



03028
5
24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE
POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CUERNAVACA, MOR., MEXICO

FALLA DE ORIGEN

“UNA RIBOZIMA ALOSTERICA”

T E S I S
Q U E P R E S E N T A
H E L E N A P O R T A D U C O I N G
P A R A O B T E N E R E L G R A D O D E
D O C T O R A E N B I O T E C N O L O G I A

1995

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 está 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.

**EL PRESENTE TRABAJO SE DESARROLLO BAJO LA ASESORIA DEL DR.
PAUL M. LIZARDI LOPEZ**

AGRADECIMIENTOS

**A MI COMITE TUTORIAL INTEGRADO POR LA DRA. ALEJANDRA
COVARRUBIAS, EL DR. EDMUNDO CALVA, EL DR. JAVIER SOBERON
Y EL DR. PAUL LIZARDI.**

**A LOS MIEMBROS DEL JURADO DEL EXAMEN DE GRADO:
DR. PAUL LIZARDI, DRA. PATRICIA LEON, DRA. SUSANA LOPEZ,
DR. ROBERTO HERNANDEZ, DR. MARIO ROCHA, DR. LORENZO
SEGOVIA Y DRA. HILDA LOMELI.**

**PARA LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO CONTE CON EL APOYO
ECONOMICO DEL CONACYT Y DE UN DONATIVO DEL "HOWARD
HUGHES MEDICAL INSTITUTE".**

*A DIEGO , MIGUEL ANGEL,
MAGADALENA, SEBASTIAN,
MAGDA, MONICA Y SEBASTIAN*

*A TODOS MIS AMIGOS QUE
AFORTUNADAMENTE, SON MUCHOS.*

CONTENIDO

1 RESUMEN

3 INTRODUCCION

LOS ARNs CATALITICOS O RIBOZIMAS

Ribozimas pequeñas

La ribozima "hammerhead"

La ribozima "hairpin"

La ribozima Delta

La ribozima de la mitocondria de *Neurospora*

Ribozimas grandes

Los intrones del grupo 1

Los intrones del grupo 2

La ribonucleasa P

Otros ARNs catalíticos

ENZIMAS ALOSTERICAS

"SWITCHES" MOLECULARES

INMOVILIZACION DEL ARN CATALITICO

28 OBJETIVOS

29 MATERIALES Y METODOS

Oligonucleótidos

ARN del SW1

Digestión con RNasa III del SW1

Reacción en cadena de la TAQ DNA polimerasa (PCR)

Transcripción *in vitro*

Cromatografía en DEAE-Celulosa del ARN sintetizado químicamente

Marcaje en el extremo 5' del ARN sintetizado químicamente

Marcaje del extremo 3' del ARN sintetizado químicamente

Geles de retardamiento

Reacción de corte del sustrato por la ribozima en presencia de 20 mM de MgCl₂ ó en presencia de 10 mM de MgCl₂

ADN y ARN ajenos al corte catalítico

Desfosforilación de ARN

Inmovilización de ARN en un soporte activado, por oxidación con periodato de sodio

3 8 RESULTADOS

"AN ALLOSTERIC RIBOZYME"

4 3 RESULTADOS ADICIONALES

Una ribozima alostérica

Tres switches moleculares

Diseño del SW1

Diseño del SW2 y del SW3

Medición de la actividad catalítica de corte de la ribozima alostérica

Experimentos de retardamiento

Actividad catalítica con Mg^{++} 10 mM

Inmovilización de la ribozima alostérica

MulFold como herramienta de predicción.

Uso de marcadores fluorescentes en ensayos que involucran ácidos nucleicos

Diseño experimental para la medición de la actividad de corte de la ribozima alostérica mediante el uso de fluorescencia.

7 3 DISCUSION

7 8 BIBLIOGRAFIA

RESUMEN

Una descripción simplista de una ribozima alostérica es la siguiente: las enzimas alostéricas tienen un sitio diferente al sitio catalítico que puede unir de manera reversible una molécula moduladora o efector positivo. El efector positivo se une a la proteína y modifica la estructura permitiendo la actividad enzimática.

En este trabajo diseñamos y demostramos el funcionamiento de una molécula de ARN que contiene una ribozima tipo "hammerhead" bajo control alostérico. Esto es una ribozima que en su estado inactivo no tiene actividad catalítica. La formación del estado activo es mediada por una interacción específica de la molécula alostérica con un oligonucleótido o efector positivo que es complementario a una región cadena sencilla de la molécula alostérica.

Hasta el momento ninguna ribozima alostérica se ha descrito en la literatura.

Para llegar a una ribozima alostérica utilizamos el motivo estructural de la ribozima "hammerhead" y el concepto de "switch" molecular.

Una ribozima es un ARN que tiene actividad catalítica en ausencia de proteínas. La ribozima "hammerhead" usada en el diseño de la ribozima alostérica es la Rz_{CAT3} descrita previamente (Hasseloff and Gerlach, 1988). El sustrato empleado es un ARN de 38 nucleótidos que comprende el sitio de corte de Rz_{CAT3} .

El "switch" molecular es una molécula de ARN que tienen básicamente dos características: 1) su estructura secundaria forma un asa y un tallo, y 2) la región cadena sencilla del "switch" puede formar un duplex con una molécula de ADN, llamado efector positivo. La doble hélice formada entre el efector y el asa es más resistente a la torsión forzando así a la separación del tallo que es más corto y relativamente menos estable, de tal modo que la apertura del "switch" puede potenciarse en presencia del efector.

La ribozima alostérica es un "switch" molecular en el cual el motivo "hammerhead" Rz_{CAT}3, forma parte del tallo del "switch". Si el "switch" molecular está cerrado la estructura secundaria del "hammerhead" se interrumpe y no hay actividad. El "switch" se abre en presencia del efector positivo y la ribozima corta específicamente. Otros ARNs o ADNs con secuencia no relacionada no funcionan como efectores alostéricos positivos.

La actividad catalítica de corte de la ribozima alostérica, también se manifiesta cuando se encuentra inmovilizada sobre un soporte sólido.

Con este trabajo se demuestra la posibilidad de crear ribozimas que se activan específicamente en respuesta a un evento de reconocimiento de una molécula diseñada artificialmente. Estas enzimas en solución e inmovilizadas pueden tener aplicaciones prácticas.

INTRODUCCION

LOS ARNs CATALITICOS O RIBOZIMAS

Una ribozima es un ARN que tiene actividad catalítica. Esta es una definición limitada y que básicamente agrupa a los ARNs que tienen actividad catalítica en presencia de cationes divalentes como el magnesio que favorece la estructuración del ARN, o la espermina que puede substituir a las proteínas celulares. Bajo este criterio los ARN catalíticos o ribozimas que se conocen son los siguientes (FIGURA 1):

1. el motivo estructural "hammerhead",
2. el motivo "hairpin",
3. la ribozima delta, y
4. el dominio de mitocondria de *Neurospora*

que en base a su tamaño son consideradas ribozimas pequeñas,

5. los intrones del grupo 1,
6. los intrones del grupo 2,
7. el componente ARN de la ribonucleasa P,

a estos tres últimos grupos se les considera las ribozimas grandes (Cech, 1993).

Además de la diferencia de tamaño entre estos dos grupos hay dos características más que las distinguen: primero, las ribozimas grandes pueden mantener su estructura, mientras que las ribozimas pequeñas solo se estructuran en presencia de su substrato, y segundo, las ribozimas grandes cortan el ARN dando como resultado un 3'-hidroxilo terminal que las distingue de las ribozimas pequeñas que cortan el ARN resultando un extremo 2',3'-fosfato cíclico.

Los ARNs con actividad catalítica, son de gran interés puesto que su descubrimiento apoya la posibilidad de un mundo primitivo basado únicamente en ARN y conforme más se conoce de ellos más se abre la posibilidad de usarlos exitosamente como agentes terapéuticos antivirales en humanos, animales y en plantas y como una herramienta para inhibir selectivamente la expresión de genes a nivel celular.

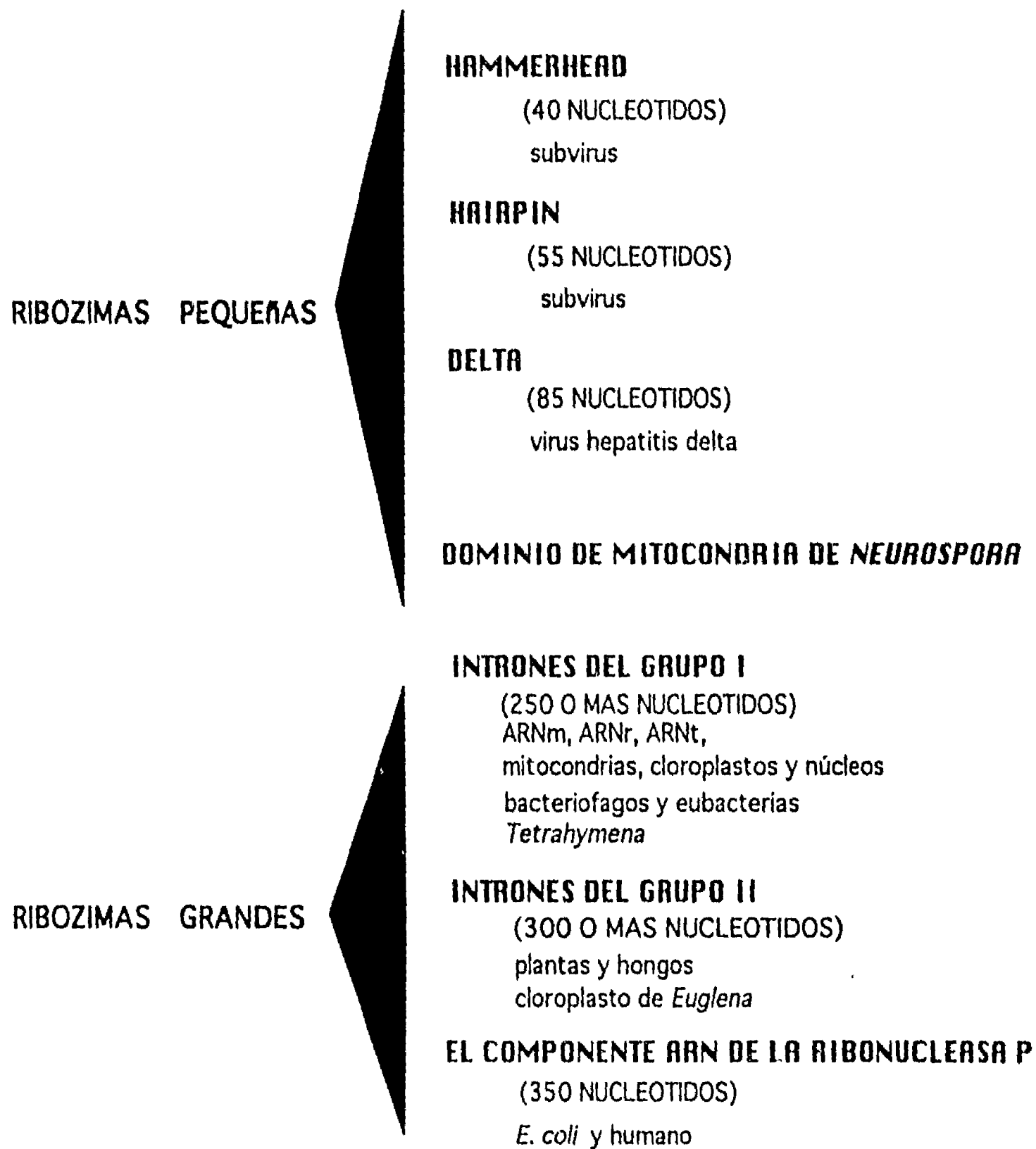


FIGURA 1. ARNs CATALITICOS.

LAS RIBOZIMAS PEQUEÑAS

Las ribozimas pequeñas comparten la característica de cortar ARN en un sitio específico como resultado del ataque de un grupo 2-hidroxilo vecino. Este corte genera un fragmento con un extremo 2',3'-fosfato cíclico y un extremo 5'-hidroxilo. Estas reacciones son parte del mecanismo de replicación de ARNs patógenos. A continuación se describen generalidades de los miembros de este grupo.

LA RIBOZIMA "HAMMERHEAD"

La observación de que algunas moléculas de ARN tienen la capacidad de cortarse rápidamente bajo condiciones en las cuales el ARN es muy estable esto es, pH neutro y bajas concentraciones de Mg^{2+} , hizo posible el descubrimiento de las ribozimas. De este corte resulta un enlace 2',3'-fosfato cíclico y un extremo 5'-hidroxilo. Esta reacción la describieron inicialmente Bruening y colaboradores (Prody, et al., 1986) quienes observaron que dímeros de ARN del satélite del virus "ringspot" de tabaco (satellite ringspot virus, sTobRV) se cortan espontáneamente en monómeros de ARN con idéntico largo (359 nucleótidos) y secuencia. La transcripción *in vitro* con SP6 ARN polimerasa de clonas de ADNc de sTobRV, se cortan a una velocidad y especificidad comparable con el del ARN de sTobRV aislado de tabaco indicando que no se necesitan proteínas accesorias. La reacción es reversible puesto que incubando en condiciones favorables los fragmentos 2',3'-fosfato cíclico y 5'-hidroxilo se ligan formando un dímero (Busayan, et al., 1986a).

Este mecanismo de corte es propio de algunos tipos de subvirus constituidos de ARN circular que se replican por "rolling circle" (Kiefer et al., 1982) (FIGURA 2). La cadena (+) del ARN se replica dando lugar a la cadena (-) concatenada. El monómero se obtiene como resultado de una autoruptura catalítica. Este mecanismo de autoescisión se ha observado *in vitro* en otros satélites de virus de plantas (Foster y Symons, 1987a y 1987b), en viroides y virusoides de plantas (Hutchings et al., 1986) y en ARN satélite de salamandra (Epstein y Gall, 1978). La reacción requiere pH de neutro a básico y un catión divalente que generalmente es Mg^{2+} pero también funciona con Mn^{2+} .

Cuando se compararon las secuencias del ARN de sTobRV, del ARN genómico del viroide "sunblotch" del aguacate (avocado sunblotch viroid, ASBV), del virus de la lucerna (lucerne transient streak virus, LSTV) y de

ROLLING CIRCLE

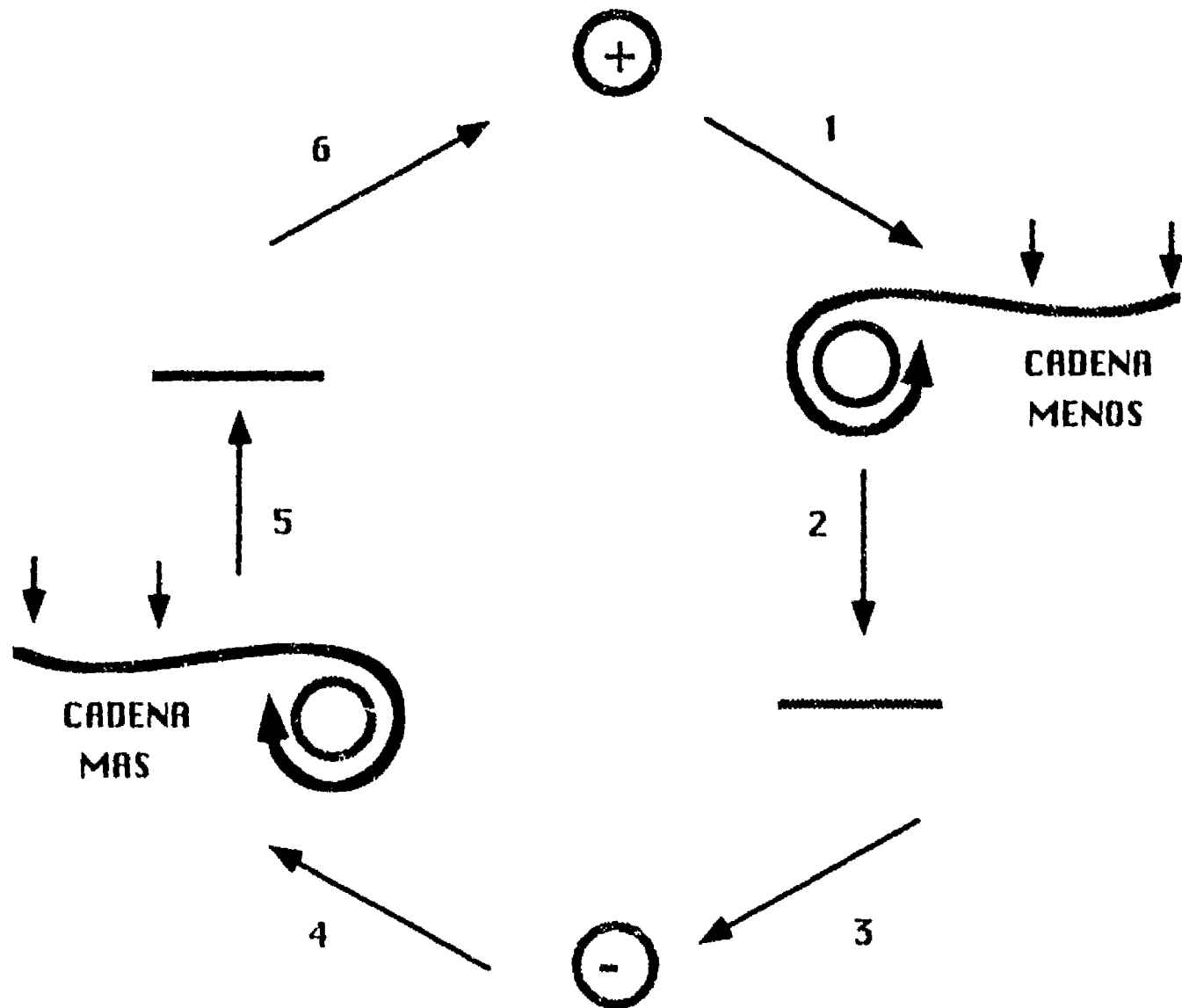


FIGURA 2. MODELO DE REPLICACION DE ARN CIRCULAR DE VIROIDES, VIRUSOIDES Y SATELITES DE ARN. 1) La cadena circular (+) se copia para formar una cadena (-) concatenada, 2) que se corta para producir el monómero. 3) El monómero se liga por la ARN ligasa del huésped. 4) La cadena circular (-) se copia por la ARN polimerasa del huésped, para producir la cadena (+). 5) La cadena (+) se corta para producir monómeros circulares.

otros ARNs patógenos de plantas se encontró una estructura secundaria común que se forma en la vecindad del sitio de corte. Esta estructura conforma el "hammerhead" y consta de un sitio de corte, tres hélices de secuencia variable que rodean al sitio de corte y una región central con secuencia conservada (FIGURA 3). Usando ARNs truncados se demostró que el motivo "hammerhead" es suficiente para cortar en presencia de Mg⁺⁺ (Busayan et al., 1986b).

La estructura y función de los motivos de ARN autocatalítico se han analizado separándolos en dos moléculas de ARN. Estos dos fragmentos de ARN bajo las condiciones apropiadas de reacción se asocian y el corte ocurre. La región del ARN que contiene el enlace fosfodiéster que se corta, se le llama sustrato. A la región de ARN que no cambia durante la reacción se le llama ribozima.

El distinguir la región catalítica del sustrato convirtió una reacción intramolecular en una reacción intermolecular de uso extensivo que puede actuar en ciclos múltiples de asociación y disociación entre el sustrato y la región catalítica.

Los requerimientos de secuencia de la ribozima "hammerhead" y de su sustrato, se han determinado con base en mutaciones. Por lo que al sustrato se refiere, la eficiencia de la actividad depende en parte de la secuencia que precede al sitio de corte. La secuencia normal es GUC. Si se cambia por GUA o GUU, la actividad no se altera básicamente. Sin embargo no hay corte después de GUG. Se observa menor actividad con CUC y aún menor con AUC y UUC (Hasseloff y Gerlach, 1988).

De la secuencia GUC conservada filogenéticamente en el sitio de corte, solo se requiere el apareamiento entre la U de esta región y la base A25 del "hammerhead" (TABLA 1 panel A). Además, nueve bases cadena sencilla con secuencia conservada en la parte central del "hammerhead" son indispensables para la actividad (C3, U4, G5, A6, G8, A9, G22, A23, y A25) (TABLA 1) (Ruffner et al., 1990; Heidenreich et al., 1994; Paolletta et al., 1992).

Una vez definido cuales ribonucleótidos deben permanecer sin cambios, varios grupos han analizado el efecto en la actividad y la resistencia a nucleasas de ribozimas y sustratos con ribonucleótidos modificados (TABLA 1). El uso de ribonucleótidos modificados, en general ha corroborado los resultados obtenidos con mutaciones. Las substituciones en ribonucleótidos que no están directamente involucrados en el corte no solo aumentan la resistencia a la degradación por ARNasas, sino también su actividad (Goodchild, 1992; Heidenreich, et al., 1994; Grasbi et al., 1993).

Las construcciones de quimeras de ribozima, es decir parte ADN y

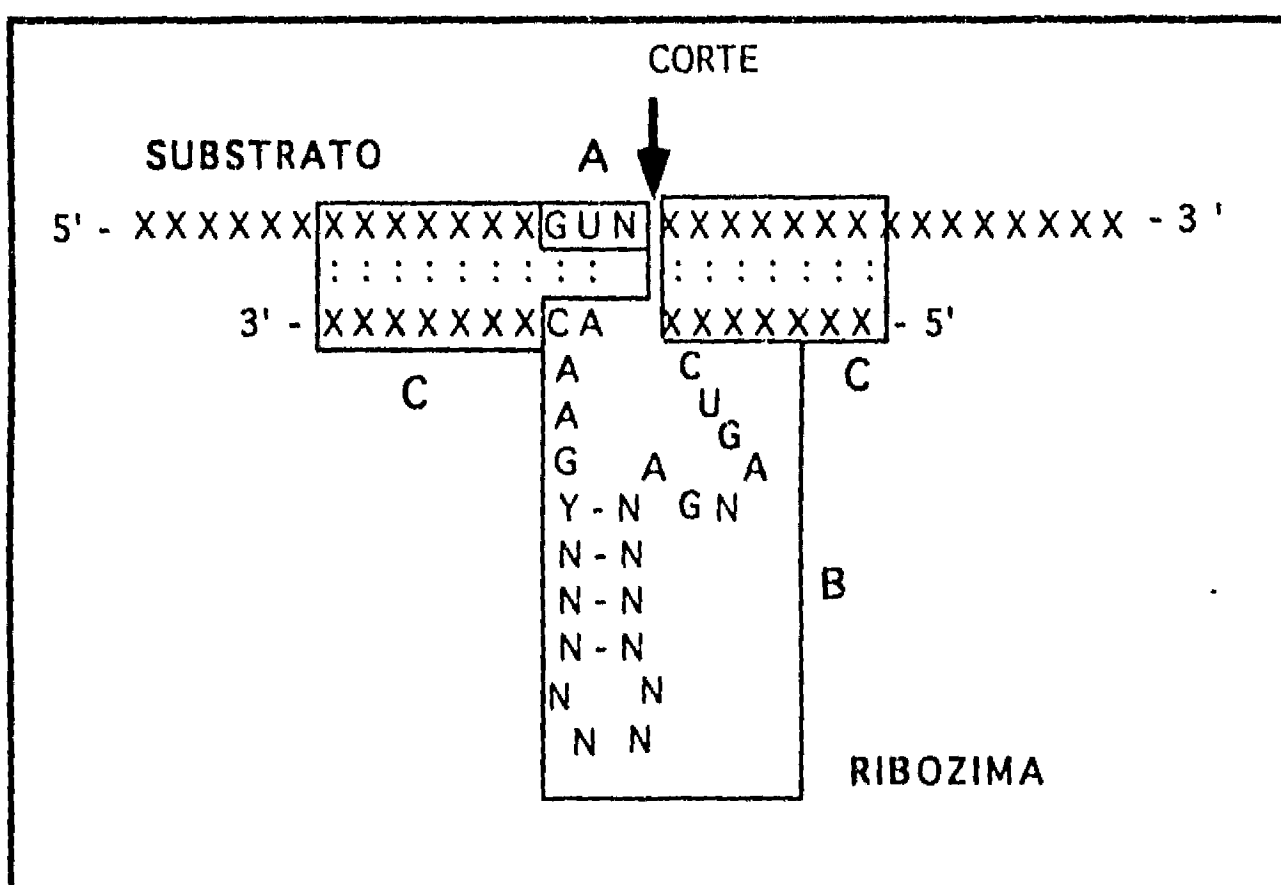


FIGURA 3. MODELO PARA EL DISEÑO DE RIBOZIMAS TIPO "HAMMERHEAD".

Se muestran los tres dominios estructurales que componen una ribozima:

A) Secuencia conservada adyacente al sitio de corte, siendo N= A, C ó U.

B) Secuencia conservada que conforma a la ribozima.

C) Secuencias apareadas entre la ribozima y el sustrato

parte ARN es otro de los enfoques explorados para obtener resistencia a nucleasas. Grupos 2'-OH en la región U4-G8 y un grupo 2'-hidroxilo adyacente al sitio de corte no pueden ser substituidos por ADN (Yang et al., 1990). Mediciones de parámetros cinéticos en presencia de varios cationes divalentes revelan que (Sawata et al., 1993): 1) si los brazos de la ribozima son ADN se incrementa la actividad de la reacción química del corte en presencia de varios cationes divalentes siendo más activa en la presencia de Mn^{2+} , 2) la interacción con diferentes cationes divalentes es similar para la ribozima quimera que para la ribozima de ARN, 3) se observa un ligero cambio en la estructura de la ribozima quimera, lo que pudiera conferirle un posicionamiento más favorable de los grupos críticos involucrados en la catálisis.

En cuanto a lo que al sustrato se refiere, una substitución 2'-O-metil-C en el sitio de corte no es sustrato de la ribozima (Paolletta et al., 1992). Esto indica la necesidad del grupo 2'-OH en el sitio de corte. Sin embargo la presencia de GUC y aún más de solo la C como ribonucleótido es suficiente para que el corte se lleve a cabo. Un efecto similar se ha observado en el caso de quimeras de ADN-ARN (Yang et al., 1990).

La reacción en la que participan dos fragmentos, al menos requiere de tres pasos: 1) unión de la ribozima y el sustrato, 2) ruptura química y 3) liberación de los productos cortados. En estos tres pasos está involucrada la formación de una hélice doble estándar de ARN. Mediciones de la velocidad de disociación del sustrato, indican que el largo de las dos hélices que forman el complejo intermolecular afectan en gran medida la velocidad general de la reacción. En una reacción de recambio múltiple, a concentraciones de saturación del sustrato, si las hélices son cortas, la reacción química de corte se vuelve el paso limitante. Las regiones ricas en A y U son más eficientes (Fedor et al., 1993) y el largo óptimo va de 11 a 15 bases en total (Herchslag, 1991).

Conforme las hélices se hacen más largas la liberación del producto es más lenta. Existe un tamaño específico y crítico en el que la liberación del producto es más lenta que la reacción química, *in vitro*. En este caso la liberación del producto se convierte en el paso limitante (Herchsalag, 1991). Cuando la secuencia de reconocimiento entre el sustrato y la ribozima se extiende más allá del límite funcional no solo disminuye la velocidad de recambio sino que pueden tolerarse bases no complementarias, perdiéndose especificidad. Sin embargo, la presencia de proteínas como la proteína p7 de la nucleocápside de VIH (p7 NC) (Tsuchihashi et al., 1993) o la proteína A1 de la partícula ribonucleoprotéica heterogénea nuclear (HNRP A1) (Rossi, 1994), pueden mejorar la eficiencia catalítica de corte en esos

casos. Cuando se usa p7 NC se observa un incremento en la actividad de 10 a 20 veces. También la presencia de la p7 NC permite a la ribozima discriminar entre sustratos que no son totalmente complementarios. La p7 NC tiene la capacidad de unirse a ADN de cadena sencilla más fuertemente que a una cadena doble y además tiene la habilidad de acelerar la asociación y disociación de oligonucleótidos. Así que el mejoramiento de la actividad catalítica de corte de la ribozima en presencia de p7 NC puede atribuirse a esa actividad de intercambio de cadenas (Tsuchihashi et al., 1993). Otro enfoque empleado para incrementar la actividad catalítica de corte de la ribozima es el empleo de 'facilitadores'. Los facilitadores son oligonucleótidos que se pueden unir al sustrato de manera contigua al extremo 3' de la ribozima. La combinación de facilitadores y ribonucleótidos 2'-O-metilados en la región flanqueadora de la ribozima confieren un aumento en la actividad de la ribozima de 20 veces y una resistencia a nucleasas de 4 veces por arriba del control. Una explicación del porqué de este aumento en la actividad es la siguiente: el apareamiento entre el facilitador y el sustrato favorecen la unión de la ribozima en el sitio correcto en el sustrato, incrementando la velocidad de asociación entre la ribozima y el sustrato, sin aumentar la velocidad de disociación. Otra alternativa es que el facilitador puede afectar la conformación del sustrato inhibiendo las interacciones que no permiten el corte, interacciones que pueden ser de tipo secundario y terciario no específicas entre dos moléculas de sustrato o el sustrato con la ribozima (Goodchild, 1992)

La ruptura del enlace fosfodiéster es una característica que comparten las ribozimas naturales. El corte químico no catalítico del enlace fosfodiéster debido a un ataque nucleofílico débil como el del hidroxilo de la ribosa o el agua, es menor a 10^{-7} min^{-1} (Ulhenbeck, 1991). Para que se lleve a cabo el corte con mayor eficiencia se requiere de una base que incremente la nucleofilicidad del grupo atacante y un ácido que protone el grupo saliente. Un complejo entre el catión divalente y los hidroxilos del medio básico pueden conformar el nucleófilo atacante. La posición del nucleófilo atacante con respecto al fosfato y la estabilización del estado de transición, contribuyen al aumento de la velocidad y se piensa que se crea un microambiente que favorece la protonación. Como resultado del corte se obtiene un enlace fosfato cíclico entre las posiciones 2' y 3' y un extremo 5' hidroxilo (Pan, et al., 1993)(FIGURA 4).

Los cationes divalentes que están involucrados en la reacción de corte no solo favorecen el doblado de la estructura del "hammerhead", sino también participan en el corte del sustrato, ya que cuando el Mg^{++} se substituye por cationes de tamaño similar o por espermidina que favorece

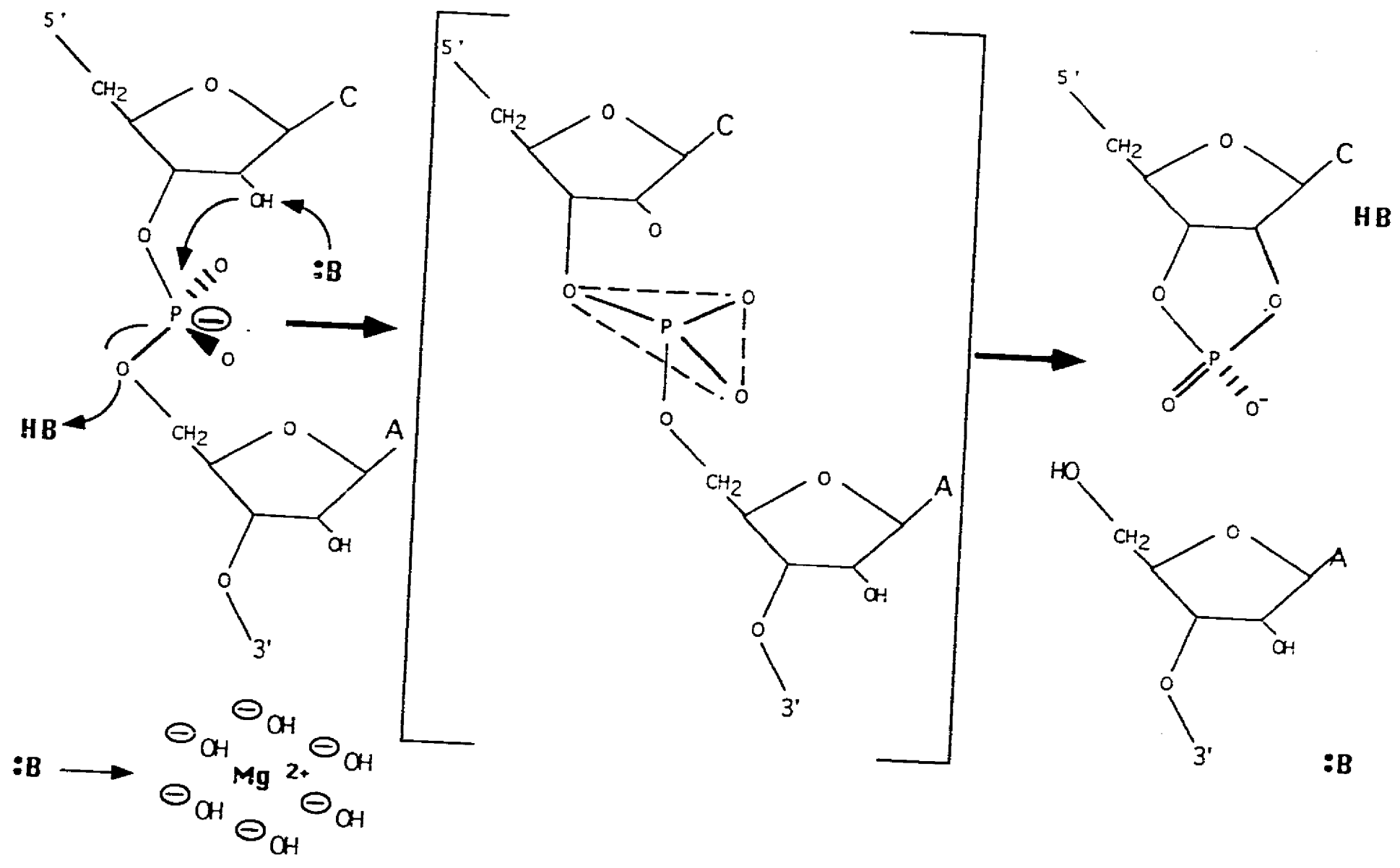


FIGURA 4. MECANISMO PROPUESTO PARA LA REACCION DE CORTE. UNO DE LOS PRODUCTOS CONTIENE UN ENLACE 2',3'- FOSFATO CICLICO Y EL OTRO UN EXTREMO 5'- HIDROXILO TERMINAL.

la estructuración del ARN, si se conforma la ribozima pero no se observa el corte. Este mismo efecto se observa en presencia de NaCl 1 M que es igualmente efectivo para estabilizar estructura secundaria del ARN (Ulhenbeck, 1987). En presencia de espermina el corte del sustrato se observa en presencia de varios cationes divalentes que incluyen Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} y Sr^{2+} . Otros cationes como el Pb^{2+} y el Ba^{2+} no estimulan el corte (Dahm, y Ulhenbeck, 1991).

Un experimento que claramente muestra la participación de un catión divalente en el mecanismo de corte emplea un "hammerhead" que tiene un fosforotioato en el sitio de corte. Cuando un grupo oxígeno pro-Rp se reemplaza por un azufre, el "hammerhead" no corta en 10 mM de $MgCl_2$ sin embargo si tiene actividad con 10 mM de $MnCl_2$. Esto es posible ya que el Mn^{2+} es más tiofílico que el Mg^{2+} (Jaffe y Cohn, 1979). Este cambio en especificidad por el metal divalente es consistente con la coordinación del ion metálico hacia el pro-oxígeno en el sitio de corte.

La actividad catalítica de corte de la ribozima "hammerhead" depende del pH. Datos experimentales indican que la velocidad de la reacción se incrementa conforme aumenta el pH de 5.5 a 8.5. Esta es una característica particular de esta ribozima puesto que en el ARN en general, no se observan rupturas a pH de 7. En el caso de la ribozima "hammerhead", si hay corte específico a pH de 7. Sin embargo, la concentración de ión hidroxido no es el paso limitante de la reacción puesto que cuando se incrementa hasta 100 veces, esto es entre pH 7 y pH 9, la velocidad de reacción aumenta solamente 4 veces (Hasseloff y Gerlach, 1988).

De manera, general podemos decir que las ribozimas "hammerhead" son ARNs de alrededor de 39 nucleótidos incluyendo la región flanqueadora del "hammerhead". Pueden ser diseñadas para cortar específicamente cualquier sustrato potencial. De estos 39 nucleótidos solamente nueve son indispensables como ribonucleótidos, siendo posible substituir el resto ya sea por desoxinucleótidos o por ribonucleótidos modificados. Ambos tipos de substituciones confieren mayor actividad y protección contra nucleasas ampliándose así su rango de utilidad.

LA RIBOZIMA "HAIRPIN"

El dominio catalítico llamado "hairpin" es parte de la secuencia de la cadena negativa del ARN satélite del virus "ringspot" (sTobRV) (Hampel et al., 1990). El complejo catalítico está compuesto de 50 nucleótidos correspondientes a la región catalítica y 14 nucleótidos que comprenden el

substrato que juntos se doblan en una estructura tipo "hairpin". La región de reconocimiento entre el dominio "hairpin" y el substrato conforman cuatro hélices. Las hélices uno y dos se forman entre la ribozima y el substrato. Las hélices tres y cuatro conforman el "hairpin". Este modelo se ha probado mediante experimentos de mutagénesis (Anderson et al., 1994). La secuencia requerida para la formación de las hélices 1 y 2 entre el "hairpin" y el substrato se presentan en la FIGURA 5. Tres nucleótidos de esta región adyacentes al sitio de corte (GUC) no pueden ser cambiados. La actividad catalítica se conserva cuando las bases de estas hélices se cambian pero se conservan apareadas, de tal manera que se pueden diseñar ribozimas "hairpin" para catalizar el corte de ARN heterólogo. Las hélices 3 y 4 requieren cuatro y tres nucleótidos respectivamente, sin embargo la hélice 4 puede extenderse sin que se pierda la actividad. La ribozima "hairpin" presenta una actividad óptima a 37 °C, baja sal y pH neutro (Hampel, et al., 1990).

LA RIBOZIMA DELTA

El genoma del virus de la hepatitis delta es ARN circular de cadena sencilla de 1.7 kilobases. Fragmentos de este ARN circular poseen actividad autocatalítica de corte. El tamaño mínimo activo es de 84 nucleótidos (Perrota y Been, 1990).

Este ARN tiene la habilidad de autocortarse completamente en 15 minutos o menos, a 37 °C empleando requerimientos menores de Mg^{++} que las otras ribozimas. El autocorte requiere de 500 μM de Mg^{++} o Ca^{++} . En presencia de EDTA la actividad se inhibe, implicando que el Mg^{++} se requiere para la actividad catalítica. La ribozima delta es activa en un rango de pH que va de 5 a 9.1 (Wu et al., 1989).

La actividad catalítica de la ribozima delta aumenta en presencia de 50% de formamida (Rosenstein y Been, 1990). De manera similar, la actividad se incrementa en presencia de urea 5 M, pero se inhibe a 10 M, probablemente debido a que estas son condiciones altamente desnaturizantes. Los agentes desnaturizantes modifican la estructura del ARN cambiandola a una forma más activa. Una delección en la region 3' la inactiva, sin embargo la actividad se recupera al elongar la region 5', lo que sugiere que la ribozima puede adquirir más de una estructura activa (Gottlieb, 1994).

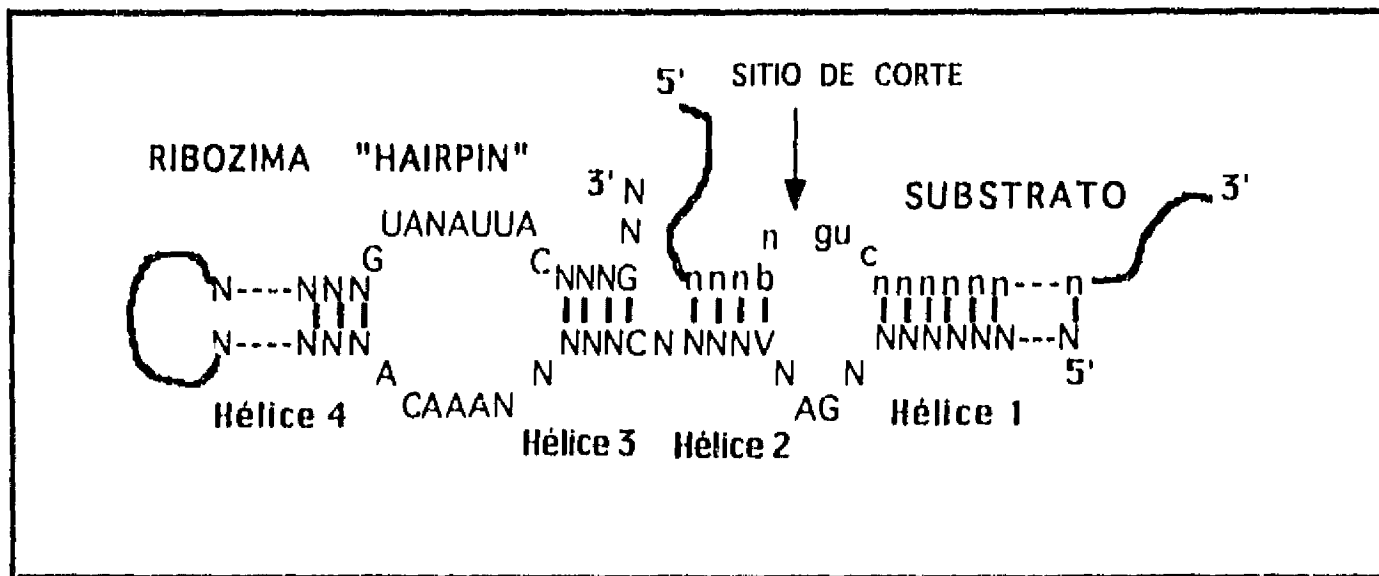


FIGURA 5. ESTRUCTURA SECUNDARIA DE LA RIBOZIMA "HAIRPIN". Se muestra el dominio "hairpin" unido al ARN sustrato. La b es c, u, ó g y la V es G, A ó C

LA RIBOZIMA DE LA MITOCONDRIA DE *NEUROSPORA*

El genoma de la mitocondria de *Neurospora* codifica un ARN denominado VSRNA de aproximadamente 881 nucleótidos de cadena sencilla. El VSRNA sintetizado *in vitro* tiene actividad autocatalítica de corte que genera un fragmento con un extremo 2',3'-fosfato cíclico y un extremo 5'-hidroxilo. Esta reacción puede estar involucrada en el proceso natural de formación de multímeros de VSRNA *in vivo*. El VSRNA no tiene estructuras similares al "hammerhead" o a cualquier otro ARN autocatalítico conocido, lo que sugiere que la estructura de ARN involucrada en este corte es novedosa (Saville y Collins, 1990).

LAS RIBOZIMAS GRANDES

Los genes de organismos eucariotes, particularmente, más no exclusivamente, tienen sus regiones codificadoras o exones, interrumpidas por regiones no codificadoras o intrones. El ARN transcrito de estos genes contiene los intrones, los cuales se remueven por un proceso de edición conocido como "splicing". Los intrones se clasifican en al menos 4 grupos basados en la presencia de secuencias conservadas y en sus estructuras de ARN. De estos grupos solo los intrones del grupo I y los intrones del grupo II, se autocortan.

LOS INTRONES DE GRUPO I

Los intrones de grupo I (250 o más nucleótidos) pueden ser reconocidos en base a su estructura secundaria la cual presenta una región central común que se conforma en base a varias regiones apareadas. Los nucleótidos conservados siempre se encuentran en la misma posición. El sitio 5' del corte del exón se aparea con lo que se denomina la secuencia guía interna en el intrón (IGS). En algunos casos también el sitio de corte 3' del exón se encuentra apareado a la secuencia guía lo que acerca a los extremos de los exones facilitando su ligación. La otra característica que los distingue es el mecanismo de "splicing" (FIGURA 6): el corte se lleva a cabo mediante dos reacciones de esterificación que emplean a una guanosina como el grupo atacante (nucléofilo) para el primer paso. Luego el extremo 3'-OH del exón 5' ataca el fosfato del extremo 3' del intrón, separando al intrón del exón

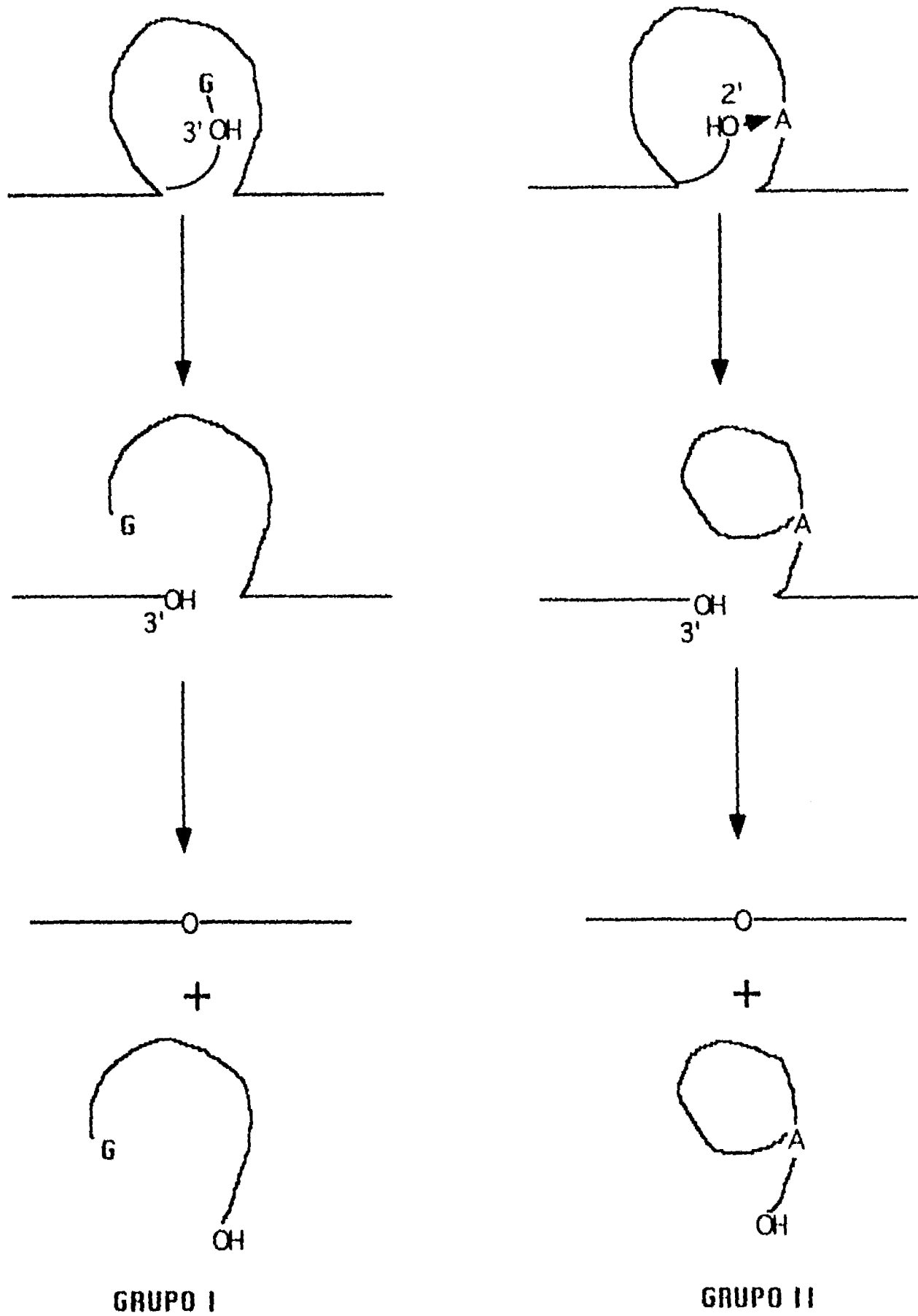


FIGURA 6. MECANISMO DE "SPLICING" PARA LOS INTRONES DEL GRUPO I Y DEL GRUPO II. La línea curva representa a los intrones. La línea recta representa a los exones flanqueadores.

3'. Más de una docena de intrones del grupo I son autocatalíticos *in vitro*, lo que quiere decir que pueden cortar y ligar específicamente en ausencia de proteínas. Actualmente se conocen alrededor de un ciento de otras secuencias homólogas (Ulhenbeck, 1991; Cech, 1993).

En algunos casos de "splicing" *in vivo* de intrones del grupo I, se requiere de proteínas, como madurasas para el pre-ARNm del citocromo b de mitocondria de levadura, y la tirosil-ARNt sintetasa de *N. crassa*. Estas proteínas se unen directamente al sitio catalítico del intrón llevándose a cabo el "splicing" solo en su presencia. En este caso el mecanismo de corte es el mismo y la estructura del ARN es la que provee el sitio de unión de la guanosina. Este sistema muestra que las proteínas pueden facilitar una reacción catalizada por ARN. Encontramos intrones del grupo I en genes de ARNm, ARNr y ARNt, en mitocondrias, cloroplastos y núcleos de muchas especies eucariotas pero no en vertebrados. También se encuentra presente en el bacterifago T4 y en eubacterias (Cech, 1993).

LOS INTRONES DEL GRUPO II

Los intrones del grupo II también se clasifican en base a su estructura secundaria que consta de seis hélices que se encuentran unidas a una región circular central. Algunos de ellos continen marcos abiertos de lectura que codifican para una proteína similar a una transcriptasa reversa.

Aunque se conocen cerca de 70 intrones del grupo II, solamente algunos de ellos funcionan *in vitro*, demostrando que el ARN estructurado puede llevar a cabo el "splicing" en ausencia de proteínas. Sin embargo requiere de condiciones extremas que ya no son fisiológicas: 100 mM de $MgCl_2$ y 500 mM de $(NH_4)_2SO_4$ a 45 °C. Bajo estas condiciones la reacción procede 10 veces más lenta que la de los intrones del grupo I.

La reacción de "splicing" de los intrones del grupo II, incluye dos pasos de transesterificación: primero, un grupo hidroxilo único en el intrón inicia el ataque en el sitio 5' del corte y forma un enlace fosfodiéster ramificado ("lariat"). El segundo paso involucra el ataque del 3' hidroxilo del exón 5' que ataca en el sitio 3' del corte (FIGURA 6).

Todos los intrones del grupo II conocidos pertenecen a organelos de eucariotes, incluyendo a los cloroplastos y las mitocondrias de plantas y hongos (Cech, 1993).

LA RIBONUCLEASA P

El único ARN catalítico que actúa *in vivo* como una enzima en el sentido de recambio es la ribonucleasa P. A nivel celular, esta enzima actúa como una ribonucleoproteína, pero al menos en el caso de eubacterias es la subunidad de ARN la que lleva a cabo la catálisis.

La reacción que lleva a cabo la ribonucleasa P, involucra el corte de un grupo de nucleótidos del extremo 5' del precursor ARNt para dar lugar al ARNt maduro. La ribonucleasa P corta mediante hidrólisis generando un 5'-fosfato y un 3'-hidroxilo terminal.

La holoenzima de *E. coli* consiste de un ARN de 377 nucleótidos (M1 ARN) y una proteína de 13.8-kD (C5). En condiciones de alta sal, la subunidad de ARN funciona *in vitro*, cortando el pre-ARNt en el sitio correcto con múltiple recambio. La proteína C5 permite que la reacción se logre eficientemente bajo condiciones iónicas fisiológicas.

La actividad de ribonucleasa P en el núcleo y las mitocondrias de los hongos y los vertebrados solo puede funcionar como ribonucleoproteína. Su secuencia difiere de la de la ribonucleasa P de eubacterias. Una explicación es que la proteína actúa estabilizando la estructura secundaria del ARN (Cech, 1993).

OTROS ARNs CATALITICOS

La definición de ARN catalítico básicamente se ha restringido a los intrones que se autoescinden, a la ribonucleasa P y a los elementos autocatalíticos del ARN infeccioso. La actividad de estas ribozimas involucra únicamente la transesterificación o hidrólisis de enlaces fosfodiéster.

Actualmente existen algunas evidencias que indican que la catálisis del ARN no solo está restringida a los grupos mencionados. Por ejemplo, los fosfatos monoésteres en el extremo 3' del ARN son también sustratos para el intrón de tipo I de *Tetrahymena* (Zaug y Cech, 1986). El fosfato sustrato puede transferirse al extremo 3' de la ribozima formando un enlace covalente fosfo-enzima. Posteriormente se lleva hasta el extremo 3'-O de un oligonucleótido aceptor o se puede hidrolizar en condiciones de pH ácido.

Las ribozimas también pueden catalizar el ataque de un grupo 3'-OH en el α -fosfato de un grupo 5'-trifosfato, formando un enlace 3', 5'-fosfodiéster liberando pirofosfato. Esta reacción es muy interesante porque

es la forma en la que las ADN, las ARN polimerasas y las replicasas actuales llevan a cabo la polimerización de la cadena de nucleótidos. Una ribozima del grupo de intrones de tipo II tiene esta actividad (Morl et al., 1992).

Lo más novedoso acerca de las ribozimas es la selección *in vitro* de secuencias de ARN funcionales. El método se basa en la selección de ácidos nucleicos capaces de unir específicamente un ligando o de poseer una actividad específica, partiendo de una librería con secuencia aleatoria. La clave de este método es el uso de ciclos de selección *in vitro* que enriquecen la librería para un ARN con las características deseadas, seguido de la amplificación de las moléculas seleccionadas. Un ciclo de selección y amplificación puede repetirse cuantas veces sea necesario hasta aislar una población de moléculas con las características deseadas que se clonan y analizan individualmente. Con este método se han seleccionado ARNs con afinidad a colorantes orgánicos y otros ligandos como aminoácidos. Este método hace posible la selección de ARN catalíticos con afinidad por análogos de estados de transición de una transformación química, lo que permite el aislamiento de nuevas ribozimas (Szostack and Ellington, 1993).

Un ejemplo de una ribozima con actividad catalítica novedosa seleccionada *in vitro*, es una variante de la ribozima de *Tetrahymena* que puede cortar un substrato ADN cadena sencilla bajo condiciones fisiológicas. Esta enzima corta con una eficiencia cien veces mayor que la enzima nativa (Beaudry y Joyce, 1992).

Todas las reacciones mencionadas arriba se llevan a cabo utilizando fósforo como elemento central. Pero las ribozimas también puede catalizar reacciones donde el carbono es el elemento central. Un oligonucleótido que puede aparearse con la IGS de la ribozima de *Tetrahymena*, y que termina en un 3' (2') aminoacil ester se deacila 15 veces más rápido que la reacción no catalizada. Esta reacción también requiere de Mg^{++} y secuencias del centro catalítico de la ribozima (Picirilli et al., 1992).

Otro ejemplo de la actividad del ARN sobre carbono involucra al ARN ribosomal 23S. En la síntesis de proteínas la reacción de la peptidil transferasa parece estar mediada por la actividad de un ARN. La subunidad 50s ribosomal de *E. coli* y de *Thermus aquaticus* mantienen la actividad de formación del enlace peptídico después de tratamientos con proteinasa K y SDS, y pierde la actividad después de la extracción con fenol-cloroformo o en presencia de EDTA. La actividad se atribuye a la peptidil transferasa ya que la reacción es inactivada con cloramfenicol y carbomicina que son antibióticos inhibidores específicos de esta enzima. Pero el punto más importante es que no hay actividad después de tratar a la subunidad ribosomal

con ribonucleasa T1, lo que sugiere que la actividad de peptidil transferasa radica en el ARN ribosomal 23S (Noller et al., 1992).

Otro ejemplo de selección *in vitro* de una ribozima con actividad catalítica novedosa la reportaron Prudent y colaboradores (1994) quienes seleccionaron de una biblioteca de ARN una ribozima que tuviera la habilidad de catalizar la isomerización de un puente difenilo. La reacción se lleva a cabo con recambio múltiple. El ARN seleccionado acelera la reacción 88 veces sobre la ausencia de catálisis y aparentemente solo 25 nucleótidos tienen un papel estructural y catalítico en la reacción.

Recientemente se reportó una ribozima nueva con actividad de polinucleotidilcinasa (Lorsch y Szostack, 1994). Se partió de una biblioteca de ARN previamente seleccionada por su capacidad de unirse a ATP. Estos ARNs tienen el dominio del sitio de unión a ATP flanqueado por tres regiones con secuencia aleatoria. Partiendo de esta biblioteca se seleccionaron varias ribozimas polinucleotidilcinasas dependientes de ATP. Algunas de ellas catalizan la transferencia intramolecular de un γ -tiofosfato del ATP- γ S a su extremo 5'-hidroxilo, mientras que otras lo hacen al 2'-hidroxilo. Una versión modificada por ingeniería genética, del grupo 5'-hidroxilo puede catalizar la transferencia del tiofosfato del ATP- γ S a el 5'-hidroxilo de un oligoribonucleótido exógeno, con recambio de 10 veces/hora a 23 °C.

Otro ejemplo de una ribozima que tiene actividad sobre un centro carbono es una variante de ribozima del grupo I que cataliza el corte de un grupo amida que forma parte de un oligodesoxinucleótido. Esta enzima es producto de experimentos de selección *in vitro*, sin embargo es impactante el hecho de que una ribozima sea capaz de cortar enlaces fosfodiéster de ARN y ADN al igual que enlaces amida (Dai et al., 1995).

La habilidad que tiene el ARN de adoptar una gran variedad de formas, favorece la idea de que su actividad catalítica puede ser muy diversa en la naturaleza. Además con las técnicas de evolución y selección *in vitro* se podrán buscar ribozimas nuevas y más activas, que ayudarán a conocer más acerca del papel del ARN en la evolución molecular además de la posibilidad de emplearlas en la biotecnología actual.

LAS ENZIMAS ALOSTERICAS

Las enzimas alostéricas son enzimas cuya regulación se basa en cambios conformacionales en su estructura terciaria. La modulación

alostérica está acompañada por efectores alostéricos que son moléculas que pueden incrementar (efectores positivos o activadores alostéricos) o disminuir (efectores negativos o inhibidores alostéricos) la velocidad de la reacción enzimática. Los efectores en general, son moléculas diferentes al sustrato que se unen reversiblemente en un sitio diferente al sitio de unión del sustrato llamado sitio alostérico. Además el sitio de regulación alostérica y el sitio catalítico se encuentran localizados en subunidades diferentes. Las enzimas alostéricas pueden tener varios sitios de unión de efectores tanto positivos como negativos. Este mecanismo de regulación es propio de enzimas claves del metabolismo que les permite activarse catalíticamente en el lugar y en el momento preciso.

La regulación alostérica de la actividad de una enzima se atribuye a la transición de la conformación de la proteína entre un estado activo y otro inactivo. Los modelos propuestos para explicar la regulación alostérica proponen un cambio conformacional en el cual la enzima puede pasar de un estado tenso (T) a un estado relajado (R). La afinidad del estado T por el sustrato es baja, sin embargo el estado R tiene una gran afinidad por el sustrato. La unión de un efector positivo promueve que el equilibrio entre el estado tenso y el estado relajado se incline hacia el estado relajado y por el contrario la unión de un efector negativo promueve el estado tenso (Monod et al., 1965; Koshland et al., 1966). Mediante estudios cristalográficos, se han podido identificar dos conformaciones diferentes en varias enzimas reguladas alostéricamente. Un ejemplo específico de la regulación en base a un cambio conformacional es el descrito por Koide y colaboradores (1992). Ellos demostraron con base en técnicas de ingeniería de proteínas y resonancia magnética nuclear (NMR) que la regulación alostérica de la actividad de la L-lactato deshidrogenasa de *Thermus caldophilus* está asociada a un cambio conformacional entre un estado de alta afinidad (R) y otro de baja afinidad (T).

Por otro lado, con base en técnicas de mutagénesis dirigida se han podido identificar aminoácidos implicados en la regulación alostérica de diversas enzimas, (Berger y Evans, 1992; Li et al., 1993). La identificación de estos aminoácidos conducen a desarrollar experimentos en los que se puede convertir una enzima no alostérica en una enzima alostérica. Tal es el caso de la aspartato transcarbamoilasa de *Bacillus subtilis* que con una sustitución sencilla de un aminoácido, incrementa su actividad hasta un 230% más que la enzima silvestre como respuesta a la presencia de succinato (Stebbins y Kantrowitz 1992). La conversión de esta enzima fué aparentemente sencilla probablemente debido a su parecido en secuencia y estructura terciaria con la aspartato transcarbamoilasa de *E. coli* que sí

es una enzima alostérica. Sin embargo, hasta la fecha no existen reportes de enzimas alostéricas sintéticas.

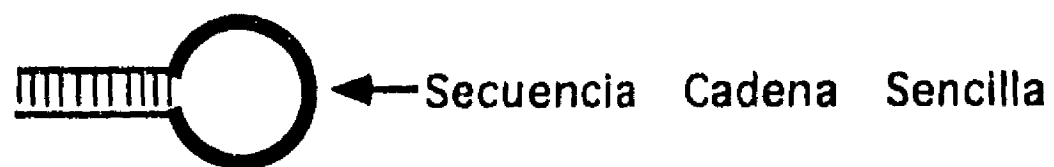
El concepto de alosterismo visto como la presencia de actividad catalítica como consecuencia de la unión reversible de un efector positivo en un sitio diferente al sitio catalítico, puede extrapolarse a los ARNs con actividad catalítica o ribozimas. El ARN tiene la habilidad de adoptar una gran variedad de estructuras y por lo tanto es posible diseñar un ARN que pueda cambiar su conformación en presencia de otra molécula diferente que bien puede ser un polinucleótido o una proteína. Si parte de la molécula de ARN es una ribozima, cuando la molécula de ARN se encuentre en su estado tenso la ribozima será inactiva. En presencia de una molécula efectora la conformación del ARN cambiará a su forma relajada y la ribozima se activará. El cambio conformacional de la ribozima alostérica inactiva a su forma activa puede llevarse a cabo como consecuencia de un evento de hibridación entre la ribozima inactiva y un oligonucleótido o efector positivo. Desde este punto de vista, la síntesis *in vitro* de una ribozima alostérica, basada en la hibridación de ácidos nucleicos, teóricamente es más sencilla que la síntesis de una enzima alostérica.

Para llegar a una ribozima alostérica analizaremos el concepto de "switch" molecular.

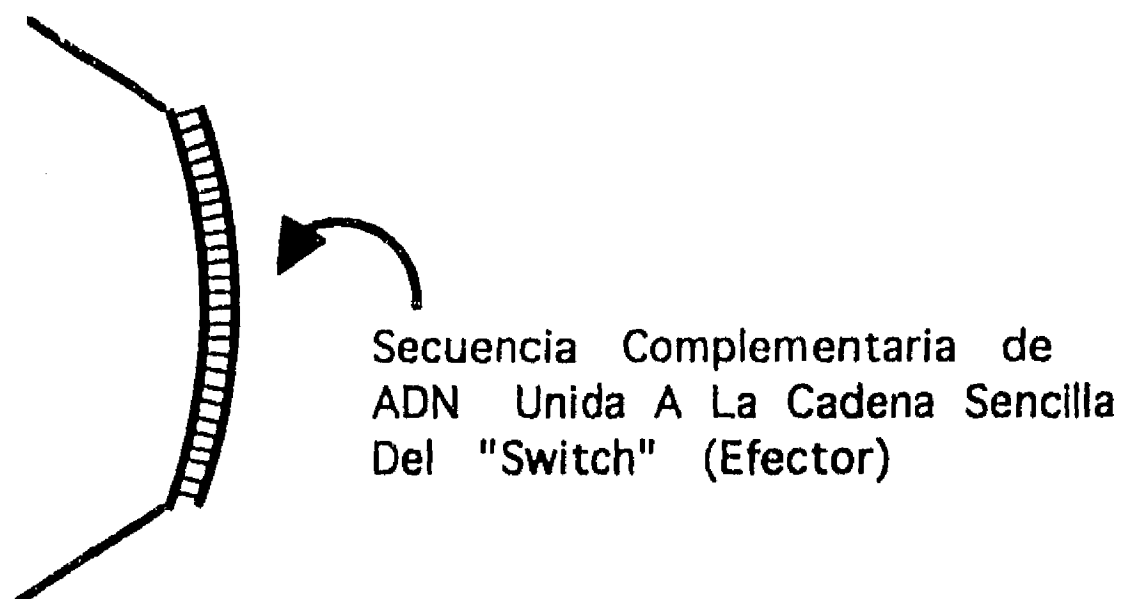
LOS "SWITCHES" MOLECULARES

Con el objeto de disminuir el ruido de fondo en un ensayo de diagnóstico basado en la actividad de Q-beta replicasa, Kramer y Lizardi (1989) diseñaron sondas de ARN que tienen la capacidad de adquirir un cambio conformacional en presencia de su blanco. Debido a la posibilidad de al menos dos diferentes estados conformacionales: uno activo y otro inactivo, a este ARN se le llama "switch" molecular.

Un "switch" molecular está formado por la secuencia de la sonda flanqueada por dos regiones cortas con secuencia complementaria, que pueden formar un híbrido entre sí conformando un tallo. Cuando la secuencia de la sonda hibrida con su blanco, se forma un duplex de mayor tamaño y más resistencia a doblarse que el tallo (Shore et al., 1981; Haggerman, 1988), que obliga al tallo a adquirir una conformación de cadena sencilla (FIGURA 7). El tallo puede enmascarar alguna secuencia reconocible por otra molécula como el sitio de unión del fago R17, un templado para la Q-beta replicasa etc. Al cambiar la conformación del "switch", el sitio enmascarado se expone y se adquiere la conformación activa.



CONFORMACION INACTIVA



CONFORMACION ACTIVA

FIGURA 7. "Switch" molecular.

Aplanamiento de
la estructura secundaria
de la ribozima

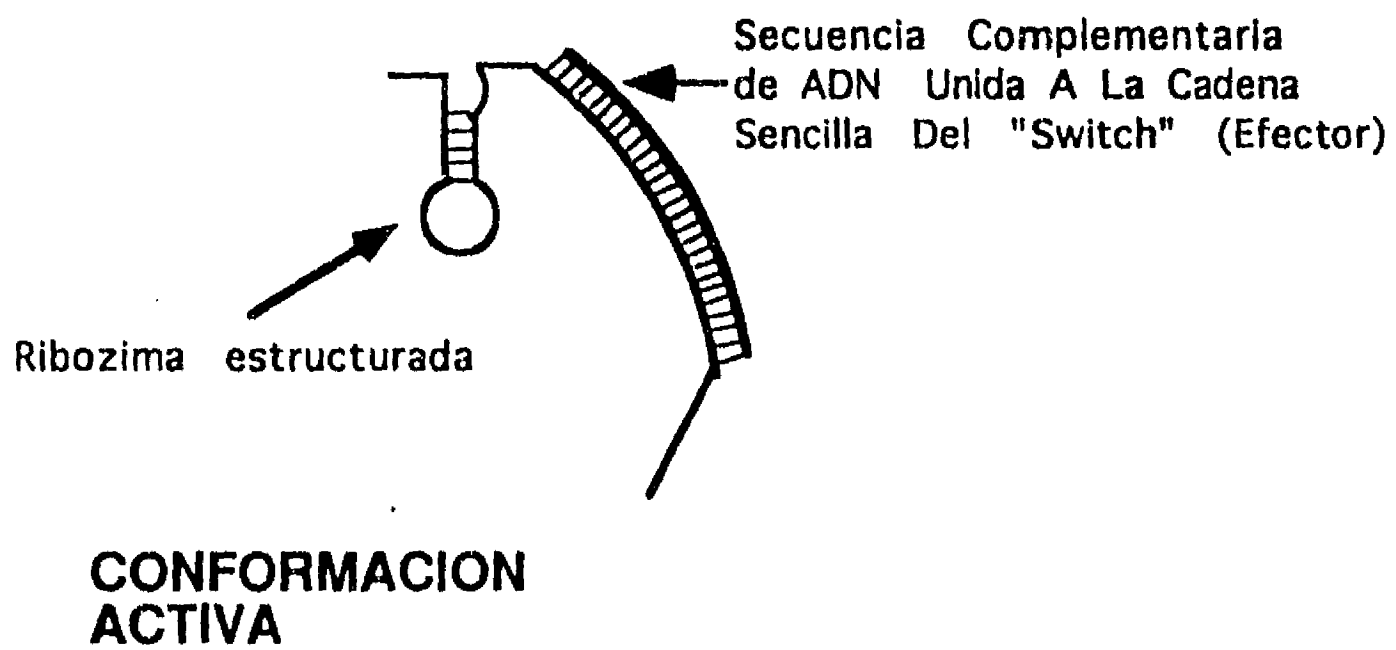
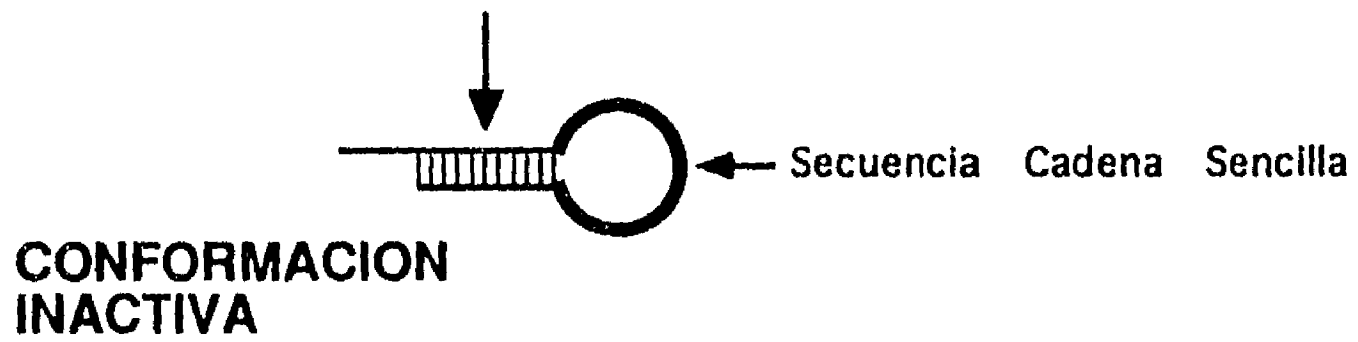


FIGURA 8. Modelo de ribozima alostérica basado en un "switch" molecular.

El "switch" molecular por ser un polinucleótido, permite cierta flexibilidad de diseño de tal forma que la secuencia de una ribozima puede formar parte del tallo. En presencia de un oligonucleótido con secuencia complementaria a la región cadena sencilla del "switch", hay un cambio conformacional que en teoría libera a la ribozima y le permite activarse (FIGURA 8).

Los "switches" moleculares tienen un tamaño moderado por lo tanto una ribozima pequeña, resulta más adecuada para el diseño de una ribozima alostérica basado en un "switch" molecular. La ribozima "hammerhead" es la más pequeña de todas las ribozimas conocidas y de la que más información se tiene, por lo tanto es el mejor modelo hasta el momento, para desarrollar una ribozima alostérica.

INMOVILIZACION DEL ARN CATALITICO

La inmovilización de ácidos nucleicos es una metodología ampliamente utilizada que permite la purificación o identificación de proteínas catalíticas y no catalíticas en base a su unión específica con el ARN inmovilizado. Algunos ejemplos lo constituyen la identificación de las proteínas ribosomales que interaccionan con el ARN 5S y 5.8S (Fanhestock y Nomura, 1972).

El ARN puede inmovilizarse sobre matrices que tienen grupos amino, mediante la oxidación de sus grupos vecinales 2' y 3' hidroxilo, con *meta*-periodato de sodio (Hermanson et al., 1992) (FIGURA 9).

Este procedimiento fué exitoso para inmovilizar ribozimas. Por ejemplo, la subunidad catalítica de la ribonucleasa P de *E.coli* (M1) (ver Ribonucleasa P en esta Introducción), se ha inmovilizado y conservado su actividad uniendo su extremo 3' a una matriz de agarosa. El ARN M1 es activo en solución en ausencia del componente proteínico C5 de la ribonucleasa P, pero inmovilizado requiere dicho componente para su actividad. Columnas hechas con el ARN M1 inmovilizado se emplean con éxito en la purificación en un solo paso de C5 (Vioque y Altman, 1986).

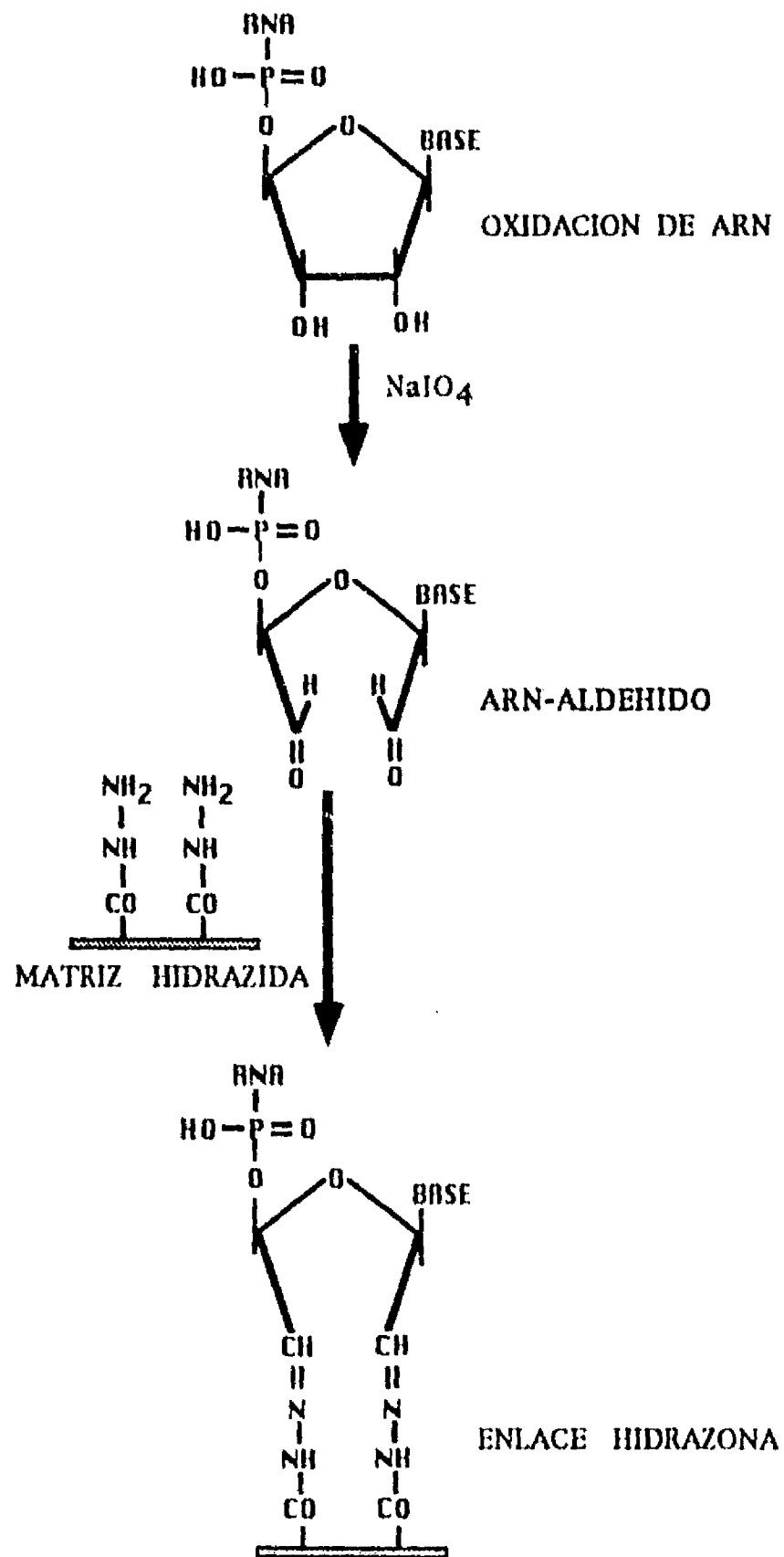


FIGURA 9. SECUENCIA PARA LA PREPARACION DE ARN INMOULIZADO.

OBJETIVOS

1. Las enzimas alostéricas son activas o inactivas como consecuencia de la unión reversible de una molécula moduladora a un sitio diferente al sitio catalítico. La habilidad que tiene el ARN de adoptar una gran variedad de formas, abre la posibilidad de aplicar el concepto de alosterismo a los ARNs con actividad catalítica, es decir una ribozima cuya actividad se manifiesta cuando el ARN adquiere un cambio conformacional como respuesta a la unión de una molécula de ADN o ARN, en un sitio que no es el catalítico.

En base a lo anteriormente indicado, el principal objetivo de este trabajo fue diseñar, sintetizar y demostrar el funcionamiento de una ribozima alostérica, esto es una molécula de ARN con actividad catalítica de corte sobre un ARN substrato, que funciona solamente en la presencia de un efector positivo que en este caso es un oligonucleótido.

2. La inmovilización de ARN con actividad catalítica, es aplicable a la ribozima alostérica, con la ventaja de ampliar los posibles usos de este sistema. Así pues, el segundo objetivo de este trabajo fue la inmovilización de la ribozima alostérica,

3. El empleo de marcadores fluorescentes es una alternativa factible para detectar la actividad de la ribozima alostérica de una manera directa, rápida y sin emplear radioactividad.

Como tercera parte de este trabajo se plantea un esquema experimental que no se ha implementado pero que definitivamente abre la posibilidad de emplear marcadores fluorescentes en ensayos que involucren la actividad de una ribozima alostérica.

MATERIALES Y METODOS

OLIGONUCLEOTIDOS

Para el SW1 se emplearon los oligonucleótido SW1-1, SW1-2, SW1.PCR1, SW1.PCR2, el efector positivo y neutro del SW1. El oligonucleótido SW3 es el templado para la obtención del ARN SW3 por transcripción.

Los oligonucleótido SW1-1, SW1-2, SW3 se sintetizaron en Operon Technology, el resto, se sintetizaron en la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología

SW1-1.

GGGCCGGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGTCCTCACGGACTCATCAGGG-
CAGAATGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAG

SW1-2.

CCGCGCGGTAGGTTCCATGTTTCGTCCTCACGGACTCATCAGGGCAGAATCGC-
CAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGA.

SW1.PCR-1.

GGGCCGGAATTCTAATACG

SW1.PCR-2.

CCGCGCGGTAGGTTCCATG

efector positivo-SW1.

CGCCAAGCUUGCAUGCCUGCAGGUCGACUCUAGAGGAUCC

EFECTOR NEUTRO-SW1.

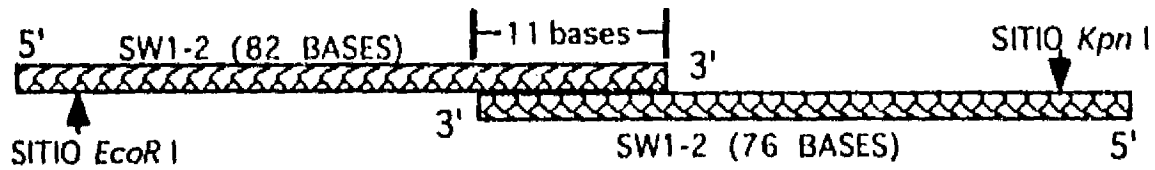
CAATACATACAGACAATGGAAACAGCAATTTCCACCAGTAC

SW3.

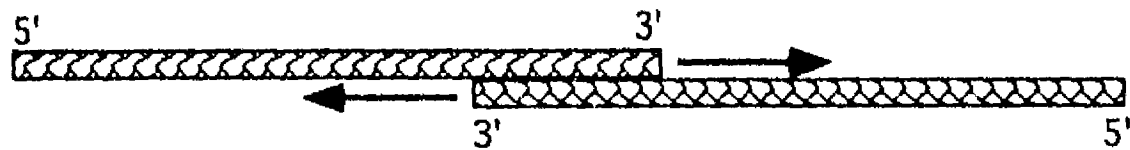
CCCTTCCATGTTTCGTCCTCACGGACTCATCAGGGCAGAATATTACGCCAAG-
CTCGCATCCCTGCAGGTGTA CTCTGCCCTGATGAGTCCCTATAGTGAGTCGTA-
TTA.

La secuencia del resto de los oligonucleótidos empleados en este trabajo se detallan en la sección "Oligonucleotides" en

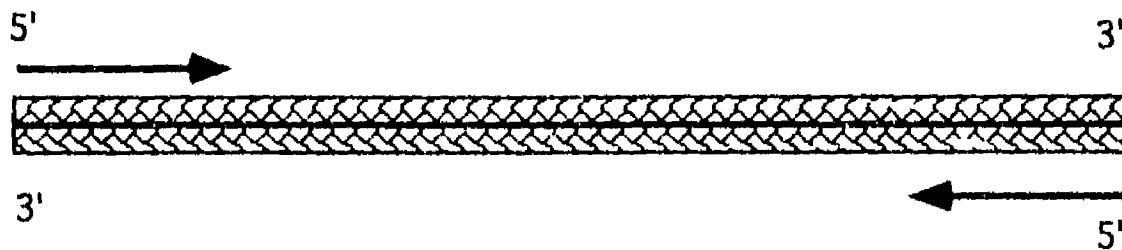
1. APAREAMIENTO DE LA REGION COMPLEMENTARIA ENTRE LOS OLIGONUCLEOTIDOS SW1-1 Y SW1-2



2. EXTENSION CON EL FRAGMENTO KLENOW



3. AMPLIFICACION CON Taq polimerasa



4. DIGESTION CON EcoR I Y Kpn I



5. CLONACION EN pUC19 EcoR I-Kpn I

6. PURIFICACION DEL ADN DE LA CLONA pUC19-SW1

7. LINEARIZACION Y TRANSCRIPCION *in vitro* CON T7 RNA polimerasa

FIGURA 10. ESQUEMA GENERAL DEL DISEÑO PARA OBTENER ARN DEL SW1.

"Experimental protocol" del Artículo.

ARN DEL SW1

El ARN del SW1 se obtuvo mediante transcripción *in vitro* con la T7 ARN polimerasa. El templado para la transcripción (FIGURA 10) lo obtuvimos utilizando dos oligonucleótidos denominados SW1-1 de 82 nucleótidos, con un sitio para *EcoR* I en el extremo 5' y el SW1-2 de 76 nucleótidos, con sitio para *Kpn* I en el extremo 5'. Estos oligonucleótidos se complementan por 11 nucleótidos en su región 3'. Los oligonucleótidos se aparearon y se extendieron utilizando el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I. La doble cadena se amplificó con Taq polimerasa, se cortaron los extremos con *EcoR* I y *Kpn* I y se clonó en pUC 19 *EcoR* I-*Kpn* I. Así llegamos a la clona denominada pUC19-SW1. El ADN de esta clona se purificó, linearizó y transcribió. Este procedimiento se detalla a continuación.

1) Con T4 polinucleótido cinasa, se incorporó un grupo fosfato en el extremo 5', tanto a 20 pM del oligonucleótido SW1-1 como del SW1-2.

2) Se mezclaron en un volumen final de 20 µl de agua.

3) Incubación a 90 °C durante 3 min y enfriamiento lento hasta temperatura ambiente.

4) Se extendieron las cadenas de los oligonucleótidos apareados en un volumen final de 50 µl con 10 U de Klenow en buffer KGB.

5) Mediante PCR se amplificó la doble cadena del ADN del SW1.

6) El producto de PCR se digirió con *EcoR* I y *Kpn* I en KGB.

7) Se clonó en pUC19 cortado en *EcoR* I-*Kpn* I (Scharf, 1990).

DIGESTION CON RNASA III DEL SW1

El sustrato de la RNasa III es ARN doble cadena (Chelladurai and Nicholson, 1991; Krinke and Wulff, 1990). Esta enzima es de utilidad para demostrar el cambio conformacional de un "switch" molecular. El SW1 tiene un sitio de reconocimiento para RNasa III. Si

la estructura secundaria del "switch" se interrumpe el sitio de corte desaparece y se observa la integridad de la molécula de ARN.

1). En 10 µl finales de buffer Tris-HCl 50 mM pH 8.0, MgCl₂, 10 mM y NaCl 100 mM, se mezclaron 5.4 nM de ARN del SW1 marcado internamente con [³²P]-CTP por transcripción *in vitro*, con 5.4 µM de efector positivo-SW1 o efector neutro-SW1.

2) Se preincubó durante 30 min a 37 °C.

3) Se agregaron 25 ng de RNasa III por 10 µl de reacción (la RNasa III fue donada por el Dr. Hermann Block del Public Health Institute of New York). A las reacciones control sin RNasa III se les agregó 1 µl de BSA a una concentración de 25 µg / ml.

4) Se incubó durante 30 min a 37 °C.

5) Después de este tiempo, se agregaron 10 µl de glicerol al 50%, 0.25 % de azul de bromofenol 0.25 % de xilencianol en Tris-HCl 10 mM pH 8.0 y EDTA 1 mM.

El resultado de la digestión por la RNasa III sobre la doble cadena del ARN del SW1 se analizó mediante electroforesis en geles no desnaturizantes de poliacrilamida al 8 % en "buffer" Tris-Boratos con MgCl₂ 1 mM. La electroforesis se hizo a 250 volts en el cuarto frío. Los resultados se visualizaron por autoradiografía.

REACCION EN CADENA DE LA TAQ DNA POLIMERASA (PCR)

Para las PCRs se utilizó en un Sistema GeneAmp 9600 de Perkin Elmer. Las condiciones en las que se llevaron a cabo las reacciones para obtener los templados para transcripción *in vitro* de los ARN empleados en este trabajo se describen a continuación.

Para la ribozima alostérica:

DESNATURALIZACION	HIBRIDACION	EXTENSION	CICLOS
-------------------	-------------	-----------	--------

PRIMER PASO

94 °C, 30 seg

1

SEGUNDO PASO

94 °C, 15 seg	30 °C, 30 seg con incrementos de 0.8 °C cada ciclo	72 °C, 30 seg	5
---------------	--	---------------	---

TERCER PASO

94 °C, 15 seg	41 °C, 30 seg	72 °C, 30 seg	25
---------------	---------------	---------------	----

CUARTO PASO

		72 °C 5 min	1
--	--	-------------	---

Para la ribozima control y el sustrato de las ribozimas:

DESNATURALIZACION	HIBRIDACION	EXTENSION	CICLOS
-------------------	-------------	-----------	--------

PRIMER PASO

94 °C, 30 seg			1
---------------	--	--	---

SEGUNDO PASO

94 °C, 15 seg	37 °C, 30 seg con incrementos de 0.8 °C cada ciclo	72 °C, 30 seg	5
---------------	--	---------------	---

TERCER PASO

94 °C, 15 seg	41 °C, 30 seg	72 °C, 30 seg	25
---------------	---------------	---------------	----

CUARTO PASO

		72 °C 5 min	1
--	--	-------------	---

Para el SW3:

DESNATURALIZACION	HIBRIDACION	EXTENSION	CICLOS
-------------------	-------------	-----------	--------

PRIMER PASO

94 °C, 30 seg 1

SEGUNDO PASO

94 °C, 15 seg 30 °C, 30 seg con 72 °C, 30 seg 5
 incrementos de
 1.8 °C cada ciclo

TERCER PASO

94 °C, 15 seg 39 °C, 30 seg 72 °C, 30 seg 25

CUARTO PASO

72 °C 5 min 1

El "buffer" empleado para estas reacciones y la concentración de templado y "primers" se describen en la sección "PCR reactions" en "Experimental Protocol" del Artículo.

TRANSCRIPCIÓN *in vitro*

Se describe en la sección "RNA synthesis" en el Artículo. La cromatografía con Sephadex-G50 se puede reemplazar con membranas de Microcon 30 (Amicon) siguiendo las instrucciones del proveedor con la siguiente modificación: previamente a la filtración de ARN la columna se lava con 0.5 ml de SDS 0.5% y con 0.5 ml de TE.

CROMATOGRAFÍA EN DEXE-CELULOSA DEL ARN SINTETIZADO QUÍMICAMENTE

Ver "Experimental protocols" del artículo.

MARCAJE EN EL EXTREMO 5' DEL ARN SINTETIZADO QUIMICAMENTE

Ver "Experimental protocols" del artículo.

MARCAJE DEL EXTREMO 3' DEL ARN SINTETIZADO QUIMICAMENTE

Ver "Experimental protocols" del artículo.

GELES DE RETARDAMIENTO

La formación de híbridos entre los "switches" 1, 2 y 3 y los oligonucleótidos efectores positivos y neutros se analizó empleando electroforesis en geles no desnaturizantes de poliacrilamida.

Se mezclaron en 10 μ L finales de reacción, 0.5 μ M de ARN de la ribozima alostérica marcada internamente con [α^{32} P]-CTP por transcripción *in vitro* se mezclaron con 2.5 μ M de efector positivo o con 2.5 μ M de cada uno de los efectores neutros. Las condiciones de la reacción fueron las siguientes:

- 1) Se preincubó a 37 °C, una hora en "buffer" Tris-HCl 50 mM pH 8, 50 mM de NaCl.
- 2) Se añadió MgCl₂ hasta 20 mM final.
- 3) Se incubó a 50 °C durante 3 horas.
- 4) Al terminar esta incubación, se agregó un volumen igual de "buffer" de carga (Ficoll 15 % 0.25 % de azul de bromofenol 0.25 % de xilencianol en Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM).

La electroforesis se hizo a 250 voltios en el cuarto frío en geles no desnaturizantes de poliacrilamida al 10% en "buffer" Tris-Boratos con 1 mM de MgCl₂. Los resultados se visualizaron y cuantificaron usando el PhosphorImager.

De manera similar, se efectuó otro experimento de retardamiento en el que se combinaron 0.5 μ M de ARN de la ribozima alostérica con 0.5, 2.5, 5 y 10 μ M de efector positivo en "buffer" Tris-HCl 50 mM pH 7.5. Después de la preincubación a 37 °C durante una hora se agregó MgCl₂ hasta 10 mM y se prosiguió como se describe arriba.

REACCION DE CORTE DEL SUBSTRATO POR LA RIBOZIMA EN PRESENCIA DE 20 mM DE MgCl₂ O EN PRESENCIA DE 10 mM DE MgCl₂

La reacción de corte en 10 mM de MgCl₂, se describe en la sección "Ribozyme cleavage reactions" en el Artículo.

La reacción de corte en presencia de 20 mM de MgCl₂ se llevó a cabo de manera similar a lo descrito en la sección "Ribozyme cleavage reactions" en el Artículo pero utilizando el "buffer" Tris-HCl 50 mM pH 8, 50 mM de NaCl y 20 mM final de MgCl₂.

ADN Y ARN AJENOS AL CORTE CATALITICO

Se describe en la sección "Other DNAs and RNAs" en el Artículo.

DESFOSFORILACION DE ARN

Para 200 pmolas de extremos 5' de ARN se emplean 1.8 U de CIP (Calf Intestinal Phosphatase, Boeringher Manhaen) en un volumen final de 20 µl de "buffer" Tris-HCl 50 mM pH 8.5, EDTA 1 mM.

- 1) Se incuba la reacción durante 30 min a 37 °C.
- 2) Para inactivar la enzima, se agregan 20 µl de "buffer" Tris-HCl 15 mM pH 7.6, EDTA 12 mM, 150 mM de NaCl, 20 µl de SDS 2% y 140 µl de agua.
- 3) Se incuba durante 15 min a 65 °C.
- 4) Se extrae con fenol-cloroformo-isoamílico.
- 5) Se agregan 15 µl de NaCl 3M (concentración final 300 mM) y 2.5 volúmenes de etanol absoluto.
- 6) El ARN precipitado, lavado se resuspende en "buffer" Tris-HCl 10 mM, 1 mM de EDTA y se procede a marcar en el extremo 5'.

INMOVILIZACION DE ARN EN UN SOPORTE ACTIVADO POR OXIDACION CON PERIODATO DE SODIO

Oxidación del extremo 3' de la ribozima alostérica y la ribozima control.

1) La oxidación del extremo 3' del ARN se efectuó usando como procedimiento básico el descrito para otra ribozima y ARN no catalíticos (Hermanson et al., 1992; Fanhestock and Nomura, 1972) utilizando 1.28 nmolas de ARN y 100 μ l de Affi-gel Hz Hidrazida (Biorad). Con el objetivo de seguir el acoplamiento del ARN al soporte, el 10 % de este material se desfosforiló y marcó en el extremo 5' como se explicó antes.

2) El ARN (38 μ g para la ribozima alostérica) disuelto en 100 μ l de "buffer" de acoplamiento de BIORAD (0.1M de acetato de sodio pH 5.0), se oxidó con 4.6 mM final de *meta*-periodato de sodio (12 μ l de una solución 0.1M) durante 1 h a 4 °C con agitación rotando el tubo con agitador Nutator.

3) Para retirar el agente oxidante se agregó 1/10 del volumen de la reacción de acetato de sodio 3 M y 2 volúmenes de etanol. Se precipitó el ARN oxidado durante 30 min a -20 °C. Se centrifugó. Se lavó la pastilla. Se secó y resuspendió en "buffer" de acoplamiento.

4) Se repitió la precipitación del ARN oxidado,

Acoplamiento del ARN oxidado a un soporte hidrazida-activado.

1) El soporte activado (100 μ l) se preparó como describe el proveedor (BIORAD) y se mezcló con el ARN oxidado durante 4 h a 4 °C (Hermanson et al., 1992).

2) Se agregaron 250 μ l de cloruro de sodio 2 M y se agitó durante 30 min a 4 °C.

3) Se lavó el soporte con el ARN acoplado con 5 ml de "buffer" de acoplamiento, 5 ml cloruro de sodio 2 M y 5 ml agua, consecutivamente (Hermanson et al., 1992). Se colectaron los lavados para determinar la cantidad de ARN acoplado al soporte activado. Simultáneamente se hizo un control con ARN no oxidado para determinar la cantidad de pegado inespecífico de ARN al soporte activado.

RESULTADOS

An Allosteric Hammerhead Ribozyme

Helena Porta and Paul M. Lizardi*

Department of Molecular Recognition and Structural Biology, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62271, México. *Corresponding author (e-mail: lizardi@xunuma.cemagbi.unam.mx)

We have constructed an RNA molecule containing a hammerhead ribozyme that is under allosteric control. In the inactive state, the RNA enzyme is unable to cleave a suitable substrate. The formation of the active state of the ribozyme is triggered by a specific interaction with a DNA oligonucleotide effector that is complementary to a single-stranded loop in the RNA enzyme molecule. Other DNA or RNA molecules containing unrelated nucleotide sequences do not function as allosteric effectors. This work demonstrates the feasibility of designing RNA enzymes that are specifically activated in response to an artificially designed molecular recognition event. Such enzymes may have practical applications.

Received 1 December 1993; accepted 24 October 1994

The role of small hammerhead ribozyme domains in the catalysis of RNA self cleavage reactions was first elucidated by Foster and Symons¹. Subsequent work by Uhlenbeck² and Haseloff and Gerlach³ established the consensus sequences and structures required for catalytic activity and demonstrated the feasibility of designing hammerhead ribozymes that could be used as true enzymes in intermolecular cleavage reactions *in vitro*.

Much remains to be understood about the modulation of ribozyme activity *in vivo* or *in vitro*. Miller and Silver⁴ have described an alternative tertiary structure that attenuates self-cleavage of the ribozyme in the satellite RNA of barley yellow dwarf virus. A tertiary structure in hepatitis delta RNA has been claimed to function as a ribozyme control element, maintaining the ribozyme in the "off" conformation until the time of viroid genome replication⁵.

In thinking about practical application of RNA enzymes, it is of interest to explore the rational design of ribozymes which are activated in response to molecular recognition events. Such events may be designed to be highly specific and completely independent of substrate RNA binding. We have constructed a synthetic RNA molecule that incorporates a hammerhead ribozyme whose activity is under allosteric control. Here we describe the simple design of this model allosteric RNA enzyme and demonstrate experimentally the modulation of catalytic activity by a specific DNA effector oligonucleotide.

Results

Design. The ribozyme used in these experiments was derived from one of the hammerhead catalytic domains described by Haseloff and Gerlach³. The construction of the allosteric RNA enzyme is based on a molecular switch design first described by Kramer and Lizardi⁶. The sequence of the 91-nucleotide RNA molecule is shown in Figure 1, panel A, where it is displayed in its most stable folded form. The RNA is designed to contain a stem of 20 base-paired nucleotides, a predominantly single-stranded loop of 28 nucleotides, and a 3'-tail of 22 unpaired bases. Of the 39 bases that constitute the hammerhead ribozyme and its arms, 19 should participate in the formation of the relatively stable double-stranded stem. Hence, the ribozyme should be inactive as long as the RNA molecule remains folded in a conformation that maintains the stem structure.

The loop sequence was designed to be complementary to a short DNA oligonucleotide, which acts as the allosteric effector. When the effector DNA hybridizes to the loop, a double-helix of 35 base-pairs is formed, and, because a double helix resists bending⁷, the relatively shorter and less stable stem is disrupted, releasing from helical constraints 19 nucleotides that are part of the hammerhead sequence. Figure 1, panel B, shows the

expected configuration of the ribozyme after hybridization of the effector DNA and subsequent binding to the RNA substrate. Also shown is a 12-nucleotide facilitator oligonucleotide⁸ which was used to improve catalytic efficiency. Figure 1, panel C shows the structure of a control, non-allosteric ribozyme, which contains the same hammerhead and arm domains and was used in the presence of the same facilitator oligonucleotide.

The RNAs used to test this experimental design were generated either by *in vitro* transcription or by chemical synthesis, and used in experiments in which we monitored the cleavage of radioactively labeled RNA substrate by gel electrophoresis. Initial experiments using high magnesium concentrations (20 mM) were disappointing because the extent of activation of the allosteric ribozyme was relatively low. Optimization of the reaction conditions demonstrated that lower concentrations of magnesium (10 mM) improved the extent of allosteric ribozyme activation.

Allosteric modulation of activity. Experimental results are shown in Figure 2. Panel 2B is a control reaction demonstrating the cleavage specificity of the Rz_{1,2,3}-derivative non-allosteric hammerhead ribozyme. The substrate was a synthetic, 39-nucleotide RNA labeled at both the 3' and the 5' ends. The cleavage reaction, which did not proceed to completion with this chemically synthesized RNA substrate, produced the expected fragments of 22 and 17 nucleotides, respectively. To test the allosteric ribozyme we used an *in vitro* transcribed substrate of 38 nucleotides, which is cleaved more efficiently than the chemically-synthesized RNA. This substrate yields the expected fragments when cleaved with the control ribozyme, as seen in lanes 2 and 3 of panel 2A. There is a small difference in the relative intensity of the bands because the 16-nucleotide fragment is labeled at lower specific activity than the 22-nucleotide fragment. The allosteric ribozyme experiments are shown in panel 2A. When the allosteric ribozyme was incubated with various unrelated DNA oligonucleotides there was relatively little cleavage of the substrate (4% average, on six different gel lanes). In the presence of the correct complementary effector oligonucleotide 43% of the RNA substrate was cleaved (average of two gel lanes). The extent of cleavage using the control, non-allosteric ribozyme was 68% (average of two gel lanes). In the presence of an imperfect effector oligonucleotide that was one nucleotide shorter and also contained four mismatched bases the extent of cleavage was 18%. The addition of unrelated single-stranded DNA from phage M13, or tRNA, showed little effect on the activity of uninduced ribozyme (5% cleavage), but activity was increased over 10-fold (53% cleavage) if either of these unrelated nucleic acids were mixed together with the correct effector oligonucleotide. The activated allosteric ribozyme assayed in lanes 15 and 16 shows 78% of the activity of the control, non-allosteric hammerhead ribozyme. A visual com-

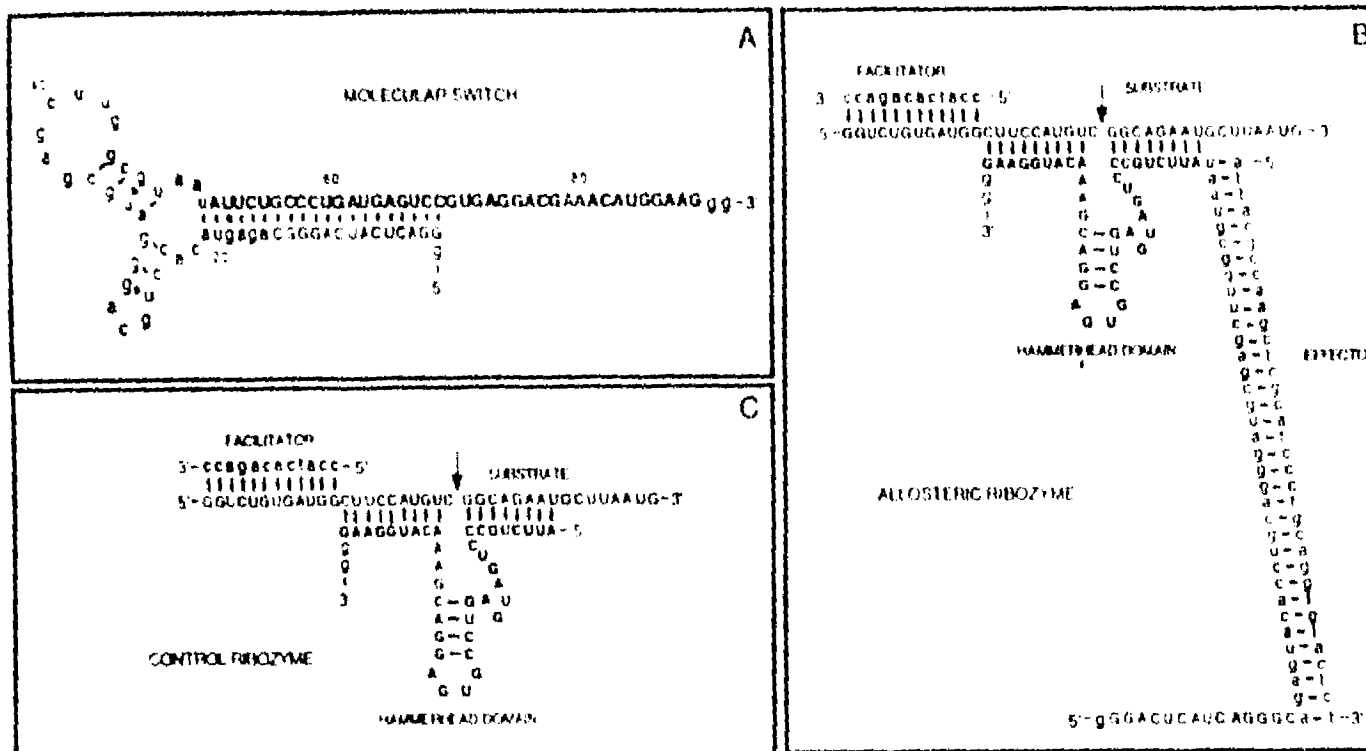


FIGURE 1. Nucleotide sequence and computer-generated folding of the allosteric ribozyme RNA, and interactions between the ribozyme and the substrate RNA. Panel (A) shows the most stable secondary structure of the allosteric ribozyme, as predicted by the program *multfold*^{11,12}. The folded molecule contains (from 3' to 5', in uppercase letters) 39 nucleotides comprising the catalytic portion and the arms of a hammerhead (derived from the Rz_{cat}3 hammerhead¹) followed by an effector-recognition loop region (34 nucleotides in lowercase letters) and finally a 15-nucleotide domain (uppercase) that is complementary to a portion of the hammerhead sequence. Five bases from the effector-recognition region, together with this 15-nucleotide domain, form a duplex with a portion of the

hammerhead giving rise to the 20-nucleotide stem. Panel (B) shows schematically the hybridization of the allosteric ribozyme with the DNA effector. This interaction disrupts the 20-nucleotide stem duplex shown in panel (A), and thus permits the formation of a correctly folded hammerhead ribozyme, as well as the required base pairing to its substrate. A 12-nucleotide facilitator DNA hybridizes with the substrate, adjacent to the 3'-end of the ribozyme. Panel (C) shows schematically the base pairing of the *in vitro* transcribed substrate RNA with the Rz_{cat}3-derivative control ribozyme (38 nucleotides) and with the 12-nucleotide facilitator DNA. The chemically-synthesized RNA substrate contained an additional A residue at the 3' end, and a U instead of a C residue at position 13.

parison of the extent of cleavage in lanes 15 and 16, versus lanes 13 and 14, illustrates clearly the catalytic activation that occurs when the allosteric ribozyme is incubated *in vitro* in the presence of its specific effector DNA.

Discussion

The facility with which one may design specific base-pairing interactions in polynucleotides allowed us to design an RNA molecule that undergoes a discrete conformational change upon hybridization with a DNA oligonucleotide. We have coupled this conformational change to the unmasking of a hammerhead sequence, creating a functional allosteric ribozyme. We exploited the bending resistance of a short double helix to trigger the conformational change, rather than relying entirely on strand displacement, which would have limited the possible choices of the effector sequence. This molecular switch is of general applicability, since the same design should work for other small ribozymes. The design allows complete freedom of choice in the effector sequences.

The activation mediated by the effector is specific. There was very little catalysis when unrelated sequences were tested for non-specific effector activity. Furthermore, the correct effector oligonucleotide activated the ribozyme with similar efficiency in the presence of an excess of unrelated single-stranded DNA or RNA. An imperfect oligonucleotide effector with four mismatches displayed 37% of the activity induced by the perfectly complementary effector. This significant level of ribozyme activation observed upon hybridization of the mismatched DNA effector was not unexpected, since it has been shown by others

that a few mismatches cause relatively little bending distortion of a double helix¹³. In other words, the bending resistance of the double helix formed by an imperfect effector DNA that contains four mismatches is expected to be sufficiently large to induce a conformational change in the allosteric ribozyme. On the basis of this result, and also based on our unpublished observations regarding the conformational properties of switch molecules made of DNA, we expect effectors with four or fewer mismatches to induce significant ribozyme activation.

In the presence of 20 mM of MgCl₂, the cleavage efficiency of the control ribozyme increases to 83%, while the cleavage efficiency of the induced allosteric ribozyme is only 29% (data not shown). We have observed that higher magnesium concentrations stimulate the formation of allosteric ribozyme dimers (data not shown). Dimer formation of two open-switch molecules occurs by intermolecular pairing of the 20-base stem sequence of one molecule and its complementary sequence, present in the opened stem of another molecule. This dimerization effectively constrains the hammerhead domain of one of the molecules, resulting in a reduction in the number of active ribozymes. Dimer formation is magnesium-dependent, and its occurrence is enhanced by the high ribozyme concentration used in the *in vitro* assay. One would expect that dimer formation would be less likely to occur in allosteric ribozymes expressed inside cells, where their relative concentration would be lower.

Among the possible applications of allosteric ribozymes are the *in vivo* cleavage of an mRNA target in response to the presence of a specific inducer (effector) sequence that is only found in a specific cell type. The use of cell-specific effector

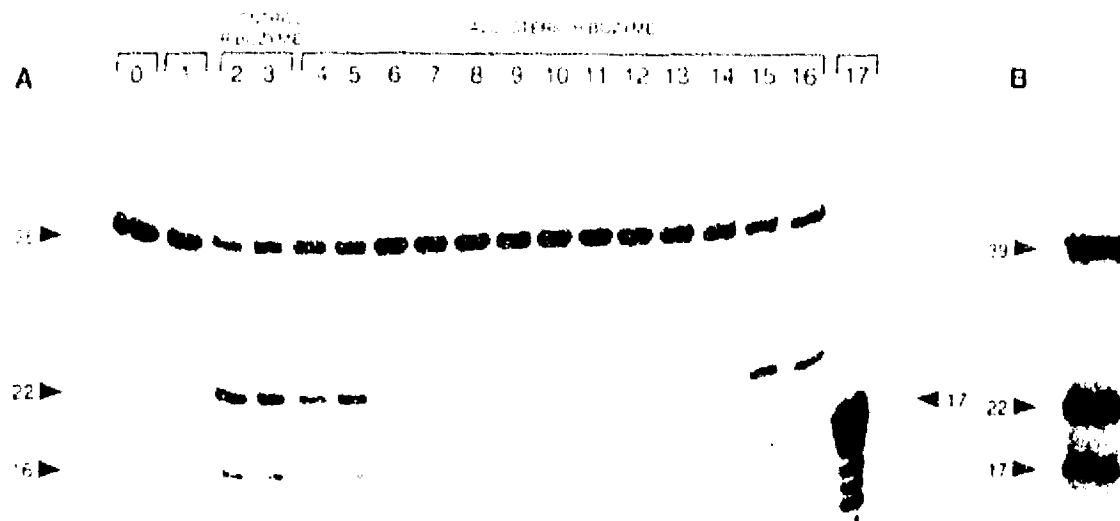


FIGURE 2. Analysis by gel electrophoresis of the cleavage of radiolabeled substrate RNA by allosteric and non-allosteric hammerhead ribozymes. Reactions were performed as described in the Experimental Protocol. All reactions contained radioactive substrate RNA and facilitator DNA. Lane 0, substrate RNA alone; Lane 1, allosteric ribozyme without effectors; Lanes 2 and 3, control Rz_{CA13} -derivative ribozyme; lanes 4 and 5, allosteric ribozyme with correct DNA effector (duplicate reactions); lanes 6 to 11, allosteric ribozyme with various unrelated DNA effectors (sequences numbered 1 to 6 in Experimental Protocol); lane 12, allosteric ribozyme and DNA effector with 4 mismatched bases; lane 13, allosteric ribozyme and single-stranded DNA from phage M13; lane 14, allosteric ribozyme and tRNA; lane 15, allosteric ribozyme, ssDNA from phage M13, and correct DNA effector; lane 16, allosteric ribo-

zyme, tRNA and correct DNA effector; lane 17, 5' end-labeled 17-nucleotide RNA size marker. The presence of a faint 17-nucleotide fragment in some of the lanes can be explained by the presence of the so-called $n+1$ transcription product in the gel-purified substrate RNA¹⁶. Panel (2B) shows the cleavage of a synthetic 39-nucleotide RNA substrate by the control, non-allosteric hammerhead ribozyme. This chemically-synthesized substrate was labeled at both the 3' and the 5' ends, with equal specific activity (see Experimental Protocol). Cleavage is highly specific and produces only two labeled fragments of the expected sizes (22 nucleotides, labeled at the 5' end, and 18 nucleotides [17 + 1], labeled with pCp at the 3' end). The mobility of the 3'-labeled fragment is analogous to that of a 17-nucleotide marker (not shown) due to the extra phosphate charge at the 3' end.

sequences can be exploited to reduce non-specific cleavage events in other cell types where hammerhead substrates exist but are not desired targets. We also envision the construction of allosteric ribozymes that catalyze reactions other than phosphodiester cleavage. For example, Prudent, Uno and Schultz¹⁷ have recently described the isolation of a ribozyme that catalyzes the isomerization of a bridged biphenyl. This work suggests that *in vitro*-directed evolution may be used to create ribozymes capable of catalyzing the formation of colored, luminescent, or fluorescent compounds. Using the allosteric molecular switch design we have described, such ribozymes could be made to be activated by hybridization to specific DNA sequences. An interesting application of such hybridization-coupled allosteric enzymes would be a homogeneous assay (i.e., an assay not requiring washing or separation steps) for the generation of signals in response to specific DNA sequences generated by PCR or other amplification methods. Allosteric ribozymes, made of RNA or DNA could be easily immobilized on surfaces using available chemistry. In view of these possibilities, allosteric ribozymes may find useful applications in diagnostic biotechnology.

Experimental Protocol

Oligonucleotides. Template and primers for PCR reactions were as follows. *Template:* Control ribozyme, TCCATGTTCCGTCCTACGGACATCAGGGGNGAAATCATAGTGGATCGTATTA. *Allosteric ribozyme:* CCCATCAAGTTCGTCCTACGGACATCAGGGGACAGAAATATACGC AAGCTCCGATCCCTGCAGGGTACTCTGCTGATGATGCCCTATAGTGGATCGTATTA. *Substrate:* CATTAAGCATCTGCGGACATGGGAGCCATCACAGACCTATAGTGGATCGTATTA. *Top primer:* T7-21mer GCGTAATACGACTCACATATAG. *Bottom primers:* Control ribozyme TCCATGTTCCGTCCTACGG. *Allosteric ribozyme:* CCCATCAAGTTCGTCCTACGG. *Substrate:* CATTAAGCATCTGCGG. *Facilitator:* CCATCACAGAAC. *Correct 35-nucleotide DNA effector:* ATTACCCAAAGCTCCGATCCCTGCAGGGTACTCT. *One nucleotide shorter effector with four mismatched bases:* TTACCG

CAAGCTCCGTCCTGCAGGGTACTCT. *Unrelated DNA effectors:* 20mer-1 GCGGCTCCGTCCTGCAGGGTACTCT. 20mer-2 CCGGC-CAGCACTTCAUCCTG. 37mer-3 CAATACATACAGACAATAAGAG-CAATTCACCAGTAC. 37mer-4 CAATACATACAGACACAAGAG-CAATTCACCAGTAC. 38mer-5 ATCCACATACTGATACT-TCGATCCGACTTTCGTCCTACGG. 40mer-6 CAATCCATACAGACAATAAG-GAAACAGCAATTCACCAGTAC. *Chemically synthesized 39 nucleotide RNA substrate (CyberScribe, Inc.):* GGCTCTGGGAGGGTCTCC-CAUGTCCGGCAGAAUGCUUAAAUCA.

PCR reactions. DNA templates for *in vitro* transcription were generated using the polymerase chain reaction (PCR). PCR reactions contained 60 pM template oligonucleotide and 0.2 μ M of each primer in 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.1 mg/ml gelatin, 200 mM of each of the four deoxynucleoside triphosphates and 2.5 U of Taq polymerase (Boehringer Mannheim). Reactions were performed in a GeneAmp system 9600 (Perkin-Elmer).

RNA synthesis. Control and allosteric ribozyme RNAs were synthesized by T7 RNA polymerase transcription¹⁸ of the corresponding PCR product. A 400 μ l transcription reaction contained 40 mM Tris-HCl, pH 7.6, 5 mM DTT, 1.5 mM spermidine, 0.01% Triton X-100, 2.4 mM nucleoside triphosphates (NTPs), 0.8 μ M template DNA and 240 units of T7 RNA Polymerase (US Biochemical). Transcription reactions were carried out at 37°C for 16 hours. After transcription, the DNA templates were digested with 26 units of RNase-free DNase from bovine pancreas (Boehringer Mannheim) at 37°C for 30 min, followed by phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation. After centrifugation, RNA was resuspended in 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, and separated from free nucleotides by two consecutive Sephadex G 50 spin columns. For the experiment shown in Figure 2, panel A, the substrate RNA was internally labeled with [³²P]-CTP using *in vitro* transcription reactions containing 5 mM GMP, as described by Wyatt and coworkers¹⁹, except that 4 units T7 RNA polymerase were used per μ l of reaction. Transcribed RNA was size purified in a 20% acrylamide gel containing 7 M urea. The 38 nucleotide RNA product was localized by radioautography and excised, using as a reference the 5' end labeled, chemically synthesized 39 nucleotide RNA. The gel piece was frozen and thawed and then eluted twice in 1 ml of 10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1 mM EDTA, 300 mM NaCl by overnight incubation at 4°C. The two gel eluates were pooled, extracted with phenol-chloroform, and concentrated by ethanol precipitation. RNA was dissolved in 10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1 mM EDTA. Prior to labeling, the chemically synthesized substrate 39 mer RNA was purified by DEAE-Sephadex chromatography, essentially as described by Bock and Chiriac²⁰. The 39 mer RNA was 5' end labeled with [³²P]-ATP



(60000) units using T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs). For 3' end labeling, the RNA substrate was ligated to [γ - 32 P] pCpA in a 1:1 molar ratio using T4 RNA ligase according to Bruce and Ulmerbeck [7]. Labeled material was purified by phenol-chloroform extraction, precipitated with ethanol, and resuspended in 10 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 mM EDTA. Portions of 5'-labeled and 3'-labeled RNAs were mixed to yield an RNA population with identical specific activities at either end of the molecule.

Ribozyme cleavage reactions. Reactions were carried out in a volume of 10 μ l, and contained 0.5 μ M ribozyme, 1.0 μ M substrate RNA, 3.0 μ M facilitator oligonucleotide and 2.5 μ M effector DNA (or other effector DNAs, as specified above in "oligonucleotides"). Other nucleic acids (single-stranded phage DNA cleaved with HaeIII, or *E. coli* tRNA) were used at a concentration of 1 μ g per 10 μ l. Substrate RNA was heated at 95°C for 30 seconds, and cooled to room temperature just before use. The ribozyme reaction buffer is similar to that described by Hertel and coworkers [8], except that the magnesium concentration was lowered to 10 mM. All reaction reagents (except magnesium chloride) were dissolved in 50 mM Tris-HCl pH 7.5 and 50 mM NaCl and preincubated at 37°C for 1 hour. Reactions were initiated by adding MgCl₂ to a final concentration of 10 mM, and incubation proceeded for 3 hours at 50°C. Reactions were stopped by adding 15 μ l of 95% formamide or 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM EDTA, 0.05% xylene cyanol-bromophenol blue. Samples were denatured by heating at 95°C for 1 min and analyzed by electrophoresis in a 16% polyacrylamide gel containing 7 M urea. Radioactive bands were detected and analyzed using a phosphorimager (Molecular Dynamics, Inc.).

Other DNAs and RNAs. Single-stranded DNA from an M13mp19 clone containing an irrelevant DNA insert was digested with HaeIII and used as unrelated DNA. Transfer RNA from *E. coli* (Merck) was used as unrelated RNA.

Acknowledgments

We thank Fried R. Kramer, Jim Harseloff, Xavier Solerion, and Sanjay Tyagi for insightful discussions. Some of the original ideas that led to this work were conceived by Cesar Guerra and Hilda Lomeli. We are indebted to Paul Gaytan and Georgina Esnada for oligonucleotide synthesis and purification. The research of P.M.E. was supported in part by an International Research Scholar Award from the Howard Hughes Medical Institute (No. 75191-527(03)). H. Barta was the recipient of a graduate fellowship from the Mexican National Council on Science and Technology (CONACYT).

References

1. Foster, A. C. and Symons, R. H. 1987. Self-cleavage of plus and minus RNAs of

similarity: a structural model for the active site. *Cell* **49**:211-213.

2. Foster, A. C. and Symons, R. H. 1987. Self-cleavage of various PVA's performed by the proposed 55-nucleotide active site. *Cell* **50**:9-16.
3. Ulmerbeck, O. C. 1987. A small catalytic oligonucleotide. *Nature* **328**:596-599.
4. Harseloff, J. and Gerlach, W. L. 1988. Simple RNA enzymes with low and highly specific endonuclease activities. *Nature* **334**:585-590.
5. Miller, W. A. and Silver, S. J. 1991. Alternative tertiary structure attenuates self-cleavage of the ribozyme in the satellite PVA of barley yellow dwarf virus. *Nucl. Acids Res.* **19**:5319-5320.
6. Branch, A. D., Levine, B. J., Batouly, B. M., Buckler-White, A., Germ, J. E. and Robertson, H. D. 1991. The novel tertiary structure of delta RNA may function as a ribozyme control element. *Prog. Clin. Biol. Res.* **364**:257-261.
7. Kramer, F. R. and Lizardi, P. M. 1989. Replicable RNA reporters. *Nature* **339**:401-402.
8. Shore, D., Langowski, J. and Baldwin, R. 1981. tRNA flexibility studied by covalent closure of short fragments into circles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:4833-4837.
9. Hagerman, P. J. 1988. Flexibility of DNA. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **17**:265-286.
10. Cookshill, J. 1992. Enhancement of ribozyme catalytic activity by a complementary oligonucleotide (facilitator) and by 2'-O-Methylation. *Nucl. Acids Res.* **20**:4617-4622.
11. Zuker, M. 1989. On finding all suboptimal foldings of an RNA molecule. *Science* **244**:38-52.
12. Jaeger, J. A., Turner, D. H. and Zuker, M. 1989. Improved predictions of secondary structures for RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:7706-7709.
13. Bhattacharya, A. and Lilley, D. M. 1989. The contrasting structures of mismatched DNA sequences containing looped out bases (bulges) and multiple mismatches (bubbles). *Nucl. Acids Res.* **19**:6831-6840.
14. Prudent, J. R., Uno, J. and Schults, P. G. 1994. Expanding the scope of RNA catalysis. *Science* **264**:1924-1927.
15. Saito, R. K., Geland, D. H., Stohel, S., Schaaf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. J., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487-491.
16. Milligan, J. F., Giesche, D. R., Wirthner, W. G. and Ulmerbeck, O. C. 1992. Oligonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. *Nucl. Acids Res.* **15**:8783-8796.
17. Watt, R. J., Chastain, M. and Pieper, D. J. 1991. Synthesis and purification of large amounts of RNA oligonucleotides. *Immunotechniques* **11**:764-768.
18. Bock, R. M. and Chiriac, J. D. 1967. Chromatography of tRNA on DEAE-Celulose and DEAE-Sephadex. *Methods in Enzymol.* **12**:638-644.
19. Bruce, A. G. and Ulmerbeck, O. C. 1978. Reactions at the terminus of RNA with T4 RNA ligase. *Nucl. Acids Res.* **5**:3666-3672.
20. Hertel, K. J., Herschlag, D. and Ulmerbeck, O. C. 1994. A kinetic and thermodynamic framework for the hammerhead ribozyme reaction. *Biochemistry* **33**:3374-3385.

If you would like
your company to be
listed in

**Bio/Technology's
1996 International
Buyers' Guide**

Send a fax to
the attention of
Mark Goodstein:
1 212 254 9493

164 *Biotechnology International*



European Patent Office DG1
Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk, The Netherlands

EPO APPLIED TECHNOLOGY SERIES — Volume 12

PROTEIN FOLDING

Reinhard Hermann

Protein Folding has been the object of much research and patent applications. Compiled from the latest information disclosed in patents from all over the world, this survey provides an up-to-date and comprehensive view of this field. Contents (partial) of the book include: *Standard Techniques for Protein Solubilisation and Unfolding*, *Standard Techniques for Refolding: Modified and Arising Methods for Unfolding and Refolding: A Proposal for a Refolding Strategy*; *List of Cited Patent Documents and Patentees*.

ISBN: 90-90061 73-8 (Hardcover)

Price DEM 100.--

Orders together with payment (cheque/money order) should be addressed to:

**Mr. S. Behmo, The European Patent Office,
Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk,
The Netherlands.**

☎ 070-3402433. Fax no. 070-3403961

FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS ADICIONALES.

UNA RIBOZIMA ALOSTERICA

Una descripción simplista de una ribozima alostérica es la siguiente: las enzimas alostéricas tienen un sitio diferente al sitio catalítico que puede unir de manera reversible una molécula moduladora o efector positivo. Al estar unido, el efector positivo modifica la estructura y permite la actividad enzimática.

Para llegar a una ribozima alostérica utilizamos el motivo estructural de las ribozimas tipo "hammerhead" y el concepto de "switch" molecular.

Las razones por las que seleccionamos una ribozima tipo "hammerhead" son las siguientes: 1) es una ribozima pequeña (39 nucleótidos), 2) su estructura secundaria se conoce detalladamente, y 3) la cinética enzimática de la reacción de corte se ha estudiado ampliamente.

La ribozima "hammerhead" usada en el diseño de la ribozima alostérica es la Rz_{CAT3} descrita previamente (Hasseloff and Gerlach, 1988). El sustrato de la Rz_{CAT3} es el ARNm del gene de la cloramfenicol acetil tranferasa. Esta ribozima tiene la ventaja de cortar eficientemente a su sustrato, además, la resistencia a cloramfenicol es un fenotipo fácilmente rastreable en experimentos *in vivo*. En este trabajo, el sustrato empleado es un ARN de 38 nucleótidos que comprende el sitio de corte de Rz_{CAT3} (se describe en "Experimental protocol" en el Artículo).

La construcción de la ribozima alostérica se basa en el diseño del "switch" molecular descrito por Kramer y Lizardi (1989). Un "switch" molecular es una molécula de ARN o ADN (ej. un oligonucleótido) que tiene dos características básicas: 1) su estructura secundaria conforma un asa y un tallo, 2) la región cadena sencilla del "switch" puede formar un duplex con una molécula de ARN o ADN, con secuencia complementaria llamada

efector positivo. La doble hélice formada entre el asa y el efector positivo se abre debido que es más larga y presenta una mayor resistencia a la torsión (Shore et al., 1981; Haggerman, 1988), forzando así la separación del tallo que es más corto y relativamente menos estable (FIGURA 7). El estado 'abierto' del "switch" se promueve en presencia del efector positivo.

Utilizando estas cualidades del "switch" molecular diseñamos una ribozima alostérica. El motivo "hammerhead" forma parte del tallo del "switch". Si el "switch" molecular está cerrado la estructura secundaria del "hammerhead" se interrumpe y no hay actividad enzimática.

Para que la ribozima alostérica funcione se requiere como primer paso que el "switch" molecular se abra específicamente en presencia del efector positivo, y como segundo paso, que en presencia de su sustrato y magnesio, la ribozima "hammerhead" se estructure y corte al sustrato en condiciones de temperatura y pH adecuados.

TRES "SWITCHES" MOLECULARES

En vista de obtener una ribozima alostérica diseñamos tres "switches" moleculares diferentes denominados "switch" uno (SW1), "switch" dos (SW2) y "switch" 3 (SW3). El cambio de estructura de 'cerrado' a 'abierto' se analizó para cada uno de estos tres "switches". El SW1 aparentemente no se abrió. El SW3 se abrió pero la ribozima no cortó. El SW2 se abrió y la ribozima cortó. Es en el SW2 en el que se basa el artículo y al que llamamos ribozima alostérica, tanto en el artículo como en estas páginas.

La información adicional a la presentada en el artículo incluye: 1) los resultados de los experimentos en los que se probó el funcionamiento del SW1 y del SW3; 2) experimentos de retardamiento de la ribozima alostérica y 3) los resultados de la inmovilización de la misma.

DISEÑO DEL SW1

La FIGURA 11 muestra la estructura secundaria más estable generada por el programa "Mufold" (Zuker 1989; Jaeger et al., 1989). El tamaño de este ARN es de 108 nucleótidos. La molécula doblada contiene desde el extremo 3', 39 nucleótidos que comprenden la región catalítica y las secuencias flanqueadoras del "hammerhead" complementarias al substrato. En seguida está la región que reconoce el efector positivo. Esta secuencia es complementaria a una región del ADN de M13mp19 que va de la base 6229 a la 6268 que incluye parcialmente el "polilinker". El tamaño diseñado de esta región es de 40 nucleótidos de cadena sencilla, sin embargo se encuentra predominantemente estructurada. Finalmente está una región de 27 nucleótidos de largo complementaria parcialmente al dominio "hammerhead". De estos 27 nucleótidos solo 25 conforman el tallo del SW1 cuando está cerrado.

Para rastrear los cambios conformacionales del SW1 en presencia del efector positivo o de los diferentes efectores neutros analizamos la susceptibilidad del SW1 al corte con la endonucleasa RNasa III (Chelladurai y Nicholson, 1991; Krinke y Wulff, 1990). La RNasa III corta en una región ARN de cadena sencilla dentro de la estructura secundaria de un ARN. Esta enzima reconoce la estructura secundaria de un tallo y el corte tiene lugar entre 10 y 14 bases a partir del extremo 3' del mismo. La secuencia CUU/GAA localizada en la región adyacente a la región cadena sencilla susceptible del corte favorece la eficiencia de corte pero no es indispensable. Este ensayo es posible debido a que el SW1 en su estado 'cerrado' incluye un sitio de corte para la RNasa III entre los nucleótidos 58 y 59 del asa del "switch".

Analizamos la integridad y conformación del SW1 en presencia de RNasa III usando electroforesis en geles no desnaturizantes (FIGURA 12). Los resultados que observamos son los siguientes: en la ausencia de efector positivo, la RNasa III corta al SW1 (CARRIL 2). El apareamiento entre el SW1 y el efector positivo ocasiona un cambio conformacional que tiene como consecuencia una pequeña reducción de la movilidad electroforética del ARN marcado, que en este experimento es el SW1 (CARRIL 3), lo cual

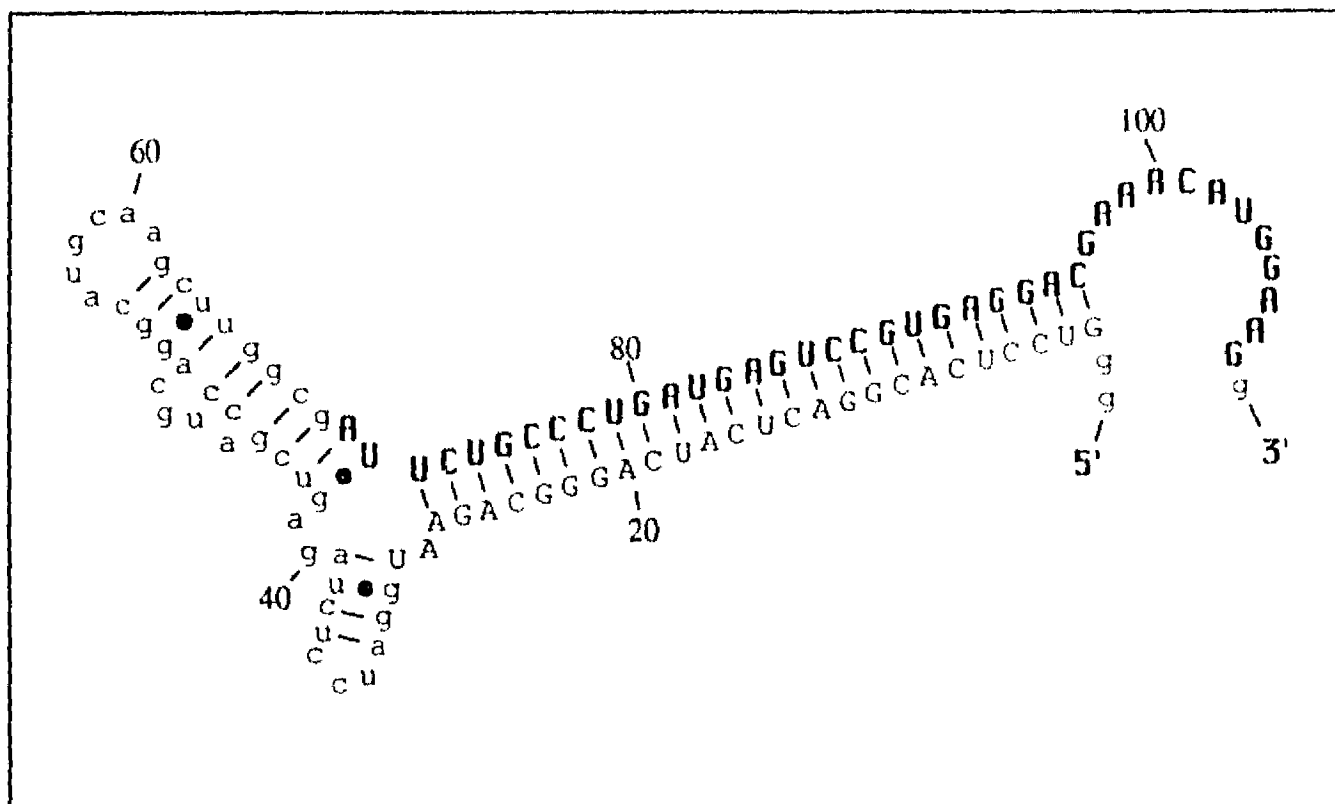
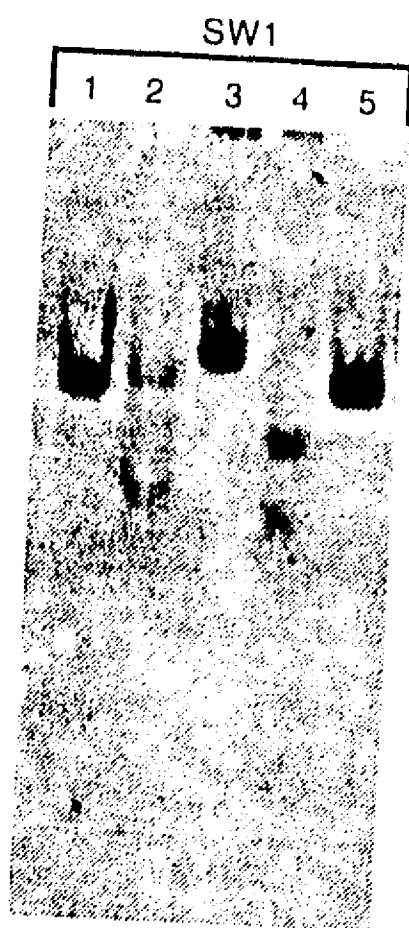


FIGURA 11. SECUENCIA Y ESTRUCTURA SECUNDARIA DEL SWI. En esta figura se muestra la estructura secundaria más estable generada por el programa MulFold (Zuker, 1989; Jaeger, et al., 1989). La molécula doblada contiene (desde el extremo 3' hacia el 5' en mayúsculas negras) 39 nucleótidos que comprenden la región catalítica y los brazos de la ribozima Hammerhead [derivada de la ribozima Hammerhead Rz_{CAT}3 (Haseloff y Gerlach, 1988)] seguida por la región que reconoce el efector (44 nucleótidos en minúsculas) y finalmente una región de 27 nucleótidos (mayúsculas) que es complementaria a una parte del dominio hammerhead.



FALLA DE ORIGEN

FIGURA 12. AUTORADIOGRAFIA DE UN GEL NATIVO DE POLIACRILAMIDA CON $MgCl_2$ 1mM PARA ANALIZAR EL ESTADO DE ABIERTO O CERRADO DEL SW1. El ARN del SW1 se marcó durante transcripción *in vitro* con $[\alpha\text{-}^{32}P]\text{-GTP}$. La apertura del SW1 en presencia del efector positivo se monitoreó en base a la actividad de la RNAsa III de cortar ARN doble cadena. La concentración de SW1 es de 5.4 nM y la de efector es de 5.4 mM. Carril 1, SW1. Carril 2, SW1 con RNAsa III. Carril 3, SW1 con efector positivo. Carril 4, SW1, efector positivo y RNAsa III. Carril 5, SW1 y efector neutro. La RNAsa III muestra actividad sobre ARN doble cadena del SW1 a pesar de que éste hibride con el efector positivo como lo indica el retardamiento de la molécula, sugiriendo que el SW1 no está abierto.

nos indica que el efector positivo reconoce su secuencia complementaria en el "switch" y forma un híbrido. Sin embargo el SW1 unido al efector positivo es susceptible al corte con RNasa III (CARRIL 4). Los fragmentos resultantes del corte en presencia de efector positivo son de diferente largo a los que encontramos sin efector positivo, indicando que se conformó un sitio diferente de corte. Los híbridos ADN-ARN no son sustrato de la RNasa III por lo que se descarta un sitio nuevo en el híbrido formado entre el efector y el "switch". Por otro lado, las ribozimas pequeñas como la "hammerhead" solo se estructuran en presencia de su sustrato (Cech 1993). En este experimento no hay sustrato, por lo que es poco probable que se estructure el "hammerhead". Más aún, suponiendo que se forma el "hammerhead" su estructura no presenta un sitio de corte probable para la RNasa III (Chelladurai y Nicholson, 1991).

Otra posibilidad es que el sitio de corte nuevo esté localizado en el tallo. Basándonos en el retardamiento del SW1 en presencia del efector positivo (Carril 3) podemos decir que en efecto, se forma un híbrido específico entre el "switch" y el efector positivo. Sin embargo cabe la posibilidad de que el tallo no se separe totalmente y se forme un sitio para la RNasa III. Esta región sí contiene una de las secuencias descritas como sitio de reconocimiento para RNasa III partiendo del nucleótido 87 (ccgu/ggca) (Chelladurai y Nicholson, 1991).

Tratando de discernir la formación de un nuevo sitio de reconocimiento y corte de la RNasa III, analizamos las estructuras secundarias subóptimas resultantes del doblado del SW1 junto con el efector positivo. Para obtener las estructuras secundarias óptima y subóptimas del SW1 empleamos el programa "MulFold" (Zucker, 1989; Jaeger, et al., 1989). El programa "MulFold" permite doblar una sola molécula de ARN a la vez. Así que para analizar la interacción del SW1 con el efector la secuencia del "switch" se unió a su efector positivo mediante 8 bases no específicas marcadas como N dentro de la secuencia. Las primeras 9 estructuras más estables muestran que el 100% de las bases del efector están apareadas con el asa del "switch" y se conforma el "hammerhead" y no hay un sitio de reconocimiento para RNasa III. Sin embargo en la décima estructura más estable, 8 nucleótidos del extremo 3' del efector no están hibridando con el asa del "switch" lo que permite que el extremo 5' del "switch" se estructure. Esta región conforma

un tallo y un asa que contiene una de las secuencias descritas como sitio de reconocimiento de la RNasa III en la posición 33 en el asa del "switch" (uccu/agga) (Chelladurai y Nicholson, 1991) (FIGURA 13). La ribozima se localiza en el extremo 3' y su estructura se mantiene. Las estructuras secundarias obtenidas usando "MulFold" para otras moléculas de ARN de las que se conoce su estructura secundaria por métodos enzimáticos o químicos, indican que la posibilidad de encontrar estructuras subóptimas que concuerden con los datos experimentales, se encuentra entre 5 y 10 % de incremento en la energía. La estructura subóptima en la que encontramos el sitio de corte para RNasa III presenta un incremento en energía arriba del 11% con respecto a la estructura óptima. Por consiguiente, la creación de este sitio nuevo implica que el SW1 en solución, se estructure preferentemente como una molécula que teóricamente no es la más estable. Para aclarar el funcionamiento del SW1, se puede medir la actividad catalítica de la ribozima, sin embargo este experimento no se ha hecho.

La reducción en la movilidad electroforética depende de la presencia del efector positivo, puesto que no se observa cuando se substituye por un efector neutro, esto es, con un oligonucleótido no relacionado (CARRIL 5).

DISEÑO DEL SW2 (RIBOZIMA ALOSTÉRICA) Y DEL SW3

La estabilidad del tallo del SW1, nos condujo al diseño de dos nuevos "switches". Con estos nuevos diseños pretendemos favorecer el estado 'abierto' de la molécula como consecuencia de su apareamiento con el efector positivo. A diferencia del SW1, el SW2 y el SW3 son más cortos, por lo tanto se emplea solo un oligonucleótido que contiene el promotor de T7 ARN polimerasa y mediante extensión y amplificación se obtiene templado para transcribir directamente sin necesidad de clonar. Un resumen de las características de cada uno de los 3 "switches" se muestra en la TABLA 2.

La secuencia y estructura secundaria del SW2 se encuentra detallada en la FIGURA 1 del Artículo.

La FIGURA 14 PANEL A, muestra la estructura secundaria más estable

	oligonucleótidos y tamaño (bases)		largo total (bases)	largo asa (bases)	largo tallo (bases)	ribozima (bases)	ARN
SW1	sw1-2 82 sw1-2 76		108	44	25	RzCAT3 (39)	clonación y transcripción
SW2	sw2 108		91	34	20	RzCAT3 (39)	PCR y transcripción
SW3	sw3 108		91	34	20 apareamiento "wobble" entre la U10 y la G62	RzCAT3 (41) un par C-G (G70 y C75)	PCR y transcripción

TABLA 2. RESUMEN DE LAS CARACTERISTICAS DE LOS TRES SWITCHES MOLECULARES EMPLEADOS EN ESTE TRABAJO.

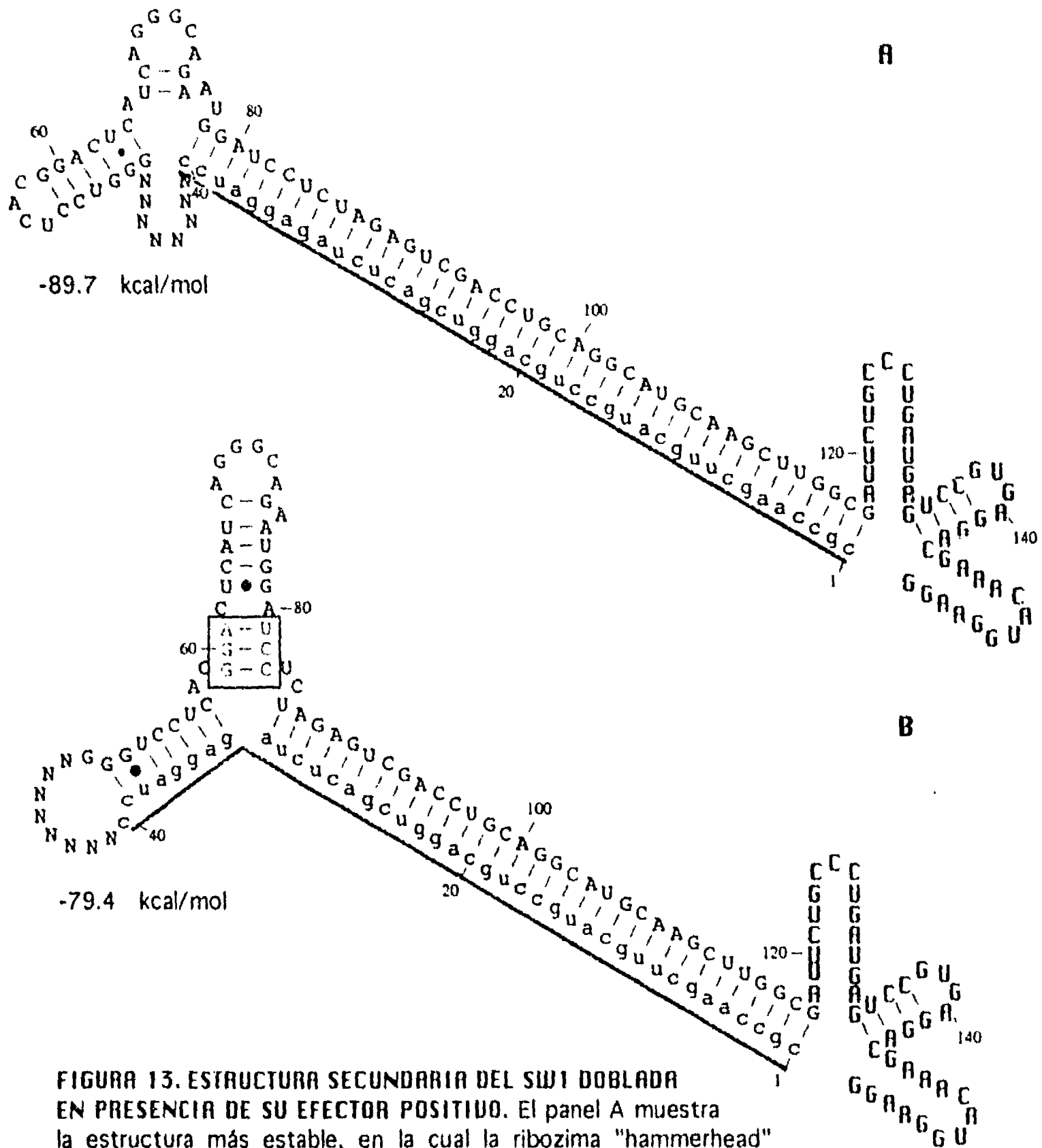


FIGURA 13. ESTRUCTURA SECUNDARIA DEL SW1 DOBLADA EN PRESENCIA DE SU EFECTOR POSITIVO. El panel A muestra la estructura más estable, en la cual la ribozima "hammerhead" (en mayúsculas azules) se estructura correctamente. El efector positivo hibrida completamente con el asa del SW1 (subrayado en rosa). El panel B muestra la décima estructura subóptima, en la cual se forma un sitio probable de reconocimiento de la RNAasa III (mayúsculas enmarcadas).

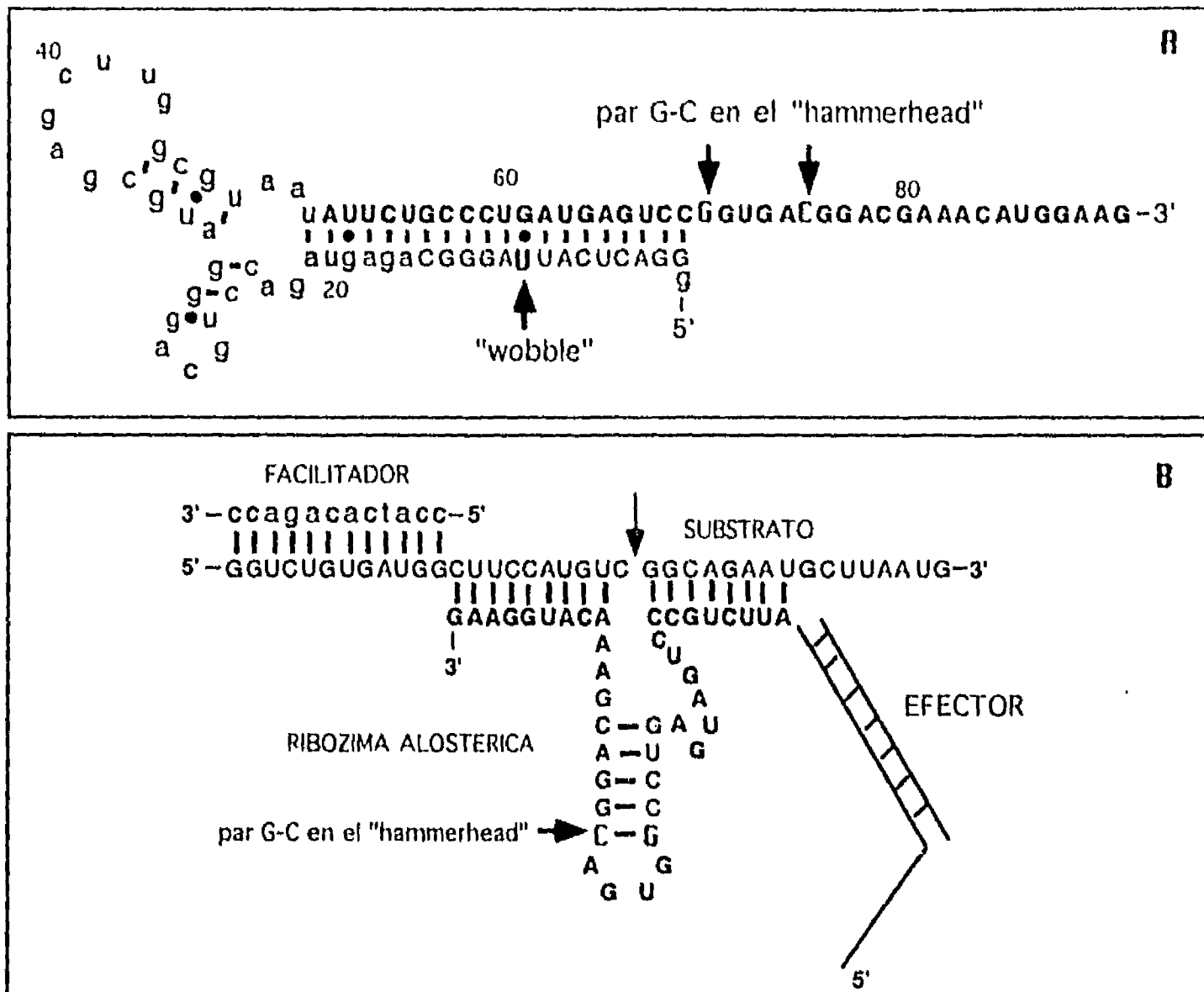


FIGURA 14. SECUENCIA Y ESTRUCTURA SECUNDARIA DEL SW3 E INTERACCION ENTRE LA RIBOZIMA Y SU SUBSTRATO. En el panel A se muestra la estructura secundaria más estable generada por el programa MulFold (Zuker, 1989; Jaeger, et al., 1989). La molécula doblada contiene (desde el extremo 3' hacia el 5' en mayúsculas negras) 41 nucleótidos que comprenden la región catalítica más un par G-C y los brazos de la ribozima hammerhead [derivada de la ribozima Hammerhead RZ_{CAT}³ (Haseloff y Gerlach, 1988)] seguida por la región que reconoce el efector (34 nucleótidos en minúsculas) y finalmente una región de 14 nucleótidos (mayúsculas) que es complementaria a una parte del dominio "hammerhead". En esta región, la C, o nucleótido número 10 del SW2, se substituye por una U en el SW3 ocasionando un apareamiento de tipo "wobble". El panel B muestra esquemáticamente la hibridación del SW3, con el efector positivo. Esta interacción abre el SW3 y permite la estructuración de la ribozima "hammerhead" y el apareamiento con el sustrato.

generada por el programa "Mufold", para el SW3. El tamaño de este ARN es de 91 nucleótidos. La molécula doblada contiene desde el extremo 3', 41 nucleótidos que comprenden la región catalítica y las secuencias flanqueadoras del "hammerhead" complementarias al sustrato. Esta diferencia de largo entre el motivo "hammerhead" descrito en la literatura (Hasselof y Gerlach, 1988) y el usado en este "switch" se debe a un aumento de un par G-C en la estructura conservada del "hammerhead" (G 70 y C 75). Este cambio lo sugirió el Dr. Haseloff con la idea de incrementar la actividad de corte de la ribozima. En seguida está una región de 34 nucleótidos que reconoce el efector positivo y que se estructura predominantemente como cadena sencilla. Esta secuencia es idéntica en el SW2 y SW3. Finalmente está una región de 15 nucleótidos de largo que es complementaria al dominio "hammerhead". Estos 15 nucleótidos más 5 bases de la región que reconoce el efector, conforman el tallo del SW3 cuando éste está cerrado.

MEDICION DE LA ACTIVIDAD CATALITICA DE CORTE DE LA RIBOZIMA ALOSTERICA

Para la medición de la actividad catalítica de corte de la ribozima alostérica, inicialmente, seguimos las condiciones descritas para la ribozima Rz_{CAT3} , esto es Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, $MgCl_2$ 20 mM, con la siguiente modificación: NaCl 50 mM para estabilizar el híbrido entre la ribozima alostérica y el efector positivo. También empleamos un oligonucleótido descrito en la literatura como 'facilitador' (Goodchild 1992). La función del facilitador es favorecer el acceso de la ribozima a su sustrato, sin afectar la velocidad de recambio de la reacción. La secuencia del facilitador que usamos en este trabajo incluye los 12 nucleótidos previos adyacentes al 3' de la ribozima con secuencia complementaria al sustrato (FIGURA 14 PANEL A y "Experimental protocol" en el Artículo).

El sustrato de la ribozima alostérica es un ARN de 38 nucleótidos (mARN de CAT) de largo obtenido por transcripción *in vitro* incorporando [$\alpha^{32}P$]-CTP. (Ver "RNA synthesis" en "Experimental protocol" del Artículo).

Como resultado de la actividad catalítica de corte de la ribozima alostérica sobre el sustrato tenemos un fragmento de 22 y otro de 16 nucleótidos de largo. La diferencia que observamos en la intensidad de las bandas se debe a la menor actividad específica del fragmento de 16 nucleótidos con respecto al fragmento de 22 nucleótidos. El porcentaje de actividad lo definimos como:

$$\% \text{ Actividad} = [1 - (C_1 \text{ sustrato} - F / C_0 \text{ sustrato} - F)]100,$$

donde C_1 es la concentración final de sustrato en presencia de Mg^{++} y efector positivo, C_0 es la concentración inicial de sustrato en ausencia de Mg^{++} o efector positivo y F es el ruido de fondo detectado .

Los resultados de la actividad catalítica de corte de la ribozima alostérica en presencia de 20 mM de Mg^{++} , se muestran en la FIGURA 15. Bajo estas condiciones la actividad de la ribozima no alostérica empleada como control positivo, es de 83%. (FIGURA 15, Carriles 1 y 2) y de la ribozima alostérica es de un 29% (Carriles 3 y 4). En presencia de varios efectores neutros, esto es ADN no relacionado la actividad de la ribozima alostérica es relativamente menor comparada con el efector positivo (entre 1.0 y 3%, carriles 6 a 11). Utilizando un efector imperfecto, esto es que tiene 4 nucleótidos no complementarios a partir del nucleótido 15 y que es un nucleótido más corto, la actividad catalítica es de un 4%. Agregando ADN cadena sencilla del fago M13mp19 cortado con *Hae* III, o ARNt, vemos que la actividad de la ribozima alostérica se incrementa hasta 5.4 y 1.2% respectivamente. Sin embargo esta actividad aumenta considerablemente hasta 27.3 y 29.7% si cualquiera de estos dos ácidos nucleicos no relacionados se mezcla con el efector positivo. Comparando los carriles 14 y 15 con el 12 y 13 , observamos claramente que la activación de la ribozima alostérica depende de la presencia del efector positivo. Hasta aquí podemos decir que la ribozima alostérica funciona específicamente aunque con menor actividad que la ribozima no alostérica. Es notable la presencia de dos fragmentos pequeños en lugar de uno de 16. Durante la transcripción *in vitro* es común obtener productos que son más pequeños o más grandes que el oligoribonucleótido deseado (Milligan et al., 1987) La aparición de esta banda extra puede ser la consecuencia de una copurificación de los ARNs 38 y 39, que después del corte resultan en fragmentos de 16 y 17 nucleótidos de largo.

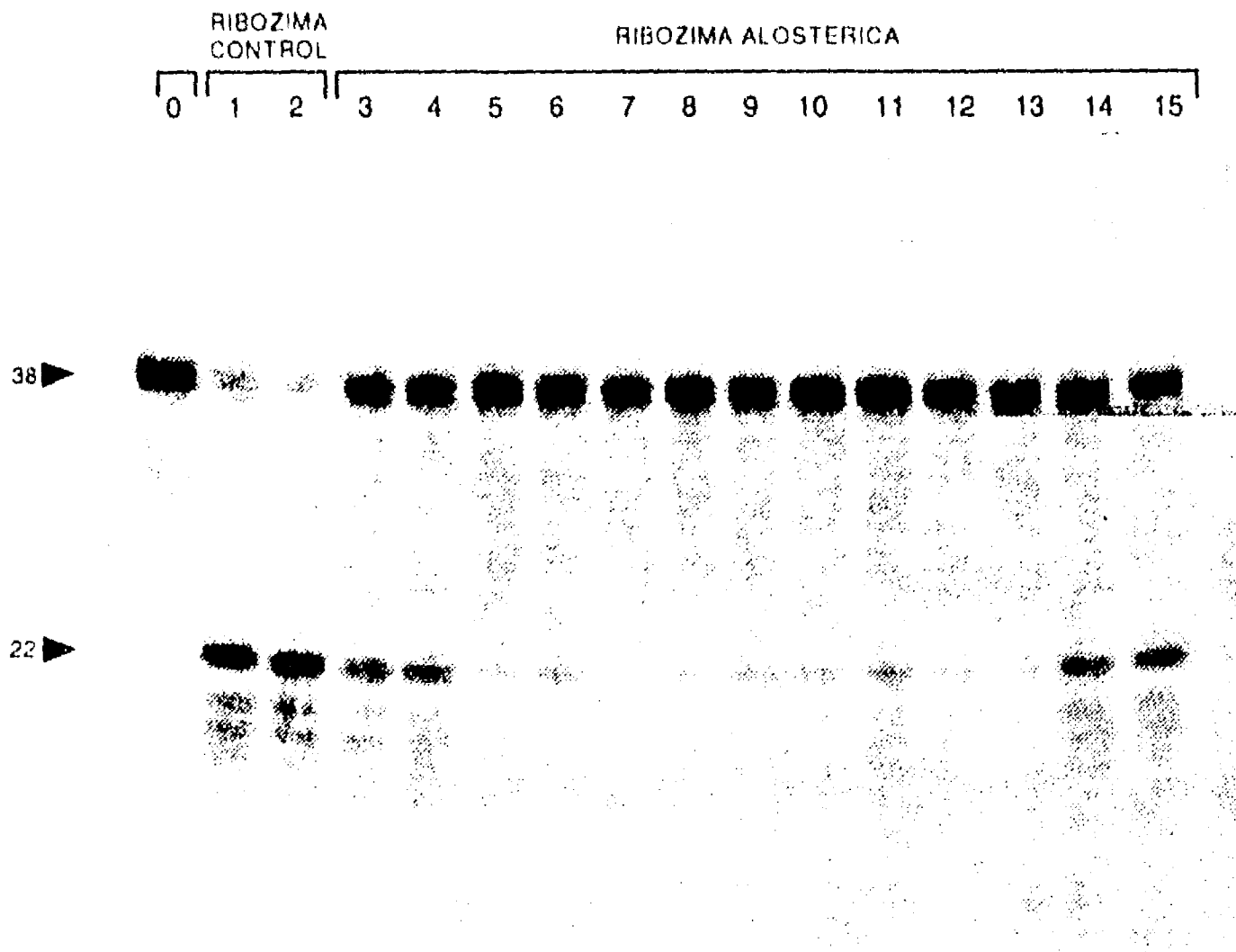


FIGURA 15. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA PARA ANALIZAR EL CORTE DEL SUBSTRATO RADIOACTIVO POR LAS RIBOZIMAS "HAMMERHEAD" NO ALOSTERICA Y ALOSTERICA EN PRESENCIA DE 20 mM DE $MgCl_2$. Todas las reacciones contienen 2 μM de sustrato radioactivo y 3 μM de facilitador. La concentración inicial de ribozimas control y alostérica es de 1 μM y la de efector es de 5 μM . Carril 0, ribozima alostérica sin efector positivo. Carriles 1 y 2, ribozima control. Carriles 3 y 4, ribozima alostérica con efector positivo. Carriles 5 a 10, ribozima alostérica con diferentes efectores no relacionados. Carril 11, ribozima alostérica y efector positivo con 4 bases no complementarias. Carril 12, ribozima alostérica y ADN cadena sencilla del fago M13. Carril 13, ribozima alostérica y ARNt. Carril 14, ribozima alostérica, ADN cadena sencilla del fago M13 y efector positivo. Carril 15, ribozima alostérica, ARNt y efector positivo.

FALLA DE ORIGEN

Las condiciones de reacción empleadas en el experimento descrito antes, si bien muestran una actividad catalítica de corte de la ribozima no alostérica comparable con el 71% reportado para Rz_{CAT3} (Hasseloff y Gerlach, 1988) no favorecen a la ribozima alostérica. Esta baja actividad puede deberse a la formación de multímeros entre dos o más moléculas de ribozima alostérica abiertas (FIGURA 16). El extremo 5' de una ribozima alostérica abierta es complementario al extremo 3' de otra molécula similar, por lo que una posibilidad es que se estructuren multímeros de dos a más moléculas abiertas quedando constreñida una de las ribozimas. El resultado de esta estructuración es una menor actividad catalítica de corte de la ribozima alostérica. Ya que los cationes divalentes como el Mg^{++} son muy efectivos estabilizando la doble hélice de ARN (Pan et al., 1993) cabe la posibilidad que durante la reacción de corte que depende de Mg^{++} , la ribozima alostérica forme multímeros no activos. Por lo tanto, analizamos la formación de multímeros en presencia de 20 mM de Mg^{++} , empleando electroforesis en geles no desnaturizantes.

EXPERIMENTOS DE RETARDAMIENTO

La formación de híbridos entre dos a más moléculas de ARN se puede analizar empleando electroforesis en geles no desnaturizantes de poliacrilamida. En estos geles se emplea 1 mM de magnesio para mantener los híbridos durante la electroforesis. En ausencia de híbridos, la molécula analizada presenta una migración característica. Sin embargo la formación de híbridos entre dos moléculas iguales o una diferente se observa como un retardamiento en la migración.

En los experimentos que se describen a continuación se analizan por un lado, la formación de híbridos entre los "switches" y su efector positivo (monómero), además de la formación de multímeros entre dos o más "switches" abiertos.

La formación de monómeros y multímeros del SW2 en presencia de 20 mM de Mg^{++} la analizamos en la FIGURA 17. El apareamiento entre la ribozima

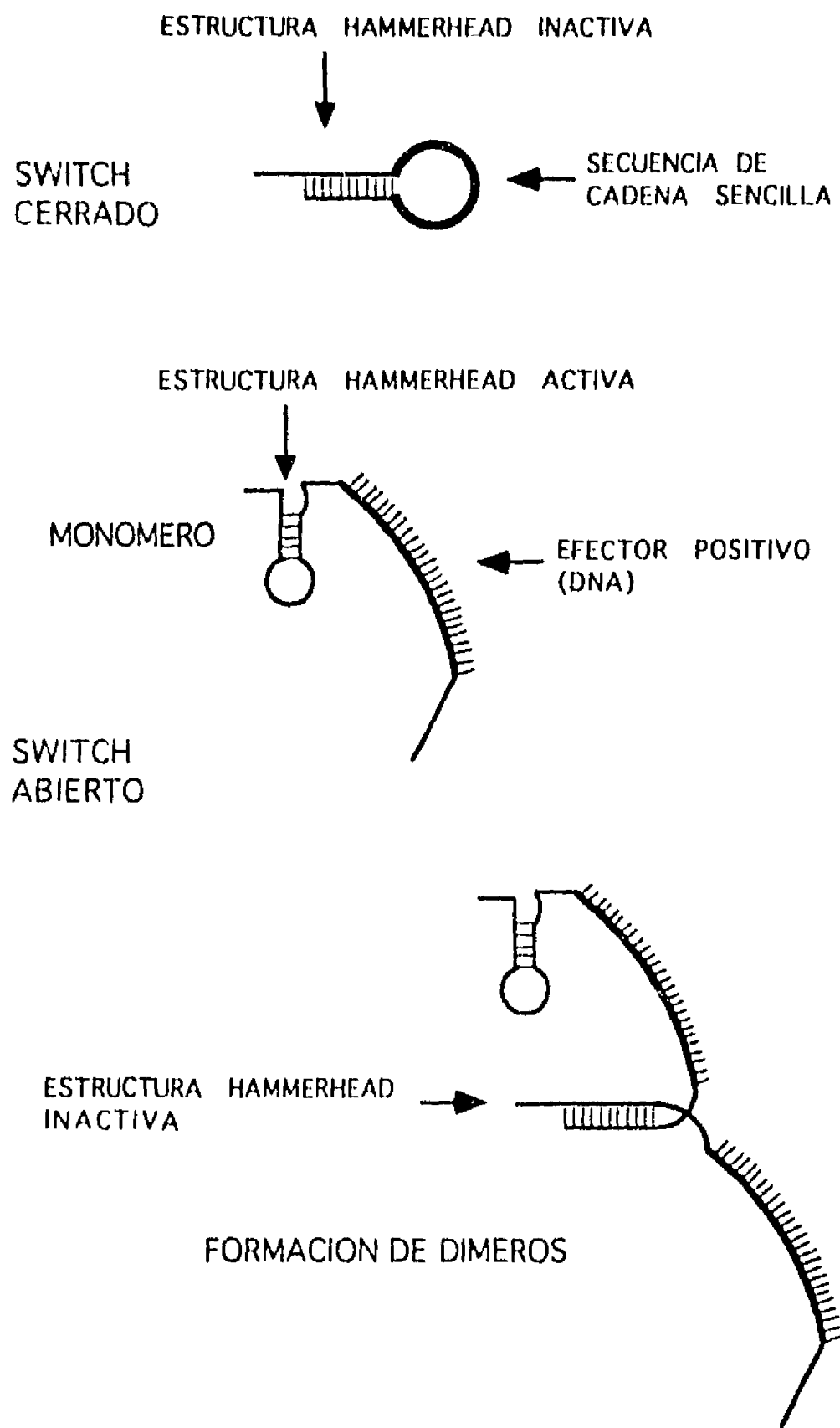
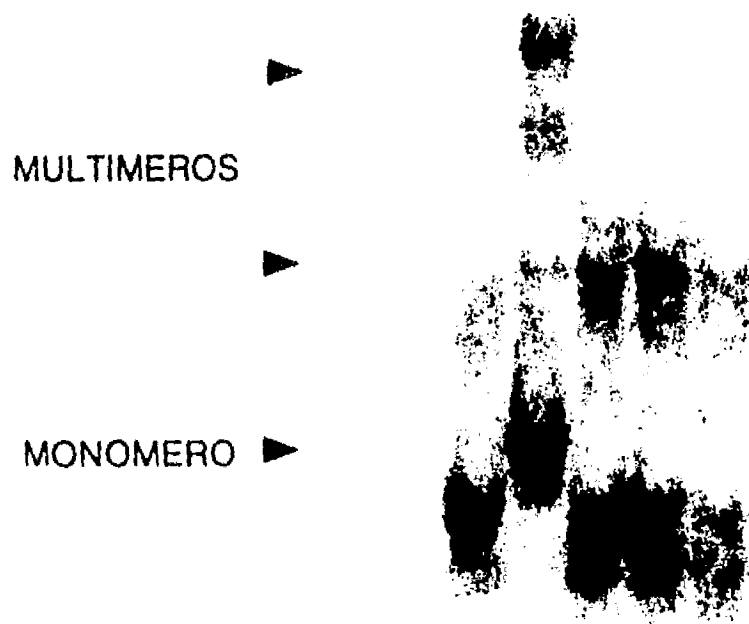


FIGURA 16. FORMACION DE DIMEROS. La formación de dimeros entre dos switches moleculares abiertos, restringe el dominio de la ribozima hammerhead de una de las dos moléculas. Esta estructuración resulta en una reducción del número de ribozimas activo.

RIBOZIMA ALOSTERICA

1 2 3 4 5



FALLA DE ORIGEN

FIGURA 17. FORMACION DE MULTIMEROS ENTRE EL SW2 Y EL EFECTOR POSITIVO EN PRESENCIA DE 20 mM DE MgCl₂. El gel de retardamiento muestra que la ribozima alostérica forma multímeros de mayor peso molecular cuando se aparea específicamente con el efector positivo en presencia de 20 mM de MgCl₂. El 52 % de la concentración de ribozima alostérica inicial, forma una estructura monomérica. Carril 1, 0.5 μ M de ribozima alostérica. Carril 2, 0.5 μ M de ribozima alostérica en presencia de 2.5 μ M de efector positivo. Carril 3 a 5, 0.5 μ M de ribozima alostérica en presencia de 2.5 μ M de 3 diferentes efectores neutros (ADN no relacionados), respectivamente.

alostérica y el efector positivo (CARRIL 2), ocasiona un cambio conformacional que tiene como consecuencia una pequeña reducción de la movilidad electroforética del SW2 marcado radioactivamente. En presencia del efector positivo, el 52% de la concentración inicial de ribozima alostérica se encuentra en forma de monómero, el resto se encuentra formando varios multímeros. Las formas de mayor peso molecular (trímeros y tetrámeros), dependen de la presencia del efector positivo.

Por otro lado, en ausencia del efector positivo, se observa en todos los carriles, la formación de una estructura con un peso molecular mayor que el monómero. La formación de esta estructura (que podría ser un dímero), puede ser una consecuencia del equilibrio dinámico que existe entre el estado de cerrado y abierto del "switch" molecular en solución, lo que permite que una proporción de moléculas de "switch" se encuentre abierta y pueden estructurarse en ausencia de efector positivo.

La reducción en la movilidad electroforética del monómero depende de la presencia del efector positivo, puesto que no se observa cuando éste se sustituye por diferentes efectores neutros (CARRILLES 3 a 5).

La concentración de Mg^{++} usada para permitir la actividad catalítica de corte de la ribozima alostérica, favorece la estructuración de multímeros pudiendo ser esta la causa de la menor actividad de la ribozima alostérica comparada con la ribozima no alostérica.

Una de las maneras de contender con estructuras diferentes al monómero, es hacer menos estable el tallo del "switch".

Con esta idea en mente, sustituimos un enlace de tipo Watson y Crick en la posición 9 (FIGURA 14 PANEL A), de la ribozima alostérica, por un apareamiento más débil tipo "wobble". Es a esta molécula a la que llamamos SW3.

La conformación del SW3 en presencia de 20 mM de Mg^{++} la analizamos usando electroforesis en geles no desnaturizantes (FIGURA 18). El apareamiento entre el SW3 y el efector positivo (CARRIL 2) ocasiona un cambio conformacional que tiene como consecuencia una pequeña reducción de la movilidad electroforética del SW3. El 81% de la concentración inicial de SW3 se encuentra formando una estructura monomérica. Así pues, como consecuencia de la formación de una doble hélice más débil en el tallo del

FORMACION DE MULTIMEROS

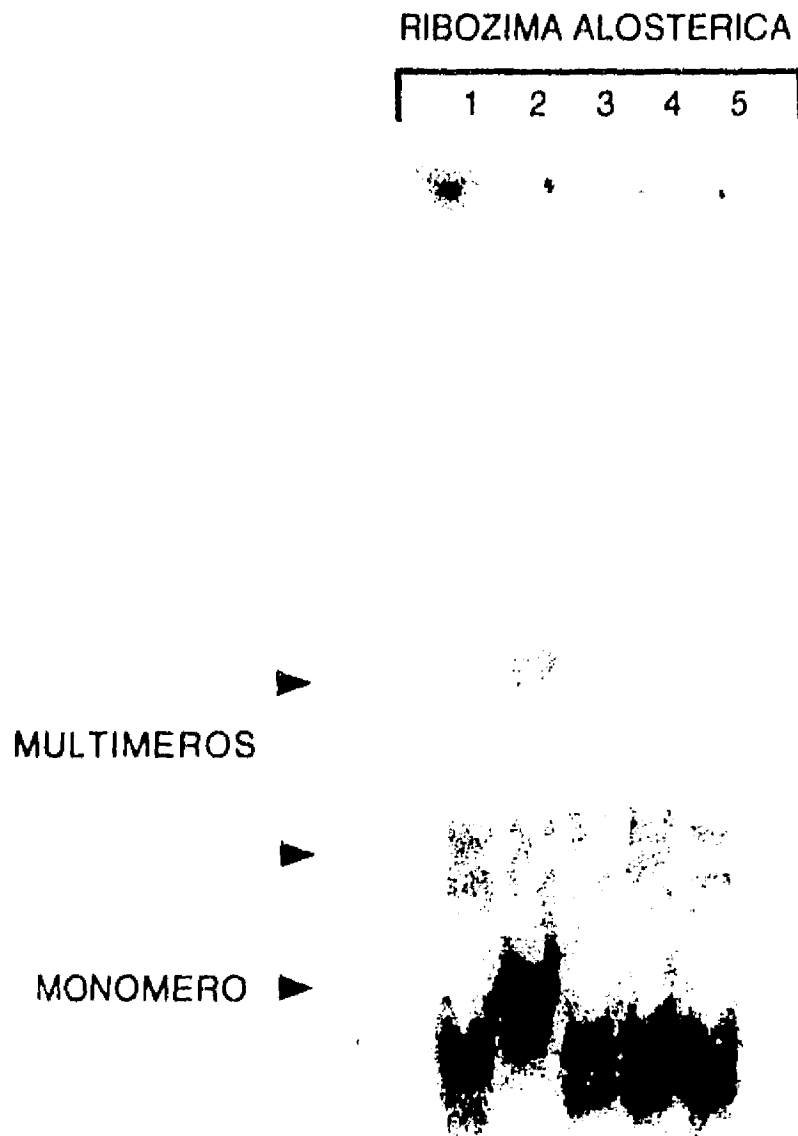


FIGURA 18. FORMACION DE MULTIMEROS ENTRE EL SW3 Y EL EFECTOR POSITIVO EN PRESENCIA DE 20 mM de MgCl₂. El 80 % de la concentración de ribozima alostérica inicial, forma una estructura monomérica. Carril 1, 0.5 μ M de ribozima alostérica. Carril 2, 0.5 μ M de ribozima alostérica en presencia de 2.5 μ M de efector positivo. Carril 3 a 5, 0.5 μ M de ribozima alostérica en presencia de 2.5 μ M de 3 diferentes efectores neutros (ADN no relacionados), respectivamente.

SW3, la concentración de monómeros es mayor. A menor constricción, la actividad de la ribozima presente en el SW3 debe ser mayor comparandola con ribozima alostérica. Desafortunadamente, la ribozima "hammerhead" contenida en el SW3 no tuvo actividad catalítica. La presencia del par G₇₀/C₇₅ en la secuencia conservada del "hammerhead" (FIGURA 14, PANEL B), aparentemente, inhibió su actividad de corte.

Otra manera de contender con la estructuración no deseada de la ribozima alostérica es disminuir la concentración de Mg⁺⁺ durante la reacción de corte.

Concentraciones de Mg⁺⁺ de 10 mM se emplean exitosamente para probar la actividad catalítica de corte de ribozimas tipo "hammerhead", por lo tanto cambiamos el "buffer" descrito para la Rz_{CAT}3 por uno que contiene Tris-HCl 50 mM pH 7.5 y Mg⁺⁺ 10 mM (Hertel et al., 1994).

Los resultados de un experimento de retardamiento similar al descrito anteriormente pero ahora usando 10 mM de Mg⁺⁺ se muestran en la FIGURA 19. El apareamiento entre la ribozima alostérica y del efector positivo en concentraciones crecientes (CARRILES 2 a 5), ocasiona un cambio conformacional que reduce un poco la movilidad electroforética de la ribozima alostérica marcada radioactivamente. El 90% de la ribozima alostérica se encuentra en forma de monómero. Observamos en este experimento que basta incrementar la concentración del efector positivo 5 veces para que el "switch" molecular se abra.

ACTIVIDAD CATALITICA CON Mg⁺⁺ 10 mM

La actividad de la ribozima alostérica se monitoreó, empleando el "buffer" con 10 mM de Mg⁺⁺. Estos resultados se describen en la FIGURA 2, del ARTICULO.

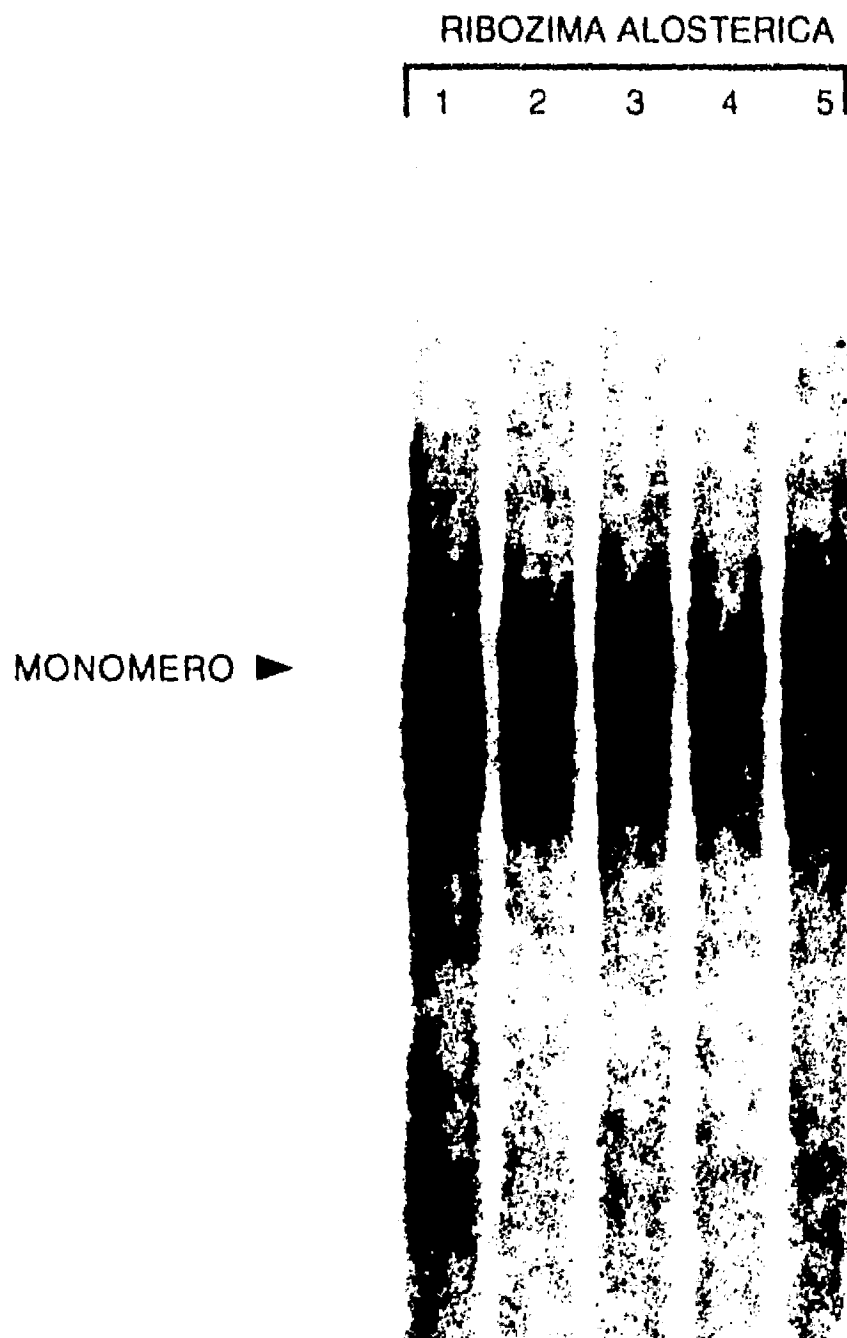


FIGURA 19. Experimento de retardamiento de la ribozima alostérica con 10 mM de MgCl₂. Los geles de retardamiento muestran que el 90 % de la ribozima alostérica migra como una estructura monomérica cuando se encuentra apareada específicamente con el efector positivo en presencia de 10 mM de MgCl₂. Carril 1, 0.5 μM de ribozima alostérica. Carril 2 a 5, 0.5 μM de ribozima alostérica con 0.5, 2.5, 5, y 10 μM de efector positivo. La ausencia de dímero en estas condiciones contrasta con los resultados obtenidos con 20 mM de MgCl₂.

INMOVILIZACION DE LA RIBOZIMA ALOSTERICA

La inmovilización de la ribozima alostérica tiene como objetivo el evitar la formación de estructuras diferentes al monómero, además demostrar que una ribozima alostérica inmovilizada conserva su actividad.

Se inmovilizaron tanto la ribozima no alostérica como la alostérica sobre una matriz que tienen grupos amino, mediante la oxidación, de sus grupos 2' y 3' hidroxilo vecinales con *meta*-periodato de sodio como se describe en Materiales y Métodos. Al estar fijo uno de los extremos de la ribozima alostérica, se descarta la posibilidad de que se estructure con otra molécula abierta (FIGURA 20).

La actividad de las ribozimas control y alostérica inmovilizadas la analizamos en la FIGURA 21. Las condiciones para medir la actividad catalítica de corte de las ribozimas son las mismas descritas en el Artículo en la sección "Ribozyme cleavage reactions". EL substrato esta marcado de la manera descrita en los experimentos anteriores.

En los carriles 1 al 5 mostramos los resultados de la actividad catalítica de corte de las ribozimas no alostérica y alostérica en solución: En el carril 1, hay ribozima alostérica sin efector positivo, como control negativo. En el carril 2, la ribozima no alostérica en presencia de magnesio tiene una actividad de un 22%. En el carril 3 se muestra la actividad de la ribozima alostérica de la misma preparación que se empleó en todos los experimentos descritos previamente (preparación A). En los carril 4 y 5 se muestra la actividad de la ribozima alostérica de la preparación que empleamos para inmovilizar (preparación B), sin y con efector positivo, respectivamente.

La actividad que presentan las preparaciones A y B, es de 13 y 14% respectivamente. Esta comparación la hacemos ya que se requiere una cantidad considerable de ARN (alrededor de 50 µg) para inmovilizar por lo que preparamos más ribozima alostérica y según vemos, la actividad de las preparaciones A y B son comparables entre si.

La actividad de la ribozima no alostérica y alostérica observada en este experimento comparada con la de otros experimentos, (FIGURA 2 en el

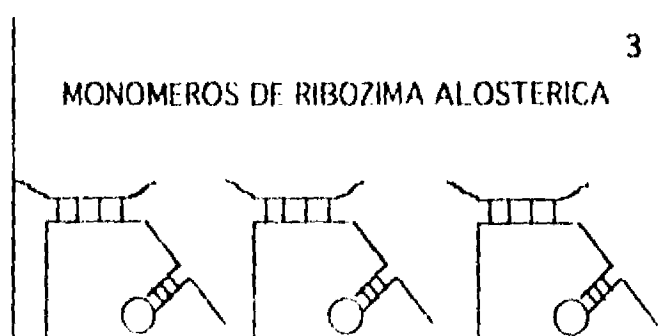
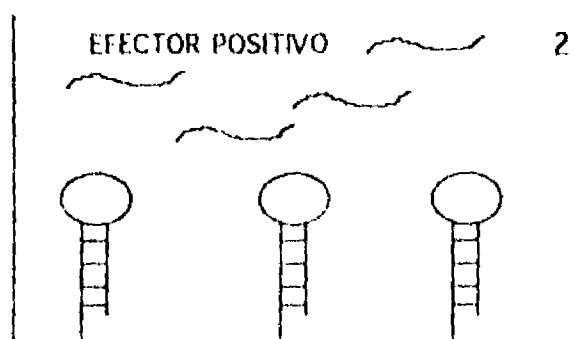


FIGURA 20. LA RIBOZIMA ALOSTERICA INMOVILIZADA NO FORMA DIMEROS.

- 1) La ribozima alostérica se encuentra unida por el extremo 3' a una matriz.
- 2) Se agrega el efector positivo para activar a la ribozima alostérica.
- 3) Al estar fijo el extremo 3' de la ribozima alostérica, se descarta la posibilidad de que se forme un dímero con otra molécula abierta.

RIBOZIMAS EN SOLUCION					RIBOZIMAS INMOVILIZADAS		
RA	RnA	RA	RA	RA	RnA	RA	RA
1	2	3	4	5	6	7	8

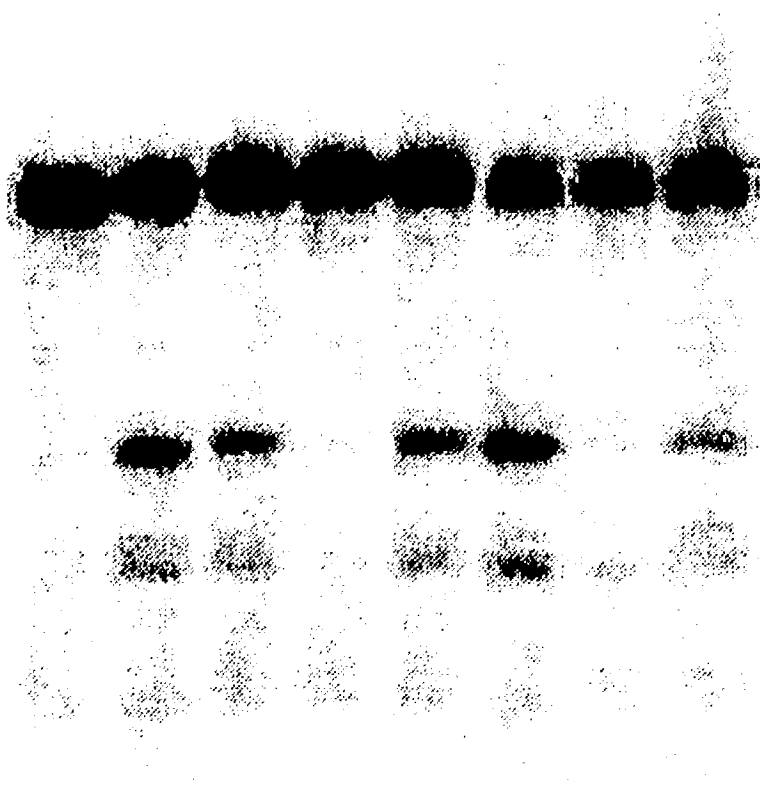


FIGURA 21. ACTIVIDAD DE CORTE DE LAS RIBOZIMAS NO ALOSTERICA Y ALOSTERICA EN SOLUCION E INMMOVLIZADAS. La actividad de las ribozimas control y alostérica inmovilizadas en Affigel-Hidrazida se compara con la actividad de corte mostrada en solución. El buffer usado es Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 50 mM y MgCl₂ 10 mM. La concentración inicial de sustrato es 1 μ M. La relación molar entre la ribozima alostérica y el efector positivo es de 1:5. Carril 1 al 5, 0.5 μ M de ribozimas en solución: 1) ribozima alostérica (preparación A) sin efector positivo; 2) ribozima no alósterica; 3) ribozima alostérica (preparación A) con efector positivo; 4) ribozima alostérica (preparación B) sin efector positivo; 5) ribozima alostérica (preparación B) con efector positivo. Carriles 6 al 8, ribozimas inmovilizadas: 6) 0.5 μ M de ribozima no alostérica, 7) 0.5 μ M de ribozima alostérica (preparación B) sin efector positivo; 8) 0.5 μ M de ribozima alostérica (preparación B) con efector positivo. RnA: ribozima no alostérica, RA: ribozima alostérica.

Artículo), es menor. La diferencia radica en que el sustrato usado en cada uno de estos experimentos proviene de una preparación distinta y aunque en ambos casos se emplea la misma metodología, los ARNs que se obtienen en cada ocasión no se cortan con la misma eficiencia. Este comportamiento puede ser una consecuencia de la purificación a partir de geles desnaturizantes de poliacrilamida, ya que mediante este procedimiento el ARN puede adquirir conformaciones no funcionales (Walstrum y Ulhenbeck, 1990).

Del carril 6 al 8 mostramos la actividad de las ribozimas no alostérica y alostérica inmovilizadas. La actividad de la ribozima no alostérica es de 35% (CARRIL 6). Comparando esta actividad con el 22% de actividad catalítica de corte de la ribozima no alostérica en solución (CARRIL 2), la enzima inmovilizada es aparentemente 35% más activa. En los carril 7 y 8 se muestra la actividad de la ribozima alostérica (preparación B) sin y con efector positivo. El corte del sustrato por la ribozima alostérica inmovilizada es de 11%. Esta actividad es un tanto menor a la que presenta la ribozima alostérica no inmovilizada (CARRIL 5).

La actividad catalítica de corte de la ribozima alostérica depende de dos hibridaciones: la primera entre la ribozima y el efector positivo y la segunda entre la ribozima estructurada y su sustrato. Una baja actividad de la ribozima inmovilizada puede deberse a una cinética de hibridación más lenta. Por otro lado, es posible que parte del sustrato o fragmentos del mismo después del corte se queden unidos inespecíficamente a la matriz. Un pegado inespecífico del sustrato nos llevaría a una subestimación de la actividad catalítica de corte de las ribozimas inmovilizadas.

Lo más relevante en este experimento es la demostración de tener ribozimas inmovilizadas funcionales. Un manejo adecuado de la medición de la actividad dependerá del diseño experimental de futuras aplicaciones de ribozimas inmovilizadas.

"MULFOLD" COMO HERRAMIENTA DE PREDICCIÓN

De manera teórica se analizó la capacidad de reconocimiento del asa del "switch" por el efector positivo utilizando el programa "MulFold" (Zucker, 1989; Jaeger, et al., 1989).

El programa "MulFold" permite doblar una sola molécula de ARN a la vez. Así que para analizar la interacción del "switch" con el efector la secuencia de cada uno de los "switches" se unió a la secuencia de su efector positivo mediante 8 nucleótidos no específicos marcadas como N dentro de la secuencia. Cada uno de estos ARN se doblaron en estructuras con la mínima energía (se ejemplifica para el SW1 en la figura 13).

También calculamos la energía mínima de la estructura secundaria del efector positivo para cada uno de los "switches" y del efector imperfecto para el SW2. La energía mínima que presenta el efector antes de hibridar al "switch", se debe considerar sumada a la energía mínima del "switch" cerrado, puesto que tanto la estructura del "switch" como la del efector se interrumpen en el momento de la hibridación.

De los resultados de estos doblados podemos señalar los siguientes puntos (TABLA 2): 1) El resultado de la diferencia del valor de ΔG del "switch" abierto menos la suma de la ΔG del "switch" cerrado más la ΔG del efector antes de hibridar [$\Delta(\Delta G)$], nos muestra una estabilidad mayor que coincide con un mayor número de estructuras positivas es decir estructuras secundarias en las que se encuentra totalmente hibridado el efector a su región complementaria en el "switch". 2) Un mayor valor de $\Delta(\Delta G)$ correlaciona con el mejor funcionamiento del estado 'abierto' o 'cerrado' monitoreado experimentalmente para cada uno de los "switches". La $\Delta(\Delta G)$ más estable es la del SW3. El 81% del SW3 se encuentra en forma de monómero, comparada con el 52% del SW2 siendo su valor de $\Delta(\Delta G)$ menos estable. La actividad de la ribozima alostérica en presencia del efector positivo es de 43% ($\Delta(\Delta G)$ más estable) contra un 18% en presencia de el efector imperfecto ($\Delta(\Delta G)$ menos estable). Analizando la $\Delta(\Delta G)$ para el SW1 podemos esperar que el "switch" se abra en presencia del efector positivo, puesto que su valor es similar al que presenta el SW2. Además el número de estructuras positivas es igual al del SW3. La medición de la

SWITCH MOLECULAR	$\Delta G_{\text{CERRADO}}$ (kcal/mol)	$\Delta G_{\text{EFECTOR}}$ (kcal/mol) (8)	$\Delta G_{\text{ABIERTO}}$ (kcal/mol) (1)	SUMA DE LA $\Delta G_{\text{CERRADO}} + \Delta G_{\text{EFECTOR}}$ (kcal/mol)	$\Delta (\Delta G)$ ABIERTO- (CERRADO + EFECTOR) (kcal/mol)	No. (2)	FUNCIONAMIENTO
SW3	-33.7	-7.8	-72.7	-41.5	-31.2	10	SI (3)
SW2	-36.5	-7.8	-72.6	-44.3	-28.5	9	SI (4)
SW2/EI(5)	-36.5	-8.7	-60.7	-45.2	-15.5	7	PARCIAL (6)
SW1	-55.5	-6.9	-89.7	-62.4	-27.3	10	NO (7)

TABLA 3. Valores de ΔG para el SW1, SW2, SW3 en presencia o en ausencia de efectores.

1. Cada uno de los switches moleculares y su correspondiente molécula efectora en *cis* se doblaron usando el programa MulFold (Zuker, 1989; Jaeger, et al., 1989).
2. El número (No.) de estructuras secundarias que mostraron la hibridación correcta entre el asa del switch molecular y el efector.
3. El funcionamiento del SW3 se presenta en base a experimentos de retardamiento.
4. El funcionamiento del SW2 se presenta en base experimentos de retardamiento y a la actividad de corte de la ribozima "Hammerhead" estructurada el abrirse el switch.
5. Se refiere a la interacción entre el SW2 y el efector imperfecto (EI).
6. El funcionamiento del SW2 en presencia de EI se presenta con base en la actividad de corte de la ribozima "Hammerhead" estructurada el abrirse el switch.
7. El funcionamiento del SW1 se presenta en base a la actividad de la RNasa III sobre el ARN doble cadena. No se midió la actividad de la ribozima.
8. La ΔG del efector antes de aparear con el SW.

actividad de la ribozima de este "switch" aclararía si el SW1 funciona correctamente.

Este no es un estudio sistemático, puesto que no es uno de los objetivos de este trabajo definir el poder de predicción del "MulFold", sin embargo Δ (ΔG) pudiera ser indicativo del funcionamiento de un "switch" molecular. Un estudio más a fondo del valor de "MulFold" para predecir la actividad de ARNs catalíticos pequeños se reportó recientemente (Denman, 1993).

USO DE MARCADORES FLUORESCENTES EN ENSAYOS QUE INVOLUCRAN ACIDOS NUCLEICOS

Uno de los intereses de estudio, en el laboratorio del Dr. Lizardi es la creación de nuevos métodos para diagnóstico basados en ensayos de hibridación de ácidos nucleicos en que la detección se lleva a cabo empleando compuestos fluorescentes. Este concepto puede ser aplicable para medir la actividad de una ribozima, por lo que a continuación se plantea un esquema que no se ha implementado pero que definitivamente abre la posibilidad de emplear marcadores fluorescentes en ensayos que involucren la actividad de una ribozima alostérica.

La gran mayoría de los ensayos basados en hibridación de ácidos nucleicos son de tipo heterogéneo, es decir el oligonucleótido detector está unido a un soporte insoluble. El material que no hibrida puede ser lavado exhaustivamente de tal forma que sólo los híbridos entre la sonda y el blanco son detectados. Por otro lado, en los ensayos de tipo homogéneo la hibridación procede en solución y se caracterizan porque la señal detectada inicialmente se ve alterada como una consecuencia de la hibridación. Los ensayos homogéneos aunque menos sensibles tienen la ventaja de no requerir un soporte insoluble, lo que reduce la manipulación durante el ensayo y elimina el problema que genera el pegado inespecífico del detector al soporte (Morrison et al., 1989).

El ensayo con marcadores fluorescentes emplea dos sondas de ADN

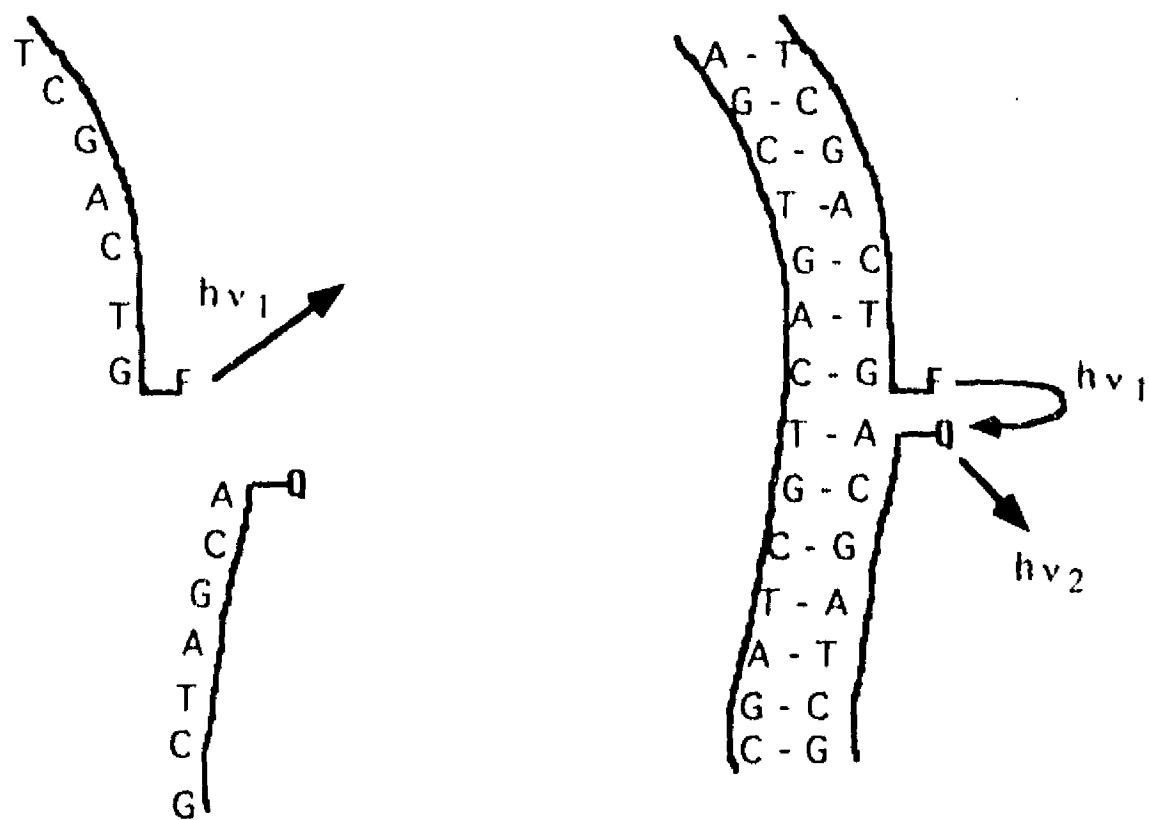


FIGURA 22. FORMATO NO COMPETITIVO PARA UN ENSAYO HOMOGENEEO. Este ensayo emplea dos sondas complementarias a regiones contiguas al blanco. Una de los sondas complementarias esta marcada con un compuesto fluorescente (F) que puede ser excitado por absorción de luz produciendo fluorescencia. La otra sonda esta marcado con un compuesto (Q) que puede interactuar con F mediante su hibridación al blanco, disminuyendo la eficiencia de emisión de F o emitiendo luz con diferente longitud de onda.

complementarias a regiones contiguas del blanco (FIGURA 22). Uno de los detectores está marcado con un compuesto fluorescente (F) que puede ser excitado por absorción de luz produciendo fluorescencia. La otra sonda está marcado con un compuesto (Q) que puede interactuar con F alterando su emisión de luz, resultando en una disminución de la eficiencia de emisión de F. A este fenómeno se le llama "quenching". La eficiencia del "quenching" depende de la distancia entre F y Q. En general, en un ensayo los detectores en solución se encuentran en baja concentración y tan alejados uno del otro que no se encubre la fluorescencia. Sin embargo, cuando las sondas hibridan en regiones contiguas del blanco las marcas están lo suficientemente juntas para interactuar. La disminución de la señal fluorescente es entonces una medida de la hibridación de la sonda al blanco (Morrison, 1989).

El ensayo homogéneo descrito por Morrison y colaboradores, es una alternativa factible para detectar la actividad de la ribozima alostérica de una manera directa, rápida y sin emplear radioactividad.

DISEÑO EXPERIMENTAL DE LA MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE CORTE DE LA RIBOZIMA ALOSTÉRICA MEDIANTE EL USO DE FLUORESCENCIA

Basándonos en un sistema homogéneo no competitivo, diseñamos un ensayo para medir la actividad catalítica de corte de la ribozima alostérica midiendo el cambio en la señal fluorescente como consecuencia de una hibridación entre oligonucleótidos fluorescentes y el substrato de la ribozima. Este ensayo usa dos sondas contiguas con secuencia complementaria al substrato de la ribozima. Uno de los oligonucleótidos contiene en el extremo 3' un dabcilo (Q). El otro oligonucleótido contiene en el extremo 5' una cumarina (F). La marca F puede ser excitada por la luz y producir fluorescencia mientras que la marca Q puede interactuar con F disminuyendo su eficiencia de emisión de luz. Cuando los dos oligonucleótidos hibridan con el substrato los fluoróforos se acercan de tal forma que la fluorescencia emitida por F se encubre por Q y no hay señal fluorescente. Como resultado de la actividad catalítica de la ribozima, el substrato se

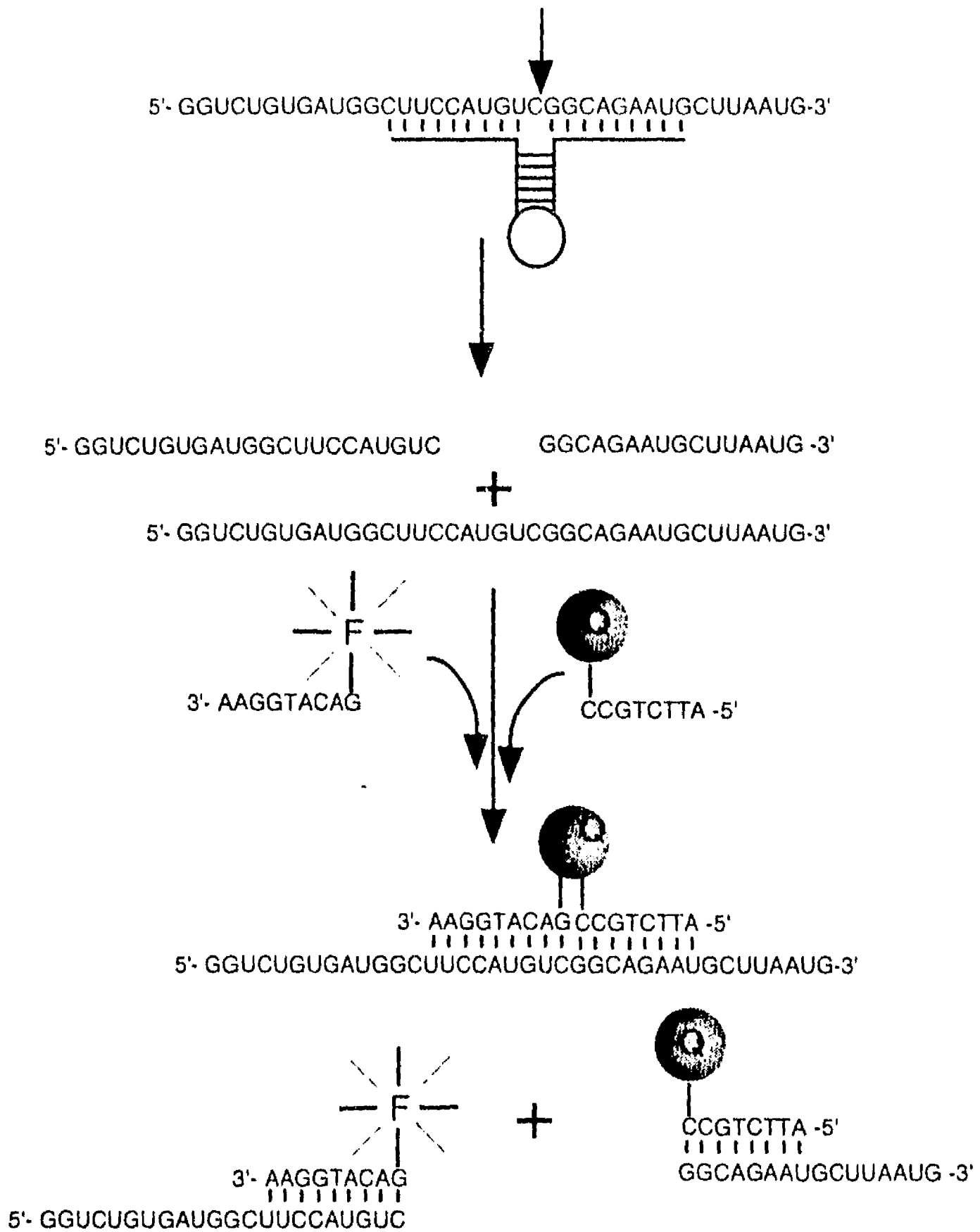


FIGURA 23. SECUENCIA PARA LA DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALITICA DE CORTE DE LA RIBOZIMA EN BASE A UN FORMATO NO COMPETITIVO CON OLIGONUCLEOTIDOS FLUORESCENTES. 1) Se lleva a cabo la reacción de corte de la ribozima. 2) Se añaden los oligonucleótidos fluorescentes. 3) Los oligonucleótidos hibridan tanto con los fragmentos como con el sustrato sin cortar. La fluorescencia detectada es proporcional a la fracción de sustrato cortado.

corta justo en la posición que separa a F de Q. La señal fluorescente emitida será indicativa de la actividad de corte de la ribozima. El ensayo homogéneo de hibridación con marca fluorescente funciona bien en un intervalo de 10 nM y 1 nM de concentración de sondas y en relaciones 1:1 de F y Q.

El diseño de los pasos para esta detección se muestran en la FIGURA 23. Se lleva a cabo la reacción de corte enzimático por la ribozima de la manera ya establecida. A los 10 µl de la reacción de corte se le agrega EDTA para quelar el Mg²⁺ y así evitar que fragmentos del sustrato o sustrato sin cortar queden unidos a la ribozima. La hibridación no competitiva se haría de forma similar a como lo describe Morrison para un ensayo competitivo (1989), utilizando los oligonucleótidos F y Q en relación de 1:1 con respecto al sustrato, desnaturalizando las muestras a 85 °C durante un minuto y permitiendo enfriar hasta la temperatura de hibridación y transferir a una placa tipo ELISA. En ausencia de corte los oligonucleótidos marcados hibridan al sustrato, adyacentes uno al otro, bloqueándose, así, la señal fluorescente. Si el sustrato se cortó, la señal fluorescente detectada dependerá de la hibridación entre el fragmento 5' del sustrato y oligonucleótido marcado con la fluoresceína y será representativa de la actividad catalítica de corte de la ribozima. La concentración de fluoróforo empleado en este ensayo, teóricamente permite su detección utilizando un espectrofluorímetro para leer una placa con formato tipo ELISA. El tiempo que consumiría este ensayo después de la reacción de corte podría ser de aproximadamente 1 hora. Uno de los posibles problemas de este ensayo sería un efecto de "quenching" debido a una alta concentración de fluoróforos en solución en ausencia de muestra. En este caso la reacción de corte, se puede diluir hasta una concentración que use menos oligonucleótidos marcados sin salirse del intervalo de detección mínima del espectrofluorímetro.

DISCUSION

La facilidad que tiene el ARN de aparearse consigo mismo o con moléculas de ADN nos permitió crear una ribozima alostérica. Hasta el momento ninguna ribozima alostérica se había descrito en la literatura.

El diseño de la ribozima alostérica está basado en una estructura de ARN denominada "switch" molecular, que cambia de conformación al hibridar con una molécula de ADN con secuencia complementaria.

La región catalítica de una ribozima tipo "hammerhead", forma parte del "switch" molecular de tal forma que no se permite su estructuración. Cuando el "switch" molecular forma un duplex con un polinucleótido con secuencia complementaria al que llamamos efector positivo, sufre un cambio conformacional que libera a la ribozima "hammerhead" de su constreñimiento.

Este es un sistema basado en el diseño de apareamientos específicos entre una molécula de ARN y un oligodesoxinucleótido, que tienen la gran ventaja de permitir cambiar por un lado, la secuencia de la región complementaria con el efector positivo, y por el otro, la secuencia de la ribozima.

Para llegar a una ribozima alostérica funcional se requirió del diseño de tres "switches" moleculares en los cuales se modificaron los tamaños y las secuencias tanto del asa como del tallo. Para el diseño de estos "switches" nos apoyamos en el programa de doblado del ARN "MulFold".

Estudios para determinar la hibridación entre ADN antisentido y un blanco de ARN, indican que a mayor estructuración menor es la afinidad del oligonucleótido antisentido por su blanco (Lima et al., 1992). Este concepto se puede aplicar al diseño de "switches" moleculares, de tal forma que una nula o mínima estructuración en el asa del "switch" molecular es deseable para que la hibridación entre el efector positivo y el "switch" molecular sea eficiente. De los tres "switches" moleculares analizados, el asa del SW1 presenta mayor estructuración que el SW2 y el SW3. Sin embargo, en base a las ΔG de las estructuras con la mínima energía, de los "switches" abiertos, ("switch" molecular más efector), la estructura formada entre el

SW1 y su efector es más estable que las correspondientes estructuras para el SW2 y el SW3. Por otro lado, el valor arbitrario de $\Delta(\Delta G)$, nos muestra una estabilidad mayor que coincide con un mayor número de estructuras positivas. A mayor número de estructuras positivas y un valor de $\Delta(\Delta G)$ más estable, el funcionamiento de los switches es mejor. Los valores de $\Delta(\Delta G)$ para el SW1 indican la posibilidad de que el "switch" se abra. Los datos experimentales muestran que sí hay un retardamiento del SW1 en presencia de su efector, sin embargo, esta estructura es sustrato de la RNasa III, por lo que es probable que el tallo no se encuentre totalmente separado. Sin embargo, el experimento con RNasa III no es definitivo. Midiendo la actividad de la ribozima de este "switch" se definiría si el SW1 está totalmente abierto, por lo tanto la digestión con RNasa III no debe emplearse como único criterio para definir la conformación de un "switch" molecular.

Así pues, el valor $\Delta(\Delta G)$ puede ser usado como un indicador del funcionamiento correcto de un "switch" molecular. El programa "MulFold" no es predictivo, pero sí nos proporciona información útil para el diseño de ribozimas alostéricas activas.

La baja actividad de la ribozima alostérica en presencia de 20 mM de Mg^{++} , bien podría deberse a la formación de estructuras no monoméricas inactivas. El uso de apareamientos tipo "wobble", secuencias ricas en A y U o más cortas, deben considerarse para el diseño de tallos menos estables que faciliten el cambio conformacional del "switch" en presencia del efector de manera específica. En el caso de este trabajo, el cambio de un par G/C en el SW2 por un par G/U en el SW3, incrementó la presencia de estructuras monoméricas de un 52% hasta un 80 %. La estabilización de estructuras secundarias de ARN se favorece con la presencia de cationes divalentes. Una menor concentración de Mg^{++} en la reacción de corte resultó en una mayor actividad de la ribozima alostérica, probablemente debido a la disminución de estructuras inactivas. Sin embargo, en el caso particular de la ribozima Rz_{CAT3} , parece ser menos activa en presencia de 10 mM de Mg^{++} . El uso de Mn^{++} u otros cationes divalentes, en lugar de Mg^{++} , podría incrementar la actividad de la ribozima alostérica ya sea con base en una menor formación de estructuras inactivas o mejorando la actividad del motivo "hammerhead" *per se*.

La diferencia en la actividad de corte de un experimento a otro

empleando las mismas preparaciones de ribozimas, radica en el uso de preparaciones de substrato diferentes. Para contender con este problema el substrato obtenido por transcripción y purificación en geles desnaturizantes de poliacrilamida, se ha substituido por prácticamente la misma molécula obtenida por síntesis química. Este substrato sin purificar no se cortó, por lo que se purificó por HPLC, geles desnaturizantes de poliacrilamida e intercambio iónico. Solo en el caso de intercambio iónico y en una ocasión se obtuvo un substrato que pudo ser cortado por la ribozima. El ARN sintético probablemente está contaminado con un componente químico que inhibe la reacción y los métodos de purificación empleados no lo separaron del substrato.

Una aplicación práctica de un ARN obtenido por síntesis química puede ser el uso de un substrato para una ribozima que incluya un fluoróforo y su par que interrumpa la señal fluorescente, flanquendo el sitio de corte lo cual facilitaría la medición de la actividad, ya que la señal fluorescente aparecería como un efecto directo de la actividad de corte en un ensayo de tipo competitivo (Morrison et al. 1989).

La posibilidad de inmovilizar ribozimas y que éstas conserven su actividad, abre la posibilidad de usarlas en un sistema de diagnóstico en el cual la ribozima alostérica se encuentre inmovilizada. La idea general es que la ribozima alostérica sea activada por un blanco específico presente en una muestra biológica. Para este tipo de ensayo se puede emplear una ribozima alostérica quimera de ADN/ARN, ya que son resistentes a la degradación por nucleasas (Yang et al. 1990). Para detectar la señal se puede usar un substrato, que también puede ser una quimera de ARN/ADN, con marcadores fluorescentes. Dado que la ribozima alostérica es un sistema versátil, el motivo catalítico se podría substituir por una ribozima obtenida por selección *in vitro* capaz de catalizar la formación de un compuesto colorido o fluorescente.

La utilidad de la ribozima alostérica se puede extender prácticamente a todos los usos que actualmente tienen las ribozimas. Como ejemplo se puede mencionar la inactivación de mensajeros en sistemas *in vivo*. Una de las estrategias más prometedora implica la síntesis *in vitro* de ribozimas quimeras de ARN y ADN para ser posteriormente introducidas en las células. Estas ribozimas pueden cortar un blanco de ARN mediante el dominio ARN de la ribozima, además de que los híbridos ARN/ADN formados entre el

blanco y la ribozima, son sustrato para la RNasa H. El uso de una ribozima híbrida se estudia actualmente para el tratamiento de leucemia mielógena crónica (Rossi, 1994). La otra estrategia, es crear un gen que codifique para una ribozima, el cual se introduce a las células y es la misma célula la que sintetiza a la ribozima (Rossi y Sarver, 1990a y 1990b; Cotten, 1990; Edgington, 1992). En vista de que la ribozima alostérica se activa específicamente en presencia de ADN y ARN ajenos, es posible que una ribozima alostérica corte un ARN sustrato en un medio intracelular complejo, como respuesta a la presencia de una molécula efectora específica.

Una ribozima alostérica sería de utilidad *in vivo* para estudiar la expresión genética a nivel celular. Por ejemplo, se infiere que el producto del gene c-fos está implicado en muchos procesos celulares dentro de los que se incluye la síntesis de ADN, la transducción de señales y la resistencia a agentes antineoplásicos (Kashani-Sabet, et al., 1991). La destrucción del ARNm de cualquiera de los genes implicados en algunas de esas vías como consecuencia de la actividad de una ribozima alostérica activada por el ARNm de c-fos, podría aportar más información acerca de la modulación genética de las vías metabólicas relacionadas con c-fos. Una ribozima alostérica también puede ser útil para el estudio de la expresión diferencial de familias de genes. Tal es el caso de la glutamino sintetasa de frijol. Esta enzima está codificada en el núcleo, por cuatro genes muy relacionados denominados $gln\alpha$, $gln\beta$, $gln\gamma$ presentes en el citosol y $gln\delta$ que se encuentra en citosol como un polipéptido precursor que posteriormente se localiza en cloroplastos (Cullimore y Bennet, 1992). Para estudiar si la expresión del gen $gln\delta$ está relacionado con la fotosíntesis, se puede emplear una ribozima alostérica activada por un ARNm expresado durante fotosíntesis como el ARNm de la subunidad pequeña de la ribulosa bifosfatocarboxilasa (Rubisco), también presente en citosol. La destrucción del ARNm de $gln\delta$ como consecuencia de la actividad de una ribozima alostérica activada por el ARNm de la subunidad pequeña de Rubisco, podría aportar mas información acerca de la regulación de esta familia de genes. Cualquiera de las estrategias que actualmente se utilizan para el uso de ribozimas *in vivo* puede aplicarse para la ribozima alostérica.

Por el momento la activación de la ribozima alostérica está limitada a su unión a un ácido nucléico. Sin embargo, con la metodología de selección *in vitro*, se puede ampliar la variedad de efectores positivos. Hasta el

momento, se han desarrollado varios experimentos para seleccionar ácidos nucleicos que se unen a ligandos y los resultados indican que hay pocas limitaciones en cuanto a lo que un ácido nucleico puede reconocer. A estos ácidos nucleicos se les conoce como aptámeros. Dentro de los aptámeros más estudiados están algunos ARN seleccionados para reconocer específicamente colorantes orgánicos, esto es un ARN que se une a un colorante y que no puede unirse a otro aún siendo su estructura similar (Ellington y Szostack 1990). Un ARN también puede unir D-triptofano específicamente de entre una mezcla de D- y L-triptofano (Famulok y Szostack, 1992). También se han podido seleccionar ARN que pueden formar estructura de triple hélice al unirse a un ADN doble cadena (Pei et al., 1991). Extrapolando la metodología de selección *in vitro* a la ribozima alostérica, las posibilidades de seleccionar una ribozima alostérica que presente una superficie que interactue específicamente con un compuesto dado, es factible. Esto es, si partimos de una biblioteca de ARN en la cual la región que reconoce el efector es una secuencia aleatoria se podría seleccionar una ribozima alostérica que se activa como consecuencia de su unión a un aminoácido, a ligandos específicos o a ADN doble cadena.

Los "switches" moleculares tienen un tamaño moderado por lo tanto una ribozima pequeña, resulta más adecuada para el diseño de una ribozima alostérica. Esto podría ser una limitante si se piensa en ribozimas de mayor tamaño. Actualmente los ARNs con actividad catalítica novedosa o los aptámeros son moléculas de alrededor de 200 bases de largo, sin embargo, el sitio de unión a un ligando o el sitio catalítico parece estar limitado a unas cuantas bases. La región crítica para el reconocimiento de colorantes orgánicos es de 20 a 30 bases (Ellington y Szostack 1990). El aptámero mínimo que reconoce ATP comprende una estructura de 35 nucleótidos (Lorsch y Szostack 1994). En el caso del ARN con actividad de isomerasa (Prudent et al. 1994) 25 nucleótidos parecen importantes en la estructuración y en la catálisis. Este es un campo de investigación muy novedoso y productivo y cabe la posibilidad de tener en un futuro cercano una variedad de ribozimas pequeñas. La ribozima alostérica es un sistema basado en el diseño de apareamientos específicos de un ARN y por lo mismo, tiene la gran ventaja de permitir cambiar la secuencia de la región catalítica, lo que permitirá en un futuro el diseño de nuevas ribozimas alostéricas.

BIBLIOGRAFIA

- Anderson, P., Monforte, J., Tritz, R., Nesbitt, S., Hearst, J. and Hampel, A. 1994. Mutagenesis of the hairpin ribozyme. *Nucleic Acids Res.* **22**:1096-1100
- Bhattacharyya, A. and Lilley, D. M. 1989. The contrasting structures of mismatched DNA sequences containing looped-out bases (bulges) and multiple mismatches (bubbles). *Nucleic Acids Res.* 1989. **17**:6821-6840.
- Beaudry, A. A and Joyce F. G. 1992. Directed evolution of an RNA enzyme. *Science* **257**:635-641.
- Bennet, M. J. and Cullimore, J. V. 1992. Selective cleavage of closely-related mRNAs by synthetic ribozymes. *Nucleic Acids Res.* **20**: 831-837.
- Berger, S.A. and Evans, P.R. 1992. Site-directed mutagenesis identifies catalytic residues in the active site of *Escherichia coli* phosphofructokinase. *Biochemistry.* **31**:9237-9242.
- Branch, A.D., Levine, B.J., Baroudy, B.M., Buckler-White, A. Gerin, J.L. and Robertson H.D. 1991. The novel tertiary structure in delta RNA may function as a ribozyme control element. *Prog Clin Biol Res.* **364**:257-264.
- Bruce, A. G. and Ulhenbeck, O. C. 1978. Reactions at the termini of tRNA with T4 RNA ligase. *Nucleic Acids Res.* **5**:3666-3677
- Bock, R. M. and Cherayil, J. D. 1967. Chromatography of sRNA on DEAE-Cellulose and DEAE-Sephadex. *Methods in Enzymol.* **12**:638-644.
- Busayan, J. M., Gerlach, W. L. and Bruening, G. 1986a. Non-enzymatic cleavage and ligation of RNAs complementary to a plant virus satellite RNA. *Nature.* **323**:349-353.
- Busayan, J. M., Gerlach, W. L. and Bruening, G. 1986b. Satellite tobacco ringspot virus RNA: A subset of the RNA sequence is sufficient for autocatalytic processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:8859-8862.
- Cech, T. R. . Structures and mechanisms the large catalytic RNAs: group I, group II and ribonuclease P. *In* The RNA world. Cold Spring Harbor Laboratories

1993. pp. 239- 269.

Cotten, Max. 1990. The *in vivo* application of ribozymes. *TibTech* **8**:22-27.

Chelladurai, B. S., Li. H. and Nicholson, A. 1991. A conserved sequence element in ribonuclease III processing signals is not required for accurate *in vitro* enzymatic cleavage. *Nucleic Acids Res.* **19**:1759-1766.

Dai, X., De Mesmaeker, A. and Joyce, G. F. 1995. Cleavage of an amide bond by a ribozyme. *Science.* **267**:237-240.

Dahm, S. C. and Ulhenbeck, O. C. 1991. Role of divalent metal ions in the hammerhead RNA cleavage reaction. *Biochemistry* **30**: 9464-9469.

Denman, R. B. 1993. Using RNAFOLD to predict the activity of small catalytic RNAs. *BioTechniques.* **15**:1090-1094.

Edgington, S.M. 1992. Ribozymes: Stop making sense. *BIO/TECHNOLOGY* **10**: 256-262.

Ellington, A.D. and Szostack, J.W. 1990. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **346**:818-822.

Epstein, L.M. and Gall, J. G. Self cleaving transcripts of satellite DNA from the newt. 1978. *Cell* **48**: 535-543.

Famulock, M. and Szostack, J.W. 1992. Stereospecific recognition of tryptophan agarose by *in vitro* selected RNA. *J. Am. Chem. Soc.* **114**:3990-3991

Fanhestock S. R. and Nomura, M. 1972. Activity of ribosomes containing 5S RNA with a chemically modified 3'-terminus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **69**: 362-365.

Fedor, M. J and Ulhenbeck, O. C. 1990. Substrate sequence effects on "hammerhead" RNA catalytic efficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:1668-1672.

Fedor, M. J and Ulhenbeck, O. C. 1993. Kinetics of intermolecular cleavage by hammerhead ribozymes. *Biochemistry.* **31**: 12042-12054.

Forster, A. C. and Symons, R. H. 1987a. Self cleavage of plus and minus RNAs of a virusoid and a structural model for the active site. *Cell* **49**:211-220.

Forster, A. C. and Symons, R. H. 1987b. Self cleavage of virusoid RNAs is performed by the proposed 55 nucleotide active site.. Cell 50: 9-16

Goodchild, J. 1992. Enhancement of ribozyme catalytic activity by a contiguous oligodeoxynucleotide (facilitator) and by 2'-O-Methylation. Nucleic Acids Res. 20:4607-4612.

Gottlieb, P. A., Prasad, Y., Smith, J. B., Williams, A. P. and Dinter-Gottlieb, G. 1994. Evidence that alternate foldings of hepatitis δ RNA confer varying rates of self-cleavage. Biochemistry. 33:2802-2808.

Grasbi, J.A., Buttler, P.J, and Gait, M. J. 1993. The synthesis of oligonucleotides containing O6-methylguanosine: the role of conserved guanosine residues in hammerhead ribozyme cleavage. Nucleic Acids Res. 21: 4444-4450.

Haggerman, P.J. 1988. Flexibility of DNA. Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 17:265-286.

Hampel, A., Tritz, R., Hicks, M. and Cruz, Phillip. 1990. "Hairpin" catalytic RNA model: evidence for helices and sequence requirement for substrates RNA. Nucleic Acids Res. 18: 299-304.

Haseloff, J. and Gerlach, W. L. 1988. Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. Nature. 334:585-591.

Heidenreich, O., Benseler, Fritz, Fahrenholz, A. and Eckstein Fritz. 1994. High activity and stability of hammerhead ribozymes containing 2'-modified pyrimidine nucleosides and phosphorothioates. J. Biol. Chem. 269: 2131-2138.

Hermanson, G. T., Mallia A. K., Smith, P. K. Immobilized affinity ligand techniques. Academic Press Inc. 1992. pp. 270-273.

Herchsalag, D. 1991. Implications of ribozyme kinetics for targeting the cleavage of specific RNA molecules *in vivo*. More isn't always better. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:6921-6925.

Hertel, K. J., Herschlag, D. and Ulhenbeck, O. C. 1994. A kinetic and thermodynamic framework for the hammerhead ribozyme reaction. Biochemistry. 33:3374-3385.

Hutchings, C. J., Rathjen, P. D., Forster, A. C. and Symons, R. H. 1986. Self

cleavage of plus and minus RNAs transcripts of avocado sunblotch viroid. *Nucleic Acids Res.* **14**: 3627-3640.

Jaeger, J. A., Turner, D. H. and Zuker, M. 1989. Improved predictions of secondary structures for RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**:7706-7710.

Jaffe, E. K. and Cohn M. 1979. Diastereomers of the nucleoside phosphorotioates as probes of the structure of the metal nucleotide substrates and the nucleotide binding site of the yeast hexokinase. *J. Biol. Chem.* **254**:10839-10845.

Kiefer, M.C., Daubert, S.D., Schneider, I. R. and Bruening, G. B. 1982. Multimeric forms of satellite tobacco ringspot virus RNA. *Virology* **121**:1577-1580.

Koide, S., Yokoyama, S., Matsuzawa, H., Miyazawa, T. and Ohta, T. 1992. Conformational equilibrium of an enzyme catalytic site in the allosteric transition. *Biochemistry* **31**: 5362-5368.

Kramer, F. R. and Lizardi, P. M. 1989. Replicable RNA reporters. *Nature.* **339**:401-402.

Krinke L. and Wulff D. 1990. The cleavage specificity of RNase III. *NAR.* **18**:4809-4815.

Li, J., Zhu, X., Byrnes, M., Nelson, J.W. and Chang, S.H. 1993. Site-directed mutagenesis of rabbit muscle phosphofructokinase cDNA. *J. Biol. Chem.* **268**: 24599-24606.

Lima, W.F, Monia, B.P., Ecker, D. J. and Freier, S. M. 1992. Implication of RNA structure on antisense oligonucleotide hybridization kinetics. *Biochemistry.* **31**:12055-12061.

Lorsch, R.J and Szostack, J. W. 1994. *In vitro* evolution of new ribozymes with polynucleotide kinase activity. *Nature* **371**:31-36.

Miller, W.A. and Silver, S.L. 1991. Alternative tertiary structure attenuates self-cleavage of the ribozyme in the satellite RNA of barley yellow dwarf virus. *Nucleic Acids Res.* **19**:5313-5320.

Milligan, J. F., Groebe, D. R., Witherell, W. G. and Uhlenbeck O. C. 1987. Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. *Nucleic Acid Res.* **15**:8783-8798.

Morrison, L. E., Halder, T. C. and Stols, L. M. 1989. Solution-phase detection

of polynucleotides using interacting fluorescent labels and competitive hybridization. *Analytical biochemistry* **183**: 231-244.

Morl, M., Niemer, I. and Schmelzer. 1992. New reaction catalyzed by a group II intron ribozyme with RNA and DNA substrates. *Cell*. **70**: 803-810.

Noller, H., F., Haffarth, V. and Zimniak, L. 1992. Unusual resistance of peptidyl transferase to protein extraction procedures. *Science* **256**: 1416-1419.

Pan, T., Long, D. M. and Ulhenbeck, O. C. Divalent metal ions in RNA folding and catalysis. *In* *The RNA world*. Cold Spring Harbor Laboratories 1993. pp. 271- 302.

Paollela, G., Sprout, B. S., and Lamond, A. I. 1992. Nuclease resistant ribozymes with high catalytic activity. *EMBO J.* **11**: 1913-1919.

Pei, D., Ulrich, H.D. and Schultz, P.G. 1991 A combinatorial approach toward DNA recognition. *Science* **253**: 1408-1411.

Perrota, A. Tand Been, M.D. 1990. The self-cleaving domain from the genomic RNA of hepatitis delta virus: sequence requirements and the effect of denaturant. *Nucleic Acids Res.* **18**:6821-6827.

Picirilli, J. A., McConnell T. S., Zaug, A. J., Noller, H.F. and Cech, T.R. 1992. Aminoacyl esterase activity of the *Tetrahymena* ribozyme. *Science* **256**: 1420-1424.

Prody, G. A., Bakos, J. T., Schneider, I. R. and Bruening, G. 1986. Autolytic processing of dimeric plant virus satellite RNA. *Science*. **231**:1577-1580.

Prudent, J. R., Uno, T. and Schultz, P. G. 1994. Expanding the scope of RNA catalysis. *Science* **264**:1924-1927.

Rossi, J.J. 1994. The development and application of therapeutics ribozymes. *In* *The San Diego Conference. The genetic revolution*. San Diego, USA.

Rossi, J.J. and Sarver, N. 1990. RNA enzymes (ribozymes) as antiviral therapeutic agents. *TibTech* **8**:12-16.

Rosenstein, S. P. and Been, M.D. 1990. Self-cleavage of hepatitis delta virus genomic strand RNA is enhanced under partially denaturing conditions. *Biochemistry*. **29**:8011-8016.22.

Ruffner D.E., Stormo, G. D. and Ulhenbeck, O. C. 1990. Sequence requirements of the hammerhead RNA self-cleavage reaction. *Biochemistry*. **29**:10695-10702.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.

Saville, B.J. and Collins, R. A. 1990. A site-specific self-cleavage reaction performed by a novel RNA in *Neurospora crassa* mitochondria. *Cell*. **61**:685-696.

Sawata, S. Shimayama, T., Komiyama, M., Kumar, P. K. R., Nishikawa, S and Taira, Kazunari. 1993. Enhancement of the cleavage rates of DNA-armed hammerhead ribozymes by various divalent metal ions. *Nucleic Acids Res.* **21**:5656-5660.

Scalon, K.J., Jiao, L., Funato, T., Wang, W., Tone, T., Rossi, J.J. and Kashani-Sabet, M. 1991. Ribozyme-mediated cleavage of c-fos mRNA reduces gene expression of DNA synthesis enzymes and metallothionein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **88**:10591-10595.

Scharf, J. S. Cloning with pcr. In pcr protocols a guide to methods and applications. Edited by Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J. Academic Press, 1990. pp. 84-91.

Shore, D., Langowski, J. and Baldwin, R. 1981. DNA flexibility studied by covalent closure of short fragments into circles. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*. **78**:4833-4837.

Stebbins, J.W. and Kantrowicz E.R. 1992. Conversion of the Noncooperative *Bacillus subtilis* aspartate transcarbamoylase into cooperative enzyme by single aminoacid substitution. *Biochemistry* **31**: 2328-2332.

Szostak, J.W. and Ellington, A.D. In Vitro Selection of Functional RNA Sequences. *In* The RNA world. Cold Spring Harbor Laboratories 1993. pp. 511-534.

Tsuchihashi, Z., Khosla, M. and Hersclag, D. 1993. Protein enhancement of hammerhead ribozyme catalyst. *Science*. **262**:99-102.

Ulhenbeck, O. C. 1991. Catalytic RNAs. *Current opinion in structural biology*. 1991. **1**: 459-463.

- Uhlenbeck, O. 1987. A small catalytic oligonucleotide. *Nature* **328**:596-600.
- Vioque, A. and Altman, S. 1986. Affinity chromatography with an immobilized RNA enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **83**:5904-5908.
- Walstrum, S., A. and Uhlenbeck, O. C. 1990. The self-splicing RNA of *Tetrahymena* is trapped in a less active conformation by gel purification. *Biochemistry*. **29**:10537-10576.
- Wu, H., Lin, Y., Makino, S., Chang, M. and Lai, M. M. C. 1989. Human hepatitis δ virus RNA subfragments contain autoclavage activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:18310-18315.
- Wyatt, R. J., Chastain, M. and Puglisi, D. J. 1991. Synthesis and purification of large amounts of RNA oligonucleotides. *Biotechniques*. **11**:764-768
- Yang, J., Perreault, J., Labuda, D., Usman, N. and Cedergren R. 1990. Mixed DNA/RNA polymers are cleaved by the Hammerhead ribozyme. *Biochem.* **29**:11156-11160.
- Zaug, A. J. and Cech T.R. 1986. The *Tetrahymena* intervening sequence ribonucleic acid enzyme is a phosphotransferase and an acid phosphatase. *Biochemistry*. **25**:4478-4482.
- Zuker, M. 1989. On finding all suboptimal foldings of an RNA molecule. *Science*. **244**:48-52.