

03062

19  
2ej.

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

---

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

CONSTRUCCION Y ANALISIS DE TIPO ESTRUCTURA-FUNCION  
DE DOS MOLECULAS RECOMBINANTES SUBSTRATOS  
PARA LA REPLICASA DEL FAGO QB, QUE CONTIENEN  
UNA SONTA PARA *Trypanosoma cruzi*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
MAESTRIA EN INVESTIGACION  
BIOMEDICA BASICA

P R E S E N T A

MARIA ISABEL TUSSIE LUNA

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

CUERNAVACA, MOR

1992



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.

## INDICE

### RESUMEN

### INTRODUCCION

I. Síntesis de RNA <i>in vitro</i> por la replicasa de QB.	1
II. El RNA MDV-1, un templado modelo para estudiar el mecanismo de replicación.	4
III. Análisis estructural.	6
IV. Análisis de secuencia del RNA.	6
V. Evolución de RNA <i>in vitro</i> .	6
VI. Mecanismo de replicación de RNA por la replicasa de QB.	7
VII. Otras actividades enzimáticas de la replicasa del fago QB.	13
VIII. RNAs recombinantes.	14
IX. Moléculas reporteras amplificables y sondas de RNA recombinantes.	16

JUSTIFICACION	21
---------------	----

OBJETIVO GENERAL	23
------------------	----

OBJETIVOS PARTICULARES	23
------------------------	----

### MATERIALES Y METODOS

a) Enzimas.	24
b) Oligonucleótidos.	24
c) Plásmido para la síntesis del RNA MDV-1 (+) por transcripción <i>in vitro</i> .	24
d) Construcción del plásmido que contiene un polylinker dentro de la secuencia del cDNA de MDV-1.	24
e) Construcción de los plásmidos pT7MDVTC para la síntesis de los RNAs recombinantes MDVTC.	25
f) Análisis de la secuencia nucleotídica.	25

g) Transcripción <i>in vitro</i> .	25
h) Replicaciones.	26

## RESULTADOS

I. Construcción de un plásmido para la síntesis del RNA MDV-1 (+).	27
II. Síntesis de RNAs recombinantes por medio de la transcripción de plásmidos.	31
III. Diseño y construcción de sondas replicables para <i>Trypanosoma cruzi</i> .	31
IV. Replicación de los RNAs recombinantes.	34
a) Replicaciones bajo distintas concentraciones de MgCl <sub>2</sub> .	36
b) Replicaciones bajo distintas concentraciones de espermidina.	36
c) Replicaciones bajo distintas concentraciones de NaCl.	38
d) Cinéticas de replicación en condiciones de bajo MgCl <sub>2</sub> ausencia de espermidina y NaCl.	38
V. Amplificación exponencial después de una dilución seriada.	41
VI. Análisis teórico sobre el doblado de estas moléculas recombinantes.	45
a) Simulación del doblado de RNAs utilizando el programa para computadora de Zuker.	45
b) Agrupación de las estructuras secundarias de los RNAs recombinantes utilizando un programa de sorteo de motivos estructurales seleccionables "Motifsort".	53

## DISCUSION

I. Análisis de replicabilidad de las moléculas recombinantes: MDVTC11 y MDVTC17.	68
II. Análisis de las estructuras secundarias predichas por el algoritmo de doblado de moléculas de Zuker.	73
III. Futuras estrategias para el uso de señales replicables en ensayos diagnósticos.	75

BIBLIOGRAFIA	82
--------------	----

## RESUMEN

Se prepararon nuevas moléculas de RNA que contienen una sonda diagnóstica para el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* embebida dentro de la secuencia del RNA MDV-1, que es un templado natural para la RNA polimerasa RNA-dirigida, la Q $\beta$  replicasa. Los RNAs recombinantes resultantes son bifuncionales en el sentido que, funcionan como sondas de hibridación y como templados para la amplificación exponencial por incubación con la replicasa de Q $\beta$ . La secuencia sonda se insertó dentro de un tallo y asa que se encuentra en el exterior del RNA MDV-1. Dos reacciones de Q $\beta$  replicasa iniciadas con 15.2 pg del RNA MDVTC11 y 14.9 pg del RNA MDVTC17 cada una ( $10^8$  moléculas), produjeron apenas 190 y 263 ng de RNA recombinante producto en 30 minutos. Esto representa 12,500 y 17,700 veces de amplificación, respectivamente comparado con un billón de veces de amplificación del RNA MDV-1 o de otros RNAs recombinantes como MDVMal22 o MDVHIV20. Los RNAs recombinantes MDVTC11 y MDVTC17 replican menos eficientemente que el RNA MDV-1. Probablemente sólo una fracción de las moléculas iniciales en cada una de estas reacciones de replicación, sirve como templado para la síntesis de un gran número de copias de RNA. Nuestros resultados demuestran que no todos los RNAs recombinantes poseen características de replicabilidad similares al RNA MDV-1 y que hasta que se obtiene una molécula con estas características es que se vuelve factible el empleo de estos RNAs replicables en ensayos diagnósticos altamente sensibles, donde servirán como sondas específicas y como grupos reporteros amplificables. Un ensayo modelo, que utiliza el RNA replicable MDVHIV20, para la detección del virus HIV-1 mostró una sensibilidad de 10,000 moléculas de blanco (Lomelí y col., 1989).

## INTRODUCCION

El mecanismo de la síntesis de RNA por la replicasa de Q $\beta$  ha sido ampliamente estudiado por el Dr. Fred R. Kramer y el Dr. Donald Mills del Instituto de Investigaciones en Salud Pública de la Ciudad de Nueva York y de la Universidad del Estado de Nueva York. Su trabajo ha estado dirigido hacia el entendimiento del papel que tienen secuencias específicas y estructuras secundarias en el control del proceso sintético. Su trabajo responde esencialmente a cuál es la manera en que el templado controla la unión de la polimerasa, cómo ocurre la iniciación de la replicación, cuál es la velocidad y fidelidad de la polimerización, cómo es que ocurre la separación del producto y el templado y cómo ocurre la terminación de la síntesis.

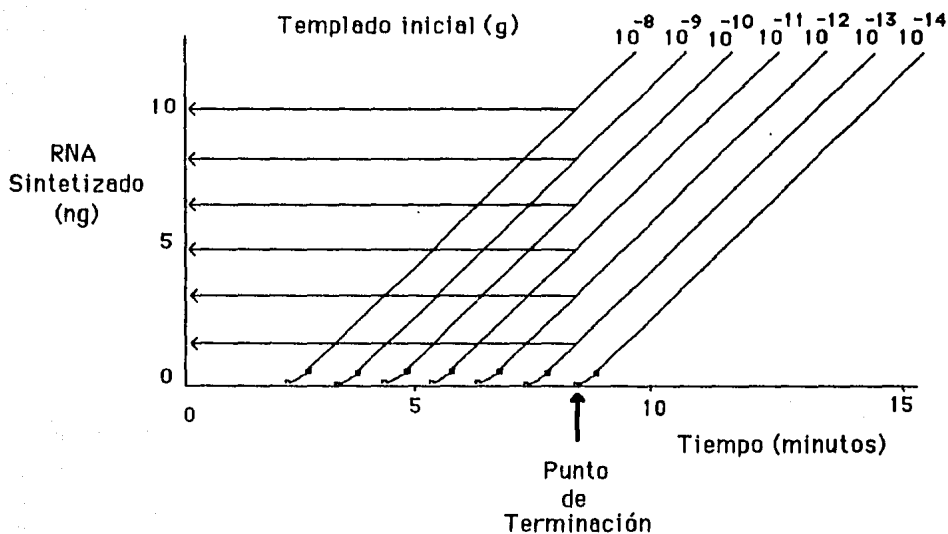
### I. Síntesis de RNA *in vitro* por la replicasa de Q $\beta$ .

La replicasa del fago Q $\beta$  es una RNA polimerasa RNA-dirigida de 215,000 de peso molecular, extremadamente estable y capaz de sintetizar diez millones de copias de un templado de RNA en 10 minutos. La replicasa de Q $\beta$  fue aislada por primera vez de *Escherichia coli* infectada con el bacteriofago Q $\beta$  (Haruna y Spiegelman, 1965a). Está constituida por cuatro polipéptidos y sólo uno de ellos es codificado por el RNA viral (Kamen, 1970; Kondo y col., 1970). Los otros tres polipéptidos son proteínas de *Escherichia coli*, y han sido identificadas como los factores de elongación, Tu y Ts, de la síntesis de proteínas (Blumenthal y col., 1972) y la proteína ribosomal S1 (Wahba y col., 1974). La enzima es extremadamente selectiva para sus propios templados (Haruna y Spiegelman, 1965a). Promueve la síntesis de la cadena sencilla del RNA de Q $\beta$  (Haruna y Spiegelman, 1965a) para producir un RNA viral infectivo (Spiegelman y col., 1965). Se encontró que, el polipéptido codificado por el RNA viral esta involucrado en el reconocimiento específico del templado de RNA y la elongación de la cadena producto (Landers y col., 1974). Recientemente, se clonó este gene viral en *Escherichia coli* y por lo tanto, ahora es posible purificar la replicasa de Q $\beta$  de bacterias transformadas con este plásmido (Mills,

1988). La función de la proteína ribosomal S1 parece ser la unión del templado de RNA y el relajamiento de la estructura secundaria durante la replicación (como una helicasa) (Blumenthal y Carmichael, 1979; Cole y col., 1982) mientras que, los factores Tu y Ts, están involucrados en la iniciación de la cadena producto. La región funcional del factor de elongación Tu está localizada en la porción central de la cadena polipeptídica (Mills y col., 1989). Se ha sugerido que los factores de elongación Tu y Ts, sólo están proporcionando la estructura requerida para que la subunidad viral asuma la conformación necesaria para la iniciación de la cadena producto (Blumenthal y col., 1979).

El proceso replicativo, en términos generales procede de la siguiente forma: la replicasa usa la cadena viral (+) como templado para dirigir la síntesis de la cadena complementaria (-). Ambas cadenas sirven como templado para la síntesis de más cadenas (+) y (-) (Weissman y col., 1968; Spiegelman y col., 1968) y de esta forma se observa un incremento exponencial en el número de cadenas de RNA. Eventualmente, el número de cadenas de RNA presente es suficiente para saturar las moléculas de enzima disponibles y entonces, el número de cadenas incrementa linealmente con respecto a el tiempo. Este proceso también puede llevarse a cabo en reacciones de replicación *in vitro*. Estas reacciones se inician con un gran exceso de QB replicasa respecto al número inicial de templados de RNA. La población de moléculas de RNA se duplica aproximadamente cada 36 segundos (Chu y col., 1986) y la cinética es exponencial. Esto continúa hasta que el número de moléculas de RNA iguala el número de moléculas de replicasa activa (Haruna y Spiegelman, 1965b), después de lo cual, la cinética de síntesis es lineal. Dicho de otra manera, si se inician dos reacciones idénticas con distintas cantidades de templado, las cinéticas de reacción son idénticas excepto que, a la reacción iniciada con menor cantidad de templado le toma más tiempo saturar la enzima y entrar a la fase lineal de síntesis. De esta manera, hay una relación directa entre el tiempo al cual comienza la fase lineal de crecimiento y la cantidad de RNA templado presente inicialmente en la reacción. En una gráfica que muestra la cinética de esta reacción (Figura 1), la fase exponencial se observa como un "lag" después del cual se observa un incremento lineal. El "lag" es mayor o menor dependiendo del número inicial de cadenas de RNA templado.

La velocidad de replicación  $p$  en la fase lineal de crecimiento está definida



**FIGURA 1.** Relación entre la cantidad de RNA sintetizado en la fase lineal de una reacción con Q $\beta$  replicasa y la cantidad inicial de RNA templado. Cada incremento geométrico en la cantidad inicial de RNA templado produce un incremento lineal en la cantidad de RNA producto presente cuando las reacciones son detenidas (Kramer y col., 1974).



como  $d[I_0]/[E_c]dt$ , donde  $[I_0]$  es la concentración total de RNA templado unido a la enzima y de RNA templado libre mientras que,  $[E_c]$  es la concentración de enzima unida al RNA. Una vez que la enzima está saturada con el templado en la fase lineal,  $[E_c] \approx [E_0]$  esto es, la concentración de enzima unida al templado es casi la concentración de enzima total. El valor de  $p$  puede ser determinado fácilmente de la pendiente de los perfiles de incorporación. En la fase de crecimiento exponencial, la velocidad de replicación total,  $k$  esta definida como  $d[I_0]/[I_0]dt$ . Ésta puede ser determinada de la pendiente de una gráfica semilogarítmica del perfil de incorporación. Sin embargo, se puede medir con mayor precisión y mayor conveniencia de la aparición en el tiempo (el "lag") de los perfiles de incorporación a las diferentes diluciones de templado (Biebricher y col., 1981)

La replicación procede aproximadamente tres veces más rápido en la fase de crecimiento exponencial que en la fase de crecimiento lineal. La velocidad de crecimiento lineal esta determinada por la velocidad de reactivación de la enzima (número de recambio) mientras que, bajo condiciones de exceso de enzima, el producto liberado puede empezar inmediatamente un nuevo ciclo de replicación (Biebricher y col., 1981). En la fase exponencial, la formación de complejos RNA-enzima y la formación de estructuras secundarias tanto en la cadena templado como en la cadena naciente (Kramer y col., 1981; Priano y col., 1987) aparentemente protegen a las cadenas sencillas complementarias de formar inmediatamente cadenas dobles, pero en la fase lineal, puede ocurrir la formación irreversible de cadenas dobles a partir de las cadenas sencillas de RNA que se van acumulando, aniquilando la actividad de templado de ambas cadenas (Biebricher y col., 1984).

## II. El RNA MDV-1, un templado modelo para estudiar el mecanismo de replicación.

Existen un gran número de templados para la replicasa de QB que ocurren naturalmente y son mucho más pequeños que el RNA del fago QB (4,220 nucleótidos). Un grupo de tales RNAs fueron generados en un experimento de transferencia seriada (Mills y col., 1967). Después de varias generaciones de

replicación, se produjeron varios RNAs más cortos, en donde las regiones codificadoras que no están involucradas en la replicación, fueron deletadas. El RNA más pequeño seleccionado en este experimento contiene menos del 15% de la longitud del RNA de Q $\beta$ . Otro grupo de RNAs fue aislado de *Escherichia coli* infectada con el fago Q $\beta$  e incluye varias especies de RNAs "6S" (Banerjee, 1969). El tercer grupo fue producido por reacciones de replicación *in vitro* que fueron llevadas a cabo en ausencia de RNA templado exógeno. Éstos incluyen el RNA MDV-1 (midvariante) (Kacian y col., 1972), el RNA MCV (microvariante) (Mills y col., 1975), los RNAs NVs (nanovariantes) (Schaffner y col., 1977), el RNA MNV (minivariante) (Biebricher, 1987) y el RNA resistente a cordicepina (Priano y col., 1986a). Sus tamaños fluctúan entre 221 y 77 nucleótidos. El cuarto grupo de RNAs fue también aislado de una reacción de replicación *in vitro* en ausencia de templado, pero el análisis de secuencia mostró que son RNAs recombinantes que pueden contener tanto elementos de RNAs celulares como del RNA de Q $\beta$  (Munishkin y col., 1988) o tan sólo elementos de algunos RNAs celulares (Munishkin y col., 1991). Uno de tales RNAs recombinantes, el RNA RQ120, contiene una porción del RNA de Q $\beta$  en su extremo 5' y una parte de la secuencia del tRNA<sup>ASP</sup> de *Escherichia coli* en su extremo 3' (Munishkin y col., 1988). Mientras que, el RNA RQ 135, consiste únicamente de segmentos homólogos al RNA ribosomal 23S de *Escherichia coli* y al origen de replicación del fago *lambda* (Munishkin y col., 1991). Aunque el origen y el significado biológico de estos RNAs aún no está claro, han sido extensamente caracterizados y todos son excelentes templados para la replicasa de Q $\beta$ . Características notorias de todos estos templados son su alto contenido de GC, así como, la presencia de muchos posibles apareamientos intracadena capaces de formar diferentes estructuras de tipo tallo y asa.

De entre estos RNAs, el que ha sido más extensamente estudiado es el RNA MDV-1 (221 nucleótidos), el cual, por ser más pequeño que el RNA de Q $\beta$  (4,220 nucleótidos), ha sido el modelo idóneo para el estudio del mecanismo de replicación. El RNA MDV-1 es unido por la replicasa de Q $\beta$  y replicado en forma similar al RNA de Q $\beta$  (Kacian y col., 1972). Su menor tamaño permitió la determinación de su secuencia nucleotídica (Mills y col., 1973). Se ha tomado ventaja del pequeño tamaño de este templado para probar la manera en que su secuencia y las estructuras secundarias controlan el proceso de replicación.

### III. Análisis estructural.

Se han hecho estudios de microscopía electrónica y las observaciones hechas con moléculas nativas, desnaturalizadas y parcialmente desnaturalizadas indican que el RNA MDV-1 nativo de cadena sencilla es una molécula altamente condensada que posee muchísima estructura terciaria (Klotz, 1982). Utilizando agentes químicos que modifican regiones de cadena sencilla de RNA se identificaron estructuras secundarias específicas (Mills y col., 1980). Se determinó la estructura terciaria del RNA MDV-1 por experimentos de digestión limitada con la ribonucleasa de T1, que rompe únicamente regiones de cadena sencilla en las zonas externas y de esta manera se identificaron las regiones más expuestas (Kramer y col., 1986). También se empleó la digestión con ribonucleasa T1 como una prueba de la presencia de estructuras secundarias en RNAs MDV-1 sintetizados parcialmente (Kramer y Mills., 1981), ya que estas moléculas no están tan fuertemente dobladas como las cadenas completas. También se hace evidente su fuerte estructura secundaria (Priano y col., 1987) por su alto punto de fusión (Biebricher y col., 1982).

### IV. Análisis de secuencia del RNA.

Se utilizó un método análogo al método de secuenciación de DNA de Sanger que incorpora análogos 3'-deoxi de los rNTPs como terminadores específicos de la cadena para la determinación de la secuencia del RNA MDV-1 (Kramer y Mills, 1978; Axelrod y Kramer, 1985). Se identificaron varias zonas de compresión de bandas. Como se conocía la estructura secundaria del RNA-MDV-1 se demostró que las zonas de compresión de bandas se debían a la persistencia de estructuras secundarias durante la electroforesis. Se encontró que, la sustitución de inosina por guanosina previene eficientemente la formación de estructuras secundarias durante la electroforesis (Mills y Kramer, 1979).

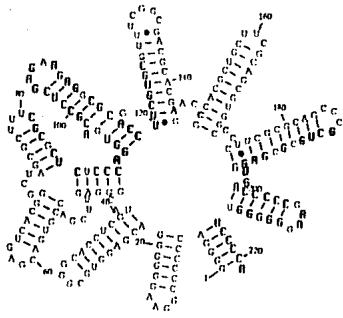
### V. Evolución de RNA *in vitro*.

Se puede mantener indefinidamente el crecimiento de una población de

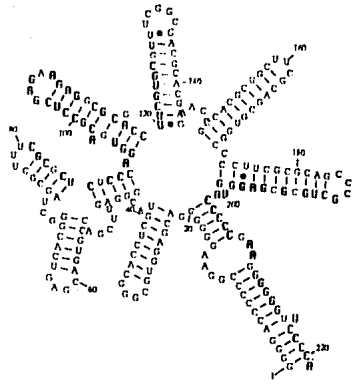
moléculas de RNA que replican *in vitro*, por la técnica de transferencia seriada (Mills y col., 1967) en dónde una pequeña porción del producto de una reacción se utiliza como templado para la siguiente reacción en la serie. De vez en cuando, ocurren errores durante la replicación ( $3 \times 10^{-4}$  bases/seg) (Batschelet y col., 1976) y se obtiene una cadena mutante. Normalmente, es difícil detectar la presencia de cadenas mutantes por análisis de secuencia nucleotídica. Sin embargo, cuando se crece una población de RNA en presencia de un inhibidor de la replicación, las moléculas mutantes que son capaces de resistir al inhibidor tienen una ventaja selectiva. Dejando crecer las suficientes generaciones, estas moléculas vienen a ser predominantes en la población. Por imposición de diferentes presiones selectivas surgieron diferentes variantes (Levisohn y Spiegelman, 1969). Así, se han seleccionado mutantes resistentes a bromuro de etidí (Kramer y col., 1974), a ribonucleasa T1 (Kramer y col., 1986), a cordicepina trifosfato (Priano y col., 1986) y se han secuenciado muchas de estas mutantes.

## VI. Mecanismo de replicación de RNA por la replicasa de Q $\beta$ .

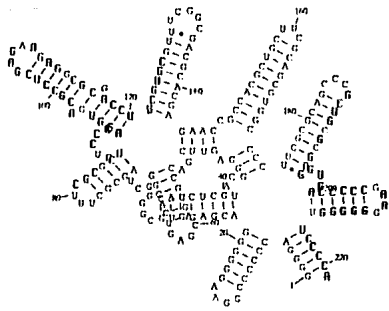
La síntesis de RNA por medio de la replicasa de Q $\beta$  se puede dividir en cuatro pasos: reconocimiento, iniciación, elongación y terminación. El primer evento en la síntesis de la cadena producto es la unión de la replicasa a una región interna del templado de RNA. Se han identificado regiones específicas en el RNA de Q $\beta$  (Weber y col., 1972; Meyer y col., 1981), en el RNA MDV-1 (Nishihara y col., 1983) y en el RNA NV (Shaffner y col., 1977) que unen a la replicasa de Q $\beta$ . La región encontrada en el RNA MDV-1 (+) y en el RNA (-) de Q $\beta$  (Nishihara y col., 1983) esta conservada entre los colifagos de RNA del grupo IV (Inokuchi y col., 1988) y forma una fuerte estructura de tallo y asa en el centro de la molécula como lo predice el algoritmo de doblado en computadora (Figura 2) (Zuker y col., 1989). Esta región contiene los tallos que se habían encontrado eran hipersuceptibles a la digestión con la ribonucleasa de T1 (Kramer y col., 1986). Así, el sitio de unión a la replicasa está situado en el exterior de la molécula. La unión de la replicasa a esta región ocurre en la ausencia de rNTPs (August y col., 1968; Mills y col., 1976) indicando que, primero se forma el complejo replicasa-templado y luego, ocurre la iniciación.



221 ENERGY = -115.0 MDV-1 (+)



221 ENERGY = -114.8 MDV-1 (+)



221 ENERGY = -111.8 MDV-1 (+)

**FIGURA 2. Estructura secundaria óptima y las siguientes dos estructuras subóptimas predichas para el RNA MDV-1 (+). La predicción se hizo utilizando el programa de cálculo de estructuras subóptimas de Zuker (Zuker, 1989). Las dos principales regiones homólogas al RNA (-) del fago Q $\beta$  se indican con letras oscuras (Nishihara y col., 1983).**

La iniciación de la síntesis de la cadena producto ocurre en el extremo 3' del templado con pppG (August y col., 1968; Kacian y col., 1972). Se cree que la interacción entre la Q $\beta$  replicasa y el sitio de unión altera la conformación del RNA de forma tal que, el extremo 3' es traído a la proximidad de la replicasa (Blumenthal, 1979). Se requieren las tres C's del extremo 3', que se encuentran en todos los templados secuenciados así como en el RNA del fago Q $\beta$ , para que ocurra la iniciación (Rensing y col., 1969; Schaffner y col., 1977; Mills y col., 1973). La remoción o la conversión de las tres citidinas de su extremo 3' causa una pérdida total de la actividad de templado y la infectividad (Rensing y col., 1969; Mills y col., 1980). De aquí se concluye que, las tres C's presentes en el extremo 3' son indispensables para que la síntesis ocurra de manera exponencial (Mills y col., 1980).

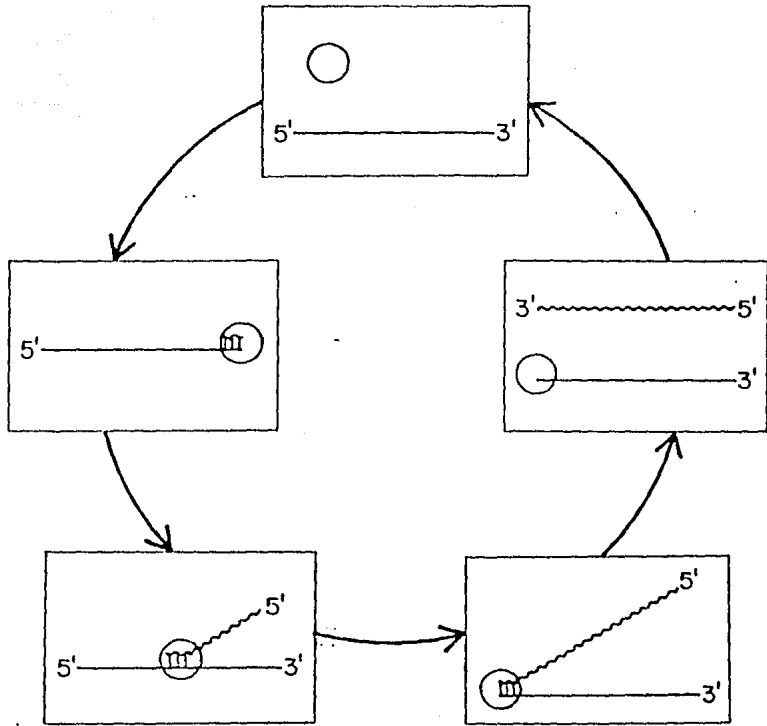
La elongación de la cadena producto ocurre en la dirección 5'  $\rightarrow$  3' (Spiegelman y col., 1968). La estructura secundaria del templado influye fuertemente la velocidad de elongación de la cadena producto. El análisis electroforético de la distribución de los diferentes intermediarios de elongación durante la síntesis del RNA MDV-1 por la replicasa de Q $\beta$  reveló que la velocidad de síntesis es altamente variable (Mills y col., 1978). Los datos sugieren que la replicasa es interrumpida temporalmente en un número relativamente pequeño de sitios específicos y luego, continúa espontáneamente con una probabilidad finita. El análisis de la secuencia nucleotídica de los intermediarios de elongación más prominentes reveló que todos podían formar una estructura de tallo en el extremo 3'-terminal. Esto sugirió que la marcada variabilidad en la velocidad de elongación de la cadena se debía a la formación de tallos terminales en la cadena producto o a la reformación de tallos en la cadena templado. Durante la elongación, la cadena naciente se separa de la cadena templado, debido a la formación de estructuras secundarias (Feix y col., 1968; Kramer y col., 1981; Priano y col., 1987). Otros experimentos, han demostrado que la formación de estructuras secundarias durante la elongación de la cadena juega un papel importante en la prevención del colapso de la cadena producto sobre la cadena templado (Priano y col., 1987; Mills y col., 1986) ya que, el RNA de cadena doble no sirve como templado para la replicasa de Q $\beta$  (Weissmann, 1974; Biebricher y col., 1982). Se sabe que, ocurren reorganizaciones estructurales mientras la cadena producto crece (Kramer y Mills, 1981). Así, se reemplazan configuraciones

menos estables por configuraciones más estables mientras la cadena producto es sintetizada.

Antes de la terminación de la síntesis, ocurre la adición de una adenosina no codificada por el templado en el extremo 3' de la cadena producto (Weber y Weissmann, 1970). No hay adenilación terminal en las cadenas sintetizadas sobre fragmentos de templado que carecen de un extremo 5' normal (Bausch y col., 1983). La función de esta adenosina terminal no está clara. No se copia en la cadena hija durante la iniciación (August y col., 1968; Kacian y col., 1972) ni esta involucrada en la infectividad o en la replicación (Rensing y col., 1969; Bausch y col., 1983). Después de la adición de la adenosina terminal al extremo 3', la cadena producto se libera y luego, la replicasa se disocia de la cadena templado. Entonces, la replicasa queda lista para unirse a otra molécula de templado e iniciar la siguiente vuelta de replicación. Una sola molécula de replicasa unida a un sólo templado de cadena sencilla es suficiente para llevar a cabo un ciclo sintético completo (Dobkin y col., 1979). Se muestra en la Figura 3 una representación esquemática del ciclo de replicación.

Para mantener la capacidad de replicación, se deben conservar en el templado y en la cadena producto tanto el sitio de unión a la replicasa como el sitio 3' de iniciación. Ya que la síntesis de la cadena producto ocurre de manera antiparalela, las tres G's del extremo 5' de la cadena templado dirigen la síntesis de las tres C's del extremo 3' de la cadena producto. Así, las secuencias terminales complementarias preservan el sitio de iniciación en ambas cadenas. Por otro lado, como consecuencia de la complementariedad entre las cadenas (+) y (-), los tallos y asa que ocurren en una cadena también están presentes en su complemento (Figura 4). Tanto la presencia de tallos y asás como de secuencias terminales idénticas en ambas cadenas, explica por qué la replicasa de QB, que es una enzima altamente selectiva, puede reconocer a las dos cadenas que son complementarias, pero no idénticas.

La Figura 2 muestra la estructura secundaria óptima y las siguientes dos estructuras secundarias subóptimas del RNA MDV-1 predichas por el programa de computadora de Zuker (Zuker y col., 1981; Zuker, M. 1989; Jaeger y col., 1989a; Jaeger y col., 1989 b). Este dibujo es consistente con la evidencia



**FIGURA 3. Ciclo de replicación de la replicasa del fago Q $\beta$  (Dobkin y col., 1979).** La replicasa (simbolizada por un círculo) sintetiza un producto de cadena sencilla en dirección 5'  $\rightarrow$  3' a partir de un templado de cadena sencilla. Esta enzima puede utilizar otros templados más pequeños que el propio RNA de Q $\beta$  como son el RNA MDV-1, el RNA MCV, toda la gama de RNAs NVs o el RNA MNV. La replicasa usa la cadena viral (+) como templado para dirigir la síntesis de la cadena complementaria (-). Luego, ambas cadenas sirven como templado para la síntesis adicional de cadenas (+) y (-). De esta manera se observa un incremento exponencial en el número de cadenas de RNA respecto al tiempo.





estructural obtenida por modificación química (Mills y col., 1980), la observación de regiones de compresión de bandas en geles de secuencia (Kramer y Mills, 1978; Mills y Kramer, 1979) y con el mapeo de estructura utilizando la digestión con la ribonucleasa de T1 (Kramer y Mills, 1981). Haciendo una comparación exhaustiva de las secuencias nucleotídicas del RNA MDV-1 y del RNA viral de QB (Nishihara y col., 1983) se encontraron sólo dos regiones de homología (indicadas con letras oscuras en la Figura 2). Estas regiones comprenden el sitio de unión a la replicasa necesario para el reconocimiento del templado y la secuencia en el extremo 3' rica en C's, necesaria para la iniciación de la cadena producto.

## VII. Otras actividades enzimáticas de la replicasa del fago QB.

Cuando se utiliza una preparación de replicasa a la cual se le ha quitado completamente el templado de RNA endógeno (Sumper y Luce, 1975; Biebricher y col., 1986) y se analizan reacciones iniciadas con una dilución tal que, correspondería a la ausencia completa de templado, se observan tiempos "lag" muy largos y dispersos, los perfiles son irreproducibles y los productos no se parecen en nada al RNA templado inicial. Los productos no parecen ser copias de un RNA replicable presente como impureza en la preparación de la enzima (Biebricher y col., 1986) por lo que se piensa que, pueden ser producto de síntesis *de novo* (Sumper y Luce, 1975). A bajas concentraciones de enzima o de sustrato o a elevada fuerza iónica, no ocurre síntesis *de novo*.

Otras DNA y RNA polimerasas también llevan a cabo síntesis *de novo* (Kornberg y col., 1964; Krakow y col., 1967). Aún cuando los productos de las diferentes polimerasas son diferentes, el mecanismo es probablemente muy similar para todas las polimerasas. Primero, se condensan los rNTPs a oligonucleótidos en una forma más o menos azarosa. Una vez que aparece un RNA, aunque sea pobremente replicable, se amplifica rápidamente bajo el mecanismo usual, dirigido por el templado. Entonces, hay un proceso de optimización evolutiva, ya que los "fingerprints" de las nuevas bandas están muy relacionados entre sí mientras que, los productos *de novo* de las diferentes muestras son completamente diferentes (Biebricher y col., 1981a). El proceso de optimización de los productos de síntesis

*de novo* es irreproducible: se observan diferentes productos de optimización relacionados secuencialmente, en diferentes tubos de reacción ("aislados geográficamente") indicando que, hay eventos raros involucrados (Biebricher, 1983). El mecanismo de optimización no está claro. Probablemente estén involucradas inserciones, ya que se encontró que se añaden nucleótidos lenta y de manera no azarosa al extremo 3' del templado si se inhibe la iniciación de cadenas nuevas, reemplazando el GTP con ITP.

Aún no se entiende el significado biológico de este proceso no codificado por el templado. Como se encontró que esto sucede cinco órdenes de magnitud más lento aún a concentraciones altas de sustrato y de enzima, en condiciones menos óptimas, estas reacciones colaterales deben ser tan lentas que no pueden ser detectadas.

Por otro lado, se encontró que en reacciones de replicación iniciadas con templados de DNA de cadena doble (cDNAs que codifican para RNAs replicables) se pueden generar cadenas sencillas de RNA producto por medio de la actividad de RNA polimerasa DNA-dirigida de la replicasa de Q $\beta$ , que luego pueden ser amplificadas por sucesivos ciclos de replicación y así, ser detectados (Sanjay Tyagi, comunicación personal). Esta reacción es aproximadamente dos órdenes de magnitud menos eficiente que una reacción iniciada con un RNA como templado.

## VIII. RNAs recombinantes.

La amplificación exponencial producida por la replicasa de Q $\beta$  constituye una manera de generar grandes cantidades de cualquier RNA *in vitro*. Se ha intentado utilizar muchas veces la replicasa de Q $\beta$  para amplificar RNAs heterólogos y se han seguido varias estrategias para soslayar la especificidad de la replicasa por el templado. La forma más simple ha sido añadiendo iones manganeso a la mezcla de reacción, que permite a la enzima sintetizar la cadena complementaria iniciada con pppG (Palmenberg y col., 1974; Obinata y col., 1975). La segunda forma es alineando un oligonucleótido al templado, que sirve como primero y permite a la replicasa sintetizar el RNA complementario desde el

extremo 3' del primero (Feix y col., 1976a). La tercera, es relajando la especificidad de la replicasa añadiendo un pedazo de rC o de dC a el extremo 3' del templado de RNA, que asemeja la secuencia 3' terminal de los templados naturales y permite a la replicasa iniciar la síntesis de la cadena complementaria con pppG (Feix y col., 1976b). Aunque la Q<sub>B</sub> replicasa puede replicar algunos RNAs que no son templados naturales bajo condiciones especiales, el producto de la síntesis está restringido al RNA complementario de la cadena templado y así, a una sola vuelta de síntesis; no está sujeto a un ciclo de replicación exponencial. La alta especificidad de templado de la replicasa de Q<sub>B</sub> no ha permitido esta aplicación.

Se siguió una estrategia distinta al insertar las secuencias heterólogas dentro del RNA MDV-1 y ha sido la única forma exitosa de amplificar RNAs heterólogos (Miele y col., 1983; Lomeli y col., 1989). En este caso, el RNA MDV-1 sirve como un acarreador que provee las secuencias y las estructuras requeridas por la replicasa de Q<sub>B</sub> (Miele y col., 1983). El sitio elegido para la inserción está localizado fuera de las regiones requeridas para el reconocimiento del templado e iniciación de la cadena producto (entre el nucleótido 63 y 64 del RNA MDV-1). Este sitio se encuentra en un tallo y asa, donde es menos probable que se altere la estructura secundaria y dónde se sabe que, ocurren mutaciones viables indicando que esa secuencia no es esencial para la replicación. Además, este tallo-asa se encuentra en el exterior de la molécula ya que es una región hipersusceptible al tratamiento con la ribonucleasa de T1.

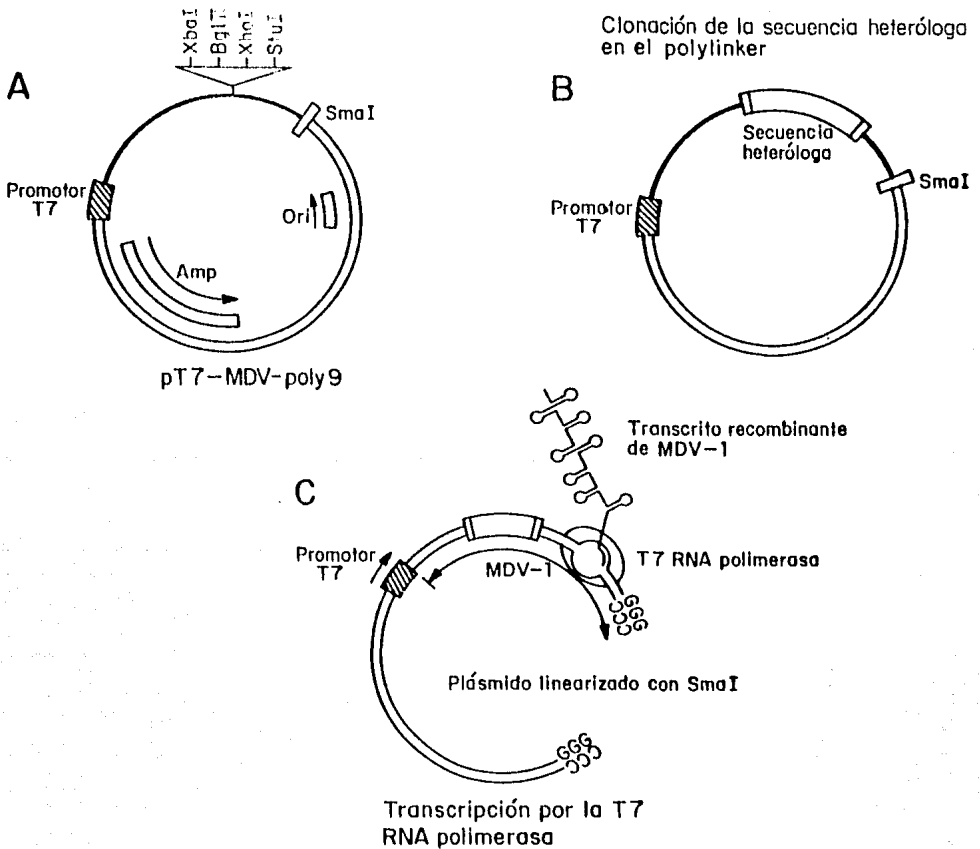
El primer RNA recombinante que se construyó fue preparado por ruptura del RNA MDV-1 en el sitio seleccionado con la ribonucleasa de T1. Luego se insertó ahí ácido decaadenílico con la ayuda de la RNA ligasa del bacteriofago T4. La molécula recombinante de 231 nucleótidos mostró propiedades replicativas similares a las del RNA MDV-1 demostrando que, la secuencia insertada no interfiere con la replicación (Miele y col., 1983). Los productos consistían de copias completas del RNA recombinante. Se sintetizaron las dos cadenas complementarias. El patrón de "fingerprint" de cada una de las cadenas del RNA recombinante, confirmó su identidad. El análisis de la cinética de síntesis del RNA recombinante demuestra que el mecanismo de síntesis es autocatalítico y que la cantidad de RNA incrementa exponencialmente, obteniéndose un millón de veces

de amplificación (Miele y col., 1983). De esta manera, parece posible crear moléculas bifuncionales. La secuencia de RNA insertada dentro de un RNA replicable puede jugar muchos papeles. Puede servir como una sonda de hibridación (esta tesis; Lomelf y col., 1989), como el sitio de unión para la proteína de la cápside del virus R17 (Guerra y col., manuscrito en preparación) o como un RNA mensajero para traducción *in vitro* (Wu y col., manuscrito en preparación) mientras que, las secuencias flanqueadoras de RNA MDV-1 permiten su amplificación exponencial por la replicasa de Q $\beta$ .

Por la conveniencia de insertar secuencias heterólogas en el RNA MDV-1 para generar RNAs recombinantes, se introdujo una copia de cDNA del RNA MDV-1 en un plásmido de *Escherichia coli*. El cDNA de MDV-1 comienza inmediatamente hacia abajo del promotor para la RNA polimerasa de T7 y termina exactamente en el sitio de restricción de Sma I. Se insertó un polylinker de 22 pares de bases en la posición 63 del cDNA de MDV-1, contando a partir del extremo 5' de la secuencia del RNA MDV-1 (+). Se generaron dos plásmidos, el pT7MDVp4 y el pT7MDVp9, cada uno con la secuencia polylinker en la orientación opuesta. Con estos plásmidos se pueden preparar fácilmente RNAs recombinantes por la inserción de las secuencias heterólogas en el polylinker y luego por transcripción *in vitro* del plásmido linealizado con Sma I por incubación con la polimerasa de T7 (Figura 5). En nuestro laboratorio hemos estudiado la replicación de varios RNAs recombinantes que contienen distintas secuencias heterólogas insertadas en un sólo sitio dentro del RNA MDV-1 (+).

## **IX. Moléculas reporteras amplificables y sondas de RNA recombinantes.**

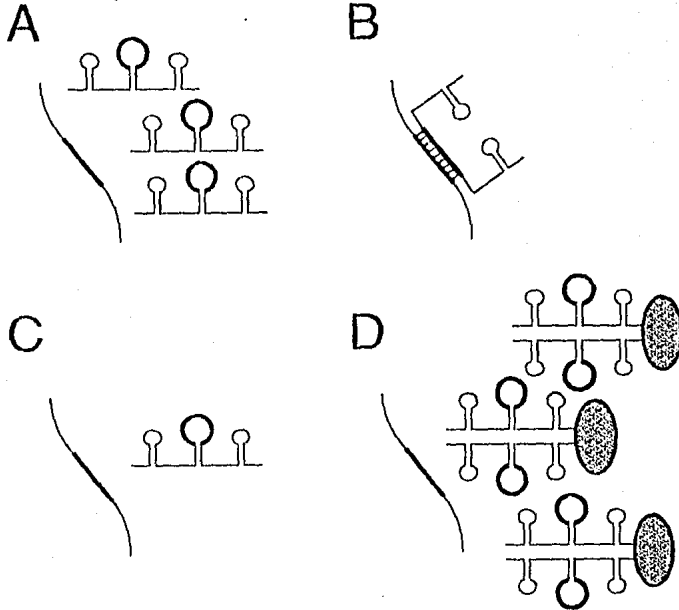
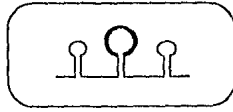
Hay un gran número de ventajas en usar la replicación de un templado de RNA como la base de un sistema exponencial de generación de señal: a) la replicasa de Q $\beta$  es altamente específica para sus propios templados (Haruna y Spiegelman, 1965a); b) cantidades tan pequeñas como una molécula de templado, pueden iniciar la síntesis (Levisohn and Spiegelman, 1968); c) la cantidad de RNA sintetizado en una reacción corta (típicamente, 200 ng en 15 minutos en 25  $\mu$ l) es tan grande que puede ser medido con la ayuda de técnicas colorimétricas sencillas (Haruna y col., 1965b).



**FIGURA 5. Síntesis de RNAs recombinantes por transcripción *in vitro*.** El plásmido pT7MDVpoly9, que contiene el promotor del bacteriofago T7 en dirección hacia el cDNA de MDV-1 (segmento oscuro) (panel A) es modificado por la inserción de la secuencia de DNA heteróloga deseada en cualquiera de los sitios únicos del polylinker, localizado dentro de la secuencia de MDV-1 (panel B). El plásmido resultante es cortado al final de la secuencia de MDV-1 por la enzima de restricción Sma I y luego incubado con la RNA polimerasa de T7 para sintetizar el RNA recombinante MDV-1 (+) que contiene el inserto correspondiente de RNA heterólogo (región oscura del transcrito, panel C).

La Figura 6 muestra cómo es que se piensan utilizar las características de replicación de las reacciones con la replicasa de Q $\beta$  para medir la cantidad de RNA templado que esta presente inicialmente en una reacción como consecuencia de que previamente ha hibridado a una secuencia blanco. La cantidad de RNA templado presente en un ensayo de hibridación será directamente proporcional al número de blancos presentes inicialmente en la muestra. Si se iniciaran un número de reacciones con diferentes cantidades de RNA templado y se incubaran un tiempo tal que, todas hubieran entrado a la fase lineal de la síntesis, entonces habría una relación lineal entre la cantidad de RNA presente en cada reacción y el logaritmo de la cantidad inicial de templado. Dicho de otra forma, incrementos exponenciales en la cantidad de RNA templado son vistos como incrementos lineales en la cantidad de RNA producto. Esta situación se ilustra en la Figura 5 del artículo que se anexa a esta tesis. En la práctica, esto significa que la detección de la señal ocurrirá en el rango de cientos de nanogramos aún para reacciones iniciadas con muy poco RNA templado. Sin embargo, los ensayos para determinar la cantidad inicial de RNA templado tendrán un amplio rango dinámico, ya que el tiempo al cual se mide el RNA producto puede ser disminuido si hay una gran cantidad de RNA templado al inicio, o aumentado si se requieren ensayos muy sensibles. La detección de esta gran cantidad de RNA producto se puede lograr por el intercalamiento de compuestos fluorogénicos tales como el bromuro de etidio (Sharp y col., 1973) o el yoduro de propidio.

Aunque se han iniciado reacciones con la replicasa de Q $\beta$  con tan poco como una molécula de RNA templado (Levinsohn y Spiegelman, 1968), hay dos fuentes de "background" que determinarán el límite de sensibilidad a alcanzar: 1) el número de sondas que se queden pegadas inespecíficamente a la muestra y 2) la presencia de un número pequeño de moléculas de RNA MDV-1 en las preparaciones de replicasa. El número de templados contaminando la replicasa en una reacción típica es del orden de 40-100 moléculas (Kramer y col., 1974). Existen métodos para remover los RNAs templados contaminantes de la replicasa (Eoyang y col., 1971; Hill y Blumenthal, 1983) y por otro lado, ya se ha clonado la subunidad viral de la Q $\beta$  replicasa de forma que, ahora es posible obtener una replicasa libre de "background" (Mills, 1988) de modo que, el "background" en ensayos futuros, estará determinado fundamentalmente por el número de sondas



**FIGURA 6. Uso de sondas de RNA recombinante.** El símbolo de la sonda de RNA recombinante esta formado por una molécula de RNA MDV-1 (representada por una línea doblada en tres tallos y asas), a la cual se le ha insertado una secuencia detectora (que se muestra como un semicírculo engrosado). Se prepara la secuencia blanco de cadena sencilla (panel A). Se hibrida la sonda de RNA recombinante a este blanco, el cual puede ser RNA o DNA (panel B). Después de lavar las sondas de RNA no unidas, se liberan las sondas hibridadas del blanco con calor (panel C). Luego, las sondas de RNA recombinante liberadas son amplificadas exponencialmente por incubación con la replicasa de QB (panel D).



que se queden pegadas inespecíficamente al sistema. Actualmente, se han diseñado otros esquemas alternativos, genéricos, que disminuirán esta fuente de "background" y que se explicarán con más detalle en la discusión de esta tesis.

## JUSTIFICACION

La enfermedad de Chagas afecta a 12 millones de personas en el Continente Americano y hay aproximadamente 35 millones en riesgo de infección. En general, no existe un tratamiento útil o una vacuna. La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas es causada por el parásito protozooario, *Trypanosoma cruzi*, el cual es transmitido eflicamente por insectos de la familia Reduviidae, en especial del género *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus* o por transfusión sanguínea de un donador infectado. En el huésped mamífero, después de una fase aguda inicial, la parasitemia puede decaer y entonces, pasar a una fase crónica de larga duración (de años) con características multisintomáticas y polimórficas.

Debido a la baja abundancia de los tripomastigotes en sangre, el método más confiable de detección directa del parásito es el xenodiagnóstico (Schenone y col., 1977) en el cual se permite que, triatomídeos de laboratorio libres de infección tomen sangre del paciente. Si hay infección, los trypanosomas se multiplican rápidamente en el intestino de la chinche y un exámen de su contenido intestinal después de varias semanas, muestra al parásito. Otros métodos incluyen cultivos axénicos de la sangre e infección de animales de laboratorio susceptibles. Recientemente, también se han desarrollado métodos inmunodiagnósticos tales como el ELISA (Tachibana y col., 1988), el DIG-ELISA (Castilla y col., 1988), el de hemaglutinación o el de inmunofluorescencia indirecta para detectar anticuerpos para *Trypanosoma cruzi*. Estos métodos proporcionan información importante con respecto a la exposición del parásito, sin embargo, debido a la persistencia de anticuerpos contra el trypanosoma después de la desaparición de los parásitos de sangre, hace que estos métodos no discriminen adecuadamente entre infecciones pasadas y presentes. Otros métodos inmunodiagnósticos para detectar directamente antígenos de superficie de *Trypanosoma. cruzi*, también ya han sido desarrollados (Chandler y col., 1988). Son útiles para detectar infecciones presentes, pero anticuerpos contra antígenos del trypanosoma, provenientes de una infección pasada pueden interferir con este ensayo. Otros problemas potenciales son, el secuestro del antígeno en complejos inmunes *in vivo* y persistencia antigénica por días e incluso semanas después de que la

parasitosis ha terminado.

En los últimos años, se han publicado estudios que demuestran la utilización de sondas de hibridación de DNA capaces de detectar *Trypanosoma. cruzi* con absoluta especificidad y gran sensibilidad (González y col., 1984; Ashall y col., 1988). Su sensibilidad depende en parte, de la abundancia relativa de las secuencias nucleotídicas ensayadas en el parásito. Un acercamiento para aumentar la sensibilidad de estos ensayos ha sido la utilización de secuencias repetitivas especie-específicas como sondas. En los estudios originales se utilizan sondas marcadas radioactivamente pero la utilización de sondas no radioactivas es factible y pueden ser tanto o más sensibles que las sondas radioactivas. La sensibilidad reportada es de hasta 5 parásitos en 20 µl de sangre infectada (Ashall y col., 1988).

El diagnóstico para la enfermedad de Chagas tiene que estar basado, en una prueba que identifique al parásito y la especie con gran sensibilidad, para que sea de utilidad clínica. En tanto que, para estudios epidemiológicos además debe ser cuantitativo y capaz de evaluar un gran número de muestras en un período de tiempo más o menos corto.

Por otro lado, desarrollos recientes en la tecnología de amplificación de ácidos nucleicos hacen posible explorar el diseño de nuevos métodos diagnósticos con la sensibilidad y operatividad propuestas. El desarrollo de este tipo de pruebas permitirá el aprovechamiento de esta misma tecnología para el diseño de ensayos diagnósticos para otras enfermedades infecciosas tales como el dengue, la tifoidea, la amibiasis o, a largo plazo, el SIDA.

## **OBJETIVO GENERAL:**

El objetivo general de este proyecto era la búsqueda de reglas generalizables y predecibles en el diseño de moléculas recombinantes, sustratos para la replicasa de QB.

## **OBJETIVOS PARTICULARES:**

Los objetivos de esta tesis fueron:

- A) Generar sondas replicables para el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* que pudieran ser útiles para un ensayo diagnóstico,
- B) Analizar las propiedades replicativas de las diferentes moléculas recombinantes obtenidas, bajo distintas condiciones y
- C) Analizar las relaciones de tipo estructura-función entre las diferentes moléculas recombinantes.

## MATERIALES Y METODOS

**a) Enzimas.** Las endonucleasas de restricción y la polinucleótido cinasa de T4 se compraron de New England Biolabs. La fosfatasa alcalina de intestino de cabra, la DNA ligasa de T4, el fragmento Klenow de la DNA polimerasa de *Escherichia coli* y la DNAsa de pancreas bovino fueron compradas de Boehringer Mannheim. La RNA polimerasa de T7 se compró de U.S. Biochemicals. La replicasa de Q $\beta$  fue aislada de *Escherichia coli* Q13 infectada con el bacteriófago Q $\beta$  por el procedimiento de Eoyang y August (1971), sin el paso de hidroxilapatita. La Q $\beta$  replicasa es una enzima estable cuando se guarda en presencia de glicerol a -20°C; su actividad permanece inalterada incluso después de cinco años.

**b) Oligonucleótidos.** Los oligonucleótidos se prepararon utilizando la química de  $\beta$ -cianoetil fosforoamidita en un sintetizador Microsyn-1450A (Systec). Después de desbloquear y liberar de la resina, los oligonucleótidos fueron purificados por electroforesis en gel preparativo, eluidos del gel y purificados por cromatografía en cartuchos de SEP-PAK (Waters Associates).

**c) Plásmido para la síntesis del RNA MDV-1 (+) por transcripción *in vitro*.** El plásmido pT7MDV contiene un promotor para la RNA polimerasa del fago T7 dirigido hacia el cDNA completo del RNA MDV-1. El plásmido fue construido de tal forma que la transcripción desde el promotor de T7 comienza con el primer nucleótido del RNA MDV-1 (+). Se introdujo un sitio para Sma I en el otro extremo de la secuencia del cDNA de MDV-1 de modo que, cuando el plásmido es linerizado con la endonucleasa Sma I y luego incubado con la T7 RNA polimerasa, la transcripción termina dos nucleótidos antes del final del RNA MDV-1 (+). Los transcritos resultantes, aunque carecen del dinucleótido CpA-OH, sirven como excelentes templados para la replicación exponencial por la replicasa de Q $\beta$ .

**d) Construcción del plásmido que contiene un polylinker dentro de la secuencia del cDNA de MDV-1.** El fragmento PpuM I-BstE II del cDNA de

MDV-1 en el plásmido pT7MDV fue reemplazado con el correspondiente fragmento PpuM I-BstE II de un cDNA de MDV-1 modificado que contenía un sitio único para Xba I en lugar del sitio único para Hinf I en la secuencia del cDNA de MDV-1. Luego un fragmento de DNA sintético (preparado por el alineamiento de dCTAGATCTCGAGGCCCTG a dCTAGCAGGCCCTCGAGAT) fue clonado en el sitio de Xba I, convirtiéndolo en un polylinker que posee cuatro sitios de restricción únicos: Xba I, Bgl II, Xho I y Stu I. Según la orientación del polylinker el plásmido fue llamado pT7MDVpoly4 ó pT7MDVpoly9.

e) **Construcción de los plásmidos pT7MDVTC para la síntesis de los RNAs recombinantes MDVTC.** Los plásmidos pT7MDVTC fueron construídos por inserción de una secuencia sonda sintética (preparada por el alineamiento de dCTAGGGCGGACACCCAAACAACCC-TGAACTATCCGT a dCTAGACGGATAGTTCAGGGTTGTTTGGTGTCCGCC) en el sitio de Xba I del polylinker del plásmido pT7MDVpoly9. Esta secuencia sonda es complementaria a 27 nucleótidos de una secuencia repetitiva de 195 pares de bases del parásito protozoario *Trypanosoma. cruzi*. La secuencia nucleotídica que usamos fue determinada a partir de clonas de DNA repetitivo aisladas de la cepa Y (González y col., 1984).

f) **Análisis de la secuencia nucleotídica.** La secuencia nucleotídica en la región recombinante de cada plásmido fue confirmada por el método de Sanger (Sanger y col., 1977), utilizando 7-deaza-guanosina 5'-trifosfato (Boheringer Mannheim) en lugar de deoxiguanosina 5'-trifosfato (Mizusawa y col., 1986) y [<sup>35</sup>S]deoxicitidina 5'-(o -tio)trifosfato (New England Nuclear) como marca (Biggin y col., 1983). Las reacciones de secuencia fueron llevadas a cabo en DNA de plásmido de cadena doble lineal (Wallace y col., 1981), utilizando un 20mero (Pharmacia) complementario a la secuencia del promotor de T7 (Osterman y col., 1981).

g) **Transcripción *in vitro*.** Los plásmidos fueron aislados por el método de lisis alcalina-SDS (Birboim y col., 1979; Ish-Horowitz y col., 1981) y purificados por cromatografía en Sheparosa CL-4B (Pharmacia). Luego, se digirió el DNA de plásmido con Sma I. La transcripción se llevó a cabo de acuerdo a una modificación del protocolo de Axelrod y Kramer (1985): 1 µg de DNA lineal se

incubó con 85 unidades de T7 RNA polimerasa por 3 horas a 37°C en 40 µl de 400 µM ATP, 400 µM [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]CTP, 400 µM GTP, 400 µM UTP, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 12 mM MgCl<sub>2</sub>, 12.5 mM dithiothreitol (preparado fresco), 100 µg/ml de seroalbúmina bovina y 1u/µl de inhibidor de ribonucleasas, RNAsin (Promega Biotec). Los transcritos [<sup>32</sup>P] fueron incubados con 0.1 µg/µl de DNAsa I libre de ribonucleasa (Tullis y col., 1980) para destruir el DNA templado y luego purificados por extracción con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, seguido por precipitación con etanol. La concentración de cada RNA fue determinada de acuerdo a su actividad específica. El tamaño y la homogeneidad del RNA fue determinada por electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% en presencia de 7 M urea. Las bandas de RNA fueron visualizadas por tinción con nitrato de plata.

**h) Replicaciones.** Entre  $1.5 \times 10^{-18}$  g y  $1.5 \times 10^{-10}$  g de transcrito (dependiendo de la reacción) fueron incubados con 1.2 µg de Q $\beta$  replicasa a 37°C en 25µl de 400µM ATP, 400µM [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]CTP, 400 µM GTP, 400 µM UTP, 1 a 14 mM MgCl<sub>2</sub> (según se indica en cada figura) y 90 mM Tris-HCl (pH 7.5). Se tomaron muestras de cada reacción cada 4-5 min. La cantidad de RNA en cada muestra de 2 µl fue determinada por unión del [<sup>32</sup>P]RNA a filtros de celulosa DE81 (Wathman) (Maxwell y col., 1978) y se midió la radioactividad en cada filtro en un contador de centelleo. El tamaño y la homogeneidad del RNA de las muestras seleccionadas fue determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida-urea. Las bandas de [<sup>32</sup>P]RNA fueron detectadas por autoradiografía.

## RESULTADOS

### I. Construcción de un plásmido para la síntesis del RNA MDV-1 (+).

Por la dificultad que representaba introducir modificaciones dentro de la secuencia de RNA y la facilidad con la que el DNA podía ser manipulado empleando la tecnología de DNA recombinante, se preparó una copia de DNA del RNA MDV-1 y se construyeron plásmidos que contenían promotores dirigidos hacia la secuencia del cDNA de MDV-1 (Mills y col., 1991). Se diseñaron estos plásmidos para que sirvieran como templados para la transcripción *in vitro* de copias perfectas del RNA MDV-1 por medio de la RNA polimerasa de T7.

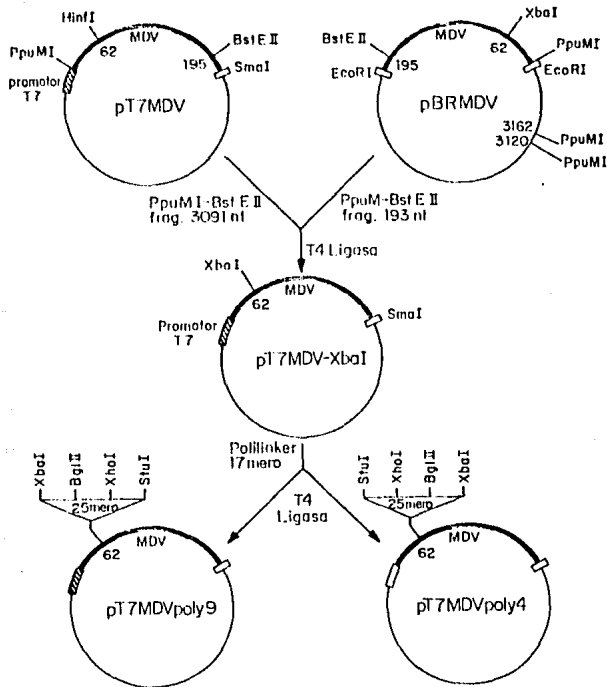
Se preparó el cDNA de MDV-1 utilizando la transcriptasa reversa del virus de la micloblastosis apiaria y primeros de oligo dT para sintetizar copias casi completas del RNA MDV-1 (+) poliadenilado y del RNA MDV-1 (-). Se hibridaron ambas cadenas y se rellenaron por incubación con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *Escherichia coli*. Se quitaron las colas de oligo dT, hibridando cada una de las cadenas completas de cDNA con el RNA MDV-1 complementario correspondiente, digiriendo los híbridos con nucleasa S1 y luego quitando el RNA por tratamiento con álcali. Se alinearon las copias de cDNA completas de cada una de las cadenas y se insertaron en el sitio de Eco RI del plásmido pBR322 utilizando linkers sintéticos. Luego, a través de una serie de pasos, se modificaron los extremos del inserto de cDNA de MDV-1 de forma que cada uno contuviera un sitio para Sma I flanqueado por un sitio para Eco RI. Estas modificaciones permitieron insertar la secuencia de MDV-1 en un plásmido en el sitio de Eco RI y luego, escindir el inserto con Sma I, lo cual producía extremos rasurados en el cDNA de MDV-1 que eran idénticos a la secuencia de los extremos del RNA MDV-1. El análisis de la secuencia nucleotídica reveló que la secuencia del cDNA de MDV-1 de la clona seleccionada era idéntica al RNA de MDV-1, excepto por una sustitución (una adenosina en vez de una guanosina) en la posición 87 de la cadena (-) (Mills y col., 1991) y la ausencia de una adenosina en el extremo 3', no requerida para la replicación del RNA (Bausch y col., 1983).



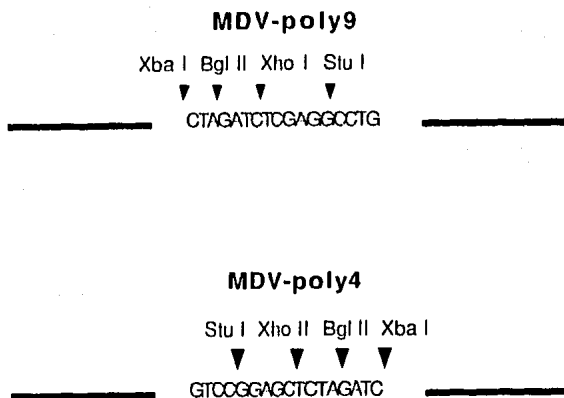
Se decidió utilizar como sitio de inserción de secuencias heterólogas la posición 60 del cDNA de MDV-1, porque codificaba para un asa que se encontraba en el exterior de la molécula de RNA MDV-1 y porque estaba fuera de las regiones requeridas para reconocimiento del templado e iniciación de la cadena producto durante la reacción de replicación. Se construyó un sitio único de restricción en esta posición insertando un linker que contiene un sitio para Xba I. Se cortó el cDNA de MDV-1 en el sitio único de Hinf I (posición 60), se digirió con nucleasa S1 para dejar extremos rasurados y ahí se ligó un linker (8mero) que contenía un sitio para Xba I constituyendo así, el pBR322MDVXbaI (Mills y col., datos no publicados).

Simultáneamente, se construyó el plásmido pT7MDV que contenía el promotor del bacteriofago T7 dirigido hacia el cDNA de MDV-1, escindiendo la secuencia intacta de cDNA de MDV-1 (la no modificada) del plásmido pBR322 con Ava II-Eco RI e insertando la misma, en el sitio de Hinc II-Eco RI del plásmido pSP64 (regenerando ambos sitios) y posteriormente, insertando en el sitio de Hinc II un oligonucleótido de cadena doble (20mero) que contenía el promotor de T7 (Mills y col., 1991).

Partiendo de estos dos plásmidos: el pT7MDV y el pBR322MDVXbaI, construimos en nuestro laboratorio el plásmido pT7MDVpoly (Figura 7). Se sustituyó el fragmento interno del cDNA de MDV-1 PpuM I-BstE II del plásmido pT7MDV por el fragmento PpuM I-BstE II que contenía el sitio único para Xba I y posteriormente se clonó en este sitio en ambas orientaciones, un oligonucleótido sintético que contenía los siguientes sitios únicos de restricción: Xba I, Bgl II, Xho I y Stu I (Figura 8). El análisis de la secuencia nucleotídica de las dos clonas seleccionadas, pT7MDVpoly4 y pT7MDVpoly9, reveló que la secuencia del cDNA de MDV-1 alrededor de la posición 62 era idéntica a la secuencia del oligonucleótido clonado, pero orientado de forma opuesta en cada una de las clonas.



**FIGURA 7. Construcción del plásmido pT7MDVpoly.** Se partió de dos plásmidos contruidos en el Laboratorio del Dr. Fred R. Kramer: el pT7MDV (+) y el pBR322MDVXbaI (+). El primero contenía una copia idéntica del cDNA del RNA MDV-1 (+) frente al promotor del bacteriofago de T7 mientras que el segundo, contenía una copia del cDNA del RNA de MDV-1 (+) frente al promotor de T7 pero modificada por un sitio para Xba I en la posición 62. Para la obtención de cualquiera de los plásmidos pT7MDVpoly se substituyó el fragmento interno del cDNA de MDV-1, PpuM I-BstE II del plásmido pT7MDV por el fragmento PpuM I-BstE II que contenía el sitio para Xba I y posteriormente se clonó en este sitio en ambas orientaciones, un oligonucleótido sintético que contenía los siguientes sitios únicos de restricción: Xba I, Bgl II, Xho I y Stu I.



**FIGURA 8. RNAs recombinantes de MDV-1 (+) que contienen una secuencia polylinker.** Se muestra la secuencia del oligonucleótido clonado en el sitio Xba I del plásmido pT7MDV en ambas orientaciones y los sitios únicos de restricción que contiene. Con una línea gruesa se simboliza el cDNA de MDV-1 (+). El nombre de cada construcción se indica arriba de cada esquema. La cadena escrita es la que se transcribe en RNA.

## II. Síntesis de RNAs recombinantes por medio de la transcripción de plásmidos.

Nos propusimos construir una molécula de RNA bifuncional que sirviera como sonda específica y como templado para la replicasa de QB. Escogimos el RNA MDV-1 como la primera molécula parental porque se podían sintetizar RNAs de MDV-1 modificados a partir de plásmidos recombinantes por transcripción *in vitro*. El plásmido pT7MDV sirve como templado para la síntesis de RNA MDV-1. Se pueden generar RNAs recombinantes insertando el fragmento de DNA heterólogo de interés en cualquiera de los sitios únicos de restricción del polylinker de pT7MDVpoly y luego utilizar el plásmido resultante, como templado para la transcripción con la RNA polimerasa de T7 (Figura 5). Los RNAs obtenidos por transcripción *in vitro* a partir del pT7MDVpoly4 y del pT7MDVpoly9 mostraron ser susceptibles de replicación con la replicasa de QB con propiedades muy similares al RNA MDV-1 (ver el artículo que se anexa a esta tesis).

## III. Diseño y construcción de sondas replicables para *Trypanosoma cruzi*.

El RNA MDV-1 contiene muchas estructuras secundarias estables (Klotz y col., 1980; Mills y col., 1980; Kramer y col., 1981) y toda la evidencia disponible hasta el momento sugiere que muchas de estas estructuras son esenciales para la replicación. Sabíamos que, el sitio que estábamos escogiendo para la inserción de secuencias sonda potenciales dentro del RNA MDV-1 se localizaba en el exterior de la molécula (Miele y col., 1983) y que ahí era menos probable que el inserto alterara estas estructuras. Primeramente se escogió como sonda, un fragmento de la secuencia del elemento repetitivo de 195 pares de bases del DNA del parásito protozoario, *Trypanosoma cruzi*. La abundancia relativa de este elemento es de aproximadamente 120,000 copias por genoma. En la Figura 9 se muestra el alineamiento de la secuencia de cinco copias de este elemento repetido (González y col., 1984) y la región escogida como posible sonda. La secuencia del oligonucleótido que contiene la región sonda se diseñó bajo los siguientes criterios: 1) que su complemento estuviera presente en la región más conservada del elemento repetido; 2) que no presentara posibilidad de una fuerte estructura



145 ACACCTGGACACCAAACAACCCCTGAAC'TATCCGCTGCTTGGAGGAATTTCCG  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 145 ACACCTGGACACCAAACAACCCCTGAAC'TACTATCCGCTGCTTGGAGGAATTTCCG  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 145 ACACCTGGACACCAAACAACCCCTGAAC'TACTATCCGCTGCTTGGAGGAATTTCCG  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 145 ACACCTGGACACCAAACAACCCCTGAAC'TACTATCCGCTGCTTGGAGGAATTTCCG  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 145 ACACCTGGACACCAAAGAACCCCTGAAC'TATCCGCTGCTTGGAGGAATTTCCG

ACACTGGACACCAAACAACCCCTGAAC'TATCCGCTGCTTGGAGGAATTTCCG



Sonda detectora

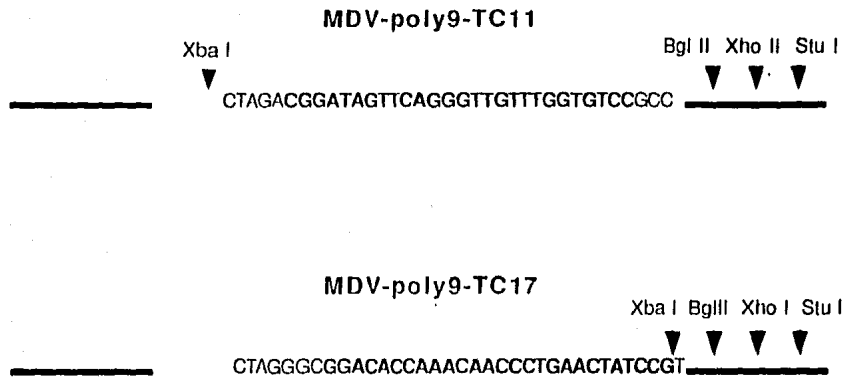
**FIGURA 9.** Ubicación de la sonda detectora en el alineamiento de la secuencia de cinco repetidos de un elemento repetitivo de 195 nucleótidos de *Trypanosoma cruzi*. Los elementos A, B y C eran elementos contiguos en la clona pTCNRE3. Las clonas pTCNRE1 y pTCNRE2 eran clonas independientes que contenían un sólo inserto del repetido (González y col., 1984). La última línea del alineamiento muestra la secuencia "consenso" de las cinco variantes del elemento repetido. Las letras minúsculas indican las bases que están cambiadas en cada clona. También se muestra la región escogida como sonda detectora.

secundaria, ya que esto podría impedir su hibridación con el blanco; y 3) que presentara sitios compatibles de clonación dentro del cDNA del RNA MCV. En la Figura 10 se muestra la secuencia del oligonucleótido sonda que se insertó en el sitio de Xba I del polylinker y las construcciones obtenidas con el inserto en las dos orientaciones posibles. El análisis de la secuencia nucleotídica de estas dos clonas: MDVpoly9TC11 y MDVpoly9TC17 reveló que la secuencia del inserto era idéntica a la secuencia del oligonucleótido clonado excepto que, la secuencia de la construcción MDVpoly9TC17 había sufrido una delección de 6 nucleótidos, durante el proceso de clonación, en la región del polylinker: UCUCGA (datos no mostrados).

#### IV. Replicación de los RNAs recombinantes.

Se prepararon cuatro diferentes RNAs por transcripción *in vitro*: MDVMal22, MDVpoly9, MDVTC11 y MDVTC17. El análisis electroforético de estos transcritos muestra que los recombinantes MDVpoly o los recombinantes que contienen la secuencia sonda MDVTC11 o MDVTC17, pueden ser distinguidos fácilmente unos de otros por su movilidad relativa. Se aislaron los transcritos de la mezcla de reacción y se usaron como templados para la síntesis adicional de RNA por la replicasa de Q $\beta$  (ver Figura 14, más adelante).

Un fenómeno que afecta frecuentemente las reacciones de replicación es que se encuentran unas cuantas moléculas de RNA MDV-1 contaminando la preparación de enzima ya que el método (Eoyang y August, 1971) que utilizamos para aislar la Q $\beta$  replicasa no elimina el RNA MDV-1 endógeno (Kramer y col., 1974). La cantidad de RNA MDV-1 contaminante que puede estar presente en una reacción de replicación típica es del orden de 40-100 moléculas (Kramer y col., 1974) pero debido a que la cinética de replicación es exponencial, al cabo de un tiempo (aproximadamente 30 a 45 min) puede observarse la presencia del RNA MDV-1, como un producto adicional. Este hecho parecía constituir una limitante para el diseño de sondas diagnósticas recombinantes, aunque posteriormente se reportó un método que remueve más eficientemente el RNA de la replicasa (Hill y col., 1983) y también ya se ha clonado la subunidad viral de la



**FIGURA 10.** RNAs recombinantes de MDV-1 (+) que contienen una sonda para *Trypanosoma cruzi*. Se muestra la secuencia del oligonucleótido clonado en el sitio de Xba I del plásmido pT7MDVpoly9 en ambas orientaciones. Con una línea gruesa se simboliza el polylinker y con letras oscuras se muestra la secuencia que es homóloga a *Trypanosoma cruzi*. El nombre de cada construcción se indica arriba de cada esquema. La cadena escrita es la que se transcribe en RNA.



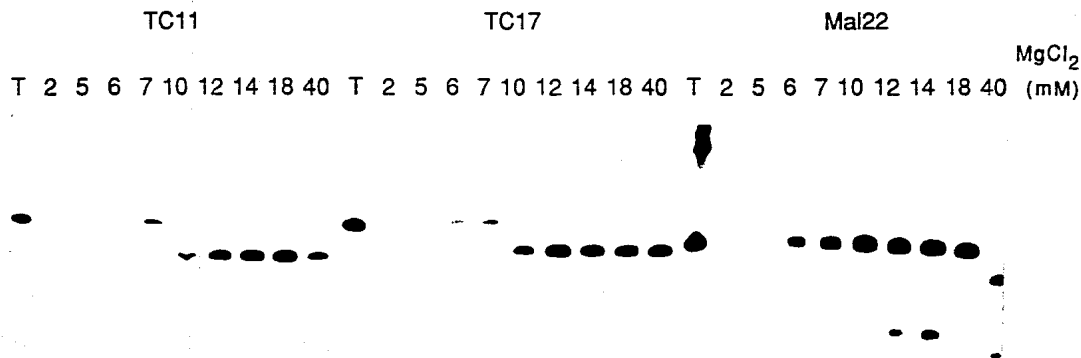
Q8 replicasa de forma que, ahora es posible obtener una replicasa libre de templado endógeno (Mills y col., 1988).

#### **a) Replicaciones bajo distintas concentraciones de $MgCl_2$ .**

Se prepararon en paralelo tres series de reacciones de replicación bajo diferentes concentraciones de  $MgCl_2$ : 2, 5, 6, 7, 10, 12, 14, 18 y 40 mM. Cada serie se inició con  $10^8$  moléculas de transcrito de las recombinantes MDVTC11, MDVTC17 y MDVMal22, todas las reacciones se pararon a los 30 minutos de incubación y se corrieron geles desnaturalizantes de poliacrilamida-urea. Como puede observarse en la Figura 11, a bajas concentraciones de  $MgCl_2$  puede suprimirse la replicación del RNA MDV-1 endógeno y favorecerse la replicación de los RNAs recombinantes mientras que, a altas concentraciones de  $MgCl_2$  se favorece claramente la replicación del RNA MDV-1 endógeno. La concentración óptima de  $MgCl_2$  a la cual replican estas moléculas es característica para cada molécula recombinante: 5 mM para MDVTC11, 6 mM para MDVTC17 y alrededor de 10 mM para MDVMal22. Por otro lado, la recombinante MDVMal22 replica tan bien como el RNA MDV-1 aún a concentraciones de  $MgCl_2$  tan altas como 20 mM. Sin embargo, a 40 mM de  $MgCl_2$  esta recombinante también deja de replicar y se observa únicamente el RNA MDV-1. No puede descartarse que la banda correspondiente al tamaño del RNA MDV-1, presente en algunas de estas reacciones de replicación esté constituida parcialmente por un producto de deletogénesis. Algunas moléculas recombinantes construidas en nuestro laboratorio y otros, presentan deleciones durante la reacción de replicación que al ocurrir, producen RNAs más pequeños cuya replicación se ve favorecida por sobre la del recombinante original. Se ha demostrado que el fenómeno de deletogénesis es un fenómeno específico para cada molécula recombinante, es decir, que la región deletada siempre es la misma para la misma molécula en distintas reacciones de replicación (David Zhang, comunicación personal).

#### **b) Replicaciones bajo distintas concentraciones de espermidina.**

Pensando en que la espermidina es una poliamina que se une fuertemente y



**FIGURA 11.** Efecto de la concentración de  $MgCl_2$  sobre la replicación de RNAs recombinantes. La concentración de magnesio utilizado durante la reacción de replicación se muestra arriba de cada carril. En la parte superior se indica el nombre de la molécula recombinante utilizada y la T al inicio de cada grupo muestra el transcrito utilizado como templado en la reacción de replicación correspondiente. Cada reacción fué iniciada con  $10^8$  moléculas y detenida a los 30 minutos de incubación.

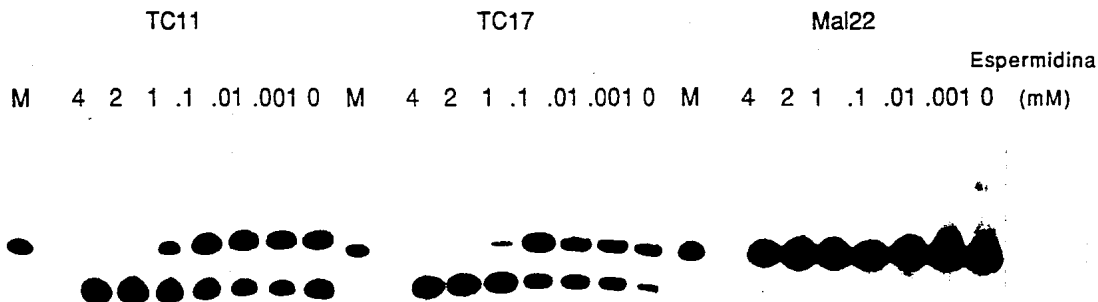
altera la conformación del DNA y el RNA (Kaiser y col., 1963; Gosule y col., 1976; Chatteraj y col., 1978; Suwalsky y col., 1969 y Liquori y col., 1967) y en que, normalmente se utiliza durante la reacción de transcripción a concentraciones de alrededor de 4 mM, quisimos averiguar el efecto de las distintas concentraciones de espermidina sobre la cantidad de RNA sintetizado en reacciones comenzadas con  $10^8$  moléculas de RNA recombinante e incubadas 20 min en presencia de la replicasa de QB. Como puede verse en la Figura 12 a altas concentraciones de espermidina se inhibe la replicación de las moléculas recombinantes y se favorece la replicación del RNA MDV-1 endógeno. La concentración de espermidina a la cual se deja de observar el producto de replicación del recombinante es característica para cada molécula recombinante: 4 mM para MDVTC11, 2 mM para MDVTC17 y arriba de 4 mM para MDVMal22.

#### **c) Replicaciones bajo distintas concentraciones de NaCl.**

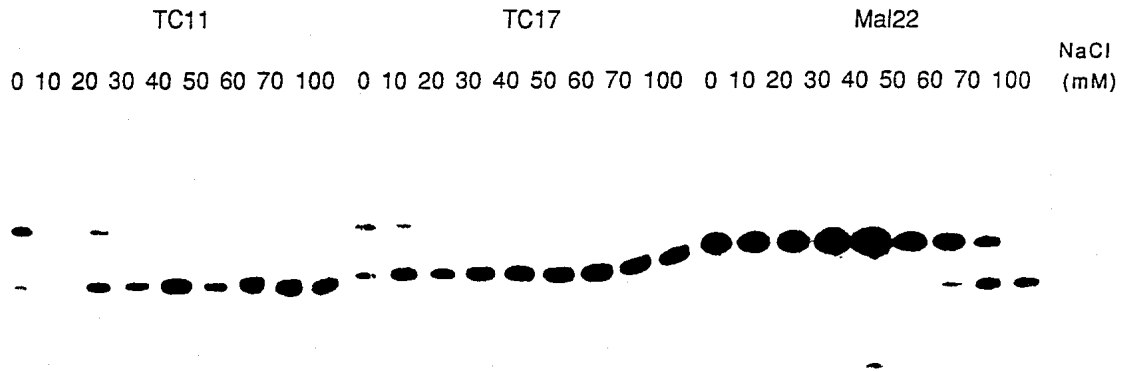
Se prepararon tres series de reacciones de replicación bajo diferentes concentraciones de NaCl: 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 y 100 mM. Cada serie se inició con  $10^8$  moléculas de transcrito de las recombinantes: MDVTC11, MDVTC17 y MDVMal22 y todas las reacciones se pararon a los 20 minutos de incubación. Como puede observarse en la Figura 13, MDVTC11 y MDVTC17 replican mucho mejor a baja fuerza iónica mientras que, MDVMal22 replica muy bien incluso a concentraciones tan altas de NaCl como 50 mM. Sin embargo, no se observa producto de replicación de las moléculas recombinantes a concentraciones de NaCl de: más de 30 mM para MDVTC11, más de 20 mM para MDVTC17 y arriba de 100 mM para MDVMal22. A baja concentración de enzima o de sustrato o a elevada fuerza iónica no hay síntesis *de novo* de la molécula sustrato (Biebricher y col., 1987).

#### **d) Cinéticas de replicación en condiciones de bajo $MgCl_2$ , ausencia de espermidina y NaCl.**

El análisis cinético de la cantidad de RNA sintetizado en las reacciones de QB replicasa demuestra que todos estos RNA s recombinantes son templados



**FIGURA 12. Efecto de la concentración de espermidina sobre la replicación de RNAs recombinantes.** La concentración de espermidina utilizada durante la reacción de replicación se muestra arriba de cada carril. En la parte superior se indica el nombre de la molécula recombinante utilizada y la M al inicio de cada grupo muestra el RNA recombinante MDV-Mal22 como marcador de tamaño. Cada reacción fué iniciada con  $10^8$  moléculas y detenida a los 20 minutos de incubación.



**FIGURA 13.** Efecto de la concentración de NaCl sobre la replicación de RNAs recombinantes. La concentración utilizada de NaCl durante la reacción de replicación se muestra arriba de cada carril. En la parte superior se indica el nombre de la molécula recombinante utilizada en cada grupo. Cada reacción fué iniciada con  $10^8$  moléculas y detenida a los 20 minutos de incubación.

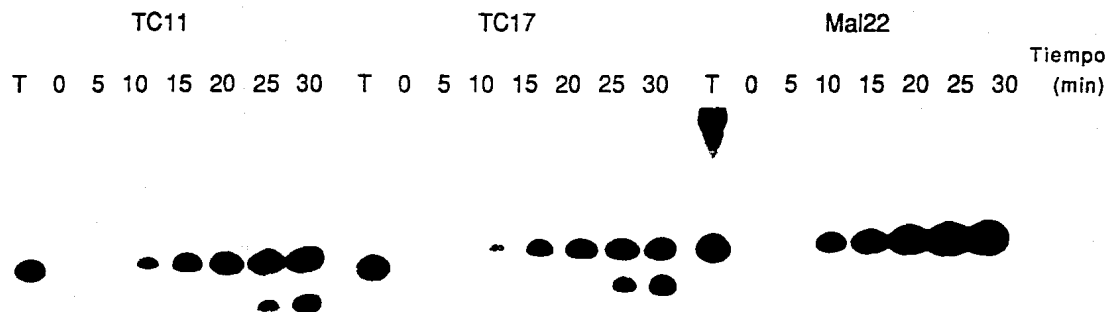
competentes para la amplificación exponencial. El análisis electroforético del RNA sintetizado en cada reacción de replicación (Figura 14) muestra que los productos son réplicas homogéneas de los transcritos originales. Sin embargo, cuando se compara la cantidad de RNA sintetizado a un tiempo dado en reacciones de replicación en paralelo de los diferentes transcritos (Figura 15), se puede observar una menor cantidad de RNA en las reacciones de replicación de los RNAs recombinantes MDVpoly9, MDVTC11 y MDVTC17 en contraste, a la cantidad que se obtiene en reacciones semejantes de los RNAs recombinantes MDVMal22 o MDVHIV20, que replican esencialmente en la misma proporción que el RNA MDV-1 (artículo anexo a esta tesis), de donde se derivaron todas éstos.

## V. Amplificación exponencial después de una dilución seriada.

Se iniciaron una serie de reacciones de replicación con cantidades cada vez diez veces menores de RNA MDVTC17. Los resultados muestran que una reacción iniciada con apenas  $10^8$  moléculas de RNA produce 263 ng de RNA recombinante producto después de 30 minutos de síntesis, que corresponde a 17,700 veces de amplificación. El análisis electroforético del RNA sintetizado en cada punto mostró que los productos eran RNAs MDVTC17 completos. Se muestra en la Figura 16 el experimento donde se utilizó el RNA MDVTC17 como templado. Se obtuvieron resultados semejantes en una serie de reacciones en paralelo iniciadas con el RNA MDVTC11: una reacción iniciada con  $10^8$  moléculas produjo alrededor de 190 ng de RNA recombinante producto después de 30 minutos de incubación, lo que correspondió a 12,500 veces de amplificación (dato que no se muestra).

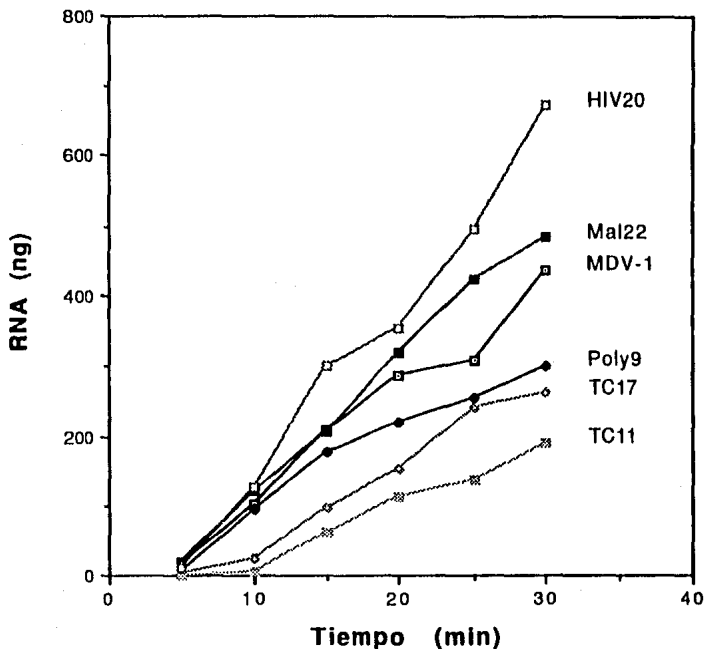
Comparando los rendimientos de la síntesis de RNA, la replicación del RNA MDVMal22 parece ser mucho más eficiente que la del RNA MDVTC11 o el RNA MDVTC17. También fueron diferentes los rendimientos entre los dos RNAs recombinantes MDVTC. Se obtuvo aproximadamente 1.4 veces más producto del RNA MDVTC17 que del RNA MDVTC11.

Extendiendo este análisis a otros RNAs recombinantes construídos en nuestro



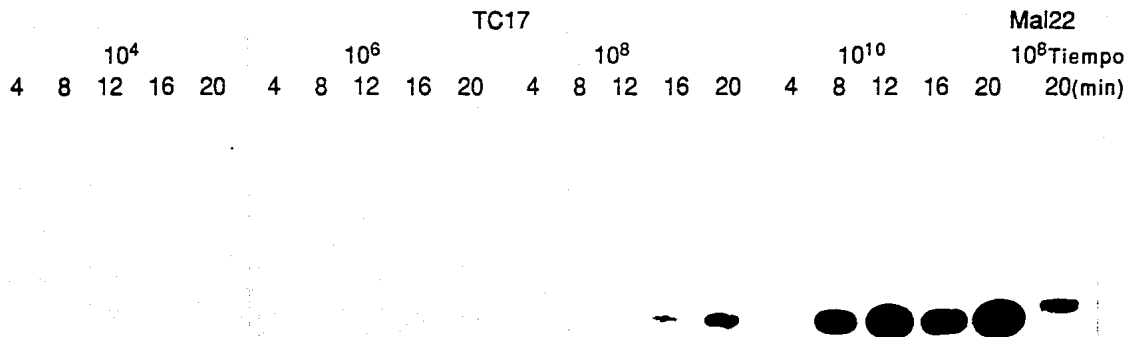
**FIGURA 14.** Comparación de las cinéticas de replicación de distintos RNAs recombinantes utilizando la replicasa de Q $\beta$ . En la parte superior se indica el nombre de la molécula recombinante que se utilizó en cada una de las reacciones de replicación. Cada una de las reacciones se llevó a cabo en presencia de 7 mM de MgCl<sub>2</sub>, se inició con 10<sup>8</sup> moléculas y se continuó por 30 minutos, tomándose alícuotas a los 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos, respectivamente.

### Cinéticas de replicación de algunas moléculas recombinantes



**FIGURA 15.** Cinéticas de replicación de distintos RNAs recombinantes utilizando la replicasa de QB. A la derecha de cada curva se indica el nombre de la molécula recombinante que se utilizó en la reacción de replicación correspondiente. Cada reacción de replicación se inició con  $10^8$  moléculas y se continuó por 30 minutos, tomándose alícuotas a los 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos, respectivamente.





**FIGURA 16.** Efecto de la concentración inicial de RNA sobre el curso temporal de la síntesis de RNA por la replicasa de Q $\beta$ . Se iniciaron una serie de reacciones de 25  $\mu$ l con la replicasa de Q $\beta$  y las siguientes cantidades del RNA MDVTC17: 1.49 ng, 14.9 pg, 149 fg y 1.49 fg que corresponde a  $10^{10}$ ,  $10^8$ ,  $10^6$  y  $10^4$  moléculas de templado añadido. Se tomaron muestras cada 4 minutos de cada reacción para determinar la cantidad de RNA que había sido sintetizado y se corrió un gel de poli(acrilamida-urea) al 6%. La movilidad electroforética del RNA MDVTC17 presente en cada reacción (272 nucleótidos) comparada a la movilidad del RNA MDVMal22 (276 nucleótidos,  $10^8$  moléculas iniciales, 20 minutos de incubación) confirmó que el producto de las reacciones iniciadas con el RNA recombinante MDVTC17 era el RNA MDVTC17.

laboratorio, encontramos que en términos generales se observan tres tipos de comportamiento: algunas recombinantes replican exponencialmente y de forma muy eficiente, al igual que el RNA MDV-1; otras, presentan deleciones que al ocurrir, producen RNAs más pequeños cuya replicación se favorece y otras, simplemente no replican o al menos no con una eficiencia que permita observar el producto de replicación a los 30 minutos de incubación (tiempo necesario para amplificar  $10^9$  veces). De las moléculas recombinantes construídas hasta la fecha aproximadamente, el 80% replican eficientemente. Estas recombinantes incluyen RNAs de MDV-1 que contienen secuencias del parásito *Plasmodium falciparum* (33meros); del virus del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida, el HIV-1 (35meros); el sitio de unión para la proteína de la cubierta del virus R17 (27mero); la secuencia codificadora del tRNA<sup>Ser</sup>; el RNA mensajero para la cloranfenicol-acetil-transferasa (801 nt); la secuencia del gene que codifica para la angiotensina II; la secuencia del virus de la influenza o la secuencia del virus que infecta la papa, el PSTV (359 nt).

## **VI. Análisis teórico sobre el doblado de estas moléculas recombinantes.**

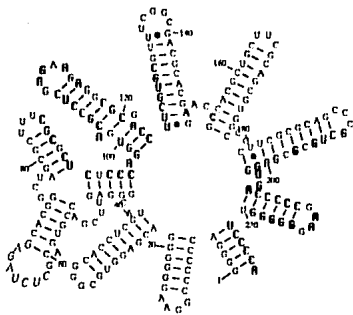
Hasta ahora no han podido dilucidarse las propiedades que determinan los diferentes comportamientos observados en las distintas moléculas recombinantes. Si bien se supone que esto debe estar estrechamente relacionado con la estructura secundaria y terciaria que adoptan las moléculas recombinantes, los principios estructurales que rigen este comportamiento no están claros. Otras propiedades moleculares que probablemente estén involucradas, son el tamaño de los insertos y su composición de bases (Axelrod y col., 1991), pero tampoco parece haber una correlación que pueda evidenciarse claramente (Lomelí, 1990).

### **a) Simulación del doblado de RNAs utilizando el programa para computadora de Zuker.**

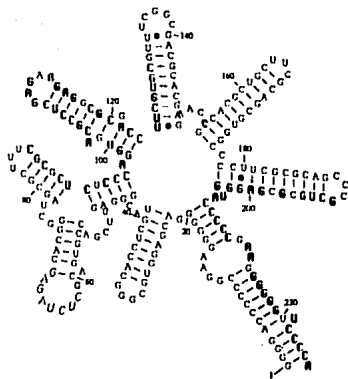
Se pensó que el uso de programas que predicen estructuras secundarias alternativas en función de la secuencia nucleotídica, en un rango estrecho de energía libre tal como el que Zuker diseñó en 1989 (Zuker, M. 1989; Jaeger y col.,

1989a; Jaeger y col., 1989b), podían ser de utilidad para la identificación de los componentes estructurales involucrados en la función de replicabilidad.

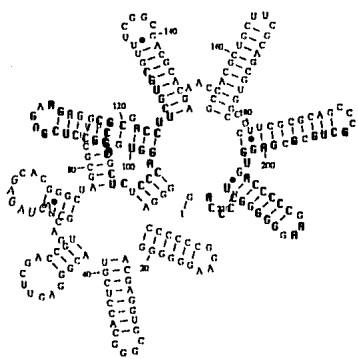
Este programa maneja los siguientes parámetros: a) el número de estructuras subóptimas que se desean obtener dentro de un rango de energía  $X$ , por debajo de la energía libre de la estructura óptima; b) el rango de energía por debajo de la energía libre de la estructura óptima y c) la ventana o número mínimo de pares de bases distintos entre una estructura subóptima y otra. Se corrió este programa buscando las primeras 100 estructuras subóptimas predichas para cada una de las moléculas recombinantes, MDV-1, MDVXbaI, MDVpoly4, MDVpoly9, MDVTC11, MDVTC17 y MDVMaI22, dentro de un rango de energía del 30% por debajo de la energía libre para cada una de las estructuras óptimas y que difirieran una de la otra al menos en 4 pares de bases. Esto, con la idea de obtener por lo menos 25-30 estructuras subóptimas para cada una de las moléculas recombinantes antes mencionadas, que fueran lo suficientemente distintas entre ellas tanto en energía libre como en estructura. En las Figuras 2, 17, 18, 19, 20, 21 y 22 se muestran las estructuras secundarias óptimas y las siguientes dos estructuras subóptimas (ordenadas de mayor a menor energía libre) predichas por este programa para MDV-1, MDVXbaI, MDVpoly4, MDVpoly9, MDVTC11, MDVTC17 y MDVMaI22, respectivamente. En general, si se divide la energía libre obtenida para cada estructura óptima entre el número de nucleótidos de esa molécula, el programa predice estructuras secundarias más estables para MDV-1 > MDVpoly4 > MDVXbaI > MDVpoly9 > MDV-MaI22 >> MDVTC17 ≈ MDVTC11. Las estructuras óptimas de las moléculas recombinantes MDVXbaI, MDVpoly4, MDVpoly9, MDVTC11, MDVTC17 y MDVMaI22 presentan subestructuras idénticas al RNA MDV-1 incluyendo el tallo y asa que contiene el sitio de unión a la replicasa (Nishihara y col., 1983) excepto, en la longitud y la forma del tallo que contiene el inserto. Sin embargo, cuando se analizan algunas de las primeras estructuras subóptimas encontradas en un rango estrecho de energía libre se observa que, el RNA MDVTC11 se reorganiza frecuentemente de forma que pierde por ejemplo, la subestructura del sitio de unión a la replicasa (Figura 20). Por otro lado, los RNAs MDVpoly4, MDVpoly9, MDVTC11 y MDVTC17 replican menos eficientemente que los RNAs recombinantes MDVMaI22 o MDVHIV20 o incluso que el RNA MDV-1, según se presenta en esta tesis (Figura 15) (ver artículo anexo a esta tesis)



226 ENERGY = -113.4 MDV-1(+) XbaI

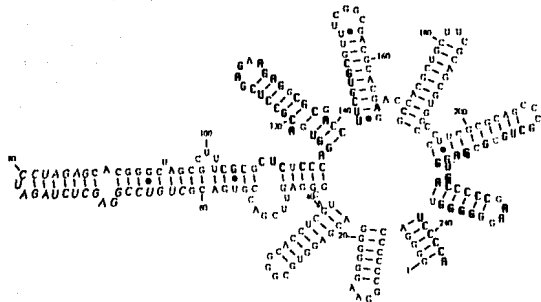


226 ENERGY = -113.2 MDV-1(+) XbaI

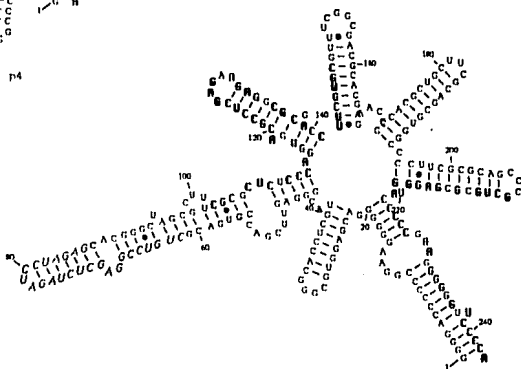


226 ENERGY = -110.4 MDV-1(+) XbaI

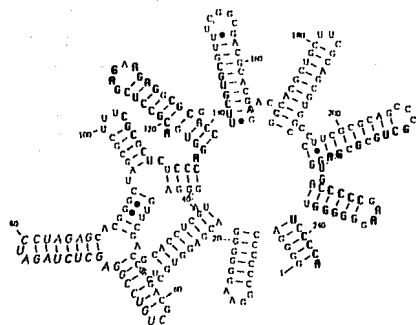
**FIGURA 17.** Estructura secundaria óptima y las siguientes dos estructuras subóptimas predichas para el RNA recombinante MDVXbaI. La predicción se hizo utilizando el programa de cálculo de estructuras subóptimas de Zuker (Zuker, 1989). El sitio de unión a la replicasa y el sitio de iniciación de la replicación se indica con letras oscuras. El sitio de Xba I es un inserto de 8 nucleótidos y se indica con letras itálicas y oscuras.



743 ENERGY - -125.1 MDV-1(1) p4

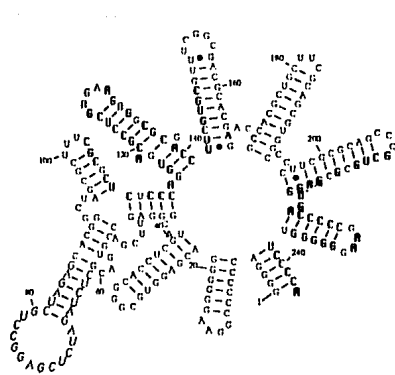


743 ENERGY - -124.9 MDV-1(1) p4

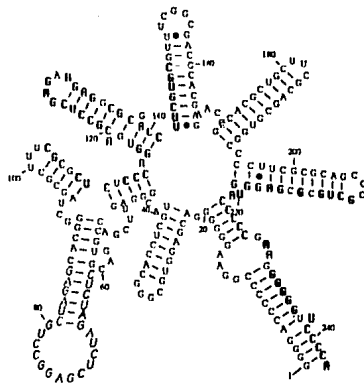


743 ENERGY - -122.4 MDV-1(1) p4

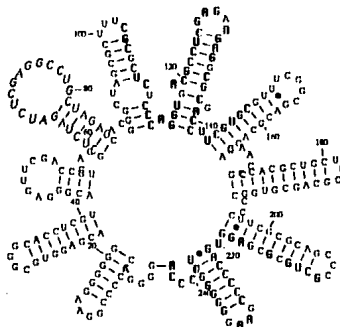
**FIGURA 18.** Estructura secundaria óptima y las siguientes dos estructuras subóptimas predichas para el RNA recombinante MDVpoly4. La predicción se hizo utilizando el programa de cálculo de estructuras subóptimas de Zuker (Zuker, 1989). El sitio de unión a la replicasa y el sitio de iniciación de la replicación se indica con letras oscuras. El polylinker con la orientación Stu I, Xho I, Bgl II, Xba I es un inserto de 25 nucleótidos que se muestra con letras *italicas* y entre flechas.



243 ENERGY = -119.2 MDV-1(+) p9

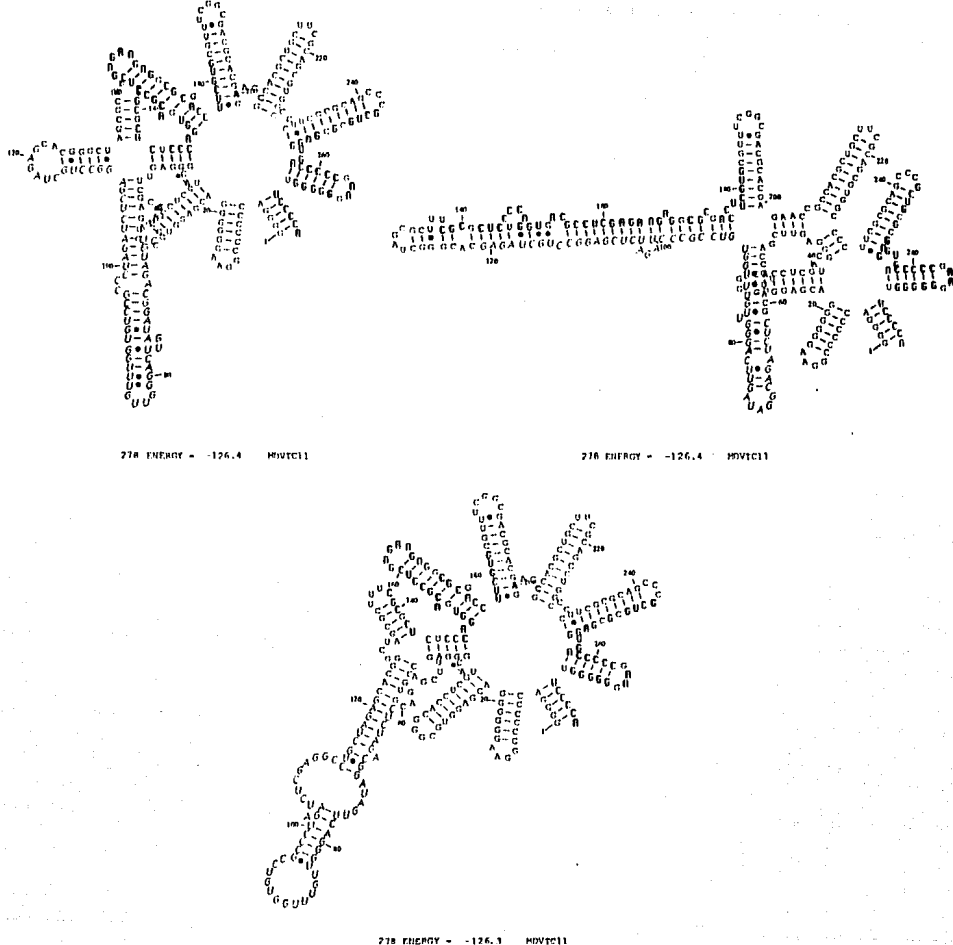


243 ENERGY = -119.0 MDV-1(+) p9

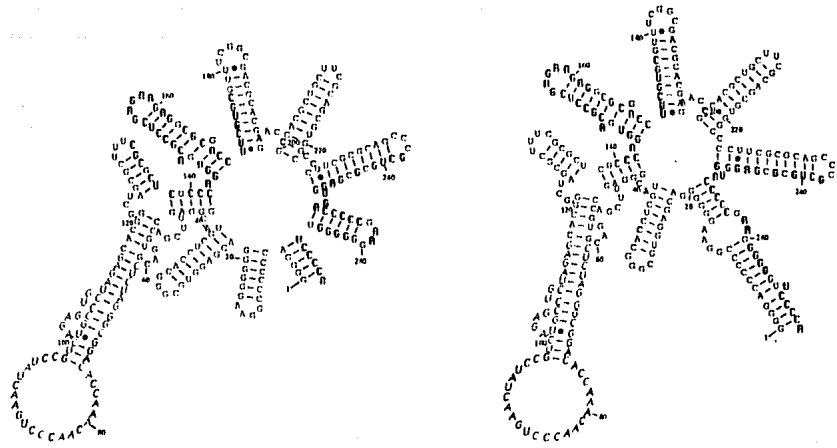


243 ENERGY = -117.4 MDV-1(+) p9

**FIGURA 19.** Estructura secundaria óptima y las siguientes dos estructuras subóptimas predichas para el RNA recombinante MDVpoly9. La predicción se hizo utilizando el programa de cálculo de estructuras subóptimas de Zuker (Zuker, 1989). El sitio de unión a la replicasa y el sitio de iniciación de la replicación se indica con letras oscuras. El polylinker con la orientación Xba I, Bgl II, Xho I, Stu I es un inserto de 25 nucleótidos que se muestra con letras itálicas y entre flechas.

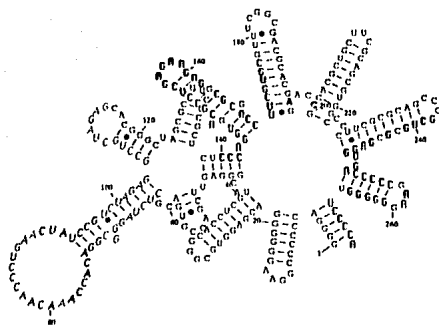


**FIGURA 20.** Estructura secundaria óptima y las siguientes dos estructuras subóptimas predichas para el RNA recombinante MDVTC11. La predicción se hizo utilizando el programa de cálculo de estructuras subóptimas de Zuker (Zuker, 1989). El sitio de unión a la replicasa y el sitio de iniciación de la replicación se indica con letras oscuras. El RNA MDVTC11 contiene un inserto de 60 nucleótidos (mostrado entre flechas) en lugar del segmento de tres nucleótidos AGU, que existe en el RNA MDV-1 (+). Las letras itálicas y oscuras indican los nucleótidos que son complementarios al elemento repetido de *Trypanosoma cruzi*.



272 ENERGY = -124.7 MDVTC11

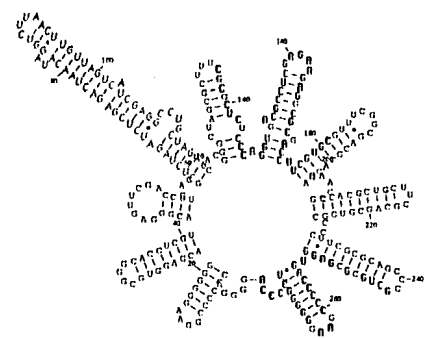
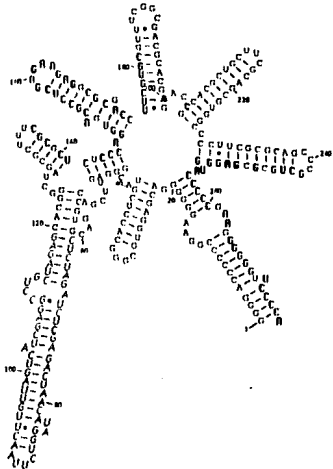
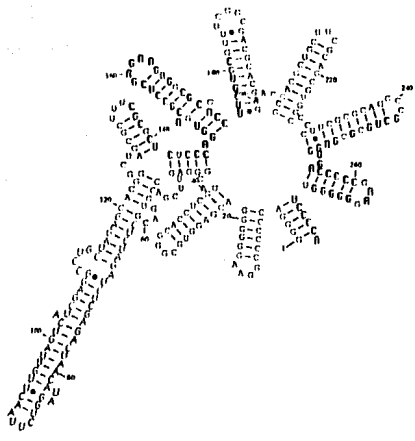
272 ENERGY = -174.0 MDVTC17



272 ENERGY = -123.7 MDVTC17

**FIGURA 21.** Estructura secundaria óptima y las siguientes dos estructuras subóptimas predichas para el RNA recombinante MDVTC17. La predicción se hizo utilizando el programa de cálculo de estructuras subóptimas de Zuker (Zuker, 1989). El sitio de unión a la replicasa y el sitio de iniciación de la replicación se indica con letras oscuras. El RNA MDVTC17 contiene el mismo inserto de 54 nucleótidos (mostrado entre flechas) en la orientación opuesta al RNA MDVTC11. Las letras itálicas y oscuras indican los nucleótidos que son complementarios al elemento repetido de *Trypanosoma cruzi*.





**FIGURA 22.** Estructura secundaria óptima y las siguientes dos estructuras subóptimas predichas para el RNA recombinante MDVMa122. La predicción se hizo utilizando el programa de cálculo de estructuras subóptimas de Zuker (Zuker, 1989). El sitio de unión a la replicasa y el sitio de iniciación de la replicación se indica con letras oscuras. El RNA MDVMa122 contiene un inserto estructurado de 58 nucleótidos (mostrado entre flechas) (Lomeli, 1990). Las letras itálicas y oscuras indican los nucleótidos que son complementarios a la secuencia repetida de *Plasmodium falciparum*.

**b) Agrupación de las estructuras secundarias de los RNAs recombinantes utilizando un programa de sorteo de motivos estructurales seleccionables "Motifsort".**

Los programas que predicen estructuras secundarias son de mayor utilidad en la medida que, permiten un análisis estadístico del conjunto de estructuras subóptimas alternativas generadas dentro de un rango de energía libre seleccionable. Este tipo de análisis, permite estudiar subestructuras específicas de una misma molécula o comparar conjuntos de subestructuras que significan hipótesis distintas respecto a la función de replicabilidad. Una vez obtenido el conjunto de estructuras subóptimas para cada una de las moléculas recombinantes: MDVTC11, MDVTC17 y MDVMa122, se corrió el programa de agrupación de las estructuras secundarias en cuanto a dos motivos estructurales: 1) la región del sitio de unión a la replicasa (un tallo y asa característico) (Nishihara y col., 1983) y 2) la molécula completa. Este análisis se llevó a cabo en forma automática y relativamente rápido por medio de un programa para computadora Macintosh modificado por el Dr. Paul M. Lizardi, en nuestro laboratorio. La salida de este programa produce dos tipos de datos:

- 1) Número de subgrupos de estructuras que presentan el motivo estructural seleccionado de acuerdo a un parámetro de "semejanza" (que puede ir de 0.7 a 0.9), y
- 2) El ordenamiento de las estructuras dentro de cada grupo de tal forma que, la primera en el grupo representa la subestructura prototípica del grupo y no necesariamente, la que posee la mayor energía libre

Con estos datos se elaboraron tablas, algunas de las cuales se muestran en la sección de tablas de esta tesis (ver Tablas 1, 2, 3, 4, 5 y 6). De los resultados obtenidos, se pueden apreciar la formación de 4 grupos para los RNAs MDVMa122 (Tabla 5) o MDVTC17 (Tabla 3) y hasta 6 grupos para MDVTC11 (Tabla 1) cuando se toma como motivo estructural a la molécula completa. Si se ordenan las estructuras secundarias subóptimas para cada molécula de acuerdo a sus valores de energía libre y luego se ve cuales quedan en cada grupo, se puede observar que MDVMa122 presenta subgrupos muy homogéneos, es decir, con







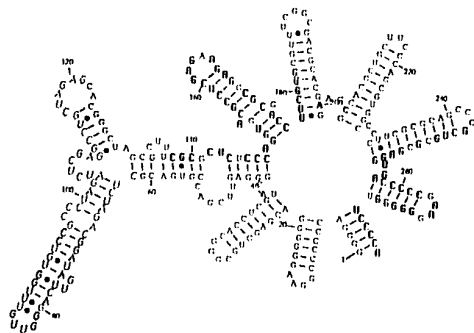






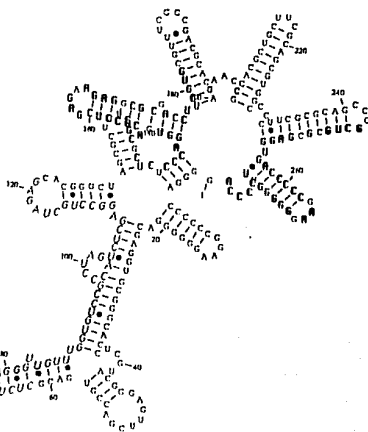


estructuras subóptimas contiguas, dentro del mismo subgrupo (por ejemplo, las estructuras #1 a la #7 se localizan en el subgrupo 1) mientras que, MDVTC17 presenta subgrupos más heterogéneos y en general, de menor energía libre. Es decir, MDVTC17 presenta estructuras más inestables y no contiguas dentro de un mismo subgrupo. En contraste, MDVTC11 además de mostrar más subgrupos y más heterogeneidad dentro de cada subgrupo, presenta las dos estructuras óptimas (la #1 y la #2 que poseen la misma energía libre) como pertenecientes a subgrupos diferentes (la #1 cae en el subgrupo 1 mientras que, la #2 cae en el subgrupo 3). En las Figuras 23, 25 y 26 se muestran las estructuras subóptimas prototípicas de cada subgrupo para MDVTC11, MDVTC17 y MDVMal22, respectivamente cuando se toma como motivo estructural a la molécula completa. Nótese que, cuando se toma como motivo estructural el sitio de unión a la replicasa (Tablas 2, 4 y 6) se observa el mismo patrón, en cuanto al número de subgrupos (3 tanto para MDVMal22 como para MDVTC17 y 7 para MDVTC11), la heterogeneidad dentro de los mismos y las energías libres de las diferentes estructuras que cuando se toma como motivo estructural, a la molécula completa (Tablas 1, 3 y 5). En la Figura 24 se muestran las estructuras subóptimas prototípicas de cada subgrupo, únicamente para MDVTC11 cuando se toma como motivo estructural el sitio de unión a la replicasa. Por otra parte, cuando se analizan las propiedades replicativas de MDVpoly4, MDVpoly9, MDVTC11 y MDVTC17, se observa que éstos replican menos eficientemente que los RNAs recombinantes MDVMal22 o MDVHIV20 o incluso que el RNA MDV-1, según se presenta en esta tesis (Figura 15) (ver artículo anexo a esta tesis).



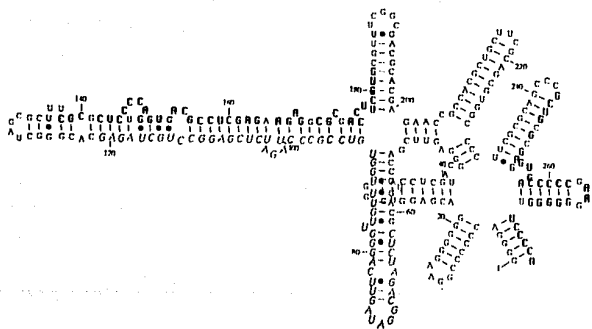
278 ENERGY - -121.5 MDVTC11

subgrupo 1



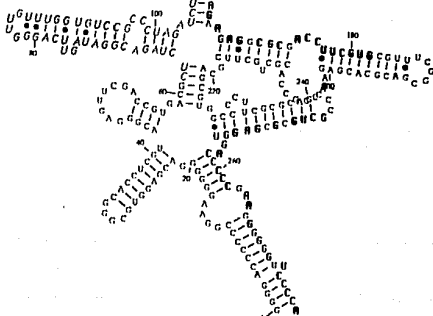
278 ENERGY - -126.0 MDVTC11

subgrupo 2



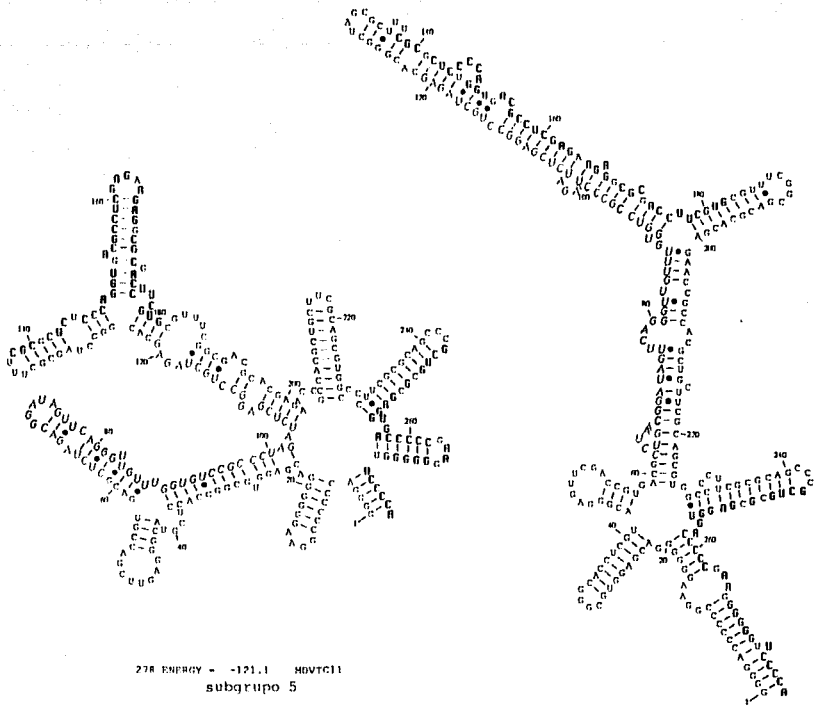
278 ENERGY - -126.4 MDVTC11

subgrupo 3

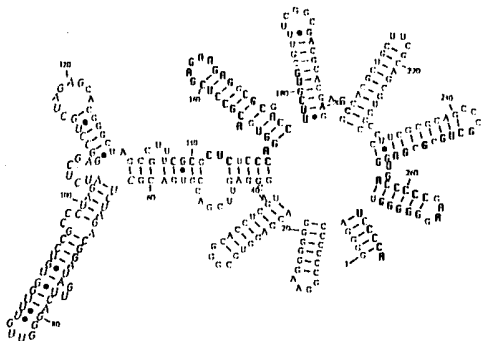


278 ENERGY - -114.0 MDVTC11

subgrupo 4

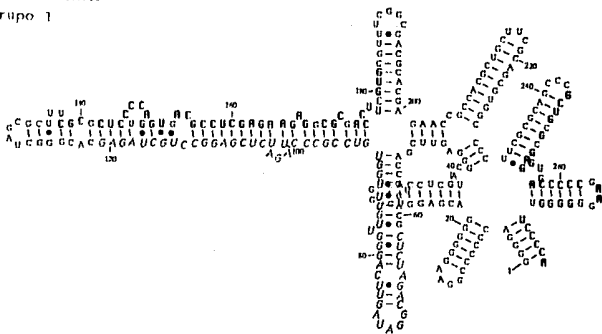


**FIGURA 23.** Estructuras secundarias prototípicas de cada uno de los subgrupos del conjunto de estructuras subóptimas del RNA recombinante MDVTC11, utilizando como motivo estructural la molécula completa. La predicción de estructuras subóptimas se hizo utilizando el programa de Zuker (Zuker, 1989). El agrupamiento de estas estructuras se hizo de acuerdo al programa de sorteo de motivos estructurales (Lizardi, 1991). El sitio de unión a la replicasa y el sitio de iniciación de la replicación se indica con letras oscuras. El inserto se muestra entre flechas. Las letras itálicas y oscuras indican los nucleótidos que son complementarios a la secuencia repetida de *Trypanosoma cruzi*.



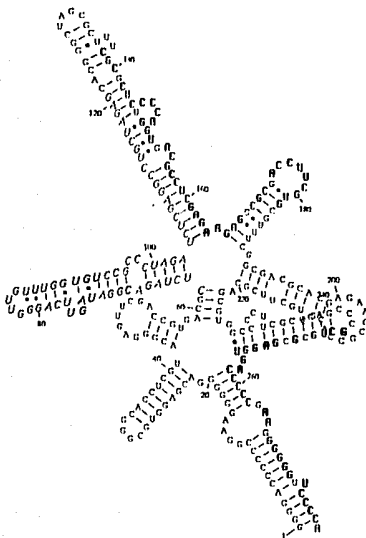
278 ENERGY = -121.5 MDVTC11

subgrupo 1



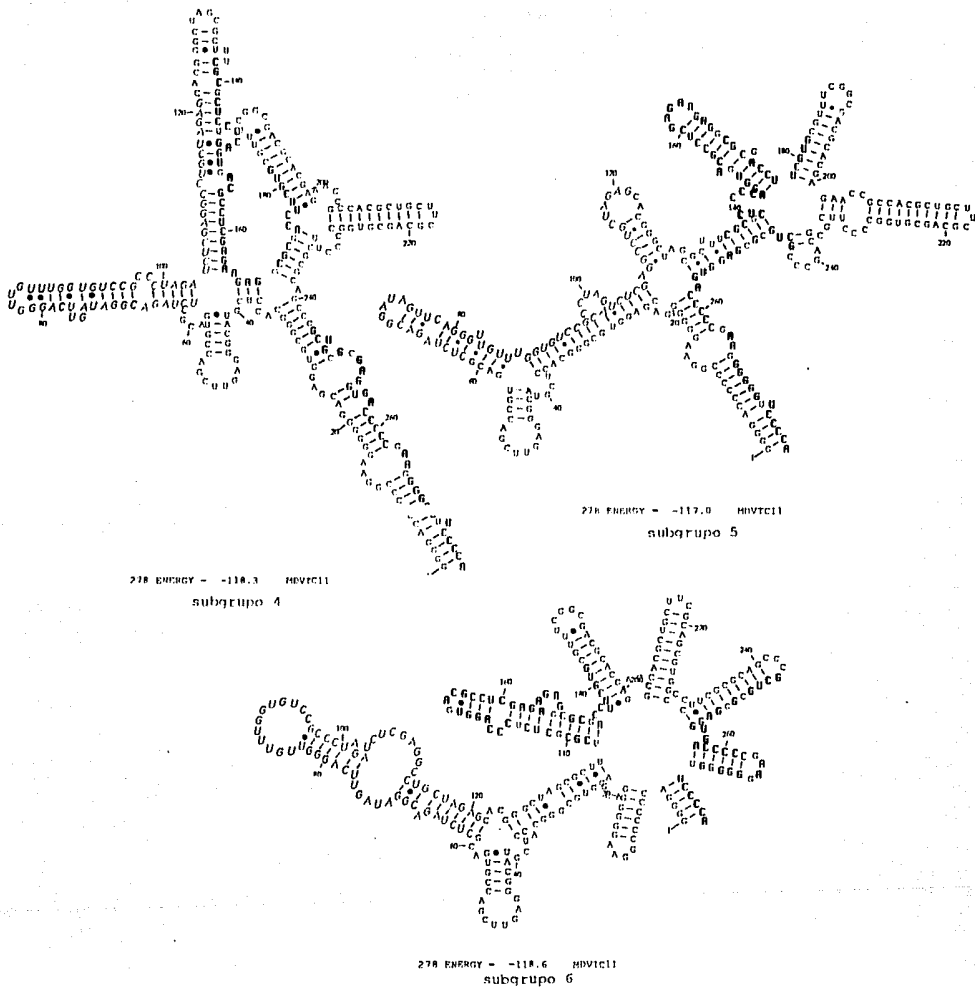
278 ENERGY = -126.4 MDVTC11

subgrupo 2

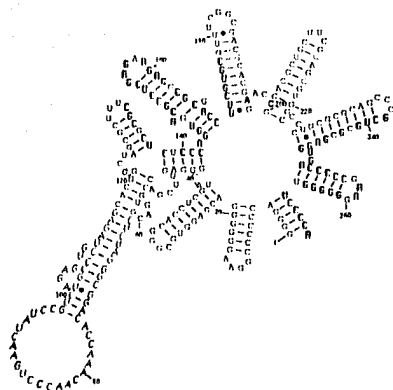


278 ENERGY = -110.7 MDVTC11

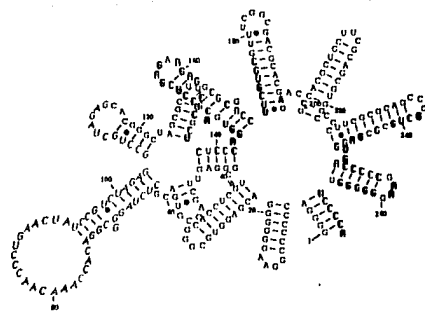
subgrupo 3



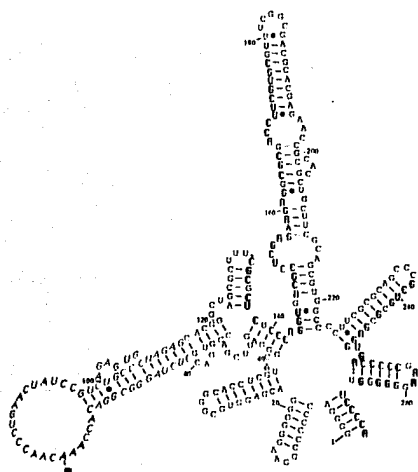
**FIGURA 24.** Estructuras secundarias prototípicas de cada uno de los subgrupos del conjunto de estructuras subóptimas del RNA recombinante MDVTC11, utilizando como motivo estructural el sitio de unión a la replicasa (nucleótidos 146 al 182). Todo se hizo y se indica como en la Figura 23.



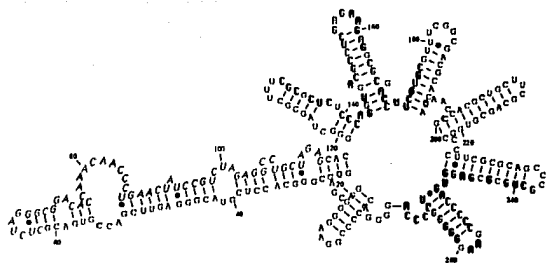
212 ENERGY = -124.2 MDVTC17  
subgrupo 1



212 ENERGY = -123.2 MDVTC17  
subgrupo 2

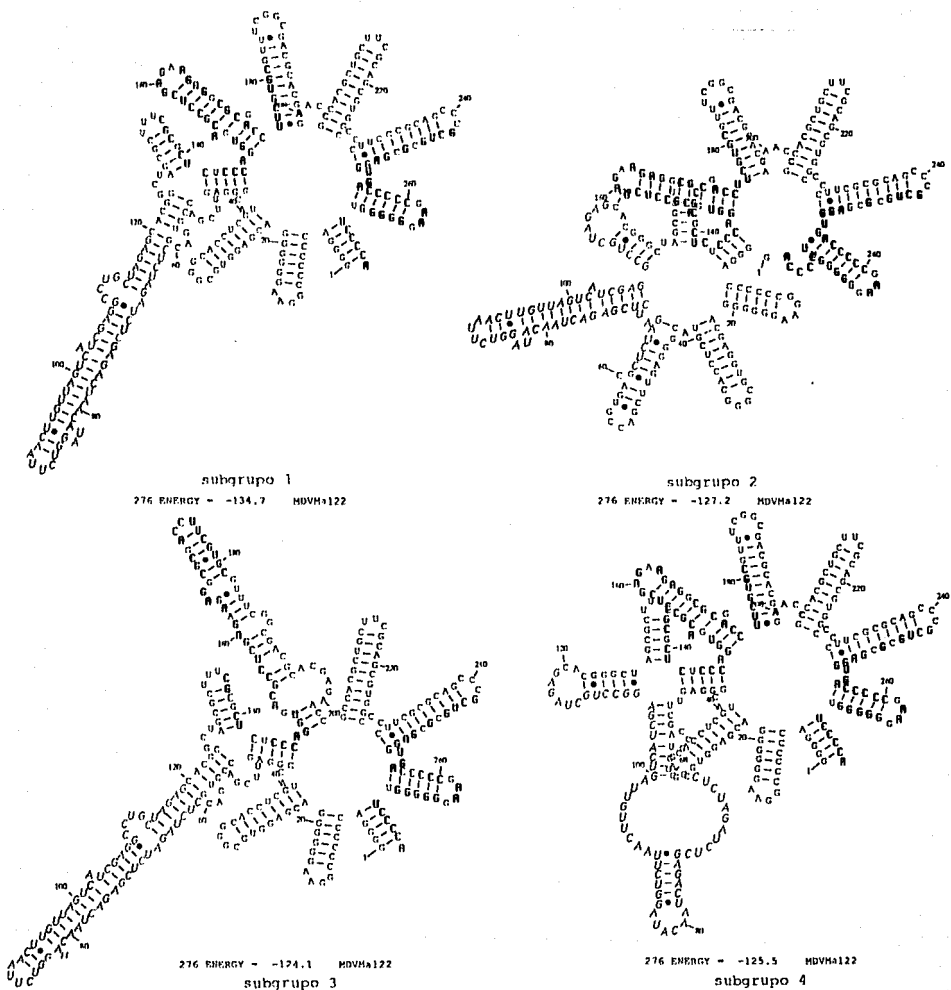


212 ENERGY = -109.9 MDVTC17  
subgrupo 3



212 ENERGY = -119.1 MDVTC17  
subgrupo 4

**FIGURA 25.** Estructuras secundarias prototípicas de cada uno de los subgrupos del conjunto de estructuras subóptimas del RNA recombinante MDVTC17, utilizando como motivo estructural la molécula completa. Todo se hizo y se indica igual que en la Figura 23.



**FIGURA 26.** Estructuras secundarias prototípicas de cada uno de los subgrupos del conjunto de estructuras subóptimas del RNA recombinante MDVMal22, utilizando como motivo estructural la molécula completa. Todo se hizo y se indica igual que en la Figura 23, excepto que aquí las letras itálicas y oscuras indican los nucleótidos que son complementarios a la secuencia repetida de *Plasmodium falciparum* (Lomelí, 1990).

## DISCUSION

La amplificación exponencial de RNAs recombinantes con la replicasa de QB es una manera de generar grandes cantidades de una secuencia de RNA heteróloga. Se han hecho muchos intentos de amplificar RNAs que no son templados naturales para la replicasa de QB tales como, el añadir iones manganeso a la reacción (Palmenberg y col., 1974; Obinata y col., 1975), el añadir un oligonucleótido como primero a la reacción (Feix y col., 1976a) o el añadir un trecho de polycitidina al extremo 3' del templado (Feix y col., 1976b). Aunque todos estos métodos, relajaron la especificidad de templado de la replicasa de QB, tan sólo se produjo la cadena complementaria, la eficiencia de la síntesis de RNA fué muy baja y en general, no hubo una cinética de replicación exponencial.

La especificidad de la replicasa de QB por sus propios templados está determinada por ciertas estructuras presentes en ellos: 1) una estructura de tallo y asa que sirve como el sitio de unión a la replicasa de QB (Nishihara y col., 1983) y 2) un trecho de polycitidinas en el extremo 3' que permiten la iniciación de la síntesis de la cadena complementaria (Rensing y col., 1969; Mills y col., 1980). El RNA MDV-1, un RNA para la replicasa de QB que ocurre naturalmente, posee ambas estructuras (Mills y col., 1980; Nishihara, 1983) y así sirve como un excelente templado (Kacian y col., 1972). Si pudiera ser insertada una secuencia extraña dentro del RNA MDV-1 de tal forma que, el inserto no alterara la estructura nativa del RNA MDV-1, la secuencia heteróloga sería capaz de ser amplificada junto con MDV-1. Se ha demostrado que algunas secuencias cortas insertadas dentro del RNA MDV-1, son replicadas por la replicasa de QB (Miele y col., 1983; artículo que se anexa a esta tesis; Lomeli y col., 1989; Lomeli, 1990; Axelrod y col., 1991; Wu y col., 1992). El análisis cinético de la replicación mostró que algunos de estos RNAs recombinantes replican tan eficientemente como el RNA MDV-1 parental. Estos resultados indican que la inserción de algunas secuencias de alrededor de 50-60 nucleótidos, en un sitio específico (en la posición 62 del RNA MDV-1), no interfieren con la unión de la replicasa de QB a los RNAs recombinantes, ni con la iniciación de la síntesis.



## **I. Análisis de replicabilidad de las moléculas recombinantes: MDVTC11 y MDVTC17.**

Se han utilizado sondas de hibridación de DNA capaces de detectar al parásito *Trypanosoma cruzi* con absoluta especificidad y gran sensibilidad (González y col., 1984; Ashall y col., 1988). Asumiendo, que podría haber un sólo parásito en 2.5 ml de sangre y que luego, ésta debe solubilizarse para analizar una alícuota de 25 µl resulta que, se requiere un ensayo de detección con una sensibilidad mínima de 1,000 moléculas de blanco (ver Tabla I).

Con respecto a la generalidad del uso de sondas de hibridación replicables para la detección de diversos agentes infecciosos, es importante analizar algunos aspectos. Uno de ellos es el hecho de que no todos los RNAs recombinantes derivados de MDV-1 son sustratos para la replicasa de QB. Ya que esto constituye un problema desde el punto de vista del diseño de señales replicables, es clara la necesidad de conocer los factores que determinan la función de replicabilidad. Tal conocimiento permitirá el diseño racional de sondas replicables y además es por sí mismo un problema de interés básico ya que, hablará del mecanismo que asegura la propagación de estos RNAs por la replicasa de QB (Mills y col., 1987; Priano y col., 1987).

En este trabajo se construyeron varias moléculas recombinantes sustratos para la replicasa del fago QB, insertado fragmentos de 8 a 60 nucleótidos dentro de la secuencia del RNA MDV-1 en la posición 62. Los RNAs MDVTC11 y MDVTC17 contienen un inserto de 60 y 54 nucleótidos, de los cuales únicamente 27, hibridan con parte del elemento repetido de 195 pares de bases del parásito *Trypanosoma cruzi*, resultando así en RNAs recombinantes de 278 y 272 nucleótidos de longitud, respectivamente. Ensayos que utilizan clones que llevan este elemento repetido han mostrado que son útiles como sondas especie-específicas (González y col., 1984).

La replicación de los RNAs recombinantes MDVTC11 y MDVTC17 se favorece en bajas concentraciones de  $MgCl_2$ , en ausencia de espermidina y a baja fuerza iónica (Figuras 11, 12, 13).

En general, a mayor concentración de sal hay una mayor estabilidad de la doble

**TABLA 1. SENSIBILIDAD REQUERIDA PARA LA DETECCION DE AGENTES INFECCIOSOS EN MUESTRAS DE SANGRE DE 25  $\mu$ l.**

Patógeno	No. Agentes Patógenos	No. Moléculas DNA	No. Moléculas RNA
<i>Plasmodium falciparum</i>	1000*	2 X 10 <sup>6</sup>	8 X 10 <sup>7</sup> *
(Gene MDR de <i>P. falciparum</i> )		4 X 10 <sup>3</sup>	2 X 10 <sup>4</sup>
(Gene DHFR-TII de <i>P. falciparum</i> )		2 X 10 <sup>3</sup>	1 X 10 <sup>4</sup>
<i>Plasmodium vivax</i>	50**	1 X 10 <sup>4</sup>	4 X 10 <sup>6</sup> *
<i>Trypanosoma cruzi</i>	(0.01 ?***)	1 X 10 <sup>3</sup>	1 X 10 <sup>3</sup> *
Virus HIV-1	1000	1 X 10 <sup>3</sup>	2 X 10 <sup>4</sup>
<i>Salmonella typhi</i>	0.1****	0	1 X 10 <sup>3</sup>

\* Una célula del parásito contiene por lo menos 80,000 moléculas de RNA ribosomal 18S.

\*\* La sensibilidad del método microscópico de gota gruesa permite detectar 10 a 20 parásitos por  $\mu$ l, o sea entre 250 y 500 parásitos en 25  $\mu$ l.

\*\*\* Asumiendo que en 2.5 ml de sangre podría haber un sólo parásito y que se solubiliza esta muestra para luego analizar una alícuota de 25  $\mu$ l.

\*\*\*\* Asumiendo que en 1 ml hay 4 bacterias y que se solubiliza esta muestra para luego analizar una alícuota de 25  $\mu$ l.

hélice DNA:DNA, DNA:RNA o RNA:RNA. Sabemos que la presencia de iones monovalentes como el  $\text{Na}^+$  tienen un efecto estabilizador sobre la estructura nativa de varios tRNAs (Schimmel y Redfield, 1980). A concentraciones crecientes de  $\text{Na}^+$  los tRNAs pasan de una estructura "random coil" a una estructura secundaria y luego adquieren una estructura terciaria definida (Saenger, 1988). La concentración de sal en las reacciones de Q $\beta$  replicasa tiene un efecto considerable en la generación de productos de cadena sencilla o de cadena doble (Briebricher y col., 1982).

Por otro lado, variaciones en la concentración del ion  $\text{Mg}^{2+}$  pudieran estar afectando la estabilidad de los RNAs de cadena sencilla en solución y en el complejo de replicación. Para el caso de algunas moléculas recombinantes, si se disminuye la concentración de magnesio presente durante la reacción de replicación, se mejora la eficiencia de replicación en casi un 100% y se disminuye la replicación de las moléculas contaminantes (Sanjay Tyagi, comunicación personal y Figura 11). Probablemente, las bajas concentraciones de  $\text{MgCl}_2$  y  $\text{NaCl}$  están disminuyendo en conjunto la estabilidad de las moléculas recombinantes y de esta forma, relajando la interacción de la Q $\beta$  replicasa con sus templados. Con respecto al papel del  $\text{Mg}^{++}$  sobre la actividad de la replicasa de Q $\beta$  se sabe que, ésta es una enzima dependiente de  $\text{Mg}^{++}$  como muchas otras enzimas que reconocen ácidos nucleicos. Sin embargo, la mayor parte de lo que se conoce con respecto al efecto del  $\text{Mg}^{++}$  sobre la estabilización de la estructura secundaria y terciaria de los RNAs se ha hecho con tRNAs. Cuando el  $\text{Mg}^{++}$  se une fuertemente ( $K_a \approx 10^5$  litros/mol) a los tRNAs, éstos se doblan y pasan de un estado desnaturalizado a la conformación nativa (Crothers y Cole, 1978). El número de sitios de unión de alta afinidad para el  $\text{Mg}^{++}$  no es el mismo para todos los tRNAs y varía desde uno para el tRNA<sup>Met</sup> de *E. coli* hasta 17 para el tRNA<sup>Phe</sup> de levadura, de los cuales, sólo 5 se pegan en forma cooperativa. El resto no se unen de manera cooperativa y son menos específicos. Los análisis cristalográficos de las estructuras del tRNA<sup>Phe</sup> de levadura muestran que el  $\text{Mg}^{++}$  se une como una especie octahédrica coordinada  $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$  e interactúa con el tRNA a través de puentes de hidrógeno de las moléculas de agua que lo hidratan o por el reemplazo de una o dos moléculas de agua por una coordinación directa a los oxígenos de algunos fosfatos (Saenger, 1988).

Además de los efectos de la sal, la replicasa por si misma puede jugar un papel en la separación de las cadenas (+) y (-) en el complejo de replicación. Aunque tal función no ha sido descrita para la replicasa de Q $\beta$ , se ha demostrado una actividad de helicasa para la proteína ribosomal S1, una subunidad de la Q $\beta$  replicasa (Blumenthal y Carmichael, 1979; Cole y col., 1982).

La espermidina, al igual que la espermina y la putrescina es un polication que se une fuerte y preferencialmente a secuencias heteropoliméricas y altera la conformación del DNA y el RNA (Feuerstein y col., 1989). Como la espermidina se pega fuertemente al RNA y normalmente se utiliza en las reacciones de transcripción a concentraciones de 4 mM se pensó que, ya que muy difícil removerla completamente con el procedimiento de purificación del transcrito que se utilizaba, pudiese estar inhibiendo la replicación de algunas moléculas recombinantes. De esta manera, se prepararon RNAs en ausencia de espermidina y se utilizaron para iniciar reacciones de replicación bajo diferentes concentraciones de espermidina (Figura 12). Como puede observarse, efectivamente la replicación de las recombinantes MDVTC11 y MDVTC17 se inhibe a altas concentraciones de espermidina.

La ecuación que describe la cinética exponencial característica de la reacción de replicación con la replicasa de Q $\beta$  y que igualmente puede aplicarse a la cinética de replicación del RNA MDVTC11 o el RNA MDVTC17 es:

$$N = N_0 2^{t/d}$$

donde  $N_0$  es el número inicial de moléculas de RNA;  $t$  es el tiempo de incubación;  $d$  es el tiempo característico que toma a una población de RNA para duplicarse y  $N$  es el número de moléculas de RNA presente al tiempo  $t$ . De esta ecuación se puede concluir que si se determina la cantidad de moléculas presentes a un tiempo dado de reacción y se conoce la constante de duplicación de cada molécula recombinante, puede calcularse el número de moléculas con que se inició cada reacción. Si se hace un cálculo aproximado del tiempo de duplicación durante la fase exponencial para las moléculas recombinantes MDVTC11 y MDVTC17 con los datos de la Figura 15 o se calcula la pendiente de los perfiles de incorporación durante la fase lineal, se deduce que en general el tiempo de duplicación para MDVTC11 (2.2 minutos) es mayor que para MDVTC17 (2.13 minutos) y mucho mayor que para MDVMal22 (35

segundos), lo cual refleja una mayor velocidad de síntesis para MDVMal22 >> MDVTC17 > MDVTC11.

Se obtuvieron incrementos de 12,000 a 14,500 veces en la cantidad de producto sintetizado en reacciones de replicación de 30 minutos iniciadas con  $10^8$  moléculas de MDVTC11 y MDVTC17, respectivamente (Figura 15). Comparando los rendimientos en la síntesis de RNA, la replicación del RNA MDVMal22 parece ser mucho más eficiente que la del RNA MDVTC11 o el RNA MDVTC17. También fueron diferentes los rendimientos entre los dos RNAs recombinantes MDVTC. Se obtuvo aproximadamente 1.4 veces más producto del RNA MDVTC17 que del RNA MDVTC11. Los diferentes rendimientos obtenidos durante la reacción de replicación sugieren que las estructuras secundarias de las tres moléculas es diferente, lo cual está apoyado por el análisis de doblado en computadora (Figuras 20, 21 y 22). También se pudieron haber introducido nuevos sitios de pausa en estos RNAs recombinantes junto con las secuencias insertadas (Mills y col., 1978; Priano y col., 1987).

La observación de que los RNAs MDVTC son replicados exponencialmente sugiere fuertemente que la replicasa puede tener acceso al sitio de unión interno y al extremo 3' del templado de RNA. Lo que también implica que, la cadena producto en crecimiento puede formar estructuras secundarias durante la elongación, que previenen el colapso de las cadenas complementarias (Priano y col., 1987). Por otro lado, la velocidad de replicación posiblemente sea menor para los RNAs recombinantes MDVTC que para el RNA recombinante MDVMal22 lo que podría indicar más sitios de pausa en estos RNAs recombinantes, debido a la presencia del inserto de *Trypanosoma cruzi*. Cabe señalar que en este trabajo no se realizaron experimentos de cinética que midieran "estrictamente" los tiempos de duplicación durante la fase exponencial y que, el cálculo de tiempos de duplicación para las distintas recombinantes se hizo de forma indirecta en base a los rendimientos obtenidos en reacciones de replicación que ya habían entrado en fase lineal (Figura 15). Alternativamente, pudieran estar coexistiendo en solución varias estructuras secundarias subóptimas en un rango estrecho de energía libre y tan sólo una fracción de éstas pudieran ser sustratos competentes para amplificación exponencial (Priano y col., 1987). O que, mientras la reacción de replicación procede y aumenta la concentración de cadenas producto, se estén formando moléculas duplex entre las cadenas (+) y (-)

y de esta manera se esté disminuyendo la concentración efectiva de cadenas templado (Biebricher y col., 1987).

## II. Análisis de las estructuras secundarias predichas por el algoritmo de doblado de moléculas de Zuker.

Los programas que predicen estructuras secundarias óptimas como el que Zuker diseñó en 1981 (Zuker y Stiegler, 1981), no han sido de gran utilidad para la identificación de componentes estructurales que tengan alguna función en replicabilidad. Pero en 1989, el mismo Zuker diseñó un algoritmo que predice estructuras subóptimas dentro de un rango estrecho de energía. Este programa ha mostrado un 96% de correlación en cuanto a la estructura secundaria de muchos tRNAs y un 88%, para la estructura secundaria de algunos RNA ribosomales 5S (Zuker y col., 1989). Así, el análisis por computadora de los doblados subóptimos de las secuencias de MDV-1, MDVXba1, MDVpoly4, MDVpoly9, MDVTC11 y MDVTC17, mostró estructuras secundarias más estables para MDV-1 > MDVpoly4 > MDVXba1 > MDVpoly9 > MDVMa122 >> MDVTC17 ≈ MDVTC11. El análisis de las primeras estructuras subóptimas para MDVTC11 y MDVTC17, sugiere que el inserto de *Trypanosoma cruzi* puede estar separado del dominio estructural de MDV-1 principalmente en la molécula de MDVTC17 de modo que, la estructura secundaria del RNA MDV-1 permanece intacta (Figura 20 y 21) (Mills y col., 1980).

Una vez obtenidas las estructuras subóptimas para cada una de las moléculas recombinantes: MDVTC11, MDVTC17 y MDVMa122, se corrió el programa de agrupación de estructuras subóptimas en cuanto a dos motivos estructurales: 1) la región del sitio de unión a la replicasa y 2) la molécula completa. Recuérdese que la salida de este programa produce dos tipos de datos: 1) un X número de subgrupos de estructuras subóptimas que presentan el motivo estructural seleccionado de acuerdo a un parámetro de "semejanza" (que puede ir de 0.7 a 0.9), y 2) ordena las estructuras dentro de cada grupo de forma tal que, la primera en el grupo representa la estructura prototipo y no necesariamente, la que posee la mayor energía libre. De este análisis se puede observar una cierta tendencia particular común a los RNAs que son replicados más eficientemente como el RNA

MDVMal22, comparados a los que no son replicados tan eficientemente como el RNA MDVTC11 y el RNA MDVTC17. Cuando se toma como motivo estructural el sitio de unión a la replicasa (Tablas 2, 4 y 6) se observa el mismo patrón en cuanto al número de subgrupos, la heterogeneidad de los mismos y las energías libres de las estructuras subóptimas, que cuando se toma como motivo estructural la molécula completa (Tablas 1, 3 y 5). Aunque MDVMal22 y MDVTC17 presentan el mismo número de subgrupos, MDVMal22 presenta subgrupos más homogéneos y en general, de mayor energía libre que MDVTC17. Mientras que MDVTC11, no sólo presenta mayor número de subgrupos sino mayor heterogeneidad dentro de cada subgrupo y estructuras de más o menos igual energía libre que MDVTC17. Sin embargo, cuando se analizan las propiedades replicativas de MDVpoly4, MDVpoly9, MDVTC11 y MDVTC17, se observa que éstos replican menos eficientemente que los RNAs recombinantes MDVMal22 o MDVHIV20 o incluso que el RNA MDV-1, según se muestra en la Figura 15 (ver también la Figura 3 del artículo que se anexa a esta tesis). De hecho, MDVTC11 replica todavía a una menor eficiencia que MDVTC17 (Figura 15).

Estas observaciones indican que pueden existir ciertas diferencias asociables a las propiedades replicativas de una molécula bajo el criterio de número de subgrupos, de acuerdo a un motivo estructural seleccionado de forma arbitraria y la heterogeneidad dentro del subgrupo de acuerdo a la proximidad de las estructuras subóptimas. Es posible que un grupo de diferentes estructuras subóptimas en un rango estrecho de energía puedan coexistir en solución y que las diferencias de replicabilidad entre las distintas recombinantes esten determinadas en parte, también por interacciones específicas a nivel de estructura terciaria la cual, hasta el momento no es posible predecir.

Si bien únicamente hemos analizado tres moléculas recombinantes de acuerdo a este programa estadístico, no podemos concluir categóricamente que esto sigue siendo cierto para un mayor número de recombinantes. Cabe señalar que existen otras formas de interpretar y graficar los resultados que generó el programa de predicción de estructuras subóptimas y por lo tanto es probable que, planteándose otras hipótesis respecto a los factores que podrían influir sobre la replicabilidad de los RNAs recombinantes se puedan obtener datos más significativos.

Recientemente, el grupo del Dr. Don Mills reportó la construcción y la caracterización de 16 distintos RNAs recombinantes, substratos para la replicasa de Q $\beta$ , que contienen distintos tamaños de secuencias con la posibilidad de formar o no, una estructura de tipo tallo y asa independiente dentro del RNA MDV-1 (igualmente, en la posición 62) (Axelrod y col., 1991). Se utilizaron estos templados para iniciar reacciones de replicación *in vitro* con la replicasa de Q $\beta$  en cantidades que saturaran a la enzima. Las velocidades de replicación para los RNAs que presumiblemente poseían insertos estructurados estaban en el rango de 33 a 69% la del RNA MDV-1 control, a pesar del tamaño del inserto. De hecho, la mayor parte del RNA recién sintetizado se encontraba en cadena sencilla. En contraste, los RNAs que contenían insertos no estructurados (que no se esperaba que formaran estructuras secundarias) mostraron velocidades de replicación menores al 25% de la de MDV-1. En este caso, la velocidad de replicación correlacionó con la longitud de la secuencia insertada y la mayor parte del producto sintetizado eran moléculas duplex (cadenas complementarias (+) y (-), hibridadas). Cuando estos RNAs recombinantes se utilizaron en reacciones en donde la cantidad molar de templado era 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> veces menor que la de replicasa, sólo aquellas que presumiblemente contenían estructuras secundarias, sobrevivieron durante la reacción de replicación. Estos resultados son consistentes con que, la formación de estructuras de tipo tallo y asa durante la síntesis de RNA por la replicasa de Q $\beta$  influyen directamente la regeneración de RNAs de cadena sencilla (Axelrod y col., 1991), si bien no explican las diferentes eficiencias de replicación entre las recombinantes con insertos estructurados. Es posible que el mecanismo de pausa característico de la Q $\beta$  replicasa (Mills y col., 1978) estuviera operando en estas secuencias estructuradas heterólogas. Se sabe que la replicasa de Q $\beta$  se detiene temporalmente mientras se sintetiza el extremo 3' de un tallo y asa estable durante la replicación de varias especies de RNA endógenas (Mills y col., 1978; Priano y col., 1987).

### **III. Futuras estrategias para el uso de señales replicables en ensayos diagnósticos.**

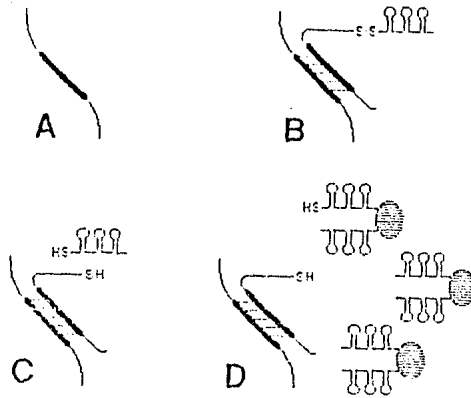
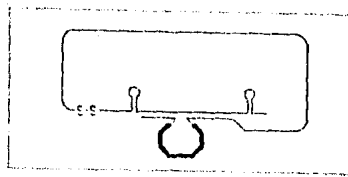
El ensayo modelo publicado para HIV-1 que utiliza sondas replicables, el sistema de lavados conocido como "reversible target cycling" y el sistema de



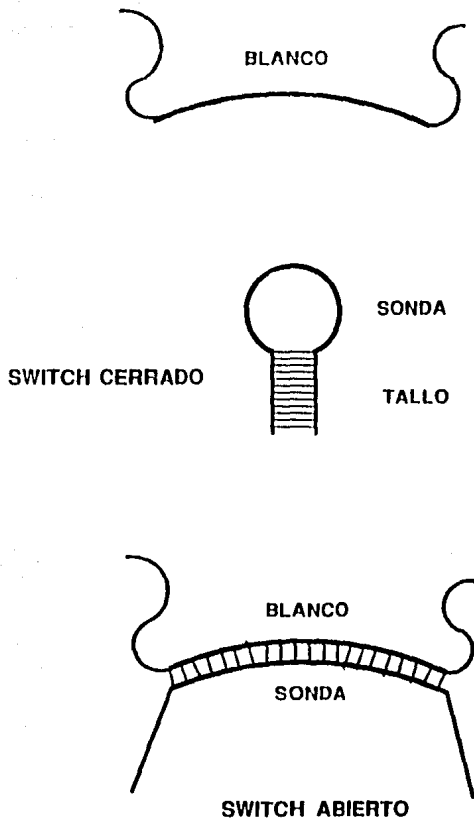
amplificación con la replicasa de QB, tuvo un límite de detección de 10,000 moléculas de blanco (Lomeli y col., 1989). Esto se debió a la replicación de las sondas que se pegan de forma inespecífica a la paredes y no son eliminadas eficientemente durante los lavados. Con el objeto de disminuir esta señal de fondo, se ha pensado en la posibilidad de usar sondas que incorporen "switches moleculares" (Kramer y col., 1989) y así eliminar también, la necesidad de los múltiples lavados. En base a estos resultados y a la pobre eficiencia de replicación de las moléculas recombinantes MDVTC11 y MDVTC17 comparada a la de MDVHV20 o MDV-1, se hizo evidente que este mismo esquema para la detección de *Trypanosoma cruzi*, no alcanzaría la sensibilidad mínima requerida. Actualmente el ensayo de detección de *Trypanosoma cruzi* más sensible reportado, es sin duda, el que utiliza PCR e hibridación con un oligonucleótido interno marcado, para amplificar fragmentos especie- y cepa- específicos de los microrganismos del DNA del kinetoplasto (Sturm y col., 1989). Este ensayo puede detectar alrededor de 40 moléculas de blanco.

Recientemente se han diseñado otros modelos de detección que precinden del requisito de obtener RNAs recombinantes replicables y que pretenden abatir el ruido de fondo utilizando "switches moleculares". Algunos de estos modelos involucran la utilización de RNAs replicables que tienen la secuencia sonda en un extremo. Después de que la sonda se une a su blanco, se utiliza uno de varios mecanismos para separarlo de la señal replicable, y proceder a la amplificación de éste último. La forma de separar la sonda de la señal replicable, depende de la forma en que se encuentran unidos. Una posibilidad es que sean moléculas independientes que se unan por enlaces disulfuro y luego, sean separadas por reducción con ditioneitol (Chu y col., 1986) (ver Figura 27).

Otro diseño de una sonda que incorpora un switch molecular y que es actualmente un proyecto de nuestro laboratorio se muestra en la Figura 28. Al unirse la sonda al blanco ocurre un cambio conformacional (la apertura de un tallo de doble cadena) tal que, únicamente las sondas unidas al blanco son capaces de generar señal. Las sondas que no se unen específicamente al blanco permanecen cerradas y de esta forma no generan señal. La apertura del tallo de cadena doble de la molécula switch, se debe a la rigidez adoptada por la doble hélice de DNA:DNA o DNA:RNA que se forma (Shore, D. y col., 1981; Bhattacharya y col.,



**FIGURA 27. Uso de un tipo de "switch molecular".** La figura que representa el switch molecular esta formada por un DNA de cadena sencilla que contiene una secuencia sonda (representada por una línea engrosada) embebida dentro de secuencias aplanadoras y complementarias al RNA MDV-1. Este DNA esta unido covalentemente al RNA MDV-1 a través de un puente disulfuro (-S-S-) (simbolizado por una línea doblada en tallos y asas). El tallo y asa central del RNA MDV-1 no se muestra ya que el sitio de unión a la replicasa, necesario para que la replicasa se una ha sido alterado estructuralmente por las secuencias aplanadoras. Se prepara el DNA de cadena sencilla que contiene la secuencia blanco (Panel A). La sonda se une al blanco (Panel B) e induce un rearrreglo en la molécula tal que, el sitio de unión a la replicasa en el RNA MDV-1 es liberado. Después de lavar las sondas no unidas, se rompe el puente disulfuro por incubación con dithiothreitol (Panel C). Luego, el RNA templado liberado es amplificado exponencialmente por incubación con la replicasa de Q $\beta$  (Panel D). Las sondas que se quedan pegadas inespecíficamente a la membrana son incapaces de servir como templados para la replicasa de Q $\beta$ .



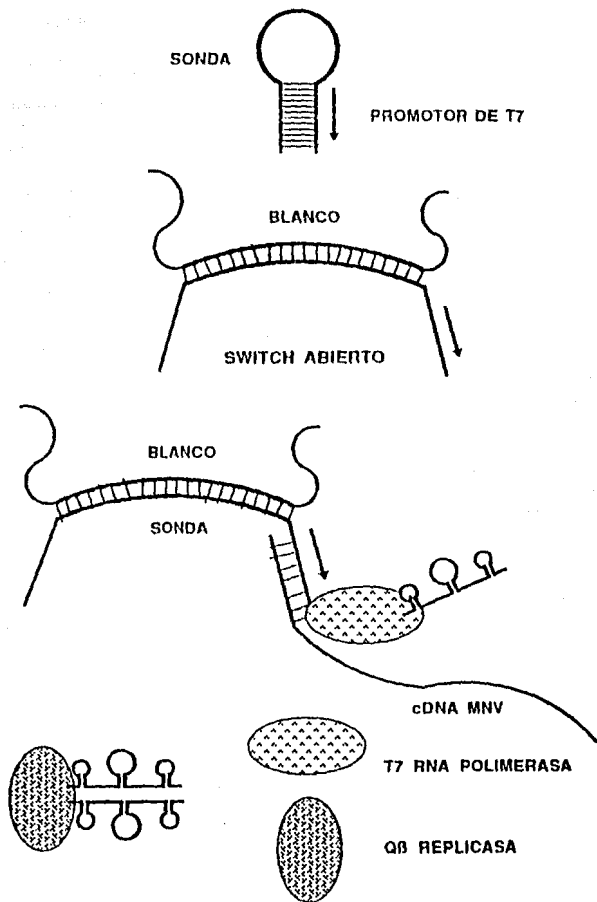
**FIGURA 28.** Esquema básico de un "switch molecular" que se abre, al hibridar la sonda con el blanco. En la parte superior se muestra la molécula blanco, la cual puede ser DNA o RNA. En la porción media se esquematiza la sonda o "switch" en su estado cerrado (en ausencia del blanco) formando un tallo y asa consigo misma (la cual, también puede ser DNA o RNA). El tallo esta formado por dos secuencias complementarias, localizadas cada una en los extremos de la molécula y el asa contiene la secuencia que servirá como sonda. En la porción inferior se muestra el "switch" hibridando con el blanco, ahora en posición abierta.

1989). El funcionamiento de este switch ya ha sido demostrado en ensayos modelo que miden la presencia de un tallo de RNA abierto o cerrado como función de la presencia o ausencia del blanco (Guerra y col. manuscrito en preparación).

En este ensayo, la generación de señal ocurrirá como se muestra en la Figura 29. Al unirse al blanco, el switch molecular se abrirá y expondrá una secuencia de 20 nt de cadena sencilla que contiene las 15 bases superiores del promotor para la T7 RNA polimerasa. En la misma solución, se encontrará una molécula de DNA de cadena sencilla que contiene la cadena inferior del promotor de T7, localizada frente al gene que codifica para el RNA replicable. Este DNA de cadena sencilla se unirá específicamente a la secuencia de 20 pares de bases del switch abierto. Una incubación, simultánea en presencia de la T7 RNA polimerasa y la replicasa de QB, resultará en la generación de un RNA replicable por transcripción y su concomitante replicación. La detección del RNA producido podrá realizarse por métodos simples tales como, por tinción con bromuro de etidio.

Un aspecto importante de este acercamiento será la utilización de un esquema de hibridación en "sandwich". Este esquema involucra el uso de una segunda sonda (sonda de captura) cuya función es la de inmovilizar al híbrido y así permitir lavados sucesivos. Esta sonda de captura contiene una secuencia complementaria al blanco en una región adyacente a la zona donde hibrida la sonda detectora y una cola de poli-dA en el extremo 3'. Esta cola de poli-dA permite que la sonda de captura se pueda pegar con alta eficiencia a las partículas magnéticas que contienen poli-dT25. Este esquema ya se ha descrito anteriormente y fué el que se usó en el ensayo para HIV-1 (Lomclí, H., y col., 1989).

Cabe señalar que, un ensayo diagnóstico que utilice señales de RNA replicables del tipo desarrollado para HIV-1, requiere de la síntesis de varios oligonucleótidos (para las sondas de captura y para la sonda detectora), la construcción de varias moléculas recombinantes y su caracterización para la selección de una sonda competente para replicación exponencial y la construcción del vector de donde se obtendrá el blanco artificial. En cambio un modelo como el del "switch molecular", donde la sonda detectora y la que sirve



**FIGURA 29.** Esquema de un "switch molecular acoplado a un sistema generador de señal exponencial. Cuando la sonda hibrida al blanco, el "switch" molecular se abre y expone una secuencia de 20 nucleótidos de cadena sencilla de los cuales, 7 son complementarios al promotor de la T7 RNA polimerasa. Se encuentra presente en la misma solución una molécula de DNA de cadena sencilla que contiene la cadena inferior del promotor de T7 adyacente al gene que codifica para el RNA replicable. Este DNA de cadena sencilla hibrida específicamente con la secuencia de 20 nucleótidos del "switch" abierto. Después de la incubación con la T7 RNA polimerasa, se genera un RNA replicable por transcripción que luego es amplificado por la replicasa del fago Q $\beta$ .

como templado de la molécula replicable, están localizadas en moléculas separadas resulta más genérico en el sentido que, involucra únicamente la síntesis de algunos oligonucleótidos (las sondas de captura y la sonda detectora) para cada nuevo ensayo que se quiere implementar.

## BIBLIOGRAFIA

- Ashall, F., Yip-Chuck, D.A.M., Luquetti, A.A. and Miles, M.A. (1988). Radiolabeled total parasite DNA probe specifically detects *Trypanosoma cruzi* in mammalian blood. *J. Clin. Microbiol.* **26**: 576.
- August, J.T., Banerjee, A.K., Eoyang, L., Franze de Fernández, M.T., Hori, K., Kuo, C.H., Rensing, U. and Shapiro, L. (1968) Synthesis of bacteriophage Q $\beta$  RNA. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **33**: 73.
- Axelrod, V.D., Brown, E., Priano, C. and Mills, D.R. (1991). Coliphage Q $\beta$  RNA replication: RNA catalytic for single-strand release. *Virology* **184**: 595.
- Axelrod, V.D. and Kramer, F.R. (1985). Transcription from bacteriophage T7 and SP6 RNA polymerase promoters in the presence of 3'-deoxyribonucleoside 5'-triphosphate chain terminators. *Biochemistry* **24**: 5716.
- Banerjee, A.K., Rensing, U. and August, J.T. (1969). Replication of RNA viruses. replication of a natural 6S RNA by the Q $\beta$  RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **45**: 181.
- Batschelet, E., Domingo, E. and Weissmann, C. (1976). The proportion of revertant and mutant phage in a growing population as a function of mutation and growth rate. *Gene*. **1**: 27.
- Bausch, J.N., Kramer, F.R., Miele, E.A., Dobkin, C. and Mills, D.R. (1983). Terminal adenylation in the synthesis of RNA by Q $\beta$  replicase. *J. Biol. Chem.* **258**: 1978.
- Bhattacharyya, A. and Lilley, D.M.J. (1989). The contrasting structures of mismatched DNA sequence containing looped-out bases (bulges) and multiple mismatches (bubbles). *Nucleic Acids Res.* **17**: 6821.

- Blattacharya, A., Murchie, A.I.H. and Lilley, D.M.J. (1990). RNA bulges and the helical periodicity of double-stranded RNA. *Nature* **343**: 484.
- Biebricher, C.K. (1982). Structural analysis of self-replicating RNA synthesized by Q $\beta$  replicase. *J. Mol. Biol.* **154**: 629.
- Biebricher, C.K. (1983). Darwinian selection of RNA molecules *in vitro*. *Evol. Biol.* **16**: 1.
- Biebricher, C.K. (1987a). Replication and evolution of short-chained RNA species replicated by Q $\beta$  replicase. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **52**: 299.
- Biebricher, C.K. (1987b). Replication and selection kinetics of short-chained RNA species. *UCLA Symp. Mol. Cell. Biol.* **54**: 9.
- Biebricher, C.K., Dickmann, S, and Luce, R. (1982). Structural analysis of self-replicating RNA synthesized by Q $\beta$  replicase. *J. Mol. Biol.* **154**: 629.
- Biebricher, C.K., Eigen, M. and Gardiner, W.C. (1984). Kinetics of RNA replication: plus-minus asymmetry and double-strand formation. *Biochemistry.* **23**: 3186.
- Biebricher, C.K., Eigen, M. and Luce, R. (1981). Kinetic analysis of template-instructed and *de novo* RNA synthesis by Q $\beta$  replicase. *J. Mol. Biol.* **148**: 391.
- Biebricher, C.K., Eigen, M. and Luce, R. (1986). Template-free RNA synthesis by Q $\beta$  replicase. *Nature* **321**: 89.
- Biggin, M.D., Gibson, T.J. and Hong, G.F. (1983). Buffer gradient gels and <sup>35</sup>S label as an aid to rapid DNA sequence determination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 3963.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for



- screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513.
- Blumenthal, T. (1979). Q $\beta$  RNA replicase and protein synthesis elongation factors EF-Tu and EF-Ts. *Methods Enzymol.* **60**: 628.
- Blumenthal, T. and Carmichael, G.G. (1979). RNA replication: Function and structure of Q $\beta$  replicase. *Annu. Rev. Biochem.* **48**: 525.
- Blumenthal, T., Landers., T.A. and Weber, K. (1972). Bacteriophage Q $\beta$  replicase contains the protein biosynthesis elongation factors EF-Tu and EF-Ts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**: 1313.
- Castilla, M.M., Santos-Gomez, M., Guzman-Bracho, C. and Bautista-Garfias, C.R. (1988). A new method for diagnosis of Chagas' disease: diffusion-in-gel enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Parasitol.* **74**: 805.
- Chandler, F.W. and Watts, J.C. (1988). Immunofluorescence as an adjunct to the histopathologic diagnosis of Chagas' disease. *J. Clin. Microbiol.* **26**: 567.
- Chattoraj, D.K., Gosule, L.C. and Schellman, J.A. (1978). DNA condensation with polyamines II. Electron microscopic studies. *J. Mol. Biol.* **121**: 327.
- Chu, B.C.F., Kramer, F.R. and Orgel, L.E. (1986). Synthesis of an amplifiable reporter RNA for bioassays. *Nucleic Acids Res.* **14**: 5591.
- Cole, P.E., Sawchyn, I. and Guerrier-Takada, C. (1982). Q $\beta$  replicase containing altered forms of ribosomal protein S1. *J. Biol. Chem.* **257**: 12929.
- Crothers, D.M. and Cole, P.E. (1978). Conformational changes of tRNA. In: *Transfer RNA* (S. Altman, Ed.), pp. 196-217. MIT Press, Cambridge.
- Dobkin, C., Mills, D.R., Kramer, F.R. and Spiegelman, S. (1979). RNA replication: Required intermediates and the dissociation of template, product and Q $\beta$  replicase. *Biochemistry* **18**: 2038.

- Eoyang, L. and August, J.T. (1971). Q $\beta$  RNA polymerase from phage Q $\beta$ -infected *E. coli*. pp. 829-839. In: Procedures in Nucleic Acids Research. Volume 2. Cantoni, G.L. and Davis, D.R. eds. Harper and Row, New York.
- Feix, G. (1976a). Primer-dependent copying of rabbit globin mRNA with Q $\beta$  replicase. *Nature* **259**: 593.
- Feix, G. Pollet, R. and Weissmann, C. (1968). Replication of Viral RNA. XVI Enzymatic synthesis of infectious viral RNA with noninfectious Q $\beta$  minus strands as template. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **59**: 145.
- Feix, G. and Sano. (1976b). "Polydeoxyribonucleotides as templates for RNA synthesis catalyzed by Q $\beta$  replicase". *FEBS Lett.* **63**: 201.
- Feuerstein, B.G., Pattabiraman, N. and Marton, L. (1989). Molecular dynamics of spermine-DNA interactions: Sequence specificity and DNA bending for a simple ligand. *Nucleic Acids Res.* **17**: 6883.
- González, A., Prediger, E., Huecas, M.E., Nogueira, N. and Lizardi, P.M. (1984). Minichromosomal repetitive DNA in *Trypanosoma cruzi*: Its use in a high-sensitive parasite detection assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 3356.
- Gosule, L.C. and Schellman, J.A. (1976). DNA condensation with polyamines I. Spectroscopic studies. *J. Mol. Biol.* **121**: 311.
- Haruna, I. and Spiegelman, S. (1965a). Recognition of size and sequence by an RNA replicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **54**: 1189.
- Haruna, I. and Spiegelman, S. (1965b). Autocatalytic synthesis of a viral RNA *in vitro*. *Science* **150**: 884.
- Hill, D. and Blumenthal, T. (1983). Does Q $\beta$  replicase synthesize RNA in the absence of template?. *Nature* **301**: 350.
- Inokuchi, Y., Jacobson A.B., Hirose, T., Inayama, S. and Hirashima, A. (1988).

- Analysis of the complete nucleotide sequence of the group IV RNA coliphage SP. *Nucleic Acids Res.* **16**: 6205.
- Ish-Horowitz, D. and Burke, J.F. (1981). Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.* **9**: 2989.
- Jaeger, J.A., Turner, D.H. and Zuker, M. (1989a). Improved predictions of secondary structures for RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 7706.
- Jaeger, J.A., Turner, D.H. and Zuker, M. (1989b). Predicting optimal and suboptimal structure for RNA. In "Molecular evolution: Computer analysis of protein and nucleic acid sequences", R. F. Doolittle ed. *Methods in Enzymology.* **183**: 281.
- Kacian, D.L., Mills, D.R., Kramer, F.R. and Spiegelman, S. (1972). A replicating RNA molecule suitable for a detailed analysis of extracellular evolution and replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**: 3038.
- Kaiser, D., Tabor, H. and Tabor, C.W. (1963). *J. Mol. Biol.* **6**: 141.
- Kamen, R. (1970). Characterization of the subunits of Q $\beta$  replicase. *Nature* **228**: 527.
- Klotz, G., Kramer, F.R. and Kleinschmidt, A.K. (1980). Conformational details of partially base-paired small RNAs in the nanometer range. *Electron Microscopy* **2**: 530.
- Klotz, G. (1982). Dark field imaging of nucleic acid molecules. *Proc. 10th Int. Cong. Electron Microscopy*, pp. 57.
- Kondo, M., Gallerani, R. and Weissmann, C. (1970). Subunit structure of Q $\beta$  replicase. *Nature* **228**: 525.
- Kornberg, A. Bertsch, L.L., Jackson, J.F. and Khorana, H.G. (1964). Enzymatic synthesis of DNA. XVI. Oligonucleotides as templates and the mechanism of

- their replication. Proc. Natl. Acad. Sci. **51**: 315.
- Krakow, J.S. and Karstadt, M. (1967). *Azotobacter vinelandii* RNA polymerase. Unprinted synthesis of r1C copolymer. Proc. Natl. Acad. Sci. **58**: 2094.
- Kramer, F. R. and Lizardi, P.M. Replicatable RNA reporters. Nature **339**: 401.
- Kramer, F.R. and Mills, D.R. (1978). RNA sequencing with radioactive chain-terminating ribonucleotides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75**: 5334.
- Kramer, F.R., Mills, D.R., Cole, P.E., Nishihara, T. and Spiegelman, S. (1974). Evolution *in vitro*: sequence and phenotype of a mutant RNA resistant to ethidium bromide. J. Mol. Biol. **89**: 719.
- Kramer, F.R. and Mills, D.R. (1981). Secondary structure formation during RNA synthesis. Nucleic Acids Res. **19**: 5109.
- Kramer, F.R., Mills, D.R. and Rudner, R. (1986). Selection of a mutant RNA resistant to ribonuclease T1.
- Landers, T.A., Blumenthal, T. and Weber, K. (1974). Function and structure in ribonucleic acid phage Q $\beta$  ribonucleic acid replicase. The roles of the different subunits in transcription of synthetic templates. J. Biol. Chem. **249**: 5801.
- Levisohn, R. and Spiegelman, S. (1968). The cloning of a self replicating RNA molecule. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **60**: 866.
- Levisohn, R. and Spiegelman, S. (1969). Further extracellular Darwinian experiments with replicating RNA molecules: Diverse variants isolated under different selective conditions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **63**: 805.
- Liquori, A.M., Constantino, L., Crescenzi, V., Elia, V., Giglio, E., Puliti, R., DeSantis, S.M. and Vitigliano, V. (1967). J. Mol. Biol. **24**: 113.
- Lomelí, H. (1990). Desarrollo de sondas de RNA recombinante amplificables y su

uso en ensayos modelo de hibridación. Tesis de Doctorado en Investigación Biomédica Básica. UACPyP del CCII/UNAM.

- Lomeli, H., Tyagi, S., Pritchard, C.G. Lizardi, P.M. and Kramer F.R. (1989). Quantitative assays based on the use of replicatable hybridization probes. *Clin. Chem.* **35**: 1826.
- Maxwell, J.H., Van Ness, J. and Hahn, W.E. (1978). Assay of DNA-RNA hybrids by S1-nuclease digestion and adsorption to DEAE-cellulose filters. *Nucleic Acids Res.* **5**: 2033.
- Meyer, F., Weber, H. and Weissman, C. (1981). Interactions of Q $\beta$  replicase with Q $\beta$  RNA. *J. Mol. Biol.* **153**: 631.
- Miele, E.A., Mills, D.R. and Kramer, F.R. (1983). Autocatalytic replication of a recombinant RNA. *J. Mol. Biol.* **171**: 281.
- Mills, D.R. (1988). Engineered recombinant messenger RNA can be replicated and expressed inside bacterial cells by an RNA bacteriophage replicase. *J. Mol. Biol.* **200**: 489.
- Mills, D.R., Dobkin, C., and Kramer, F.R. (1978). Template-determined, variable rate of RNA chain elongation. *Cell* **15**: 541.
- Mills, D.R. and Kramer, F.R. (1979). Structure-independent nucleotide sequence analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**: 2232.
- Mills, D.R., Kramer, F.R., Dobkin, C., Nishihara, T. and Spiegelman, S. (1975). Nucleotide sequence of microvariant RNA: Another small replicating molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**: 4252.
- Mills, D.R., Kramer, F.R., Dobkin, C., Nishihara, T. and Cole, P.E. (1980). Modification of cytidines in a Q $\beta$  replicase template: Analysis of conformation and localization of lethal nucleotide substitutions. *Biochemistry* **19**: 228.

- Mills, D.R., Kramer, F.R. and Spiegelman, S. (1973). Complete nucleotide sequence of a replicating RNA molecule. *Science* **180**: 916.
- Mills, D.R., Nishihara, T., Dobkin, C., Kramer, F.R., Cole, P.E., Spiegelman, S. (1977). The role of template structure in the recognition mechanism of Q $\beta$  replicase. In: Vogel, H.J., ed. *Nucleic acid-protein recognition*. New York, Academic Press.
- Mills, D.R., Peterson, R.L. and Spiegelman, S. (1967). An extracellular Darwinian experiment with a self-duplicating nucleic acid molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **58**: 217.
- Mills, D.R., Priano, C., DiMauro, P. and Binderow, B. (1989). Q $\beta$  replicase: Mapping the functional domains of an RNA-dependent RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **205**: 751.
- Mills, D.R., Priano, C. and Kramer, F.R. (1986). In: *Positive strand RNA viruses* (Brinton, M.A. & Rueckert, R.R., eds.), pp 35-45. Alan R. Liss, Inc., New York. Requirement for secondary structure formation during coliphage RNA replication.
- Mills, D.R., Priano, C. and Kramer, F.R. (1987). Requirement for secondary structure formation during coliphage RNA replication. *UCLA Symp. Mol. Cell. Biol.* **54**: 35.
- Mizusawa, S., Nishimura, S. and Seela, F. (1986). Improvement of the dideoxy chain termination method of DNA sequencing by use of deoxy-7-deazaguanosine triphosphate in place of GTP. *Nucleic Acids Res.* **14**: 1319.
- Munishkin, A.V. Voronin, L.A. and Chetverin. (1988). An *in vivo* recombinant RNA capable of autocatalytic synthesis by Q $\beta$  replicase. *Nature*. **333**: 473.
- Munishkin, A.V., Voronin, L.A., Ugarov, V.I., Bondareva, L.A., Chetverina, H.V. and Chetverin, A.B. (1991). Efficient templates for Q $\beta$  replicase are formed by recombination from heterologous sequences. *J. Mol. Biol.* **221**: 463.

- Nishihara, T., Mills, D.R. and Kramer, F.R. (1983). Localization of Q $\beta$  replicase recognition site in MDV-1 RNA. *J. Biochem.* **93**: 669.
- Obinata, M., Nasser, D.S. and McCarthy, B.J. (1975). Synthesis of probes for RNA using Q $\beta$ -replicase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **64**: 640.
- Osterman, H.L. and Coleman, J.E. (1981). T7 ribonucleic acid polymerase-promoter interactions. *Biochemistry* **20**: 4885.
- Palmenberg, A. and Kaesberg, P. (1974). Synthesis of complementary strands of heterologous Q $\beta$  replicase.. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **71**: 1371.
- Priano, C., Kramer, F.R. and Mills, D.R. (1987). Evolution of the RNA coliphages: The role of secondary structures during RNA replication. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **52**: 321.
- Priano, C., Mills, D.R. and Kramer, F.R. (1986). Sequence, structure and evolution of a 77-nucleotide template for Q $\beta$  replicase. *Nucleic Acids Res.* **14**:
- Rensing, U. and August, J.T. (1969). The 3'-terminus and the replication of phage RNA. *Nature* **224**: 853.
- Saenger, W. (1988). Metal and polyamine cation binding to tRNA. In: *Principles of nucleic acid structure* (Cantor, C.R. Ed.), pp. 343-346. Springer-Verlag New York Inc.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.K. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463.
- Schaffner, W., Ruegg, K.J. and Weissmann, C. (1977). Nanovariant RNAs: nucleotide sequence and interaction with bacteriophage Q $\beta$  replicase. *J. Mol. Biol.* **117**: 877.
- Schimmel, P.R. and Redfield, A.G. (1980). Transfer RNA in solution: Selected topics. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **9**: 181.

- Sharp, P.A., Sugden, B. and Sambrook, J. (1973). Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry*. **12**: 3055.
- Shore, D., Langowsky, J. y Baldwin, R.L. (1981). DNA flexibility studied by covalent closure of short DNA fragments into circles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 4833.
- Spiegelman, S., Haruna, I., Holland, I.B., Beaudreau, G. and Mills, D.R. (1965). The synthesis of self-propagating and infectious nucleic acid with a purified enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **54**: 919.
- Spiegelman, S., Pace, N.R., Mills, D.R., Levison, R., Eikhom, T.S., Taylor, M.M., Peterson, R.L. and Bishop, D.H. (1968). The mechanism of RNA replication. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **33**: 101.
- Sturm, N.R., Degrave, W., Morel, C. and Simpson, L. (1989). Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.* **33**: 205.
- Sumper, M and Luce, R. (1975). Evidence for *de novo* production of self-replicating and environmentally adapted RNA structures by bacteriophage Q $\beta$  replicase. *Proc. Natl. Acad. Sci* **72**: 162.
- Suwalsky, M., Traub, W., Shmueli, U. and Subirana, J.A. (1969). An X-ray study of the interaction of DNA with spermine. *J. Mol. Biol.* **42**: 363.
- Tachibana, H., Nagakura, K. and Kaneda, Y. (1988). Serodiagnosis of Chagas' disease using monoclonal antibody against *Trypanosoma cruzi*-specific M $_r$  25 000 antigen. *Parasitol. Res.* **74**: 409.
- Tullis, R.H. and Rubin, H. (1980). Calcium protects DNAse I from proteinase K: A new method for the removal of contaminating RNAse from DNAse I. *Anal. Biochem.* **107**: 260.



- Wahba, A.J., Miller, M.J., Niveleau, A., Landers, T.A., Carmichael, K., Weber, K., Hawley, D.A. and Slobin, L.I. (1974). Subunit I of Q $\beta$  replicase and 30S ribosomal protein S1 of *Escherichia coli*. Evidence for the identity of the two proteins. *J. Biol. Chem.* **249**: 3314.
- Wallace, R.B., Johnson, M.J., Suggs, S.V., MYyoshi, K., Bhatt, R. and Itakura, K. (1981). A set of synthetic oligodeoxiribonucleotide primers for DNA sequencing in the plasmid vector pBR322. *Gene* **16**: 21.
- Weber, H., Billeter, M., Kahane, J., Hindley, J., Peter, A. and Weissman, C. (1972). Molecular basis for repressor activity of Q $\beta$  replicasa. *Nature New Biol.* **237**: 166.
- Weber, H and Weissmann, C. (1970). The 3'-termini of bacteriophage Q $\beta$  plus and minus strands. *J. Mol. Biol.* **51**: 215.
- Weissmann, C. (1974). The making of a phage. *FEBS Lett. (suppl.)* **40**: S10.
- Weissmann, C., Feix, G. and Slor, H. (1968). *In vitro* synthesis of paghe RNA: The nature of intermediates. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **33**: 83.
- Wu, Y., Zhang, D.Y. and Kramer, F.R. (1992). Amplificable messenger RNA. *Nucleic Acids Res.* (manuscrito en preparaci3n).
- Zuker, M., and Stiegler, P. (1981). Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. *Nucleic Acids Res.* **9**: 133.
- Zuker, M. (1989). On finding all suboptimal foldings of an RNA molecule. *Science.* **244**: 48.

# **EXPONENTIAL AMPLIFICATION OF RECOMBINANT-RNA HYBRIDIZATION PROBES**

**Paul M. Lizardi, Cesar E. Guerra, Hilda Lomeli, Isabel Tussie-Luna, and Fred  
Russell Kramer<sup>1</sup>**

Reprinted from *Bio/Technology* Vol. 6, No. 10, October 1988

## EXPONENTIAL AMPLIFICATION OF RECOMBINANT-RNA HYBRIDIZATION PROBES

Paul M. Lizardi, Cesar E. Guerra, Hilda Lomeli, Isabel Tussie-Luna, and Fred Russell Kramer<sup>1</sup>

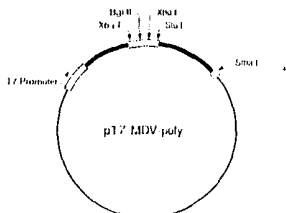
Centro de Investigacion sobre Ingenieria Genética y Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3, 62270 Cuernavaca, Morelos, México, and <sup>1</sup>Department of Molecular Genetics, Public Health Research Institute, 455 First Avenue, New York, NY 10016.

We have synthesized recombinant RNA molecules that function both as hybridization probes and as templates for exponential amplification by Q $\beta$  replicase. Each recombinant consists of a sequence specific for the protozoan parasite, *Plasmodium falciparum*, embedded within the sequence of MDV-1 RNA, which is a natural template for Q $\beta$  replicase. The probe sequence was inserted within a hairpin loop that occurs on the exterior of MDV-1 RNA. The recombinant RNAs hybridize specifically to complementary DNA, despite topological constraints on the probe domain, are replicated at the same rate as MDV-1 RNA, despite their additional length, and are able to serve as templates for the synthesis of a large number of RNA copies. A Q $\beta$  replicase reaction initiated with only 0.14 femtograms of recombinant RNA (1,000 molecules) can produce 129 nanograms of recombinant RNA product in 30 minutes. This represents a one-billion fold amplification. Our results demonstrate the feasibility of employing exponentially replicatable RNAs in bioassays, where they would serve the dual role of specific probe and amplifiable reporter.

The very high specificity inherent in nucleic acid hybridization<sup>1</sup> has provided powerful analytical tools for molecular biologists. There has been considerable interest in new techniques that permit the amplification of hybridization signals<sup>2-4</sup> to achieve levels of sensitivity that exceed those obtained with radioactive probes. We have been working on the design and synthesis of replicatable probes that combine in a single molecule the dual functions of hybridization probe and amplifiable reporter<sup>5</sup>. These novel molecules are recombinant RNAs<sup>6</sup> that contain a probe sequence embedded within the sequence of a naturally occurring RNA that serves as a template for the RNA-directed RNA

polymerase, Q $\beta$  replicase<sup>7</sup>. The structural and functional requirements for these recombinant RNAs are as follows: the presence of the probe must not interfere with replication, and the probe must retain its ability to hybridize to its target, despite the presence of the sequences required for replication. If these conditions are met, then these recombinant RNAs could be utilized in bioassays in which specifically hybridized molecules are amplified by incubation with Q $\beta$  replicase, generating a relatively large mass of recombinant RNA that would serve as a signal that hybridization had occurred.

The impetus for undertaking the study of these recombinant RNA molecules stems from the remarkable properties of RNA synthesis by Q $\beta$  replicase. A small number of template strands can initiate the synthesis of a large number of product strands<sup>8</sup>. Million-fold increases in the amount of RNA routinely occur *in vitro*<sup>9</sup> as a result of an exponential reaction mechanism<sup>10,11</sup>; single-stranded RNAs serve as templates for the synthesis of complementary single-stranded products; after the completion of product strand elongation, both the product and the template are released from the replication complex<sup>12</sup>; and both strands are free to serve as templates in the next round of synthesis. Consequently, as long as there is an excess of replicase, the number of RNA strands increases exponentially. After the number of RNA strands equals the number of active replicase molecules, RNA synthesis continues linearly. There are a number of advantages to using the amplification of RNA by Q $\beta$  replicase as the



**FIGURE 1** Structure of plasmid p17-MDV-poly. The heavy black line represents MDV-1 cDNA. The restriction sites contained within the polylinker (crosshatched segment) are not found elsewhere in the plasmid. When this plasmid is cleaved with endonuclease SmaI and incubated *in vitro* with T7 RNA polymerase, the resulting transcripts, MDV-poly RNA, consist of an RNA copy of the polylinker embedded within the sequence of MDV-1 (+) RNA. This plasmid serves as a vector for the construction of recombinant RNAs.

basis of a signal-generating system: Q $\beta$  replicase is highly specific for its own template RNAs<sup>14</sup>; as little as one molecule of template RNA can, in principle, initiate replication<sup>15</sup>; and the amount of RNA synthesized (typically, 200 ng in 50  $\mu$ l in 15 minutes) is so large that it can be measured with the aid of simple colorimetric techniques.

Two developments led to the current work: the discovery that oligoribonucleotides can be inserted within the sequence of a small, naturally occurring template for Q $\beta$  replicase, MDV-1 RNA<sup>16</sup>, without interfering with its replicability<sup>17</sup>; and the availability of a plasmid that serves as a template for the synthesis of MDV-1 (+) RNA when the plasmid is incubated *in vitro* with bacteriophage T7 RNA polymerase (Mills et al., in preparation). We modified this plasmid by inserting a polylinker within the MDV-1 cDNA sequence. The subsequent insertion of probe sequences within the polylinker created plasmids that served as templates for the transcription of recombinant RNAs. In this report, we demonstrate that these novel recombinant RNA molecules fulfill the design goals, serving as both specific hybridization probes and as amplifiable reporters. The use of these molecules in actual bioassays will be reported elsewhere.

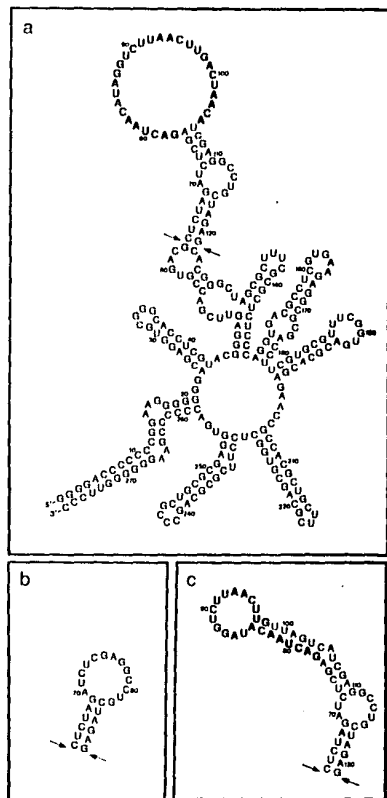
## RESULTS

**Synthesis of recombinant RNAs by transcription from plasmids.** We set out to construct an RNA molecule that would serve both as a specific probe and as a template for Q $\beta$  replicase. We chose MDV-1 RNA as the parent molecule because modified MDV-1 RNAs can be synthesized by transcription from recombinant plasmids. Plasmid pT7-MDV serves as a template for the synthesis of replicatable MDV-1 RNA. We inserted a synthetic polylinker into the MDV-cDNA sequence of this plasmid, creating plasmid pT7-MDV-poly (Fig. 1). Recombinant RNAs can be generated by inserting any heterologous DNA sequence into one of the unique restriction sites in the polylinker of pT7-MDV-poly, and then utilizing the resulting plasmid as a template for transcription by T7 RNA polymerase.

**Design of the replicatable probes.** MDV-1 RNA contains many stable secondary structures<sup>16-18</sup>, and the available evidence suggests that these structures are required for replication<sup>19,21</sup>. The site that we chose for inserting potential probe sequences into MDV-1 RNA was known to be on the exterior of the molecule<sup>6</sup>, where the insert was less likely to disturb these structures. A repetitive DNA sequence from the protozoan parasite, *Plasmodium falciparum*<sup>22-24</sup>, was chosen as a model probe. We had two main concerns when choosing the sequence of the probe: the inserted sequence might have to assume a single-stranded conformation for it to hybridize to its target sequence; and the inserted sequence might have to form secondary structures, otherwise the product and the template might form a nonreplicatable duplex<sup>21</sup>. Since these two concerns imposed contradictory constraints on the design of the inserted sequence, we prepared two recombinant RNAs with inserts expected to assume different structures. The first recombinant, MDV-fal-un RNA, was likely to possess an unstructured probe region, according to a computer analysis of its sequence<sup>25</sup>. The second recombinant, MDV-fal-st RNA, differed from MDV-fal-un RNA in a 5-nucleotide region. As a consequence, it was likely to form a more stable secondary structure in the region containing the probe. Figure 2 shows the nucleotide sequence and predicted secondary structure of MDV-fal-un RNA, MDV-fal-st RNA, and MDV-poly RNA.

**Replication of the recombinant RNAs.** Four different RNAs were prepared by transcription *in vitro*: MDV-1,

MDV-poly, MDV-fal-un, and MDV-fal-st. Electrophoretic analysis of these transcripts (left panel of Fig. 3) demonstrated that the recombinants that contained probe sequences could easily be distinguished from the other



**FIGURE 2** Nucleotide sequences of the recombinant transcripts folded into the secondary structures predicted by a computer program to be most stable<sup>25</sup>. MDV-fal-un (+) RNA (a) contains a 58-nucleotide insert (shown between the arrows) in place of the 3-nucleotide segment, AGU, that occurs in natural MDV-1 (+) RNA<sup>16</sup>. The secondary structures that the computer program predicts in the region of the recombinant outside the insert are identical to the secondary structures that were experimentally identified in MDV-1 RNA<sup>17,18</sup>, suggesting that the probe sequence would have little effect on the topology of the MDV-1 domain. Bold letters indicate the nucleotides that are complementary to *P. falciparum* DNA. The lower panels show the predicted secondary structure of the inserts present in MDV-poly (+) RNA (b) and MDV-fal-st (+) RNA (c).

transcripts by their relative mobility. The transcripts were then isolated from the reaction mixture and used as templates for the synthesis of additional RNA by Q $\beta$  replicase. Kinetic analysis of the amount of RNA synthesized in the Q $\beta$  replicase reactions (middle panel of Fig. 3) demonstrated that both the structured and the unstructured recombinant RNAs were excellent templates for exponential replication. Furthermore, electrophoretic analysis of the RNA synthesized in each Q $\beta$  replicase reaction (right panel of Fig. 3) showed that the products were homogeneous replicates of the original transcripts.

To compare the rate of replication of recombinant RNA to the rate of replication of MDV-1 RNA, Q $\beta$  replicase reactions were initiated with mixtures of MDV-fal-st (+) RNA and MDV-1 (+) RNA. The reactions were incubated for 20 minutes, permitting the synthesis of approximately ten million copies of each RNA. The RNA products of the reactions were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis. The results (Table 1) indicate that, despite recombinant RNA being 55 nucleotides longer than the MDV-1 RNA from which it was derived, it is amplified at essentially the same rate by Q $\beta$  replicase.

**Exponential amplification after serial dilution.** A series of Q $\beta$  replicase reactions were initiated with decreasing amounts of MDV-fal-un RNA. The results (Fig. 4) demonstrate that a reaction initiated with as few as 1,000 molecules of recombinant RNA (0.14 fg) produced 129 nanograms of recombinant RNA product after 30 minutes of synthesis, which is a one-billion-fold amplification. Virtually identical kinetic results were obtained in a parallel series of reactions initiated with MDV-fal-st RNA, indicating that the relative lack of secondary structure in the probe region of MDV-fal-un RNA had no discernible effect on replication.

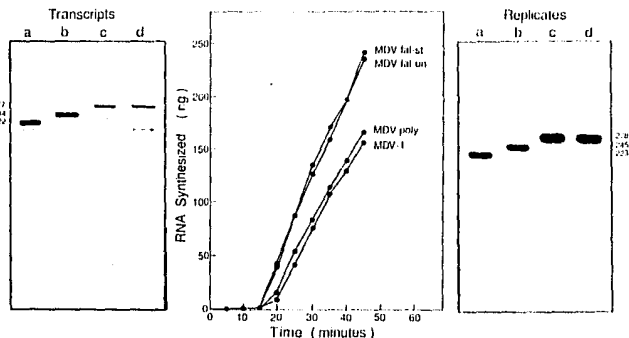
Electrophoretic analysis showed that the product of the reaction to which no exogenous template had been added was MDV-1 RNA (see inset of Fig. 4). This was expected, since the method that we used for isolating Q $\beta$  replicase<sup>28</sup> yields an enzyme with endogenous MDV-1 RNA<sup>29</sup>. A method designed to remove RNA from the replicase has been published<sup>29</sup>, but was not employed in this work. Based on the time it took for the control reaction to achieve saturation (when the number of RNA molecules

equals the number of active replicase molecules), we estimate that only 40 molecules of MDV-1 RNA were present initially. This was confirmed by the following results: when a reaction was initiated with 100 molecules of MDV-fal-un RNA, the 25-minute product contained 30% MDV-1 RNA; and a reaction initiated with only 10 molecules of MDV-fal-un RNA contained mostly MDV-1 RNA.

The results also demonstrate a unique kinetic characteristic of Q $\beta$  replicase reactions: if a set of reactions is incubated long enough to insure that all syntheses have achieved saturation, then the amount of RNA present in each reaction will be linearly proportional to the logarithm of the amount of RNA that was present initially. Fig. 5 utilizes the data shown in Fig. 4 to illustrate this relationship: the amount of RNA synthesized in 25 minutes is plotted against the logarithm of the number of recombinant molecules added initially. The results demonstrate that the amount of recombinant RNA product (which is in the hundred-nanogram range) is an accurate measure of the amount of RNA that was present initially over a range of at least six orders of magnitude.

**Hybridization of the recombinant RNAs.** Each of the recombinant RNAs was shown to bind specifically to denatured plasmids containing a known quantity of *P. fulciparum* target sequences (Fig. 6). Neither recombinant RNA bound to control plasmids that lacked *P. fulciparum* sequences. Furthermore, MDV-poly RNA, which does not contain a probe sequence, did not bind to either plasmid. Taken together, these results demonstrate that both recombinant RNAs bind specifically to their targets and that, under the hybridization conditions employed, the presence of structure in the probe region has little effect on hybridization.

In another experiment, truncated versions of each recombinant probe were prepared by transcription from plasmids that had been linearized by digestion with SmaI, instead of SmaI. These transcripts were only 111 nucleotides long, and contained 63 nucleotides from the 5' end of MDV-1 (+) RNA and 48 nucleotides from the insert region, including the entire probe sequence. Under the hybridization conditions employed, no difference could be observed between the hybridization of the truncated



**FIGURE 3** Replication of recombinant RNAs. Polyacrylamide gel electrophoresis (left panel) showed the relative mobility of different transcripts: MDV-1 (a), MDV-poly (b), MDV-fal-un (c), and MDV-fal-st (d). The numbers on the side of the panel indicate the length of each transcript (in nucleotides). Q $\beta$  replicase reactions were initiated with 200 fg of each transcript. Kinetic analysis (center panel) showed that approxi-

mately 100,000 copies of each transcript were synthesized in 20 minutes. Electrophoretic analysis of the RNA present after 45 minutes (right panel) showed that the products were replicates of the transcripts. The products were probably one nucleotide longer than the transcripts, since a nonessential, 3'-terminal adenosine is usually added during replication<sup>27</sup>.

RNAs and the hybridization of the full-length RNAs. This result demonstrates that the constrained topology of the MDV-1 domain<sup>10</sup> that surrounds the probe region in the full-length molecule does not impede the ability of the probe sequence to hybridize with its target.

**Replication of recombinant RNAs after hybridization.** Additional experiments were carried out to determine whether hybridized recombinant RNAs retain their ability to serve as templates for QB replicase after all the manipulations that occur during filter hybridization. MDV-fal-un RNA that had been hybridized to plasmids containing *P. falciparum* sequences was eluted from the dot-blot by a brief heating step. Electrophoretic analysis of this RNA showed that intact recombinant molecules had been released. A portion of the eluted RNA was then tested to see whether it could serve as a template for QB replicase. A ten-million-fold amplification occurred in 20 minutes. Electrophoretic analysis of the product of this reaction showed that it was MDV-fal-un RNA. In addition, a reaction was initiated with the eluant from a control dot-blot in which MDV-fal-un RNA had been incubated with plasmid DNA that lacked *P. falciparum* sequences. The product of this reaction was also MDV-fal-un RNA, indicating that a small amount of probe had bound nonspecifically. However, kinetic analysis confirmed that there was a distinctly lower level of RNA in the eluant from the control. Thus, these results demonstrate that hybridized recombinant RNAs that are released from target DNA retain the ability to be exponentially replicated by QB replicase.

## DISCUSSION

The results demonstrate that recombinant RNAs possess the minimum characteristics required for their use as replicatable probes in bioassays: they hybridize specifically to target DNA and retain the ability to be amplified exponentially by QB replicase. The surprising observation, that recombinants replicate at the same rate as MDV-1 RNA, indicates that the presence of relatively unstructured inserts does not lead to a collapse of the product strand upon the template strand<sup>12</sup>, and highlights how little we understand the structural determinants of replicability. We are constructing a wide variety of recombinant RNAs that are designed to function as replicatable probes. Thus, it will be possible to assess the generality of this new approach to probe design.

The exponential amplification of replicatable probes by QB replicase provides an alternative to the exponential amplification of targets by the DNA polymerase chain reaction<sup>13</sup>. A disadvantage of probe amplification in general is that nonspecifically bound probes serve as templates for amplification. However, methods involving capture DNA, such as sandwich hybridization<sup>17,18</sup>, have the potential of dramatically lowering the level of nonspecifically bound probes. Furthermore, additional properties can be added to replicatable probes through molecular design. Since replicatable probes undergo a conformational change upon hybridization, it should be possible to incorporate structural elements in the recombinant RNA that create a molecular switch whose state is dependent upon whether or not the probe is bound to its target. By coupling the state of this switch to a capture scheme or to signal generation, the background could be reduced significantly.

Although practical assays employing recombinant RNAs do not exist yet, we think it worthwhile to enumerate some of their expected advantages: (1) sensitivity—amplification factors of one-billion-fold would permit detection at extremely low levels of target; (2) speed—amplification would occur during a single incubation step

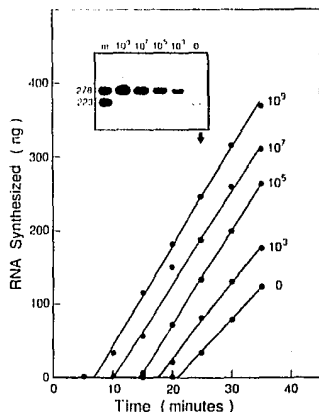
that takes less than 30 minutes; (3) convenience—the signal would take the form of a relatively large mass of RNA that could be quantitated by nonradioactive means; (4) wide dynamic range—the unique kinetic properties of QB replicase reactions would permit the quantitation of levels of target over a range of at least six orders of magnitude; and (5) simultaneous detection—a mixture of different replicatable probes could be used in a single assay, and after amplification they could be sorted out by hybridization to an ordered array of DNA dot-blots complementary to each probe, permitting the simultaneous identification of several different targets in the same sample.

## EXPERIMENTAL PROCEDURE

**Enzymes.** Restriction endonucleases, T4 polynucleotide kinase, and T7 RNA polymerase were purchased from New England Biolabs. Call intestine alkaline phosphatase, T4 DNA ligase, the Klenow fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I, and bovine pancreatic deoxyribonuclease I were purchased from Boehringer Mannheim. QB replicase was isolated from bacteriophage QB-infected *E. coli* Q13 by the procedure of Eoyang and August<sup>19</sup>, with the hydroxylapatite step omitted.

**Oligonucleotides.** Single-stranded DNA fragments were prepared, using B-cyanoethyl phosphoramidite chemistry<sup>21</sup>, in a Microsyn-450A synthesizer (Syntec). After deblocking and release from the resin, the oligonucleotides were isolated by preparative gel electrophoresis<sup>22</sup>, eluted from the gel, filtered through nitrocellulose, and purified by chromatography<sup>23</sup> on SEP-PAK C18 cartridges (Waters Associates).

### Plasmid for synthesizing MDV-1 (+) RNA by transcription.



**FIGURE 4** Effect of initial RNA concentration on the time-course of recombinant RNA synthesis. A series of 25- $\mu$ l QB replicase reactions were initiated with the following quantities of MDV-fal-un RNA: 140  $\mu$ g, 1.4  $\mu$ g, 14  $\mu$ g, 0.14  $\mu$ g, and 0  $\mu$ g, which corresponds to  $10^7$ ,  $10^5$ ,  $10^3$ ,  $10^1$ , and 0 molecules of added template. Samples of each reaction were taken every 5 minutes to determine the amount of RNA that had been synthesized. The results demonstrate that the time spent in the exponential phase of synthesis is increased when the initial number of template molecules is decreased<sup>19</sup>. Each 100-fold reduction in the number of recombinant molecules used as template resulted in a 3.6 minute delay in achieving saturation (indicating that the RNA population doubled every 33 seconds). The electrophoretic mobility of the RNA present in each reaction after 25 minutes (see inset), compared with the mobility of recombinant RNA (278-nucleotides long) and MDV-1 RNA (228-nucleotides long) markers (m), confirmed that the product of reactions initiated with recombinant RNA was recombinant RNA.

pT7-MDV contains a promoter for T7 RNA polymerase directed towards a full-length DNA prepared from MDV-1 RNA (Abills et al., in preparation). This plasmid had been constructed so that transcription from the T7 promoter begins with the first nucleotide of MDV-1 (+) RNA. A *Sma*I restriction site had been introduced at the other end of the MDV-1 cDNA sequence so that when the plasmid is linearized by digestion with endonuclease *Sma*I and then incubated with T7 RNA polymerase transcription terminates two nucleotides before the end of MDV-1 (+) RNA. The resulting transcripts, though lacking the natural 3'-terminal dinucleotide, CpA-OH, serve as excellent templates for exponential replication by Q $\beta$  replicase. A full description of the construction and use of this plasmid will be published elsewhere. Plasmids containing a polylinker within the MDV-1 cDNA sequence. The *Pvu*II-*Bst*II fragment of the MDV-1 cDNA sequence in pT7-MDV DNA was replaced with the corresponding *Pvu*II-*Bst*II fragment of a modified MDV-1 cDNA that contained a unique *Xba*I recognition sequence in place of the only *Hind*III recognition sequence in MDV-1 cDNA<sup>27</sup>. A synthetic DNA fragment (prepared by annealing dCTAGATCTCTC-GAGGCGCTG to dCTAGGAGGCGCTCGAGA) was then cloned into this *Xba*I site, converting it into a polylinker possessing unique restriction sites for *Xba*I, *Bgl*II, *Xho*I, and *Sst*I. This plasmid was designated pT7-MDV-poly.

**Plasmids for synthesizing recombinant RNAs by transcription.** pT7-MDV-fal-*in* was constructed by inserting a synthetic probe sequence (prepared by annealing dTCGAGACTAAGC-TAGCTCTTAAGTCTGACCTAAGC to dTCGATGTTAGTCTCAAGCTTAAGACTATGCTTACGTC) into the *Xba*I site of the polylinker sequence in pT7-MDV-poly. pT7-MDV-fal-*st* was constructed by inserting the related synthetic probe sequence (prepared by annealing dTCGAGACTAAGCCTAAGTCTCTTAAGCTTGTAGTCT to dTCGATGACTAAGCAAGTTAAGC-CCTATGTTAGTCT) into the same site in pT7-MDV-poly. Both probe sequences were complementary to the unique 21-base-pair repetitive sequence motif of *P. falciparum*<sup>22, 23</sup>. The nucleotide sequence that we used was determined from clones of repetitive DNA isolated from strain FCR 3/Gambia.

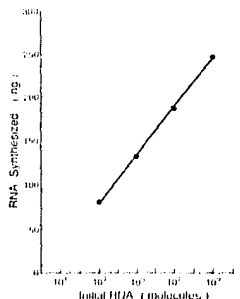
**Nucleotide sequence analysis.** The nucleotide sequence in the recombinant region of each plasmid was confirmed by the chain termination procedure<sup>24</sup>, utilizing 7-deaza-deoxyguanosine 5'-triphosphate (Boehringer Mannheim) in place of deoxyguanosine 5'-triphosphate<sup>25</sup>, and [<sup>32</sup>P]deoxycytidine 5'-( $\alpha$ -thio)triphosphate (New England Nuclear) as label<sup>26</sup>. Sequencing reactions were carried out on total plasmid DNA<sup>27</sup>, utilizing a 20-nucleotide primer (Pharmacia) that was complementary to the T7 promoter sequence<sup>28</sup>.

**Transcription.** Plasmids were isolated from bacteria by the method of Holmes and Quigley<sup>29</sup> and purified by gel filtration chromatography<sup>30</sup> on Sepharose S-1000 (Pharmacia). Plasmid DNA was then digested with *Sma*I or *Sst*I. Transcription was carried out according to a modification of the protocol of Axelrod and Kramer<sup>31</sup>: 1  $\mu$ g of linearized DNA was incubated with 80 units of T7 RNA polymerase for 3 hr at 37°C in 40  $\mu$ l of 400  $\mu$ M ATP, 400  $\mu$ M [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]GTP, 400  $\mu$ M GTP, 400  $\mu$ M UTP, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 12 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM dithiothreitol (freshly prepared), 100  $\mu$ g/ml bovine serum albumin, 4 mM spermidine, and 1 unit/ $\mu$ l of the ribonuclease inhibitor, RNasin (Promega Biotec). The [<sup>32</sup>P]transcripts were incubated with 0.1  $\mu$ g/ $\mu$ l of ribonuclease-free deoxyribonuclease I<sup>32</sup> to destroy the template DNA, and then purified by phenol/chloroform/isoamyl alcohol extraction, followed by precipitation with ethanol. The concentration of each RNA was determined from its specific radioactivity. The size and homogeneity of the RNA was determined by electrophoresis through 6% polyacrylamide slab gels in the presence of 7M urea<sup>33</sup>. The RNA bands were visualized by silver staining<sup>34</sup>.

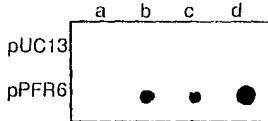
**Replication.** Between 1.4  $\times$  10<sup>-18</sup> g and 1.1  $\times$  10<sup>-10</sup> g of transcripts (depending on the reaction) were incubated with 1.2  $\mu$ g of Q $\beta$  replicase at 37°C in 25  $\mu$ l of 400  $\mu$ M ATP, 400  $\mu$ M [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]GTP, 400  $\mu$ M GTP, 400  $\mu$ M UTP, 14 mM MgCl<sub>2</sub>, and 90 mM Tris-HCl (pH 7.5). Each reaction was sampled every 5 min. The amount of RNA in each 2- $\mu$ l sample was determined by binding the [<sup>32</sup>P]RNA to DE81 cellulose discs (Whatman), as described by Maxwell and his coworkers<sup>35</sup>, and measuring the radioactivity on each disc with a scintillation counter. The size and homogeneity of the RNA in selected samples was determined by polyacrylamide gel electrophoresis. The [<sup>32</sup>P]RNA bands were detected by autoradiography.

**Hybridization.** Two different plasmids were used as targets. The first, pPRF6, was constructed by the insertion of a DNA fragment containing 45 tandem copies of the 21-base-pair repeti-

tive sequence of *P. falciparum* DNA (strain FCR-3) and into the BamHI site of pUC13 DNA (Boehringer Mannheim). Fifteen of the 45 repeated sequences were identical to the inserted sequence in the recombinant RNA probes. The other repeated sequences contained microheterogeneities. The second plasmid, pUC13, served as a negative control for hybridization of the recombinant RNA probes. Each plasmid was linearized by digestion with BamHI, denatured by incubation in 0.1 N NaOH for 60 sec at 42°C, and 0.5- $\mu$ g or 1.0- $\mu$ g aliquots were bound to a BMB3 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell), according to the dot-blot procedure of Kafatos and his coworkers<sup>36</sup>. The membrane was cut into sections, each containing a duplicate pair of pPRF6 and pUC13 dot-blots. Each membrane section was prehybridized for 3 hr at 37°C in 5 $\times$  SSPE (5 $\times$  SSPE is 400 mM NaCl, 50 mM sodium phosphate (pH 7.0), and 5 mM EDTA), 2 mg/ml sodium dodecyl sulfate, 500  $\mu$ g/ml heparin (Sigma), and 20% formamide. Each membrane section was then incubated for 4 hr at 25°C with between 23 ng and 150 ng of the [<sup>32</sup>P]RNA to be tested and 10  $\mu$ g of unlabeled *E. coli* rRNA<sup>35</sup> carrier (Boehringer Mannheim) dissolved in 2 ml of the prehybridization buffer. The following RNAs were tested: MDV-poly, MDV-fal-*in*,



**FIGURE 5** Linear relationship between the logarithm of the initial number of RNA molecules added to a Q $\beta$  replicase reaction and the amount of product RNA synthesized. This result illustrates how bioassays that utilize replicatable probes can be interpreted: the amount of product RNA would be proportional to the logarithm of the number probes bound to targets.



**FIGURE 6** Hybridization of recombinant RNAs. 28 ng MDV-poly RNA (a), 75 ng MDV-fal-*st* RNA (b), and 75 ng MDV-fal-*in* RNA (c) were hybridized to dot-blot<sup>36</sup> containing either 0.5  $\mu$ g pPRF6 DNA (a plasmid containing 45 copies of the *P. falciparum* target sequence) or 0.5  $\mu$ g pUC13 DNA (the plasmid vector used to construct pPRF6). The recombinant RNA probes hybridized specifically to plasmids containing target sequences. When the amount of both the MDV-fal-*in* RNA and the DNA was doubled (d), a marked increase was seen in the amount of RNA that bound to the target DNA.

**TABLE 1** Replication of mixtures of MDV-1 RNA and recombinant RNA.

Initial RNA (fg)		Product RNA (ng)	
MDV-1	MDV-fal- <i>st</i>	MDV-1	MDV-fal- <i>st</i>
1	1	12	54
10	1	45	13
1	10	17	149

MDV1-*lact*, and truncated versions of each (transcribed from plasmids cleaved at the *Sal*I site). After hybridization, the membranes were washed three times (15 min/wash) at 25°C with a solution containing 4 × SSPE, 2 mg/ml sodium dodecyl sulfate, and 400 µg/ml heparin, followed by two 10-min washes at 25°C in 1 × SSPE, and a 12-min wash at 37°C in 1 × SSPE. The hybridized RNA was detected by autoradiography.

**Replication of recombinant RNAs after hybridization.** To study the replicability of bound RNA, MDV1-*lact* RNA hybridized to double-stranded cRNA was eluted by boiling in 200 µl of water for 60 sec. The integrity of the eluted RNA was analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis. The replicability of the eluted RNA was determined by initiating a QB replicase reaction with 0.1 µl of the eluant. These reactions were followed kinetically, and the identity of the product RNA determined by polyacrylamide gel electrophoresis.

#### Acknowledgments

We are indebted to Donald Mills and Vladimir Axelrod for the construction of plasmid p17-MDV. We thank William Tzeger for providing P. *falciparum* strain FC-R-3/Gambia, Xavier Sobrón and Jesús Martín-Polo for advice on oligonucleotide synthesis, Georgina Estrada and Donna Lee Regl for expert technical assistance, Karl Delfia and Ellen Prediger for critically reading the manuscript, and John Mack for the preparation of the illustrations. We gratefully acknowledge the primary support received for this project from the National Science Foundation (DMB-80-16429), the American Cancer Society (MV-191C), and the John D. and Catherine T. MacArthur Foundation Consortium on Parasitic Diseases. We also thank of Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), the National Institutes of Health (GM-33315), and the Rockefeller Foundation (GA-118-8639) for additional support. Hilda Lomeli is supported by a predoctoral fellowship from CONACYT.

Received 26 July 1988; accepted 5 August 1988.

#### References

- Gilvovir, D. and Spiegelman, S. 1965. A quantitative assay for DNA-RNA hybrids with DNA immobilized on a membrane. *J. Mol. Biol.* **12**:282-291.
- Sakri, R. K., Schaif, S., Faloway, J., Mills, K. B., Horn, G. T., Ehrlich, H. A., and Anheim, N. 1985. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**:1350-1354.
- Sakri, R. K., Gelfand, D. H., Schaif, S., Schaif, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mills, K. B., and Ehrlich, H. A. 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:197-199.
- Ehrlich, H. A., Gelfand, D. H., and Sakri, R. K. 1986. Specific DNA amplification. *Nature* **331**:601-602.
- Chu, R. C., Gelfand, D. H., and Ogel, L. E. 1986. Synthesis of an amplifiable reporter RNA for bioassays. *Nucleic Acids Res.* **14**:5591-5603.
- Miele, E. A., Mills, D. R., and Kramer, F. R. 1983. Autocatalytic replication of a recombinant RNA. *J. Mol. Biol.* **171**:281-295.
- Hama, I. and Spiegelman, S. 1965. Specific template requirements of RNA replicases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **54**:579-587.
- Hama, I. and Spiegelman, S. 1965. Autocatalytic synthesis of a viral RNA *in vitro*. *Science* **150**:981-986.
- Kramer, F. R., Mills, D. R., Cole, P. E., Nishihara, T., and Spiegelman, S. 1971. Evolution *in vitro* sequence and phenotype of a mutant RNA resistant to ribonuclease. *J. Mol. Biol.* **90**:71-736.
- Weissmann, C., Feix, G., and Slin, H. 1968. *In vitro* synthesis of phage RNA: the nature of the intermediates. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **33**:83-100.
- Spiegelman, S., Pace, N. R., Mills, D. R., Levinsohn, R., Eklum, T. S., Taylor, M. M., Peterson, R. L., and Bishop, D. H. L. 1968. The mechanism of RNA replication. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **33**:101-124.
- Dobkin, C., Mills, D. R., Kramer, F. R., and Spiegelman, S. 1979. RNA replication: required intermediates and the dissociation of template, product, and QB replicase. *Biochemistry* **18**:2039-2044.
- Haxina, I. and Spiegelman, S. 1965. Regulation of site and sequence by an RNA replicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **54**:1189-1193.
- Levinsohn, R. and Spiegelman, S. 1968. The cloning of a self-replicating RNA molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **60**:866-872.
- Kanbu, D. L., Mills, D. R., Kramer, F. R., and Spiegelman, S. 1972. A replicating RNA molecule suitable for a detailed analysis of extracellular evolution and replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**:3038-3042.
- Klotz, C., Kramer, F. R., and Kleinschmidt, A. K. 1980. Conformational details of partially base-paired small RNAs in the nanometer range. *Flektion Microscopy* **25**:39-531.
- Mills, D. R., Dobkin, C., Nishihara, T., and Cole, P. E. 1980. Modification of cytosines in a QB replicase template: analysis of conformation and localization of lethal nucleotide substitutions. *Biochemistry* **19**:228-236.
- Kramer, F. R. and Mills, D. R. 1981. Secondary structure formation during RNA synthesis. *Nucleic Acids Res.* **9**:5109-5121.

- Mills, D. R., Dobkin, C., and Kramer, F. R. 1978. Template-determined, variable rate of RNA chain elongation. *Cell* **15**:541-550.
- Nishihara, T., Mills, D. R., and Kramer, F. R. 1983. Localization of the QB replicase recognition site in MDV1-RNA. *J. Biochem.* **93**:669-671.
- Pisano, C., Kramer, F. R., and Mills, D. R. 1987. Evolution of the RNA coliphage: the role of secondary structures during RNA replication. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **52**:321-330.
- Franzen, L., Westin, G., Shabo, R., Ålund, L., Perlmann, H., Persson, E., Wigzell, H., and Pettersson, U. 1984. Analysis of clinical specimens by hybridization with probe containing repetitive DNA from *Plasmodium falciparum*. A novel approach to malaria diagnosis. *Lancet* **1**:529-528.
- Ålund, L., Franzen, L., Westin, G., Persson, T., Wigzell, H., and Pettersson, U. 1985. Highly reiterated non-coding sequence in the genome of *Plasmodium falciparum* is composed of 21 base-pair tandem repeats. *J. Mol. Biol.* **185**:501-516.
- Zelig, J. W., Andrade, L. E., and Scott, E. D. 1987. Detection of *Plasmodium falciparum* DNA using repetitive DNA clones as species specific probes. *Mod. Biotech. Parasitol.* **22**:145-151.
- Zuker, M., and Stiegler, P. 1981. Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamic and auxiliary information. *Nucleic Acids Res.* **9**:133-148.
- Mills, D. R., Kramer, F. R., and Spiegelman, S. 1973. Complete nucleotide sequence of a replicating RNA molecule. *Science* **180**:910-927.
- Bousch, J. N., Kramer, F. R., Miele, E. A., Dobkin, C., and Mills, D. R. 1983. Terminal addition in the synthesis of RNA by QB replicase. *J. Biol. Chem.* **258**:1978-1981.
- Fovang, L. and August, J. T. 1971. QB RNA polymerase from phage QB-infected *E. coli*, p. 829-839. In: *Proceedings in Nucleic Acid Research*, Volume 2. Cantoni, G. L. and Davis, D. R. (eds.). Harper and Row, New York.
- Hill, D. and Munnellat, T. 1983. Does QB replicase synthesize RNA in the absence of template? *Nature* **301**:350-352.
- Bieberich, C. K., Diekmann, S., and Lutz, R. 1982. Structural analysis of self-replicating RNA synthesized by Q-beta replicase. *J. Mol. Biol.* **161**:629-648.
- Gait, M. J. 1981. *Oligonucleotide Synthesis*. Int. Press, Oxford, UK.
- Martins, H. W. D., Zenke, W. M., Grundström, T., Stath, A., Wintzerlin, M., and Chambon, P. 1981. Simultaneous rapid chemical synthesis of over one hundred oligonucleotides on a microscale. *EMBO J.* **3**:801-805.
- Lo, K. M., Jones, S., Hackett, N. R., and Khwaja, H. G. 1981. Specific amino acid substitution in bacteriophage replacement of a restriction fragment in the structural gene by synthetic DNA fragments containing altered codons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:2282-2289.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. K. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:5463-5467.
- Mizusawa, S., Nishimura, S., and Seela, F. 1986. Improvement of the dideoxy chain termination method of DNA sequencing by use of deoxy-7-deaza-2,2,7-triphosphate in place of GTP. *Nucleic Acids Res.* **14**:4319-4324.
- Biggin, M. D., Gibson, T. J., and Hong, G. F. 1983. Buffer gradient gels and <sup>32</sup>S label as aid to rapid DNA sequence determination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:3903-3905.
- Wallace, R. B., Johnson, M. J., Suggs, S. V., Miyoshi, K., Bhatt, R., and Bakota, K. 1981. A set of synthetic oligodeoxynucleotide primers for DNA sequencing in the plasmid vector pBR322. *Gene* **16**:21-26.
- Osterman, H. L. and Coleman, J. E. 1981. 17 ribonucleic acid polymerase-promoter interactions. *Biochemistry* **20**:4885-4892.
- Holmes, D. S. and Quigley, M. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**:193-197.
- Bresler, A. I., Bywater, P., and Hollau, L. 1983. A novel chromatographic procedure for purification of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **132**:219-224.
- Axelrod, V. D. and Kramer, F. R. 1985. Transcription from bacteriophage  $\lambda$ 7 and SP6 RNA polymerase promoters in the presence of 3'-deoxyribonucleoside 5'-triphosphate chain terminators. *Biochemistry* **24**:16-229.
- Tullis, R. H. and Rubin, H. 1980. Calcium protease DNase I from protinase K: a new method for the removal of contaminating RNase from DNase I. *Anal. Biochem.* **107**:260-264.
- Munkit, T., Jeffrey, A., and van deSande, H. 1975. Chain length determination of single-stranded and single-stranded DNA molecules by polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochemistry* **14**:3787-3794.
- Sammons, D. W., Adams, L. D., and Nishihara, E. E. 1981. Ultra-sensitive silver-based color staining of polypeptides in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **2**:135-141.
- Maxwell, I. H., Van New, J., and Hahn, W. E. 1978. Assay of DNA-RNA hybrids by *S1*-nuclease digestion and adsorption to DEAE-cellulose filters. *Nucleic Acids Res.* **5**:2033-2038.
- Kafatos, F. C., Jones, C. W., and Elstathiadis, A. 1979. Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentrations by a dot hybridization procedure. *Nucleic Acids Res.* **7**:1541-1552.
- Blatt, C. E., Pollock, A., Stramen, A., Laaksonen, M., and Söderlund, H. 1983. Sandwich hybridizations as a convenient method for detection of nucleic acids in crude samples. *Gene* **21**:77-85.
- Synänen, A.-C., Laaksonen, M., and Söderlund, H. 1986. Fast quantification of nucleic acid hybrids by affinity-based hybrid collection. *Nucleic Acids Res.* **14**:5037-5048.