



Cinvestav

**CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**Optimización de ribozimas hairpin para la construcción de
un nanorobot de RNA**

Tesis que presenta

Q.B.P. Luis Rodrigo Rosas Becerra

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

En la especialidad de

Genética y Biología Molecular

Director de la tesis: Dr. Luis Marat Alvarez Salas

Ciudad de México.

Marzo 2016

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Terapia Génica dirigido por el Dr. Luis Marat Alvarez Salas en el departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN gracias al apoyo CONACYT 176281 siendo el Q.B.P. Luis Rodrigo Rosas Becerra becario del Consejo Nacional de Ciencia Y Tecnología (CONACYT) bajo el número de registro 299477.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia; mi padre José Luis, mi madre Gabriela y mis hermanos Guadalupe y Jesús por su gran e invaluable apoyo incondicional, por ser siempre mi fuente de inspiración y motivación y a quienes dedico cada logro en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luis Marat Álvarez Salas por la oportunidad y confianza brindada al permitirme formar parte de este grupo de trabajo; así como su guía, su paciencia, su dedicación y sus enseñanzas durante la realización del proyecto.

A la Dr. María Luisa Benítez Hess por sus conocimientos y experiencia compartida durante el desarrollo del proyecto.

A mi comité de tesis, Dra. María del Refugio Bermúdez, Dr. Javier Hernández Sánchez y Dr. Eduardo Santillán Zeron por los comentarios, observaciones y recomendaciones realizadas a lo largo del proyecto.

A la Sria. Gabriela Mora Macías, por toda su dedicación y su apoyo administrativo.

Al Sr. Héctor Vargas Sánchez por el apoyo técnico brindado.

A mis compañeros de generación, por su apoyo incondicional y por los agradables momentos.

A mis compañeros de laboratorio: Naty, Vicky, Aida, Alex, Gio, Diana y Sergio por la amistad brindada, por su disponibilidad para ayudarme en cualquier momento y por hacer la estancia en el laboratorio tan agradable.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
Características de los ácidos nucleicos cómo material de construcción de nano-dispositivos.....	4
Ácidos nucleicos catalíticos.....	5
Ribozimas.....	5
Mecanismo de reacción.....	6
Ribozima hairpin.....	7
Función.....	7
Estructura.....	7
Acoplamiento.....	9
Mecanismo.....	10
DNAzimas.....	13
Nano-dispositivos de ácidos nucleicos.....	14
Nano-dispositivos no autónomos.....	14
Nano-dispositivos autónomos.....	16
ANTECEDENTES.....	19
Ribozima R434.....	19
Ribozima tríplex.....	20
Nanorobot basado en la ribozima tríplex.....	22

Mecanismo de desplazamiento del nanorobot en un camino programado de DNA.....	27
JUSTIFICACIÓN.....	29
HIPÓTESIS.....	30
OBJETIVOS.....	31
Objetivo general.....	31
Objetivos específicos.....	31
METODOLOGÍA.....	32
Esquema general de trabajo.....	32
MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
Diseño de oligodesoxinucleótidos (ODNs).....	33
Síntesis de ODNs.....	33
Purificación de ODNs.....	33
Hibridación de ODNs.....	34
Reacción en cadena de la polimerasa.....	35
Obtención del plásmido pRz434bis.....	36
Aislamiento de DNA plasmídico a pequeña escala (MINIPREP).....	36
Transcripción <i>in vitro</i>	37
Ensayos de catálisis.....	38
Cinética de catálisis de la extremidad T5.....	42
RESULTADOS.....	43
Diseño de extremidades catalíticas y sustratos para el nanorobot.....	43

Construcción de las extremidades catalíticas.....	47
Generación de las extremidades catalíticas por transcripción <i>in vitro</i>	59
Ensayos de catálisis.....	61
Construcción de las extremidades T5mut y T3mut.....	69
Transcripción <i>in vitro</i> de T5mut Y T3mut.....	71
Ensayos de catálisis comparativos de las extremidades T5, T5mut, T3 Y T3mut..	73
Construcción de las extremidades T5 y T3 y los sustratos S5 y S3.....	75
Transcripción <i>in vitro</i> de las extremidades T5 y T3 y de los sustratos S5 y S3.....	80
Ensayos de catálisis de las extremidades T5 y T3 en configuración <i>trans</i>	83
Caracterización cinética de la extremidad T5.....	85
DISCUSIÓN.....	93
CONCLUSIONES.....	101
PERSPECTIVAS.....	102
BIBLIOGRAFÍA.....	103
APÉNDICE: MATERIALES ADICIONALES.....	106
Oligodesoxinucleótidos.....	106
<i>Primers</i>	108
Medios de cultivo.....	109
Buffers.....	109

RESUMEN

Los nano-dispositivos son máquinas a nano-escala (1×10^{-9} m) capaces de convertir energía en movimiento. La idea de poder generar nano-dispositivos capaces de llevar a cabo tareas de forma autónoma, programada y controlada es uno de los más grandes y fascinantes retos de la actualidad. Se han utilizado los ácidos nucleicos, como materia prima de construcción de nano-dispositivos aprovechando las características intrínsecas de estas biomoléculas para su funcionamiento. La ribozima hairpin es una molécula de RNA catalítico que reconoce específicamente sustratos moleculares de la misma naturaleza mediante complementariedad de bases y llevan a cabo el corte en estos de forma procesiva. La catálisis se lleva a cabo mediante un mecanismo dinámico de acoplamiento y desacoplamiento de dominios intramoleculares, convirtiéndola en un modelo potencial para el diseño de un caminante molecular autónomo. Previamente en nuestro grupo de trabajo se desarrolló una ribozima tríplex la cual consta de un solo dominio catalítico y tres sitios de reconocimiento y corte. Su capacidad de procesar a los sustratos que se unen en todos los sitios sugiere un mecanismo pendular de catálisis. Esta observación inspiró el desarrollo de un primer diseño de un caminante molecular que consta de dos extremidades de reconocimiento y un dominio catalítico el cual puede ir reconociendo sustratos fijados a un camino híbrido de DNA-RNA. Sin embargo la caracterización individual de ambas extremidades mostró limitaciones que estas tuvieron para el fin deseado. El objetivo del presente trabajo fue replantear el diseño de las extremidades del caminante molecular basándose en el mecanismo de corte de la ribozima tríplex y en un modelo hipotético de desplazamiento, para ello, se consideraron dos ribozimas ya descritas obteniendo así el diseño de dos extremidades catalíticas denominadas T5 y T3 para su análisis individual. La extremidad T5 mostró ser funcional con un comportamiento cinético michaeliano, mientras que la extremidad T3 no mostró actividad sugiriendo la necesidad de proponer un diseño distinto que aumente su flexibilidad. Estas observaciones sugirieron que aunque las extremidades pueden ser probadas por separado, hay un requerimiento para implementar el diseño de extremidades en el caminante completo y probar su funcionalidad de forma integral.

ABSTRACT

Nanodevices are nanoscale machines capable of converting energy into motion. The idea of generating nanodevices able to perform programmed and controlled tasks autonomously, is one of the biggest and most fascinating technological challenges nowadays. Nucleic acids have been used as material for construction of nanodevices taking advantage of the inherent physicalchemical characteristics. In particular, the hairpin ribozyme is a catalytic RNA moiety that specifically recognizes molecular substrates of the same nature by base complementarity and performs processive cleavage on these. Catalysis obeys a dynamic docking and undocking mechanism through intramolecular domains, making it attractive for designing autonomous nanodevices. In previous works, a triplex hairpin ribozymes consisting of a single catalytic domain and three different specificities was able to simultaneously cleave three substrates in a single reaction. This observation guides the design and development of a molecular walker consisting of two recognition legs and a catalytic domain which can recognize and cleave attached substrates on a hybrid DNA-RNA track. However, the individual characterization of both legs showed the limitations that they had for this purpose. The aim of this study was to re-design the catalytic legs of the molecular walker based on the pendular cleavage mechanism of the triplex ribozyme and two different recognition sites sequences from previously described ribozymes were considered to construct of two new catalytic legs called T5 and T3 which were analyzed separately. The T5 construct was shown as a functional leg with a Michaelis-Menten kinetic behavior, while the T3 leg showed no activity suggesting the need for a different design with increased flexibility. These observations suggested that although functional legs may be tested separately, there is a requirement for implementing leg design on the actual walker to better test overall functionality.

INTRODUCCIÓN

Los recientes avances de la nanotecnología han impactado en varios campos del conocimiento tales como la física, química, biología, medicina y ciencias de los materiales, entre otros. Esto nos ha permitido conocer y describir fenómenos que ocurren en la nano-escala (1×10^{-9} m) hasta llegar a la elaboración de materiales nano-estructurados, nano-dispositivos y nano-sistemas con características únicas y/o mejoradas. Sin embargo, la creación de estos nano-materiales, implica la manipulación de cada bloque de construcción, es decir, ensamblar de forma dirigida y controlada cada componente molecular. Esto ha llevado a una intensa investigación científica-tecnológica en la búsqueda y desarrollo de métodos que permitan hacerlo de manera eficiente y económica.

La mayoría de los nano-dispositivos desarrollados en la actualidad tienen el objetivo de funcionar como biosensores, sistemas de liberación de fármacos y nano-actuadores que puedan desarrollar sus funciones de forma autónoma, dirigida y controlada. No obstante, generar nano-dispositivos con estas características es posible si observamos los múltiples ejemplos existentes dentro de organismos vivos (Sánchez y Puma, 2009). La naturaleza ha seleccionado eficientes biomotores a lo largo de millones de años de evolución. Las células tienen varios ejemplos de nano-dispositivos naturales involucrados en procesos vitales a través de una variedad de eventos de conversión de energía. Tal es el caso de la quinesina, miembro de las proteínas motoras, que se mueve a lo largo de filamentos de microtúbulos aprovechando la energía liberada de la ruptura de la molécula del adenosin trifosfato (ATP). Tales modelos de nano-dispositivos naturales inspiran el desarrollo de máquinas moleculares sintéticas. Estos nano-dispositivos podrían ser programados para señalización molecular, liberación inteligente de drogas o síntesis química programable (Song *et al.*, 2013).

Características de los ácidos nucleicos como material de construcción de nano-dispositivos

Los ácidos nucleicos, como el DNA y el RNA, son polímeros biológicos constituidos de nucleótidos, cada uno de ellos formado de una molécula de azúcar ribosa (en el caso del RNA) o desoxirribosa (en el caso del DNA), una base nitrogenada y un fosfato. Las bases nitrogenadas son clasificadas por su estructura química como pirimidinas y purinas. La unión de varios nucleótidos por enlaces fosfodiéster origina una cadena polinucleotídica que puede tener una longitud de miles de millones de nucleótidos. La secuencia lineal del polinucleótido está dada por el orden consecutivo de las bases nitrogenadas en un arreglo del extremo 5' al 3' y es una característica que distingue a un polímero de otro. Esta secuencia consecutiva de bases en los ácidos nucleicos es denominada estructura primaria.

La estructura primaria dicta la interacción específica de dos cadenas polinucleotídicas antiparalelas para dar origen a la formación de estructuras secundarias de doble cadena estabilizadas mediante apareamientos entre las bases nitrogenadas de cada cadena y el apilamiento en la matriz de la molécula. Estos apareamientos se establecen generalmente entre Adenina y Timina (en el DNA) o Adenina y Uracilo (en el RNA) y entre Guanina y Citosina (en ambas especies moleculares) (Soukup, 2001). De tal manera que se forma una cadena dúplex estableciendo la clásica estructura secundaria de doble hélice descrita inicialmente por Watson y colaboradores en 1953 (Watson J.D. y Crick F.C., 1953).

Por otro lado un polinucleótido de cadena sencilla muestra varios ángulos de torsión a lo largo de su esqueleto de azúcar-fosfato. Estos sitios son puntos que permiten cierto movimiento intrínseco al polinucleótido, es decir, confieren flexibilidad. Debido a esta flexibilidad y a interacciones canónicas entre bases nitrogenadas, un polinucleótido puede plegarse así mismo generando una gama extensa de estructuras secundarias internas. Esta característica es principalmente observada en polinucleótido de cadena sencilla como el ssDNA o el RNA (Chen y Varani, 2010).

Así, tanto la flexibilidad como las reglas de apareamiento de los ácidos nucleicos han sido explotadas en la nano-construcción, ya que es posible sintetizar oligonucleótidos a partir de su secuencia lineal para que se auto-ensamblen en un diseño predeterminado.

La formación de estructuras secundarias en polinucleótidos de cadena sencilla permite originar una jerarquía estructural aún más compleja mediada por interacciones no canónicas (p.e.j. Hoogsteen, Woble) que es la estructura terciaria. Esta jerarquía estructural, principalmente observada en el RNA, le confiere funciones adicionales a las observadas en la estructura secundaria (p.e.j. transporte, catálisis) (Chan y Varani, 2010).

Por lo tanto, debido a su diversidad estructural funcional, el RNA es ubicado como un excelente blanco para el desarrollo de nano-estructuras o nano-dispositivos con una infinidad de aplicaciones prácticas (Guo P, 2010).

Ácidos nucleicos catalíticos

Ribozimas

Las ribozimas son moléculas de RNA que catalizan una reacción de corte o ligación sobre una cadena de RNA blanco. Las ribozimas pueden ser clasificadas en dos principales grupos de acuerdo a su función: ribozimas de escisión (*cleaving-ribozymes*) las cuales incluyen ribozimas auto-escindibles (*self-cleaving ribozymes*) y la ribozima RNasa P (*trans-cleaving ribonuclease P*) y ribozimas de corte y empalme (*splicing ribozymes*), los cuales son largos RNAs involucrados en la escisión de intrones de RNAs mensajeros precursores.

Las ribozimas auto-escindibles a su vez son divididas en subgrupos. Uno de ellos son las ribozimas que se encuentran integradas en RNAs satélites. Este subgrupo está conformado por las ribozimas hammerhead, hairpin, del virus de la hepatitis delta (HDV) y del satélite Varkud. Estas ribozimas están involucradas en el procesamiento del material genómico durante la replicación del RNA que las contiene. Dicho proceso se lleva a cabo mediante el mecanismo del círculo rodante

y requiere la actividad de corte para liberar los genomas virales individuales (Serganov y Patel, 2007).

Las ribozimas más ampliamente estudiadas son la ribozima Hammerhead y la ribozima Hairpin. Estas fueron descubiertas en el RNA satélite del virus de la mancha anular del tabaco (sTRSV) (Burke y Lupták, 2012). Cada una de estas ribozimas adopta una estructura diferente pero realizan la misma reacción de corte y ligación de una cadena de RNA blanco mediante una reacción reversible de transesterificación.

Mecanismo de reacción

La reacción de transesterificación inicia con un ataque nucleofílico realizado por el oxígeno enlazado al carbono 2'. Este oxígeno se enlaza al fósforo, generando un complejo intermediario. Posteriormente, el oxígeno unido al C5' es liberado del complejo como grupo saliente. El resultado final es la generación de un extremo 5'OH y un 2', 3-ciclicil fosfato (Figura 1) (Fedor, 2009).

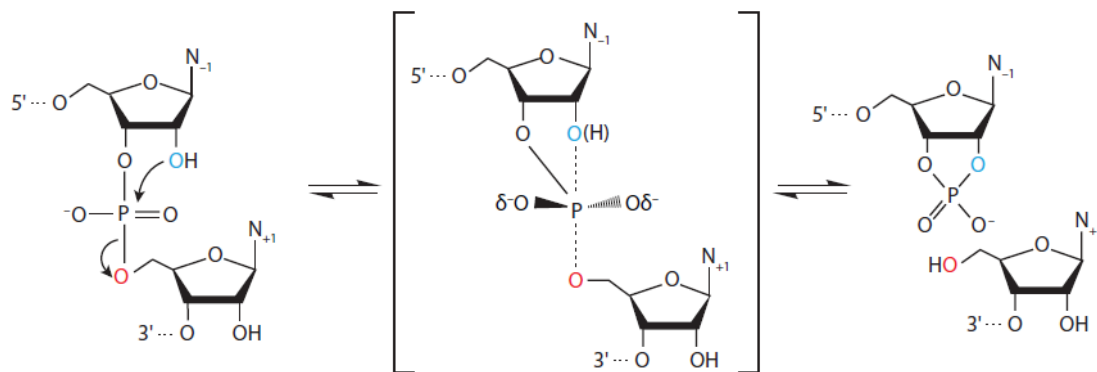


Figura 1. Mecanismo de corte del enlace fosodiéster mediado por ribozimas.

Ribozima hairpin

Función

La ribozima hairpin es naturalmente encontrada en la cadena negativa de los RNAs satélite del sTRSV, del virus del moteado amarillo de la achicoria (sCYMV) y del virus del mosaico de las arabis (sARM). La ribozima hairpin es un elemento *cis*-actuante implicado en el procesamiento del RNA durante la replicación llevada a cabo mediante el mecanismo del círculo rodante. Durante este proceso se generan varias réplicas de RNA anti-sentido (-) unidas una a otra formando concatámeros. Las unidades monoméricas son procesadas por el auto-corte realizado por la ribozima hairpin presente en este mismo RNA. Las unidades monoméricas son posteriormente ligadas por esta ribozima para dar origen a un RNA circular, que servirá como molde en la generación del RNA sentido (+) (Figura 2) (Xu y Roossinck, 2011).

Estructura

La ribozima hairpin comprende dos bucles (*loops*) internos, A y B, que están presentes en los brazos adyacentes de una unión ramificada de cuatro cadenas (*four-way-junction*) (Figura 3b). La asociación íntima de estos *loops* (proceso llamado acoplamiento) es estabilizada por iones metálicos divalentes y genera el ambiente local necesario para la catálisis. Una versión mínima de la ribozima hairpin en la cual la estructura *four-way-junction* es remplazada por un enlace fosfodiéster es igualmente activa (Figura 3a), pero esta forma requiere 1000 veces más la concentración iones Mg^{2+} para inducir el plegamiento. Los análisis de rayos X han jugado el papel principal para la determinación de la estructura de la ribozima hairpin (Figura 3c). (Wilson *et al.*, 2007).

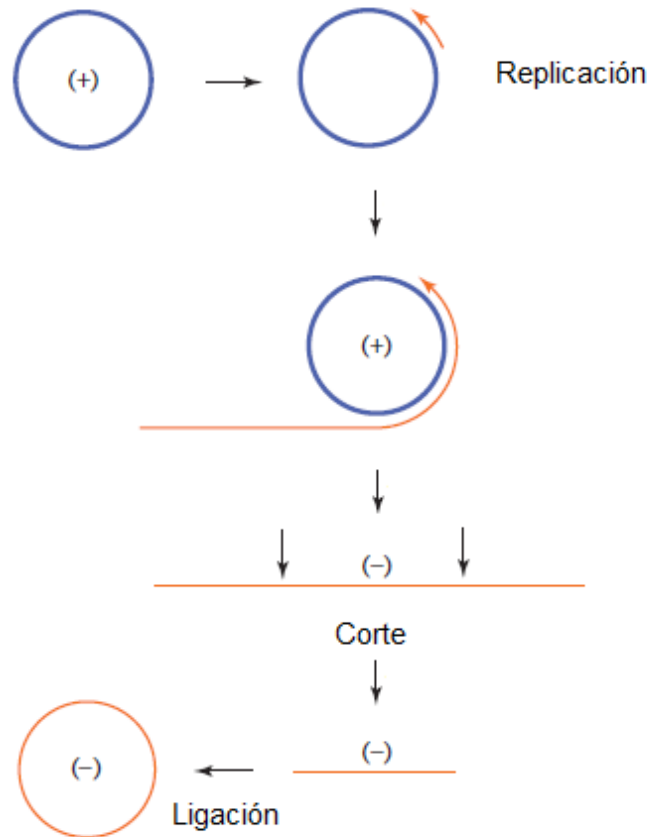


Figura 2. Replicación y procesamiento del RNA satélite del virus de la mancha anular del tabaco (sTRSV). El RNA genómico de cadena sencilla (+) (círculo azul) es replicado mediante la RNA polimerasa del hospedero, la cual sintetiza RNA progresivamente, generando un concatámero lineal. La copia multimérica es cortada después en fragmentos monoméricos, los cuales son circularizados generándose así un molde anti-sentido (-) (círculo naranja) para la síntesis de una nueva cadena sentido (+). Las reacciones de corte y ligación en la cadena anti-sentido son llevadas a cabo por la ribozima hairpin (Ferré y Scott, 2010).

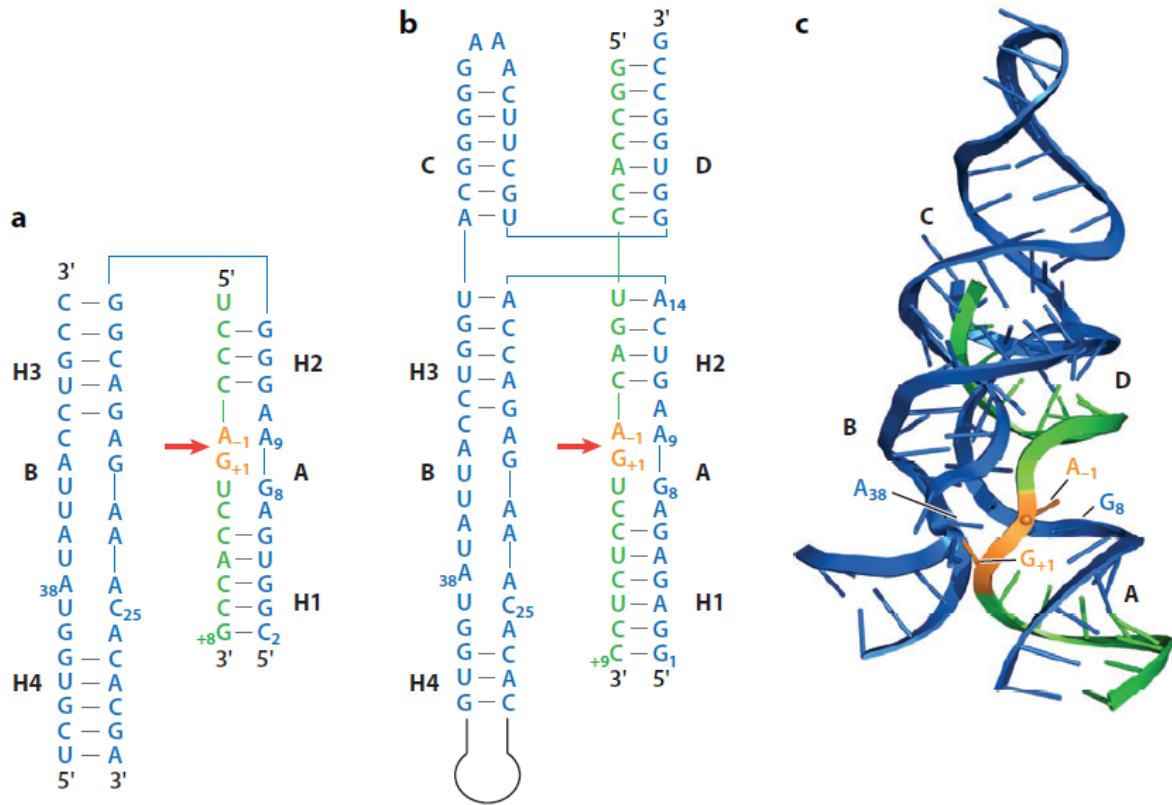


Figura 3. Estructura de la ribozima hairpin. a) Secuencia y estructura secundaria de la ribozima hairpin mínima optimizada para cristalización. Los *loops* esenciales A y B están unidos mediante un puente triple de etilen glicol en lugar del nucleótido A₁₄. b) Secuencia y estructura secundaria de la ribozima hairpin *four-way junction* optimizada para cristalización. Esta ribozima contiene dos hélices, C y D, adicionales a las esenciales A y B. c) Arquitectura global de la estructura terciaria de la ribozima hairpin en el estado de transición (Fedor M., 2009).

Acoplamiento

En un estudio hecho por Walter y colaboradores en 1998, se utilizó el método de FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) para elucidar los cambios estructurales que lleva a cabo la ribozima hairpin con su sustrato. Los resultados obtenidos demostraron que la transición del complejo ribozima-sustrato de una forma abierta a una acoplada es un paso requerido precedente al corte y ligación del sustrato y que el plegamiento molecular es limitante en la velocidad para formación del producto. Así, se llegó al siguiente modelo: una interacción inicial

ocurre entre sustrato y ribozima en la conformación no acoplada o abierta, en la cual el complejo forma una configuración extendida caracterizada por un apilamiento coaxial de las hélices 2 y 3. Después de la unión del sustrato, la flexibilidad dinámica sobre la bisagra entre las hélices 2 y 3 es utilizada para explorar posibles modos de contactos entre los *loops* internos A y B de los dos dominios llevando finalmente a un acoplamiento metaestable (estado de transición débilmente estable) y reversible de los dos dominios en una conformación cerrada, la cual es un intermediario esencial en el plegamiento que da origen a la catálisis. El proceso reversible de corte es seguido por la disociación del producto y el desacoplamiento (Figura 4) (Walter *et al.*, 1998).

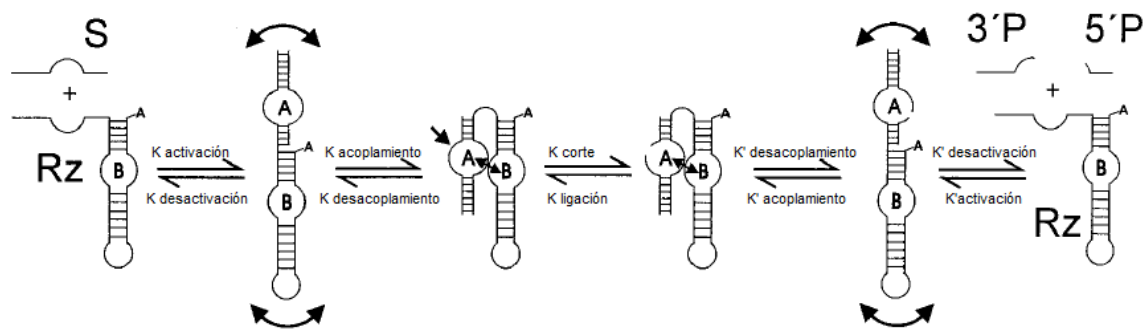


Figura 4. Representación esquemática del mecanismo mínimo para la catálisis de la ribozima hairpin. Sustrato en configuración *trans* (S) se une a la ribozima en una conformación extendida. Este conformero estructural es suficientemente flexible para plegarse (flechas curvadas) en una estructura acoplada, permitiendo a los *loops* A y B interactuar. Después, el corte en el sitio específico ocurre (flecha corta), el complejo se despliega en un complejo abierto y los productos de corte 5' y 3' se disocian. Todos los pasos son totalmente reversibles y pueden ser caracterizados por sus constantes de velocidad como es indicado (Walter *et al.*, 1998).

Mecanismo

Rupert y colaboradores en 2002 realizaron un estudio donde generaron una ribozima hairpin carente el fosfato escindible sustituyéndolo por vanadato con el objetivo mimetizar el estado de transición del fósforo penta-coordinado durante la

reacción. Las estructuras analizadas muestran que las posiciones G₈ A₉ y A₃₈ participan en la estabilización del estado de transición mediante el establecimiento de puentes de hidrógeno que son más que los realizados con los precursores o productos de la reacción (Rupert *et al.*, 2002). Dicho mecanismo se explica con mayor detalle en la figura 5.

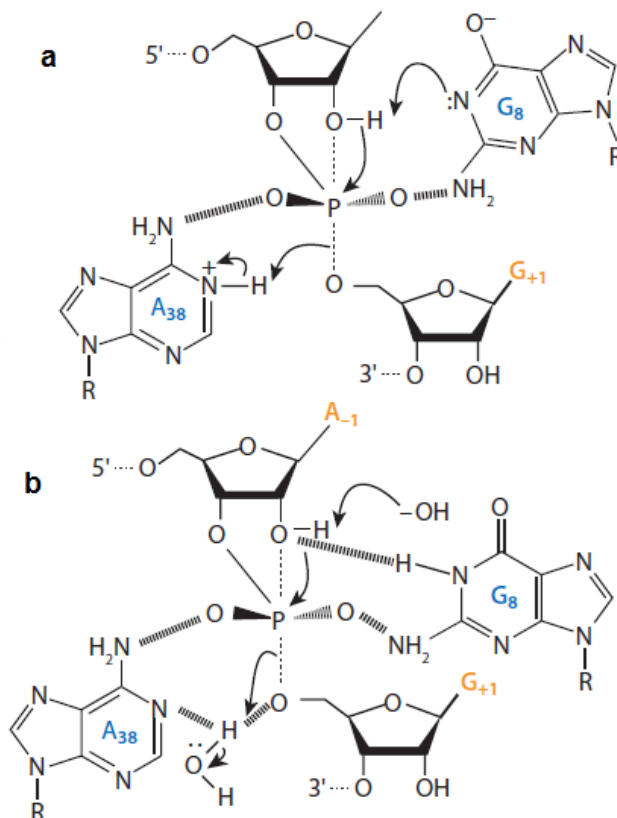


Figura 5. Mecanismo de estabilización del estado transitorio durante la reacción de corte de la ribozima hairpin. a) Mecanismo hipotético en el cual G₈ y A₃₈ actúan como catalizadores ácido-base, con el N1 de la posición G₈ retirando un protón del grupo hidroxilo 2' y con el N1 de la posición A₃₈ donando un protón al oxianión 5' del grupo saliente durante el corte. b) Mecanismo hipotético en el cual la formación de puentes de hidrógeno con los grupos amida de A₃₈ y G₈ contribuyen a posicionamiento y orientación y proveen una estabilización electrostática para la transición del estado penta-covalente, y en el cual la transferencia de protones ocurre a través de catálisis ácido-base (Fedor, 2009).

La ribozima hairpin se ensambla de secuencias en la cadena sencilla de RNA de sTRSV *in vivo*, pero cadenas de RNA pueden asociarse a través de apareamiento de hélices de manera intermolecular para formar complejos funcionales (Figura 6). En la configuración que es más comúnmente usada para estudios de enzimología, las secuencias no esenciales son simplemente eliminadas dejando a la ribozima y el sustrato asociarse a través la formación de las hélices H1 y H2. En esta configuración, alteraciones en las secuencias de H1 y H2 permiten a la ribozima hairpin reconocer una variedad de blancos de mRNAs y RNAs genómicos virales (Fedor, 2000).

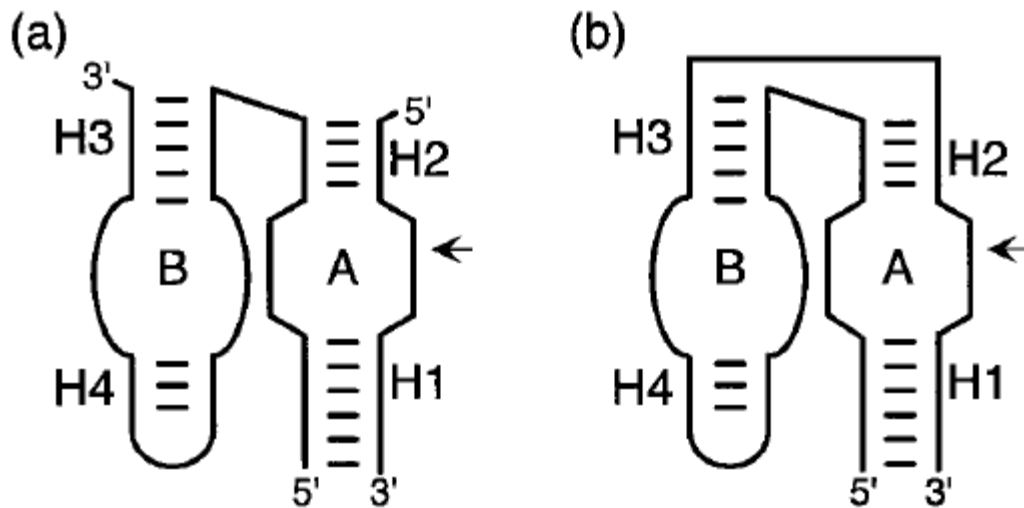


Figura 6. Configuración intermolecular e intramolecular de la ribozima hairpin. a) El sustrato de RNA se asocia con la ribozima hairpin a través de complementariedad de bases en las hélices 1 y 2. El corte genera un extremo producto 5' que se asocia con la ribozima a través de H2 y un producto 3' que se asocia con la hélice 1. b) El auto-corte genera un extremo 5' en la ribozima y un extremo 3' en el producto. El producto 3' de auto-corte se asocia con la ribozima a través de apareamiento de bases intermolecular en la hélice 1 (Fedor, 2000).

DNAzimas

Las DNAzimas son moléculas de ssDNA que tienen la capacidad de catalizar una reacción química. Hasta el momento estas moléculas se limitan a ser producidas en el laboratorio. La primera DNAzima aislada tiene la capacidad de cortar RNA en forma dependiente de iones. Hasta la fecha, se han desarrollado varias secuencias que pueden catalizar el corte y ligación de DNA, tener actividad de peroxidasa, realizar fotoreversión de dímeros de timina y cortar RNA, entre otros (Silverman, 2004).

Dentro de estas DNAzimas destacan las denominadas 8-17 y 10-23 las cuales fueron obtenidas mediante selección *in vitro* por Santoro y Joyce en 1997. Para esto, se llevaron a cabo la búsqueda de secuencias catalíticas de DNA de cadena sencilla bajo 5 criterios establecidos: 1) Habilidad de corte con recambio múltiple bajo condiciones fisiológicas. 2) Capacidad de reconocimiento del sustrato de RNA a través de apareamientos canónicos. 3) Habilidad para ser modificada en sus dominios de reconocimiento y poder dirigirla a otros sustratos de RNA. 4) Actividad catalítica comparable o mayor a la de las ribozimas conocidas y 5) composición total de no más de 50 nucleótidos. Después de un proceso de selección-amplificación *in vitro* fueron obtenidas. Ambas DNAzimas pueden ser modificadas en sus dominios de reconocimiento de blanco sin perder su actividad catalítica (Figura 7) (Santoro y Joyce, 1997).

El desarrollo de DNAzimas que corten RNA ha tenido una gran aplicación en el desarrollo de terapia génica y, recientemente, desarrollo de nano-dispositivos.

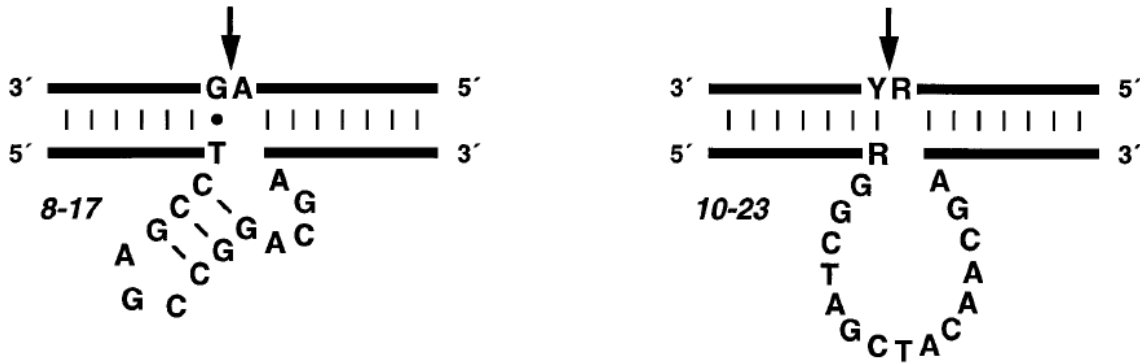


Figura 7. Composición de los núcleos catalíticos de las DNazimas 8-17 y 10-23. La DNazima se une al sustrato de RNA a través de apareamientos canónicos. El corte ocurre en la posición indicada por la flecha. R=A o G. Y=U o C (Santoro y Joyce, 1997).

Nano-dispositivos de ácidos nucleicos

Los prototipos de nano-dispositivos desarrollados con ácidos nucleicos son clasificados como no autónomos y autónomos. Los no autónomos basan su locomoción mediante hibridación, estos nano-dispositivos requieren de la adición de ácidos nucleicos como fuente de energía para moverse, es decir requiere la manipulación externa de un operador.

Los nano-dispositivos autónomos se basan en el uso de ATP o ácidos nucleicos catalíticos para su locomoción. La ventaja de estos dispositivos es que no requieren un operador. Estos pueden funcionar bajo el esquema de un camino programado haciendo homología a un robot seguidor de línea. A continuación se describen algunos ejemplos.

Nano-dispositivos no autónomos

Shin y Pierce en 2004 desarrollaron un caminante molecular basado en hibridación. El sistema tiene cuatro componentes: 1) un caminante, 2) un camino, 3) cadenas “combustible” de anclaje y 4) cadenas “combustible” de separación. El caminante molecular consiste de dos cadenas de DNA parcialmente complementarias, con una hélice de 20 pares de bases como “cuerpo” y dos cadenas sencillas como

“extremidades” de 23 bases cada una. El camino, construido con seis oligonucleótidos, tiene cuatro ramificaciones protuberantes de cadena sencilla, de 20 bases cada una, separadas por 15 pares de bases de la hélice del andamio entre una y otra. Como se ilustra en la figura 8, el caminante avanza sobre el camino bajo control externo por la adición de las cadenas A y D. Una cadena A específicamente ancla el caminante a una ramificación por formación de hélices con la correspondiente extremidad y la ramificación. Posteriormente, el proceso es repetido para la otra extremidad. Cuando las dos extremidades están unidas al camino, la extremidad que va a avanzar es liberada por una cadena D que hibrida perfectamente con la cadena A. Esto ocurre reacción mediante el desplazamiento de la cadena A del anclaje, produciendo un dúplex residuo y la extremidad del caminante liberada para dar el siguiente paso (Shin y Pierce, 2004).

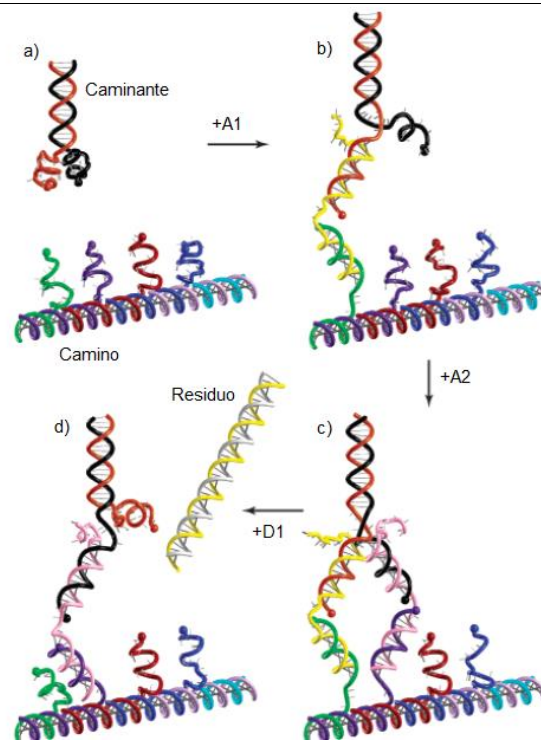


Figura 8. Esquema de locomoción del caminante. Los diagramas describen a) caminante libre, b) caminante anclado a la ramificación 1, c) caminante anclado a las ramificaciones 1 y 2, y d) caminante liberado de la ramificación 1 mediante la generación de un dúplex residuo (Shin y Pierce, 2004).

Nano-dispositivos autónomos

Lund y colaboradores en 2010 desarrollaron un caminante molecular basado en la DNAzima 8-17. Se trata de un caminante molecular con un cuerpo que hace semejanza al de una araña. Comprende una molécula de estreptavidina como un cuerpo inerte y tres extremidades catalíticas. Las extremidades son adaptadas a partir de la DNAzima 8-17 que corta sustratos oligodesoxinucleótidos pero con un solo nucleótido que contiene una ribosa en el sitio de corte, generando dos productos que tienen una menor afinidad por la DNAzima. La diferencia de afinidades del sustrato y los productos asegura que las interacciones de las extremidades del caminante sobre una lámina de sustratos inmovilizados y avance en dirección hacia donde estén los sustrato no cortados. Esto permite el diseño de rutas programadas, donde se traza el camino mediante un patrón establecido por los sustratos anclados y el caminante tenderá a seguir esta ruta. El camino y la lámina en la que está construido es generado por DNA origami (plegamiento de moléculas de DNA de forma dirigida para formar estructuras bidimensionales o tridimensionales en la nano-escala). El caminante es capturado al inicio del camino mediante su extremidad de captura. Para dar la orden de “comenzar” se adiciona un cadena sencilla de DNA que funciona como un “disparador”, la cual libera al caminante por desplazamiento al hibridarse con la misma cadena que lo retenía. Posteriormente, el caminante se ancla a los primeros sustratos del camino por cercanía y sus extremidades se hibridan con el sustrato. Lo que posteriormente corta y avanza, cuando hace este procedimiento de forma progresiva está realizando la acción de “avanzar”. La trayectoria determinada contiene vueltas o giros. En el momento en el que el caminante los encuentra realiza la acción “girar” ya que obedece al diseño de la trayectoria. Finalmente, el caminante se detiene cuando encuentra la indicación “parar” al encontrar un sustrato que no es escindible y detiene su movimiento. (Figura 9) (Lund *et al.*, 2010).

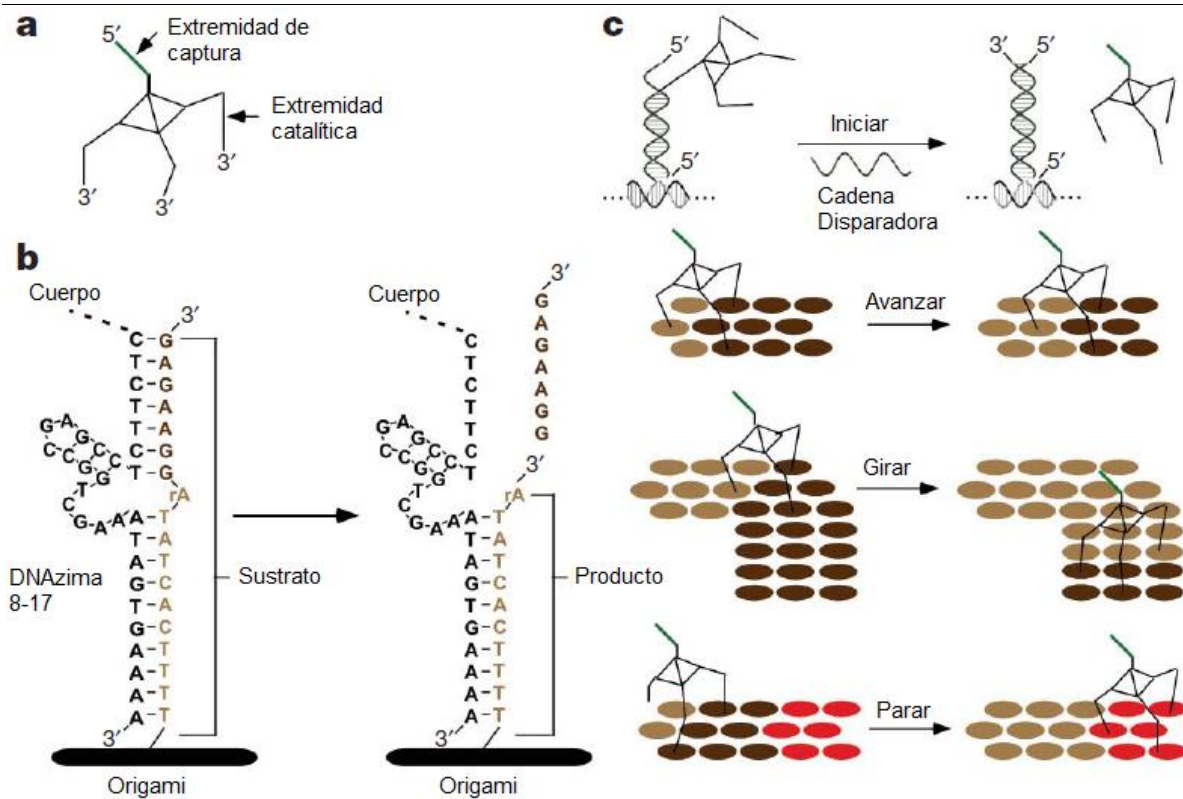


Figura 9. Caminante molecular basado en la DNAzima 8-17 guiado por un camino programado. a) El nanorobot consiste de un núcleo de estreptavidina con una cadena sencilla de DNA de 20 bases que lo posiciona al inicio y tres extremidades de desoxirribosima. b) La DNAzima 8-17 corta su sustrato en un ribonucleótido, creando dos productos más cortos (7 y 11 bases de longitud respectivamente). La disociación de estos productos permite a las extremidades asociarse con el siguiente sustrato. c) Después de la liberación por una cadena disparadora de DNA de 27 bases, el nanorobot sigue el camino de sustrato, gira y continúa a un sitio de paro (rojo) (Lund *et al.*, 2010).

Un modelo más, el cual es relevante debido a que tiene una aplicación de transporte fue desarrollado en 2013 por Cha y colaboradores quienes diseñaron un caminante molecular que transporta nano-partículas a lo largo de un nanotubo de carbono. Los Nano-cristales de Sulfuro de Cadmio (CdS) y nanotubos de carbono fueron utilizados en un sistema modelo de transporte de la carga sobre un camino unidimensional. Una DNAzima es acoplada a un nano-cristal de CdS y se aparea con un sustrato de RNA anclado a un nanotubo de carbono por adsorción. El caminante está basado en la DNAzima 10-23, la cual tiene dos brazos de

reconocimiento y un núcleo catalítico. Este DNAzima corta el enlace fosfato-diéster entre los nucleótidos que contienen las bases A y U de la cadena “combustible” de RNA en la presencia de iones de Mg^{2+} . El mecanismo de locomoción se describe a continuación.

Inicialmente los dos brazos de la DNAzima (E) se asocian con una molécula de RNA (S1) en el nanotubo, el cual es inmovilizado en una película de agarosa (i). El corte de S1 de la DNAzima es asistido por iones Mg^{2+} y resulta en la generación de dos fragmentos como productos (ii): un fragmento de 13 bases (P1) y otro de 28 bases (P2). Esta reacción de corte domina sobre la ligación, ya que la velocidad de reacción de corte k_{cat} es tres veces mayor que la velocidad de ligación k_{lig} . Después P1 se disocia de E en una velocidad k_D y difunde (iii). El brazo libre de la DNAzima “busca” y se une a la adyacente molécula de RNA (S2) en el nanotubo con velocidades de k_H (hibridación) y K_H (disociación) (iv). La formación del dúplex corto es seguida por un reemplazamiento de cadena a través de la migración de DNAzima a una velocidad k_M , pasando a un estado termodinámicamente más estable (v). LA DNAzima se mueve de una cadena de RNA a la siguiente completando un recambio simple. Operaciones repetidas de la DNAzima crean una marcha progresiva a lo largo del nanotubo sin intervención alguna (Figura 10) (Cha *et al.*, 2013).

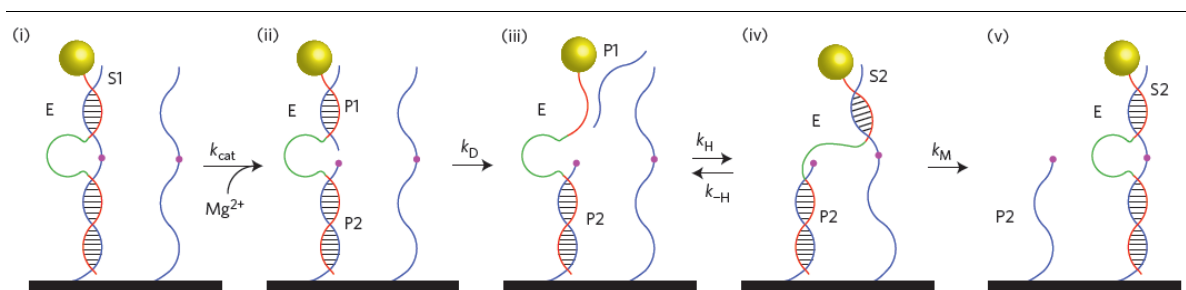


Figura 10. Principio de locomoción del motor basado en la DNAzima 10-23. Después de la asociación con un sustrato de RNA (S1), la DNAzima E corta en el sitio rosa de S1 en presencia de Mg^{2+} , produciendo los fragmentos P1 corto y P2 largo. P1 se disocia de E, y el brazo de reconocimiento desapareado de E se asocia con un sustrato de RNA adyacente (S2) en el camino. El

resto de E migra de S1 a S2, completando un recambio simple. Por repetición del proceso, el motor molecular se mueve a lo largo del nanotubo (Cha *et al.*, 2013).

ANTECEDENTES

Ribozima R434

En los últimos 20 años se han desarrollado varios diseños de ribozimas basadas en la estructura de la ribozima hairpin con enfoque a la terapia anti-sentido. Esto consiste en generar RNA catalíticos dirigidos contra un mRNA blanco. Así, estas ribozimas tiene la capacidad de unirse a su blanco, cortarlo y liberarse de los productos para cortar otro mRNA sustrato inhibiendo la expresión de genes. Siguiendo con este principio, Alvarez-Salas y colaboradores diseñaron y optimizaron una ribozima denominada R434 (Patente US 5,683,902), basada en la estructura mínima de la ribozima hairpin (Figura 11), con el objetivo de dirigirla contra el RNA mensajero de E6 de HPV-16. Inicialmente propusieron varias secuencias blanco en las cuales cumplieran con la condición de tener la secuencia 5'-GUC-3' necesaria para la formación del *loop* A (necesario para el corte) en el dominio de reconocimiento. La secuencia óptima como blanco de corte fue la que rodeaba al nucleótido 434 del mensajero (de ahí deriva el nombre esta ribozima). Posteriormente la actividad de la ribozima R434 fue evaluada *in vitro* donde demostró la capacidad de inhibir la traducción de E6/E7. Un ensayo *in vivo* en el cual se usaron queratinocitos humanos los cuales fueron transfectados con E6/E7 y la ribozima R434, se demostró que la ribozima tenía la capacidad de inhibir la expresión de E6/E7 lo que resultó finalmente en la inhibición de la inmortalización de estas células (Alvarez-Salas, 1998).

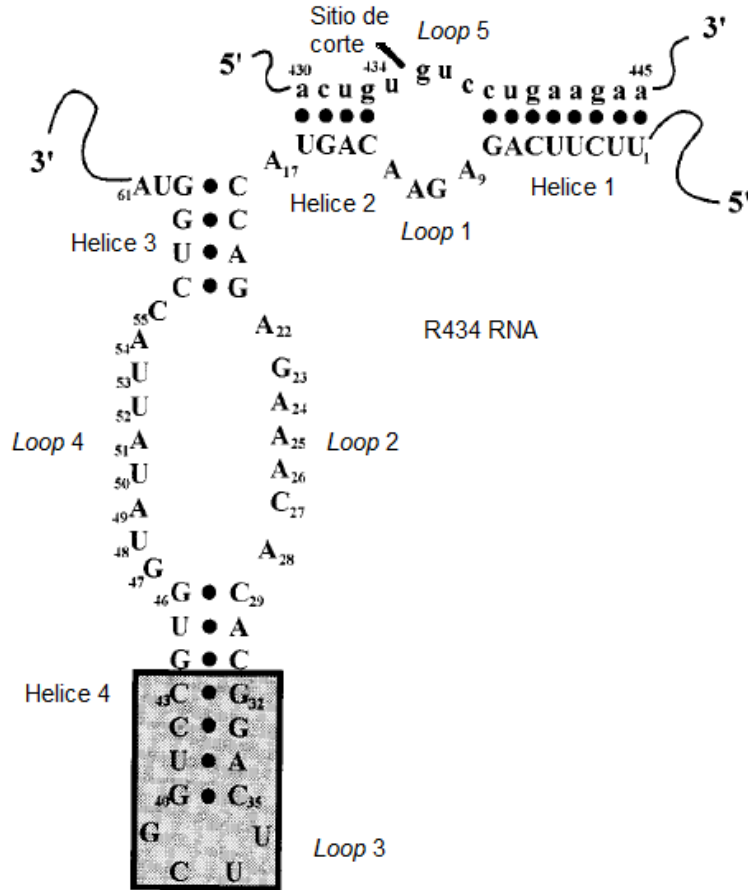


Figura 11. Estructura secundaria de la ribozima R434 con su sustrato. El modelo contiene las cuatro hélices estándar y cinco *loops* nombrados como originalmente se describieron para la ribozima hairpin de -sTRSV. El sustrato HPSE62 para el gen E6 HPV-16 es indicado en letras minúsculas (a₄₃₀-a₄₄₅). La caja sombreada contiene las modificaciones de la hélice 4. Puntos en negro indican apareamientos de bases Watson-Crick (Alvarez-Salas *et al.*, 1998).

Ribozima tríplex

Dando continuidad al trabajo desarrollado con la ribozima R434, se decidió adaptarla a un sistema de expresión múltiple o en tándem, pero trabajos anteriores reportaron una eficiencia similar a los sistemas que expresaban a una sola ribozima (Aquino-Jarquín, Tesis de doctorado, 2008). Por lo tanto, se decidió adaptar la ribozima R434 a un sistema *shotgun*, el cual consiste en un modelo de ribozima tríplex. Una ribozima tríplex tiene dos sitios de corte *cis* que le permiten auto-

escindirse del mensajero que lo contiene y un sitio de corte *trans* que le permite cortar el blanco para el cual está dirigido. Aquino-Jarquin y colaboradores en 2008 desarrollaron con éxito una ribozima tríplex basada en la ribozima 434. Posteriormente, la ribozima tríplex fue probada *in vivo* en la línea celular SiHa, donde demostró auto-escindirse del mensajero y cortar el RNA blanco en condiciones intracelulares, resultando en una mejora significativa de su actividad en comparación a la R434 convencional. (Figura 12) (Aquino-Jarquin *et al.*, 2008) (Aplicación de patente US 2005/0260163).

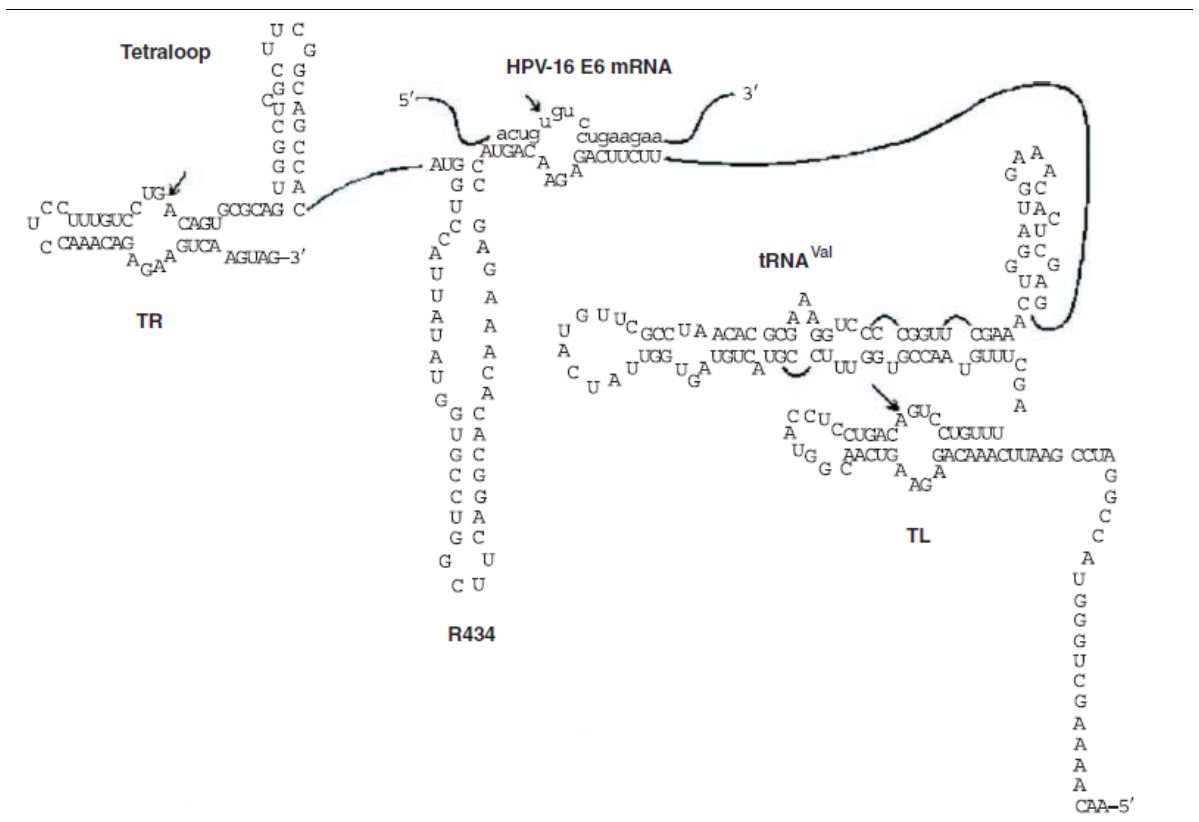


Figura 12. Diseño de la ribozima Rz434bis (Ribozima tríplex) dirigida contra el RNA mensajero E6/E7 de HPV-16. Representación de la estructura secundaria del transcrito total del sistema tríplex de una ribozima, mostrando la ribozima R434 *trans*-actuante, un t-RNA^{val} mutante, un tetraloop y los dominios TR y TL. Las flechas indican sitios de corte de la ribozima. La secuencia blanco de HPV-16 es mostrada para referencia (Aquino-Jarquin *et al.*, 2008).

Nanorobot basado en la ribozima tríplex

El hecho de que la ribozima tríplex tenga la capacidad de cortar en ambos lados sin importar la ubicación del sitio de corte, es decir en el extremo 5' como en el 3' y conociendo el mecanismo de acoplamiento para el corte del sustrato, surgió la idea de generar un nanorobot con dos extremidades catalíticas y aprovechar el mecanismo de acoplamiento como principio mecánico de locomoción.

La ribozima tríplex fue modificada, eliminando los elementos de protección contra degradación intracelular ya que resultan innecesarios para el movimiento y actividad catalítica y se modificaron los sitios de corte. Así, finalmente se llegó al diseño de un nanorobot con dos extremidades llamadas T3 y T5 flanqueando a un *loop* catalítico para demostrar la factibilidad del uso del diseño tríplex para generar un caminante molecular (Figura 13). El mecanismo hipotético de desplazamiento es mostrado en la figura 18.

Antes de construir y probar el nanorobot completo, se evaluó cada extremidad de forma independiente (Figura 14a y 15a). Se observó que la extremidad T5 presentaba corte pero conforme se aumentaba la concentración de sustrato está se veía inhibida por el producto. Para tal cinética, fue establecida una ecuación que describe el comportamiento de la curva (Figura 14b). Mediante el análisis de hibridación entre el dominio de reconocimiento de la extremidad y el producto, se observó que cerca 15 bases se aparean con la extremidad dificultando su liberación.

Por otro lado T3 no mostró actividad catalítica. Lo que llevo a dos nuevos diseños de la extremidad mediante la adición de 5 y 10 nucleótidos. La extremidad modificada por la adición de 10 nucleótidos ya fue capaz de realizar la catálisis, pero con muy poca actividad (Figura 15b). El análisis de hibridación de la extremidad con el producto mostró que este último se apareaba con una porción transcrita que no pertenece al diseño de la extremidad (Romero-Hernández, Tesis de maestría, 2011).

Por lo tanto, ambas extremidades requieren modificaciones en el dominio de reconocimiento del blanco que permitan una optimización de su catálisis.

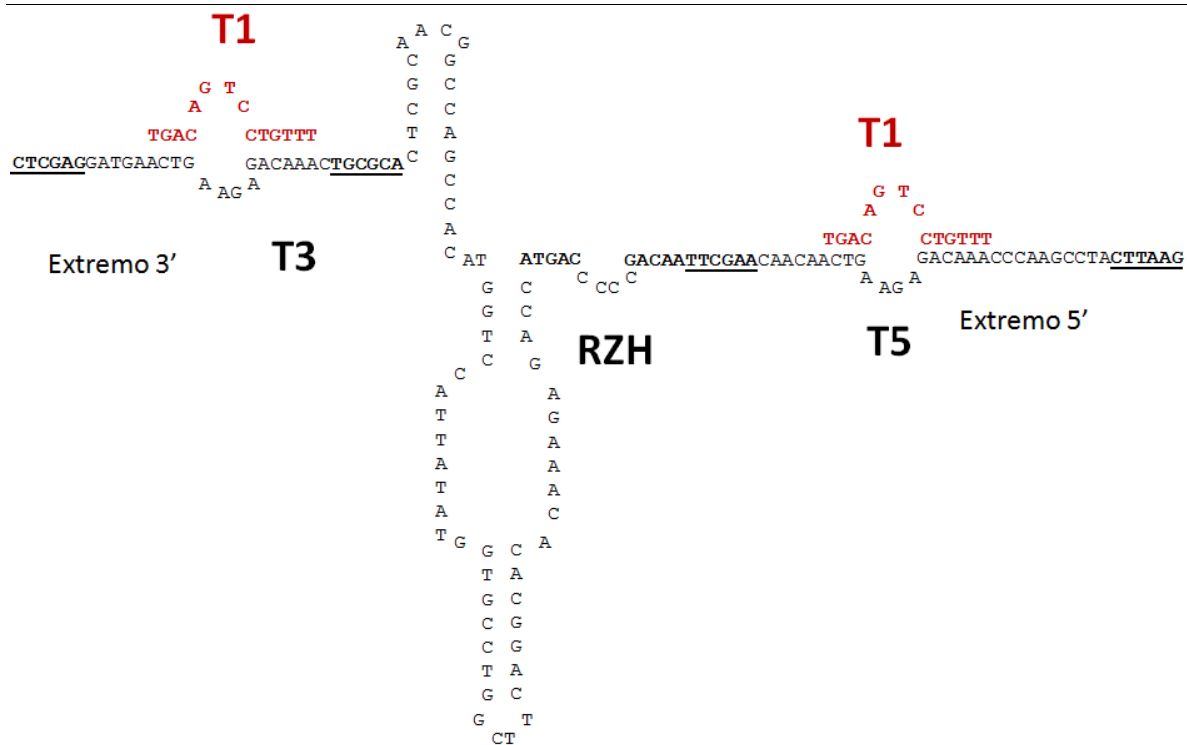
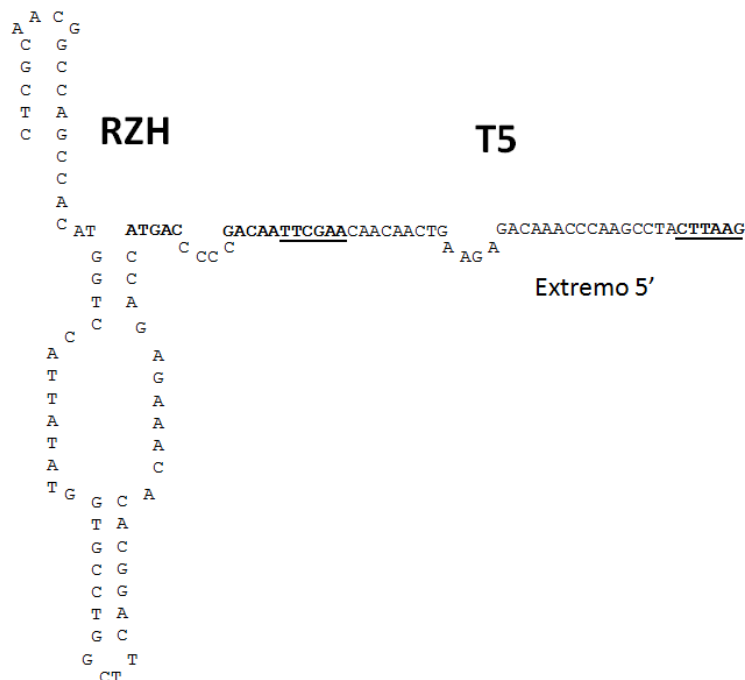


Figura 13. Diseño del caminante con su blanco. Se muestra la representación esquemática de los módulos que componen a la ribozima, denominados T3 y T5 para los dominios de reconocimiento con corte en *trans*, y RZH para el dominio catalítico. Adicionalmente se muestra la representación esquemática del blanco en color rojo, el cual se hibrida parcialmente con cada extremidad del caminante y permite la formación del loop necesario para el corte (Romero-Hernández, Tesis de maestría, 2011).

a)



b)

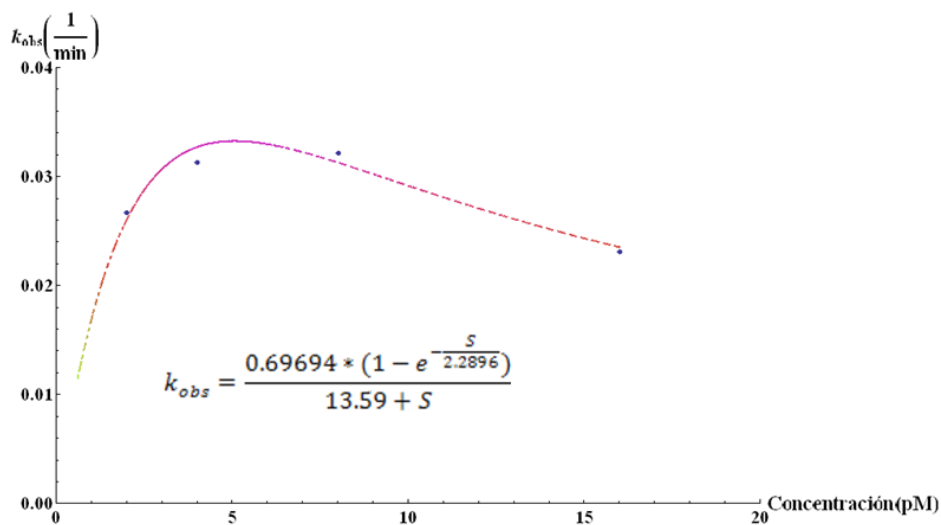
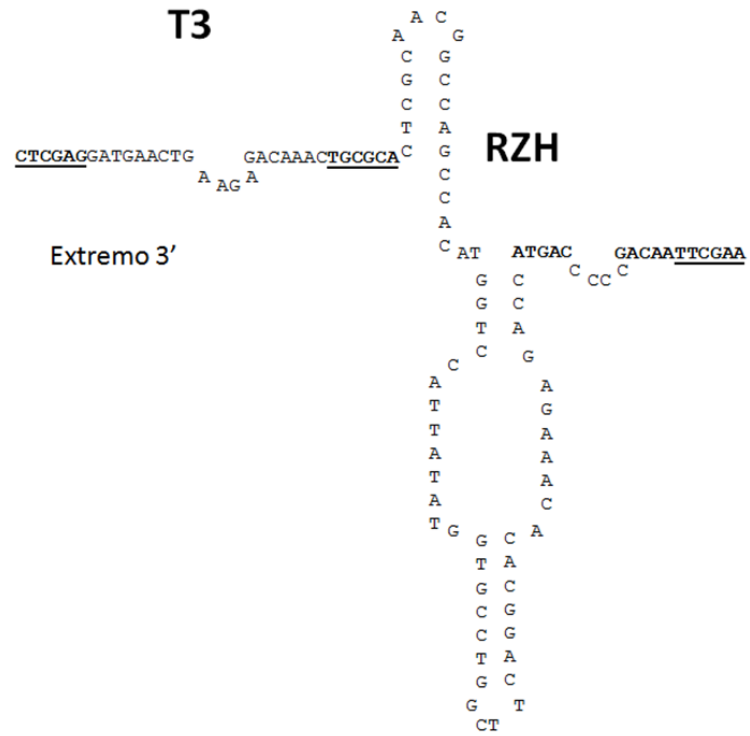
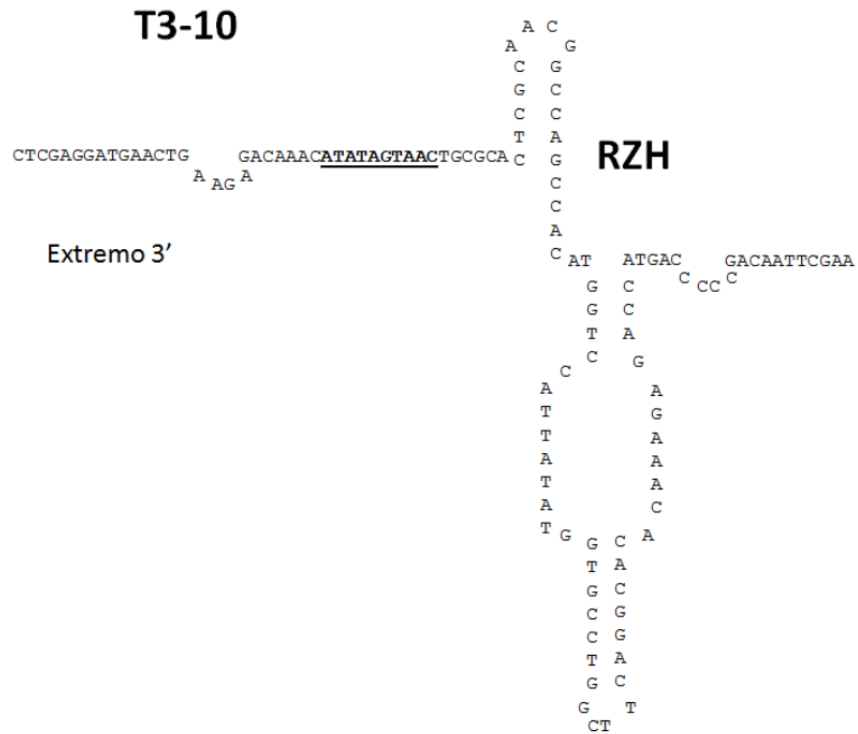


Figura 14. Evaluación de la actividad catalítica de la extremidad T5. a) Secuencia y estructura de la extremidad T5. Se muestra el fragmento RZH y T5 conformando la unidad catalítica. b) Modelo de cinética en base a la constante de velocidad contra concentración. Se muestran los valores de las constantes de velocidad observadas (k_{obs}) a cada concentración en color azul, y en colores el modelo propuesto modificado con la ecuación y los valores ajustados a dicha ecuación $V_{max}= 0.69694 \text{ min}^{-1}$, $K_m=13.59 \text{ pM}$ y $K_i= 2.2896 \text{ pM}$ con una $r^2=0.9361$ (Romero-Hernández, Tesis de maestría, 2011).

A)



B)



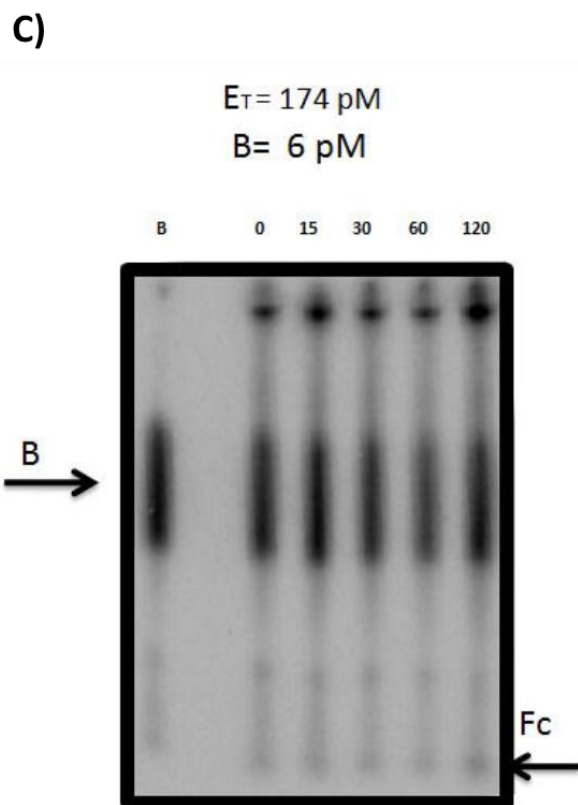


Figura 15. Evaluación de la actividad catalítica de la extremidad T3. A) Estructura y secuencia de la extremidad catalítica T3. Se muestra el fragmento RZH y el dominio de reconocimiento 3' conformando la extremidad catalítica. **B)** Izquierda. Estructura y secuencia de la extremidad T3-10. **C)** Evaluación de la actividad catalítica de la extremidad T3-10. Ensayo de catálisis para la extremidad T3-10 no radiomarcada. Se muestra un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 6% que tiene el ensayo de catálisis para el caminante T3 no radio-marcados y blanco radio-marcado a diferentes tiempos y un control denominado B donde solo se presenta el blanco de la ribozima; se señala mediante flechas el blanco (B), y el fragmento cortado de 10 bases (Fc). Se tiene un recambio sencillo con una concentración de blanco de 6 pM y de ribozima de 174 pM (Romero-Hernández, Tesis de maestría, 2011).

Mecanismo de desplazamiento del nanorobot en un camino programado de DNA.

Se plantea que ambas extremidades T5 y T3 sean más afines a sus primeros dos sustratos S5₁ y S3₁ que a los inhibidores I5 e I3 con los que están acoplados para desplazarlos. A su vez la afinidad de las extremidades a los sustratos S5₂ y S3₂ es menor que su afinidad a los inhibidores, por lo tanto, sólo los primeros sustratos podrán desplazar a los inhibidores y así asegurar que el nanorobot empiece a “caminar” desde el inicio. Por otro lado los parámetros cinéticos EC y k_{cat} de T5 deben de ser mayores a T3, es decir la catálisis de T5 debe de ser más rápida para asegurar que el nanorobot empiece por el sustrato S5₁ lo que contribuirá la dirección del desplazamiento de izquierda a derecha. B) El desplazamiento sigue la numeración, las flechas azules indican reacciones en equilibrio. 1) El nanorobot mediante su extremidad T5 se une al sustrato S5₁ e I5 es desplazado. 2) El nanorobot realiza un acoplamiento para poner en contacto los *loops* catalíticos y de reconocimiento. 3) La extremidad T3 se une al sustrato S3₁ e I3 es desplazado. 4) El sustrato S5₁ es cortado en dos productos P5_a y P5_b. 5) La extremidad T5 es liberada.

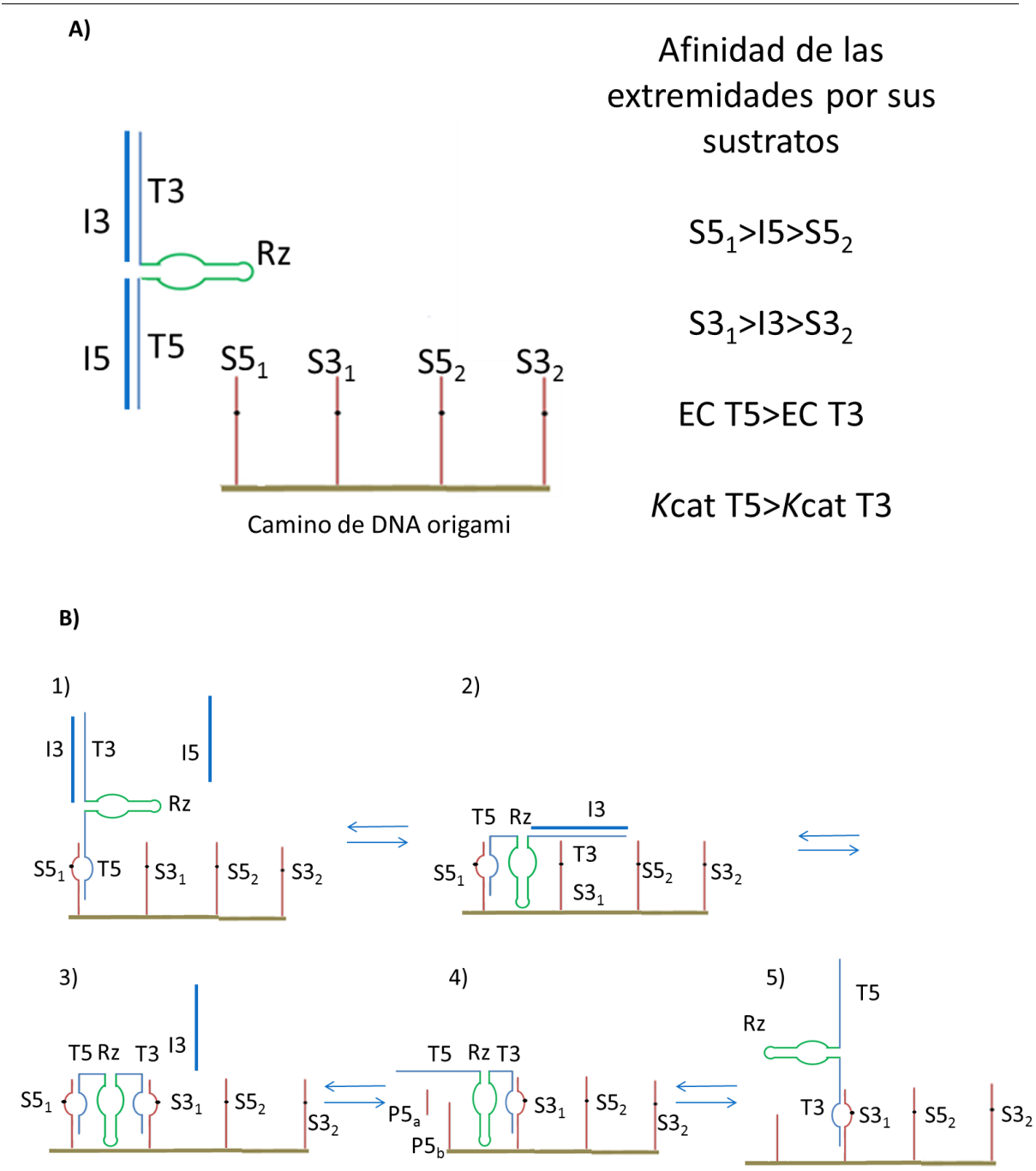


Figura 16. Modelo hipotético del desplazamiento del nanorobot sobre un camino programado. A) Diseño del desplazamiento del nanorobot. Se muestra al nanorobot molecular basado en la ribozima tríplex. Las extremidades de reconocimientos T3 y T5 son indicadas en azul acopladas a inhibidores de cadena sencilla. El dominio catalítico Rz es indicado en verde. Los sustratos S5₁, S5₂, S3₁ y S3₂ son indicados en rojo. Los sitios de corte en los sustratos son indicados en negro en los sustratos. El camino de DNA es indicado en café.

JUSTIFICACIÓN

La construcción de nano-dispositivos que puedan tener un movimiento autónomo y programable es uno de los grandes retos de la nanotecnología. Estos dispositivos podrían ser utilizados, por ejemplo, en líneas de transporte y ensamble de nano-estructuras, optimizando así la producción y disminuyendo la heterogeneidad de los productos.

Los ácidos nucleicos han mostrado ser un excelente material de nano-construcción ya que, por si mismos, son moléculas programables las cuales pueden ser útiles para el ensamble de nano-estructuras.

Existe una gran variedad de nano-dispositivos contruidos con ácidos nucleicos con la capacidad de desarrollar tareas programadas y de forma autónoma, pero este campo aún puede ser más ampliado al proporcionar prototipos que muestren un mayor simplicidad en su diseño y que puedan desarrollar tareas igual de complejas o incluso más. Los nano-dispositivos reportados están contruidos principalmente de DNA, a pesar de ser una excelente molécula para formar estructuras estables y prediseñadas, muestra bastantes limitaciones con respecto a otro ácido nucleico, el RNA, el cual muestra una mayor diversidad de estructuras y por lo tanto de funciones que, sin duda, podrán optimizar el desarrollo de nano-máquinas que realicen tareas complejas.

Nuestro grupo de trabajo está interesado en desarrollar un nanorobot, cuyo diseño está basado en la ribozima tríplex. Se requiere saber si este diseño tiene la capacidad de poder caminar sobre un camino programado y darle alguna aplicación a largo plazo. Para esto, primero debe de realizarse la evaluación y caracterización de los componentes del diseño así como del diseño completo.

HIPÓTESIS

Si se modifican las extremidades catalíticas T3 y T5 del nanorobot, en cuanto a secuencia y longitud, entonces se podrá llegar a la optimización de sus actividades catalíticas.

OBJETIVOS

Objetivo general

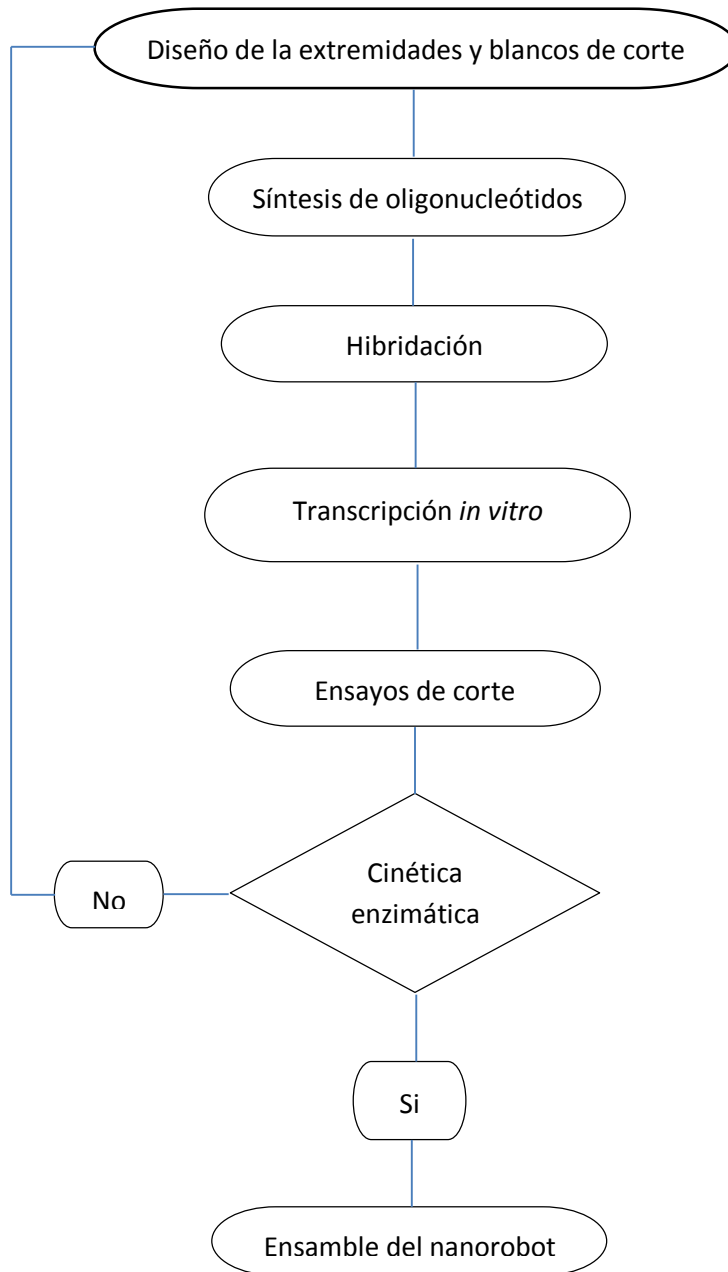
- Optimizar la actividad catalítica de un caminante molecular basado en la ribozima tríplex

Objetivos específicos

- Diseñar las modificaciones a las extremidades 5' y 3' del caminante.
- Construir las extremidades 5' y 3' del caminante.
- Medir la actividad catalítica de cada extremidad hasta encontrar un funcionamiento óptimo

METODOLOGÍA

Esquema general de trabajo



MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño de oligodesoxinucleótidos (ODNs)

Para el diseño de los ODNs se consideró invariable la porción catalítica del caminante y sólo se realizaron modificaciones a las extremidades T5 y T3 que son los dominios que reconocen al blanco. Se analizaron una serie de secuencias ya reportadas utilizadas en ensayos catalíticos. El análisis se enfocó en el contenido nucleotídico, longitud y T_m de cada secuencia. Se seleccionaron secuencias diferentes para cada extremidad pero manteniendo similar la longitud y la T_m. Se diseñaron blancos que hibriden con las extremidades pero que mantengan el *loop* A necesario para la catálisis, generando así dos extremidades catalíticas para evaluar su actividad de corte en posición *cis* (corte del blanco presente en la misma extremidad) y sus moléculas análogas inactivadas mediante mutaciones puntuales en bases del sitio catalítico como controles negativos. Adicionalmente se realizó el diseño de las extremidades catalíticas para medir su actividad *trans* (corte del blanco en una molécula independiente a la extremidad).

Síntesis de ODNs

La síntesis de los ODNs fue requerida bajo los siguientes diseños: 5'-Promotor T7-Extremidad catalítica-Sustrato-3' para analizar la actividad catalítica *cis* de las extremidades (con sus respectivas mutantes). Por otro lado, fueron requeridas la síntesis de ODNs 5'-Promotor T7-Extremidad catalítica-3' y 5'-Promotor T7-Blanco-3' para analizar la actividad catalítica *trans* para cada extremidad. Para todos los diseños se sintetizó también la secuencia complementaria.

Purificación de ODNs

Los ODN liofilizados (T4 Oligo S.A.P.I., Irapuato Gto), se centrifugaron a 13,000rpm (15,890g) (por 5 minutos con el objetivo de concentrar todo el contenido del tubo en el fondo). Posteriormente, fueron resuspendidos en 30µl de agua libre de nucleasas

y la mitad de estos fueron mezclados en un volumen igual de solución de paro 2x. Los tubos fueron incubados a 94°C por 5 minutos e inmediatamente se colocaron en hielo para evitar la formación de estructuras secundarias. Las muestras se cargaron en geles desnaturizantes (Urea 7M) de acrilamida-bisacrilamida 19:1 18% TBE 1X y se realizó un corrimiento electroforético a 250V durante 4 horas (PowerPac 3000; BIORAD). Después de esto, los geles fueron colocados en placas fluorescentes y fueron irradiados con luz UV de onda corta (320nm) para identificar las bandas de los ODNs completos, las cuales pudieron observarse como una sombra generada por la absorción de la luz UV de las bases nitrogenadas del DNA. Las bandas fueron marcadas y extraídas con la ayuda de una aguja y extruidas con una jeringa, depositándolas en microtubos de 1.5mL. Después se adicionaron 500µl de buffer de elución. La elución se llevó a cabo durante toda la noche a 4°C, volumen que posteriormente fue pasado a través de filtros de 0.45µm y depositado en columnas de purificación de Sephadex G25 previamente lavadas con 30ml de H₂O desionizada estéril. La columna se lavó con 5ml de H₂O para obtener 10 fracciones de (500µl en cada tubo). Cada fracción fue analizada por espectrofotometría en una longitud de onda (λ) de 260nm (Nanodrop 2000; Thermo Scientific) para obtener las concentraciones de DNA de cada fracción. Las fracciones con mayor concentración de DNA se analizaron mediante un corrimiento electroforético en un gel desnaturizante (Urea 7M) de acrilamida-bisacrilamida 19:1 12% TBE 1X para confirmar su presencia y observar su integridad.

La polimerización de los geles se llevó a cabo en presencia de 250 µL de persulfato de amonio 10% y 35µL del catalizador TEMED para un volumen de 50mL de acrilamida ya sea nativa o desnaturizante.

Hibridación de ODNs

Los ODNs purificados y cuantificados fueron colocados en solución en fracciones equimolares, se incubaron cinco minutos a 95°C y se dejan enfriar lentamente hasta alcanzar la temperatura ambiente para generar ODNs de doble cadena. Para confirmar la formación de los dúplex, se realizó un corrimiento electroforético a 150V

durante 1 hora en un gel nativo de acrilamida:bisacrilamida 19.1 12% nativos. Los geles fueron teñidos en una solución de bromuro de etidio (0.5µg/ml) durante 10 minutos y se visualizaron en un trans-iluminador.

La polimerización se llevó a cabo en presencia de 70µL de persulfato de amonio 10% y 12µL del catalizador TEMED para un volumen de 12mL de acrilamida ya sea nativa o desnaturizante.

Reacción en cadena de la polimerasa

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue utilizada para amplificar todos los moldes utilizados para generar cada sistema de ribozimas diseñados (*cis* y *trans*). Los ensayos de PCR fueron realizados usando los siguientes reactivos:

- a) 2µL de Buffer PCR Rxn 10x -MgCl₂ (Invitrogen Co.).
- b) 2µL de mezcla de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) 2mM.
- c) 2µL de *primers* sentido (*forward*) 10µM
- d) 2µL de *primers* antisentido (*reverse*) 10µM
- e) 0.8µL de MgCl₂ (Invitrogen Co.) 50mM
- f) ODNs hibridados (100-250ng)
- g) 0.2µL de Polimerasa de DNA (*Taq DNA polymerase*, Invitrogen Co.) (5u/µL).

Cada reacción se llevó a un volumen final de 20µL. Posteriormente se colocaron las reacciones el termociclador (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems) iniciando con la desnaturización completa del DNA molde a 94°C durante tres minutos. Se realizaron 25 ciclos de amplificación con las temperaturas y tiempos indicados en la tabla 1. Después de 25 ciclos, se mantuvo la temperatura a 72°C durante tres minutos y luego se incubaron a 4°C. Para verificar el producto de PCR, se realizó un corrimiento electroforético a 150V durante 1 hora en un gel de acrilamida-bisacrilamida 19:1 12% nativo.

Tabla 1. Condiciones de temperatura y tiempo para los ciclos de amplificación

Proceso	Temperatura (°C)	Duración (segundos)
Desnaturalización	94	30
Alineamiento	55	30
Extensión	72	30

Obtención del plásmido pRz434bis

La construcción pRz434bis que contiene la secuencia de la ribozima tríplex Rz434bis que fue previamente diseñada y construida en el laboratorio. Las bacterias *Escherichia coli* DH5 α (F- ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rk⁻, mk⁺) *phoA supE44 λ -thi-1 gyrA96 relA1*) recombinantes que tienen este plásmido fueron conservadas en STABs. Con el objetivo de obtener el plásmido, para posteriormente obtener la ribozima que codifica, se inocularon muestras de STABs de almacenamiento en tubos con 3mL de medio líquido LB con ampicilina (200 μ g/ml). Los tubos inoculados fueron incubados a 37°C/250rpm durante 16-18 horas. Se tomaron 100 μ L de la suspensión bacteriana como inóculo y se depositó en placas con agar LB con ampicilina (200 μ g/ml). El inóculo fue homogéneamente distribuido en la superficie de la placa y se incubaron a 37°C durante 16-18 horas con el objetivo de tener un resguardo de estas bacterias recombinantes. El resto de la suspensión de bacterias se utilizó para aislar el plásmido de interés.

Aislamiento de DNA plasmídico a pequeña escala (MINIPREP)

Después de haber obtenido los cultivos bacterianos en medio líquido LB con ampicilina (200 μ g/ml) se realizó el aislamiento de DNA plasmídico a pequeña escala con los reactivos del kit QIAprep® Miniprep (Qiagen). La suspensión bacteriana fue centrifugada a 13,500rpm (17,136g) durante 1 minuto en microtubos de 1.5ml. El DNA plasmídico se aisló resuspendiendo los botones bacterianos, con ayuda del vortex, en 300 μ l de buffer de resuspensión P1 por muestra. A este volumen se adicionaron 300 μ l de buffer de lisis de membrana P2, los volúmenes se mezclaron por inversión de los tubos e incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Posteriormente, para precipitar las proteínas y el DNA genómico, se adicionaron 300µl del buffer de neutralización P3, e inmediatamente se mezcló la suspensión por inversión de los tubos, se dejó incubar a temperatura ambiente por 10 minutos para luego centrifugarlos a 13,000rpm (15,890g) durante 15 minutos. Posteriormente, se tomó el sobrenadante a un nuevo tubo y se colocaron 700µl de Etanol Absoluto se mezcló por inversión y se incubó a -20°C por al menos 2 horas. Luego se centrifugó 30 minutos a 13,000rpm (15,890g); se decantó el sobrenadante y se colocaron 500µl de Etanol al 70% y se centrifugo 20 minutos a 13,000rpm (15,890g), se decantó una vez más y se dejó secando durante 5 minutos para finalmente resuspender en 100µl de H₂O desionizada estéril. Se comprobó su integridad en un gel de agarosa al 1% y se cuantificó la concentración a 260nm (Nanodrop 2000, Thermo Scientific).

Transcripción *in vitro*

Para las transcripciones *in vitro* (TIV) se utilizaron los ODNs de doble cadena (codificantes para las ribozimas en corte *cis* y en corte *trans* y los sustratos) fueron obtenidos por PCR previamente purificados. También se utilizó la construcción pRz434bis (codificante de la ribozima de referencia Rz434bis) previamente digerida con *Sac I* y purificada. Los ensayos de transcripción *in vitro* se realizaron mediante el sistema conocido como *run-off* utilizando los siguientes reactivos:

- a) DNA molde (1µg)
- b) 2µl de buffer de transcripción 10X (New England Biolabs)
- c) 1µl de cada rNTP tomados a partir de soluciones stock 10mM de rATp, rCTP, rGTP y rUTP (en caso de que los transcritos no se requirieran radio-marcados).
- d) 1µl de Inhibidor de RNAsas RiboLock® (40U/µL) (Thermo Fisher Scientific)
- e) 1µl de α^[32P]UTP (10mCi/ml) (Perkin Elmer) (Se utilizó en caso de requerir transcritos radio-marcados).
- f) 1µl de RNA Polimerasa T7 (50U/µL) (New England Biolabs) para los productos de PCR RNA polimerasa T3 (Thermo Fisher Scientific) para la construcción pRz434bis.

Las reacciones se llevaron a 20µL adicionando agua libre de nucleasas y se incubaron a 37°C durante 1 hora y media para generar los transcritos correspondientes a la extremidad catalítica-blanco 16% o la extremidad y el blanco. Se realizó una purificación de los transcritos deseados mediante un corrimiento electroforético a 250V 1hr 15 minutos en gel desnaturalizante (Urea 7M) acrilamida-bisacrilamida 19:1 TBE1X. Después del corrimiento electroforético el gel se sometió a exposición con placas radiográficas durante 10 minutos para ver las bandas de interés. Los transcritos completos se extrajeron del gel y se eluyeron en buffer de elución durante toda la noche a 4°C. Posterior a esto, el eluido se pasó a través de un filtro de 0.45µm y fue adicionado con 400 µL de Trizol® Reagent (Invitrogen Co.) y 80µL de cloroformo. Se mezcló con ayuda de un vortex, y se centrifugó a 13,500rpm (17,136g) por 15 minutos, de ahí se recuperó la fase acuosa, la cual se le adicionó 800µL de isopropanol absoluto y se centrifugó nuevamente a 13,500rpm (17,136g) durante 30 minutos y se guardó a -70°C hasta el momento de su uso para los ensayos de catálisis. Cuando fue necesario, se centrifugó a 13,500rpm (17,136g) posteriormente por 30 minutos, se decantó el sobrenadante y el botón fue lavando tres veces con 500µL de Etanol al 80%. En cada lavado, se centrifugó a 13,500rpm (17,136g) durante 20 minutos. Posteriormente, se resuspendieron en 20µL de agua libre de nucleasas con inhibidor de RNAsas.

Ensayos de catálisis

Las reacciones para analizar auto-procesamiento de las ribozimas se realizaron usando los siguientes reactivos:

- a) Extremidades catalíticas en corte *cis* y la ribozima de referencia a analizar previamente aisladas (500cpm) en agua libre de nucleasas
- b) 2µL de buffer de ribozima 5X
- c) 1µL de inhibidor de RNAsas RiboLock® (40U/µL)

Para evaluar la actividad el procesamiento del blanco por las extremidades catalíticas (corte *trans*) se adicionaron los siguientes reactivos:

- a) Extremidades catalíticas en configuración *trans* previamente aisladas (2μl*)
- b) Blanco previamente aislado (3μL*)
- c) 2μL de buffer de ribozima 5X
- d) 1μL de inhibidor de RNAsas RiboLock® (40U/μL)

*dependiendo de la concentración a utilizar

Para los ensayos de catálisis para la caracterización cinética de T5 se requirió cuantificar la concentración del sustrato S5. Para esto, primero fueron obtenidas las c.p.m. por conteo de centelleo del sustrato. Obtenido este valor se realizaron los siguientes cálculos:

Se determinó la actividad específica del α[³²P]UTP tomando en cuenta el factor de decaimiento del ³²P del tiempo transcurrido desde la fecha de calibración (dada por el fabricante) hasta la fecha de la cuantificación de las c.p.m. del sustrato mediante la siguiente fórmula.

$$SA = \frac{D_F}{\frac{1}{SA_{cal.}} - \frac{(1 - D_F)}{SA_{Theo}}}$$

Ecuación 1.

Donde:

SA = Actividad específica (*Ci/mmol*)

SA cal. = Actividad específica en el día de calibración (*Ci/mmol*)

D_F = Fracción de la radiactividad que permanecerá presente relativa al día de calibración. (Tabla 2)

SA Theo = Actividad específica teórica para ³²P libre (9120*Ci/mmol*).

Tabla 2. Valores de decaimiento para ^{32}P relativo a la fecha de calibración.

Día	D_F
0	1.000
1	0.953
2	0.906
3	0.865
4	0.824
5	0.785
6	0.748
7	0.712
8	0.678
9	0.646

Las *c.p.m./ μL* obtenidas fueron consideradas directamente como *d.p.m./ μL* . A su vez se deben de dividir entre 4 debido a la cantidad de uracilos marcados radiactivamente en el transcrito.

$$\frac{d.p.m./\mu L}{4U's \text{ por molécula de RNA}} = \frac{d.p.m. \text{ por molécula de RNA}}{\mu L}$$

Ecuación 2.

Este último valor es usado para calcular la concentración del sustrato mediante los siguientes cálculos:

Dado que: $1d.p.m = 4.5045 \times 10^{-13} Ci$

$$\left(\frac{d.p.m.}{\mu L} \right) \left(\frac{4.5045 \times 10^{-13} Ci}{1d.p.m.} \right) = \frac{Ci}{\mu L}$$

Ecuación 3.

Considerando la actividad específica del día de la cuantificación de las *c.p.m.* dada en *Ci/mmol*

$$\left(\frac{Ci}{\mu L}\right)\left(\frac{1}{Ci/mm\text{mol}}\right) = \frac{mmol}{\mu L}$$

Ecuación 4.

Finalmente se obtuvo la concentración del sustrato tomando en cuenta que

$$1 \times 10^{-15} \frac{mmol}{\mu L} = 1 pM$$

$$\left(\frac{mmol}{\mu L}\right)\left(\frac{1 pM}{1 \times 10^{-15} mmol/\mu L}\right) = pM$$

Ecuación 5.

Las reacciones se llevaron a un volumen final de 10 μ L con agua libre de nucleasas y se incubaron a 37°C en intervalos de tiempo de 0, 15, 30, 60 y 120 minutos (en algunos casos se requirió sólo analizar la actividad catalítica en los tiempos 0 y 120 minutos de incubación). En todos los casos se incluyó un control del sustrato sin la ribozima. Cumpliendo con estos tiempos las muestras se sometieron a enfriamiento rápido con hielo seco. Posteriormente, las muestras fueron calentadas a 65°C durante 5 minutos y enseguida fueron sometidas a un corrimiento electroforético a 250V durante 1 hora 15 minutos en geles desnaturizantes al 6% acrilamida-bisacrilamida 19:1 Urea 7M TBE 1X (análisis de corte *cis*) o 1 hora 30 minutos en geles desnaturizantes al 12% acrilamida-bisacrilamida 19:1 Urea 7M TBE 1X (análisis de corte *trans*). Al término del corrimiento electroforético, dichos geles se desmontaron y fueron sumergidos en una solución de Ácido Acético/Metanol 30/50 durante 20 min, este proceso se denomina fijación del gel y su propósito es sustituir el agua y buffer TBE presente en el gel por Metanol para su rápida evaporación. Una vez fijado el gel se colocó sobre papel filtro y se cubrió con plástico adherente para colocarlo en el secador de geles (583 BIO RAD y HydroTech Vacuum pump), una vez seco el gel se colocó sobre una placa (Molecular dynamics) y se dejó en exposición toda la noche, para después leer dicha placa en el Typhoon TRIO (GE Healthcare).

Cinética de catálisis la extremidad T5

Para caracterizar a la extremidad catalítica T5 se realizaron 4 ensayos cinéticos de catálisis por triplicado, cada uno ajustado a una concentración de S5 diferente (3.75, 7.5, 15 y 30pM) y a diferentes tiempos de incubación (0, 15, 30, 60 y 120 minutos). Las imágenes de los geles analíticos obtenidas de las cinéticas fueron analizadas mediante el programa ImageQuant 5.2 (Molecular Dynamics). El programa asigna automáticamente un valor proporcional a cada una de las porciones analizada, expresado en porcentaje. Para cada imagen se analizaron tres porciones, el sustrato completo S (16 bases) (fracción no cortada) y dos porciones de tamaño molecular inferiores como Fa (11 bases) y Fb (5 bases) que sumándolos representaron el porcentaje de la fracción cortada (%Fc) (Figura 47).

Estos datos se utilizaron para construir el gráfico de tiempo (min) contra % fracción cortada (%Fc). De este gráfico se obtuvo el modelo ajustado de la fase inicial de la cinética cuyo comportamiento es lineal obteniendo de la pendiente la constante de velocidad observada (k_{obs}).

$$Fc = k_{obs}t$$

Ecuación 6.

Donde Fc es la fracción cortada en %, k_{obs} es la constante de velocidad observada y t corresponde al tiempo de la reacción.

Posteriormente, se graficaron los valores de k_{obs} contra $[S]$, ajustados a la ecuación de Michaelis-Menten para obtener los parámetros cinéticos:

$$k_{obs} = \frac{k_{cat}[S]}{Km + [S]}$$

Ecuación 7.

Donde k_{cat} es la tasa de recambio y la constante de velocidad máxima, Km es la constante de Michaelis-Menten y $[S]$ es la concentración total de sustrato.

Después, los datos de velocidad inicial obtenida fueron graficados contra la concentración de sustrato $[S]$ de cada ensayo para obtener un modelo ajustado a una hipérbola rectangular correspondiente a la cinética de Michaelis-Menten que permite obtener los parámetros cinéticos k_{cat} y Km . La constante de especificidad es una constante de segundo orden que refleja la medida de la eficiencia catalítica de una enzima, en este caso T5. Se obtuvo mediante el cociente de k_{cat} entre Km como se muestra en la ecuación.

$$EC = \frac{k_{cat}}{Km}$$

Ecuación 8.

RESULTADOS

Diseño de extremidades catalíticas y sustratos para el nanorobot

Para la generación de las extremidades catalíticas, se diseñaron los ODNs considerando el mismo dominio catalítico que comparten el primer diseño del nanorobot (Romero-Hernández. Tesis de maestría, 2011), la ribozima tríplex Rz434bis (Aquino-Jarquín *et al*, 2008) y la ribozima 434 (Alvarez-Salas *et al*, 1998) desarrollados previamente en el grupo de trabajo. Para el diseño del sitio de reconocimiento del sustrato de cada extremidad se realizó una comparación entre varias secuencias de ribozimas reportadas en ensayos catalíticos con sus parámetros cinéticos determinados y reportados. A partir de aquí, se realizó un análisis en cuanto a secuencia y longitud en nucleótidos preestableciendo que la secuencia no debe de ser la misma ya que al tener los sustratos específicos para cada extremidad catalítica anclados en un camino de DNA le indicarán la dirección del movimiento al nanorobot planteado en su modelo hipotético de desplazamiento (Figura 16). Adicionalmente, se determinó que los valores de T_m de la hibridación entre las extremidades catalíticas y sus sustratos fueran los mismos, por lo tanto, el

contenido de A+U y G+C y la longitud en secuencia debe de ser similar. Para este fin, se calcularon los valores de T_m de las hélices H2 y H1 de forma independiente, así como el valor de T_m de la configuración H2-*loop*A-H1 y se mantuvo invariable el *Loop A* ya que este es necesario para la catálisis (Figura16).

Siendo así, se eligieron dos secuencias para los sitios de reconocimiento de las extremidades y sus respectivos sustratos pertenecientes a las ribozimas hairpin 434 y 419 (Tabla 2) (Alvares-Salas, 1998). La secuencia de la ribozima 434 fue designada tal cual como la extremidad catalítica T5 así como su sustrato. La extremidad catalítica T3 fue diseñada con la secuencia de la ribozima 419 a la cual se le hicieron dos modificaciones. La primera de ellas, el sitio de reconocimiento se colocó en el extremo 3' de la molécula en lugar del extremo 5' ya que esta es la configuración de la extremidad requerida para el ensamble del caminante. La segunda, fue la adición de una A en el extremo 5' de la hélice 1 (H1) del sitio de reconocimiento de T3 para cumplir con la intención de igualar la longitud de nucleótidos y el valor de T_m con T5.

Teniendo ya designadas las secuencias de las extremidades catalíticas T5 y T3 y los sustratos S5 y S3 correspondientes, se decidió que cada extremidad y su sustrato estuvieran contenidos en una misma molécula (configuración *cis*) con la intención de determinar de forma preliminar la funcionalidad de las extremidades catalíticas mediante el seguimiento de su auto-procesamiento, para posteriormente, generar las extremidades catalíticas y sus sustratos de forma independiente (configuración *trans*) y caracterizarlas cinéticamente. Adicionalmente, para conferir flexibilidad a la molécula para poder llevar a cabo la unión entre el sitio de unión y el sustrato se adicionaron cuatro bases (5'-GCUU-3') el cual funciona como una bisagra entre el sitio de reconocimiento y el sustrato (Figura 17).

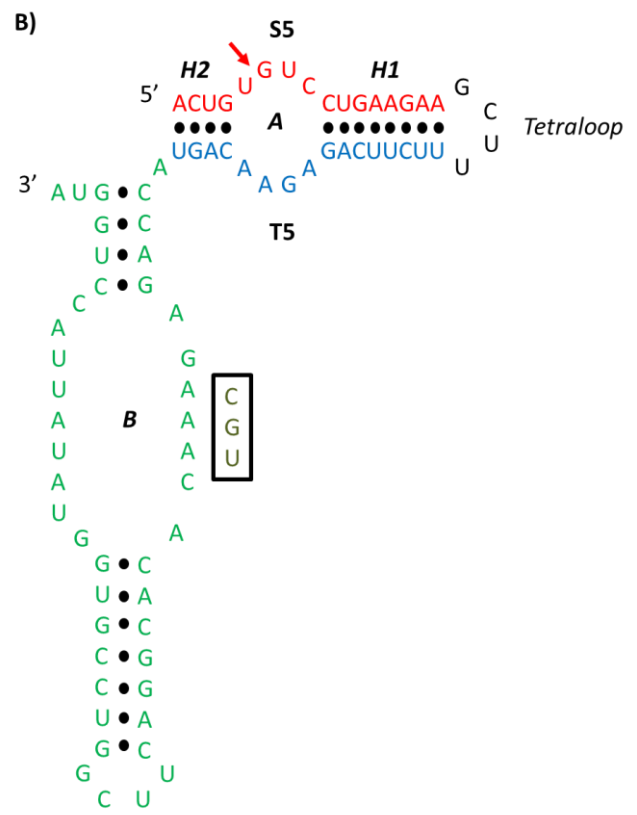
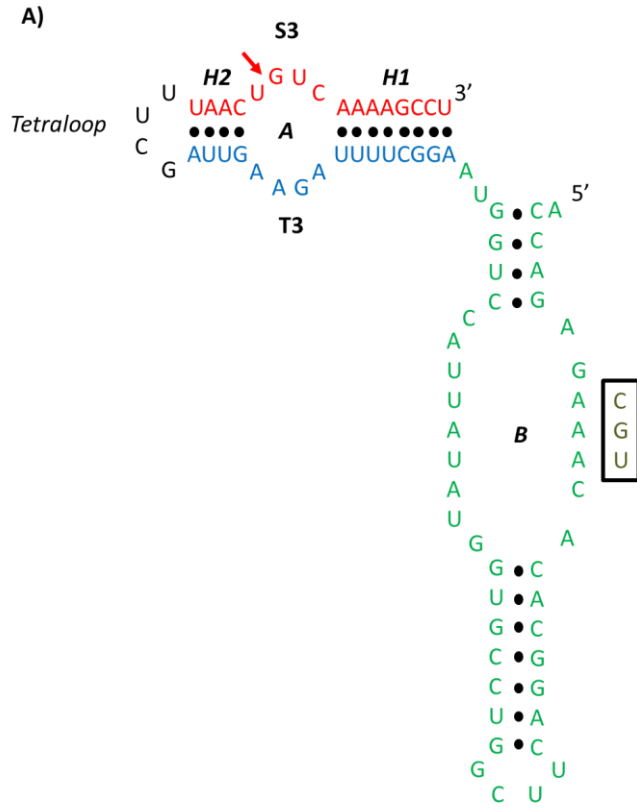
Tabla 3. Secuencias seleccionadas para el diseño para los sitios de unión para las extremidades T5 y T3 con parámetros termodinámicos y cinéticos.

Secuencias de sitios de unión (3'→5') y sustratos (5'→3')	H2 Tm (°C)	H1 Tm (°C)	RNAFold ^a Tm (°C)	Km (μM)	<i>k_{cat}</i> (min ⁻¹)	E.C. (min ⁻¹ /μM ⁻¹)	Fuente	Extremidad asignada
<i>H2</i> <i>loop A</i> <i>H1</i>								
5' ACUGU GUC ^b CUGAAGAA 3' 3' UGACA AGA GACUUCUU 5'	12	22	44.8	0.021	0.08	3.81	R 434 Alvarez-Salas, 1998	T5
5' UAACU GUC AAAAGCC 3' 3' AUUGA AGA UUUUCGG 5'	12	20	40.2	0.098	0.18	1.84	R 419 Alvarez-Salas, 1998	
5' UAACU GUC AAAAGCCU ^c 3' 3' AUUGA AGA UUUUCGGA 5'	12	22	45.1	-	-	-	R 419 modificada	T3

^a Valores de Tm obtenidos para la estructura *H1-loop A-H2* con la herramienta informática The DINAMelt de mfold Web Server

^b Se indican las bases que no se aparean durante la unión del sustrato al sitio de unión y que forman el *loop A*.

^c Adición de una base A en el sitio de unión y U en el sustrato con respecto a las secuencias de la ribozima 419.



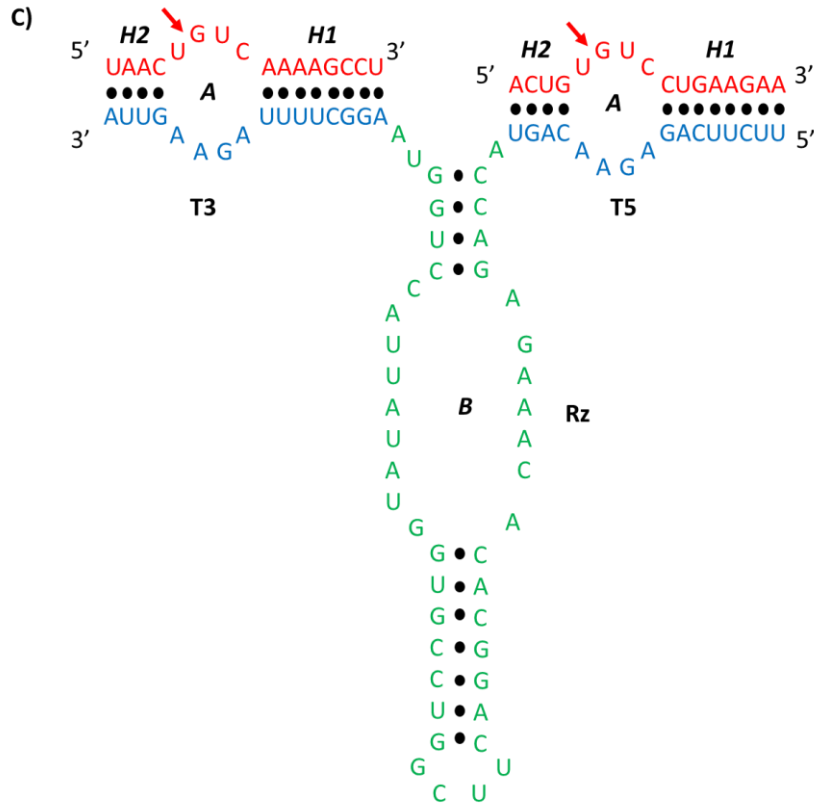


Figura 17. Estructura secundaria de las extremidades catalíticas T3 y T5 y del nanorobot ensamblado. A) Extremidad catalítica T5. **B)** Extremidad catalítica T3. Se muestra la estructura secundaria de ambas extremidades en configuración *cis* acopladas con sus respectivos sustratos. En ambas extremidades se indica el *tetra*loop que confiere flexibilidad al plegamiento. **C)** Estructura secundaria del nanorobot ensamblado y acoplado con los sustratos S5 y S3 en configuración *trans*. En los tres esquemas se indican las hélices H1 y H2 y el *loop* A que se forman durante el acoplamiento del sitio de unión con el sustrato. Se indica el *loop* B en el dominio catalítico el cual es necesario para la actividad catalítica. El sitio de corte en el sustrato es indicado con una flecha roja. La mutación introducida para generar extremidades catalíticas inactivas aparece indicada dentro del recuadro.

Construcción de las extremidades catalíticas

El tener el diseño y configuración de las ribozimas nos permitió diseñar los ODNs que codificaran las secuencias. Los ODNs fueron diseñados de la siguiente forma:

T5 → 5' Promotor T7 – Sustrato S5 – *tetra*loop – Extremidad T5 – Dominio RZ 3'

T3→ 5' Promotor T7 – Dominio Rz – Extremidad T3 – *tetra*loop – Sustrato S3 3'

Para ambos ODNs se realizó el diseño de las secuencias complementarias correspondientes, requiriendo finalmente la síntesis de 4 ODNs, T5, T5c, T3 y T3c, cada uno con una longitud de 101 bases.

Una vez obtenidos los ODNs estos fueron purificados, cuantificados y analizados mediante un corrimiento electroforético en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 12% (Figura 18). Se analizó la integridad los ODNs T5, T5c, T3 y T3c por duplicado. Al ver que los 4 ODNs estaban íntegros fueron hibridados en cantidades equimolares (200pmoles) y fueron analizados mediante un corrimiento electroforético en un gel de poliacrilamida nativo al 12% el cual permitió observar la formación de los ODNs de doble cadena, con un peso molecular correspondiente a 101 pares de bases (Figura 19).

Posteriormente, se amplificaron los ODNs de doble cadena mediante PCR con el objetivo de tener una mayor cantidad de éstos para los ensayos de transcripción *in vitro*. Para esto, se diseñaron 4 *primers* con una longitud de 20 bases, complementarias a los extremos 5' y 3' de los ODNs de doble cadena. Estos *primers* fueron denominados T5*forward* y T5*reverse* para ODN dúplex T5/T5c y T3*forward* y T3*reverse* para el ODN dúplex T3/T3c. Las reacciones de PCR fueron realizadas bajo las condiciones y el programa de ciclos de amplificación mencionados anteriormente usando como molde los ODNs hibridados T5/T5c y T3/T3c. Los productos fueron analizados mediante un corrimiento electroforético en un gel nativo de poliacrilamida al 12% (todas las reacciones de PCR fueron analizadas mediante un corrimiento electroforético en un gel nativo de poliacrilamida al 12%). La amplificación para ODN dúplex T5 fue satisfactoria ya que se muestra un solo producto con un peso de 101pb correspondiente el pesos molecular esperado (Figura 20). Sin embargo, la amplificación para el ODNs dúplex de T3 no fue totalmente satisfactoria ya que puede observarse el también el producto principal de 101pb pero además aparece un producto no deseado con un peso molecular inferior cercano a 101pb (Figura 20).

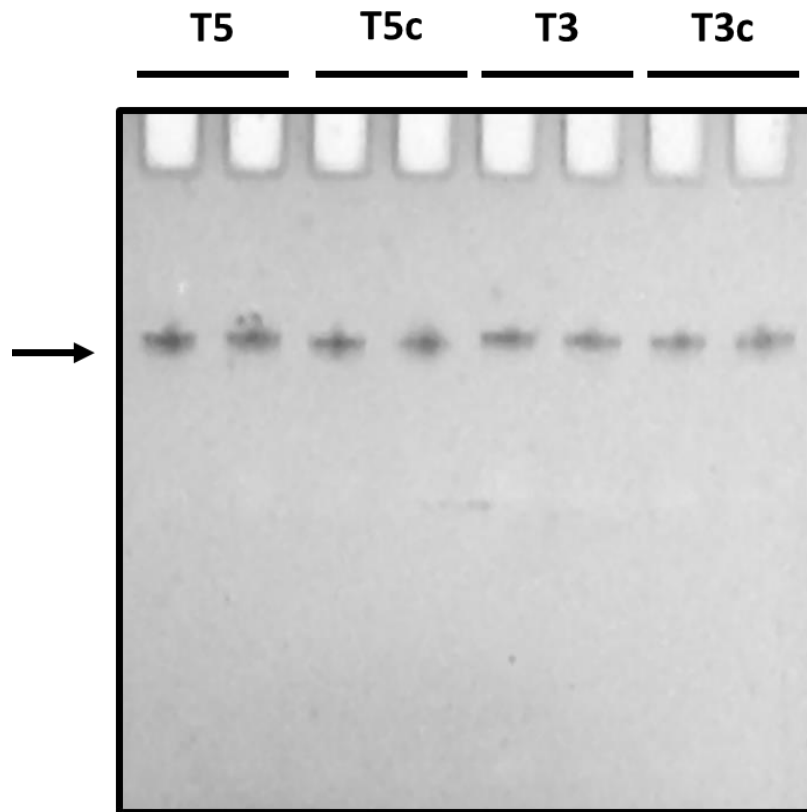


Figura 18. Análisis de integridad de los ODNs T5, T5c, T3 y T3c. Los cuatro ODNs fueron purificados, recolectados en fracciones de elusión y cuantificados. Se muestra el corrimiento electroforético en un gel de poliacrilamida al 12% desnaturizante de las dos fracciones más concentradas de cada ODN, los cuales son indicados con la flecha negra, donde se observa una sola banda correspondiente a cada uno.

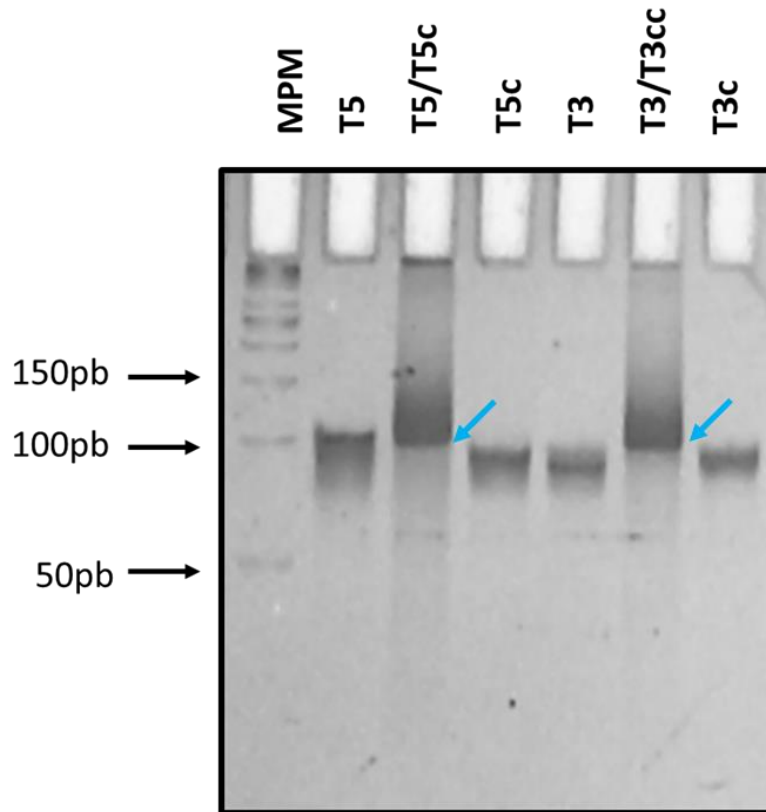


Figura 19. Hibridación de ODNs para T5, T5c, T3 y T3c. Se muestra un gel de poliacrilamida al 12% nativo donde se muestra el corrimiento electroforético de los ODNs de cadena sencilla y los ODNs de doble cadena. Los ODNs hibridados (T5/T5c y T3/T3c) muestran un dúplex en el peso molecular esperado (101pb indicados con una flecha azul) mientras que los ODNs de cadena sencilla realizaron un corrimiento dependiendo de su estructuración (T5, T5c, T3, T3c). MPM: marcador de pesos molecular.

Esto representaba un problema, ya que si este producto estuviera presente en el momento de realizar las reacciones de transcripción *in vitro* podría generar transcritos no funcionales y disminuir la producción del transcrito deseado. La razón por la que pudo haber ocurrido esto probablemente se debe a la hibridación parcial, pero estable, de alguno de los *primers* en otro sitio del molde de amplificación, por lo tanto se decidió modificar tanto la temperatura de alineamiento, como la concentración de $MgCl_2$ y la concentración de *primers* para las siguientes reacciones de PCR con el objetivo de generar condiciones más astringentes para la hibridación de los *primers* y disminuir o eliminar el producto no deseado. Primero, se llevaron a

cabo reacciones de PCR a lo largo de un gradiente de temperatura de alineamiento de 48 a 55⁰C. Este gradiente de temperaturas se aplicó a las reacciones de PCR para T5, con el objetivo de encontrar una temperatura óptima de alineación para la amplificación, y para T3, con el objetivo de eliminar el producto no deseado. Se observó que al modificar la temperatura de alineación en el rango utilizado para la amplificación de T5 no hubo diferencia en la obtención del amplificado, así que se decidió utilizar la temperatura de alineación de 55⁰C (Figura 21). Por otro lado, el haber utilizado el gradiente de temperatura para la amplificación de T3 no ayudó a eliminar ni disminuir el producto no deseado (Figura 22).

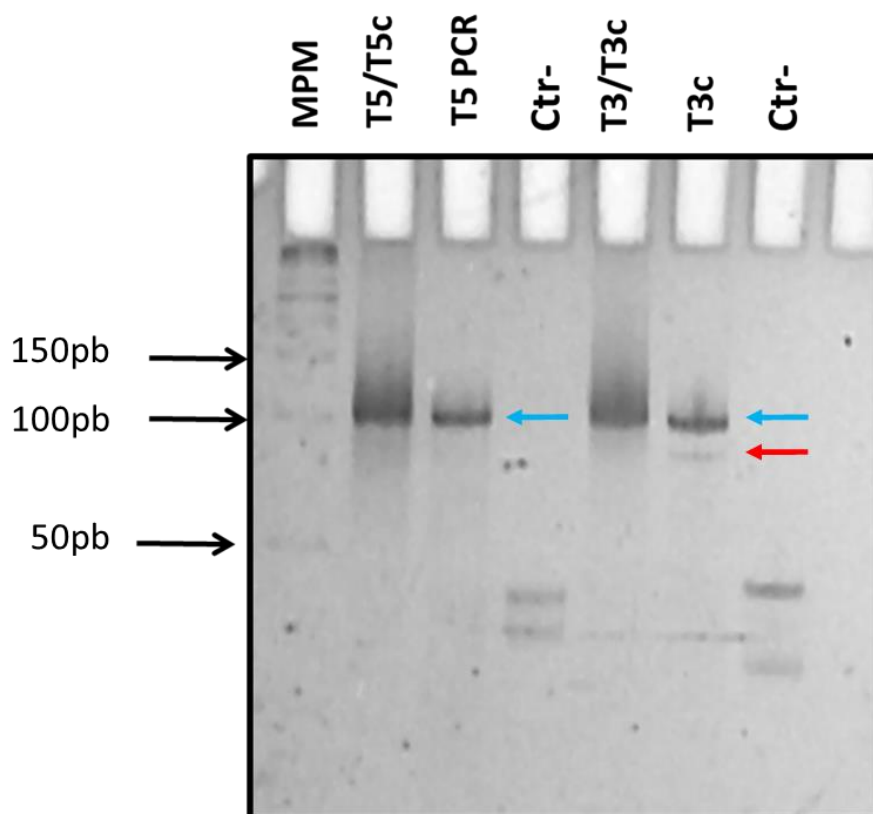


Figura 20. Amplificación por PCR de los ODNs dúplex de T5 y T3. En la imagen se muestra el corrimiento electroforético en un gel nativo de poliacrilamida al 12% de T5/T5c y de T3/T3c obtenidos de ensayos previos de hibridación, los amplificados de PCR los dúplex de T5 y T3 y sus respectivos controles negativos. Se observa la obtención de un solo producto para el ODN dúplex de T5 y T3 correspondiente a 101pb indicados con una flecha azul. Sin embargo, también se observa un producto secundario de un tamaño molecular inferior al esperado indicado con una flecha roja.

Las reacciones fueron llevadas a cabo con una concentración final de 3mM de MgCl₂, 1μM de *primers* y a 55°C de temperatura de alineación.

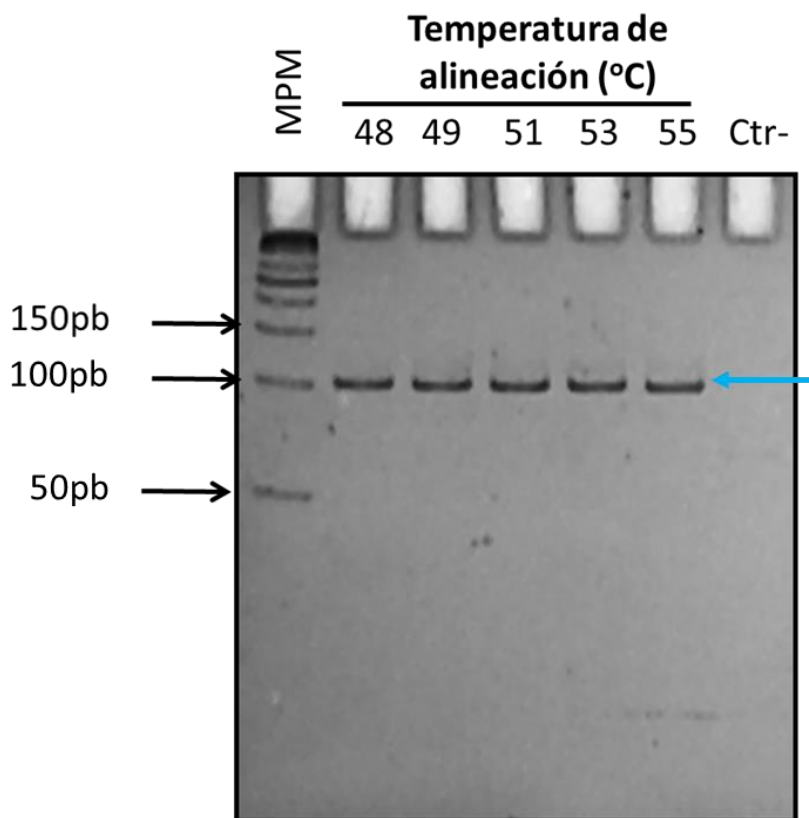


Figura 21. Estandarización de la temperatura de alineación en la reacción de PCR de T5. Las reacciones de PCR se realizaron con diferentes temperaturas de alineación de 48 a 55°C. Adicionalmente se adicionó un control negativo (Ctr-) que es una reacción con todos los elementos de la PCR excepto el DNA molde. Se observa la obtención de un solo producto de amplificación de 101bp indicado con la flecha azul, sin embargo no se observa algún incremento en la amplificación. Las reacciones fueron analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida nativo al 12%. Las reacciones fueron llevadas a cabo con una concentración final de 3mM de MgCl₂ y 1μM de *primers*.

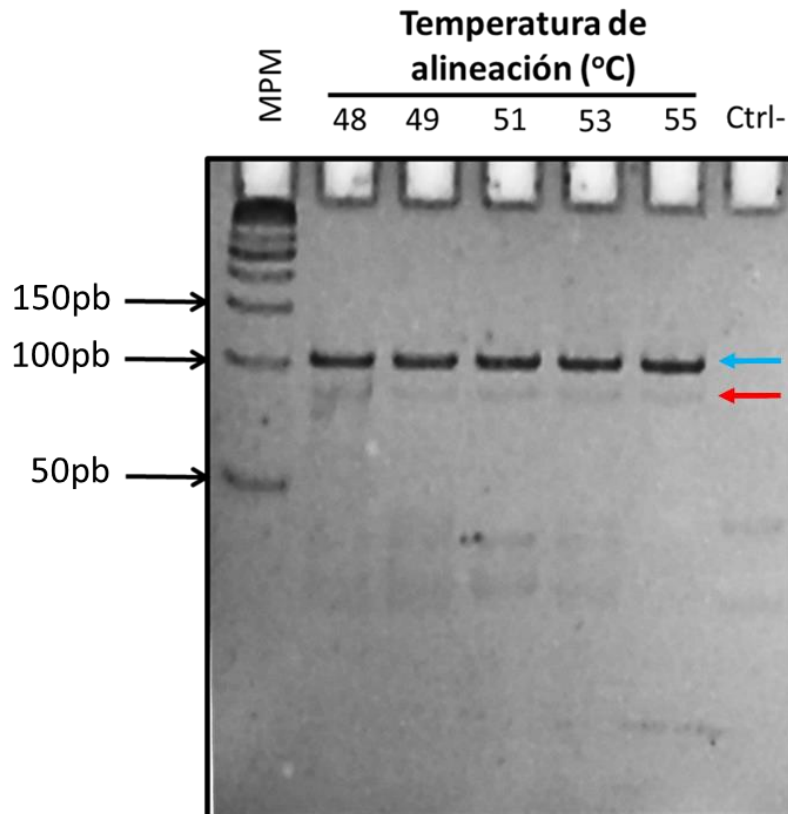


Figura 22. Estandarización de la temperatura de alineación en la reacción de PCR para T3. Las reacciones de PCR se realizaron con diferentes temperaturas de alineación de 48 a 55°C con su respectivo control negativo. Se observa la amplificación del ODN T3 dúplex de interés de 101pb (flecha azul), sin embargo, la modificación de la temperatura no disminuye la aparición del producto inespecífico (flecha roja). Las reacciones fueron analizadas mediante un corrimiento electroforético en un gel de poliacrilamida nativo al 12%. Las reacciones fueron llevadas a cabo con una concentración final de 3mM de MgCl₂ y 1μM de *primers*.

Debido a lo anterior, se decidió probar temperaturas de alineación más altas, de 55 a 66°C esperando disminuyeran la aparición del producto no deseado. El análisis de las reacciones demostró que esta modificación en la temperatura de nuevo no brindó algún resultado satisfactorio ya que a lo largo del intervalo analizado el producto no deseado seguía apareciendo (Figura 23).

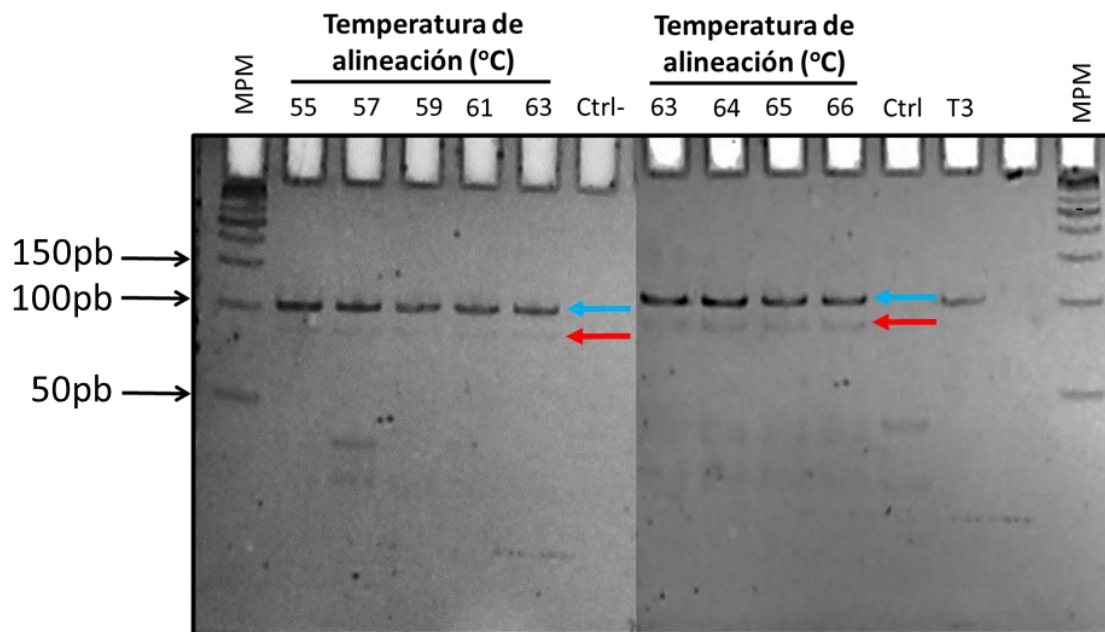


Figura 23. Estandarización de la temperatura de alineación para la reacción de PCR de T3. Las reacciones de PCR se realizaron con diferentes temperaturas de alineación de 55 a 66^oC con su respectivo control negativo en dos ensayos independientes. Se observa la amplificación del ODN T3 dúplex de interés de 101pb, sin embargo, la modificación de la temperatura no disminuye la aparición del producto artefactual. Las reacciones fueron analizadas mediante un corrimiento electroforético en un gel de poliacrilamida nativo al 12%. Las reacciones fueron llevadas a cabo con una concentración final de 3mM de MgCl₂ y 1μM de *primers*.

Posteriormente, se decidió disminuir la concentración de MgCl₂ de 3mM a 2mM y nuevamente se llevaron a cabo las reacciones de PCR a través de un gradiente de temperatura de alineación 45 a 63^oC. Como se muestra en el gel de la figura 24, la disminución de MgCl₂ no ayudó a solucionar el problema.

Después, se decidió disminuir la concentración de *primers* pasando de 1μM a 500 y 100nm sin mejora aparente (Figura 25). Finalmente, se decidió montar las reacciones de PCR establecida (Tabla 3) y para poder eliminar el producto artefactual de la reacción de PCR de T3 se decidió por purificar el producto principal mediante un corrimiento electroforético en un gel nativo de poliacrilamida al 12% (Figura 26). El producto principal fue extraído del gel y purificado para proceder a las reacciones de transcripción *in vitro*.

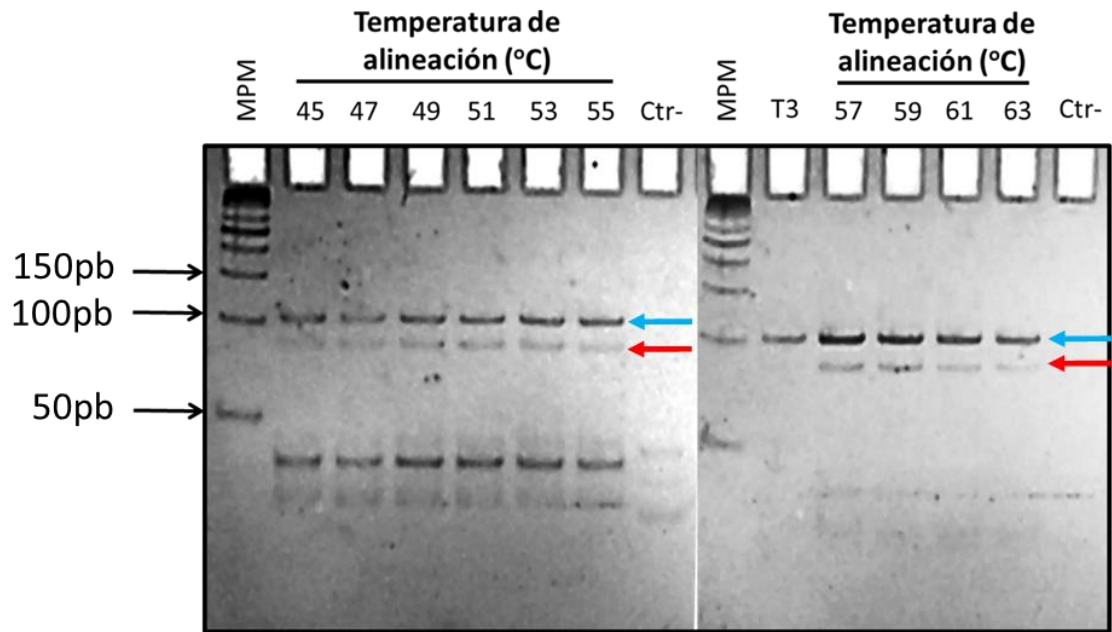


Figura 24. Estandarización de la temperatura de alineamiento y concentración de $MgCl_2$ para la reacción de PCR de T3. Las reacciones de PCR se realizaron con diferentes temperaturas de alineación de 45 a 63°C y disminuyendo la concentración de $MgCl_2$ a 2mM con su respectivo control negativo en dos ensayos independientes. Se observa la amplificación del ODN T3 dúplex de interés de 101pb (flecha azul), sin embargo, la modificación de la temperatura no disminuye la aparición del producto indeseado (flecha roja). Las reacciones fueron analizadas mediante un corrimiento electroforético en un gel de poliacrilamida nativo al 12%. Las reacciones fueron llevadas a cabo con una concentración final 1 μ M de *primers*.

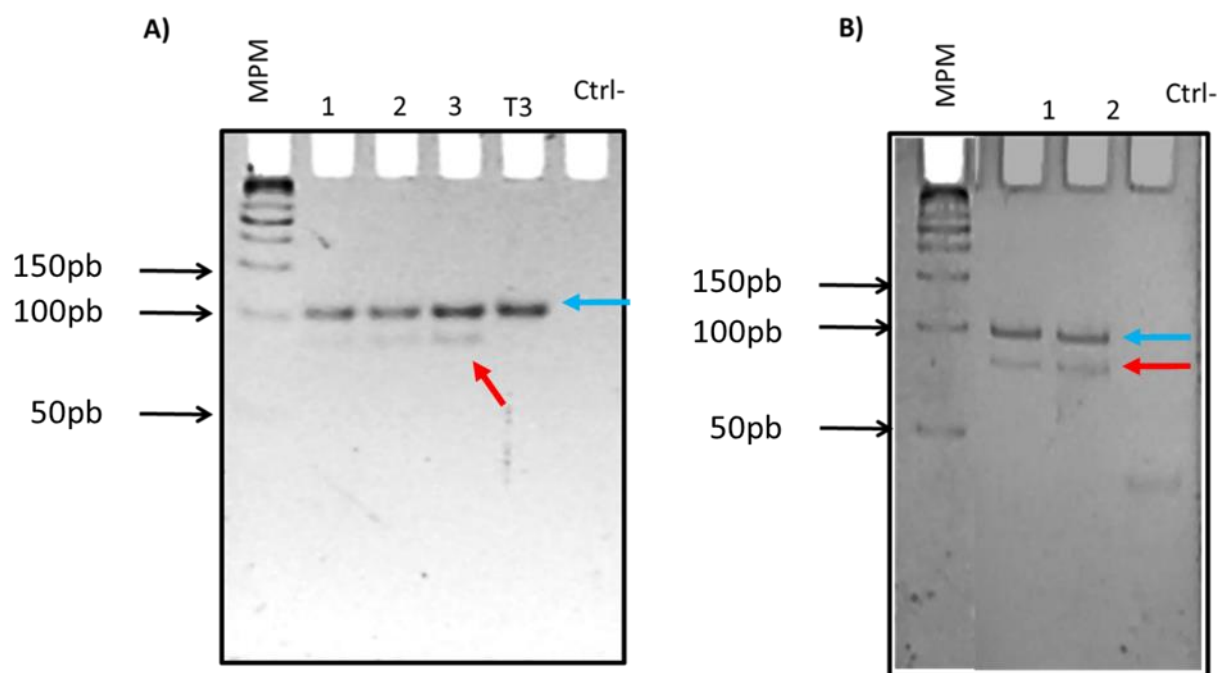


Figura 25. Estandarización de la concentración de *primers* para la reacción de PCR de T3. Las reacciones de PCR se realizaron usando concentraciones de *primers* de 500nM (A) y de 10nM (B). Se observa la amplificación del ODN T3 dúplex de interés de 101pb (flecha azul), sin embargo, la modificación de la concentración de *primers* no disminuye la aparición del producto no deseado (flecha roja). Las reacciones fueron analizadas mediante un corrimiento electroforético en un gel de poliacrilamida nativo al 12%. Las reacciones fueron llevadas a cabo con una concentración final de 3mM de MgCl₂ y a 55^oC como temperatura de alineamiento.

Tabla 4. Estandarización de las condiciones de reacción para PCR para T5 y T3.

Condición	T5	T3
Temperatura (°C)	55	55
Concentración de MgCl ₂ (mM)	3	3
Concentración de <i>primers</i> (mM)	1	1

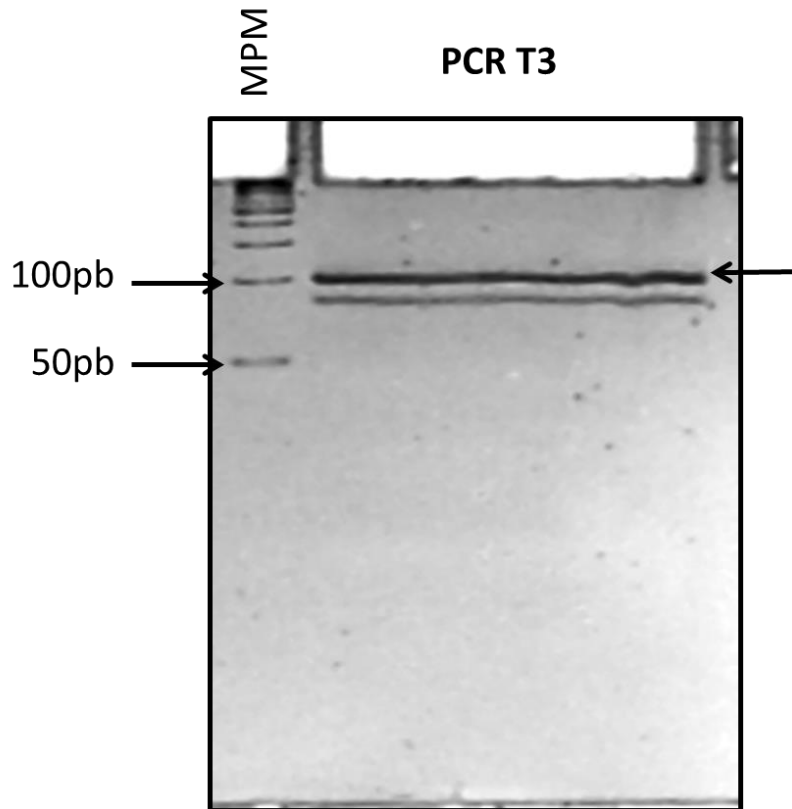


Figura 26. Purificación del producto de interés a parte de reacciones de PCR de T3. En el gel se muestra la presencia de dos bandas amplias. La de mayor peso molecular corresponde al amplificado de interés (indicada con una flecha negra de lado izquierdo). Abajo se puede observar un amplificado de menor peso molecular. A partir de este gel se hizo la extracción del amplificado de interés para su posterior purificación y uso para las reacciones de transcripciones *in vitro*. El corrimiento electroforético se realizó en un gel de poliacrilamida al 12% nativo. La reacción de PCR se llevó a cabo con una concentración final de $MgCl_2$ 3mM, 1 μ M de *primers* y a una temperatura de alineación de 55°C.

Por otro lado se consideró apropiado el uso de la ribozima tríplex (Rz434bis) como un control positivo de catálisis ya que tenemos la certeza de que es funcional y además su auto-procesamiento genera fragmentos de RNA de pesos molecular conocido por lo que podemos usar esta ribozima como un marcador de pesos molecular. Para poder usar esta ribozima fue necesario recuperar el plásmido pRz434bis que contiene la secuencia de esta ribozima, el cual estaba almacenado en STABs. Para su recuperación, se tomaron fragmentos de agar que fueron

inoculados por picadura al momento de preservar el plásmido. Estos trozos de agar fueron colocados en medio LB líquido con 200µg/ml de Ampicilina e incubados durante 18 horas en agitación a 37°C. A los cultivos positivos se les realizó una extracción de plásmido a pequeña escala (*miniprep*). El plásmido fue extraído, purificado y cuantificado. Posteriormente se realizó un corrimiento electroforético para analizar su integridad en un gel de agarosa al 1% (Figura No 27).

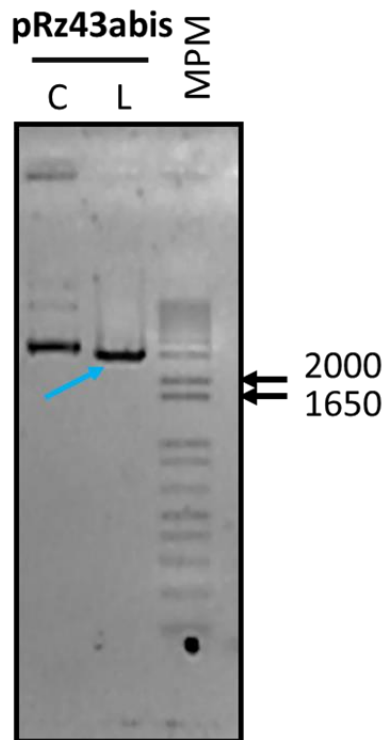


Figura 27. Forma circular y linear del plásmido pRz434bis. En la imagen se presenta el corrimiento electroforético de la forma circular (carril indicado con C) y la forma linealizada (carril indicado con L) del plásmido pRz434bis. La forma linealizada se obtuvo mediante un solo corte realizado por la enzima Sac I (flecha azul). La forma linear corresponde al tamaño de 3117 pares de bases. El corrimiento electroforético fue realizado en un gel de agarosa al 1%.

La construcción de este plásmido consideró la colocación de un sitio de restricción blanco de la enzima Sac I al final de la región que codifica a la ribozima tríplex, con la intención de linealizar al plásmido en este punto, por lo tanto al momento de montar la reacción de transcripción in vitro con este plásmido se acabará la

transcripción donde el plásmido haya perdido su circularidad, este método también es conocido como *run off* (figura 28). Por lo anterior explicado, se procedió a linealizar el plásmido con la enzima Sac I. Posteriormente, el plásmido fue sometido a un corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 1% con el objetivo de evidenciar la linealización del plásmido. El plásmido linealizado fue purificado para realizar los ensayos de transcripción *in vitro* (Figura 27).

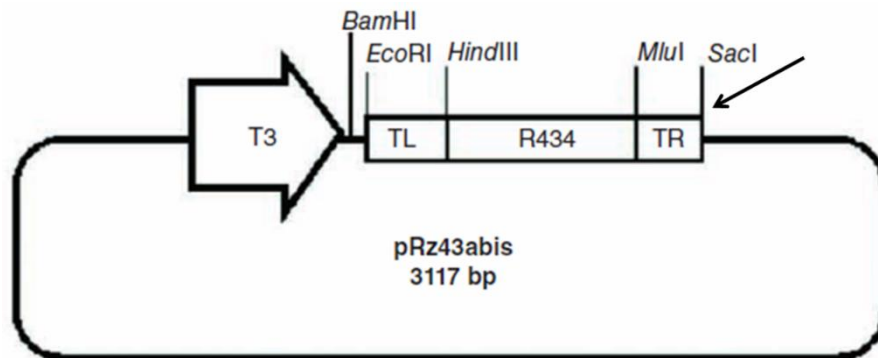


Figura 28. Mapa del plásmido pRz434bis. El mapa muestra esquemáticamente la región que codifica para la ribozima tríplex y sus módulos. LA flecha indica el sitio de corte de Sac I, el cual permite linealizar el plásmido y utilizarlo para la generación de la ribozima tríplex por transcripción *in vitro*.

Generación de las extremidades catalíticas por transcripción *in vitro*

Una vez obtenidos los ODNs de doble cadena codificantes para las extremidades T5 y T3, se realizaron reacciones de transcripción *in vitro* con el fin de obtener los transcritos de RNA correspondientes a las extremidades catalíticas a analizar. Adicionalmente se utilizó el plásmido linealizado pRz434bis para transcripción *in vitro* para generar la ribozima tríplex. Las reacciones se realizaron como se explicó en la sección de materiales y métodos. Después de la incubación de las reacciones durante 1 hora y 30 minutos a 37°C, se realizó un corrimiento electroforético a 250V durante 1 hora 15 minutos en un gel de poliacrilamida al 6% con el objetivo de separar los transcritos generados. Posterior a esto, se revelaron los productos de la

transcripción mediante placas de rayos X poniendo en evidencia la localización de los transcritos, se seleccionaron los transcritos que tuvieran el peso molecular más elevado considerando estos los transcritos completos y seleccionaron las secuencias de mayor tamaño molecular, considerándolas como los transcritos completos de las extremidades catalíticas diseñadas y la ribozima tríplex (Figura 29). Los transcritos fueron extraídos del gel y purificados para su uso en ensayos de catálisis.

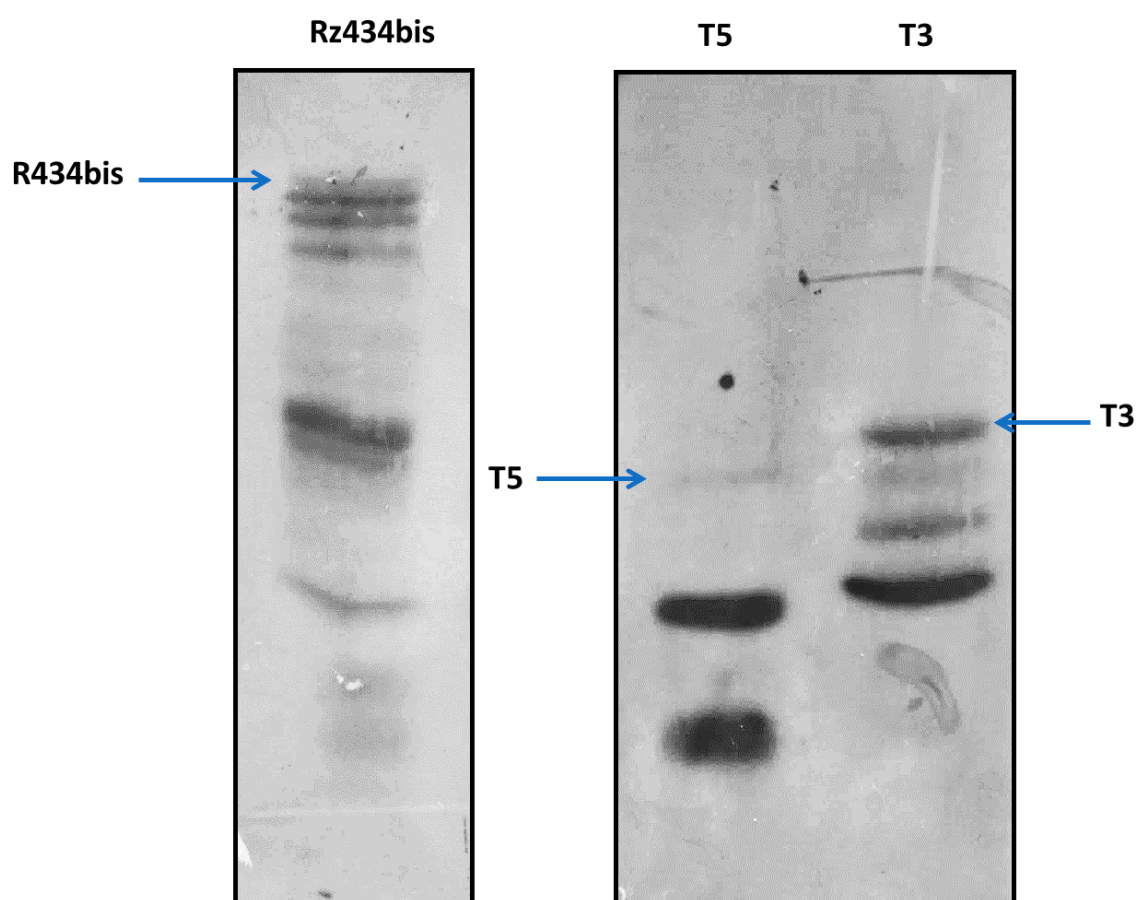


Figura 29. Transcripción *in vitro* de la ribozima Rz434bis y de las extremidades catalíticas T5 y T3. Se obtuvieron transcritos partir del plásmido pRz434bis digerido con Sac I y de los ODNs dúplex de T5 y T3. Se seleccionaron los transcritos más grandes, indicados con flechas azules, como los transcritos completos para realizar los ensayos de catálisis. Estos transcritos fueron extraídos del

gel. El corrimiento electroforético se hizo a 250V durante 1 hora y 15 minutos en un gel desnaturante de poliacrilamida al 6% y 7M urea.

Ensayos de catálisis

Para analizar la actividad de corte *cis* de las extremidades catalíticas T5 y T3, estas fueron sometidas a ensayos de catálisis. Para esto, cada extremidad fue incubada con buffer de ribozima a 37°C durante 0, 15, 30, 60 y 120 minutos. Posterior a esto, se realizó un corrimiento electroforético a 250V durante 1 hora y 15 minutos en un gel desnaturante de poliacrilamida al 6% y 7M urea con el objetivo de ver los productos de la catálisis. Como se puede observar en la Figura 30, no se observan los productos de la auto-catálisis esperados por parte de las extremidades a lo largo del tiempo. Esto llevo a pensar en la posibilidad de que las condiciones de catálisis no eran las óptimas, por lo tanto se decidió modificar las concentraciones de Mg²⁺ y espermidina, ya que ambos factores son de suma importancia de para la actividad catalítica de las ribozimas.

Adicionalmente, las variaciones de estas concentraciones fueron realizadas para ensayos de catálisis con la ribozima Rz434bis ya que es el control positivo de auto-procesamiento. Debido a la ausencia de catálisis se pensó que un exceso de espermidina pudiese estar impidiendo la actividad catalítica al asociarse con las ribozimas e impedir el mecanismo dinámico necesario para el corte. Para probar esta teoría, se realizó un ensayo de catálisis con la ribozima tríplex, debido a su actividad auto-catalítica fue adecuado usarla para optimizar las condiciones de catálisis. Por lo tanto se hicieron ensayo de catálisis con la ribozima tríplex incubándola con buffer de ribozima sin espermidina y con espermidina 2mM a 37°C durante 0, 15, 30, 60 y 120 minutos. Posteriormente, fueron sometidas a un corrimiento electroforético a 250V durante 1 hora y 15 minutos en un gel desnaturante de poliacrilamida al 6%. Se pudo observar que la aparición de bandas correspondientes al auto-procesamiento de la ribozima Rz434bis incrementa cuando el buffer de ribozima tiene 2mM en comparación con las catálisis

que llevó buffer sin espermidina. Este efecto fue apreciado de mejor manera al momento de realizar una gráfica considerando el tiempo del catálisis (eje X) contra porcentaje de blanco cortado (eje Y) (Figura 31 y 32).

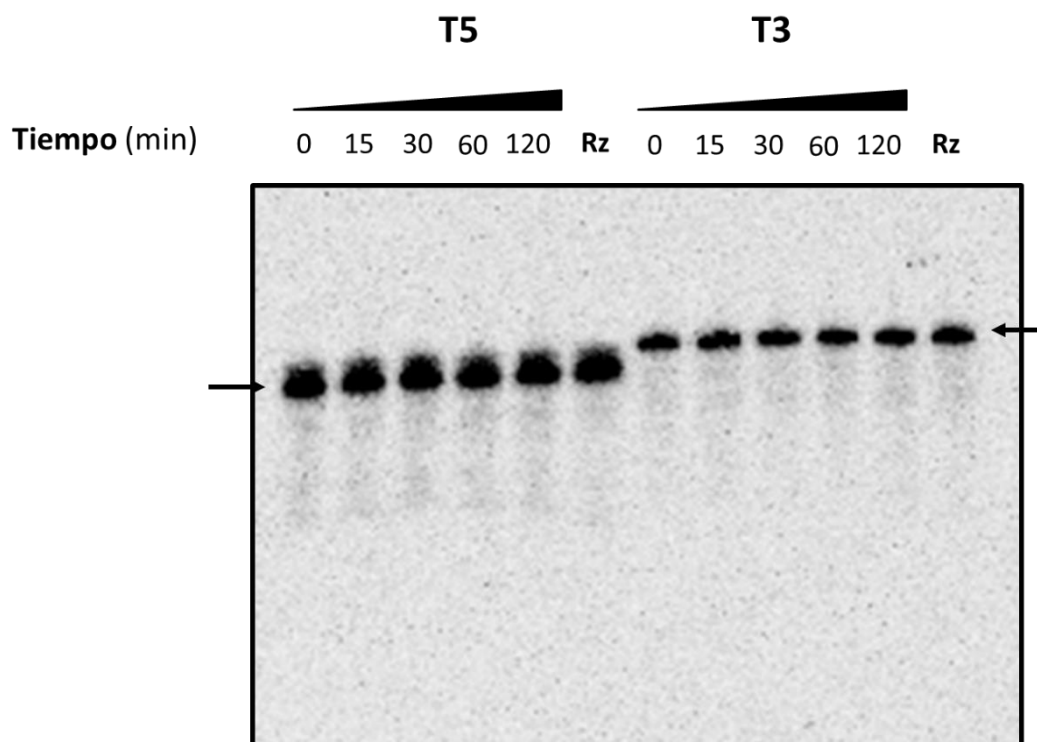


Figura 30. Ensayo de catálisis para las extremidades catalíticas T5 y T3. Se muestran el corrimiento electroforético en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 6% de los ensayos de catálisis de las extremidades catalíticas T5 y T3 a 0, 15, 30, 60 y 120 minutos. Las extremidades T5 y T3 completas están indicadas por flechas negras. Durante el transcurso del tiempo no se observan productos generados por la catálisis lo que indica que no hubo auto-procesamiento de las extremidades catalíticas.

Espermidina 2mM

+

-

Tiempo (min)

0 15 30 60 120 Rz 0 15 30 60 120

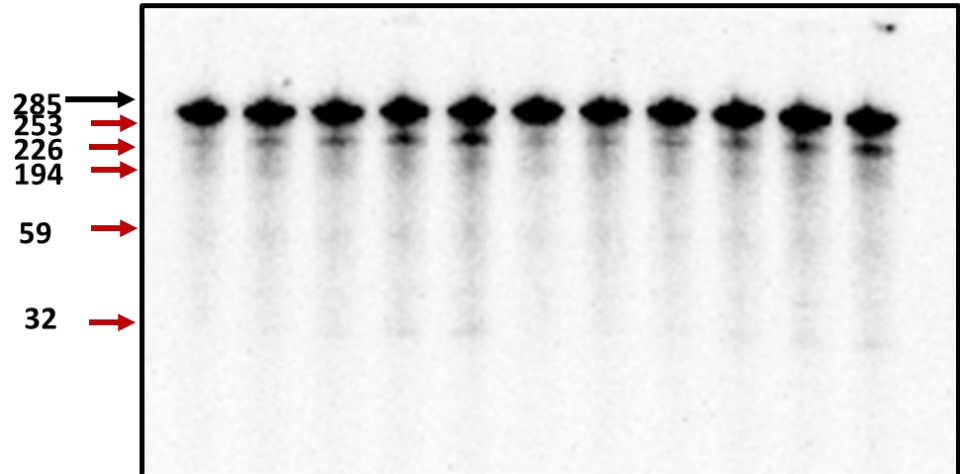


Figura 31. Análisis comparativo de la actividad catalítica de la ribozima tríplex sin espermidina y con espermidina 2mM. Se muestra el corrimiento electroforético en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 6% de las reacciones de catálisis de la ribozima tríplex en los valores de tiempo de 0, 15, 30, 60 y 120 minutos con espermidina 2mM (lado izquierdo de la imagen) y sin espermidina (lado derecho de la imagen). Se evidencia que en presencia de espermidina la ribozima genera más productos de catálisis que en ausencia de esta misma. La ribozima completa se indica con la flecha negra y los productos de catálisis se indican con flechas rojas.

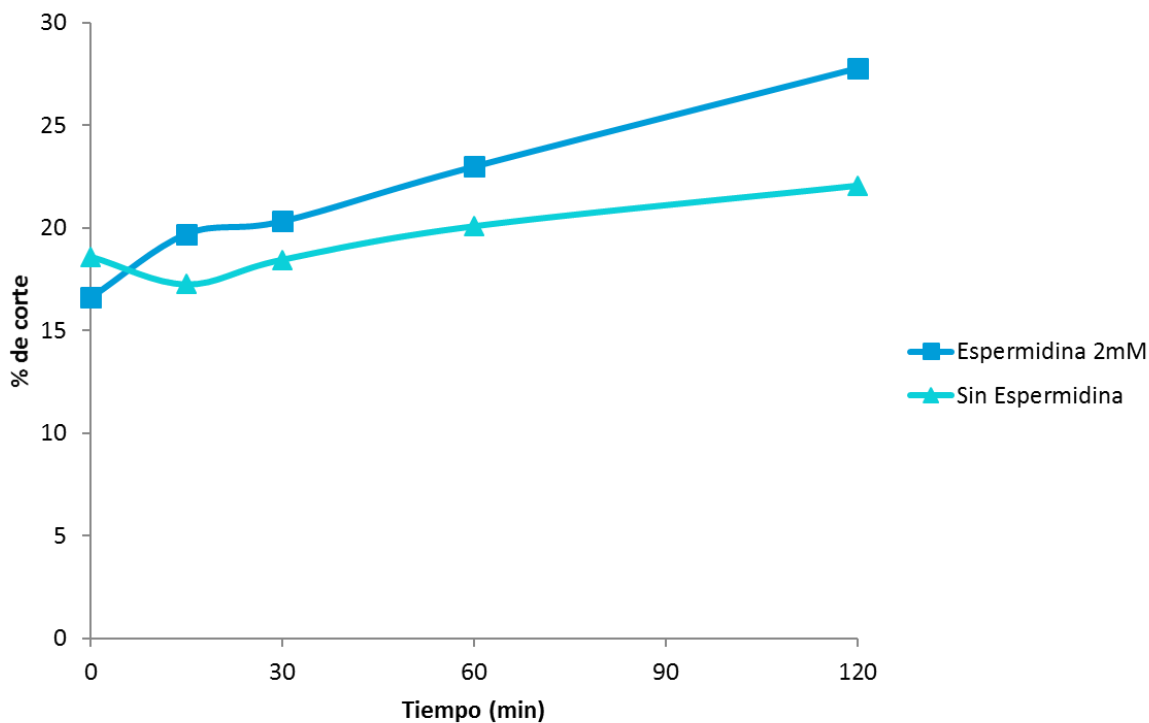


Figura 32. Gráfico del efecto de la espermidina en la catálisis de la ribozima Rz434bis. Se muestra un gráfico de Tiempo (min) vs % de corte mediante el uso del programa ImageQuant 5.2. Se observa que el % de corte de la ribozima tríplex es mayor en presencia de espermidina 2mM.

Posteriormente, se decidió aumentar las concentraciones de $MgCl_2$ y espermidina de buffer de ribozima con la finalidad de optimizar la catálisis de la ribozima Rz434bis. Primero se hicieron ensayos de catálisis con concentraciones finales de 12, 25 y 50mM de $MgCl_2$. Se incubaron a $37^{\circ}C$ evaluando sólo dos puntos en el tiempo 0 y 120 minutos. Posterior a esto, las reacciones fueron sometidas a un corrimiento electroforético a 250V durante 1 hora y 15 minutos en un gel de poliacrilamida 6% desnaturalizante para analizar los productos. Se observó que la reacción de catálisis de la ribozima es mayor conforme va aumentando la concentración de $MgCl_2$, observando un máximo con una concentración de 50mM. Sin embargo, como no se observó una diferencia relevante entre las catálisis obtenidas entre 50 y 25mM de $MgCl_2$ se decidió seleccionar esta última concentración para los próximos ensayos de catálisis (Figura 33).

$MgCl_2$ (mM)	12		25		50		
Tiempo (min)	0	120	0	120	0	120	Rz

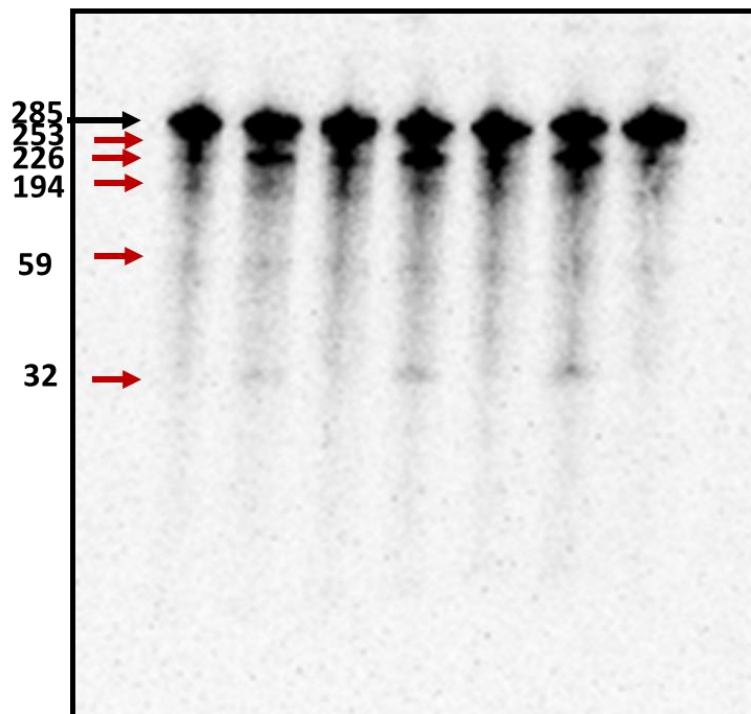


Figura 33. Efecto de la concentración de $MgCl_2$ en la actividad de catálisis de la ribozima Rz434bis.

Se muestran el corrimiento electroforético en un gel desnaturizante de poliacrilamida al 6% de tres ensayos de catálisis con la ribozima Rz434bis con una concentración final de $MgCl_2$ 12, 25 y 50 mM. Se observa que hay una mayor actividad catalítica con $MgCl_2$ 50mM. La ribozima completa se indica con la flecha negra y los productos de catálisis se indican con flechas rojas.

Ya establecida la concentración de $MgCl_2$ se decidió ahora aumentar la concentración de espermidina. Se realizaron dos ensayos de catálisis con espermidina 2 y 4mM como concentraciones finales en el tubo de reacción y estos se incubaron a 37°C tomando dos puntos de tiempo 0 y 120 minutos. Como se puede observar en la figura 34, la catálisis fue mayor al suplementar el ensayo de catálisis con una concentración final de espermidina 4mM.

Espermidina (mM)	2		4		
Tiempo (min)	0	120	0	120	Rz

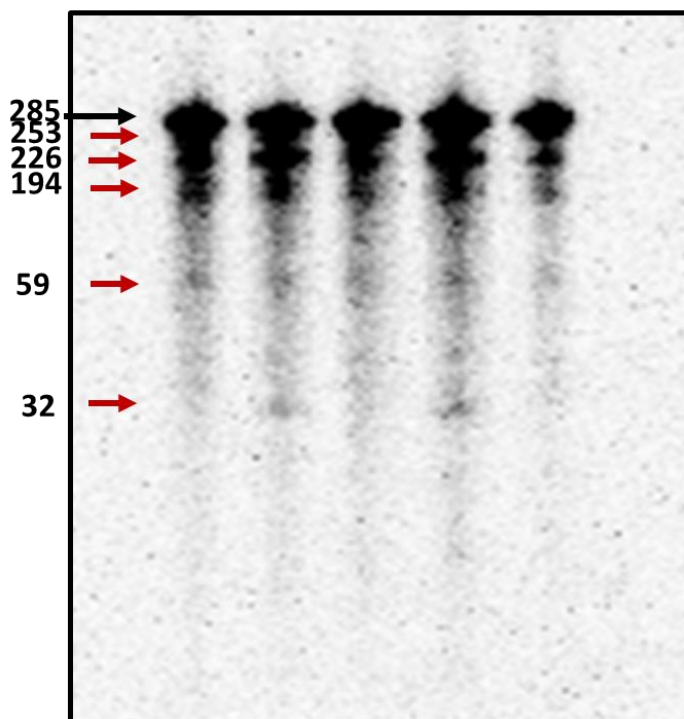


Figura 34. Efecto de la concentración de espermidina en la actividad catalítica de la ribozima RZ434bis. Se muestra el corrimiento electroforético en un gel desnaturante de poliacrilamida al 6% de los ensayos de catálisis realizados con la ribozima Rz434bis con concentraciones de espermidina 2 y 4mM. Se puede observar que la actividad catalítica aumenta cuando la concentración de espermidina en el ensayo de catálisis es de 4mM. La ribozima completa se indica con la flecha negra y los productos de catálisis se indican con flechas rojas.

Ya habiendo establecido las condiciones que mejoran la catálisis de la ribozima Rz434bis resumidas en la tabla 4, se procedió a aplicarlas a los ensayos de catálisis para las extremidades T5 y T3.

Se montaron las reacciones con las extremidades catalíticas T5 y T3 con las condiciones mejoradas de catálisis. En ambos ensayos de catálisis de T5 y T3 se observa la aparición de bandas que sugieren ser los fragmentos originados por auto-

procesamiento; sin embargo, estos resultados nos fueron contundentes ya que no se observa un cambio significativo al comparar la aparición de estos fragmentos entre el tiempo 0 y 120 minutos. (Figura 35). Lo que llevó a plantear dos explicaciones. La primera fue que tal vez estas bandas no corresponden a productos de catálisis, si no a degradación por nucleasas o a elementos co-purificados con los transcritos. La segunda fue que probablemente no se estaba llevando el plegamiento adecuado para su actividad. A pesar de que la configuración nativa de la ribozima *hairpin* es en “*cis*” esta difiere en estructura ya que cuenta con cuatro hélices en un arreglo *four-way junction* (Figura 3). Esta estructura aumenta eficiencia de la interacción de los “*loops*” A y B necesario para la catálisis (Tan *et al*, 2003). Sin embargo la ribozima tríplex realiza contes en “*cis*” sin que forme la estructura mencionada.

Las observaciones anteriores llevaron a la construcción de extremidades catalíticas mutadas, es decir, sin actividad para hacer ensayos comparativos de transcripción *in vitro* y de catálisis.

Tabla 5. Concentraciones de MgCl₂ y espermidina empleadas para los ensayos de catálisis de Rz434bis y las extremidades catalíticas T5 y T3.

Condición de catálisis	Rz434bis
Concentración de MgCl ₂ (mM)	25
Concentración de Espermidina (mM)	4

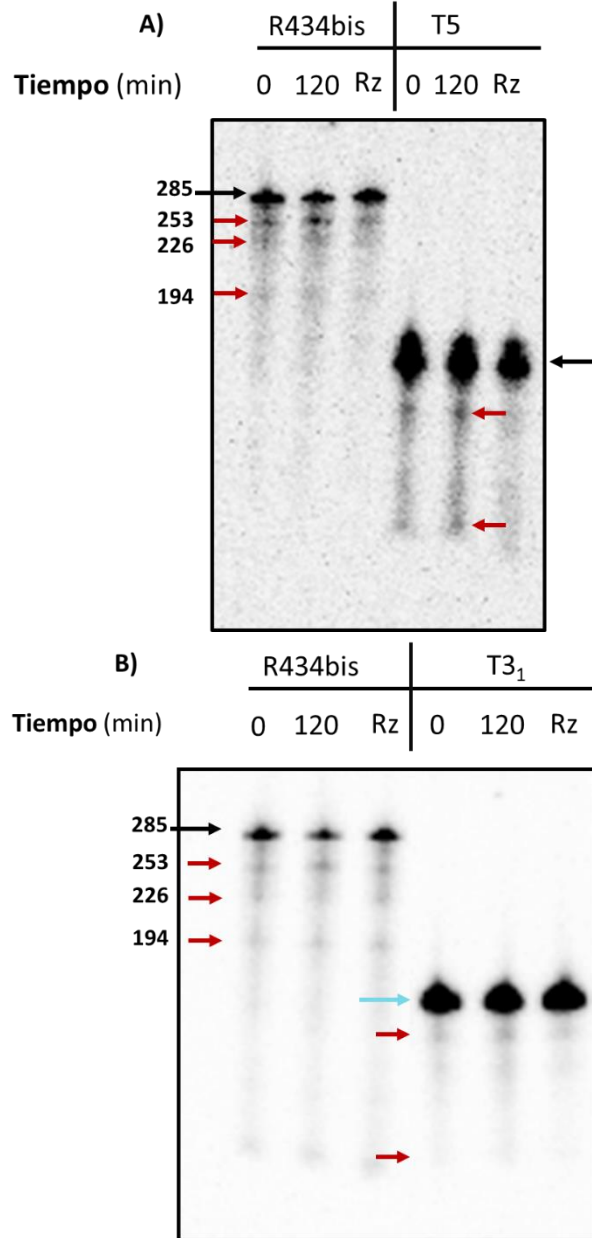


Figura 35. Ensayos de catálisis de las extremidades catalíticas T5 y T3. Se muestra el corrimiento electroforético en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 6% de los ensayos de catálisis de T5 (A) y T3 (B) ambas acompañadas de los ensayos de catálisis de la ribozima Rz434is como control positivo de catálisis y marcador de peso molecular. En ambas imágenes se indica con una flecha negra la ribozima completa Rz434bis y en azul las extremidades catalíticas T5 y T3. Las flechas rojas indican los productos de la catálisis y los pesos moleculares son indicados para los productos de Rz434bis. La actividad catalítica observada para las extremidades T5 y T3 es muy pobre, la cual no permite concluir si son activas.

Construcción de las extremidades T5mut y T3mut

Por otro lado se diseñaron dos ODNs que codifican para el mismo sistema ribozímico para T5 y T3 pero con mutaciones puntuales el dominio catalítico (Figura 17) con el objetivo de inactivarlo y obtener unas extremidades catalíticas no funcionales que servirían como controles negativos. Esto con la finalidad de comparar tanto los ensayos de transcripción *in vitro* como ensayos de catálisis.

Siendo así se obtuvo el diseño de cuatro ODNs las extremidades catalíticas mutadas las secuencias respectivas complementarias, los cuales fueron T5mut, T5mutc, T3mut y T3mutc. Los ODNs fueron purificados y cuantificados. Posteriormente, se hibridaron obteniendo los dúplex T5mut/T5mutc y T3mut/T3mutc (Figura 36).

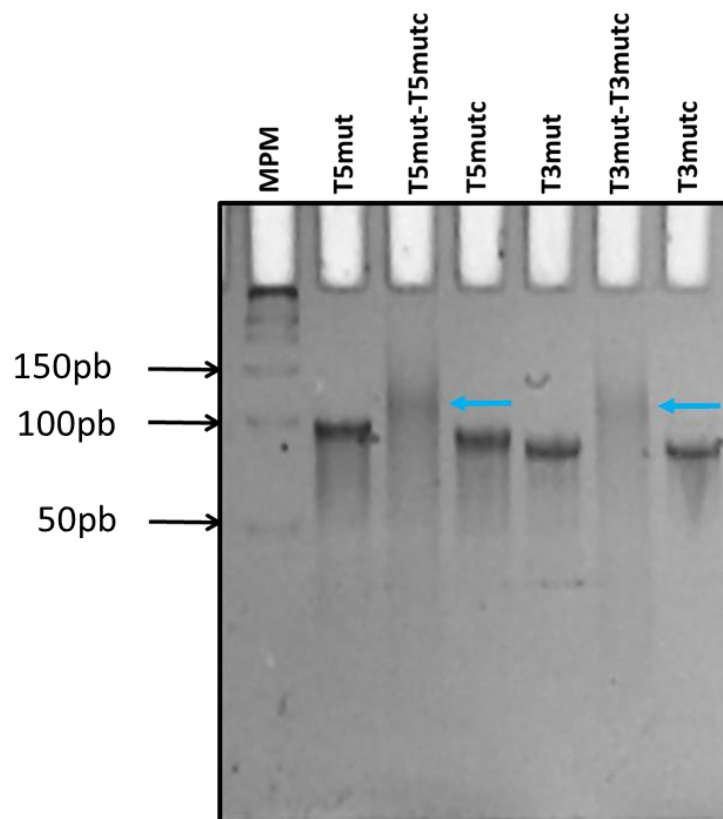


Figura 36. Hibridación de los ODNs T5mut, T5mutc, T3mut y T3mutc. Se observa el corrimiento de los ODNs dúplex T5mut/T5mutc y T3mut/T3mutc con una banda difusa con un tamaño molecular de 101pb (flechas azules). Adicionalmente, también se observa el corrimiento de los ODNs de cadena sencilla usados para la formación de los híbridos con un corrimiento electroforético

indistinto a su longitud en nucleótidos. El corrimiento electroforético se realizó en un gel nativo de poliacrilamida al 12% a 150 V durante 1 hora.

Estos ODNs de doble cadena después fueron utilizados como molde para amplificación por PCR (Figura 37). Las reacciones de PCR para estos ODNs fueron realizadas bajo las condiciones previamente establecidas y con los mismo *primers* que se usaron las reacciones de PCR de T5 y T3. Los amplificados obtenidos fueron analizados mediante un corrimiento electroforético en un gel nativo de poliacrilamida al 12%. Con esto se puso en evidencia la obtención de un producto de doble cadena con un tamaño de 101pb correspondiente al esperado. Sin embargo, aparece un producto inespecífico de un tamaño molecular menor durante la amplificación de T3. En esta ocasión ya no se realizó una estandarización de las condiciones de la PCR, en cambio, se realizó una extracción y purificación del producto de 101pb.

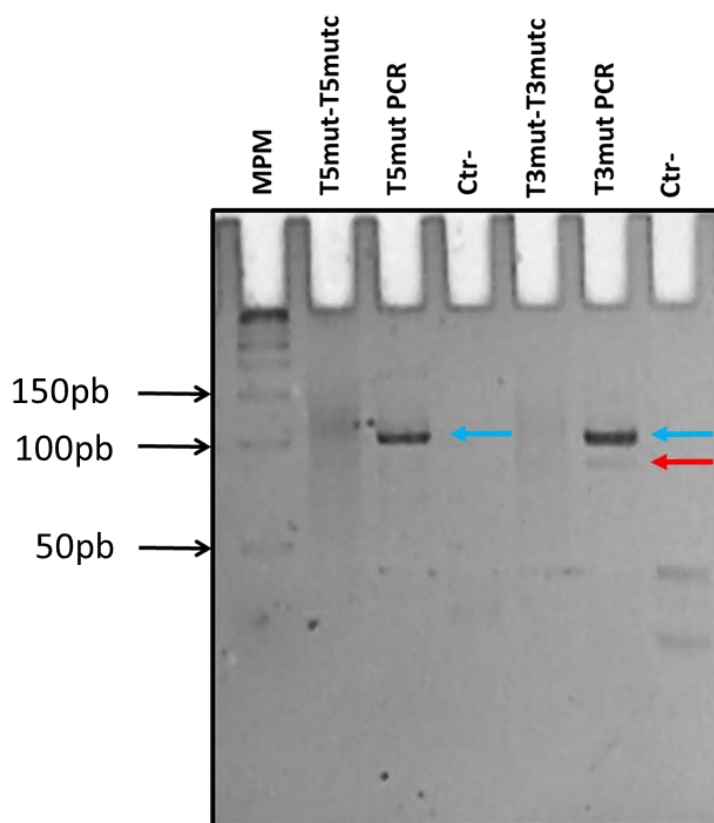


Figura 37. Amplificación de los ODNs dúplex T5mut y T3mut por PCR. Se observa el corrimiento electroforético de los ODNs amplificados T5mut y T3mut en el tamaño esperado de 101pb (flechas

azules). Adicionalmente se observa la aparición de un producto secundario de tamaño inferior al amplificado de T3mut (flecha roja). En el corrimiento electroforético se incluyeron los moldes de amplificación T5mut/T5mutc y T3mut/T3mutc y respectivos controles negativos de PCR. El corrimiento electroforético se realizó a 150V durante 1 hora en un gel nativo de poliacrilamida al 12%.

Transcripción *in vitro* de T5mut Y T3mut

Se realizaron cinco reacciones de transcripción como se describió previamente marcando los transcritos por incorporación de α -P³²UTP para generar la ribozima Rz434bis, las extremidades T5, T5mut, T3 y T3mut. Las reacciones fueron detenidas con buffer Stop, calentadas a 65°C y los transcritos fueron separados mediante un corrimiento electroforético en un gel desnaturizante de poliacrilamida al 6%. Se observó sólo cambios en la abundancia relativa de los transcritos generados a partir de los moldes T5 y T5mut. Se observan dos transcritos asignados con la letra a y b que están en una menor cantidad en la reacción de transcripción de T5 en comparación a la de T5mut. Esto sugirió que los dos transcritos tienen actividad catalítica y que se auto-procesan al momento de su generación por lo que se ven disminuidos en el gel. Por otro lado, se observó un patrón diferente de bandeo entre T3 y T3mut y los transcritos que coincidieron en tamaño no diferenciaban en cuanto a cantidad lo que llevó a pensar que ambas extremidades T3 y T3mut carecen de actividad (Figura 38). Así se decidió extraer, las bandas de todos los transcritos que correspondieran en tamaño a aquellos seleccionados como activos de la extremidad catalítica T5.

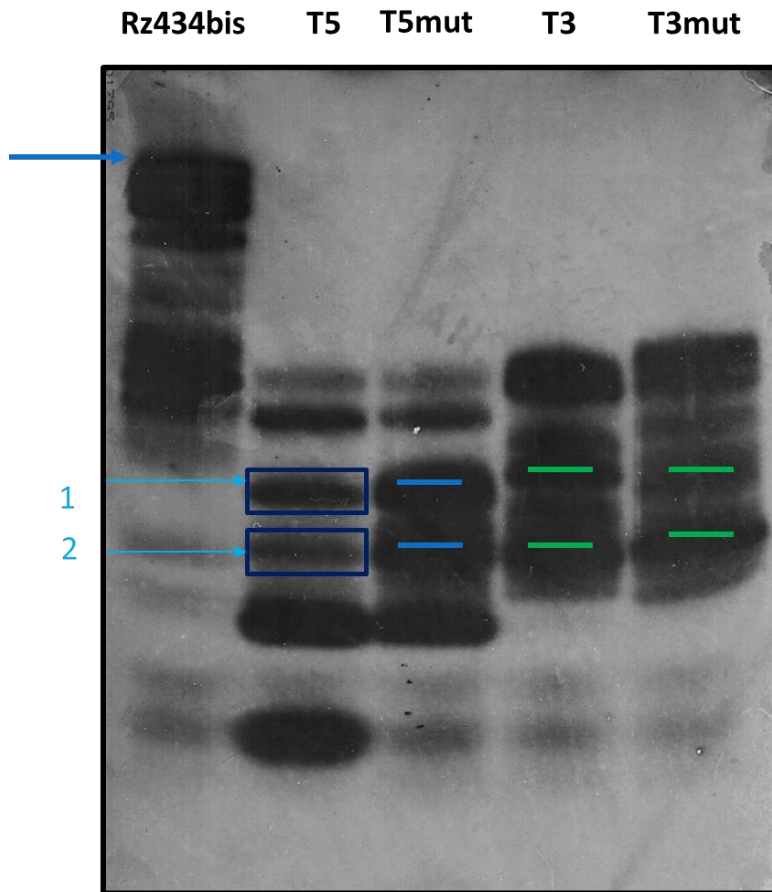
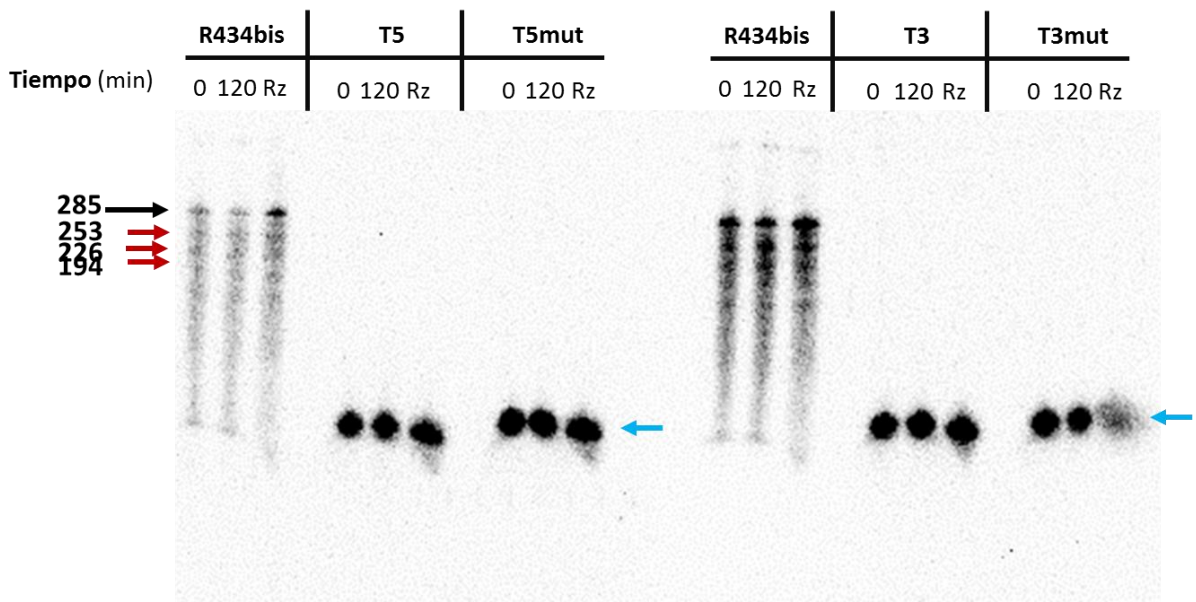


Figura 38. Transcripciones *in vitro* de Rz434bis, T5, T5mut, T3 y T3mut. Se obtuvieron transcritos a partir del plásmido pRz434bis digerido con Sac I y de los ODNs dúplex de T5, T5mut, T3 y T3mut. Se seleccionó el transcrito de mayor tamaño molecular indicado con una flecha azul para su extracción. Por otro lado los dos transcritos marcados como activos para T5 denominados 1 y 2 (rectángulos azules) se observan en menor proporción que los correspondientes obtenidos de T5mut (líneas azules). Los transcritos de T3 y T3mut que corresponden al peso molecular de los seleccionados para T5 son señalados con líneas verdes. Todos los transcritos marcados en la imagen fueron extraídos y purificados para ensayos de catálisis. El corrimiento electroforético se hizo a 250V durante 1hora y 15 minutos en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 6% y 7M urea.

Ensayos de catálisis comparativos de las extremidades T5, T5mut, T3 Y T3mut

Los transcritos seleccionados fueron extraídos del gel, purificados y ensayados en condiciones de catálisis con la intención de comparar su actividad. Los ensayos de catálisis incluyeron a la ribozima Rz434bis como un referente de catálisis y sus fragmentos como marcadores de peso molecular. Las reacciones de catálisis fueron realizadas bajo las condiciones ya establecidas considerando dos tiempos de reacción que fueron 0 y 120 minutos. Las reacciones fueron analizadas mediante un corrimiento electroforético a 250V durante 1 hora y 15 minutos en un gel desnaturizante de poliacrilamida al 6%. Como se puede observar en la figura 39, ninguno de los cuatro transcritos seleccionados mostró actividad. Aunque se observa una banda de menor peso molecular con respecto al transcrito completo, no se puede decir que sea un producto de catálisis ya que este se presente en todos los transcritos analizados y no cambia en cuanto a cantidad en relación al tiempo. Lo que sugirió que las bandas extraídas y probadas para este experimento de T5 y T3 carecen de actividad catalítica y probablemente no corresponden a los transcritos completos que pudieran mostrar actividad.

A)



B)

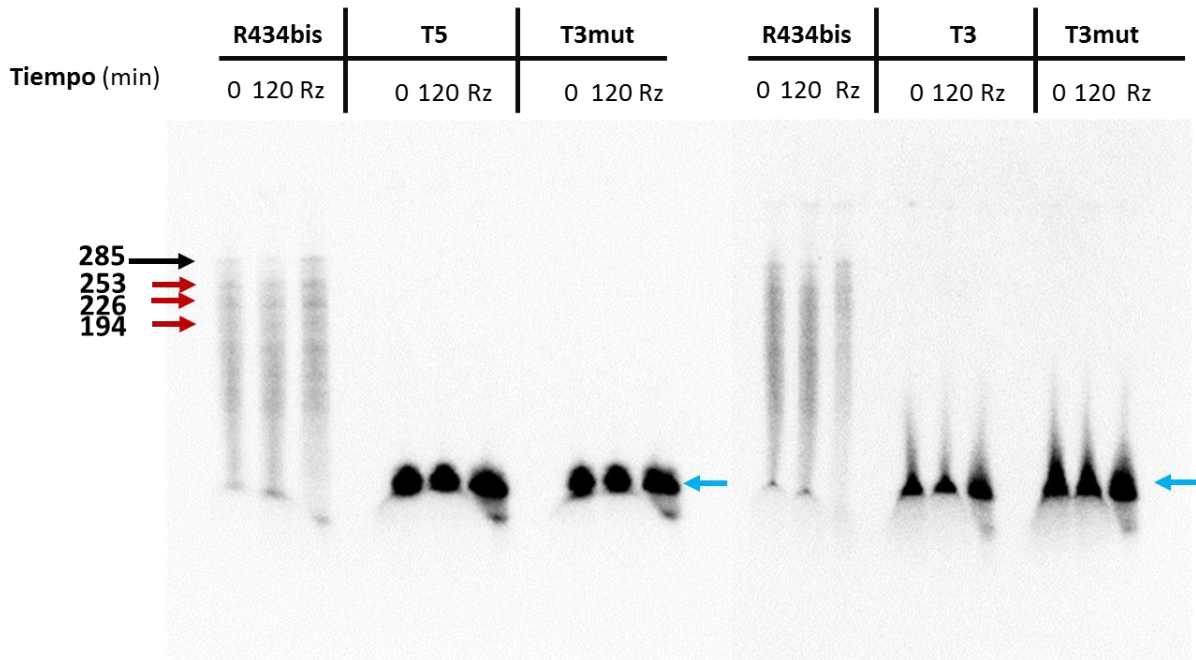


Figura 39. Ensayos de catálisis de la ribozima Rz434bis, T5, T5mut, T3 y T3mut. Se muestran los ensayos de catálisis para el transcrito 1 (A) y para el transcrito 2 (B) seleccionados de T5 y los transcritos correspondientes del mismo tamaño molecular de T5mut, T3 y T3mut. Se incluye la catálisis de Rz434bis como control positivo. Se indican con una flecha azul los transcritos de tamaño molecular completo. Se observa que no hay generación de productos en ninguno de todos los transcritos probados. La ribozima completa Rz434bis se indica con una flecha negra y los productos con flechas rojas con su correspondiente tamaño molecular. La electroforesis se realizó en un gel desnaturante de poliacrilamida al 6% 7M urea.

Construcción de las extremidades T5 y T3 y los sustratos S5 y S3

Con la intención de demostrar si las extremidades tienen actividad catalítica, se decidió realizar su diseño para realizar corte en “*trans*” ya que fue la configuración en la cual las ribozimas 434 y 419 (de las cuales surgieron T5 y T3, respectivamente) mostraron actividad. Por lo tanto, se diseñaron 4 ODNs que tuvieran las secuencias de las extremidades y sus sustratos por separado. El diseño fue el siguiente:

T5t → 5' - Promotor T7 - Extremidad T5 - Dominio Rz - 3'

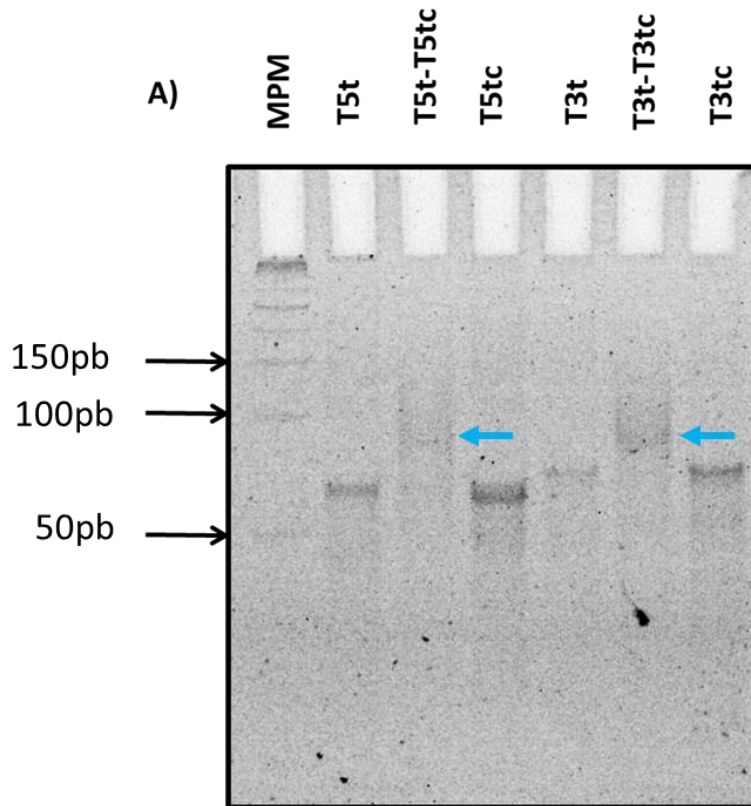
S5 → 5' - Promotor T7 - Sustrato S5 - 5'

T3t → 5' - Promotor T7 - Dominio catalítico Rz - Extremidad T3 - 3'

S3 → 5' - Promotor T7 - Sustrato S3 3'

En los cuales, los ODNs de las extremidades T5 y T3 tiene 81 bases mientras que los de los sustratos tiene 36. Posteriormente, se requirió la síntesis de estos ODNs y sus ODNs complementarios. Estos ODNs fueron purificados, cuantificados e hibridados para la obtención de ODNs de doble cadena. Las hibridaciones fueron realizadas en cantidades equimolares, calentadas a 95⁰C y se permitió la disminución de forma paulatina para favorecer la hibridación de los ODNs. Los híbridos T5t/T5tc, T3t/t3c, S5/S5c y S3/S3c fueron analizados en conjunto con sus respectivos ODNs de cadena sencilla mediante un corrimiento electroforético a 150V durante en un gel de poliacrilamida al 12% (Figura 40). Se obtuvieron ODNs de doble cadena tanto de las extremidades como de los sustratos; sin embargo los ODNs dúplex T5t/T5tc, T3t/t3c y S5/S5c hibridados no tuvieron un patrón electroforético correspondiente al tamaño molecular esperado mientras que S3/S3c sí, por otro lado los ODNs de cadena sencilla tuvieron un patrón electroforético independiente a su longitud de bases. Posteriormente, cada ODN de doble cadena obtenido por hibridación fue utilizado como molde para su amplificación por PCR. Para estas reacciones de PCR se hizo uso del *primer T5forward* como un cebador común para todos los ODNs dúplex ya que este primer contiene la secuencia del promotor T7 y los cuatro ODNs tiene la secuencia complementaria en su secuencia. Por lo otro lado, solo para el ODN T5t/T5tc fue posible utilizar el *primer T5reverse*

pero para los tres ODNs dúplex restantes se diseñaron tres primer diferentes de manera que se unieran a los extremos 3' de cada ODN. Estos tres *primers* fueron nombrados como *T3reverse*, *S5reverse* y *S3reverse*. Posteriormente, se procedió a la amplificación de los moldes de las extremidades T5t y T3t y los sustratos S5 y S3 bajo las condiciones ya establecidas para PCR para T5 y T3 descritas anteriormente. Los productos de PCR fueron analizados mediante un corrimiento electroforético en un gel nativo de poliacrilamida al 12% en conjunto con los ODNs utilizados como molde y los controles negativos correspondientes. En la figura 41, se observa la obtención de ODNs correspondientes al tamaño molecular esperado. En el caso de los amplificados de T5t y T3t fue de 81pb y de los sustratos S5 y S3 fue de 36pb es posible observar que la reacción de PCR corrigió el problema observado en los ensayos de hibridación para T5t/T5t, T3t/t3c y S5/S5c ya que los amplificados si tiene el peso molecular correcto.



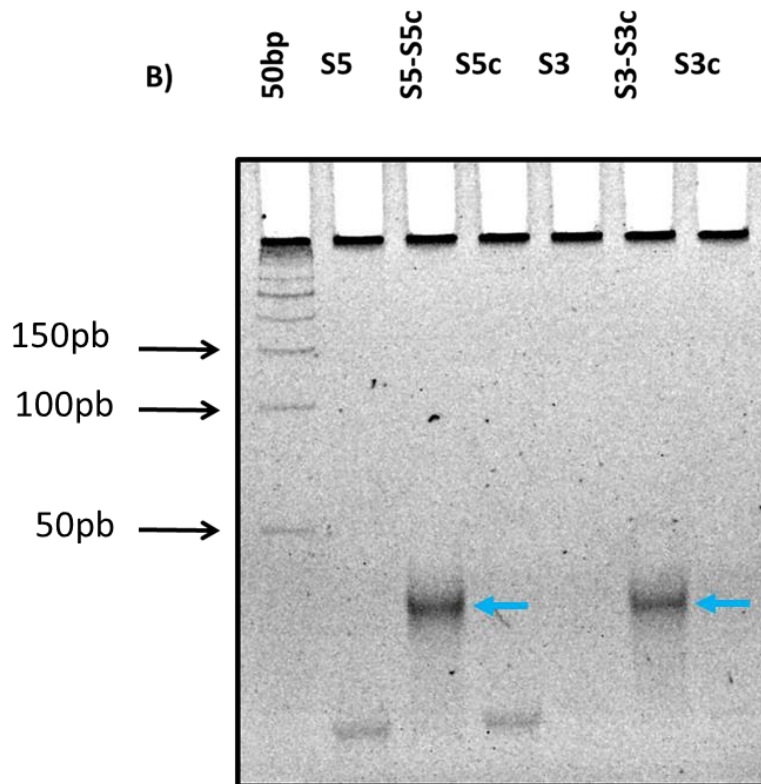
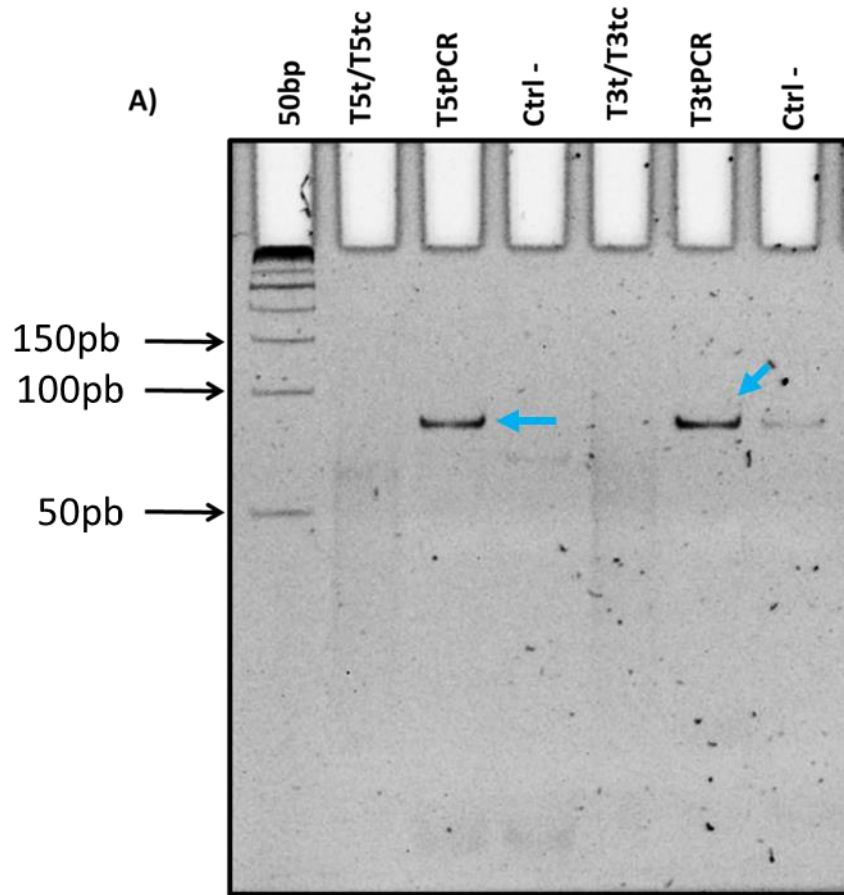


Figura 40. Hibridación de los ODNs T5t, T5tc, T3t, T3tc, S5, S5c, S3 y S3c. A) Se observan los ODNs de doble cadena T5t/T5tc y T3t/T3tc formados durante la hibridación con un tamaño aparentemente inferior al tamaño de 81pb esperado (flecha azul). Se observan también los ODNs T5t, T5tc, T3t y T3tc de cadena sencilla de los cuales su migración fue independiente a su longitud de nucleótidos. B) Se observan los ODNs de doble cadena S5/S5c y S3/S3c formados durante la hibridación con un tamaño aparentemente inferior al tamaño de 36pb esperado (flecha azul). Se observan también los ODNs S5 y S5t, de cadena sencilla de los cuales su migración fue independiente a su longitud de nucleótidos. Los ODNs S3 y S3c resultan difíciles de ver, sin embargo son visibles al hibridarse y formar el dúplex. El corrimiento electroforético se realizó a 150V durante 1 hora en un gel nativo de poliacrilamida al 12%.



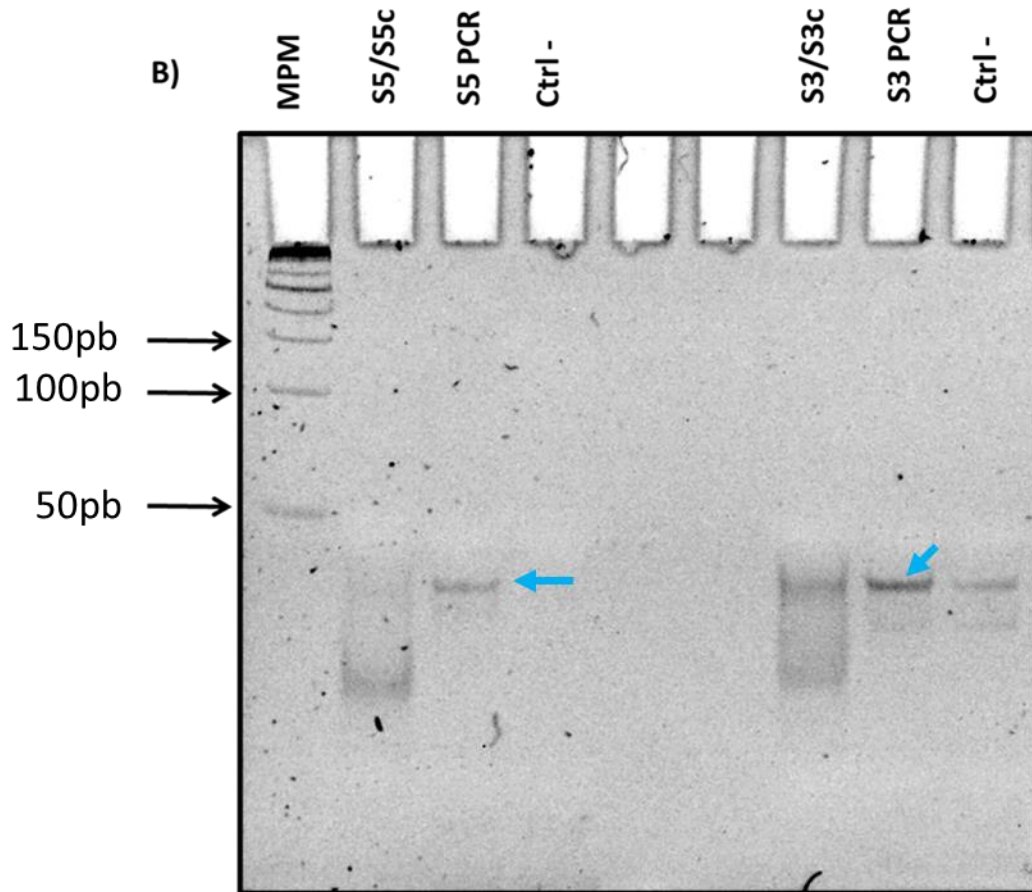


Figura 41. Amplificación por PCR de los ODNs dúplex T5t, T3t, S5 y S3. A) Se observa los amplificados de T5t y T3t con el tamaño molecular esperado de 81pb (flecha azul), los ODNs T5t/T5tc y T3t/T3tc que se utilizaron como molde de amplificación muestran un tamaño inferior. B) Se observa los amplificados de S5 y S3t con el tamaño molecular esperado de 36pb (flecha azul), ambos ODNs S5/S5t y S3/S3c que se utilizaron como molde de amplificación muestran el mismo tamaño que los amplificados. El corrimiento electroforético se realizó a 150V durante 1 hora en un gel nativo de poliacrilamida al 12%.

Transcripción *in vitro* de las extremidades T5 y T3 y de los sustratos S5 y S3

Los productos amplificados de los ODNs que codifican para las extremidades y los sustratos correspondientes, fueron utilizados en reacciones de transcripción *in vitro*. Los amplificados de T5t y T3t fueron usados para la obtención de las extremidades T5 y T3 sin marca radiactiva mientras que los amplificados de S5 y S3 fueron usados para la obtención de los sustratos radio-marcados. Esto con la finalidad de sólo seguir el procesamiento de los sustratos en los ensayos de catálisis. Las reacciones de transcripción fueron realizadas bajo las condiciones antes descritas. Los transcritos generados a partir de cada molde fueron separados mediante un corrimiento electroforético a 250V durante 1 hora y 15 minutos en geles desnaturalizantes al 12%. Los transcritos generados a partir de los moldes que codifican para las extremidades catalíticas fueron visualizados mediante tinción con bromuro de etidio y exposición con luz UV (Figura 42). Los transcritos seleccionados para determinar su actividad catalítica fueron aquellos que tuvieran un peso molecular inferior al molde y su cantidad fuera representativamente mayor. Dado lo anterior se seleccionó un transcrito para T5 y dos para T3 (T3a y T3b). Por otro lado, los transcritos generados a partir de los moldes que codifican a los sustratos fueron analizados mediante la exposición de una placa de rayos X con el gel (Figura 44). Se observaron los transcritos generados y se seleccionaron y extrajeron para ser utilizados en los ensayos de catálisis. Los transcritos extraídos y purificados fueron analizados mediante un corrimiento electroforético a 150V durante 1 hora en un gel de poliacrilamida al 12% para corroborar su tamaño molecular y su integridad (Figura 43).

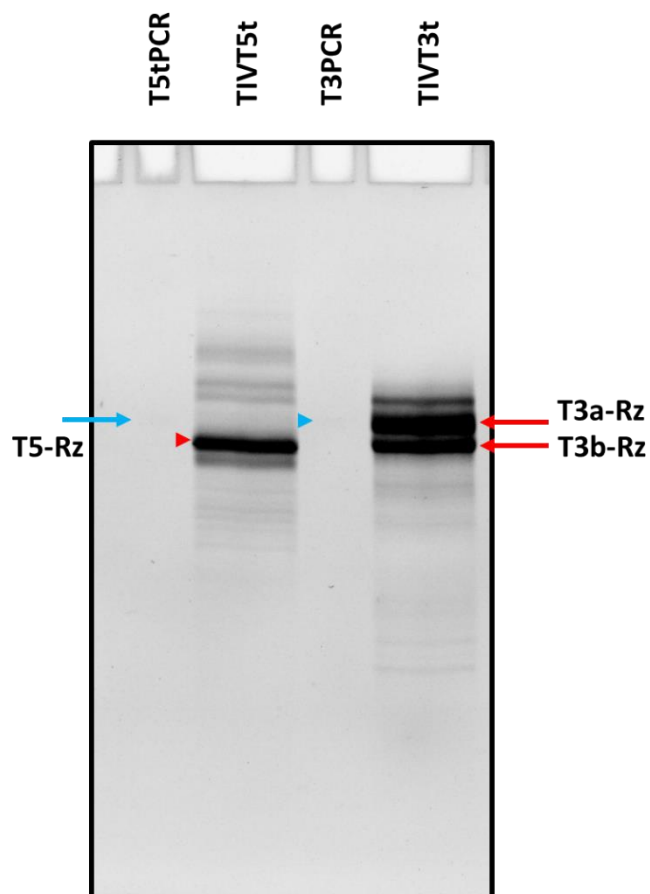


Figura 42. Transcripción *in vitro* de T5 y T3. Se observan los transcritos obtenidos durante la reacción de transcripción así como los amplificados de PCR de T5t y T3t como referencia de tamaño molecular. Las flechas azules indican la posición de los amplificados de PCR. Las flechas rojas indican los transcritos seleccionados para su extracción y purificación para los ensayos de catálisis. El corrimiento electroforético se realizó a 250V durante 1 hora y 30 minutos en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12%.

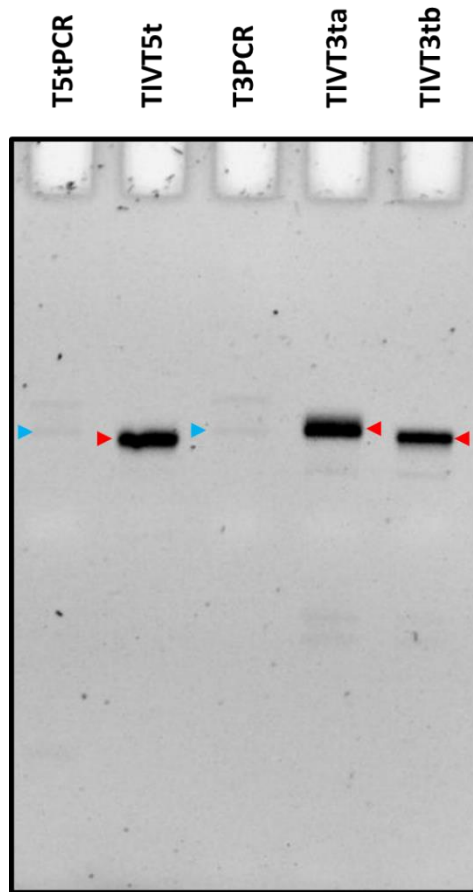


Figura 43. Análisis de integridad de las extremidades catalíticas T5 y T3. Se observa las extremidades catalíticas T5 y T3 (cabezas de flechas rojas) correspondientes a los transcritos purificados de T5-Rz, T3a y T3b (61b en todos los casos) en los carriles correspondientes. Los productos de PCR de T5t o T3t (señalados con las cabezas de flechas azules) fueron adicionados como referencia de tamaño molecular (81b). El corrimiento electroforético se realizó a 150V durante 1 hora en un gel desnaturalizante al 12% Urea 7M.

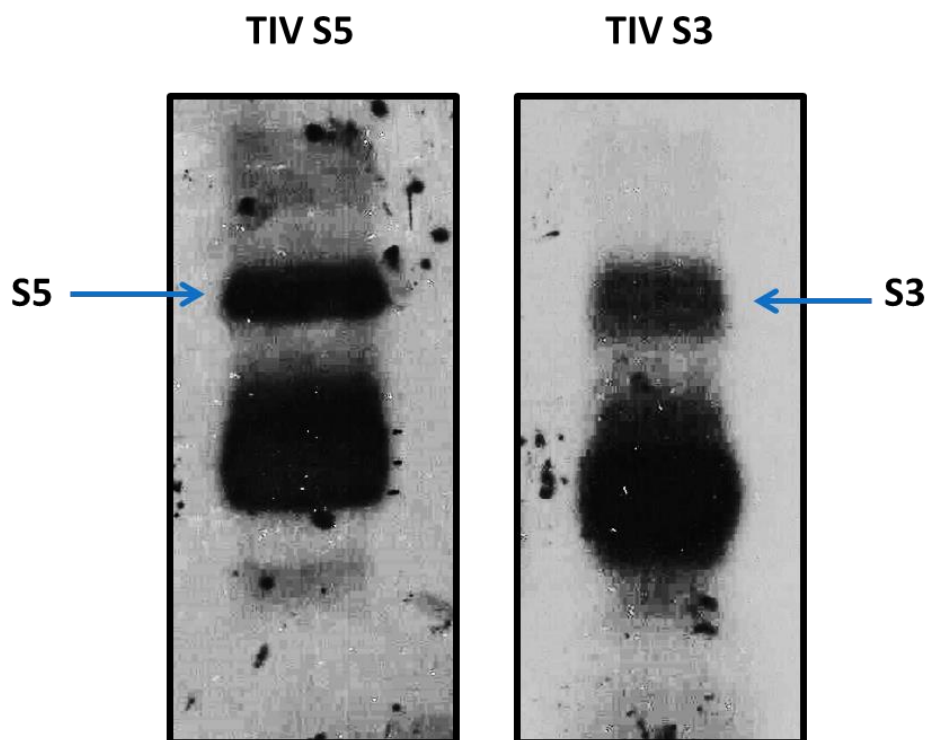


Figura 44. Transcripción *in vitro* de los sustratos S5 y S3. Se muestran los transcritos generados por transcripción *in vitro* de los sustratos S5 y S3. Se seleccionaron las bandas de mayor peso molecular (16b) para su extracción y purificación. El corrimiento electroforético se hizo en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12% urea 7M.

Ensayos de catálisis de las extremidades T5 y T3 en configuración *trans*

Teniendo tanto las extremidades como los sustratos purificados, se procedió a realizar los ensayos de catálisis incubando en conjunto cada extremidad con su sustrato (se utilizó solo el transcrito mayor de los sustratos) correspondiente en las condiciones previamente descritas en la sección de *materiales y métodos*. Las reacciones de catálisis fueron analizadas mediante un corrimiento electroforético a 250V durante 1 hora y 15 minutos en un gel de poliacrilamida al 12% desnaturalizante, En la figura 45 se puede observar que la extremidad catalítica T5 procesó a su sustrato S5 lo cual es evidente después de 2 horas de incubación generando los dos productos esperados (11 y 5 bases) demostrando así su actividad catalítica. Sin embargo, ninguno de los dos candidatos obtenidos, para funcionar como la extremidad T3, pudieron procesar al sustrato S3 en el tiempo de

incubación lo que indica que son inactivas. Las bandas de tamaño molecular inferiores al sustrato completo S3 pueden deberse a degradación de la muestra durante el proceso de extracción y purificación, ya que estas bandas no se modifican a lo largo del tiempo y aparecen en el carril marcado con letra S el cual es un control del sustrato, fue incubado en condiciones de catálisis pero sin los transcritos de la extremidad T3.

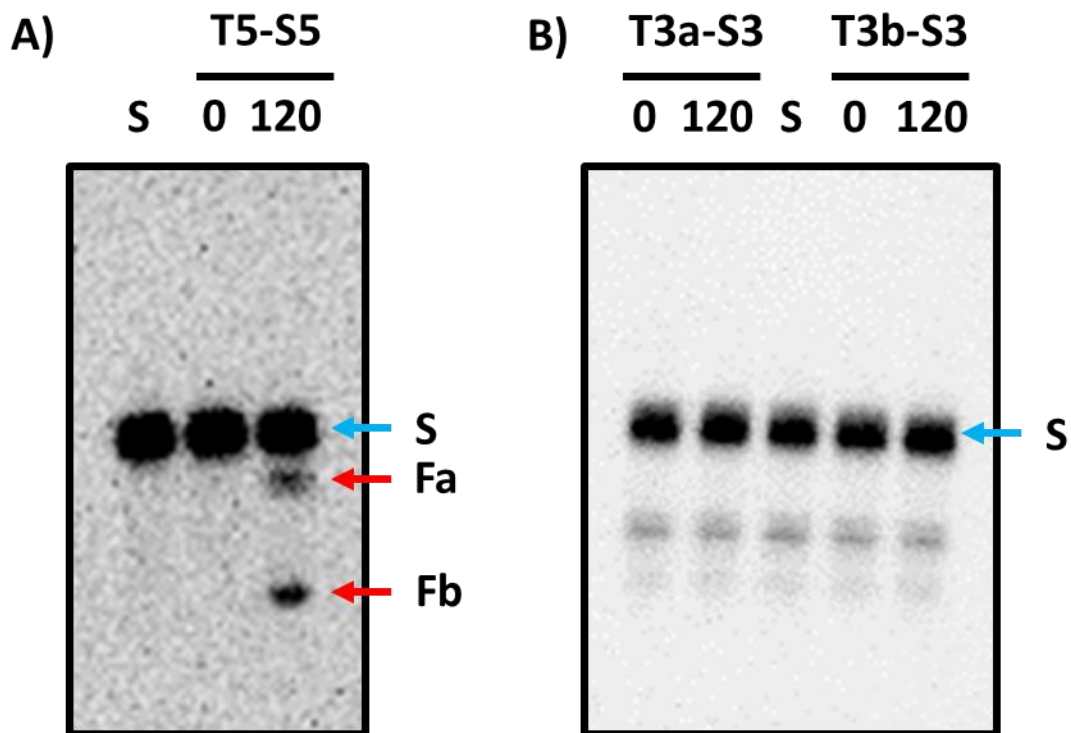


Figura 45. Ensayo de catálisis de las extremidades catalíticas T5 y T3. Se muestran los ensayos de catálisis al tiempo 0 y 120 minutos de reacción y el control del sustrato (S) sin ribozima. En la imagen **A)** se puede observar la aparición de 2 bandas (Fa y Fb, 11 y 5 bases respectivamente) productos del corte del sustrato S5 mediado por la extremidad T5. En la imagen **B)** se muestra la ausencia de productos de corte del sustrato S3 al incubarlos con los transcritos T3a y T3b. Las bandas de menor peso molecular que parecen sugieren ser productos de degradación o elementos co-purificados con el sustrato S3. El corrimiento electroforético se realizó a 250V durante 1 hora y 15 minutos en un gel desnaturante de poliacrilamida al 12% Urea 7M.

Caracterización cinética de la extremidad T5

El planteamiento inicial para la caracterización cinética de la extremidad T5 fue bajo condiciones de recambio múltiple es decir, una mayor concentración de sustrato que de ribozima, para lo cual se realizó el primer experimento ajustando la concentración de ribozima a 1pM y 3.75pM de sustrato en una cinética de 0 a 120 minutos de reacción. Sin embargo, no se observó la fracción cortada del sustrato en ningún punto de la cinética (Figura 46). Dado lo anterior, se decidió cambiar las condiciones de reacción a recambio sencillo. El análisis cinético fue realizado con cuatro concentraciones diferentes de sustrato (3.75, 7.5, 15 y 30pM) y la concentración de la ribozima constante (1.5 μ M) para obtener los datos de la constante de velocidad observada k_{obs} para cada concentración y determinar sus parámetros cinéticos (Figuras 48, 49, 50 y 51). La fracción cortada fue analizada como se mencionó en el apartado de *materiales y métodos* y un ejemplo de este procedimiento se muestra en la figura 47.

Tiempo (min) 
S 0 15 30 60 120

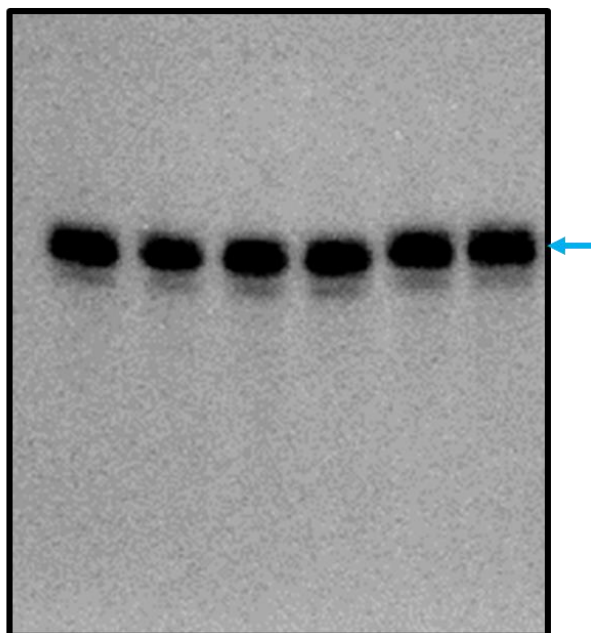


Figura 46. Cinética de catálisis de la extremidad T5 1pM con S5 3.75pM. Corrimiento electroforético en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12% Urea 7M de los ensayos de catálisis realizados con diferentes tiempos de incubación (0-120min) a 37°C y el control del sustrato (S) sin ribozima en condiciones de recambio múltiple. En la imagen es posible observar las bandas pertenecientes al sustrato completo (flecha azul) sin embargo no se observa la presencia de productos de corte a lo largo de la cinética.

Tiempo (min)

S 0 15 30 60 120

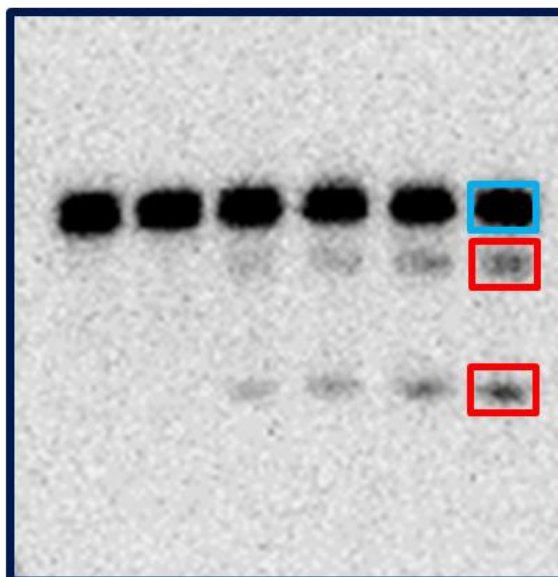


Figura 47. Análisis de los ensayos de catálisis.

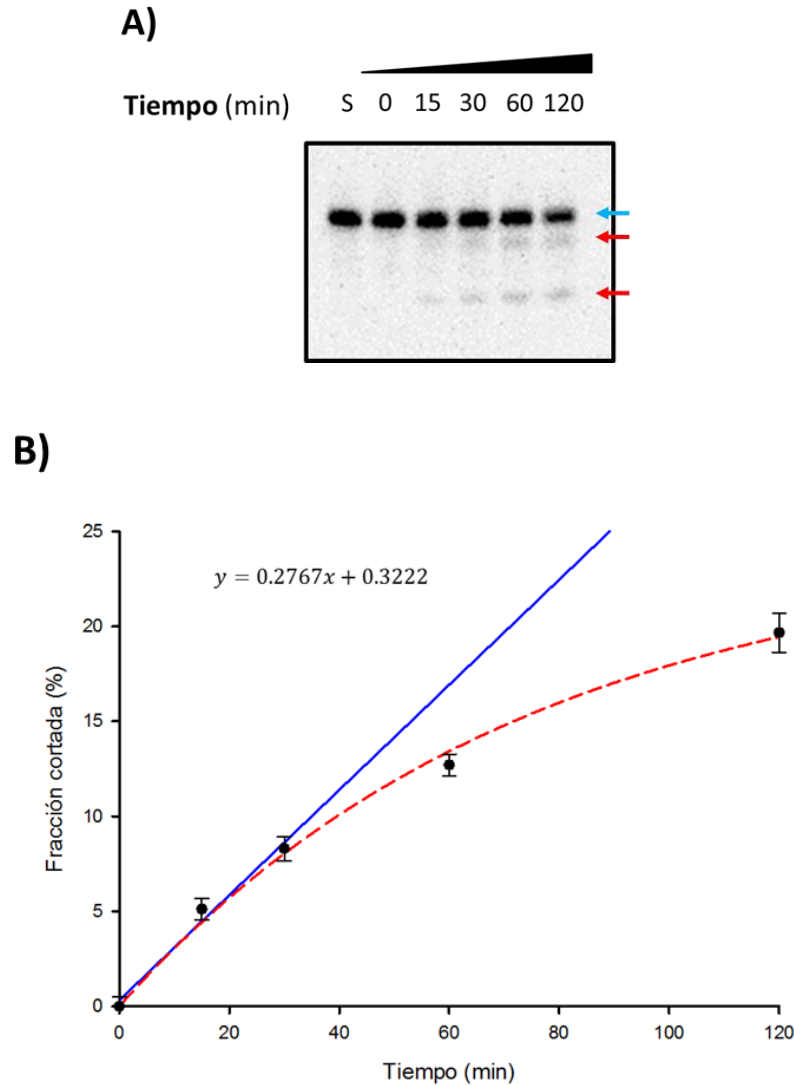


Figura 48. Cinética de catálisis de la extremidad T5 a 3.75pM [S5]. A) Corrimiento electroforético en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12% de los ensayos de catálisis realizados con diferentes tiempos de incubación (0-120min) a 37°C y el control del sustrato (S) sin ribozima. La flecha azul indica al sustrato completo y las flechas rojas indican dos fragmentos correspondientes a la fracción cortada. **B)** En el gráfico se muestra los datos obtenidos de la cuantificación de la cinética en puntos negros con barras de error de tres experimentos independientes. El comportamiento exponencial de la cinética es indicado por la curva naranja con una $r^2 = 0.995$. El comportamiento lineal solo de la fase inicial de la catálisis es indicado con la línea azul y la ecuación con una $r^2 = 0.9822$.

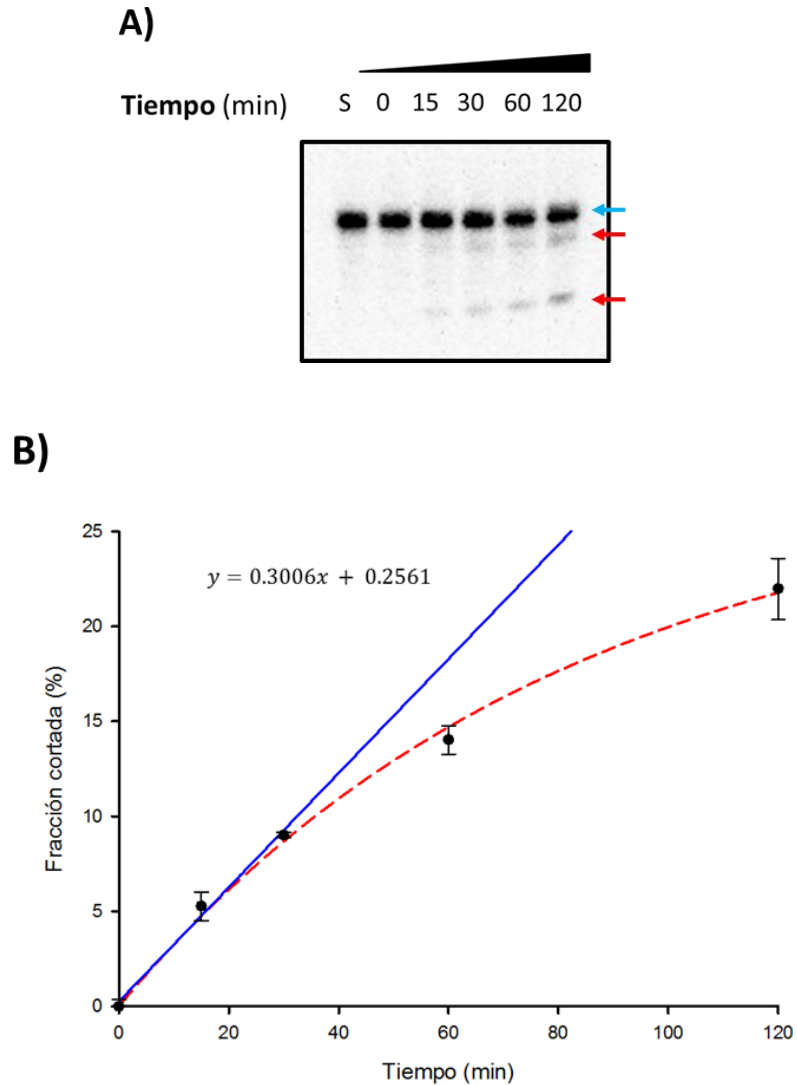


Figura 49. Cinética de catálisis de la extremidad T5 a 7.5pM [S5]. A) Corrimiento electroforético en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12% de los ensayos de catálisis realizados con diferentes tiempos de incubación (0-120min) a 37°C y el control del sustrato (S) sin ribozima. La flecha azul indica al sustrato completo y las flechas rojas indican dos fragmentos correspondientes a la fracción cortada. **B)** En el gráfico se muestra los datos obtenidos de la cuantificación de la cinética en puntos negros con barras de error de tres experimentos independientes. El comportamiento exponencial de la cinética es indicado por la curva naranja con una $r^2 = 0.997$. El comportamiento lineal solo de la fase inicial de la catálisis es indicado con la línea azul y la ecuación con una $r^2 = 0.9904$.

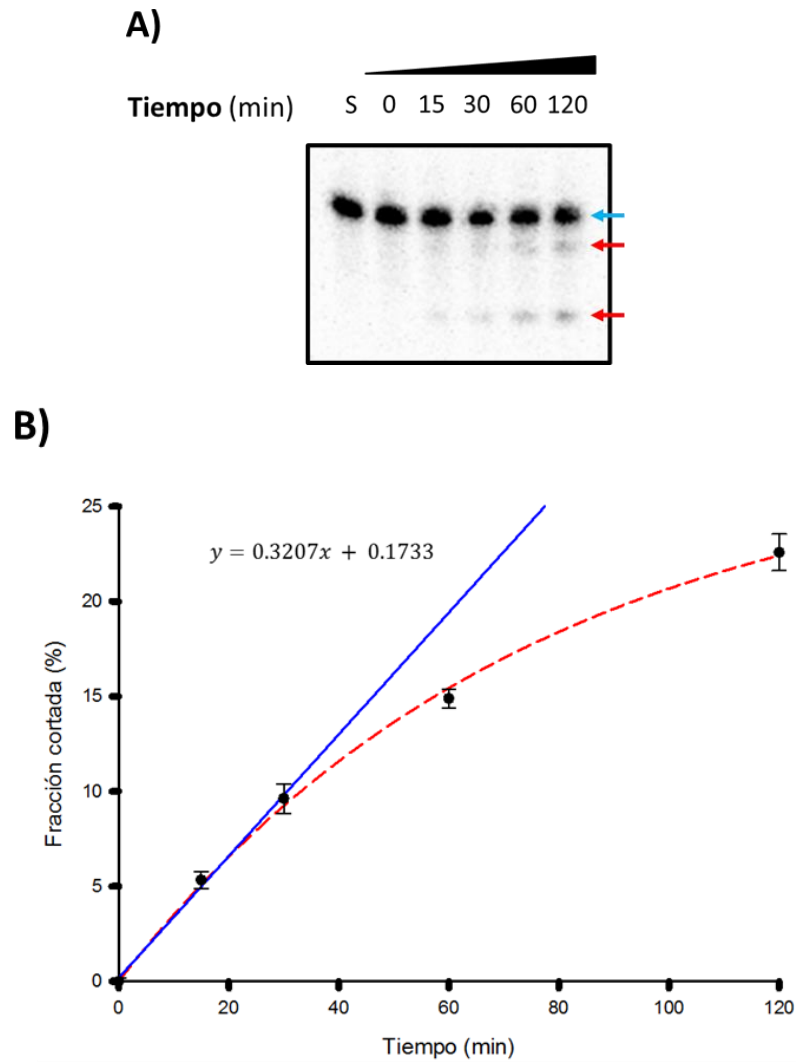


Figura 50. Cinética de catálisis de la extremidad T5 a 15pM [S5]. A) Corrimiento electroforético en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12% de los ensayos de catálisis realizados con diferentes tiempos de incubación (0-120min) a 37°C y el control del sustrato (S) sin ribozima. La flecha azul indica al sustrato completo y las flechas rojas indican dos fragmentos correspondientes a la fracción cortada. **B)** En el gráfico se muestra los datos obtenidos de la cuantificación de la cinética en puntos negros con barras de error de tres experimentos independientes. El comportamiento exponencial de la cinética es indicado por la curva naranja con una $r^2 = 0.998$. El comportamiento lineal solo de la fase inicial de la catálisis es indicado con la línea azul y la ecuación con una $r^2 = 0.9961$.

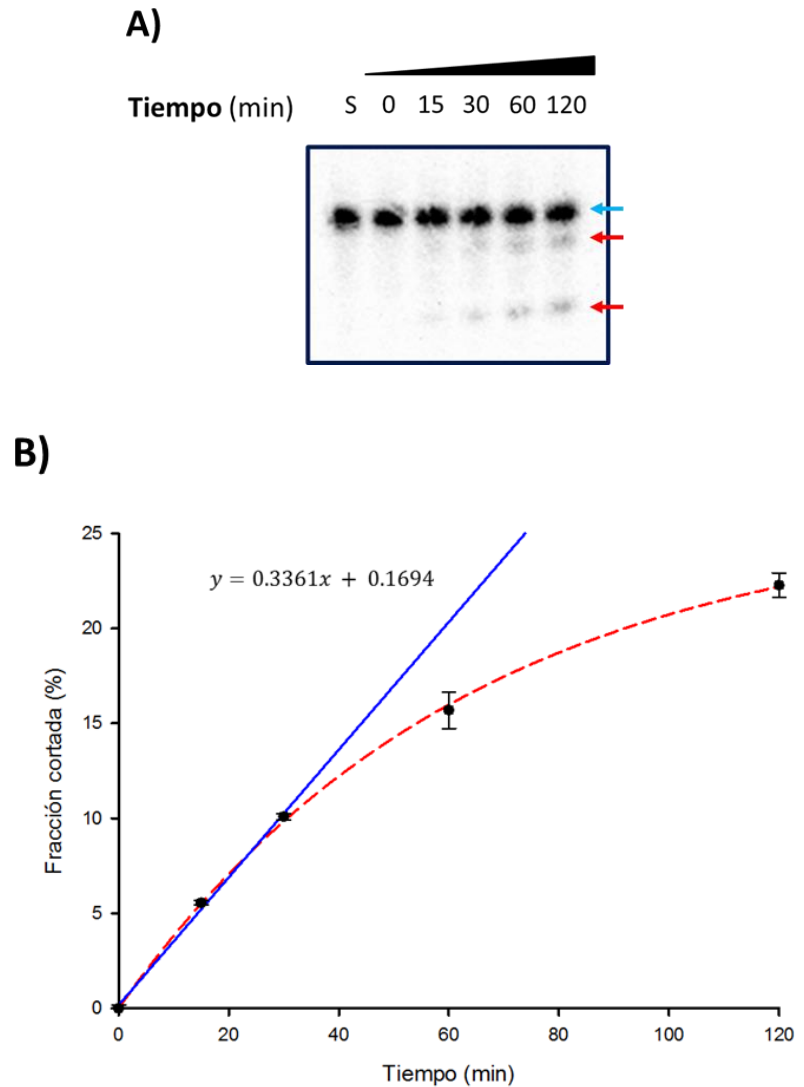


Figura 51. Cinética de catálisis de la extremidad T5 a 30pM [S5]. A) Corrimiento electroforético en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12% de los ensayos de catálisis realizados con diferentes tiempos de incubación (0-120min) a 37°C y el control del sustrato (S) sin ribozima. La flecha azul indica al sustrato completo y las flechas rojas indican dos fragmentos correspondientes a la fracción cortada. **B)** En el gráfico se muestra los datos obtenidos de la cuantificación de la cinética en puntos negros con barras de error de tres experimentos independientes. El comportamiento exponencial de la cinética es indicado por la curva naranja con una $r^2 = 0.998$. El comportamiento lineal solo de la fase inicial de la catálisis es indicado con la línea azul y la ecuación con una $r^2 = 0.9961$.

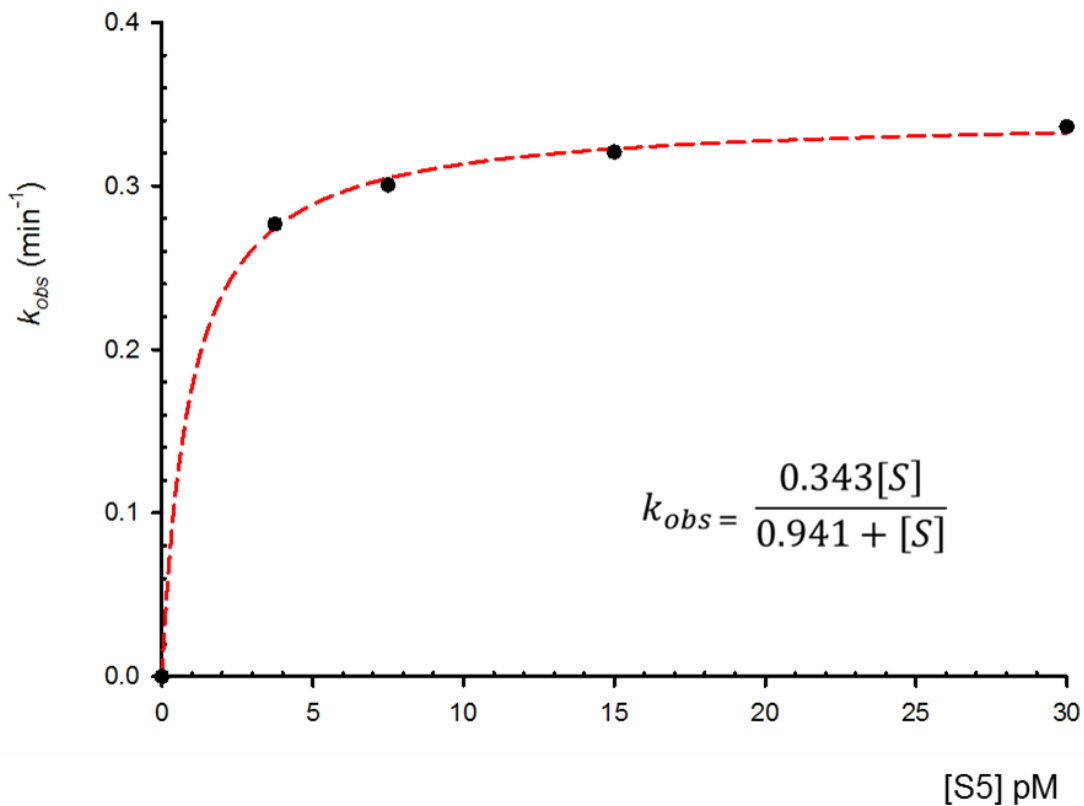


Figura 52. Modelo del comportamiento cinético de Michaelis-Menten de la extremidad T5. En el gráfico se muestra los valores de las constantes de velocidad observadas (k_{obs}) obtenidas de las pendientes de las fases iniciales de las cinéticas realizadas a diferentes concentraciones de S5 (3.75, 7.5, 15 y 30pM). Se muestra el modelo ajustado a una hipérbola rectangular en color rojo correspondiente al modelo cinético de Michaelis-Menten y la ecuación que describe el modelo. Los valores ajustados a dicha ecuación son $k_{cat} = 0.343\text{min}^{-1}$ y $Km = 0.941\text{pM}$ con una $r^2 = 0.999$. La constante de especificidad fue obtenida mediante la ecuación $EC = \frac{k_{cat}}{Km} = 0.364\text{pM}^{-1}\text{min}^{-1}$.

DISCUSIÓN

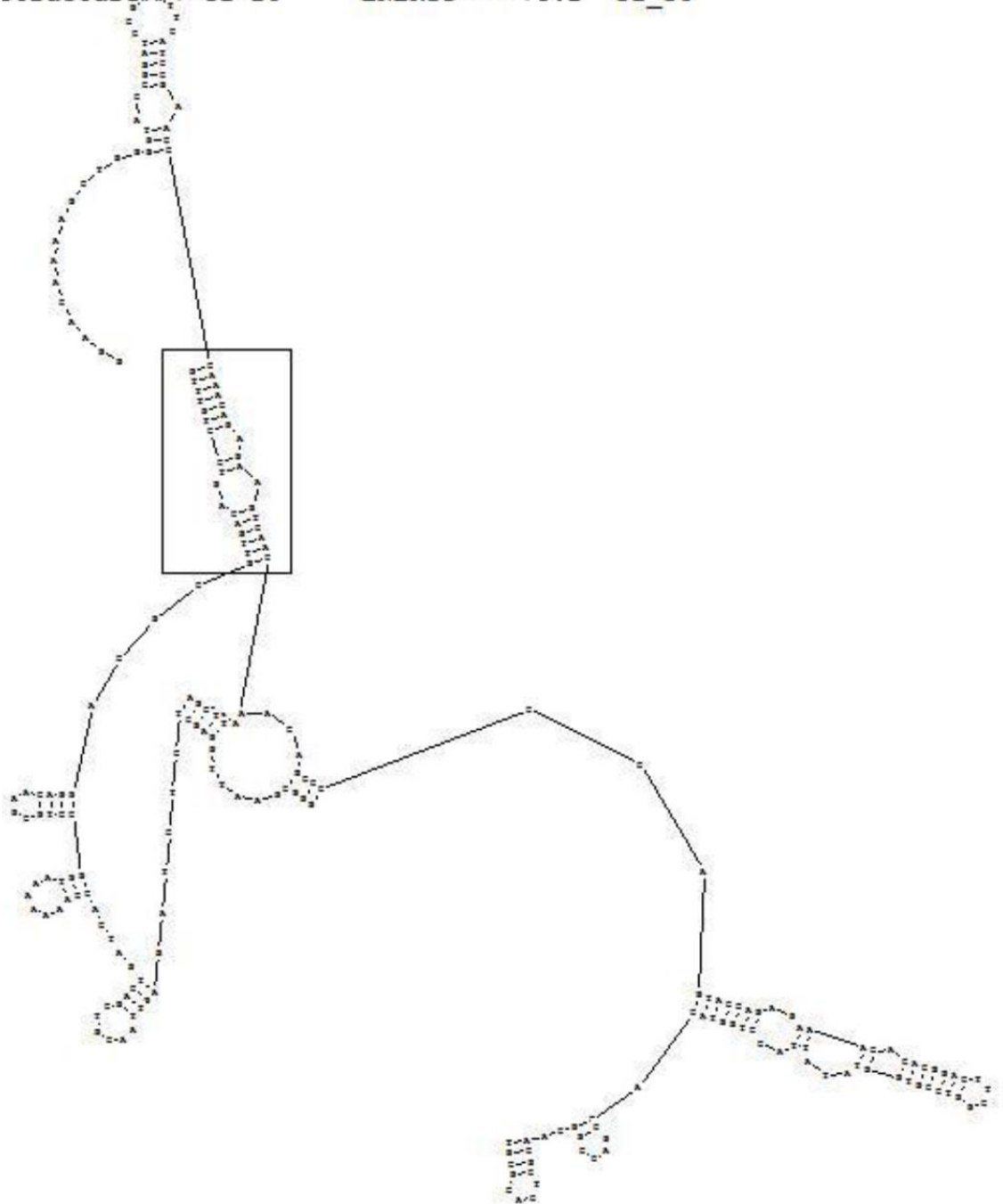
En el presente trabajo se plantea el diseño de un nanorobot caminante (basado en el diseño de la ribozima tríplex y en un primer diseño) de dos extremidades (T5 y T3) y un dominio catalítico con un desplazamiento a lo largo de una pista o camino de DNA mediado por el mecanismo de reacción intrínseco de la ribozima hairpin. Dado lo anterior, fue necesario evaluar la actividad de cada extremidad de forma independiente para posteriormente integrarlo a un sistema completo.

La caracterización de T5 muestra un comportamiento cinético descrito por Michaelis-Menten dado que la velocidad inicial de la catálisis es dependiente al aumento de la concentración del sustrato S5 (Figura 52). Esto es contrastante con la extremidad T5 caracterizada previamente (Romero-Hernández, Tesis de maestría, 2011) ya que al probarla con la concentración más alta (16pM en este estudio) de su sustrato T1 muestra una disminución en la velocidad debido a la inhibición del mismo producto de la catálisis. La razón de esto radica en la estructuración de cada extremidad catalítica con su respectivo sustrato. Analizando y comparando ambas estructuras (Figura 53), se observa que el sustrato T1, el cual es más largo (70 bases) y estructuralmente más complejo, muestra un apareamiento de 15 bases ($Tm = 47.5^{\circ}C$) al dominio de unión de la ribozima, mientras que el sustrato S5 es más pequeño (16 bases) y se une mediante el apareamiento de 14 bases ($Tm = 44.8^{\circ}C$). Adicionalmente, la predicción de estructura muestra un apareamiento extra del sustrato T1 de 4 bases en otro sitio de la ribozima, lo que hace aún más difícil la separación del sustrato T1 de la ribozima, por lo tanto, limitando la cantidad de moléculas activas disponibles para cortar un nuevo sustrato. El valor de Tm es importante ya que es directamente proporcional a la estabilidad de la interacción entre el sustrato y el sitio de unión de la extremidad y lo cual juega un papel crucial en la velocidad del recambio del sustrato. A pesar de que la diferencia de Tm no es muy grande, el recambio de S5, por principio, es más fácil. Además S5 se une a T5 en su dominio de unión y nada más, lo que también le permite la fácil liberación de los productos.

A)

Structure 17 of 20

ENERGY = -73.2 T1_T5



B)

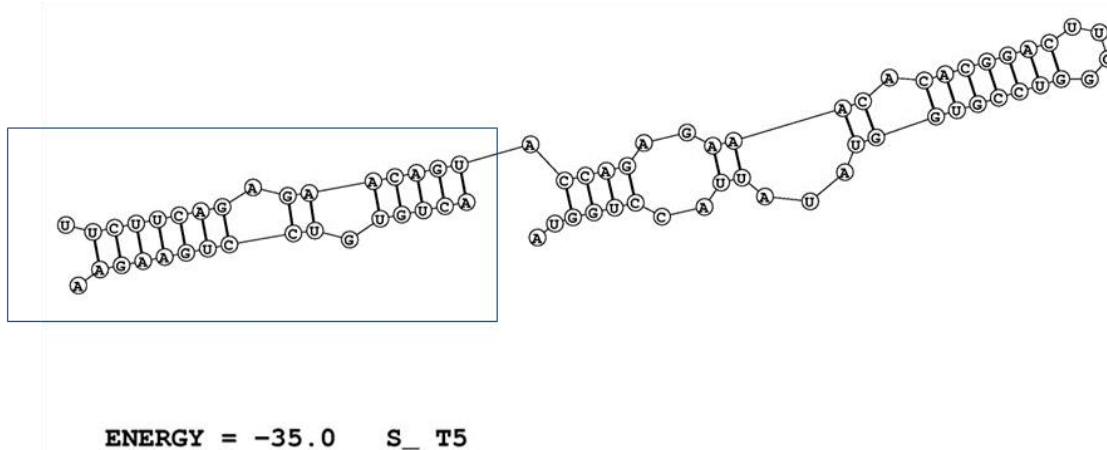
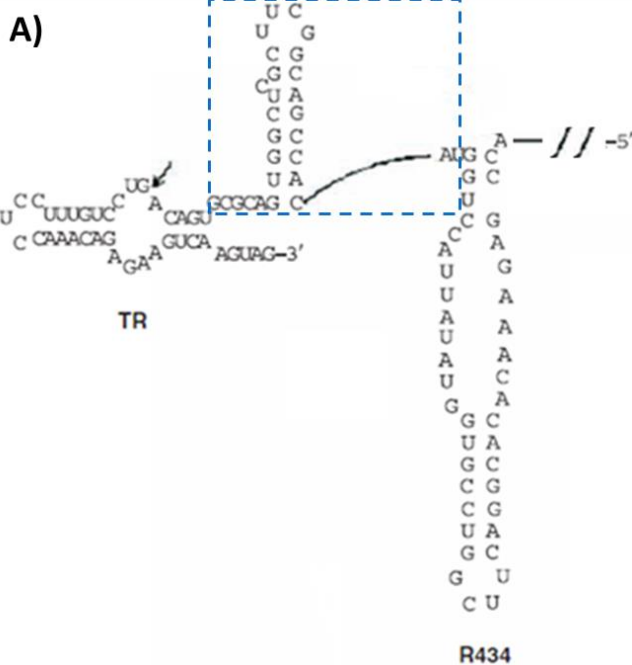


Figura 53. Comparación de estructura secundaria de las extremidades T5. A) Estructura de T5 (Romero-Hernández, Tesis de maestría, 2011) con un $\Delta G = -73.2$ Kcal/mol. B) Estructura de T5 de este trabajo con un $\Delta G = -35.0$ Kcal/mol. En ambas estructuras se muestra la interacción del sustrato (T1 y S5, respectivamente) al sitio de unión de cada extremidad. Estructuras calculadas con RNAstructure 5.3 de David Mathews de University of Rochester Medical Center.

Por otro lado, la extremidad T3 previamente descrita (Romero-Hernandez, Tesis de maestría, 2011) y la T3 de este trabajo no mostraron actividad en primera instancia. La configuración en común que tienen ambas ribozimas es que tienen el sitio de unión en el extremo 3' de la molécula, contrario a la extremidad T5 que lo tiene en el extremo 5' (que es como se encuentra de forma nativa). Sin embargo, al primer diseño de T3 al ser adicionado con 10 bases en la región de bisagra muestra actividad catalítica. Aunado esto, el extremo TR de la ribozima tríplex tiene la misma configuración que las extremidades T3, contiene 28 nucleótidos en la región de bisagra y es catalíticamente activa. Lo anterior sugiere que esta configuración de la ribozima puede causar un impedimento para que el sitio activo de la ribozima pueda entrar en contacto con el dominio catalítico, sin embargo este problema no se presenta si la longitud de nucleótidos en la región de bisagra es mayor. (Figura 53). Estas observaciones apuntan a que la cantidad de nucleótidos en esta región es crítica para la funcionalidad de la molécula, probablemente aumentando los puntos

de torsión dándole más flexibilidad a la molécula para permita el contacto entre ambos dominios para la catálisis.



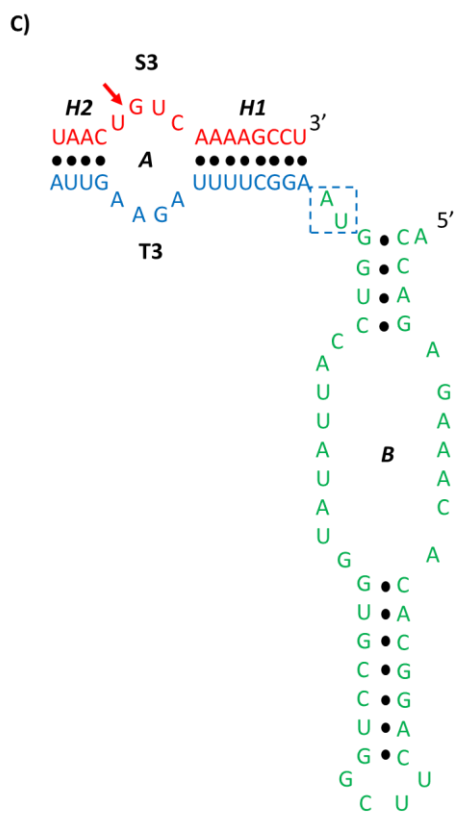
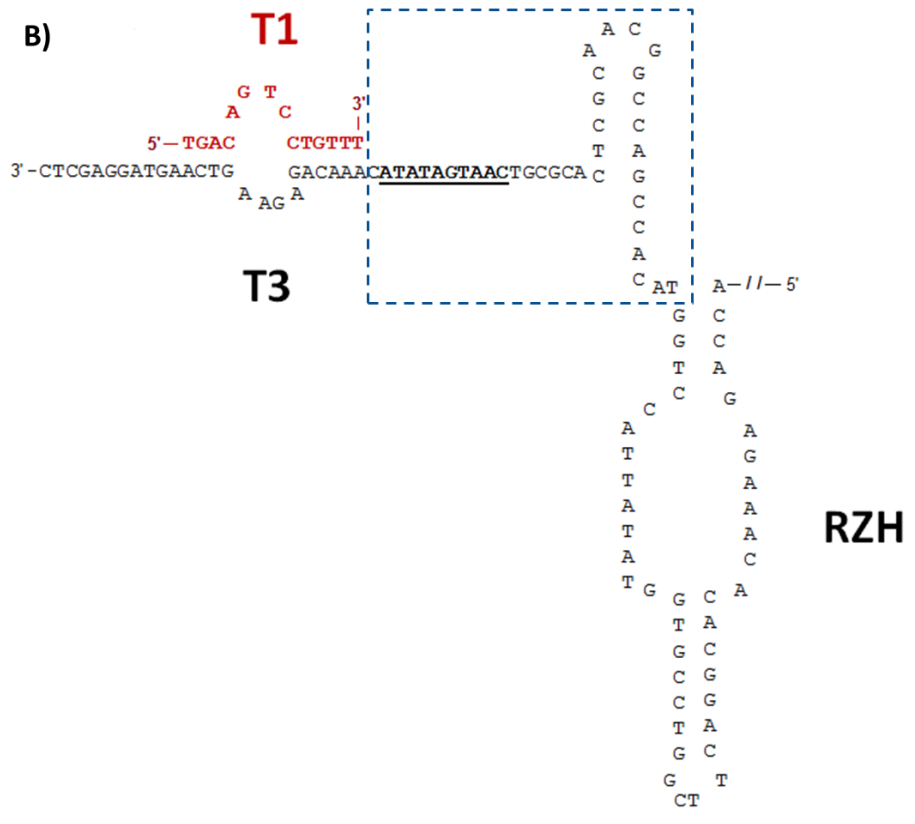


Figura 54. Comparación de la longitud de bases en la región de bisagra entre TR, T3 modificada y T3. Se muestran las estructuras secundarias de cada ribozima comparada. En cada cuadro se señalan las bases situadas en la región de bisagra para cada una de ellas. A) Extremo TR de la ribozima tríplex (Aquino-Jarquín, 2008). Tiene 28 bases en la zona indicada. B) T3 modificada (Romero-Hernández, Tesis de maestría, 2011). Tiene 37 bases en la zona indicada. C) T3 (Del presente trabajo) tiene 2 bases en la zona indicada.

Los resultados obtenidos y las observaciones realizadas llevan a reconsiderar a la ribozima Rz434bis misma como un modelo completo de nanorobot funcional debido a que mostró, a primera instancia, tener actividad catalítica en todos los sitios diseñados para el corte de las secuencias blanco. Esto indica que la actividad de la molécula está íntimamente asociada al contexto de la ribozima tríplex completa y por lo tanto el rediseño del nanorobot debe de ser, como requerimiento, bajo un sistema que integre ambas extremidades y la caracterización cinética del mismo en vez del análisis independiente que ha mostrado limitaciones. Adicionalmente, este diseño integral deberá ser ajustado a un modelo de desplazamiento como el planteado en este trabajo. Considerando lo anterior, podría ser sugerida la parte de la ribozima tríplex que contiene al sitio de reconocimiento para realizar el corte en *trans* (cuya configuración y secuencia corresponde a la extremidad catalítica T5 descrita en este trabajo), el dominio catalítico Rz y el extremo TR que contiene el sitio de corte en configuración *cis* (como un homólogo de T3) como un posible diseño de un nanorobot funcional como se muestra en la figura 55.

caminantes moleculares e inclusive en otras aplicaciones más en el campo de la nanotecnología.

CONCLUSIONES

- Se diseñaron y construyeron dos ribozimas hairpin para funcionar como extremidades catalíticas de un caminante molecular denominadas T5 y T3 en configuración *cis* y *trans* y los sustratos S5 y S3 correspondientes.
- No se observó funcionalidad por parte de las extremidades T5 y T3 en configuración *cis* a pesar de haber mejorado las condiciones de auto-catálisis
- La extremidad T5 mostró actividad catalítica *trans* sobre el sustrato S5.
- La extremidad T5 muestra un comportamiento cinético michaeliano
- La extremidad T3 no mostro actividad catalítica sobre su sustrato S3
- Se propone retomar el diseño de la ribozima Rz434bis como un modelo del caminante molecular completo.

PERSPECTIVAS

- Analizar y caracterizar el comportamiento cinético de un nanorobot con dos extremidades como un sistema integral basado en la ribozima tríplex.
- Probar el nanorobot en un camino de híbrido de DNA-RNA programado
- Considerar la alternativa de generar un nanorobot basado en DNAzimas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alvarez-Salas L.M., Cullinan A., et al. (1998). "Inhibition of HPV-16 E6/E7 immortalization of normal keratinocytes by hairpin ribozymes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 1189-1194.
2. Aquino-Jarquín, G., M. L. Benitez-Hess, et al. (2008). "A triplex ribozyme expression system based on a single hairpin ribozyme." *Oligonucleotides* **18**(3): 213-224.
3. Bowater R. and Waller Z. (2014). "DNA structure". eLS. John Wiley & Sons. 1-9.
4. Burke C. and Luptak A. (2012). "Catalytic RNA". eLS. John Wiley & Sons. 1-14.
5. Cha T., Pan J, et al. (2013). "A synthetic DNA motor that transports nanoparticles along nanotubes. *Nature Nanotechnology.* **9**: (39-43).
6. Chen Y. and Varani G. "RNA structure". (2010). eLS. John Wiley & Sons. (1-9).
7. Fedor, M. J. (2000). "Structure and function of the hairpin ribozyme." *J Mol Biol* **297**(2): 269-291.
8. Fedor, M. J. (2002). "The catalytic mechanism of the hairpin ribozyme." *Biochem Soc Trans* **30**(Pt 6): 1109-1115.
9. Fedor, M. J. (2009). Comparative enzymology and structural biology of RNA self-cleavage. *Annu. Rev. Biophys.* **38**: 271-299.
10. Ferre-D'Amare, A. R. (2004). "The hairpin ribozyme." *Biopolymers* **73**(1): 71-78.
11. Ferre-D'Amare A. and Scott W. (2010). "Small self-cleaving ribozymes". *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.* **2**: (1-10).

12. Guo P. (2010). "The emerging field of RNA nanotechnology". *Nature Nanotechnology*. **5**: (833-842).
13. Lund, K., A. J. Manzo, et al. (2010). "Molecular robots guided by prescriptive landscapes." *Nature* **465**(7295): 206-210.
14. Romero-Hernandez A. (2011). "Construcción y caracterización de un caminante molecular basado en una ribozima tríplex". Tesis de Maestría. Cinvestav. Departamento de Genética y Biología Molecular. 92p.
15. Rupert, P. B., A. P. Massey, et al. (2002). "Transition state stabilization by a catalytic RNA." *Science* **298**(5597): 1421-1424.
16. Sanchez, S. and M. Pumera (2009). "Nanorobots: the ultimate wireless self-propelled sensing and actuating devices." *Chem Asian J* **4**(9): 1402-1410.
17. Santoro S. W. y Joyce G. F. (1997). "A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**: 4262-4266.
18. Scott W. G., Horan L. H., et al. (2013). "The Hammerhead ribozyme: Structure, catalysis, and gene regulation". *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. **120**: 1-23.
19. Serganov A. and Patel D. (2007). Ribozymes, riboswitches and beyond: regulation of gene expression without proteins. *Nature Reviews Genetics*. **8**: (766-790).
20. Shin, J. S. and N. A. Pierce (2004). "A synthetic DNA walker for molecular transport." *J Am Chem Soc* **126**(35): 10834-10835.
21. Silverman S. (2004). "Deoxyribozymes: DNA catalysis for bioorganic chemistry". *Org. Biomol. Chem*. **2**: (2701-2706).

22. Song C, Wang Z, et al. (2013). "Smart nanomachines based on DNA self-assembly". *Small* **9**(14): 2382-2392.
23. Soukup G. A. (2001). "Nucleic acids: General Properties". eLS. John Wiley & Sons. 1-9.
24. Tan E, et al. (2003). "A four-way junction accelerates hairpin ribozyme folding via a discrete intermediate" *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100** (16): 9308-9313.
25. Walter, N. G., K. J. Hampel, et al. (1998). "Tertiary structure formation in the hairpin ribozyme monitored by fluorescence resonance energy transfer." *EMBO J* **17**(8): 2378-2391.
26. Watson J. D. and Crick F.H.C. (1953). "Molecular structure of nucleic acids. A structure for Deoxyribose Nucleic Acid". *Nature.* **171**: 737-738.
27. Wilson, T. J., M. Nahas, et al. (2007). "RNA folding and the origins of catalytic activity in the hairpin ribozyme." *Blood Cells Mol Dis* **38**(1): 8-14.
28. Xu P. and Rossinck M. (2011). "Plant Virus Satellites). eLS. John Wiley & Sons. 1-11.

APÉNDICE: COMPONENTES DE LOS KITS Y MATERIALES REQUERIDOS

Oligonucleótidos

T5 y T5c

5' TAATACGACTCACTATAGGGACTGTGTCCTGAAGAAGCTTTTCTTCAGAGAA
CAGTACCAGAGAAACACACGGACTTCGGTCCGTGGTATATTACCTGGTA 3'

5' TACCAGGTAATATAACCACGGACCGAAGTCCGTGTGTTTCTCTGGTACTGTT
CTCTGAAGAAAAGCTTCTTCAGGACACAGTCCCTATAGTGAGTCGTATTA 3'

T3 y T3c

5' TAATACGACTCACTATAGGGACCAGAGAAACACACGGACTTCGGTCCGTGG
TATATTACCTGGTAAGGCTTTTAGAAGTTAGCTTTAACTGTCAAAGCCT 3'

5' AGGCTTTTGACAGTTAAAGCTAACTTCTAAAAGCCTTACCAGGTAATATACC
ACGGACCGAAGTCCGTGTGTTTCTCTGGTCCCTATAGTGAGTCGTATTA 3'

T5 mut y T5 mutc

5' TAATACGACTCACTATAGGGACTGTGTCCTGAAGAAGCTTTTCTTCAGAGAA
CAGTACCAGAGCGTCACACGGACTTCGGTCCGTGGTATATTACCTGGTA 3'

5' TACCAGGTAATATACCACGGACCGAAGTCCGTGTGACGCTCTGGTACTGTT
CTCTGAAGAAAAGCTTCTTCAGGACACAGTCCCTATAGTGAGTCGTATTA 3'

T3mut y T3mutc

5' TAATACGACTCACTATAGGGACCAGAGCGTCACACGGACTTCGGTCCGTG
GTATATTACCTGGTAAGGCTTTTAGAAGTTAGCTTTAACTGTCAAAGCCT 3'

5' AGGCTTTTGACAGTTAAAGCTAACTTCTAAAAGCCTTACCAGGTAATATACC
ACGGACCGAAGTCCGTGTGACGCTCTGGTCCCTATAGTGAGTCGTATTA 3'

T5t y T5tc

5' TAATACGACTCACTATAGGGTTCTTCAGAGAACAGTACCAGAGAAACACAC
GGACTTCGGTCCGTGGTATATTACCTGGTA 3'

5' TACCAGGTAATATACCACGGACCGAAGTCCGTGTGTTTCTCTGGTACTGTT
CTCTGAAGAACCCTATAGTGAGTCGTATTA 3'

T3t y T3tc

5' TAATACGACTCACTATAGGGACCAGAGAAACACACGGACTTCGGTCCGTGG
TATATTACCTGGTAAGGCTTTTAGAAGTTA 3'

5' TAACTTCTAAAAGCCTTACCAGGTAATATAACCACGGACCGAAGTCCGTGTG
TTTCTCTGGTCCCTATAGTGAGTCGTATTA 3'

S5 y S5c

5' TAATACGACTCACTATAGGGACTGTGTCCTGAAGAA 3'

5' TTCTTCAGGACACAGTCCCTATAGTGAGTCGTATTA 3'

S3 y S3c

5' TAATACGACTCACTATAGGGTAACTGTCAAAGCCT 3'

5' AGGCTTTTGACAGTTACCCTATAGTGAGTCGTATTA 3'

Primers

T5forward 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'

T5reverse 5' TACCAGGTAATATAACCACGG 3'

T3forward 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'

T3reverse 5' AGGCTTTTGACAGTTAAAGC 3'

T3treverse 5' TAACTTCTAAAAGCCTTACC 3'

S5reverse 5' TTCTTCAGGACACAGTC 3'

S3reverse 5' AGGCTTTTGACAGTTACC 3'

Medios de cultivo

LB (para 1 litro):

Triptona 10g

Extracto de Levadura 5g

NaCl 5g

LB Sólido (para 1 litro):

Triptona 10g

Extracto de Levadura 5g

NaCl 5g

Agar 15g

Buffers

Buffer de elución para ácidos nucleicos:

CH₃COONH₄ 0.5M EDTA 1mM SDS 0.1%

Buffer TBE 5X (para 1litro):

TRIS 54g H₃BO₃ 27.5g EDTA 0.5M pH 8.0 20ml

Ensayos de catálisis

Buffer de Ribozima 10x:

TRIS-HCL pH 7.5 500mM MgCl₂ 120mM Espermidina 20mM

Solución de paro 2X:

Formamida 95% EDTA 20mM Azul de bromofenol 0.05% Xilen cianol FF 0.05%