

**Universidad de Chile**  
**Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas**



**DESARROLLO DE RIBOZIMAS DE HORQUILLA Y  
MARTILLO PARA DISMINUIR LA ACTIVIDAD DE LA  
DESHIDROGENASA ALDEHÍDICA MITOCONDRIAL  
(ALDH2) DE RATA**

**TESIS PARA OPTAR AL  
GRADO DE MAGÍSTER EN BIOQUÍMICA**

**Lorena Lobos González**

Directora de Tesis  
**Dra. Amalia Sapag Muñoz de la Peña**

Lugar de Realización  
**Laboratorio de Farmacoterapia Génica**  
Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas  
Universidad de Chile

**Santiago de Chile**  
**2007**

## AGRADECIMIENTOS

*Cuando observo todo lo que tengo,  
he tenido  
y he recibido  
me maravillo de tener tanto  
si algún día perdiera algo, algo es tanto  
y si es tanto  
entonces  
todo lo que me queda es.....infinitamente tanto  
Por eso nunca tenemos nada, siempre tenemos mucho*

*Gracias por ser parte de este tanto*

## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
Agradecimientos.....	I
Índice General.....	II
Índice de Tablas.....	IV
Índice de Figuras.....	V
Abreviaturas.....	VI
Resumen.....	VII
Summary.....	IX
<b>1 Introducción.....</b>	<b>11</b>
<b>2 Materiales.....</b>	<b>25</b>
2.1 Enzimas.....	25
2.2 Reactivos y materiales generales.....	25
2.3 Soluciones.....	26
2.4 Oligonucleótidos.....	26
2.5 Plasmidios.....	26
<b>3 Métodos.....</b>	<b>27</b>
3.1 Construcciones de genes de ribozimas de horquilla.....	27
3.1.1 <i>Formación del dúplex.....</i>	27
3.1.2 <i>Ligación del dúplex a los plasmidios.....</i>	32
3.1.3 <i>Transformación de bacterias competentes.....</i>	32
3.1.4 <i>Purificación de plasmidios por lisis alcalina.....</i>	33
3.1.5 <i>Sondeo de ribozimas mediante PCR-RFLP.....</i>	33
3.1.6 <i>Electroforesis.....</i>	36
3.1.7 <i>Secuenciación.....</i>	36
3.2 Cultivo bacteriano.....	37
3.3 Cultivo celular eucariótico.....	37
3.4 Lipofección de células de hepatoma de rata H4-II-E-C3.....	38
3.4.1 <i>Colipofección de células 293.....</i>	39
3.5 Selección de células H4-II-E-C3 con higromicina.....	40
3.6 Medición de la actividad enzimática de la ALDH2.....	41
3.6.1 <i>Cuantificación de proteínas totales.....</i>	42
3.7 Control de transfección.....	42
3.8 Análisis estadístico.....	43

<b>4 Resultados</b> .....	<b>44</b>
4.1 Diseño y síntesis de construcciones génicas.....	44
4.2 Eficiencia de transfección en células de hepatoma de rata .....	46
4.3 Efecto de la ribozima de martillo RzGUC20 y de horquilla RzCG20 en las células H4-II-E-C3 .....	46
4.3.1 <i>Ribozimas de horquilla vs de martillo</i> .....	46
4.3.2 <i>Ribozimas vs ribozimas controles</i> .....	48
4.3.3 <i>Plasmidio pAC-CMV vs pAAV-CMV</i> .....	48
4.3.4 <i>Magnitud real de la acción de las ribozimas</i> .....	49
4.4 Efecto de las ribozimas de martillo RzUUC9 y RzGUC19 en células H4-II-E-C3 .....	51
4.4.1 <i>Ribozimas vs ribozimas controles</i> .....	51
4.5 Efecto de las ribozimas de horquilla en células H4-II-E-C3 bajo selección con higromicina .....	53
4.5.1 <i>Ribozima vs ribozima control</i> .....	53
4.5.2 <i>Magnitud real de la acción de las ribozimas</i> .....	55
4.6 Efecto de las ribozimas de horquilla RzCG20 en células 293 .....	55
4.6.1 <i>Ribozima vs ribozima control</i> .....	57
4.6.2 <i>Magnitud real de la acción de las ribozimas</i> .....	58
<b>5 Discusión</b> .....	<b>59</b>
5.1 Ribozimas de horquilla y martillo dirigidas al triplete GUC 20.....	59
5.2 Ribozimas de horquilla.....	62
5.3 Ribozimas de martillo.....	65
5.4 Control de transfección .....	69
5.5 pCEP4, Integración.....	71
5.6 Proyecciones .....	73
<b>6 Conclusiones</b> .....	<b>75</b>
<b>7 Referencias</b> .....	<b>77</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1</b>	
Oligonucleótidos formadores del dúplex codificante de la ribozima de horquilla RzCG20 .....	28
<b>Tabla 2</b>	
Oligonucleótidos para secuenciación de los plasmidios pLLX.....	28
<b>Tabla 3</b>	
Oligonucleótidos usados para la PCR de plasmidios .....	28
<b>Tabla 4</b>	
Plasmidios usados en células en cultivo .....	29

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1</b> Esquema de la estructura secundaria de la ribozima de martillo.....	16
<b>Figura 2</b> Esquema de la estructura secundaria de la ribozima de horquilla.....	18
<b>Figura 3</b> Plasmidios utilizados para la clonación de ribozimas de horquilla.....	30
<b>Figura 4</b> Apareamiento de oligonucleótidos formadores del dúplex.....	32
<b>Figura 5</b> Sondeo de clones mediante PCR-RFLP.....	35
<b>Figura 6</b> Estructura secundaria de la ribozima de horquilla RzCG20.....	45
<b>Figura 7</b> Estructura secundaria de la ribozima de martillo RzGUC20.....	47
<b>Figura 8</b> Efecto de la ribozima de horquilla RzCG20 y de martillo RzGUC20 en células H4-II-E-C3.....	50
<b>Figura 9</b> Efecto de las ribozimas de martillo RzUUC9 y RzGUC19 en células H4-II-E-C3.....	52
<b>Figura 10</b> Efecto de la ribozima de horquilla RzCG20 en células H4-II-E-C3 bajo selección con higromicina.....	54
<b>Figura 11</b> Efecto de la ribozima de horquilla RzCG20 en células 293.....	56
<b>Figura 12</b> Unión de las ribozimas de martillo al mRNA de la ALDH2.....	68

## ABREVIATURAS

<b>ADH</b>	<u>d</u> esh <u>h</u> idrogenasa <u>a</u> lcohólica
<b>ALDH2</b>	<u>d</u> esh <u>h</u> idrogenasa <u>a</u> ldehídica mitocondrial
<b>Ap</b>	ampicilina
<b>cDNA</b>	ácido desoxirribonucleico complementario
<b>CMV</b>	citomegalovirus
<b>DMEM</b>	medio de Eagle modificado por Dulbecco
<b>dNTPs</b>	desoxirribonucleótidos
<b>DTT</b>	ditiotreitól
<b>EDTA</b>	ácido etilendiaminotetracético
<b>hHGpA</b>	señal de poliadenilación del gen de la hormona de crecimiento humana
<b>mRNA</b>	ácido ribonucleico mensajero
<b>nt</b>	nucleótido
<b>NAD<sup>+</sup></b>	nicotinamida adenina dinucleótido
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PCR</b>	reacción en cadena de la polimerasa
<b>RNAse</b>	ribonucleasa
<b>SV40pA</b>	señal de poliadenilación del virus SV40 del simio

## RESUMEN

Existen genes que, según las variantes que se presentan en la naturaleza, pueden ser permisivos o protectores frente al alcoholismo. El gen *ALDH2* es habitualmente permisivo (alelo *ALDH2\*1*) porque codifica la enzima deshidrogenasa aldehídica mitocondrial la cual cataliza la oxidación del acetaldehído a acetato en la vía degradativa del etanol. Este gen tiene un segundo alelo protector, *ALDH2\*2*, que da origen a una enzima inactiva, impidiendo la oxidación del acetaldehído y desencadenando en los individuos portadores un aumento en los niveles plasmáticos de acetaldehído de hasta 20 veces sobre lo normal. Estos individuos sienten malestares físicos como mareos, taquicardia y náuseas al consumir alcohol lo que les provoca una aversión frente al consumo.

Siendo el alelo *ALDH2\*2* un gen protector frente al alcoholismo, producir una disminución de la actividad enzimática es una buena estrategia terapéutica frente a la enfermedad. Un tratamiento farmacológico habitual para el alcoholismo es generar una aversión al consumo de alcohol con disulfiram. Este fármaco inactiva eficazmente la deshidrogenasa aldehídica mitocondrial (*ALDH2*), pero es muy tóxico. Una alternativa terapéutica es imitar el efecto del disulfiram silenciando el mRNA de la *ALDH2* con ribozimas, RNAs catalíticos pequeños capaces de disminuir la síntesis proteica por ocupación y/o degradación del mRNA.

Se ensayaron ribozimas de horquilla y martillo dirigidas hacia un mismo blanco del mRNA de la *ALDH2* en células de hepatoma de rata en cultivo, dado que el hígado es el órgano más importante en la degradación del etanol. Se lipofectaron células H4-II-E-C3 con plasmidios portadores de genes de ribozimas y se midió la actividad de la *ALDH2* espectrofotométricamente en extractos celulares. Se usaron ribozimas control para determinar posibles efectos de antisentido.

La ribozima de horquilla (RzCG20), clonada en el vector pAC-CMV y codificada en un gen que posee el promotor del citomegalovirus y la señal de poliadenilación del virus SV40, disminuyó en 42 % ( $p < 0,005$ ) la actividad de la ALDH2 en las células H4-II-E-C3, siendo el 44 % del efecto adjudicable a bloqueo del mRNA. En cambio, la ribozima de horquilla clonada en el vector pAAV-CMV y codificada en un gen cuya señal de poliadenilación es la de la hormona del crecimiento humana, disminuyó en 36 % ( $p < 0,005$ ) la actividad de la ALDH2 en las células en cultivo, siendo el 64 % del efecto adjudicable a bloqueo del mRNA. La ribozima de martillo redujo sólo en 20% la actividad de la ALDH2, efecto dado exclusivamente por bloqueo del mRNA.

Efectuando correcciones con el tiempo de vida media de la enzima se estima que el porcentaje de disminución del 42 % de la actividad de la ALDH2 es de al menos 56 % al usar el gen de una ribozima de horquilla anti ALDH2. No se corrigió por el porcentaje de células H4-II-E-C3 transfectadas debido a la imposibilidad de obtener una estimación razonable usando el gen de la eGFP como reportero. Sin embargo, el porcentaje mínimo (56 %) concuerda con que en células 293 derivadas de riñón de embrión humano, cuyo porcentaje de transfección es cercano al 70 %, la ribozima disminuyó en 68 % ( $p < 0,005$ ) la actividad de la ALDH2 únicamente por acción antisentido.

Buscando alcanzar un 100 % de transfección se lipofectaron células H4-II-E-C3 con plasmidios derivados del pCEP4 codificantes de las ribozimas de horquilla y su control. Este vector, que otorga permanencia y segregación divisional, mostró efectos tóxicos sobre las células de manera que no se pudo evaluar el efecto de la ribozima de horquilla en un cultivo celular homogéneo.

Los resultados de este trabajo de tesis muestran que la ribozima de horquilla RzCG20, dirigida a los nucleótidos 1553 a 1569 del mRNA de la ALDH2 de rata, es un buen candidato para experimentos *in vivo* enfocados hacia el desarrollo de un fármaco génico para el alcoholismo.

## SUMMARY

Certain genes may be permissive or protective for alcoholism depending on natural variation. The *ALDH2* gene is normally permissive (*ALDH2\*1* allele) because it encodes aldehyde dehydrogenase 2, a mitochondrial enzyme which catalyzes the oxidation of acetaldehyde into acetate in the main route of ethanol degradation. This gene has a second allele, *ALDH2\*2*, which generates an inactive enzyme, thus preventing the oxidation of acetaldehyde and triggering an increase in blood acetaldehyde of up to 20 times the normal level. Carriers of *ALDH2\*2* feel physical discomfort such as dizziness, tachycardia and nausea upon drinking alcohol generating in them an aversion to alcohol.

Given that *ALDH2\*2* protects from alcoholism, diminishing the activity of the enzyme is an excellent strategy to treat the disease. A routine and effective pharmacological treatment for alcoholism is the use of disulfiram to achieve aversion to alcohol. This drug inactivates mitochondrial aldehyde dehydrogenase but is very toxic. A therapeutic alternative is to imitate the effect of disulfiram by silencing the *ALDH2* mRNA with ribozymes, small catalytic RNAs capable of diminishing protein synthesis by occupation and/or degradation of the mRNA.

Hairpin and hammerhead ribozymes directed to the same target on the *Aldh2* mRNA were tested in rat hepatoma cells in culture given that the liver is the main site of alcohol degradation. H4-II-E-C3 cells were lipofected with plasmids carrying the ribozyme genes and ALDH2 activity was measured spectrophotometrically in cell extracts. Control ribozymes were used to assess possible antisense effects.

The hairpin ribozyme (RzCG20), cloned in the pAC-CMV vector and coded in a gene having a cytomegalovirus promoter and an SV40 polyadenylation signal, diminished the ALDH2 activity of H4-II-E-C3 cells by 42 % ( $p < 0.005$ ) of which 44 % may be ascribed to blockade of the mRNA. In contrast, the same hairpin

ribozyme, but cloned in the pAAV-CMV plasmid and coded in a gene having the polyadenylation signal of the gene for the human growth hormone, diminished the ALDH2 activity in cells in culture by 36 % ( $p < 0.005$ ), 64 % of which is accounted for by blockade of the mRNA. The hammerhead ribozyme provided only a 20 % reduction in the ALDH2 activity being afforded exclusively by blockade of the mRNA.

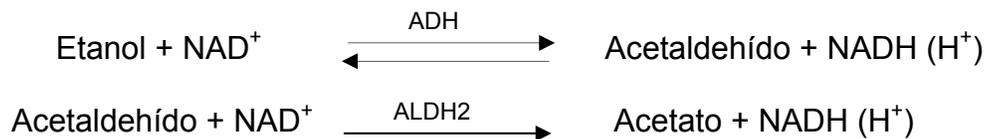
The 42 % reduction in ALDH2 activity achieved with the hairpin ribozyme gene may be considered to be 56 % when the half life of the enzyme is taken into account. Due to the impossibility of obtaining a reasonable estimate of the efficiency of transfection with an eGFP reporter gene an additional correction factor could not be applied. However, the minimum 56 % reduction in ALDH2 activity obtained in H4-II-E-C3 cells is in agreement with the 68 % ( $p < 0.005$ ) achieved in 293 cells derived from embryonic human kidney in which the efficiency of transfection is around 70%; nevertheless, the ribozyme action was entirely due to an antisense effect.

Aiming to obtain a fully (100 %) transfected culture, H4-II-E-C3 cells were lipofected with plasmids derived from pCEP4 encoding the active and control hairpin ribozymes. This vector, which allows replication and segregation coupled to cell division, had toxic effects in these cells and it was not possible to assess the effect of the hairpin ribozyme in a homogeneous population of cells by this strategy, conceived as an alternative to viral delivery.

The results of this thesis work show that the hairpin ribozyme RzCG20, targeted to nucleotides 1553 to 1569 of the rat ALDH2 mRNA, is a good candidate for *in vivo* experiments geared towards developing genetic drugs for alcoholism.

## 1 INTRODUCCIÓN

El alcohol (etanol) está presente en diversas bebidas fermentadas en concentraciones que van desde 5 a 14%, como es el caso de la cerveza y los vinos, mientras que en bebidas destiladas puede llegar al 80%. El tiempo que pasa desde el último consumo hasta que se alcanzan las concentraciones máximas de etanol en la sangre varía de 25 a 90 minutos. Cuando el etanol llega al hígado es degradado en dos oxidaciones sucesivas. La primera es catalizada por la enzima deshidrogenasa alcohólica (ADH), la cual oxida el alcohol a acetaldehído. En la segunda, la enzima deshidrogenasa aldehídica mitocondrial (ALDH2) degrada el acetaldehído a acetato (Wallgren y Barry, 1970) (ver reacción química).



El alcoholismo consiste en un consumo excesivo de alcohol en forma prolongada con dependencia del mismo. Es una enfermedad crónica que interfiere en la salud física, mental, social y familiar. Genera dependencia física con síntomas claros asociados a enfermedades secundarias como cirrosis hepática, pancreatitis, degeneración cerebral, cardiomiopatías y otras varias llegando incluso hasta la muerte del individuo (Wallgren y Barry, 1970). Chile presenta una de las tasas más altas de mortalidad por abuso de alcohol en el mundo: 32 %. En el 7 % de las muertes el alcoholismo es la causa principal mientras que en el 25 % es una causa asociada (CONACE, 2002).

Existen muchos factores genéticos y medioambientales que influyen en el desarrollo del alcoholismo (Heath y cols., 2001). Entre los factores genéticos, hay algunos que predisponen a la enfermedad y otros que protegen (Goate y Edenberg, 1998), aunque aún no se ha dilucidado bien el rol de estos genes ni su mecanismo de regulación. Estudios realizados con hermanos gemelos

entregados en adopción por separado confirman el rol integral que juega el componente genético en el riesgo a desarrollar la enfermedad (Prescott y Kendler, 1999). Por otro lado, se ha observado en la población humana asiática que el consumo de alcohol es menor que en los individuos caucásicos (Novoradovsky y cols., 1995).

Cerca del 30% de los asiáticos poseen una mutación puntual en el gen de la ALDH2 que se ha visto asociada a malestares físicos al beber alcohol (Singh y cols., 1989; Novoradovsky y cols., 1995). El gen de la ALDH2, cuyo mecanismo de regulación se desconoce, posee 13 exones (Hsu y cols., 1988). En el exón 13 hay una mutación, el cambio de una guanina (alelo *ALDH2\*1*) a adenina (alelo *ALDH2\*2*) (Yoshida y cols., 1983), que corresponde en el mRNA a la posición 1510. El alelo *ALDH2\*2* genera una proteína con un cambio aminoacídico en la posición 487: la sustitución del ácido glutámico por lisina (Yoshida y cols., 1984). La proteína forma un homotetrámero (Farrés y cols., 1989) y la mutación E487K es dominante negativa (Xiao y cols., 1995). Se ha visto que los individuos homocigotos *ALDH2\*2/ALDH2\*2* son generalmente abstemios y que los individuos heterocigotos *ALDH2\*1/ALDH2\*2* son bebedores sociales (Singh y cols., 1989).

Los individuos que presentan uno o dos alelos *ALDH2\*2* (heterocigotos y homocigotos, respectivamente) tienen una enzima cuya capacidad para convertir el acetaldehído a acetato está muy disminuida, por lo que al consumir alcohol sus niveles plasmáticos de acetaldehído aumentan de 5 a 20 veces sobre lo normal (Adachi y cols., 1989) y sufren de vasodilatación cutánea, taquicardia, náuseas y vómitos (Harada y cols., 1981). Estos malestares físicos causan en el individuo un rechazo frente al consumo. Por lo tanto, si la mutación E487K causa un incremento en los niveles plasmáticos de acetaldehído (Adachi y cols., 1989) y disminuye el consumo de alcohol es un factor protector frente al alcoholismo (Wall y cols., 2003).

En base a la mutación detectada en la población asiática cabe considerar como posible terapia para individuos bebedores problemas o alcohólicos reducir la actividad catalítica de la enzima deshidrogenasa aldehídica mitocondrial (ALDH2) (Pettinati y Rabinowitz, 2005; Williams, 2005). Durante más de 50 años esto se ha conseguido con el uso del disulfiram (Fuller y cols., 1986; Johnson y Ait-Daoud, 2000), un fármaco que inactiva a la enzima por modificación covalente de los grupos SH. La gran desventaja de este tratamiento es que tiene efectos secundarios y toxicidad (Swift, 1999; Shen y cols., 2001) debido a que es de acción inespecífica: evita la oxidación del acetaldehído a acetato inactivando no sólo la ALDH2 sino que otras deshidrogenasas aldehídicas junto con otras proteínas como el citocromo P450. Debido a los efectos secundarios y a la toxicidad el tratamiento sólo es útil a corto plazo (Hermos y cols., 2004).

Frente a las desventajas del tratamiento del alcoholismo con disulfiram se ha desencadenado un renovado interés en las enzimas que participan en la vía de degradación del alcohol, especialmente en la ALDH2, debido a la existencia del alelo *ALDH2\*2* (Yoshida y cols., 1983; Yoshida y cols., 1984) que confiere protección frente a la enfermedad. El estudio de los genes para estas enzimas ha permitido considerar el desarrollo de estrategias genéticas para causar el efecto natural del alelo *ALDH2\*2* (*vide infra*) con fines terapéuticos.

Una de las ramas de la terapia génica (Ledley, 1996) involucra la construcción de genes terapéuticos que permitan silenciar una función biológica de interés. En la terapia génica para silenciar un gen blanco se pueden abordar distintos niveles moleculares y distintos procesos metabólicos: primero, a nivel del DNA genómico, afectando el proceso de transcripción; segundo, a nivel del transcrito primario, afectando el proceso de corte y empalme; tercero, a nivel del mRNA, afectando el proceso de traducción; y cuarto, a nivel proteico, afectando la actividad biológica de la proteína. Uno de los abordajes más

eficientes descritos para silenciar un gen es intervenir a nivel de la traducción, degradando o bloqueando específicamente el RNA mensajero (mRNA).

Se han explorado varias estrategias para silenciar el gen *Aldh2* de rata intentando disminuir los niveles de mRNA de la ALDH2 disponible para la traducción. Se han empleado moléculas como oligonucleótidos de antisentido (Garver y cols., 2000; Garver y cols., 2001; Lladser, 2003), oligonucleótidos formadores de triple hélice (Encina, 2002), RNAs interferentes (Cortínez, en preparación), genes de antisentido (Karahanian y cols., 2005; Ocaranza, 2006) y genes de ribozimas (Muñoz, 2003).

Las ribozimas son moléculas pequeñas de RNA que poseen propiedades catalíticas. Las ribozimas capaces de romper enlaces fosfodiéster de otras moléculas de RNA se emplean en terapia génica con el fin de interrumpir el flujo de la información genética principalmente a nivel de traducción, disminuyendo finalmente la actividad de la proteína funcional. Estas ribozimas tienen un gran potencial terapéutico, ya que la actividad catalítica puede ser dirigida a un blanco de mRNA específico. Su estructura es variable: puede presentar uno o dos brazos que se aparean complementariamente por enlaces de Watson y Crick con el mRNA blanco y lo cortan en un lugar específico (Couture y Stinchcomb, 1996; Doudna y Cech, 2002). Así, esta actividad catalítica brinda la posibilidad de disminuir la cantidad de mRNA para la ALDH2 para que el proceso de traducción cuente con menor cantidad de mensajero. Si ello se logra, la cantidad de enzima disponible para degradar el acetaldehído será inferior a lo normal y aumentarán los niveles de acetaldehído.

## **RIBOZIMAS**

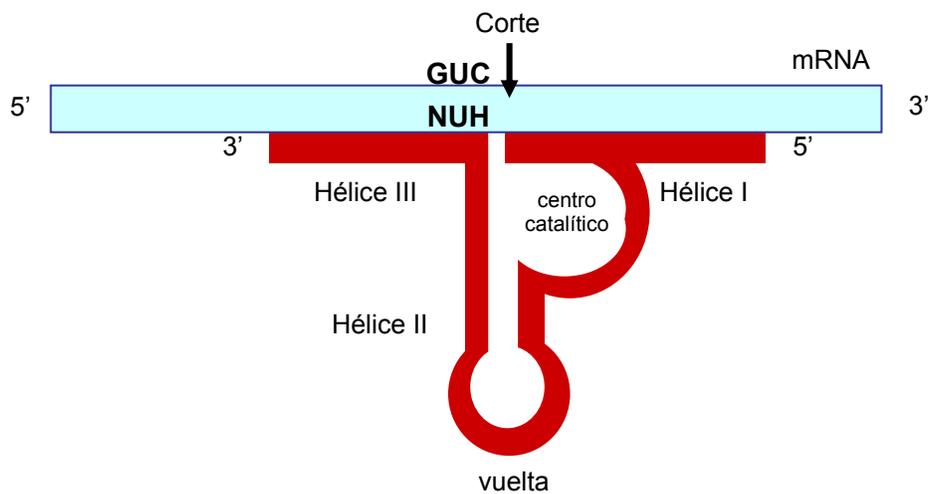
En su forma silvestre una ribozima de fragmentación, es decir, una ribozima capaz de fragmentar un RNA blanco, es una cadena simple de RNA que se pliega de manera tridimensional dejando un centro con actividad hidrolítica

única (Buzayan y cols., 1986). Estas ribozimas cortan normalmente las uniones fosfodiéster de la cadena de RNA dejando en el punto de corte un extremo 3' con fosfato 2'-3' cíclico y en el extremo 5' un grupo hidroxilo (OH) (Doudna y Cech, 2002). Todas las ribozimas requieren de un catión divalente (el más utilizado es el magnesio) y de una conformación que permita generar este corte en la cadena de RNA (Couture y Stinchcomb, 1996; James y Gibson, 1998). Las ribozimas de fragmentación más empleadas en terapia génica son las llamadas de martillo y de horquilla.

### **Ribozima de Martillo**

Tiene aproximadamente 30 nucleótidos que adoptan una estructura secundaria cuya representación en forma de cabeza de martillo da origen a su nombre (Symons, 1992). Su estructura está compuesta por un centro catalítico, tres vueltas y tres hélices de doble hebra: hélice I, hélice II y hélice III (Figura 1). Las hélices I y III incluyen las secuencias complementarias y antiparalelas al mRNA, donde cada hélice se forma por el apareamiento de 8 a 10 pb entre el mRNA y la ribozima (Amarzguioui y Prydz, 1998). La hélice II presenta nucleótidos conservados 5' CUGAHGA y GAAA 3', siendo H cualquier nucleótido menos guanina (Birikh y cols., 1997); si alguno de estos nucleótidos es reemplazado por otro la ribozima pierde parte de su actividad catalítica. Además, la hélice II mantiene la estabilidad de la zona catalítica.

La ribozima de martillo rompe un enlace fosfodiéster de su mRNA blanco, cortando inmediatamente después de una secuencia NUH, donde N es cualquier nucleótido, U es la uridina y la H puede ser adenina, citosina o uridina pero nunca guanina. El corte ocurre entre la H y el nucleótido que sigue. El triplete GUC (NUH) (Figura 1) ha sido descrito como el más eficiente para la actividad catalítica de la ribozima, tanto *in vivo* como *in vitro* (Birikh y cols., 1997).



**Figura 1**

***Esquema de la estructura secundaria de la ribozima de martillo.***

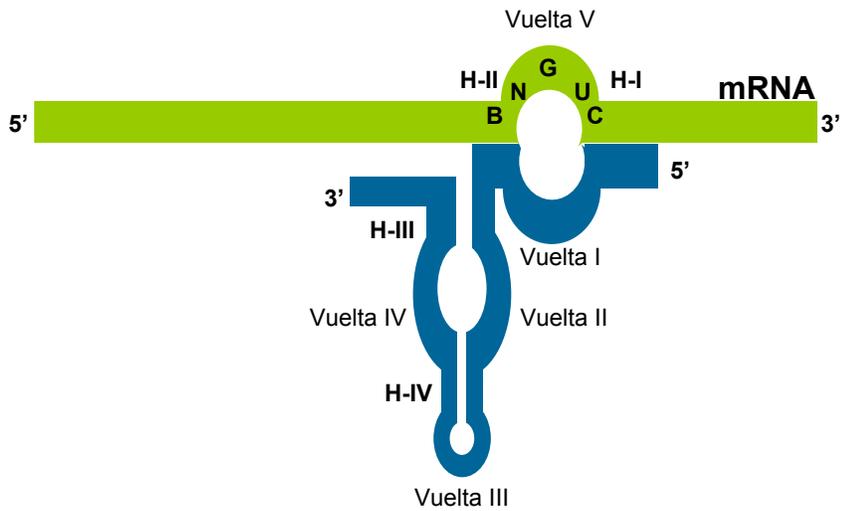
*La ribozima de martillo forma tres hélices de doble hebra (hélices I, II y III), un centro catalítico y una vuelta terminal. Las hélices I y III son las que se forman entre la unión de la ribozima y su mRNA blanco. La hélice II mantiene la estabilidad del centro catalítico.*

El uso de ribozimas de martillo para inhabilitar el mRNA de la ALDH2 de rata como estrategia terapéutica ya ha sido abordado (Muñoz, 2003). Previo al diseño de la ribozima se realizaron ensayos de accesibilidad de desoxirribonucleótidos al mRNA de la ALDH2 mediante RNasa H. Se encontraron zonas expuestas que son posibles sitios de unión de ribozimas al mRNA de la ALDH2 y son sitios blancos porque contienen los tripletes GUC, UUC o CUC. Se construyeron genes codificantes de tres ribozimas de martillo, RzUUC9, RzGUC19 y RzGUC20, que se ensayaron *in vitro* (Muñoz, 2003).

Las ribozimas RzUUC9 y RzGUC20 cortan el mRNA de la ALDH2 y la RzGUC19 no, por lo que se probaron las dos primeras en células de hepatoma de rata H4-II-E-C3 entregando los genes respectivos en construcciones plasmidiales. El mayor efecto se obtuvo con RzGUC20 observándose una disminución del 18% de la actividad de la ALDH2; este valor no ha sido corregido por el tiempo de vida media de la proteína (22 horas) ni por la eficiencia de la transfección. Se determinó que esta disminución se debía a un efecto de antisentido ya que no se detectó una disminución en los niveles de mRNA de la ALDH2, además, la ribozima control (desprovista de actividad de fragmentación mediante una mutación puntual en el centro catalítico) produjo el mismo efecto que la RzGUC20 (Muñoz, 2003). En vista de estos resultados cabe considerar la posibilidad de que la RzGUC19 también tenga un efecto de antisentido en células en cultivo, pudiendo ser mayor al de la RzGUC20.

### **Ribozima de Horquilla**

La ribozima de horquilla, al igual que la de martillo, es una cadena simple de RNA cuya estructura secundaria evoca una horquilla para el cabello (Hampel, 1998). La cadena está formada por un total de 50 a 70 nt, al menos 17 de los cuales interaccionan con el sustrato. La estructura completa tiene 4 hélices de doble hebra y 5 vueltas (Figura 2) (Hampel y cols., 1990). Las hélices III y IV poseen cada una dos uniones GC que son indispensables para la estabilización del resto de la horquilla (Anderson y cols., 1994; Hampel, 1998).



**Figura 2**

***Esquema de la estructura secundaria de la ribozima de horquilla.***

*La ribozima de horquilla forma cuatro hélices de doble hebra y cinco vueltas: las hélices I, II, III y IV y las vueltas I, II, III, IV y V. Las hélices I y II (H-I y H-II) son las que se forman entre la unión de la ribozima y su RNA blanco. Las vueltas I y V forman el centro catalítico.*

La hélice I se apareja complementariamente con el mRNA y su largo varía entre 5 y 10 pb (Symons, 1992). En las vueltas I y V se genera un centro catalítico en el que se ubican los nucleótidos que participan en el corte de la cadena.

Para efectuar el corte debe existir una secuencia preferencial en el blanco y en la ribozima. En el blanco la secuencia obedece a 5' BNGUC 3', donde B puede ser cualquier nucleótido menos adenina y N es cualquier nucleótido. En la ribozima la secuencia no es complementaria y obedece a 3'AAGA 5' (Hampel, 1998). El corte se efectúa entre el nucleótido N y la guanina siguiente (ver Figura 2). Aparentemente no se requiere del catión divalente para efectuar el corte del RNA (Shippy y cols., 1999; Borda y Sigurdsson, 2000).

La caracterización bioquímica muestra que la fragmentación catalítica mediada por la ribozima de horquilla es una de las más eficientes (Andang y cols., 2004). En comparación con la ribozima de martillo, la de horquilla tiene una eficiencia catalítica 80 veces mayor (Symons, 1992), por lo que su uso para disminuir la actividad de la ALDH2 resulta muy promisorio. En este trabajo de tesis se estudió la actividad catalítica de ribozimas de horquilla en células de rata en cultivo con miras a su aplicación en estudios preclínicos en rata.

El diseño de una ribozima de horquilla que tenga el mismo blanco que una de martillo permitiría estudiar en forma experimental cuál de las dos estructuras es más eficiente en la disminución de la actividad de la ALDH2. La ribozima de martillo RzGUC20 se dirige a un blanco del mRNA para ALDH2 (5' CGGUC\* 3') que es apropiado para ser blanco de una ribozima de horquilla (5' BN\*GUC 3').

## **VECTORES**

La ribozima, para ejercer su función catalítica como parte de una terapia contra el desarrollo del alcoholismo, debe encontrarse principalmente en el citoplasma de la célula hepática (Hampel, 1998). La ribozima se puede

entregar a la célula en forma directa, usando vehículos químicos, o bien se puede entregar como gen terapéutico usando vehículos virales (Kootstra y Verma, 2003) y no virales (Lee y Huang, 1997; Han y cols., 2000; Nishikawa y Huang, 2001). Si se quiere lograr un efecto prolongado y disminuir en forma significativa la actividad de la ALDH2, es preferible entregar el gen en lugar de la ribozima misma y entregarlo integrado en un vector que le brinde la mejor eficiencia de transferencia génica. Así, con una cantidad elevada de células transducidas es factible lograr una disminución significativa de la actividad de la ALDH2 mediada por ribozimas.

Se utilizaron en este trabajo tres ribozimas de martillo con la secuencia blanco NUH\* y una ribozima de horquilla con la secuencia blanco BN\*GUC (\* sitio de corte). Las ribozimas de martillo dirigidas al mRNA de la ALDH2 de rata (GenBank X14977) disponibles en el Laboratorio de Farmacoterapia Génica se encuentran clonadas en plasmidios derivados del vector pAC-CMV, plasmidio que contiene un promotor del CMV, dos sitios de poliadenilación del virus SV40 y que además se utiliza para construir adenovirus. El uso de vectores adenovirales ha aumentado en los últimos años en terapia génica por su gran poder infectivo, lo que se traduce en que un mayor número de células recibe el tratamiento farmacológico. Cabe destacar que hay trabajos realizados en el área del alcoholismo en los que se han usado vectores adenovirales (Karahanian y cols., 2005; Ocaranza, 2006) así como trabajos en los que se utilizan los adenovirus como portadores de genes de ribozimas en cultivos celulares (Lieber y cols., 1996) y en animales (Lieber y Kay, 1996).

En este trabajo se construyó un primer derivado plasmidial con el gen de la ribozima de horquilla en pAC-CMV, vector para generar un adenovirus. Este plasmidio fue elegido debido a que: i) las ribozimas de martillo y sus respectivos controles se encuentran clonados en este vector (Muñoz, 2003), lo que permite comparar la acción de ambos tipos de ribozimas en un mismo

contexto molecular, y ii) este plasmidio permite generar un adenovirus que porte el gen de la ribozima más eficaz para estudios preclínicos.

Posteriormente se construyó un segundo derivado plasmidial con las regiones codificantes de la ribozima de horquilla (RzCG20) en el plasmidio pAAV-CMV, vector utilizado para generar virus adenoasociados “AAV” (Xiao y cols., 1998; Carter y Samulski, 2000), modificando con ello la extensión y secuencia río abajo de la ribozima: en los derivados plasmidiales del pAC-CMV el transcrito de la ribozima de horquilla presenta desde el fin del sitio de múltiple clonación hasta el sitio de poliadenilación una secuencia río abajo de alrededor de 300 pb y en los derivados del pAAV-CMV una secuencia río abajo de alrededor de 500 pb. Así se puede estimar si la acción de la misma ribozima de horquilla se ve afectada diferencialmente por dos contextos moleculares distintos.

La elección del plasmidio pAAV-CMV se debe a su proyección experimental, ya que existe la posibilidad de generar en un futuro un virus adenoasociado que codifique la mejor ribozima (Gorbatyuk y cols., 2005). Teniendo las ventajas de ser un vector viral, el virus adenoasociado presenta otras que superan las descritas para los adenovirus. Los virus adenoasociados, a diferencia de los adenovirus, no están implicados en ninguna enfermedad humana, son menos inmunogénicos que los adenovirus (Xiao y cols., 1998) e infectan tanto a células en división como en reposo, implicando con ello una gran capacidad infectiva. Además, estudios en los que se ha utilizado un virus adenoasociado como vehículo de la ribozima, han resultado ser exitosos (Gorbatyuk y cols., 2005).

La generación de un virus, ya sea adenovirus o virus adenoasociado, sería deseable para realizar experimentos *in vivo* y es posible si se cuenta con las construcciones plasmidiales esenciales. Sin embargo, para experimentos *in vitro* es posible usar una estrategia no viral que brinde un cultivo celular uniformemente transducido con el gen terapéutico imitando la ventaja de los

virus pero sin dedicar el tiempo requerido para su generación. La magnitud de los efectos génicos medidos *in vitro* está limitada por el porcentaje de células que hayan recibido el gen terapéutico y el uso de plasmidios convencionales como vectores sólo permite alcanzar porcentajes significativamente inferiores en relación a un vector viral. El porcentaje de células transfectadas con un plasmidio se puede aumentar usando plasmidios derivados del virus del Epstein Barr (Sclimenti y Calos, 1998; Leblois y cols., 2000), como el pCEP4, porque se multiplican y segregan junto con el genoma de la célula (permanencia divisional), funciones que requieren la proteína EBNA codificada en el plasmidio; además, se pueden seleccionar las células que los hayan incorporado porque tienen el gen de resistencia a higromicina (Durocher y cols., 2002). Así, se puede aspirar a tener un cultivo celular homogéneo en el que el 100 % de las células contenga el plasmidio codificante de la ribozima. Al usar esta estrategia existe la posibilidad de que el porcentaje de disminución de la actividad de la ALDH2 sea mayor que el obtenido con los plasmidios pAC-CMV y pAAV-CMV, permitiendo una mejor comparación entre la eficiencia de una ribozima y la de los genes de antisentido entregados a las células en forma viral (Karahanian y cols., 2005), en lugar de hacerlo aplicando factores de corrección a la eficiencia de la ribozima que contemplen la vida media de la proteína y la eficiencia de la transfección.

En este trabajo experimental se diseñaron y utilizaron genes que codifican ribozimas de horquilla y de martillo, incorporados en plasmidios. En una primera etapa se utilizaron los plasmidios pAC-CMV y pAAV-CMV para lipofectar células de hepatoma de rata y evaluar la disminución de la actividad de la ALDH2 por acción de las ribozimas. En una segunda etapa se seleccionaron las células transfectadas con el plasmidio pCEP4, codificante de la ribozima de horquilla, cultivándolas en presencia de higromicina durante tres semanas, evaluando finalmente la disminución de la actividad de la ALDH2 en un 100% de células transfectadas.

## **HIPÓTESIS**

La actividad de la deshidrogenasa aldehídica mitocondrial (ALDH2) de rata se puede disminuir significativamente en células de hepatoma de rata H4-II-E-C3 inhabilitando por degradación (o por bloqueo) su mRNA mediante ribozimas de horquilla y de martillo, siendo, para un mismo blanco, más eficiente una ribozima de horquilla que una de martillo.

## **OBJETIVO GENERAL**

Reducir la actividad de la ALDH2 de rata en cultivos celulares de la línea H4-II-E-C3 de hepatoma de rata mediante la entrega de genes de ribozimas de martillo y ribozimas de horquilla diseñadas para inhabilitar por degradación (o por bloqueo) el mRNA de la ALDH2, incorporados en plasmidios.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- i) Diseñar una ribozima de horquilla (RzCG20) dirigida al mRNA de la deshidrogenasa aldehídica mitocondrial de rata (posiciones expuestas del mRNA 1554-1569) y construir un derivado del plasmidio pAC-CMV que la codifique.
- ii) Evaluar la actividad de las ribozimas de martillo RzUUC9, RzGUC19 y RzGUC20 y la ribozima de horquilla RzCG20, midiendo la actividad enzimática en cultivos de células de hepatoma de rata H4-II-E-C3 lipofectadas con plasmidios derivados del pAC-CMV portadores de los genes que las codifican, caracterizados por tener un promotor del CMV y una señal de poliadenilación del virus SV40, que deja a la ribozima con un segmento río abajo de 300 pb.
- iii) Transferir la(s) ribozima(s) que haya(n) resultado activa(s) de los plasmidios derivados del pAC-CMV al vector pAAV-CMV, caracterizado por tener un promotor del CMV y una señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento humana, que deja a la ribozima con un segmento río abajo de 500 pb.

- iv) Evaluar la actividad de la(s) ribozima(s) codificadas en el vector pAAV-CMV midiendo la actividad enzimática en cultivos de células de hepatoma de rata lipofectadas con dicho(s) plasmidio(s).
  
- v) Construir un derivado del plasmidio pCEP4 portador del gen de la ribozima de horquilla (RzCG20) caracterizado por tener un promotor del CMV y una señal de poliadenilación del virus SV40, que deja a la ribozima con un segmento río abajo de 250 pb, además de ser un vector del tipo cromosoma artificial derivado del virus del Epstein Barr.
  
- vi) Evaluar la actividad de la ribozima de horquilla codificada en el vector pCEP4, midiendo la actividad enzimática en un cultivo de células de hepatoma de rata lipofectadas con dicho plasmidio y seleccionadas de manera que el cultivo esté constituido exclusivamente por células portadoras del vector.

## 2 MATERIALES

### 2.1 Enzimas

Se usaron DNA polimerasa Taq, *Bam* HI, *Eco* RI y *Pvu* II de Promega (Madison, WI, EE.UU.), DNA ligasa del fago T4, *Hin*D III, *Rsa* I de GibcoBRL (Bethesda, MD, EE.UU.).

### 2.2 Reactivos y materiales generales

**Corning** (Corning, NY, EE.UU.): placas Costar de poliestireno de 6 pocillos.

**FMC** (Rockland, ME, EE.UU.): agarosa Nusieve GTG.

**GibcoBRL, Life Technologies** (Bethesda, MD, EE.UU.): fenol ultra puro, extracto de levadura Select, peptona Select 140, agar, Lipofectamine 2000, tripsina-EDTA, penicilina/estreptomicina, higromicina.

**Invitrogen** (Life Technologies, España): agarosa ultrapura

**Mallinckrodt** (Xalostoc, DF, México): cloruro de sodio.

**Merck** (Darmstadt, Alemania): tolueno (p.a.), etanol absoluto (p.a.), 2-propanol (p.a.), ácido acético glacial 100 % (p.a.), ácido clorhídrico fumante 37 % (p.a.), cloroformo (p.a.), acetato de potasio, cloruro de potasio, glicerol 87 % (p.a.).

**Pierce** (Rockford, IL, EE.UU.): cuantificación de proteínas Micro BCA.

**Polaroid** (St. Albans, Hertfordshire, Inglaterra): película 667.

**Promega** (Madison, WI, EE.UU.):  $\beta$ -galactosidasa hidrolizada X-Gal, isopropil  $\beta$ -D-thiogalactopiranosido (IPTG), sistema de purificación de DNA Wizard PCR Preps y Wizard Plus Midipreps, marcadores de peso molecular de DNA "1kb ladder" y "100 bp ladder", dATP, dCTP, dGTP, dTTP.

**Sigma** (St. Louis, MO, EE.UU.): acetato de sodio anhidro, ácido bórico, azul de bromo fenol, bicarbonato de sodio, bromuro de etidio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio hexahidratado, etilendiaminotetraacetato (EDTA) (sal disódica dihidrato), 4-metil-pirazol, pirazol,  $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleótido (NAD),  $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleótido forma reducida (NADH), propionaldehído, Triton X-100, Trizma base.

**W&Z** (Santiago, Chile): fosfato monohidrógeno de sodio.

Agua destilada, desionizada en el laboratorio en un purificador Barnstead NANOpure infinity D8982 (18 MΩ·vm) (Dubuque, IA, EE.UU.).

### 2.3 Soluciones

*Tampón TAE:* Tris-acetato 40 mM; EDTA 2 mM.

*Tampón TBE:* Tris-ácido bórico 90 mM; EDTA 2 mM.

*Tampón PBS:* NaCl 137 mM, KCl 2 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 13 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM y pH ajustado a 7,4 con HCl.

### 2.4 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados para construir los plasmidios que codifican la ribozima de horquilla (Tabla 1) y los utilizados para secuenciar los plasmidios pLLX (Tabla 2) se diseñaron a partir de la secuencia del cDNA de rata Sprague Dawley (GenBank: X14977) (Farrés y cols., 1989) incorporando las correcciones hechas por Sapag y cols. (comunicación personal); el cDNA de la rata Sprague Dawley es idéntico al de la rata Lewis (GenBank: AF529165) y al de las células H4-II-E-C3 (Garver y cols., 2001). El partidor TG34 se ancla en la secuencia del promotor del CMV, promotor presente en los plasmidios derivados del pAC-CMV, pAAV-CMV y pCEP4 (Tabla 3). El partidor TG233 se ancla en la secuencia de la señal de poliadenilación del virus SV40 que está presente en los plasmidios pAC-CMV y pCEP4. Todos los oligonucleótidos se sintetizaron en “CESAT” (Centro de Equipamiento y Servicios de Apoyo Tecnológico, Facultad de Medicina, Universidad de Chile).

### 2.5 Plasmidios

Como parte de esta tesis se construyeron en total siete plasmidios según se describe en la sección de métodos. Los plasmidios pLL5 y pLL7 (Tabla 4, Figura 3) son derivados del pAC-CMVpLpARS (+) (Becker y cols., 1994. designado abreviadamente pAC-CMV en este trabajo), los plasmidios pLL9 y pLL10 son derivados del pAAV-CMV (Stratagene, Cedar Creek, TX, EE.UU.) y los plasmidios pLL13 y pLL15 son derivados del pCEP4 (Invitrogen). Estos

seis derivados plasmidiales se construyeron para sintetizar las ribozimas de horquilla y su control en células de hepatoma de rata. En forma particular el plasmidio peGFP derivado del pAC-CMV se construyó para sintetizar la proteína fluorescente verde (control de transfección) en células H4-II-E-C3. Las células 293 se colipofectaron con los plasmidios codificantes de la ribozimas de horquilla junto con el pAC-CMVpALDH2-D (abreviado en este trabajo como pALDH2), derivado del pAC-CMV codificante del mRNA de la ALDH2 (Karahanian y cols., 2005).

### **3 MÉTODOS**

#### **3.1 Construcción de genes de ribozimas de horquilla**

La secuencia de la ribozima se formó mediante el apareamiento de dos oligonucleótidos que forman un dúplex. El dúplex tiene una base variable (S, es decir, C o G) generando una ribozima y una ribozima control catalíticamente inactiva, RzCG20 y RzCG20c respectivamente. Se construyeron los genes de las ribozimas de horquilla mediante una clonación dirigida de estos dúplex en los vectores pAC-CMV, pAAV-CMV y pCEP4.

##### **3.1.1 *Formación del dúplex***

Los oligonucleótidos formadores del dúplex codificante de las ribozimas de horquilla corresponden a TG274 de 44 pb y TG275 de 43 pb (ver Tabla 1). Se introdujo una doble identidad (S= G o C) en la posición 19 del TG274 a través de una síntesis mixta.

**Tabla 1***Oligonucleótidos formadores del dúplex codificante de la ribozima de horquilla*

Partidor	Secuencia
TG274 (>)	5' CCT GAA TTC TTG ACG GTA <u>S</u> AA GTC TAC CAG AGA AAC ACT CTT CG 3'
TG275 (<)	5' CTC AGA CAA GCT TAC CAG GTA ATA TAC CTC CGA AGA GTG TTT C 3'

**S:** posición con doble identidad (puede ser G o C)

**Tabla 2***Oligonucleótidos para secuenciación de los plasmidios pLLX*

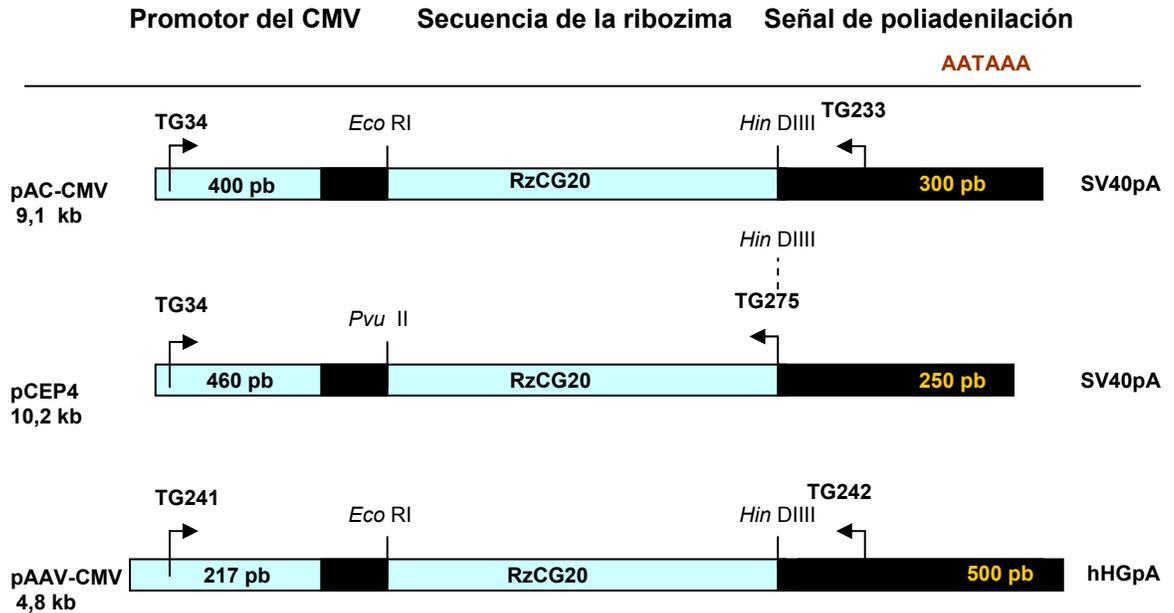
Partidor	Secuencia	Posición
TG34 (>)	5' GTT CCC ATA GTA ACG CCA ATA 3'	promotor del CMV
TG233 (<)	5' ATT TGT AAC CAT TAT AAG CTG C 3'	plasmidio pAC-CMV nts 756-736 (SV40pA) GenBank: XO3922
TG275 (<)	5' CTC AGA CAA GCT TAC CAG GTA ATA TAC CTC CGA AGA GTG TTT C 3'	Región codificante de la ribozima RzCG20

**Tabla 3***Oligonucleótidos usados para las PCRs de plasmidios*

Partidor	Secuencia	Posición	Nº acceso
TG34 (>)	5' GTT CCC ATA GTA ACG CCA ATA 3'	promotor del CMV	-
TG233 (<)	5' ATT TGT AAC CAT TAT AAG CTG C 3'	plasmidio pAC-CMV nts 756-736 (SV40pA)	GenBank: XO3922
TG275 (<)	5' CTC AGA CAA GCT TAC CAG GTA ATA TAC CTC CGA AGA GTG TTT C 3'	Región codificante de la ribozima RzCG20	
TG241 (>)	5' CAA CGT GCT GGT CTG TGT GC 3'	plasmidio pAAV-CMV nts 1263-1283 ( $P_{CMV}$ )	GenBank: AF396260
TG242 (<)	5' CTG GAG TGG CAA CTT CCA GG 3'	plasmidio pAAV-CMV nts 1457-1437 hHGpA	GenBank: AF396260

**Tabla 4***Plasmidios usados en células en cultivo.*

Plasmidio		Ribozima		
Nombre	Vector	Nombre	Estructura	Referencia
pCMB1	pAC-CMV	RzGUC20	martillo	Muñoz, 2003
pCMB2	pAC-CMV	RzGUC20c	martillo control	Muñoz, 2003
pCMB3	pAC-CMV	RzGUC19	martillo	Muñoz, 2003
pCMB5	pAC-CMV	RzUUC9	martillo	Muñoz, 2003
pCMB6	pAC-CMV	RzUUC9c	Martillo control	Muñoz, 2003
pCMB8	pAC-CMV	RzGUC19c	martillo control	Muñoz, 2003
pLL5	pAC-CMV	RzCG20	horquilla	Este trabajo
pLL7	pAC-CMV	RzCG20c	horquilla control	Este trabajo
pLL9	pAAV-CMV	RzCG20	horquilla	Este trabajo
pLL10	pAAV-CMV	RzCG20c	horquilla control	Este trabajo
pLL13	pCEP4	RzCG20	horquilla	Este trabajo
pLL15	pCEP4	RzCG20c	horquilla control	Este trabajo
Plasmidio		Estructura		
Nombre	Vector	Característica	Referencia	
pAC-eGFP	pAC-CMV	codifica la proteína eGFP	Este trabajo	
peGFP	pAAV-CMV	codifica la proteína eGFP	Ezquer, 2006	
pALDH2	pAC-CMV	codifica el mRNA de la ALDH2	Karahanian y cols., 2005	



**Figura 3**

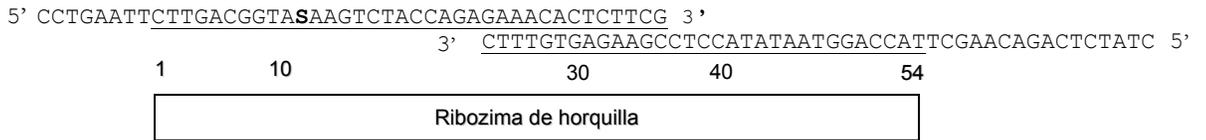
***Plasmidios utilizados para la clonación de ribozimas de horquilla.***

*Se indican los partidores utilizados para la amplificación del segmento que contiene la secuencia de la ribozima, la señal de poliadenilación de cada uno y los tamaños de las regiones río arriba, desde el partidor ubicado en el promotor del CMV hasta el sitio de corte utilizado para la clonación dirigida de la ribozima, y río abajo desde el fin del sitio de múltiple clonación hasta el (primer) sitio de poliadenilación (AATAAA).*

Para formar el dúplex se desnaturaron juntos 160 pmoles de TG274 y 174 pmoles de TG275 en Tris-HCl 50 mM pH 7,2, MgSO<sub>4</sub> 10 mM y DTT 0,1 mM (que corresponde al tampón del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I) en un volumen de reacción de 30 µL. Se incubó la mezcla durante 10 minutos a 80°C (en bloque térmico) y luego a 37°C (en un incubador de bacterias) durante 10 minutos para que la muestra alcanzara lentamente esta temperatura facilitando el apareamiento de los oligonucleótidos (14 pb de solapamiento, Figura 4) y se mantuvo la mezcla a la misma temperatura durante 10 minutos adicionales.

Se adicionaron 2 unidades de la polimerasa y dNTPs a una concentración total final de 40 µM, en un volumen final de 35 µL. Se polimerizó incubando a 37°C durante 30 minutos. Se desnaturó la enzima a 75°C durante 10 minutos (en bloque térmico), el dúplex se precipitó con 2 volúmenes de etanol al 100% y 0,1 volumen de acetato de sodio 3 M, se incubó 20 minutos a -20°C, se centrifugó a 14.000 g a 4°C durante 15 minutos, se secó el precipitado al vacío durante 10 minutos y finalmente se resuspendió el material en 50 µL de tampón de digestión (Tris-HCl 60 mM pH 7,5, NaCl 500 mM, MgCl<sub>2</sub> 60 mM y DTT 10 mM, Promega).

El dúplex obtenido tiene los extremos romos. Por lo tanto, para efectuar la clonación dirigida en el vector pAC-CMV, se efectuó el corte del dúplex con las enzimas *EcoRI* (1U) y *HindIII* (1U) durante 2 horas a 37°C. Se extrajeron las enzimas con fenol-cloroformo (en una razón 1:1), se precipitó y resuspendió en 30 µL de agua suponiendo una recuperación del 80% para cálculos posteriores. El vector pAC-CMV se sometió igualmente a digestión con *EcoRI* y *HindIII* (42 ng en 30 µL).



## Figura 4

### ***Apareamiento de oligonucleótidos formadores del dúplex***

*En subrayado se muestra la secuencia que da origen a la ribozima de horquilla. La zona de apareamiento es de 13 nucleótidos. S= G o C.*

#### 3.1.2 Ligación del dúplex a los plasmidios

El dúplex se ligó a los tres plasmidios utilizados en este trabajo: pAC-CMV, pAAV-CMV y pCEP4. La ligación del dúplex al plasmidio pAC-CMV se realizó mezclando 285 ng de pAC-CMV digerido con 42 ng de dúplex, en tampón de ligación (Tris-HCl 30 mM pH 7,8, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 10 mM y ATP 1 mM) en un volumen final de 20 µL a una razón molar vector:dúplex de 1:25. La ligación se llevó a cabo a 4°C durante 48 horas. Para el plasmidio pAAV-CMV se usaron 111 ng de vector digerido y 32 ng de dúplex y para la ligación al pCEP4, se usaron 272 ng de vector y 40 ng de dúplex, en las mismas condiciones descritas e igual razón molar.

#### 3.1.3 Transformación de bacterias competentes

Se incubaron 100 µL de bacterias *E. coli* DH5α competentes en presencia de 10 µL de producto de ligación (pAC-CMV, pAAV-CMV y pCEP4) durante 30 minutos en hielo, luego se aplicó un golpe térmico a 42°C durante dos minutos en un bloque térmico (VWR Brand) y nuevamente en hielo 2 minutos adicionales. Las células se transfirieron a un tubo con 900 µL de medio LB y se incubaron a 37°C durante 90 minutos con agitación. Se sembraron 100 µL, 150 µL y 200 µL de la suspensión de bacterias en placas con agar 1,5 % en

medio Luria (LB) con ampicilina (100 µg/mL) como antibiótico de selección. Las placas se incubaron en posición invertida durante toda la noche a 37°C (incubador de bacterias Shel Lab, EE.UU.). Las bacterias que sufrieron exitosamente la transformación, formaron colonias discretas que se propagaron en medio líquido (LB-ampicilina): se picaron con puntas amarillas desechables con las que se inoculó el medio. Se realizó una purificación alcalina de los plasmidios de los clones elegidos y una PCR seguida de digestión con enzimas de restricción (PCR-RFLP, restriction fragment length polymorphism) para determinar si el inserto correspondía a la ribozima o a su control.

#### 3.1.4 Purificación de plasmidios por lisis alcalina

Se utilizó 1,5 mL de cultivo bacteriano fresco y se centrifugó a 14,000 g durante 2 minutos descartando el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 100 µL de solución I (Tris-HCl 25 mM y EDTA 10 mM) y se agitó vigorosamente. Luego se adicionaron 200 µL de solución II (NaOH 0,2 M y SDS 1%) y se mezcló a mano rápidamente por inversión. Se adicionaron 150 µL de solución III (potasio 3 M y acetato 5 M), se agitó, dejando reposar durante 5 minutos. Se centrifugó a 14,000 g durante 7 minutos y se transfirió el sobrenadante a otro tubo, donde se realizó una extracción con fenol saturado con Tris-HCl a pH 7,4; se separaron las fases centrifugando a 14,000 g durante 5 minutos. Se transfirió la fase acuosa a otro tubo, se precipitaron los ácidos nucleicos con un décimo del volumen de acetato de sodio 3 M y dos volúmenes de etanol y se resuspendieron en 50 µL de agua. Se visualizaron los plasmidios en un gel de agarosa al 1% y se estimó su concentración aproximada para realizar una PCR-RFLP.

#### 3.1.5 Sondeo de ribozimas mediante PCR-RFLP

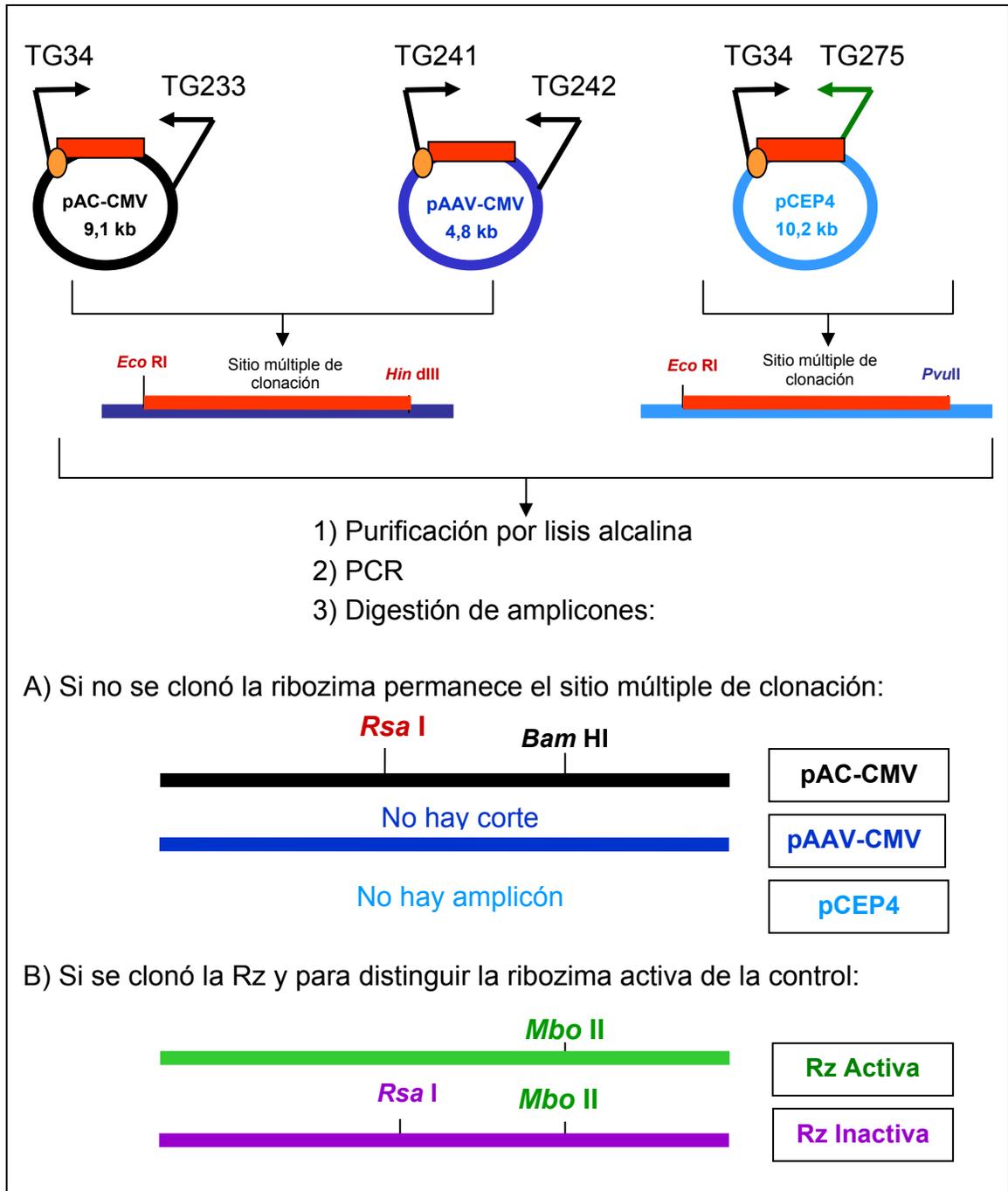
Se utilizaron 50 ng de plasmidio purificado por lisis alcalina para realizar una PCR en condiciones de 1,0 mM de cloruro de magnesio y 60°C para el apareamiento. Las mezclas de reacción se sometieron a una etapa inicial de

desnaturación a 94°C durante 3 minutos y luego a 35 ciclos de amplificación; la etapa de desnaturalización se realizó a 94°C durante 1 minuto, la de apareamiento a 60°C durante 2 minutos y la de polimerización a 72°C durante 2 minutos. Se realizó una elongación de 10 minutos a 72°C.

En el caso de los plasmidios derivados del vector pAC-CMV los partidores utilizados son el TG34, que se ancla en el promotor del CMV, y el TG233, que se ancla en la señal de poliadenilación del SV40. Para los plasmidios derivados del vector pAAV-CMV se utilizaron el TG241, que se ancla en el promotor del CMV, y el TG242, que se ancla en la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento humana. En el caso del pCEP4 se utilizaron el TG34 y el TG275; este último es el mismo oligonucleótido utilizado para formar el dúplex de la ribozima, por lo tanto, si hay amplificación, necesariamente está clonada la secuencia de la ribozima en el plasmidio. Todos los partidores se usaron a 2 pmol/μL, la concentración final de dNTPs a 10 μM y la reacción se hizo en un volumen final de 25 μL.

Una vez obtenidos los productos de amplificación mediante PCR se efectuó una sucesión de dos digestiones enzimáticas de los amplicones. Primero, para determinar si se clonó o no la ribozima, se usaron las enzimas: *Bam* HI, que corta en la secuencia del sitio de múltiple clonación sólo para el caso del pAC-CMV, y *Mbo* II, que corta en la secuencia de la ribozima de horquilla sin discriminar si es la ribozima o su control. Luego, y sólo si dio positiva la digestión con *Mbo* II, se realizó la digestión del amplicón con *Rsa*I para determinar si la ribozima clonada es la ribozima o su control (Figura 5).

Para los amplicones provenientes del pCEP4 al ser el TG275 el mismo oligonucleótido utilizado para formar el dúplex de la ribozima, no fue necesario discriminar por corte la presencia de la ribozima en el plasmidio. El sondeo para discriminar entre la ribozima y su control (RzCG20 o RzCG20c), se



**Figura 5**

**Sondeo de clones mediante PCR-RFLP**

Sondeo para clonaciones en pAAV-CMV y pAC-CMV mediante una PCR inicial y una posterior digestión enzimática del amplicón según sea la secuencia inserta en el sitio múltiple de clonación.

efectuó mediante una secuenciación de dos de los candidatos (sección 3.1.7).

Se amplificaron los clones elegidos, se purificaron los plasmidios por Wizard Miniprep y se les asignaron los nombres pLLX, siendo p: letra que identifica la molécula como un plasmidio, LL: letras iniciales de Lorena Lobos y X: el número del clon generado (Tabla 4).

### 3.1.6 Electroforesis

La técnica de electroforesis se utilizó para la separación y resolución de las diversas moléculas de DNA (plasmidios y amplicones), controlando que los tamaños correspondiesen a los esperados teóricamente.

Se realizaron electroforesis en geles de agarosa de distintos porcentajes, entre 0,7 % y 2 %, usando como medio de corrida el tampón TAE 1X, para ver la formación del dúplex, los plasmidios obtenidos de las purificaciones alcalinas y para los productos del sondeo mediante PCR-RFLP de las ribozimas de horquilla. Se utilizaron cámaras de electroforesis horizontal modelos MGU-402T, 502T y 602T de CBS Scientific (CO, EE.UU.).

### 3.1.7 Secuenciación

Los plasmidios purificados mediante Wizard Miniprep (Promega), se secuenciaron en el Servicio de Secuenciación Automática de ADN del Departamento de Ecología (Pontificia Universidad Católica de Chile) mediante secuenciación automática en un equipo Applied Biosystems modelo 310-3100 (electroforesis capilar). Se analizaron pLL5 utilizando el partidador TG233, pLL13 con TG34 y pLL15 con TG275. Se confirmó que los tres plasmidios tienen la secuencia correcta de las ribozimas y sus controles según el caso, indicando, por lo tanto, que el dúplex estaba bien sintetizado y que la PCR-RFLP realizada es un método válido de sondeo. Los partidadores utilizados para secuenciar se describen en la Tabla 2.

### 3.2 Cultivo bacteriano

Para las transformaciones se usaron células de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (genotipo: F- $\phi$ 80d/*lacZ* $\Delta$ M15 $\Delta$ (*lacZ*YA-*argF*) U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17* (*r<sub>k</sub><sup>-</sup>*, *m<sub>r</sub><sup>+</sup>*) *phoA supE44  $\alpha^-$  thi-1 gyrA96 relA1*) hechas competentes usando cloruro de calcio 50 mM (Ausubel, 1996). Las bacterias se cultivaron en un agitador orbital climatizado (modelo 4628-1, LabLine) a 250 rpm en medio de cultivo líquido Luria-Bertani (LB) (NaCl 5 g/L, extracto de levadura 5 g/L y peptona 10 g/L) sin ampicilina (Ap) para las transformaciones y con Ap (100  $\mu$ g/mL) para realizar las purificaciones plasmidiales. También se cultivaron en medio LB sólido agar (15 g/L) en presencia de ampicilina (100  $\mu$ g/mL) en placas de Petri desechables de 90x15 mm (Miniplast Ein-Shemer, Israel).

### 3.3 Cultivo celular eucariótico

Se usó la línea celular H4-II-E-C3 (ATCC CRL-16) de hepatoma de rata (American Type Culture Collection, Rockville, MD, EE.UU.). Las células se cultivaron en matraces de poliestireno de 75 cm<sup>2</sup> Sarsted (Newton, NC, EE.UU.) en medio Eagle modificado por Dulbecco con glucosa 4500 mg/mL, L-glutamina 584 mg/mL, piruvato de sodio 110 mg/mL y clorhidrato de piridoxina (DMEM) (GibcoBRL, Life Technologies, Bethesda, EE.UU.), suplementado con 1,5 g/L de bicarbonato de sodio, esterilizado mediante filtros de nitrocelulosa (GelmanSciences, Ann Arbor, MI, EE.UU.) de 0,2  $\mu$ m y complementado con penicilina 100 U/mL, estreptomina 0,1 mg/mL, 10 % de suero de equino definido Hyclone (Logan, UT, EE.UU.) y 5 % de suero fetal de bovino caracterizado Hyclone (Logan, UT, EE.UU.) en un incubador Napco 6101F-1 (Chicago, IL, EE.UU.) a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub> (Indura, Santiago, Chile).

La línea celular 293, de células embrionarias de riñón humano (ATCC, CRL-1573), se cultivó en las mismas condiciones que las células de hepatoma de rata, pero se prescindió del suero fetal de bovino usando sólo 10 % de suero de equino definido Hyclone (Logan, UT, EE.UU.).

### **3.4 Lipofección de células de hepatoma de rata H4-II-E-C3**

Se sembraron  $1 \times 10^6$  células en placas o pocillos de 35 mm en 2 mL de medio completo con sueros y antibióticos. Alcanzando entre un 60 y 70% de confluencia (18–20 hrs post siembra) se realizaron tres lavados con medio libre de suero y sin antibióticos (medio de transfección). Se realizó la lipofección en 2 mL de medio libre de suero y sin antibióticos utilizando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) como vector.

Se lipofectaron las células de hepatoma de rata con 2  $\mu$ g de plasmidio, purificados mediante Wizard Midipreps y cuantificados por gel y espectrofotometría, a 260 nm (espectrofotómetro Shimadzu, modelo UV-1201, Japón). Se preparó la mezcla de lipofección, se mezcló el volumen de DNA que corresponde a los 2  $\mu$ g de plasmidio con el volumen del medio de transfección hasta alcanzar 120  $\mu$ L, se agitó y se adicionaron a esta mezcla 5  $\mu$ L de Lipofectamine 2000 (Invitrogen), por lo tanto, el volumen final de lipofección es de 125  $\mu$ L. Se dejó reposar la mezcla final durante 20 minutos y se vertió sobre el cultivo de células de hepatoma de rata H4-II-E-C3 (Xiao y Samulski, 1998). A las 5 horas, se retiró el medio de lipofección y se restituyó el medio suplementado con sueros y antibióticos, 2 mL en cada pocillo. Las células se cultivaron 43 horas adicionales hasta completar 48 horas totales desde el inicio de la lipofección, llegando a cerca de un 100% de confluencia. Después de las 48 horas se retiró el medio y las placas con células se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Luego se descongelaron y se adicionaron a cada pocillo 500  $\mu$ L de una solución de Triton X-100 al 1% y EDTA 1 mM, manteniéndolas en agitación orbital (Lab-Rotator, Lab Line, EE.UU.) 10 minutos a 500 rpm. Se centrifugó a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos a 14000 rpm (1000 g) (centrífuga Eppendorf, modelo 5810R, Alemania). El sobrenadante del lisado celular se utilizó para la cuantificación de proteínas totales y la medición de la actividad enzimática.

Se utilizó el kit Superfect (QIAGEN) (gentileza del Dr. Andrew Quest, Laboratorio de Comunicaciones Celulares de la Facultad de Medicina de nuestra Universidad) para probar otro tipo de vector químico (dendrimeros) y comparar los resultados en las transfecciones. Las células transfectadas con Superfect se sometieron al mismo tratamiento empleado para las transfecciones con Lipofectamine 2000.

#### 3.4.1 Colipofección de células 293

Las células 293 se colipofectaron con los plasmidios codificantes de la ribozima de horquilla RzCG20 junto con el pALDH2, codificante de la ALDH2. Se sembraron  $1 \times 10^6$  células en cada pocillo de una placa de 6 pocillos, en DMEM con antibióticos y sin suero en pocillos de 35 mm. Transcurridas 24 horas, estando las células entre 60% y 70% de confluencia, se retiró el medio de cultivo, se adicionó 1 mL de DMEM sin antibióticos y sin suero.

Se diluyeron 2  $\mu\text{g}$  de DNA de cada plasmidio a utilizar (2 plasmidios considerando siempre la presencia del pALDH2; 4  $\mu\text{g}$  de DNA total) en medio DMEM sin sueros y sin antibióticos siendo el volumen final de 125  $\mu\text{L}$ . La mezcla se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente. En forma paralela se mezclaron 8  $\mu\text{L}$  de Lipofectamine 2000 (proporción de 4  $\mu\text{L}$  para 2  $\mu\text{g}$  de DNA) y DMEM sin sueros y sin antibióticos en un volumen final de 200  $\mu\text{L}$ . Esta mezcla se homogeneizó suavemente y se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 minutos. Ambas mezclas (plasmidios y liposomas) se juntaron y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente (volumen total de la mezcla de lipofección es de 325  $\mu\text{L}$ ).

Se vertió la mezcla de DNA-Lipofectamine 2000 sobre las células. A las 6 horas de efectuada la lipofección se realizó la remoción del medio y se adicionaron 2 mL de DMEM suplementado con sueros a cada pocillo. Las células se incubaron hasta completar 72 horas totales desde el inicio de la lipofección.

### **3.5 Selección de células H4-II-E-C3 con higromicina**

La selección de las células lipofectadas con pCEP4, pLL13 (RzCG20 en pCEP4) y pLL15 (RzCG20c en pCEP4) se hizo mediante la aplicación de una dosis de higromicina que es letal para las células H4-II-E-C3. El gen de resistencia a este antibiótico está incorporado en el pCEP4. La dosis de higromicina debe ser determinada para cada tipo celular, por lo cual se realizó una curva de resistencia a higromicina, entre 100 y 1000  $\mu\text{g/mL}$  y una segunda entre 10 y 100  $\mu\text{g/mL}$ , en las células H4-II-E-C3 y se determinó que 50  $\mu\text{g/mL}$  es una concentración letal de antibiótico.

Se lipofectaron las células con los plasmidios pCEP4, pLL13 y pLL15 (plasmidio sin inserto y codificantes de la ribozima y su control respectivamente). Al completar las 48 horas postlipofección se realizó la selección de las células que incorporaron el plasmidio agregando higromicina a 50  $\mu\text{g/mL}$ . El antibiótico se restituyó en el cambio de DMEM suplementado con suero y antibióticos cada 4 días y se efectuó el conteo celular por observación directa al microscopio (Nikon Eclipse TS-100, EE.UU.). A los diez días de selección comenzó la muerte de las células que no tienen resistencia al antibiótico, permaneciendo cerca de un 15% de las células adheridas a la placa. Este mismo día se modificaron las condiciones de cultivo para aumentar la tasa de replicación: se mantuvo la concentración de higromicina a 50  $\mu\text{g/mL}$  en medio DMEM, pero se suplementó con un 5% extra de suero fetal bovino. Esta selección se efectuó en triplicado y a dos de estos ensayos se les cuantificó la actividad enzimática.

Las células resistentes alcanzaron confluencia al día 30 post lipofección, fueron tripsinadas y se sembraron 6 pocillos. A cinco de ellos, al alcanzar la confluencia bajo selección permanente con higromicina, se les cuantificó la actividad de la ALDH2 (ver Figura 10). El pocillo restante se utilizó para guardar una población homogénea celular que tenga incorporado un plasmidio codificante de la ribozima.

### 3.6 Medición de la actividad enzimática de la ALDH2

La medición de la actividad de la ALDH2 se realizó en el sobrenadante de lisados de células H4-II-E-C3 (ver sección 10.3). Se usó una alícuota de 5  $\mu\text{L}$  para cuantificar la concentración de proteínas totales y otra alícuota de 150  $\mu\text{L}$  para medir la actividad (espectrofotómetro Shimadzu, modelo UV-1201 asociado a controlador de temperatura CPS-Controller 240A, Japón).

Los 150  $\mu\text{L}$  del lisado se mezclaron con propionaldehído 14  $\mu\text{M}$  y  $\text{NAD}^+$  800  $\mu\text{M}$  en fosfato mono ácido de sodio 34  $\mu\text{M}$  pH 8,5, DTT 4 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, 4-metil-pirazol 10 mM y NADH 10  $\mu\text{M}$  en un volumen final de 800  $\mu\text{L}$ . El lisado celular se incubó con la solución de reacción en presencia de  $\text{NAD}^+$ , NADH y sin sustrato para agotar otras actividades generadoras y consumidoras de NADH. Se usó 4-metil pirazol a una concentración de 10 mM y pirazol a una concentración de 100 mM (ambos son inhibidores de la deshidrogenasa alcohólica) para impedir que el propionaldehído sea reducido a propanol. El registro se hizo a 35°C; se definió esta temperatura de ensayo enzimático a partir de un barrido (15, 20, 25, 30 y 35°C).

Se registró la absorbancia a 340 nm (aparición del NADH) durante 25 minutos en total. Durante los 10 primeros minutos se tomó registro cada 1 minuto. Al minuto 10 se inició la reacción agregando propionaldehído (sustrato análogo al acetaldehído) y se registró la absorbancia cada 30 segundos durante 10 minutos. Finalmente, se tomó registro cada 1 minuto durante 5 minutos adicionales. Se graficó el aumento de la absorbancia respecto al tiempo.

Se calculó la velocidad inicial a partir de la recta ajustada a la curva de absorbancia vs tiempo y se determinó la actividad específica de la ALDH2. Se calcularon valores entre 0,5 y 2 pmoles de NADH / mg de proteína / min.

### 3.6.1 Cuantificación de proteínas totales

La cuantificación de proteínas totales se hizo empleando el método del ácido bicinconínico. El ácido bicinconínico es un cromógeno que utiliza la reducción de  $\text{Cu}^{+2}$  a  $\text{Cu}^{+1}$  formando un complejo ternario de coloración púrpura que es detectable a una longitud de onda de 562 nm (Smith y cols., 1985). Del sobrenadante del lisado celular obtenido se utilizaron 5  $\mu\text{L}$ , los que se diluyeron hasta alcanzar un volumen final de 200  $\mu\text{L}$ , luego se adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reactivos del sistema comercial de Pierce. Las muestras se incubaron a  $62^\circ\text{C}$  durante 1 hora en bloque térmico, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se midieron espectrofotométricamente.

### 3.7 Control de transfección

Se clonó el gen de la proteína fluorescente verde en el vector pAC-CMV (el plasmidio se designó pAC-eGFP) (ver Tabla 4), con el propósito de usarlo como control de transfección para aquellas ribozimas clonadas en el vector pAC-CMV. Para las ribozimas clonadas en el pAAV-CMV se usó un vector comercial (peGFP, Promega) como control de transfección. El cDNA de la eGFP se obtuvo por digestión del peGFP con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* y se clonó el fragmento de interés en el pAC-CMV.

El porcentaje de células H4-II-E-C3 transfectadas con los plasmidios pAC-eGFP y peGFP se estimó midiendo el porcentaje de células fluorescentes a las 48 horas desde el inicio de la lipofección. Se lavaron las células con medio sin suero y se vertió sobre ellas 1,5 mL de tripsina-EDTA (2,5 mg/mL de tripsina y 3,8 mg/mL de EDTA). Se adicionó el doble de volumen de medio DMEM para neutralizar la tripsina y se transfirieron las células a un tubo de 15 mL. Se centrifugaron (Dynac II, Becton Dickinson) durante 5 minutos a 1000 rpm y se resuspendieron en 1 mL de PBS (filtrado no esterilizado) a pH 7,4. Se agitaron continuamente para evitar que se unieran entre sí. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo (FACSort Becton Dickinson, excitación 488 nm con láser de argón, detección de la emisión a 525 nm),

equipo a cargo del Dr. Javier Puente del Laboratorio de Inmunobioquímica, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de nuestra Facultad, bajo la operación de Sandra Chandía. Se cuantificaron primero los controles, que corresponden a células sin lipofectar, para obtener la fluorescencia base de este tipo celular y se procedió con el resto de las muestras. Se cuantificó un total de 50.000 células por muestra y se calculó el número de células lipofectadas en porcentaje respecto al total de células cuantificadas en el citómetro.

### **3.8 Análisis estadístico**

Los datos obtenidos se analizaron aplicando el test T de Student mediante el programa SISA (Binominal.SISA. [http://home.clara.net/sisa/paread test.htm](http://home.clara.net/sisa/paread%20test.htm)).

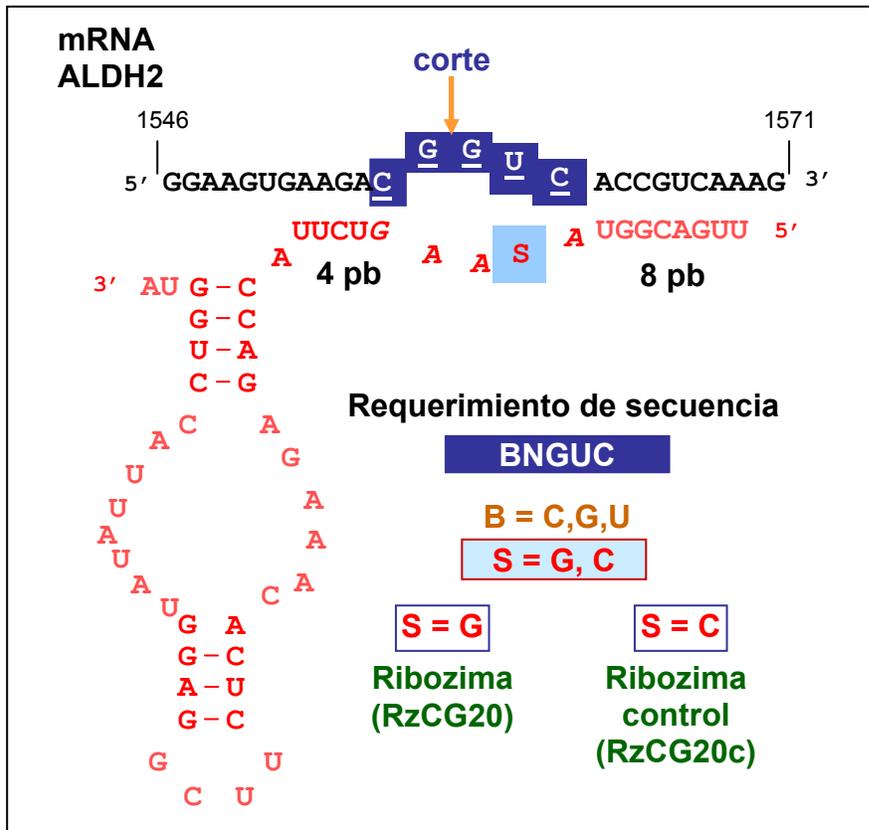
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Diseño y síntesis de construcciones génicas

Se diseñó una ribozima de horquilla (Hampel y cols., 1990) catalíticamente (RzCG20) y su control (RzCG20c) incapaz de fragmentar el blanco. Cuando en la posición 10 en la vuelta I de la ribozima (Figura 6) hay una G la ribozima “RzCG20” es catalíticamente activa y si hay una C la ribozima “RzCG20c” es catalíticamente inactiva (Hampel, 1998), sirviendo de control para descartar la posible acción antisentido. La notación de RzCG20 y RzCG20c está dada por *Rz*: ribozima, *CG*: secuencia de BN en el pentámero requerido en el sustrato (BNGUC), *20*: triplete GUC número 20 del mRNA para la ALDH2 y *c*: control. Al igual que con las ribozimas de martillo la ribozima control permite estimar si el efecto de la ribozima es en parte por mecanismos de antisentido.

Se construyeron los genes de la ribozima de horquilla mediante una clonación dirigida del dúplex de oligonucleótidos codificante de la ribozima de horquilla en los vectores pAC-CMV y pAAV-CMV utilizando los sitios *EcoRI* e *HindIII* en ambos casos y en el vector pCEP4 utilizando los sitios *PvuII* e *HindIII*. En los tres plasmidios el gen de la ribozima queda con el promotor fuerte del citomegalovirus ( $P_{CMV}$ ) y con una secuencia que codifica la señal de poliadenilación, la hormona de crecimiento humano (hHGpA) en el pAAV-CMV y la del virus SV40 (SV40pA) en los plasmidios pAC-CMV y pCEP4. A los clones elegidos se les asignaron los nombres de pLL5, pLL9 y pLL13 que tienen como inserto el DNA codificante de la ribozima RzCG20 clonado en el pAC-CMV, el pAAV-CMV y el pCEP4 respectivamente y los nombres pLL7, pLL10 y pLL15 que tienen como inserto el DNA codificante de la ribozima inactiva en los mismos plasmidios antes nombrados (ver Tabla 4).

Las ribozimas de martillo utilizadas fueron diseñadas para dirigirse a zonas expuestas del RNA mensajero de la ALDH2 (Muñoz, 2003). En la Figura 6 se muestra la ribozima de horquilla RzCG20, específicamente el diseño de la



**Figura 6**

***Estructura secundaria de la ribozima de horquilla RzCG20.***

→ : Sitio de corte en el mRNA de la ALDH2.

*Las bases destacadas corresponden a la secuencia requerida de corte (BN\*GUC).*

ribozima y las posiciones del blanco en el mRNA, y en la Figura 7 se muestra la ribozima de martillo RzGUC20 con las mismas descripciones de diseño.

#### **4.2 Eficiencia de transfección en células de hepatoma de rata**

Las células de hepatoma de rata se transfectaron con los plasmidios de interés usando liposomas catiónicos como vector químico (Lipofectamine 2000; lipofectamina). Los bajos porcentajes de transfección de las células H4-II-E-C3 estimados con genes reporteros (ver métodos), nos llevaron a probar otro agente químico, los dendrímeros (Tang y Szoka, 1997).

La eficiencia de las transfecciones de células H4-II-E-C3 con lipofectamina y dendrímeros se determinó usando los plasmidios pAC-eGFP y peGFP, midiendo el porcentaje de células fluorescentes por citometría de flujo. Se observó una eficiencia de 3% de transfección con lipofectamina vs 0,1% con dendrímeros indicando que los liposomas catiónicos son superiores como vector químico de plasmidios para las células H4-II-E-C3. Los porcentajes de eficiencia de transfección con DNA plasmidial, usando Lipofectamine 2000 como vector, están claramente subestimados al utilizar la fluorescencia de la eGFP de acuerdo a los resultados con genes de ribozimas, como se expone más abajo. Debemos considerar que para observar la fluorescencia se requiere de la transcripción y la traducción del gen de la eGFP y, por lo tanto, es muy factible que haya un porcentaje de células transfectadas mayor que el porcentaje de células con la cantidad de eGFP necesaria para la detección.

#### **4.3 Efecto de las ribozimas de horquilla RzCG20 y de martillo RzGUC20 en las células H4-II-E-C3**

##### ***4.3.1 Ribozimas de horquilla vs ribozimas de martillo***

La disminución de la actividad de la ALDH2 es mucho más pronunciada en las células transfectadas con el gen de la ribozima de horquilla catalíticamente activa RzCG20 que con los genes de las ribozimas de martillo RzGUC20 y RzGUC20c (ribozima y su control respectivamente) para el mismo blanco.



Las ribozimas de horquilla y su control clonadas en pAC-CMV (pLL5 y pLL7) disminuyen la actividad de la ALDH2 en 41,5 % y en 18,3 % ( $p < 0,005$ ) respectivamente. Las ribozimas de horquilla y control clonadas en pAAV-CMV (pLL9 y pLL10) disminuyen la actividad de la ALDH2 en 36,3% y en 23,3% ( $p < 0,005$ ) respectivamente (Figura 9). Las ribozimas de martillo y su control clonadas en el plasmidio pAC-CMV (pCMB1 y pCMB2) generan una disminución de la actividad de la ALDH2, pero en menor porcentaje, 15,3 % y 24,1 %, valores que no son estadísticamente diferentes entre sí,  $p > 0,005$  (Figura 8).

#### 4.3.2 Ribozimas vs ribozimas controles

El efecto biológico de la ribozima de horquilla RzCG20 clonada en dos plasmidios distintos (pLL5 y pLL9) es significativamente mayor ( $p < 0,005$ ) al efecto de antisentido de la ribozima de horquilla control (pLL7 y pLL10), sugiriendo que efectivamente hay una acción de ruptura catalítica del sustrato y no sólo un bloqueo estérico del mRNA de la ALDH2. La ribozima de martillo, en cambio, produce el mismo grado de disminución de la actividad de la ALDH2 que la ribozima control, sugiriendo que en el interior de las células esta ribozima de martillo no es capaz de hidrolizar el sustrato y actúa solamente por un efecto de antisentido.

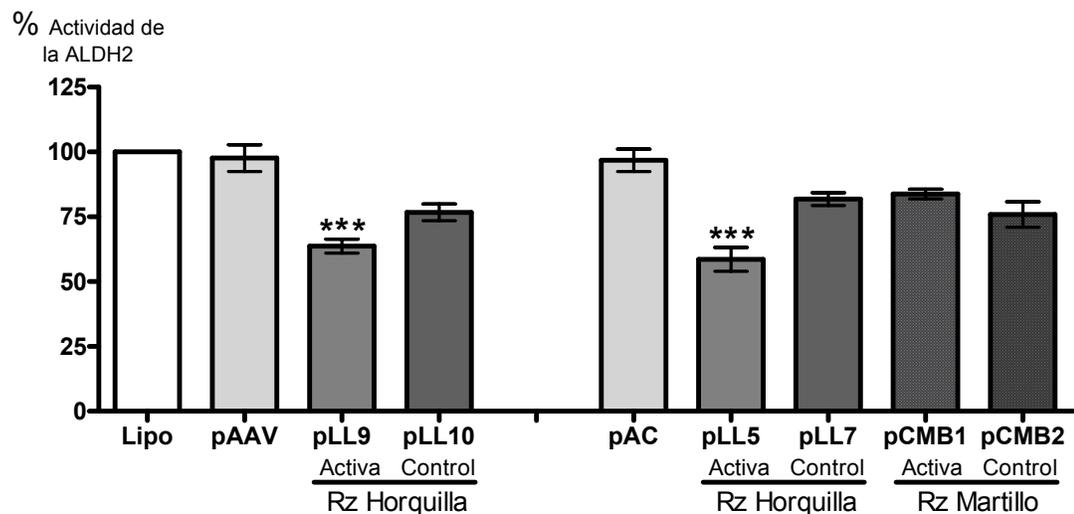
#### 4.3.3 Plasmidio pAC-CMV vs pAAV-CMV

La ribozima de horquilla y su control clonadas en el pAAV-CMV (pLL9 y pLL10) se comportan de la misma forma que aquellas clonadas en el pAC-CMV (pLL5 y pLL7), concluyéndose que ambas ribozimas disminuyen la actividad de la ALDH2 por bloqueo y por ruptura del mRNA. Esto quiere decir que los efectos de la posible diferencia funcional entre ambos contextos moleculares y los efectos de las diferencias de secuencia y extensión de los segmentos que quedaron río arriba y río abajo de las ribozimas no se manifiestan en diferencias importantes en el modo de acción de las ribozimas en células de hepatoma de rata. Cabe destacar que el 56 % de la disminución de la actividad

de la ALDH2 está dado por un efecto de ruptura del mRNA y un 44% es efecto del bloqueo del mRNA cuando la ribozima de horquilla se encuentra en el contexto molecular dado por el pAC-CMV, siendo el segmento río abajo de la ribozima de 300 pb. En el contexto molecular dado por el pAAV-CMV, siendo el segmento río abajo de la ribozima de 500 pb, un 36% del efecto está dado por ruptura y un 64% por bloqueo del mRNA. Si bien estas diferencias entre ambos contextos moleculares no son significativas estadísticamente ( $p > 0,005$ ) hay una marcada tendencia a que a mayor tamaño del segmento de RNA que sigue a la ribozima menor es la ruptura del mRNA de la ALDH2.

#### 4.3.4 Magnitud real de la acción de las ribozimas

El mayor resultado obtenido de disminución de la actividad de la ALDH2 es de 42% (ver Figura 8) en las células transfectadas con el gen de la ribozima de horquilla RzCG20 clonado en el pAC-CMV (pLL5). Considerando que el ensayo de actividad se realizó 48 horas después de la lipofección y corrigiendo por el tiempo de vida media de la enzima (~24 horas) (Garver y cols., 2000), la disminución de la actividad de la ALDH2 de 42% aumenta a 55% (Figura 8). Esto se explica porque a las 48 horas aún quedaría un 25% de la actividad inicial, aunque el mensajero se destruyera completamente, de modo que la actividad suprimible no es del 100% sino del 75% de la actividad inicial o control. En cuanto a la corrección que deba aplicarse por el hecho de que no todas las células del cultivo son transfectadas por los plasmidios se discute *in extenso* más adelante.



plasmidio	Estructura Ribozima	% Actividad ALDH2	Desviación Estándar	p (test T)
Ninguno	-	100,0	-	-
pAAV-CMV	-	97,6	16,7	0,341 <sup>a</sup>
pLL9	Horquilla	63,7	10,4	<b>0,005</b> <sup>b</sup>
pLL10	Horquilla Control	76,7	12,6	0,046 <sup>b</sup>
pAC-CMV	-	96,8	20,0	0,341 <sup>a</sup>
pLL5	Horquilla	58,5	17,8	<b>0,002</b> <sup>c</sup>
pLL7	Horquilla Control	81,7	9,7	0,063 <sup>c</sup>
pCMB1	Martillo	84,7	7,3	0,159 <sup>c</sup>
pCMB2	Martillo Control	75,9	19,1	0,011 <sup>c</sup>

**Figura 8**

**Efecto de las ribozimas de horquilla RzCG20 y de martillo RzGUC20 en células H4-II-E-C3**

Orden de la gráfica: Lipo (control con lipofectamina sin DNA), pAAV (control con plasmidio base pAAV-CMV), pLL9 (RzCG20 en pAAV-CMV), pLL10 (RzCG20c en pAAV-CMV), pAC (control con plasmidio base pAC-CMV), pLL5 (RzCG20 en pAC-CMV), pLL7 (RzCG20c en pAC-CMV), pCMB1 (RzGUC20 en pAC-CMV) y pCMB2 (RzGUC20c en pAC-CMV).

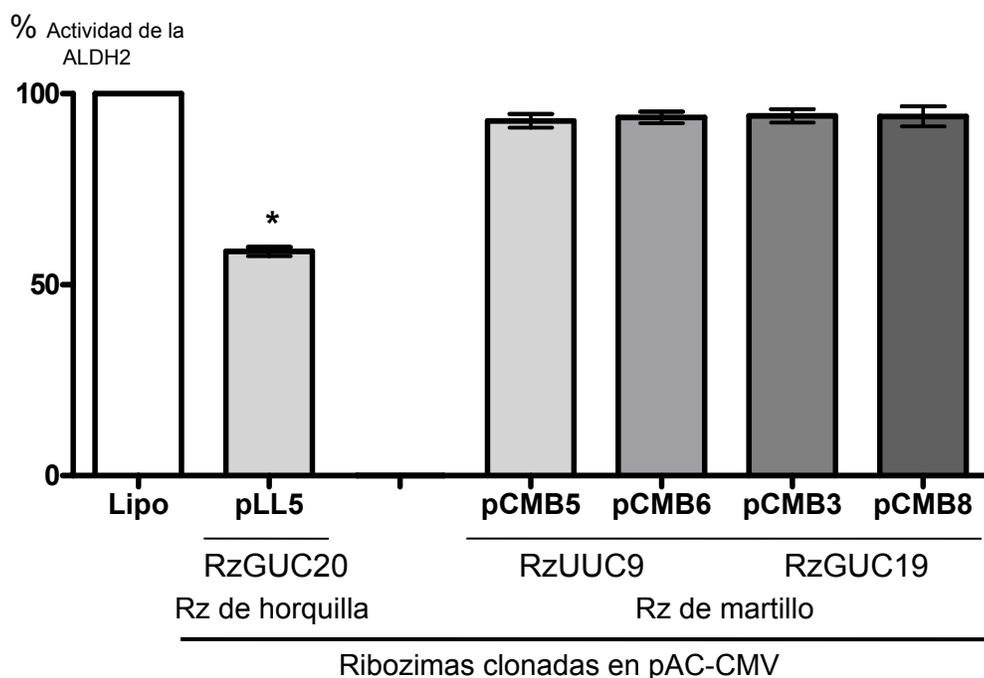
Los resultados corresponden a cuatro mediciones independientes (cuatro días distintos de lipofección) realizadas en cuadruplicado y cada medición de la actividad de la ALDH2 en duplicado. a: análisis estadístico con respecto al control con lipofectamina, b: análisis estadístico con respecto al control con el plasmidio pAAV-CMV y c: análisis estadístico con respecto al control con el plasmidio pAC-CMV. Los \*\*\* sobre las barras en el gráfico indican diferencias que son significativas estadísticamente en tres aspectos: i) entre la ribozima y el control con plasmidio base, ii) entre la ribozima de horquilla y su control inactivo (pLL5 vs pLL7 y pLL9 vs pLL10) y iii) entre la ribozima de horquilla y la ribozima de martillo (pLL5 vs pCMB1 y pLL9 vs pCMB1). Se usó el test T de Student para datos pareados (n=4) con un intervalo de confianza del 99%.

#### 4.4 Efecto de las ribozimas de martillo RzUUC9 y RzGUC19 en las células H4-II-E-C3

##### 4.4.1 Ribozimas vs ribozimas controles

Las ribozimas de martillo RzUUC9 y RzGUC19 y sus respectivos controles generan una leve disminución de la actividad de la ALDH2, entre un máximo de 10 % por efecto de la acción de la RzUUC9 control y un mínimo de 8,2 % por efecto de la acción de la RzGUC19 ( $p > 0,005$ ) (Figura 9). La disminución de la actividad no se diferencia significativamente entre la ribozimas vs las controles, ni tampoco es significativamente diferente al control de lipofecciones sólo con la lipofectamina ( $p > 0,005$ ). Por lo tanto, las ribozimas de martillo RzUUC9 y RzGUC19 sólo actúan mediante un efecto de bloqueo del mRNA de la ALDH2 y en promedio disminuyen en un 8,9 % la actividad enzimática.

En el trabajo anterior realizado por Muñoz (2003), las ribozimas fueron entregadas como genes a células de hepatoma de rata utilizando *Lipofectamine Plus* como vector químico y la medición de actividad se realizó a temperatura ambiente, dos diferencias experimentales importantes con respecto a este trabajo en el que se usó *Lipofectamine 2000* como vector y en el que la medición de actividad se hizo a 35°C. Los resultados de Muñoz mostraron que i) las ribozimas de martillo RzGUC20 y RzUUC9 son capaces de romper el mRNA de la ALDH2 *in vitro*, ii) que las ribozimas de martillo RzGUC20 y RzUUC9 en cultivo actúan disminuyendo la actividad de la ALDH2 actuando como moléculas de antisentido (en un 18 % aproximadamente, respecto a las células transfectadas con el vector base), y iii) que la ribozima RzGUC19 no corta el mRNA *in vitro* por lo cual no fue probada en células en cultivo.



plasmidio	Estructura Ribozima	% Actividad ALDH2	Desviación Estándar	p (test T)
ninguno	-	100	-	-
pLL5	horquilla	58,7	5,1	0,003*
pCMB3	martillo	91,8	4,1	0,102
pCMB8	martillo control	91,3	5,5	0,063
pCMB5	martillo	90,0	3,6	0,161
pCMB6	martillo control	91,4	6,2	0,159

**Figura 9**

**Efecto de las ribozimas de martillo RzUUC9 y RzGUC19 en células H4-II-E-C3**

Orden de la gráfica; Lipo (control con lipofectamina sin DNA), pLL5 (RzCG20 en pAC-CMV), pCMB5 (RzUUC9 en pAC-CMV), pCMB6 (RzUUC9c en pAC-CMV), pCMB3 (RzGUC19 en pAC-CMV) y pCMB8 (RzGUC19c en pAC-CMV). Los resultados corresponden a tres mediciones independientes (tres días distintos de lipofección) realizadas en triplicado. Análisis estadístico con respecto al control lipofectamina. El \* sobre la barra indica un resultado significativo estadísticamente en dos aspectos: i) entre la ribozima de horquilla y el control con lipofectamina y ii) entre la ribozima de horquilla y las cuatro ribozimas de martillo. Se usó el test T de Student para datos pareados (n=3) con un intervalo de confianza del 99%.

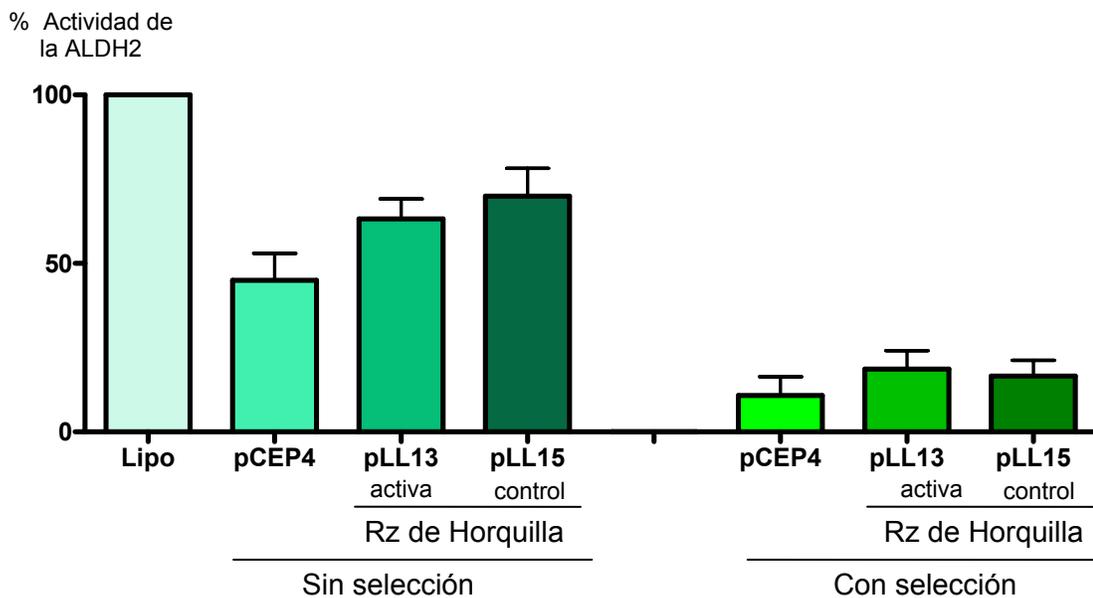
#### **4.5 Efecto de la ribozima de horquilla en células H4-II-E-C3 bajo selección con higromicina.**

La selección de las células lipofectadas con los plasmidios pLL13 y pLL15 derivados del pCEP4, correspondientes a las ribozimas RzCG20 y control RzCG20c respectivamente, se hizo mediante la aplicación de una dosis de 50 µg/mL de higromicina, dosis que es letal para las células H4-II-E-C3 que no incorporaron dichas construcciones. En el transcurso de un mes las células seleccionadas se replicaron alcanzando confluencia, obteniéndose una población homogénea a la cual se le cuantificó la actividad de la ALDH2.

##### ***4.5.1 Ribozima vs ribozima control***

Luego de obtener una población homogénea seleccionada con higromicina los resultados de cuantificación de actividad de la ALDH2 mostraron que el efecto biológico de las ribozimas de horquilla y su control (pLL13 y pLL15) es significativamente mayor ( $p < 0,005$ ) que el del control con lipofectamina: hay una disminución de un 81 % al usar el plasmidio codificante de la ribozima y un 83 % al usar el plasmidio codificante de la ribozima control (Figura 10), sugiriendo que la disminución de la actividad de la ALDH2 es por la acción de bloqueo estérico pero no por efecto de la ruptura del mRNA de la ALDH2 ( $p > 0,005$ ).

Sin embargo, si estos resultados son comparados con los obtenidos de las células lipofectadas con el plasmidio pCEP4 sin inserto no existe efecto significativo ( $p > 0,005$ ). Algún producto desconocido o la misma proteína EBNA1 (Scimienti y Calos, 1998; Leblois y cols., 2000; Durocher y cols., 2002) por sí misma genera una disminución de la actividad de la ALDH2 en un 89 %, caracterizándose además la población transfectada por tener mayor dificultad para replicarse y mantenerse viva durante el proceso de selección con higromicina, comparando con las otras poblaciones seleccionadas (transfectadas con plasmidios codificantes de ribozimas).



plasmidio	Estructura Ribozima	% Actividad ALDH2	Desviación Estándar	p (test T)
ninguno	-	100,0	-	-
pCEP4	-	44,9	25,5	0,002 <sup>b</sup>
pLL13	Horquilla	63,4	18,6	0,003 <sup>b</sup> / 0,06 <sup>a</sup>
pLL15	Horquilla Control	70,0	26,2	0,004 <sup>b</sup> / 0,08 <sup>a</sup>
pCEP4	-	10,8	12,4	0,0004 <sup>b</sup>
pLL13	Horquilla	18,7	12,2	0,0005 <sup>b</sup> / 0,10 <sup>a</sup>
pLL15	Horquilla Control	16,5	10,6	0,0002 <sup>b</sup> / 0,09 <sup>a</sup>

**Figura 10**

**Efecto de la ribozima de de horquilla RzCG20 en células H4-II-E-C3 bajo selección con higromicina**

Orden de la gráfica: Lipo (control con lipofectamina sin DNA), pCEP4 (control con plasmidio base pCEP4), pLL13 (RzCG20 en pCEP4), pLL15 (RzCG20c en pCEP4). La primera parte del gráfico muestra resultados obtenidos en ensayos en células de hepatoma de rata sin selección con higromicina que corresponden a tres mediciones independientes. En la segunda parte del gráfico se muestran resultados obtenidos en células de hepatoma de rata con selección con higromicina después de alcanzar 100 % confluencia que corresponden a cinco mediciones independientes.

a: análisis estadístico con respecto al control con el plasmidio base pCEP4 y b: análisis estadístico con respecto al control con lipofectamina. Se usó el test T de Student para datos pareados con un intervalo de confianza del 99%. Todos los resultados son significativamente diferentes con respecto al control con lipofectamina ( $p < 0,005$ ).

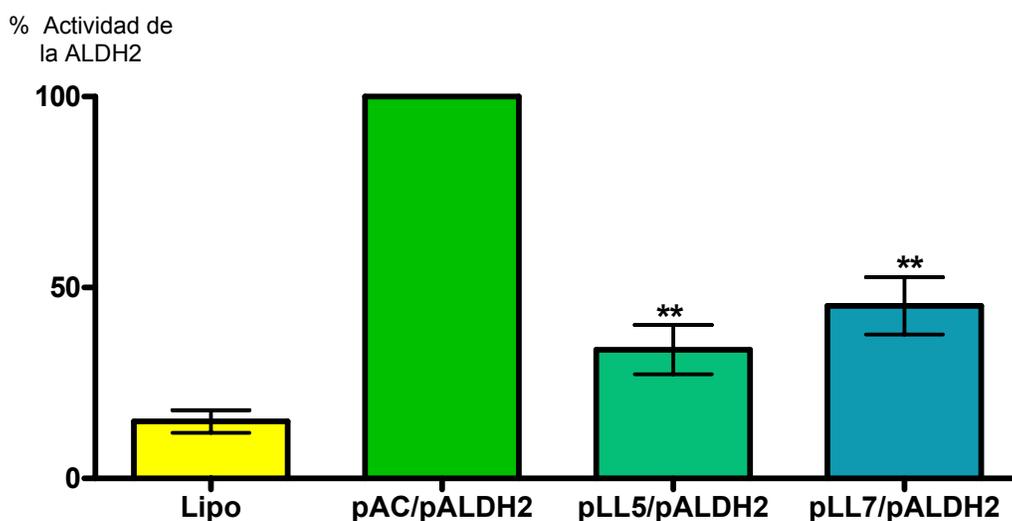
Frente a este inesperado resultado se realizó una lipofección de las células de hepatoma de rata con pLL13 (RzCG20), pLL15 (RzCG20c) y con el plasmidio base pCEP4, sin realizar selección de las células transfectadas con higromicina. Se observó una disminución de la actividad de la ALDH2 de un 36 % y un 30 % en las células transfectadas con los genes de las ribozimas de horquilla y control respectivamente ( $p < 0,005$ ; con respecto al control con lipofectamina) y una disminución del 55% de la actividad de la ALDH2 en las células transfectadas con el pCEP4.

#### 4.5.2 Magnitud real de la acción de las ribozimas

La actividad suprimible es del 100% de la actividad inicial o control cuando se trata de una población seleccionada que alcanza confluencia, ya que toda síntesis *de novo* estará afectada por la acción de la ribozima. Los porcentajes de disminución de la actividad de la ALDH2 por efecto del plasmidio pCEP4 sin inserto, la ribozima y la ribozima control son 89 %, 81 % y 83 % respectivamente (Figura 10). Estas diferencias no son significativas entre ellas ( $p > 0,005$ ), por lo tanto, la disminución de la actividad se debe a una acción desconocida, probablemente de la proteína EBNA1 codificada en el plasmidio pCEP4 y de múltiples acciones desconocidas en células eucariontes.

#### 4.6 **Efecto de la ribozima de horquilla RzCG20 en células 293**

En este trabajo se utilizaron células 293 debido, en primer lugar, a que tienen la capacidad de ser fácilmente transfectadas, con una eficiencia cercana al 70 % (Ezquer, 2006). Un segundo motivo por el cual se utilizaron células 293 es que, si bien son de riñón de embrión humano, y el órgano blanco para la terapia es el hígado, permiten hacer una estimación de si en células de origen humano la ribozima de horquilla tiene actividad. Como tercer punto las células 293 presentan sólo entre un 8% y 12% de actividad basal de la ALDH2 en relación a la actividad específica medida para las células de hepatoma de rata (Figura 11) por lo cual se colipofectaron con dos plasmidios, uno que codifica



plasmidio	Estructura Ribozima	% Actividad ALDH2	Desviación Estándar	p (test T)
ninguno	-	15	8,8	0,001
pAC/pALDH2	-	100	-	0,0
pLL5/ pALDH2	Horquilla	34	66,3	13,8
pLL7/ pALDH2	Horquilla Control	45	54,8	16,2

**Figura 11**

***Efecto de la ribozima de horquilla RzCG20 en las células 293***

*Orden de la gráfica: Lipo (control con lipofectamina sin DNA), pAC/pALDH2 (control con plasmidio base pAC-CMV), pLL5 (RzCG20 en pAC-CMV), pLL7 (RzCG20c en pAC-CMV). Los resultados corresponden a tres mediciones independientes (tres días distintos de lipofección) realizadas en triplicado. La actividad de la ALDH2 se midió después de 72 horas de cultivo postlipofección.*

*Los \*\* sobre las barras en el gráfico indican diferencias estadísticamente significativas entre los plasmidios codificantes de las ribozimas y el plasmidio base. Se usó el test T de Student para datos pareados (n=3) con un intervalo de confianza del 99%.*

la ALDH2 y un segundo plasmidio que codifica la ribozima, siendo innecesario aplicar una corrección por el tiempo de vida media de la enzima, puesto que mientras se sintetiza el mRNA de la ALDH2 se está sintetizando la ribozima, manteniendo un proceso continuo de silenciamiento.

Las ribozimas de horquilla y control disminuyen la actividad de la ALDH2 en 66,3 % y 54,8 % respectivamente ( $p < 0,005$ ), de manera más pronunciada en las células 293 que en las células H4-II-E-C3 (disminución máxima de 42 %). Por lo tanto, estos resultados, obtenidos en un tipo celular humano, sugieren que una ribozima de horquilla tiene potencial como fármaco génico de aplicación en humanos.

#### 4.6.1 Ribozima vs ribozima control

El efecto biológico de la ribozima de horquilla (pLL5) no es significativamente mayor al efecto de antisentido de la ribozima de horquilla control (pLL7): la ribozima disminuye en un 66,3 % y la ribozima control un 54,8 % la actividad de la ALDH2 ( $p > 0,005$ ), sugiriendo que no hay una acción de ruptura catalítica del sustrato que supere al efecto de bloqueo estérico del mRNA de la ALDH2 (Figura 11). Por lo tanto, se sugiere que la ribozima, en el interior de las células 293, bajo un sistema de expresión de la ALDH2 dado por la transcripción del pALDH2 y posterior traducción del mRNA, no es capaz de hidrolizar el sustrato y actúa solamente por un efecto de antisentido al igual que su ribozima control. Este cambio en el modo de acción confirma lo descrito en la literatura (Donahue y Fedor, 1997; Amarzguioui y Prydz, 1998), en el sentido de que el medio celular afecta de manera considerable el plegamiento de un RNA de hebra simple, como lo es la estructura de una ribozima.

#### 4.6.2 Magnitud real de la acción de las ribozimas

El mayor resultado obtenido de disminución de la actividad de la ALDH2 es de 66 % ( $p < 0,005$ ) (Figura 11) en células colipofectadas con el plasmidio

codificante de la ribozima de horquilla RzCG20 (pLL5) y el pALDH2. Considerando que el ensayo de actividad se realizó 72 horas después de la lipofección y que este tipo celular presenta una baja actividad de la ALDH2 en forma natural, no se corrigió por el tiempo de vida media de la enzima (~24 hrs). En estos resultados queda en evidencia que la actividad de la ribozima cambia según el medio celular en el que se encuentra, puesto que el efecto de la ribozima de horquilla en la disminución de la actividad de la ALDH2 se debe en su totalidad al bloqueo del mRNA de la ALDH2.

Se confirma en un modelo celular humano, como lo son las células 293, que la ribozima de horquilla cumple con el objetivo de disminuir la actividad de la ALDH2, pero con un mecanismo de acción diferente al observado en células de rata. Que la ribozima sea capaz de inhabilitar el mRNA en un tipo celular humano nos acerca a perfilar a la ribozima de horquilla, RzCG20, como un buen fármaco génico para el tratamiento de pacientes alcohólicos.

## 5 DISCUSIÓN

En este trabajo se utilizaron genes de ribozimas de martillo (Muñoz, 2003) y se diseñaron y construyeron genes de ribozimas de horquilla contra el mRNA de la ALDH2, enzima que es un buen blanco farmacológico en el tratamiento del alcoholismo. Estas ribozimas se ensayaron en células de hígado de rata en cultivo, buscando una molécula que fuera capaz de disminuir la actividad de la ALDH2 y que tuviera, por lo tanto, potencial farmacológico contra el alcoholismo.

Se eligieron las células H4-II-E-C3 de hepatoma de rata puesto que provienen de hígado, que es el órgano blanco y, a diferencia de otras líneas celulares de origen hepático, expresan el gen de la ALDH2, el gen blanco. La ribozima de horquilla también se ensayó en células de riñón de embrión humano: células 293. A pesar de no ser hepáticas y de no expresar el gen de la ALDH2 se utilizaron porque, además de ser comparativamente fáciles de transfectar, estas células permiten medir, con un sistema de colipofección en experimentos de corta duración, la acción de las ribozimas sin tener que aplicar una corrección por la vida media de la proteína.

### 5.1 Ribozimas de horquilla y martillo dirigidas al triplete GUC20

Se usaron la ribozima de horquilla RzCG20 y la ribozima de martillo RzGUC20; ambas se dirigen a la misma posición del mRNA de la ALDH2 y ambas, al estar clonadas en el mismo vector (pAC-CMV), están en el mismo contexto molecular, es decir, están flanqueadas por los mismos segmentos río arriba (22 nt) y río abajo ( $\approx 300$  nt), por lo tanto sus acciones son directamente comparables. La ribozima de horquilla, a diferencia de la ribozima de martillo, no se ensayó *in vitro* sino que se evaluó directamente en células en cultivo, puesto que la actividad *in vitro* no necesariamente refleja la actividad en células. Efectivamente, Muñoz (2003) determinó que las ribozimas de martillo RzUUC9 y RzGUC20 presentan actividad catalítica *in vitro* pero la pierden en cultivo. Por lo tanto se consideró que si i) el medio influye mucho en el

plegamiento de una ribozima (Andronescu y cols., 2005) y ii) hay variaciones en el modo de acción de una ribozima según el medio (Kiehnopf y cols., 1995; Bertrand y cols. 1997; Donahue y Fedor, 1997; Yanze y cols., 2003), realizar ensayos *in vitro* no sería lo más conveniente. Los resultados de disminución de la actividad de la ALDH2 en células de hepatoma de rata en cultivo demuestran que la ribozima de horquilla, RzCG20, es más activa que la ribozima de martillo dirigida al mismo blanco y con igual segmento río abajo, corroborando lo visto en los escasos estudios en que esta comparación se ha hecho (Symons, 1992; Kato y cols., 2001); esta diferencia puede tener su causa en múltiples factores que a continuación se explican.

#### *Mayor actividad catalítica de la ribozima de horquilla vs la de martillo*

Se ha descrito que la ribozima de horquilla puede tener una eficiencia catalítica 80 veces mayor que la ribozima de martillo (Symons, 1992). En un estudio en que se determinaron los parámetros cinéticos de una ribozima de horquilla, se mostró que la fragmentación del sustrato es muy eficiente comparada con la ribozima de martillo (Andang y cols., 2004). Los resultados de esta tesis muestran que la ribozima de martillo sólo presenta una acción de bloqueo del mRNA mientras que la ribozima de horquilla presenta aparentemente dos *modos de acción*: bloqueo y ruptura del mRNA. La actividad catalítica de la ribozima de horquilla sin duda puede explicar en parte su mayor efecto puesto que su actividad de bloqueo es similar en magnitud a la de la ribozima de martillo.

#### *Uniones Watson y Crick*

Las ribozimas de horquilla y martillo utilizadas probablemente difieren en la facilidad con que se desprenden del sustrato incidiendo en su actividad. Una vez efectuado el corte del mRNA la ribozima de horquilla queda unida al sustrato mediante dos segmentos: un segmento de 5 pb, de los cuales uno es no canónico, y un segundo segmento de 11 pb, de los cuales tres son no canónicos. La ribozima de martillo en cambio queda unida mediante 10 pb

canónicos a cada lado del sustrato. Así, para la ribozima de horquilla aumenta la posibilidad de liberación del mRNA una vez cortado disminuyendo consecuentemente el paso reversible de religación.

La religación sólo requiere de un mínimo de tiempo y que ambos fragmentos del mRNA blanco cortado permanezcan unidos a los brazos de la ribozima (Long y Uhlenbeck, 1993; Muller, 2003; Ivanov y cols., 2005). Se ha descrito que la ribozima de martillo presenta un equilibrio desplazado en el sentido de la religación (Long y Uhlenbeck, 1993), a diferencia de la ribozima de horquilla, la cual es especialmente eficiente en la liberación del producto (Welz y cols., 2003).

Se podría pensar que al acortar el largo de los brazos de la ribozima de martillo RzGUC20 mejoraría la eficiencia de corte. Sin embargo, la actividad de las ribozimas RzUUC9 y RzGUC19, con 8 nt en cada brazo, no presentan mejor actividad que la RzGUC20 cuyos brazos tienen 10 nt cada uno.

#### *Efecto del magnesio en la acción de las ribozimas de horquilla y martillo*

La ribozima de horquilla, a diferencia de la ribozima de martillo, no depende de la presencia de magnesio para su acción catalítica. Así como algunas enzimas proteicas requieren de un catión divalente para su acción catalítica, las ribozimas en general también lo necesitan (Hampel y cols.; 1990 Doudna y Cech, 2002). El requerimiento de este catión es esencial para la acción catalítica de la ribozima de martillo y no así para la catálisis de la de horquilla (Borda y Sigurdsson, 2005). Es posible entonces, que la concentración de magnesio libre en las células de hepatoma de rata sea insuficiente para la acción de la ribozima de martillo. En los ensayos *in vitro* (Muñoz, 2003), se obtuvo la máxima acción catalítica de la ribozima de martillo a 10 mM, reportándose que a concentraciones mayores de magnesio la actividad catalítica disminuye, siendo que la concentración de magnesio intracelular es de 30 mM (Ausubel y cols., 1996).

## 5.2 Ribozima de Horquilla

La ribozima de horquilla RzCG20 resultó ser más eficiente en el contexto molecular del pAC-CMV que en el del pAAV-CMV. Esta diferencia puede estar asociada a múltiples factores que a continuación se explican.

### *Eficiencia de transfección; efecto del tamaño de la construcción plasmidial*

Los dos plasmidios en los que se clonó la ribozima de horquilla, pAC-CMV (9,1 kb) y pAAV-CMV (4,8 kb), difieren en sus tamaños. Si consideramos que las transfecciones se realizaron con una masa constante de 2 µg de DNA plasmidial, se espera que mientras menor es el tamaño del plasmidio mayor sea el número de copias que ingresa a cada célula transfectada y mayor sea la actividad biológica aparente. No obstante, los resultados obtenidos en esta tesis indican lo contrario: la ribozima RzCG20 clonada en el plasmidio pAC-CMV dio un valor mayor de actividad biológica aparente que cuando está clonada en el plasmidio pAAV-CMV, descartando que el tamaño sea una variable determinante en los resultados. Incluso, de lo anterior se desprende que la ribozima RzCG20 en el contexto del pAC-CMV es intrínsecamente mucho más activa de lo que sugieren los resultados no corregidos por razón molar, ya que el pAC-CMV tiene un tamaño que es dos veces el del pAAV-CMV.

### *Efecto del promotor y secuencia río arriba en la acción de la ribozima*

Los dos plasmidios tienen en común el promotor del citomegalovirus: el promotor del pAAV-CMV, que está totalmente secuenciado, corresponde al del gen *E1* del CMV (GenBank AF396260, posiciones 150-812) y el promotor del pAC-CMV, que se encuentra parcialmente secuenciado, es idéntico (GenBank X03922, posiciones 787-1148) exceptuando una región desconocida de ≈60 pb. Si no hay diferencias entre ambos promotores en la región que desconocemos, debemos suponer que los niveles de transcripción son equivalentes, es decir, que las eficiencias son similares.

El promotor del CMV, que es un promotor de la RNA polimerasa II, se eligió para expresar los genes de las ribozimas, en lugar de un promotor de la RNA polimerasa III, porque existen evidencias de que las ribozimas cuyos genes están controlados por promotores de la polimerasa II son más eficientes que aquellos cuyos genes están controlados por promotores de la polimerasa III (Couture y Stinchcomb, 1996; Bertrand y cols. 1997; Kato y cols., 2001), probablemente debido a que dichas ribozimas se colocalizan con su mRNA blanco en el citoplasma. A pesar de que los promotores de la RNA polimerasa III permiten sintetizar mayores cantidades de RNA, el precursor del mRNA (transcrito primario) en el núcleo se ve asociado a un gran número de proteínas de la maquinaria de corte y empalme, tal vez impidiendo que éste sea accesible a la ribozima. En nuestro caso particular el blanco molecular se ubica en el citoplasma, puesto que los brazos de la ribozima de horquilla se dirigen a la zona del mRNA de la ALDH2 dada por la unión entre segmentos codificados por los exones 12 y 13 del gen de la ALDH2. Por lo tanto, es más apropiado usar un promotor para la RNA polimerasa II para transcribir el gen de la ribozima.

La ribozima de horquilla está acompañada, en el transcrito, por un segmento río arriba de 22 nt cuando su gen está clonado en el plasmidio pAC-CMV y de 91 nt cuando está clonado en el pAAV-CMV. En células de hepatoma de rata transfectadas con el gen de la ribozima de horquilla clonado en pAC-CMV, se observó una mayor disminución de la actividad de la ALDH2 coincidiendo con un menor segmento río arriba asociado a la ribozima. El segmento más largo de 91 nt originado a partir del pAAV-CMV podría ejercer un mayor efecto interferente sobre la acción biológica.

#### *Secuencias río abajo*

La ribozima queda acompañada de un segmento río abajo de  $\approx 300$  nt cuando está clonada en el plasmidio pAC-CMV y de  $\approx 500$  nt cuando está clonada en el

pAAV-CMV. Estos segmentos podrían carecer de efecto alguno o tener efectos positivos o negativos sobre la acción de la ribozima.

Los plasmidios tienen señales de poliadenilación diferentes: el pAC-CMV codifica la señal de poliadenilación del virus SV40 (SV40pA) y el pAAV-CMV codifica la señal de poliadenilación del gen de la hormona de crecimiento humana (hGHpA). Se podría pensar entonces que al ser diferentes las señales de poliadenilación, también lo sean las eficiencias del proceso de poliadenilación y sus consecuencias, como la destinación al citoplasma (Colgan y Manley, 1997). Así, el segmento río abajo de la ribozima puede incidir sobre su acción biológica, probablemente por las estructuras que puede formar, el reclutamiento de factores celulares y las eficiencias de los procesos de poliadenilación y destinación al citoplasma.

La ribozima de horquilla RzCG20 es menos eficiente en disminuir la actividad de la ALDH2 cuando el segmento río abajo es de mayor tamaño. Sin embargo, aunque el *grado de acción* total se ve disminuido, la ribozima mantiene los dos *modos de acción*, bloqueo y ruptura, en distintas proporciones. A mayor segmento río abajo mayor bloqueo del mRNA y menor ruptura. El bloqueo del mRNA probablemente se ve afectado por la región río abajo de la ribozima de horquilla por sus efectos en dos procesos esenciales: la unión de la ribozima al mRNA de la ALDH2 y la separación de la ribozima del mRNA después de cortado.

#### *Efecto del tipo celular*

Si bien se vio que la ribozima de horquilla tiene un efecto catalítico en las células de hepatoma de rata, en las células de riñón de embrión humano lo pierde, manteniendo sólo una acción de bloqueo. En efecto, se ha descrito que el *modo de acción* de una ribozima es variable dependiendo del tipo celular en el que se encuentre (Bertrand y cols. 1997; Donahue y Fedor, 1997). Posiblemente las diferencias en factores celulares entre los dos tipos de

células posibilitan, en parte, que la ribozima se pliegue de manera diferente (Kiehintopf y cols., 1995), y a la vez que la ribozima se vea impedida de cortar y/o liberar el sustrato en forma eficiente.

En las células 293 no sólo se vio alterado el *modo de acción* sino que también el *grado* del efecto. Dos variables que pueden afectar el *grado de acción* son i) la actividad basal de la ALDH2 y ii) la eficiencia de la transfección (ver sección 5.4).

La actividad basal de la deshidrogenasa aldehídica es diferente en ambos tipos celulares. En las células de hepatoma de rata la actividad absoluta varía entre 0,5 y 3 nmoles de NADH/ mg de proteína/ min (100 %), valores que corresponden a la actividad de la ALDH2 medida en el extracto proteico del control con lipofectamina sin DNA, en cambio en las células 293 la actividad absoluta es mucho menor, medida en el extracto proteico del control con lipofectamina sin DNA, valores que varían entre 0,01 y 0,8 nmoles de NADH/ mg de proteína/ min, pero al lipofectarlas con pALDH2 los valores varían entre 1 y 6 nmoles de NADH/ mg de proteína/ min.

### **5.3 Ribozimas de martillo**

En células de hepatoma de rata las ribozimas de martillo ensayadas muestran una disminución en la actividad de la ALDH2 causada por un efecto de bloqueo del mRNA, comprobando lo visto anteriormente por Muñoz (2003) para dos de ellas en condiciones levemente diferentes a las aquí utilizadas. A continuación se discuten posibles razones para la ausencia de la actividad catalítica y que el valor máximo de disminución de la actividad alcanzado sea del 20 %.

#### *Requerimiento de secuencia en el mRNA de la ALDH2*

Las tres ribozimas de martillo utilizadas, RzUUC9, RzGUC19 y RzGUC20, se dirigen a secuencias del mRNA de la ALDH2 que son accesibles *in vitro* y que

contienen el triplete NUH (H=A, U, C) requerido para el corte, utilizando dos de los tripletes más activos, el GUC y el UUC (Shimayama y cols. 1995). Cabe mencionar que el triplete GUC es el que se encuentra presente en la ribozima natural del RNA satélite del virus del anillado necrótico del tabaco (Forster y Symons, 1987), ribozima cuyo centro catalítico se utilizó para diseñar y construir las ribozimas de martillo (Muñoz, 2003).

Las ribozimas RzGUC20 y RzGUC19 se dirigen a un triplete GUC en el sitio de corte del mRNA, por tanto las diferencias que se encontraron en los porcentajes de disminución de la actividad de la ALDH2, como resultado de la acción de cada una de estas ribozimas, no tienen su origen en diferencias de eficiencia de corte debido a la identidad del triplete NUH, ya que con el mismo triplete GUC se ven resultados diferentes: la RzGUC20 tiene mayor actividad biológica que la RzGUC19. Para la ribozima RzUUC9 es un triplete UUC el que define el sitio de corte del mRNA. A pesar de que este triplete es menos eficiente que el triplete GUC (Shimayama y cols. 1995), la ribozima RzUUC9 tiene mayor actividad biológica que la RzGUC19 (pero menor que la RzGUC20). Por tanto, la identidad del triplete no es el factor determinante para predecir la eficiencia de la ribozima dirigida a distintos blancos.

#### *Efecto del segmento río abajo de la ribozima de martillo*

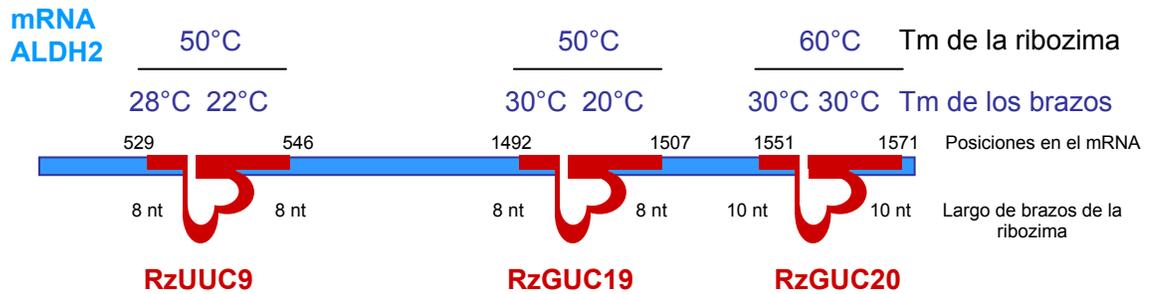
Se espera que, al ser las zonas de unión de las ribozimas en el mRNA sitios accesibles (al menos *in vitro*), no sea el acceso al mRNA el motivo por el cual no se ven resultados mayores a un 20% de disminución de la actividad de la ALDH2. Sin embargo, sí hay que considerar la accesibilidad del sitio de unión en la ribozima misma. Al igual que en el caso de la ribozima de horquilla, la ribozima de martillo queda acompañada de un segmento río abajo de  $\approx 300$  nt cuando está clonada en el plasmidio pAC-CMV y desconocemos cómo incide este segmento en la actividad de la ribozima. Si el efecto es negativo el segmento podría estar i) impidiendo la unión de la ribozima al mRNA de la ALDH2 y/o ii) impidiendo que se suelte de los fragmentos del mRNA una vez

cortado (Donahue y Fedor, 1997). Si el segmento río abajo de la ribozima impide la liberación de los fragmentos se facilita la religación (ver sección 5.1).

#### *Reacción catalítica de la ribozima de martillo*

La religación de los fragmentos del mRNA generados por acción de una ribozima de martillo es un paso poco común, pero posible, que ha sido descrito por Long y Uhlenbeck (1993). La ribozima se une al mRNA, corta el enlace fosfodiéster y en vez de liberar los dos fragmentos se queda unida a ellos y el enlace se vuelve a formar. Esto puede explicar, en parte, los resultados obtenidos en la disminución de la actividad de la ALDH2, es decir, la ribozima de martillo RzGUC20 se une al mRNA de la ALDH2, lo corta y lo religa. Para que la ribozima permanezca unida a los fragmentos del mRNA hay que considerar entonces el efecto de la  $T_m$  de los brazos de la ribozima de martillo (Poon y MacGregor, 2000).

Las tres ribozimas de martillo tienen brazos de largos diferentes. Las ribozimas de martillo RzUUC9 y RzGUC19 poseen dos brazos de unión al mRNA de 8 nt de largo cada uno, las  $T_m$ s de los cuales son 30° y 20°C para la RzUUC9 y 28° y 22°C para la RzGUC19, siendo la  $T_m$  total de unión al mRNA de ambas de 50°C. La RzGUC20 tiene dos brazos de 10 nt de largo, cada uno con una  $T_m$  de 30°C, siendo la  $T_m$  total de unión al mRNA de 60°C (Figura 12). Esta diferencia de  $T_m$  de 10°C entre la ribozima RzGUC20 y las ribozimas RzUUC9 y RzGUC19, se ve reflejada en la disminución de la actividad de la ALDH2, puesto que la RzGUC20 es la ribozima causante del mayor efecto inhibitorio y es la que posee mayor  $T_m$  y largo de brazos. A mayor  $T_m$  y largo de brazos probablemente se ve beneficiado el efecto de antisentido aumentando el *grado* de bloqueo a la vez que se ve aminorado (o suprimido) el corte al haber mayor oportunidad de religación.



**Figura 12**

**Unión de las ribozimas de martillo al mRNA de la ALDH2**

Se indican las  $T_m$  y el largo de cada brazo de las ribozimas de martillo utilizadas en este trabajo: RzUUC9, RzGUC19 y RzGUC20. Además se indican la  $T_m$  total (ambos brazos) de cada ribozima y las posiciones de unión al RNA mensajero de la ALDH2 (GenBank NM-032416).

### *Variables experimentales*

En esta tesis las ribozimas de martillo han sido utilizadas en condiciones diferentes a las empleadas en el trabajo de Muñoz (2003). Anteriormente se utilizó el vector lipídico catiónico Lipofectamine Plus, en un volumen total de mezcla de lipofección de 325  $\mu\text{L}$ , un tiempo de incubación de 10 minutos totales y las mediciones de actividad de la ALDH2 se realizaron a temperatura ambiente. En este trabajo se utilizó el vector lipídico catiónico Lipofectamine 2000, un volumen total de mezcla de lipofección de 125  $\mu\text{L}$ , un tiempo de incubación de 20 minutos y las medidas de actividad de la ALDH2 se realizaron a 35°C. Los valores de actividad enzimática, de 3 a 5 nmoles de NADH/ mg de proteína/ min, otorgan mayor sensibilidad a la detección en relación a los ensayos realizados a temperatura ambiente. Las variables experimentales citadas no afectaron de manera significativa los resultados obtenidos en los ensayos con las ribozimas de martillo en relación a los obtenidos por Muñoz (2003). En ambas condiciones de experimentación hay un efecto cercano al 20% de disminución de la actividad de la ALDH2, disminución que no se debe al corte del mRNA que codifica la ALDH2 sino a un efecto de antisentido.

#### **5.4 Control de transfección**

Los plasmidios pAC-eGFP y peGFP (ver Tabla 3) se utilizaron para determinar, en paralelo a las lipofecciones hechas con plasmidios codificantes de las ribozimas, el porcentaje de células H4-II-E-C3 transfectadas. Se pretendía determinar a qué cantidad de células se debe el efecto obtenido.

Los porcentajes de eficiencia de transfección de las células de hepatoma de rata H4-II-E-C3 con DNA plasmidial, usando Lipofectamine 2000 como vector, están claramente subestimados al utilizar la fluorescencia de la eGFP o la colorimetría por acción de la  $\beta$ -galactosidasa (G. Cortínez, comunicación personal) como métodos de evaluación. Valores de menos del 3 % de

transfección no pueden explicar una reducción del 41,5 % de la actividad de la ALDH2 al usar el gen de una ribozima anti ALDH2 (ver resultados).

Si la ribozima es capaz de destruir el 100 % del mRNA de la ALDH2 de las células que incorporaron el plasmidio que la codifica, la actividad de la ALDH2 medida a las 48 horas de efectuada la lipofección debería ser la actividad de las células no transfectadas más el 25 % de la actividad inicial de las transfectadas (vida media de la proteína de ~24 horas) (Xiao y cols., 1995). Así, un valor experimental de actividad residual del 58,5 % (RzCG20, ver Figura 8) requiere como mínimo que el 55 % de las células hayan sido transfectadas. Si esta ribozima no es capaz de destruir totalmente el mRNA de la ALDH2 se requerirá un porcentaje mayor al 55 % de transfección para obtener este valor experimental (58,5 %) de actividad remanente. Por tanto la estimación del porcentaje de transfección se puede basar en el efecto de disminución de actividad de la ALDH2, y no en la señal de la eGFP. Es reconocido que las células 293 son de fácil transfección y, en nuestro laboratorio usando el mismo vector químico y el peGFP, se estiman porcentajes de lipofección que varían entre 60 y 70 %, de manera que un 55 % para las células H4-II-E-C3 es un valor razonable.

Hemos medido un 3% de células fluorescentes por citometría de flujo que claramente no alcanzan el 55 % requerido, tal vez porque para detectar la fluorescencia i) se necesita que el gen de la proteína fluorescente verde se transcriba y se traduzca (a diferencia del gen de la ribozima que sólo debe transcribirse para actuar) y ii) se necesitan 100 copias del plasmidio codificante de la eGFP en una célula para poder detectarla al microscopio y 10 copias para detectarla por citometría de flujo (Schindelhauer y Laner, 2002). Si el 3 % de transfección fuese real, la actividad de la ALDH2 remanente a las 48 horas postransfección debería ser del 98,5 % para una ribozima 100 % eficiente. La diferencia entre un 3 % vs 60 % de células fluorescentes al comparar células

H4-E-II-C3 y 293 no tiene fácil explicación excepto que son tipos celulares diferentes.

### **5.5 pCEP4, Integración**

Debido a que i) en células de hepatoma de rata la ribozima RzCG20 es catalíticamente activa, aunque el porcentaje de transfección estimado es del 55%, y ii) que en células 293 con un alto porcentaje de transfección la ribozima de horquilla pierde su modo de acción catalítico, se transfectaron y seleccionaron células de hepatoma de rata con el plasmidio pCEP4 codificante de la ribozima de horquilla. Este vector permite la selección de las células transfectadas, ya que les brinda resistencia a la higromicina.

#### *Ensayos en células de hepatoma de rata transfectadas y seleccionadas*

La selección de las células que incorporaron el plasmidio pCEP4 tiene la ventaja de que, si bien la secuencia codificante de la ribozima no necesariamente se integra en el cromosoma de la célula huésped, se obtiene una población homogénea en la cual el 100 % de las células tiene incorporado el plasmidio codificante de la ribozima de horquilla.

La disminución de la actividad de la ALDH2 obtenida tanto con la ribozima como con su control (81 % y 84 % respectivamente), no difieren significativamente de la obtenida con el plasmidio sin inserto (89 %), indicando que es el plasmidio por sí mismo el que está generando algún efecto inhibitorio desconocido sobre la actividad de la ALDH2.

El proceso de selección de las células tomó cerca de un mes, tiempo más que suficiente para que el plasmidio pCEP4 dé origen al antígeno EBNA1 (Sclimenti y Calos, 1998; Leblois y cols., 2000). Pensando en que si se diera menos tiempo a las células para que se dividieran y se realizaran las mediciones de actividad a las 48 horas postlipofección como en el resto de las mediciones con células H4-II-E-C3, no se requeriría de EBNA1 y debería

eliminarse el efecto inhibitorio desconocido sobre la actividad de la ALDH2, por lo que se procedió a ensayar esta posibilidad y se describe a continuación.

#### *Control de transfecciones transitorias sin selección*

Las células de hepatoma de rata se lipofectaron usando las mismas condiciones experimentales empleadas en la entrega de los derivados plasmidiales del pAC-CMV y del pAAV-CMV. Así, el cultivo celular está formado por una población heterogénea: células portadoras y no portadoras del vector.

El porcentaje de disminución de la actividad de la ALDH2 en células transfectadas con pCEP4, sin inserto, es considerablemente mayor (55 %) que cuando son transfectadas con RzCG20 (37 %) y RzCG20c (30 %). Si sólo comparamos el 55 % de disminución causado por pCEP4 con respecto al control con lipofectamina (100 % valor máximo de actividad de la ALDH2) podemos sugerir que se repite el efecto del plasmidio sobre la actividad enzimática sin importar el tiempo de cultivo postransfección. Este efecto negativo confirma el porcentaje teórico de transfección, ya que el 55% de disminución de la actividad de la ALDH2 causado por el pCEP4 coincide con el cálculo estimado como mínimo de transfección, es decir, el plasmidio entra a ese porcentaje de células y elimina su actividad enzimática con una eficiencia cercana al 100 %.

Al considerar los efectos de las construcciones que llevan genes de ribozimas en relación al efecto del pCEP4 se ve una menor disminución de la actividad de la ALDH2 cuando existe un transcrito diferente en el sitio de clonación múltiple del pCEP4. Los tres plasmidios tienen tamaños muy similares y así la variación de tamaño no justifica las diferencias en los resultados. Por lo tanto queda en evidencia que es el plasmidio en sí, el pCEP4, el que genera algún efecto negativo en las células. Esto se ve corroborado por el nivel de muerte celular observado que es mucho mayor que en los ensayos anteriores.

### *Efecto del promotor y secuencia río arriba en la acción de la ribozima RzCG20*

El plasmidio pCEP4 tiene el promotor del citomegalovirus que está totalmente secuenciado y corresponde al del gen *E1* del CMV. La secuencia es idéntica a la de las otras construcciones, pAAV-CMV y pAC-CMV, por tanto podemos suponer que los niveles de transcripción son equivalentes y no es la masa de transcrito el motivo del efecto de disminución generado en las células transfectadas con el plasmidio pCEP4.

La ribozima de horquilla está acompañada, en el transcrito, por un segmento río arriba de 25 nt cuando su gen está clonado en el plasmidio pCEP4. El tamaño de este segmento es similar al que acompaña a la ribozima cuando está clonada en el plasmidio pAC-CMV, cuyos derivados otorgan la mayor disminución de la actividad de la ALDH2 en células de hepatoma de rata.

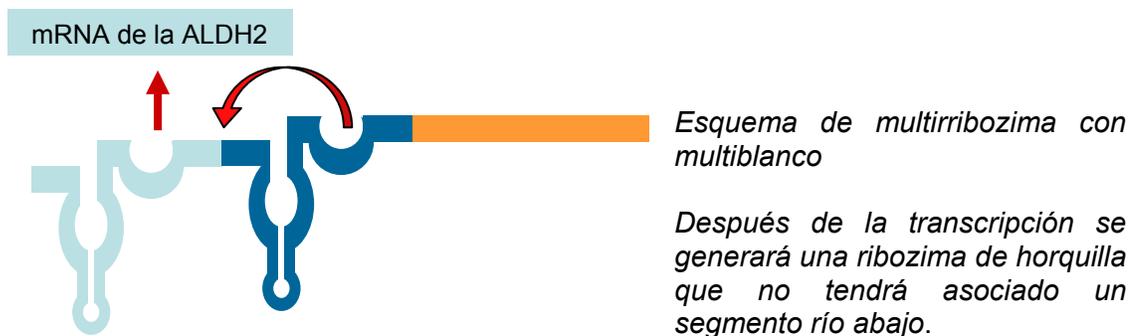
### *Segmento río abajo de la ribozima de horquilla*

La ribozima queda acompañada de un segmento río abajo de  $\approx 250$  nt cuando está clonada en el plasmidio pCEP4. El pCEP4 codifica la señal de poliadenilación del virus SV40 (SV40pA), al igual que en el plasmidio pAC-CMV, siendo ésta una secuencia conocida. El segmento río abajo de la ribozima puede incidir sobre su acción biológica probablemente por las razones antes mencionadas: i) las estructuras que puede formar, ii) el reclutamiento de factores celulares, iii) la eficiencia del proceso de poliadenilación y iv) la destinación. En este caso, los motivos por los cuales vemos diferencias de actividad de la ALDH2 no están relacionados con la acción biológica de la ribozima sino con una acción desconocida asociada al plasmidio pCEP4 sin inserto.

## **5.6 Proyecciones**

Resumiendo los resultados de este trabajo de tesis, la ribozima de horquilla dirigida a los nucleótidos 1553 a 1569 del mRNA de la ALDH2 de rata es un buen candidato para experimentos *in vivo* enfocados hacia el desarrollo de un

fármaco génico para el alcoholismo. Considerando que los resultados indican que: i) la ribozima de horquilla es más eficiente que la ribozima de martillo en disminuir la actividad de la ALDH2, ii) la ribozima de horquilla en células hepáticas de rata tiene dos modos de acción que se suman para disminuir la actividad de la ALDH2 y iii) la ribozima de horquilla mantiene su acción inhabilitadora de la actividad de la ALDH2 en células humanas, es que se proponen dos caminos para desarrollar las ribozimas como posibles fármacos para el alcoholismo. Primero, probar la ribozima de horquilla RzCG20 (clonada en el pAC-CMV) en animales, específicamente usando un adenovirus como vector, y evaluar cambios en el consumo de etanol. Segundo, para mejorar aún más la eficiencia de la ribozima en su acción inhabilitadora, generar una construcción que codifique dos ribozimas en *tándem* (Kowalski y cols., 2005), la primera dirigida a la zona entre los nucleótidos 1553 y 1569 del mRNA de la ALDH2, y la segunda dirigida al espacio entre ambas ribozimas.



Finalmente se puede concluir que la ribozima de horquilla dirigida a los nucleótidos 1553 a 1571 del mRNA de la ALDH2 de rata, es un buen candidato para experimentos *in vivo* enfocados hacia el desarrollo de un fármaco génico para el alcoholismo.

## 6 CONCLUSIONES

La ribozima de horquilla RzCG20, dirigida al mRNA de la deshidrogenasa aldehídica mitocondrial de rata (posiciones 1553-1569), disminuye en 42 % la actividad de la ALDH2 en células de hepatoma de rata en cultivo mediante entrega endógena en un plasmidio portador de un gen codificante de la ribozima que posee el promotor del citomegalovirus y la señal de poliadenilación del virus SV40; el efecto alcanza el 56 % al corregir por tiempo de vida media de la enzima.

La ribozima de horquilla RzCG20 actúa mediante bloqueo y ruptura del mRNA de la ALDH2; estando clonada en el vector pAC-CMV, en un gen que posee la señal de poliadenilación del virus SV40, el 44 % del efecto es adjudicable a bloqueo, en cambio, estando clonada en el vector pAAV-CMV, cuya señal de poliadenilación es la de la hormona del crecimiento humana, el 64 % del efecto es adjudicable a bloqueo.

La ribozima de horquilla RzCG20 tiene mayor acción inhabilitadora sobre la actividad de la ALDH2 que la ribozima de martillo RzGUC20 para el mismo blanco del mRNA de la ALDH2 (posiciones 1551-1571) al ser ensayadas en células de hepatoma de rata en cultivo mediante entrega endógena en plasmidios y estando ambas codificadas en genes que poseen el promotor del citomegalovirus y la señal de poliadenilación del virus SV40.

Las ribozimas de martillo RzUUC9, RzGUC19 y RzGUC20, codificadas en genes que poseen el promotor del citomegalovirus y la señal de poliadenilación del virus SV40, entregadas a células H4-II-E-C3 mediante plasmidios, disminuyen la actividad de la ALDH2 en alrededor del 25 % exclusivamente por acción de bloqueo.

La ribozima de horquilla RzCG20 actúa sólo por bloqueo en células 293 de riñón de embrión humano; disminuye en 66 % la actividad de la ALDH2 en células 293 cotransfectadas con el gen de la ALDH2.

No se pudo evaluar la acción de la ribozima de horquilla RzCG20 clonada en el plasmidio pCEP4 derivado del virus del Epstein Barr con propiedades de permanencia y segregación divisional, debido a efectos nocivos del vector *per se* sobre la viabilidad de las células H4-II-E-C3.

La ribozima de horquilla RzCG20 es un buen candidato para estudios preclínicos en animales.

## 7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**Adachi J**, Mizoi Y, Fukunaga T, Ogawa Y, Imamichi H  
Comparative study on ethanol elimination and blood acetaldehyde between alcoholics and control subjects  
Alcoholism: Clinical and Experimental Research 13(5): 601-604 (1989)

**Amarzguioui M**, Prydz H  
Hammerhead ribozyme design and application  
Cellular and Molecular Life Sciences 54(11): 1175-1202 (1998)

**Andang M**, Maijgren-Steffensson C, Hinkula J, Ahrlund-Richter L  
Cis-cleavage affects hammerhead and hairpin ribozyme steady-state levels differently and has strong impact on trans-targeting efficiency  
Oligonucleotides 14(1): 11-21 (2004)

**Anderson P**, Monforte J, Tritz R, Nesbitt S, Hearst J, Hampel A  
Mutagenesis of the hairpin ribozyme  
Nucleic Acids Research 22(6): 1096-1100 (1994)

**Andronescu M**, Zhang Z, Condon A  
Secondary structure prediction of interacting RNA molecules  
Journal of Molecular Biology 345 (5): 987-1001 (2005)

**Ausubel FM**, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith J, Struhl K  
Editorial BOARD, Massachusetts, EE.UU.  
Current Protocols in Molecular Biology (1996)

**Becker TC**, Noel RJ, Coats WS, Gomes-Foix AM, Gerard RD, Newgard CB  
Use of recombinant adenovirus for metabolic engineering of mammalian cells  
Methods in Cell Biology 43 Pt A: 161-189 (1994)

**Bertrand E**, Castanotto D, Zhou C, Carbonnelle C, Lee NS, Good P, Chatterjee S, Grange T, Pictet R, Kohn D, Engelke D, Rossi JJ  
The expression cassette determines the functional activity of ribozymes in mammalian cells by controlling their intracellular localization  
RNA 3(1): 75-88 (1997)

**Birikh KR**, Heaton PA, Eckstein F  
The structure, function and application of the hammerhead ribozyme  
European Journal of Biochemistry 245(1): 1-16 (1997)

**Borda EJ**, Sigurdsson ST  
Investigation of Mg<sup>2+</sup>- and temperature-dependent folding of the hairpin ribozyme by photo-crosslinking: effects of photo-crosslinker  
Nucleic Acids Research 33(3): 1058-1068 (2005)

**Buzayan JM**, Hampel A, Bruening G  
Nucleotide sequence and newly formed phosphodiester bond of spontaneously ligated satellite tobacco ringspot virus RNA  
Nucleic Acids Research 14(24): 9729-9743 (1986)

**Carter PJ**, Samulski RJ  
Adeno-associated viral vectors as gene delivery vehicles  
International Journal of Molecular Medicine 6(1): 17-27 (2000)

**Colgan DF**, Manley JL  
Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation  
Genes and Development 11(21): 2755-2766 (1997)

**CONACE**  
Resultado del Quinto Estudio Nacional de Drogas en la Población General de Chile, 2002. Consumo general entre 14 y 64 años de drogas. Gobierno de Chile (2002)

**Cortínez G**  
Inhibición de la expresión del gen de la deshidrogenasa aldehídica mitocondrial: evaluación del sistema de RNA de interferencia  
Tesis para optar al grado de Doctor en Bioquímica. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. Santiago de Chile. En preparación (2006)

**Couture LA**, Stinchcomb DT  
Anti-gene therapy: the use of ribozymes to inhibit gene function  
Trends in Genetics 12(12): 510-515 (1996)

**Donahue CP**, Fedor MJ  
Kinetics of hairpin ribozyme cleavage in yeast  
RNA 3(9): 961-973 (1997)

**Durocher Y**, Perret S, Kamen A  
High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells  
Nucleic Acids Research 30(2): 1-9 (2002)

**Doudna JA**, Cech TR  
The chemical repertoire of natural ribozymes  
Nature 418(6894): 222-228 (2002)

**Encina GF**

Efecto de oligonucleótidos formadores de triple hélice de DNA sobre la expresión del gen de la deshidrogenasa aldehídica mitocondrial (*Aldh2*) de rata. Memoria de Título de Bioquímico. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. Santiago de Chile (2002)

**Ezquer F**

Modificaciones génicas del transporte intestinal de hierro: oportunidades en el tratamiento de la hemocromatosis. Tesis de Grado de Doctor en Ciencias. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. Santiago de Chile (2006)

**Farrés J**, Guan KL, Weiner H

Primary structures of rat and bovine liver mitochondrial aldehyde dehydrogenases deduced from cDNA sequences  
European Journal of Biochemistry 180(1): 67-74 (1989)

**Forster AC**, Symons RH

Self-cleavage of virusoid RNA is performed by the proposed 55-nucleotide active site  
Cell 50(1): 9-16 (1987)

**Fuller R**, Branche L, Brightweil D, Derman R, Emrick C, Iber F, James K, Lacoussiere R, Lee K, Lowenstam I, Maany I, Neiderniser D, Nocks J, Shaw S  
Disulfiram treatment of alcoholism, a Veterans Administration cooperative study

Journal of the American Medical Association 256(11): 1449-1455 (1986)

**Garver E**, Ross AD, Tu GC, Cao QN, Zhou F, Israel Y

Paradigm to test a drug-induced aversion to ethanol  
Alcohol and Alcoholism 35(5): 435-438 (2000)

**Garver E**, Tu G, Cao Q-N, Aini M, Zhou F, Israel Y

Eliciting the low-activity aldehyde dehydrogenase Asian phenotype by an antisense mechanism results in an aversion to ethanol  
Journal of Experimental Medicine 194(3): 571-580 (2001)

**Goate AM**, Edenberg HJ

The genetics of alcoholism  
Current Opinion in Genetics and Development 8(3): 282-286 (1998)

**Gorbatyuk MS**, Pang JJ, Thomas J Jr, Hauswirth WW, Lewin AS

Knockdown of wild-type mouse rhodopsin using an AAV vectored ribozyme as part of an RNA replacement approach  
Molecular Vision 29(11): 648-656 (2005)

**Hampel A**

The hairpin ribozyme: discovery, two-dimensional model, and development for gene therapy

Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology 58: 1-39 (1998)

**Hampel A**, Tritz R, Hicks M, Cruz P

Hairpin catalytic RNA model: evidence for helices and sequence requirement for substrate RNA

Nucleic Acids Research 18(2): 299-304 (1990)

**Han S**, Mahato RI, Sung YK, Kim SW

Development of biomaterials for gene therapy

Molecular Therapy 2(4): 302-316 (2000)

**Harada S**, Agarwal DP, Goedde HW

Aldehyde dehydrogenase deficiency as cause of facial flushing reaction to alcohol in Japanese

Lancet 31(2): 982-989 (1981)

**Heath AC**, Whitfield JB, Madden PA, Bucholz KK, Dinwiddie SH, Slutske WS, Bierut LJ, Statham D B, Martin NG

Towards a molecular epidemiology of alcohol dependence: analyzing the interplay of genetic and environmental risk factors

The British Journal of Psychiatry Supplement 178(40): 33-40 (2001)

**Hermos JA**, Young MM, Gagnon DR, Fiore LD

Patterns of dispensed disulfiram and naltrexone for alcoholism treatment in a veteran patient population

Alcoholism: Clinical and Experimental Research 28(8): 1229-1235 (2004)

**Hsu LC**, Bendel RE, Yoshida A

Genomic Structure of the human mitochondrial aldehyde dehydrogenase gene

Genomics 2(1): 57-65 (1998)

**Ivanov SA**, Vauléon S, Muller S

Efficient RNA ligation by reverse-joined hairpin ribozymes and engineering of twin ribozymes consisting of conventional and reverse-joined hairpin ribozyme units

The FEBS Journal 272(17): 4464-4474 (2005)

**James HA**, Gibson I

The therapeutic potential of ribozymes

Blood 91(2): 371-382 (1998)

**Johnson BA**, Ait-Daoud N

Neuropharmacological treatments for alcoholism: scientific basis and clinical findings

Psychopharmacology 149(4): 327-344 (2000)

**Karahanian E**, Ocaranza P, Israel Y

Aldehyde dehydrogenase (ALDH2) activity in hepatoma cells is reduced by an adenoviral vector coding for an ALDH2 antisense mRNA

Alcoholism: Clinical and Experimental Research 29(8): 1384-1389 (2005)

**Kato Y**, Kuwabara T, Warashina M, Toda H, Taira K

Relationships between the activities *in vitro* and *in vivo* of various kinds of ribozyme and their intracellular localization in mammalian cells

The Journal of Biological Chemistry 276 (18): 15378-15385 (2001)

**Kiehnopf M**, Esquivel EL, Brach MA, Herrmann F

Ribozymes: biology, biochemistry, and implications for clinical medicine

Journal of Molecular Medicine 73(2): 65-71 (1995)

**Koostra NA**, Verma IM

Gene therapy with viral vectors

Annual Review of Pharmacology and Toxicology 43(10): 413-439 (2003)

**Kowalski P**, Surowiak P, Lage H

Reversal of different drug-resistant phenotypes by an autocatalytic multitarget multiribozyme directed against the transcripts of the ABC transporters MDR1/P-gp, MRP2 and BCRP

Molecular Therapy 11(4): 508-522 (2005)

**Lee RJ**, Huang L

Lipidic vector systems for gene transfer

Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 14(2): 173-206 (1997)

**Leblois H**, Roche N, Di Falco N, Orsini C, Yeh P, Perricaudet M

Stable transduction of actively dividing cells via a novel adenoviral/episomal vector

Molecular Therapy 1(4): 314-322 (2000)

**Ledley FD**

Pharmaceutical approach to somatic gene therapy

Pharmaceutical Research 13(11): 1955-1614 (1996)

**Lieber A**, He CY, Polyak SJ, Gretch DR, Barr D, Kay MA

Elimination of hepatitis C virus RNA in infected human hepatocytes by adenovirus-mediated expression of ribozymes

Journal of Virology 70(12): 8782-8791 (1996)

**Lieber A**, Kay MA

Adenovirus-mediated expression of ribozymes in mice  
Journal of Virology 70(5): 3153-3158 (1996)

**Lladser AF**

Inhibición de la expresión del gen de la deshidrogenasa aldehídica mitocondrial (*Aldh2*) de rata mediante oligonucleótidos de antisentido. Memoria de Título de Bioquímico. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. Santiago de Chile (2003)

**Long DM**, Uhlenbeck OC

Self-cleaving catalytic RNA  
The FEBS Journal 7(1): 25-30 (1993)

**Muller S**

Engineered ribozymes as molecular tools for site-specific alteration of RNA sequence  
Chembiochem: a European Journal of Chemical Biology 4(10): 991-997 (2003)

**Muñoz CR**

Disminución de la actividad de la deshidrogenasa aldehídica mitocondrial (ALDH2) de rata mediante ribozimas de martillo. Memoria de Título de Bioquímico. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. Santiago de Chile (2003)

**Nishikawa M**, Huang L

Nonviral vectors in the new millennium: delivery barriers in gene transfer  
Human Gene Therapy 12(8): 861-870 (2001)

**Novoradovsky A**, Su-Len T, Goldfarb L, Peterson R, Long J, Goldman D

Mitochondrial aldehyde dehydrogenase polymorphism in Asian and American Indian populations: detection of new ALDH2 alleles  
Alcoholism: Clinical and Experimental Research 19(5): 1105-1110 (1995)

**Ocaranza P**

Terapia génica por vectores adenovirales en modelos animales de alcoholismo: inhibición de la expresión del gen de la deshidrogenasa aldehídica mitocondrial mediante el gen antisentido  
Tesis de grado de Doctor en Bioquímica. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. Santiago de Chile (2006)

**Pettinati HM**, Rabinowitz AR

Recent advances in the treatment of alcoholism  
Clinical Neuroscience Research 8(5):151-159 (2005)

**Prescott CA**, Kendler KS

Genetic and environmental contributions to alcohol abuse and dependence in a population-based sample of male twins

American Journal of Psychiatry 156(1): 34-40 (1999)

**Poon K**, MacGregor RB Jr

Formation and structural determinants of multi-stranded guanine-rich DNA complexes

Biophysical Chemistry 84(3): 205-216 (2000)

**Sclimenti CR**, Calos MP

Epstein-Barr virus vectors for gene expression and transfer

Current Opinion in Biotechnology 9(5):476-479 (1998)

**Schindelhauer D**, Laner A

Visible transient expression of eGFP requires intranuclear injection of large copy numbers

Gene Therapy 9(11): 727-730 (2002)

**Shen ML**, Johnson KL, Mays DC, Lipsky JJ, Naylor S

Determination of *in vivo* adducts of disulfiram with mitochondrial aldehyde dehydrogenase

Biochemical Pharmacology 61(5): 537-545 (2001)

**Shimayama T**, Nishikawa S, Taira K

Generality of the NUX rule: kinetic analysis of the results of systematic mutations in the trinucleotide at the cleavage site of hammerhead ribozymes

Biochemistry 34(11): 3649-3654 (1995)

**Shippy R**, Lockner R, Farnsworth M, Hampel A

The hairpin ribozyme. Discovery, mechanism, and development for gene therapy

Molecular Biotechnology 12(1): 117-129 (1999)

**Singh S**, Fritze G, Fang B, Harada S, Paik Y, Eckey R, Agarwal D, Goedde W

Inheritance of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: genotyping in Chinese, Japanese, and South Korean families reveals dominance of the mutant allele

Human Genetics 83(2): 119-121 (1989)

**Smith PK**, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC

Measurement of protein using bicinchoninic acid

Analytical Biochemistry 15(1): 163-279 (1985)

**Swift RM**

Medications and alcohol craving

Alcohol Health and Research World 23(3): 207-213 (1999)

**Symons RH**

Small catalytic RNAs

Annual Review of Biochemistry 61(1): 641-671 (1992)

**Tang MX, Szoka FC.**

The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes

Gene Therapy 4(8): 823-832 (1997)

**Wall T, Carr L, Ehlers C**

Protective association of genetic variation in alcohol dehydrogenase with alcohol dependence in native American Mission Indians

The American Journal of Psychiatry 160(1): 41-46 (2003)

**Wallgren H and Barry H (III)**

Actions of alcohol, Vol I: Biochemical, physiological and psychological aspects

Elsevier Publishing Company, Amsterdam pp 78-90 (1970)

**Welz R, Bossmann K, Klug C, Schmidt C, Fritz HJ, Muller S.**

Site-directed alteration of RNA sequence mediated by an engineered twin ribozyme

Angewandte Chemie 42(21): 2424-2427 (2003)

**Williams SH**

Medications for treating alcohol dependence

American Family Physician 72 (9): 1775-1780 (2005)

**Xiao Q, Weinar H, Johnston T, Crabb DW**

The aldehyde dehydrogenase *ALDH2\*2* allele exhibits dominance over *ALDH2\*1* in transduced HeLa cells

The Journal of Clinical Investigation 96(5): 2180-2186 (1995)

**Xiao X, Li J, Samulski RJ**

Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus

Journal of Virology 72(3): 2224-2232 (1998)

**Yanze MF, Lee WS, Poon K, Piquette-Miller M, Macgregor RB Jr**

Cellular uptake and metabolism of DNA frayed wires

Biochemistry 42(39): 11427-11433 (2003)

**Yoshida A**, Wang G, Dave V

Determination of genotypes of human aldehyde dehydrogenase *ALDH2* locus  
American Journal of Human Genetics 35(6): 1107-1116 (1983)

**Yoshida A**, Huang I, Ikawa M

Molecular abnormality of an inactive aldehyde dehydrogenase variant  
commonly found in Orientals

Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) 81(1): 258-261  
(1984)