

Tesis Doctoral

Síntesis, caracterización y aplicaciones de dnazimas modificadas con 2'-desoxi-2'-c-metilnucleósidos

Robaldo, Laura

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Robaldo, Laura. (2011). Síntesis, caracterización y aplicaciones de dnazimas modificadas con 2'-desoxi-2'-c-metilnucleósidos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Robaldo, Laura. "Síntesis, caracterización y aplicaciones de dnazimas modificadas con 2'-desoxi-2'-c-metilnucleósidos". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y APLICACIONES DE DNAZIMAS MODIFICADAS CON 2'-DESOXI-2'-C-METILNUCLEOSIDOS

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área
Química Biológica

Lic. Laura Robaldo

Director de Tesis: **Dr. Adolfo Iribarren**
Director Asistente: **Dr. Javier Montserrat**

Consejero de Estudios: **Dr. Eduardo Cánepa**

Lugar de trabajo: Laboratorio de Química de Ácidos Nucleicos - **Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI-CONICET)**,

Buenos Aires, 2011

**SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y APLICACIONES DE DNAZIMAS
MODIFICADAS CON 2**

Los resultados obtenidos muestran que las modificaciones (2'R) y (2'S)-2'-desoxi-2'-C-metilnucleósidos pueden ser estratégicamente introducidas en diferentes posiciones del núcleo catalítico de la DNAzima

SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND APPLICATIONS OF

2

For these reasons we concluded that the modified DNazymes synthesized in this work could potentially be used as resistant antisense molecules against therapeutics mRNA targets.

Keywords

Modified DNazymes - Catalytic nucleic acids

2

Agradecimientos

Quisiera agradecer a toda la gente que me ayudó durante estos años de trabajo y estudio. Esta tesis es el producto del conocimiento y apoyo de mucha gente y por ese motivo aprovecho esta oportunidad para darle las gracias

A Adolfo y a Javier por el cariño, por enseñarme y guiarme a lo largo de tantos años de aprendizaje, por permitirme trabajar en el laboratorio y por confiar en mí.

A la Dra. Flawia, al Dr. Torres y a la comisión directiva del INGEBI por la ayuda y porque fue un placer trabajar en el INGEBI.

A Maru y a Rodrigo por compartir el día a día de nuestras tesis, por las ideas y opiniones enriquecedoras. Por divertirnos tanto, por las anécdotas interminables y por ser mis amigos.

A Mari Gallo, por preocuparse siempre por nosotros.

A Diego Wengier por su invaluable ayuda y buen humor permanente, por sus charlas y cantos. A Eva Figuerola, por su ayuda y por compartir el ministerio. A la Dra. Cristina Paveto por guardarme siempre un poquito de radioactivo. A todos los compañeros del INGEBI por hacer ameno el trabajo en el instituto y por ayudarme siempre.

A Gladis, Leonor Mari y Francisco, por su calidez, cariño y compañía. A Marta, Daniel, Mariano, Alicia e Irma, por hacer las cosas más simples del INGEBI

Al grupo del Dr. Iribarren en la UNQUI por su ayuda, por prestarnos tantas cosas.

Al Ing. Daniel Sánchez, por dedicarle tanto tiempo al arreglo del viejo sintetizador e intentar que funcionara como sea. Por arreglar casi cualquier equipo.

Al Dr. Esteban Mocetti y al Dr. Hernán García Rivello del Hospital Italiano, por permitirnos utilizar su sintetizador de oligonucleótidos en la primera etapa de la tesis.

Al grupo de la Dra. Elisa Bal. A la Dra. Marina Simian y Osvaldo Pontiggia por ayudarnos con los ensayos de inhibición.

Al grupo de la Dra. Patricia Elizalde. A Cecilia y a Franco por realizar los ensayos de inhibición.

Al grupo del Dr. Darío Estrín. A Pau, Santiago, Marcelo y Ariel por ayudarme con la química computacional.

Al Dr. Alberto Ghini y a la Dra. María Joselevich por la ayuda con la reacción de Wittig.

Al Dr. Alfredo Berzal-Herranz por permitirme trabajar y aprender en su laboratorio. A Cristina, Soledad, Kiko, José y Vicente por ayudarme y hacer tan amena mi estancia en el laboratorio. A todos los compañeros del IPBLN por la buena y desinteresada predisposición para ayudarme.

A Helena y Belén por su compañía en el laboratorio los últimos días, por los mates y los helados.

A CONICET, a la Universidad de Buenos Aires, a la OPCW, a la University of Southern Denmark, a Boehringer Ingelheim Fonds y a la Fundacion INGEBI por las becas y financiamiento para mi formación profesional.

Por ultimo, quisiera agradecerle a quienes, sin tener mucho que ver con la ciencia, son igualmente responsables de que haya podido realizar esta tesis:

A mis viejos por querernos tanto, estar siempre y ayudarnos en todo. A Juampi, porque es un hermano buenísimo y muy gracioso. A Lore, porque es por lejos la mejor cuñada (aunque no tenga con quien compararla), por compartir tantos mates. A Juli, porque ser su Iaia me llena de felicidad y porque es perfecta.

A mis abuelos porque su amor todavía me acompaña. A Marichu, Pepi, Juan, Graciela y Elena por estar siempre pendientes de cómo ando. A Esteban, Mati, Joaco, Denise y Ceci porque nos divertimos mucho. A Sofi por su ternura.

A Vero y a Dani porque la familia también se elige. A Cami, a Juan y a Delfi porque son hermosos y disfruto mucho jugar con ellos.

A los/99, a Pau, a Guto, a Nico, a Ceci, a Pablo, a Josy, a Eze, a Pao, a los Sergios, a Marie por los fines de semana, por divertirnos y pasarla tan bien juntos. A Emita, porque es hermosa y nos vuelve niños a todos.

A Facu por su cariño y consejos útiles. Por su ayuda con la tesis aunque no esté para el final.

A Fer, Juan, Pipa y Romi, por las cosas ricas, los viajes, el TEG y saber que siempre puedo contar con ellos.

A Bren y Wal por la amistad de tantos años. A Wal y Sonia por la superproducción de sobrinas.

A mis viejos

Eugenia Cilveti y Juan Carlos Robaldo

Introducción

Capítulo 1

Resultados y Discusión

Capítulo 2 - Síntesis de Nucleósidos y Oligonucleótidos Modificados	49
2-1 Objetivo	51
<hr/>	
2-2 Síntesis de nucleósidos modificados	51
2-2.1 (2)	

4-3.1 DNazimas utilizadas

7-1.7.8 Reacciones de marcación con $\gamma^{32}\text{P}$ en el extremo 5

7-7.2 Western Blot

Introducción

Introducción

Introducción

Introducción

Introducción

Introducción

Introducción

Introducción

Introducción

Introducción

Introducción

Introducción

Introducción

Introducción

Introducción

Introducción

Introducción

Introducción

Introducción

Introducción

Introducción

Introducción

Introducción

Introducción

Introducción

Introducción

Introducción

Introducción

Introducción

Introducción

Introducción

Introducción

Introducción

Introducción

Introducción

Introducción

Introducción

Introducción

Introducción

Introducción

Introducción

Introducción

Introducción

Introducción

Introducción

Introducción

Introducción

Introducción

Capítulo 2

Síntesis de Nucleósidos y Oligonucleótidos Modificados

2-1 Objetivo

El objetivo de este capítulo es detallar los pasos realizados hasta la obtención de las DNazimas modificadas. El mismo incluye la síntesis orgánica de los nucleósidos modificados, de sus correspondientes fosforamiditas y por último, la síntesis de los oligonucleótidos modificados.

2-2 Síntesis de nucleósidos modificados

2-2.1 (2

Esta ruta parte de uridina (Figura 2-1, **1**), y el primer paso es una protección conjunta de los hidroxilos de los carbonos 3' y 5' con el reactivo de Markiewicz¹. Esta protección consta de una primera etapa regioselectiva donde se produce una sustitución nucleofílica mediante el ataque del hidroxilo primario del carbono 5' a uno de los silicios del 1,3-dicloro-1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano. Posteriormente, se da una segunda sustitución nucleofílica donde participan el hidroxilo del carbono 3', el segundo silicio de la molécula y cloruro como grupo saliente para dar **3**

C-metil-3

la síntesis de un intermediario triazólido utilizando POCl_3 y 1,2,4-tetrazol. Posteriormente, el tratamiento con amoníaco sustituye este grupo dando como resultado (2'S) y (2'R)-2

2-2.4 (2)

La ruta sintética comienza con la protección del grupo amino exocíclico de la posición 6 de la adenosina. Se sintetizó N⁶,N⁶-dibenzoiladenosina (Figura 2-4, **30**) en lugar de N⁶-benzoiladenosina ya que este cambio proporciona mejoras notables en los rendimientos de las reacciones, sobre todo en el paso de oxidación.

Los siguientes pasos son la protección de los hidroxilos de las posiciones 3' y 5' con el reactivo de Markiewicz (Figura 2-4, **31**) y posteriormente, la oxidación del hidroxilo de la posición 2' para dar el **2**

Dado que esta ruta sintética no permite obtener los dos diastereoisómeros deseados, y que los rendimientos para el diastereómero (2'S) son muy bajos, no se realizaron las tareas de escalado para luego obtener las DNAzimas modificadas en las posiciones A.

2-3 Síntesis de fosforamiditas modificadas

Una vez obtenidos los nucleósidos modificados es necesario sintetizar las 5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-3'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropilaminofosforamiditas) asociadas¹⁰. Estos compuestos son los monómeros necesarios para la síntesis automatizada de ácidos nucleicos. Sus grupos funcionales reactivos se encuentran estratégicamente protegidos para lograr una desprotección selectiva durante las etapas del ciclo de síntesis.

Para obtener las fosforamiditas se lleva a cabo la ruta sintética de la Figura 2-5, donde se ha ejemplificado con los diastereoisómeros de la 2'-desoxi-2'-C-metiluridina. La primera etapa es la protección regioselectiva del hidroxilo de la posición 5' con cloruro de dimetoxitritilo. La segunda reacción es un ataque nucleofílico del hidroxilo de la posición 3' a la 2-cianoetoxi-N,N-diisopropilaminoclorofosfina para dar el monómero que se utilizarán para la síntesis de nucleósidos modificados.

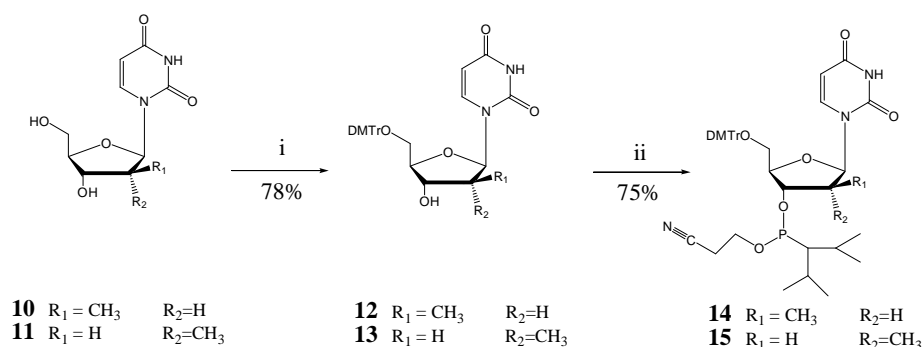


Figura 2-5: Síntesis de 5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-3'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropilaminofosforamidita)-2'-desoxinucleósidos ejemplificado para 2

La tabla 2-1 indica las fosforamiditas sintetizadas, los rendimientos obtenidos y el código numérico de estos compuestos. Los espectros de RMN de las fosforamiditas utilizadas se encuentran en el anexo.

<u>Nucleósido^A</u>		<u>Protección 5'^B</u>	<u>Fosforamidita^C</u>
(2'S)-2'-desoxi-2'-C-metiluridina	Compuesto 10	78% → Compuesto 12	80% → Compuesto 14
(2'R)-2'-desoxi-2'-C-metiluridina	Compuesto 11	73% → Compuesto 13	86% → Compuesto 15
2'-desoxi-2'-metilidenuridina	Compuesto 26	77.4% → Compuesto 27	30% → Compuesto 28
2'-desoxiuridina*	Compuesto 39	77.4% → Compuesto 40	66% → Compuesto 41
(2'S)-2'-desoxi-2'-C-metil-N ^t -benzoilcitidina	Compuesto 20	86% → Compuesto 22	85.4% → Compuesto 24
(2'R)-2'-desoxi-2'-C-metil-N ^t -benzoilcitidina	Compuesto 21	75.5% → Compuesto 23	67% → Compuesto 25

Tabla 2-1: Compuestos sintetizados: A) nucleósidos modificados, B) 5'-O-DMTr- 2'-desoxinucleósidos C) 5'-O-DMTr -3'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita)-2'-desoxinucleósidos

*La fosforamidita de la 2'-desoxiuridina fue obtenida a partir de 2'-desoxiuridina, ver Capítulo 7.

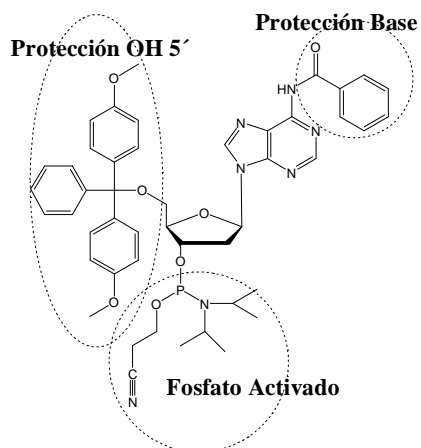
2-4 Síntesis de oligonucleótidos

Para la obtención de los oligonucleótidos se utilizaron sintetizadores automáticos que, mediante numerosos ciclos, permiten la síntesis secuencial y ordenada de cadenas de ADN o ARN. Las reacciones se llevan a cabo en fase sólida, el primer nucleósido se encuentra unido a un soporte de sílice de poro controlado (CPG) y permanece unido hasta la finalización de la síntesis. Esta metodología utiliza la química de cianoetilfosforamiditas^{11, 12}, estos monómeros contienen diversos grupos protectores estratégicamente diseñados para removerlos de forma selectiva con distinta química de desprotección. La Figura 2-6 A muestra los grupos protectores característicos de estos monómeros. El extremo 5' se protege con dimetoxitritilo que puede ser removido en medio ácido con di o tricloroacético. La fosforamidita unida al hidroxilo 3' tiene un grupo N,N-diisopropilamino, que puede activarse en medio ácido y actuar como un buen grupo saliente en una reacción de sustitución nucleofílica. Los grupos protectores de las bases y del esqueleto fosfato, son lábiles al medio básico y podrán removerse con amoníaco concentrado al finalizar la síntesis. Las fosforamiditas que se utilizan para las síntesis de oligonucleótidos de ADN se esquematizan en la Figura 2-6 B.

¹¹ Beaucage, Caruthers. Deoxynucleoside phosphoramidites. A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis Tetrahedron Letters **1981**, 22, 20, 1859-1862

¹² Beaucage, Caruthers. Synthetic Strategies and Parameters Involved in the Synthesis of oligodeoxyribonucleotides According to the Phosphoramidite Method. Current protocols in nucleic acid chemistry **2000** 3.3.1-3.3.20

A



B

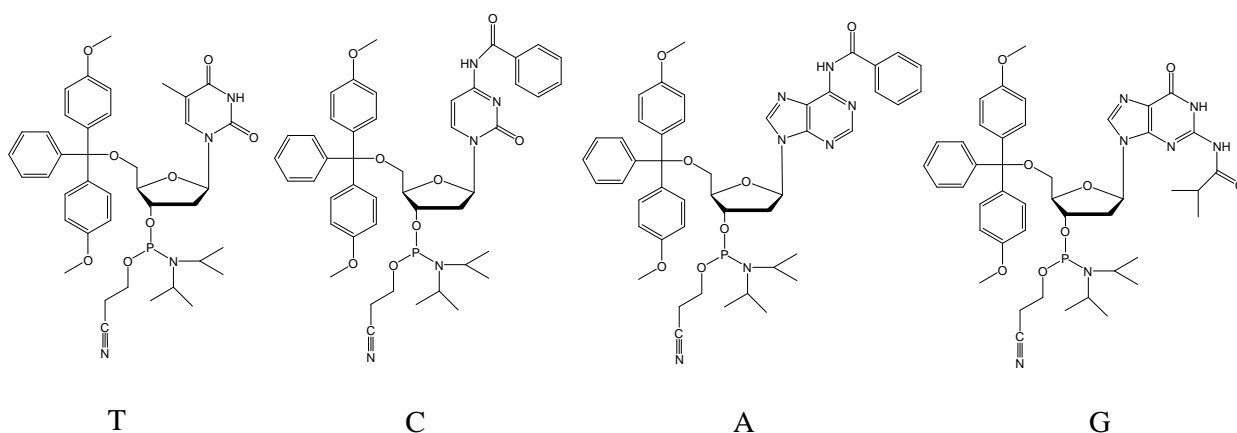


Figura 2-6: 5'-O-DMTr-3'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita)-2'-desoxinucleósidos A) grupos protectores presentes B) monómeros para la síntesis de ADN. Bases nitrogenadas **T**- Timina, **C**- N⁴-benzoilcitosina, **A**- N⁶-benzoiladenina, **G**- N²-isobutirilguanina.

La Figura 2-7 esquematiza un ciclo de síntesis, el cual incluye los pasos para adicionar un nucleótido a la cadena. La síntesis se realiza desde la posición 3' a la 5' contrariamente a la reacción biosintética, esto se debe a la mejor eficiencia de la reacción química de condensación de monómeros.

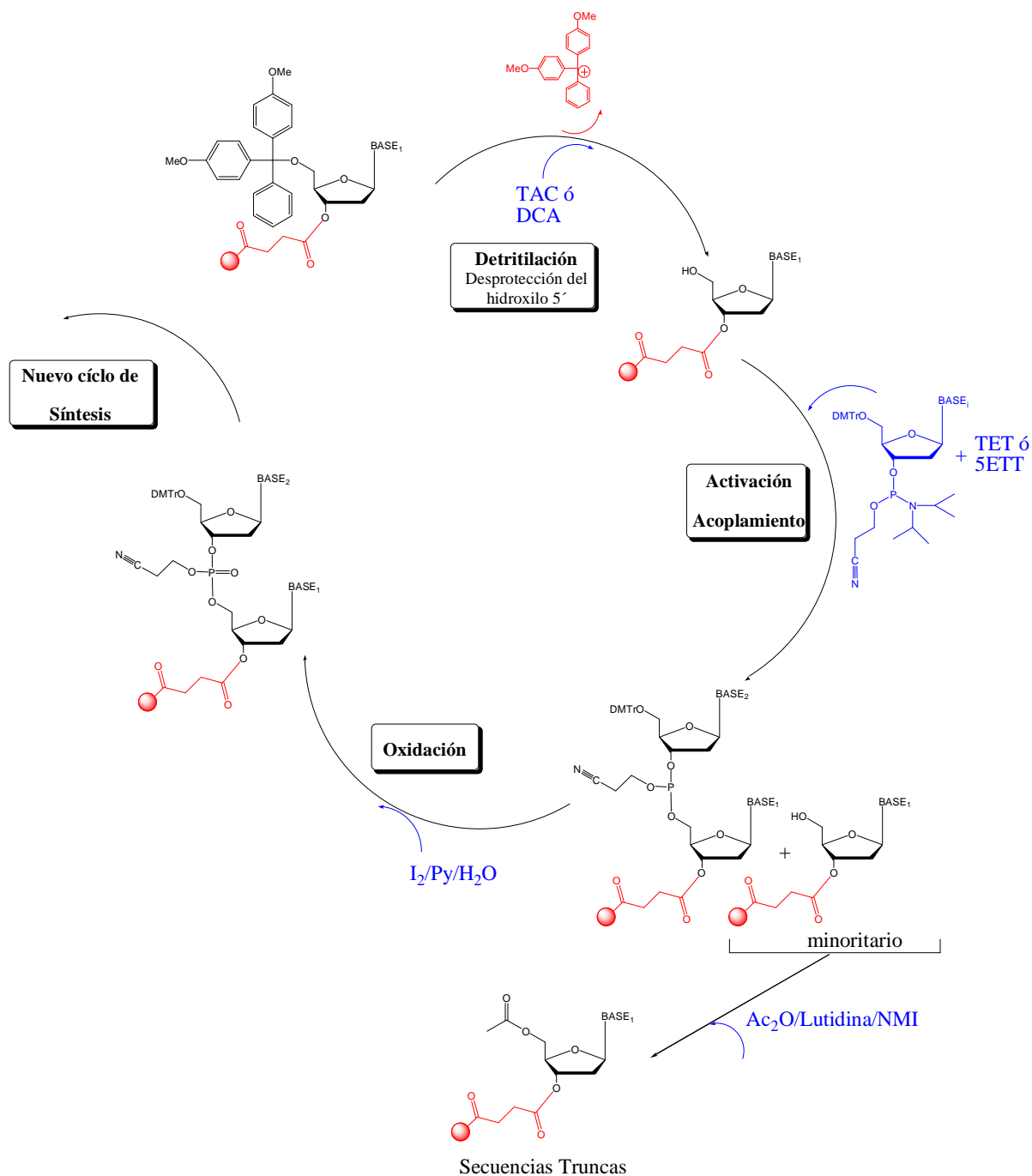


Figura 2-7: Esquema del ciclo de síntesis realizado por el sintetizador automático de oligonucleótidos.

El primer paso involucra la desprotección del hidroxilo del carbono 5' previamente protegido con dimetoxitritilo. Esta reacción se lleva a cabo en medio ácido, utilizando di o tricloroacético en diclorometano.

Una vez desprotegido el extremo 5', se procede a incorporar el siguiente monómero. Se trata la fase sólida con la fosforamidita y un activador (tetrazol o 5-etiltiotetrazol) cuya función es protonar el grupo amino de la fosforamidita y transformarlo en un excelente grupo

saliente. Tras el ataque nucleofílico del activante se obtienen el derivado fosfotetrazólido y diisopropilamina. La protección previa de los grupos reactivos de las bases deja como único nucleófilo al hidroxilo del extremo 5' que, mediante un ataque al fósforo del fosfotetrazólido, permite elongar la cadena en un nucleótido. Para alcanzar buenos rendimientos en el producto final, este acoplamiento debe realizarse con una eficiencia mínima del 98%.

Dado que la extensión de la cadena no se da de forma cuantitativa, se busca bloquear las secuencias que no reaccionaron en la condensación y evitar que interfieran en los siguientes pasos de síntesis. Finalizada la etapa de acoplamiento, se trata con un agente acetilante dando origen a secuencias truncas de largo y composición indeseados que serán posteriormente separadas mediante una purificación cromatográfica.

El siguiente paso es la oxidación del triesterfosfito con una mezcla de yodo, piridina y agua para dar un fósforo pentavalente característico del enlace fosfato de los ácidos nucleicos. Para cadenas modificadas con fosforotioatos, se adiciona un paso extra de formación del enlace fósforo-azufre utilizando 2-benzoditiol-3-ona-1,1-dióxido.

Por último, un nuevo paso de detritilación permite el comienzo del siguiente ciclo. Dado que el catión tritilo liberado tiene una coloración naranja, la absorbancia a 490-495nm se utiliza como indicador de la eficiencia de acoplamiento.

La repetición sucesiva de ciclos da origen a la secuencia de composición y largo deseados unida al soporte sólido y con los grupos protectores en las bases y en el fosfato. El tratamiento con amoníaco concentrado a 55 C durante ocho horas permite liberar el oligonucleótido del soporte de sílice e hidrolizar los grupos protectores. Se obtiene como resultado, una mezcla de la secuencia completa (de largo n) contaminada con secuencias minoritarias más cortas (n-1, n-2, etc), con un conjunto de secuencias truncas y con los grupos protectores de las bases hidrolizados. El oligonucleótido desprotegido de la fase sólida, todavía conserva el grupo protector DMTr en el extremo 5' ya que éste es lábil únicamente en medio ácido. Por ser un grupo voluminoso y lipofílico permite que la mezcla pueda ser purificada sin problemas por cromatografía de fase reversa. La Figura 2-8 A muestra el perfil cromatográfico de HPLC-RP del producto de desprotección con amoníaco de la síntesis de un oligonucleótido de ADN de 32 bases. Lo primero en eluir de la columna son las secuencias truncas. Luego, se distingue la benzamida y por último, se observa el oligonucleótido que, por estar protegido en el extremo 5' con DMTr, presenta mayor afinidad por la columna C18.

Este pico eluye con una cola hacia mayores tiempos de retención, lo cual está indicando la presencia de algunas secuencias minoritaria de menor longitud (n-1, n-2, etc).

Por último, se aísla la secuencia deseada, se desprotege el extremo 5' en medio ácido y nuevamente se debe purificar el oligonucleótidos del DMTr liberado mediante una extracción de la fase acuosa con éter etílico. Se controla la integridad y la pureza del oligonucleótidos por HPLC-RP. La Figura 2-11 B muestra, a modo de ejemplo, el cromatograma de un oligonucleótido de ADN de 32 bases totalmente desprotegido. En este caso se distinguen secuencias minoritarias n-1, n-2 y hasta n-3. La Figura 2-8 C muestra un gel de poliacrilamida donde pueden discriminarse oligonucleótidos con diferencias de longitud de entre uno y dos nucleótidos.

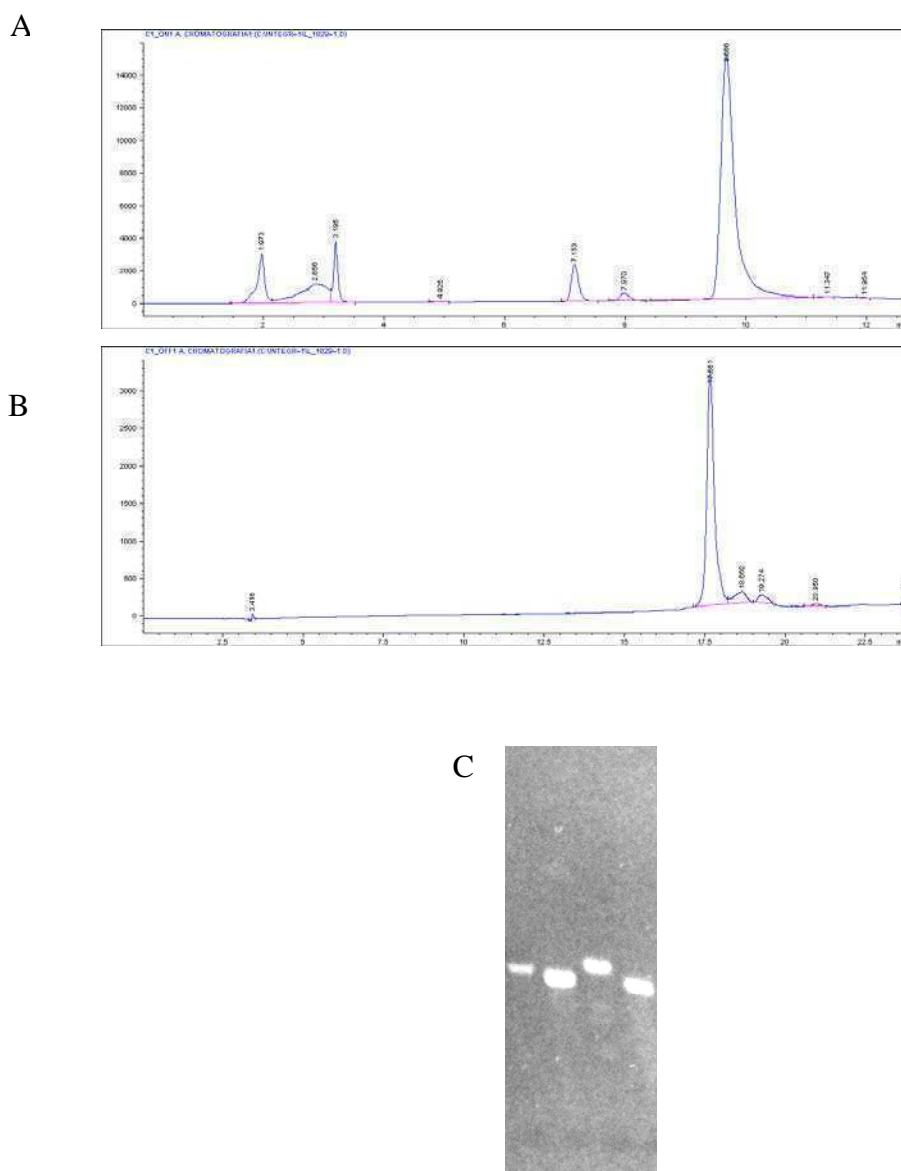


Figura 2-8: Etapas de purificación de los oligonucleótido, ejemplificado con una secuencia de ADN de 32 bases A) Producto de la desprotección con amoníaco B) Oligonucleótido totalmente desprotegido y purificado C) Control de pureza por electroforesis en gel de poliacrilamida.

Los sintetizadores comerciales ofrecen distintas opciones para los ciclos según la naturaleza del oligonucleótido a sintetizar, las preferencias de escala o la purificación post síntesis. Generalmente, los ciclos están prediseñados para síntesis de secuencias de ADN o ARN, ya sea DMTr-ON o DMTr-OFF. Pueden realizarse síntesis con escalas desde 40nmol hasta 10 mol. Igualmente, es posible variar las condiciones de los ciclos, por ejemplo, aumentando los tiempos en que los reactivos están en contacto con la fase sólida, agregando un nuevo paso de reacción, alterando el orden de los pasos, etc. Esto es muy útil cuando se trabaja con nucleósidos modificados con requerimientos de reacción no contemplados en los ciclos disponibles. Por lo tanto cada paso de síntesis se optimizó según la fosforamidita utilizada. Para 2'-desoxi-2'-C-metilfosforamiditas, 2,2'-anhidrouridinfosforamiditas, 2'-desoxi-2'-metilidenfosforamiditas y fosforamiditas LNA, se utilizó doble paso de acoplamiento y se extendió el tiempo de esta reacción. Para el caso de LNA fosforamiditas, el paso de oxidación es más lento que con las fosforamiditas de ADN, por lo tanto se requiere adicionar un paso extra de oxidación. Las fosforamiditas LNA-C deben ser disueltas en THF/ACN 25:75.

De esta manera, se obtuvieron los oligonucleótidos utilizados para los ensayos de caracterización cinética o de estabilidad nucleolítica (Capítulo 3) y para los ensayos de actividad en sistemas biológicos (Capítulo 4).

2-5 Conclusión

Durante este trabajo se sintetizaron los diastereoisómeros (2'R) y (2'S)-2'-desoxi-2'-C-metiluridina y los correspondientes a citidina, (2'R) y (2'S)-2'-desoxi-2'-C-metil-N⁴-benzoilcitidina. También se obtuvo el monómero 2'-desoxi-2'-C-metilidenuridina. Se realizaron algunas modificaciones que mejoran la ruta sintética planteada originalmente. Se avanzó sobre la síntesis de (2'R) y (2'S)-2'-desoxi-2'-C-metil-N⁶-benzoiladenosina proporcionando información para luego continuar con la síntesis.

Se obtuvieron las fosforamiditas de los 2'-desoxi-2'-C-metilpirimidinnucleósidos sintetizados. Luego se utilizaron para introducirlos en las secuencias de las DNAzimas y oligonucleótidos modificados. También se sintetizaron DNAzimas modificadas con 2'-desoxi-2'-metilidenuridina y con los monómeros comerciales LNA, 2,2'-anhidrouridina y 2'-O-metilnucleósidos.

Capítulo 3

Estudio de Actividad y Estabilidad de DNAzimas Modificadas

3-1 Objetivo

El objetivo de este capítulo es analizar el efecto generado sobre la actividad catalítica y la estabilidad biológica de la DNAzima

La relación de las constantes k_2/k_{-2} es aproximadamente 450, por lo tanto, hay una gran preferencia de la reacción de hidrólisis frente a la de ligación. Esto es lógico desde el punto de vista que la DNAsima

completo de hidrólisis todavía no son conocidos quedando numerosos interrogantes por responder⁵.

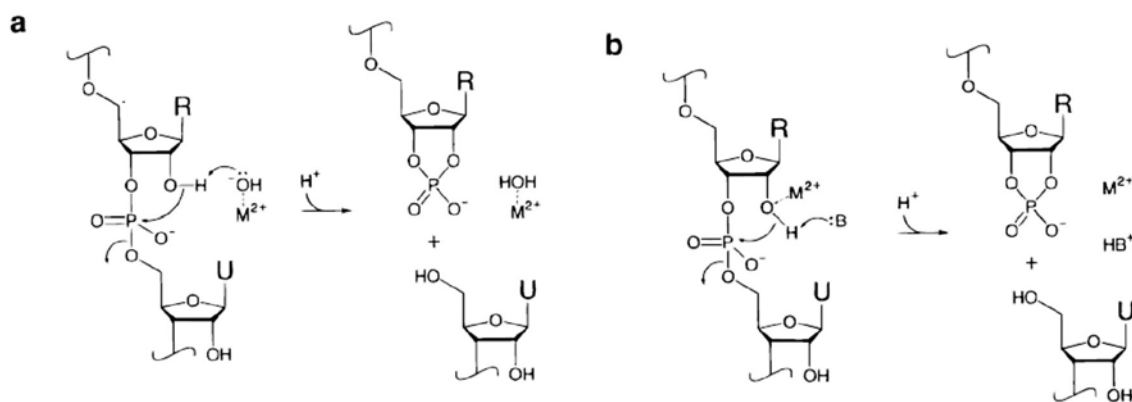


Figura 3-2: Hipótesis del mecanismo de hidrólisis del ARN catalizada por la DNAsima

Para la reacción de hidrólisis se utiliza el sustrato de ARN marcado radiativamente en el extremo 5' con ^{32}P y condiciones de exceso de la DNazima. Se extraen alícuotas de la reacción a distintos tiempos, los productos de hidrólisis se separan en un gel de poliacrilamida desnaturizante, las bandas se detectan y se cuantifica la marca radiactiva. A modo de ejemplo, la Figura 3-3 muestra un gel típico de una cinética de hidrólisis de ARN. Los valores obtenidos luego de tres ensayos independientes se ajustan a una curva de cinética de segundo orden $\mathbf{P = P * (1}$

Para la DNAzima

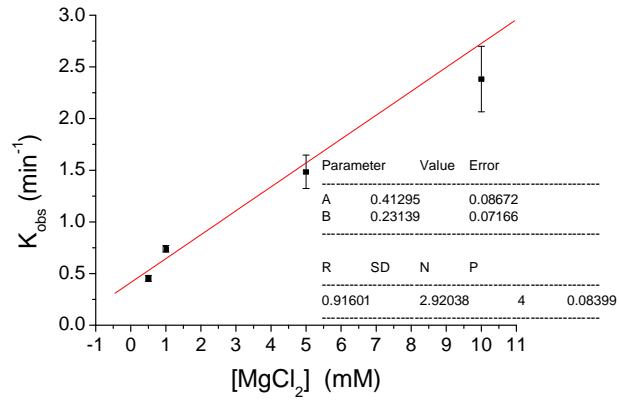
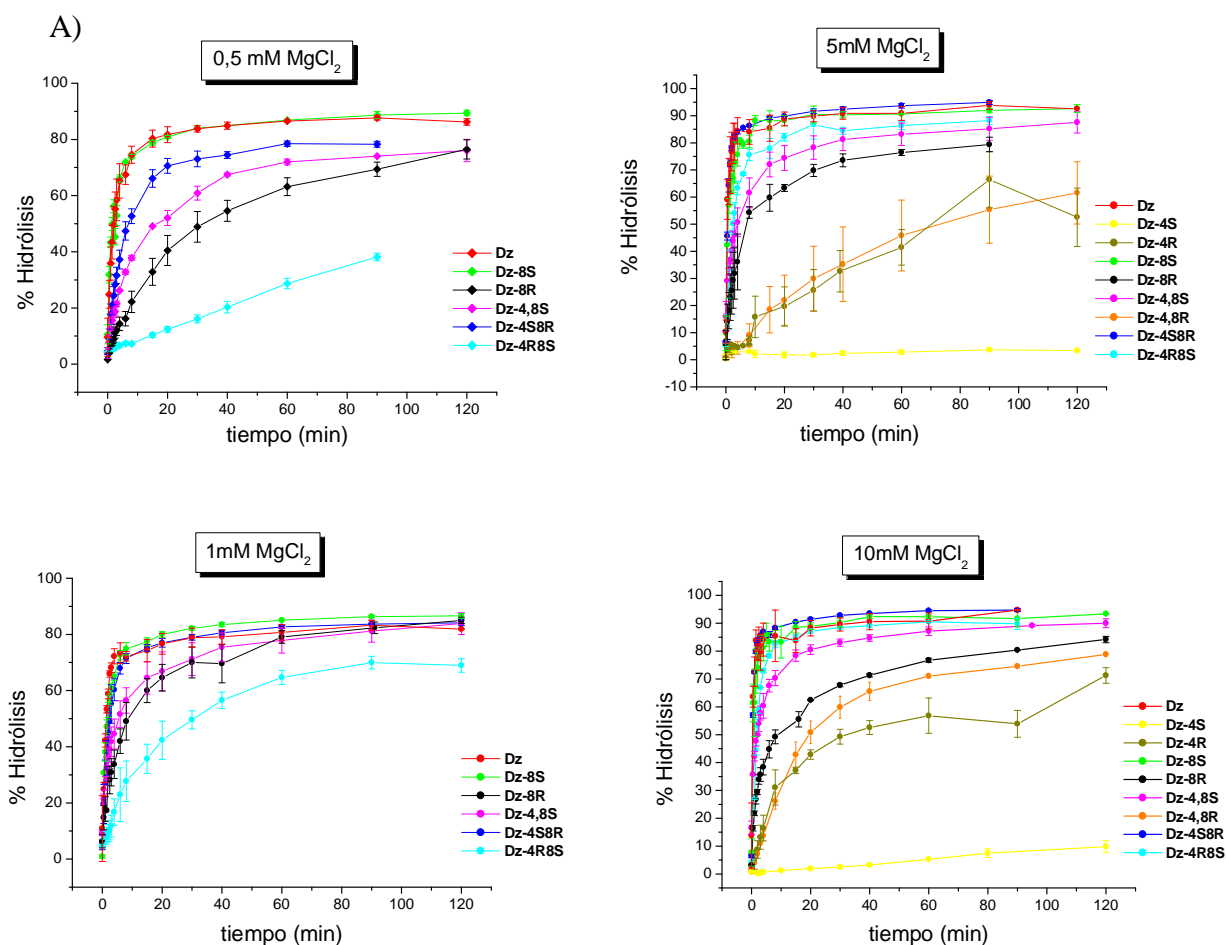


Figura 3-4: A) Cinética de hidrólisis de la DNazima

Estas dos posiciones fueron estudiadas previamente en el contexto de mutaciones puntuales con otros nucleótidos naturales⁷, con 2

De este análisis se desprende que las DNAzimas mutadas con 2'-desoxiuridina en las posiciones T4 y/o T8 no presentan cambios sustanciales en sus cinéticas de hidrólisis respecto a la DNAzima



B)

[MgCl ₂] (mM)	K _{obs} (min ⁻¹)									
	Dz	Dz-4S	Dz-4R	Dz-8S	Dz-8R	Dz-4,8S	Dz-4,8R	Dz-4S8R	Dz-4R8S	
0.5	0.45 ± 0.03	NM	NM	0.50 ± 0.05	0.041 ± 0.003	0.101 ± 0.008	ND	0.18 ± 0.01	0.017 ± 0.004	
1	0.74 ± 0.03	ND	ND	0.52 ± 0.03	0.15 ± 0.02	0.29 ± 0.03	ND	0.40 ± 0.02	0.06 ± 0.01	
5	1.5 ± 0.2	ND	0.021 ± 0.003	0.84 ± 0.06	0.20 ± 0.02	0.34 ± 0.04	0.021 ± 0.004	1.22 ± 0.06	0.35 ± 0.01	
10	2.4 ± 0.3	ND	0.071 ± 0.008	1.4 ± 0.1	0.21 ± 0.02	0.50 ± 0.05	0.051 ± 0.002	1.75 ± 0.09	0.44 ± 0.01	

NM: no medido ND: no detectado

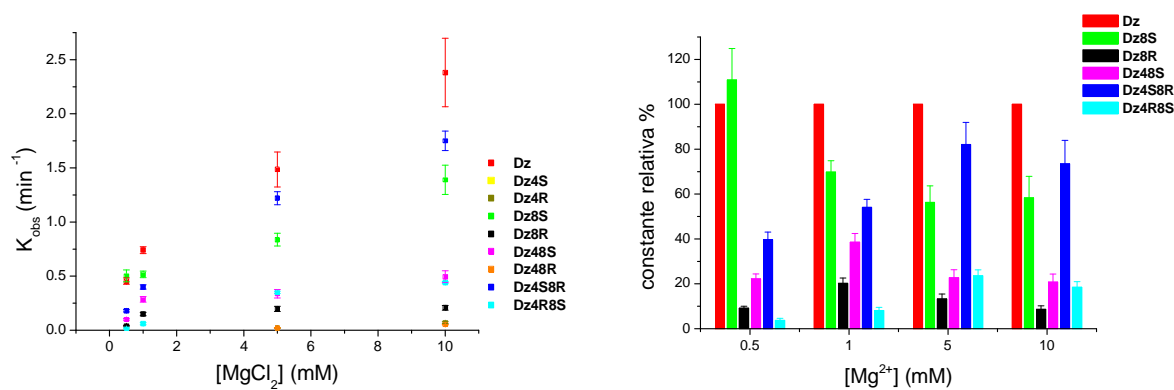
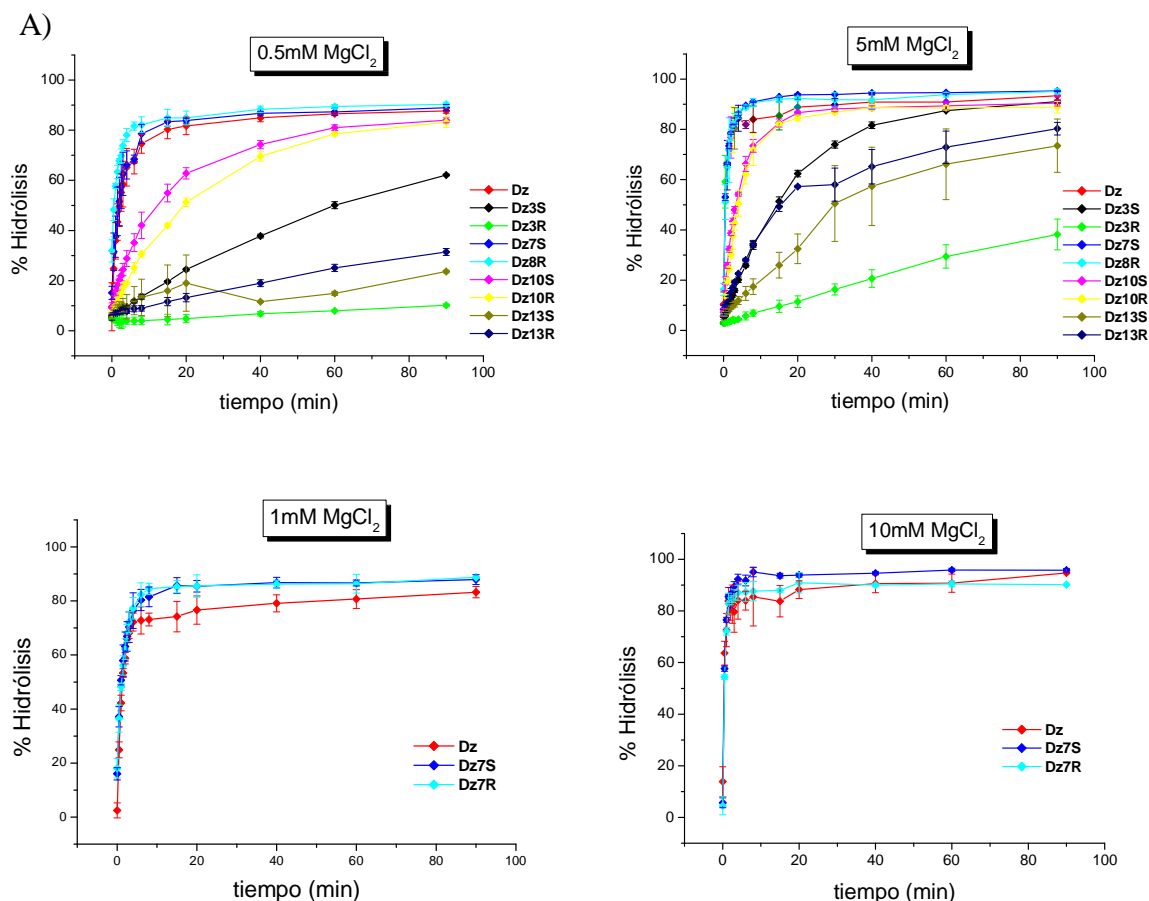


Figura 3-6: Estudio cinético de DNazimas modificadas un las posiciones T4 y T8 con 2´desoxi-2´C-metiluridina. A) Cinética de hidrólisis a 0.5; 1; 5 y 10mM MgCl₂. B) Valores de K_{obs} y su dependencia con la concentración de Mg²⁺.

Si bien no conocemos detalladamente las interacciones establecidas dentro del núcleo catalítico y es muy difícil justificar estas observaciones, es importante destacar que el efecto observado es dependiente de la configuración del carbono 2' para el caso de la posición T8 pero no para el caso de la posición T4. Por otra parte, algunas configuraciones perturban la dependencia del núcleo catalítico con Mg^{2+} , mientras otras parecen no alterar esta interacción. Por último, es interesante observar que si bien ciertas modificaciones tienen un efecto dramático sobre la actividad, este hecho puede revertirse al introducir una nueva mutación, demostrando así que los efectos de las modificaciones pueden compensarse.

3-2.3 DNAzimas modificadas con (2'S) o (2'R)-2'-desoxi-2'-C-metilcitidina

El núcleo catalítico de la DNAzima



B)

[MgCl ₂] (mM)	K _{obs} (min ⁻¹)									
	Dz	Dz-3S	Dz-3R	Dz-7S	Dz-7R	Dz-10S	Dz-13R	Dz-13S	Dz-13R	
0.5	0.45 ± 0.03	0.024 ± 0.003	ND	0.51 ± 0.04	0.76 ± 0.04	0.11 ± 0.01	0.058 ± 0.004	ND	ND	
1	0.74 ± 0.03	NM	NM	0.69 ± 0.09	0.8 ± 0.1	NM	NM	NM	NM	
5	1.5 ± 0.2	0.059 ± 0.001	0.014 ± 0.003	1.38 ± 0.09	1.25 ± 0.09	0.27 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.033 ± 0.005	0.08 ± 0.01	
10	2.4 ± 0.3	NM	NM	1.8 ± 0.2	1.80 ± 0.09	NM	NM	NM	NM	

NM: no medido ND: no detectado

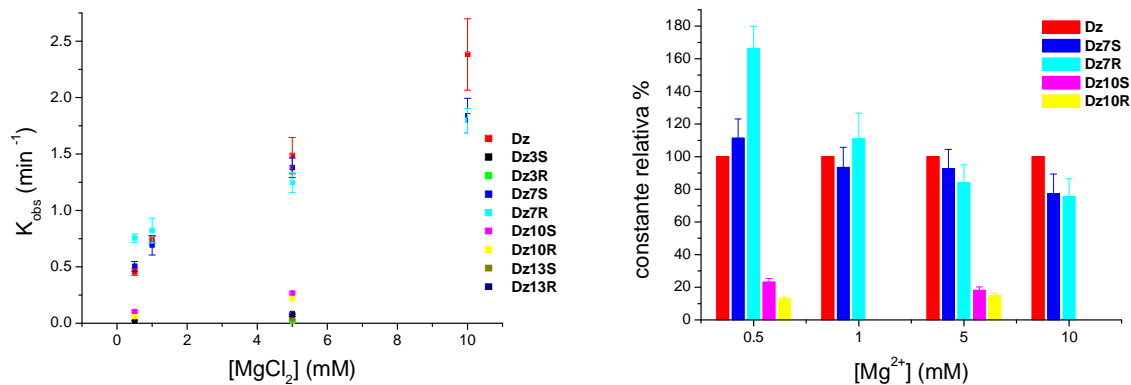


Figura 3-7: Estudio cinético de DNazimas modificadas en las posiciones C3, C7, C10 o C13 con 2'-desoxi-2'-C-metilcitidina. A) Cinética de hidrólisis a 0.5; 1; 5 y 10mM MgCl₂. B) Valores de K_{obs} y su dependencia con la concentración de Mg²⁺.

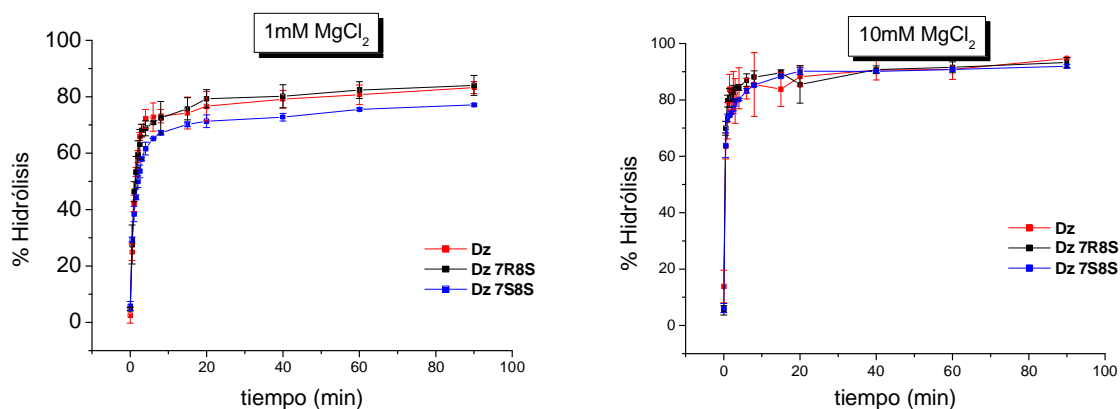
Para las posiciones C3, C10 y C13, cualquier modificación incorporada se traduce en un descenso importante de la actividad tanto a 0,5mM de Mg^{2+} como al aumentar la concentración diez veces. Pero en el caso de la posición C7, ninguna de las modificaciones introducidas afectan a la actividad de la DNAzima, es decir no discrimina entre la configuración R o S del carbono 2' del nucleótido incorporado. Al igual que con Dz-8S, podría mencionarse una leve influencia con la concentración de magnesio. Es decir, al aumentarla hay una mayor diferencia de actividad respecto a la DNAzima sin modificaciones. Incluso, a concentraciones bajas de Mg^{2+} las DNAzimas mutadas en C7 con ambos diastereómeros presentan un incremento de la actividad catalítica respecto a Dz. Si bien para el caso de las DNAzimas modificadas en las posiciones T se observó que ciertas mutaciones puntuales inactivan el núcleo pero al agregar otra mutación la actividad aumenta, para el caso de las DNAzimas mutadas en posiciones C, no se realizaron dobles mutaciones debido a la cantidad de alternativas posibles. Se decidió continuar directamente con dobles y triples mutaciones en las posiciones del núcleo catalítico que contienen timina y citosina.

3-2.4 DNAzimas modificadas con (2'S) o (2'R)-2'-desoxi-2'-C-metilcitidina y (2'S) y/o (2'R)-2'-desoxi-2'-C-metiluridina

3-2.4.1 Doble mutación

Tomando como base los estudios previos de modificaciones puntuales que no causan una gran disminución de la actividad de la DNAzima

A)



B)

[MgCl ₂] mM	K _{obs} (min ⁻¹)		
	Dz	Dz-7S8S	Dz-7R8S
1	0.74 ± 0.03	0.66 ± 0.04	0.77 ± 0.05
10	2.4 ± 0.3	2.4 ± 0.2	3.0 ± 0.3

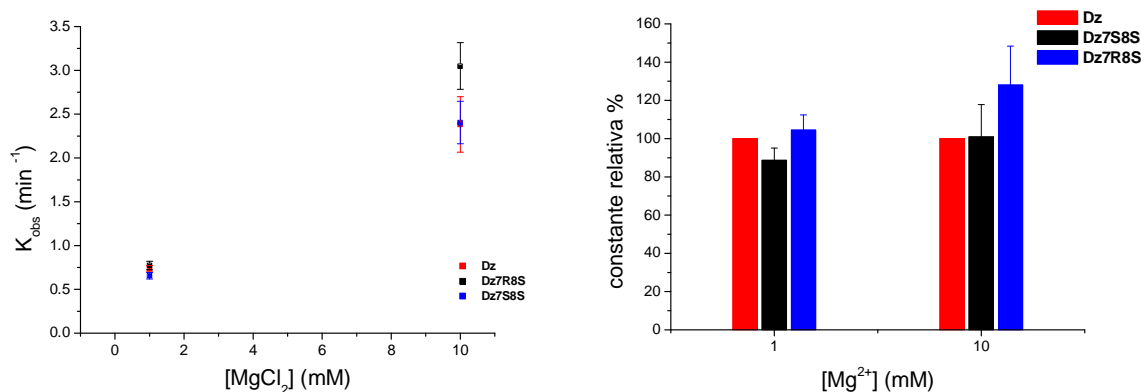


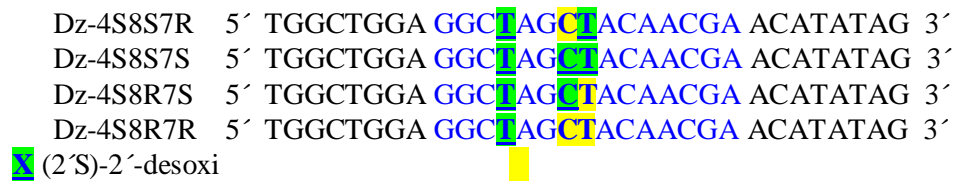
Figura 3-8: Estudio cinético de DNAzimas modificadas en las posiciones C7 y T8 con 2'-desoxi-2'-C-metilnucleótidos. A) Cinética de hidrólisis a 1y 10mM MgCl₂. B) Valores de K_{obs} y su dependencia con la concentración de Mg²⁺.

Para ambos casos no se observa un descenso de la actividad a causa de la modificación. Estos resultados concuerdan con publicaciones previas donde estas dos posiciones mostraron una gran tolerancia a los cambios, incluso a las eliminaciones puntuales.

3-2.4.2 Triple mutación

Por último, se sintetizaron DNAzimas con mutaciones en las posiciones T4, C7 y T8 del núcleo catalítico. Los experimentos previos con dobles mutaciones en T4 y T8 indican que las DNAzimas con menor descenso de la actividad son Dz-4S8R y Dz-4,8S y que la

posición C7 puede ser reemplazada por cualquiera de las configuraciones sin perder su capacidad de hidrólisis. En base a estos resultados, se diseñaron las siguientes DNazimas:



Si bien para todos los casos se observa un descenso de la actividad catalítica, este efecto no es tan marcado como en los casos de inactividad por mutaciones puntuales. Por otro lado, el efecto sobre la actividad parecería ser constante al aumentar la concentración del metal. Las Dz-4S8S7R y la Dz-4S8R7S no presentan una variación muy importante. Sobre todo a 1mM ambas DNAzimas retienen un 80% de la actividad. Esto las transforma en una buena alternativa para su uso en sistemas biológicos, ya que el aumento del número de modificaciones está directamente relacionado con el aumento de su estabilidad nucleolítica.

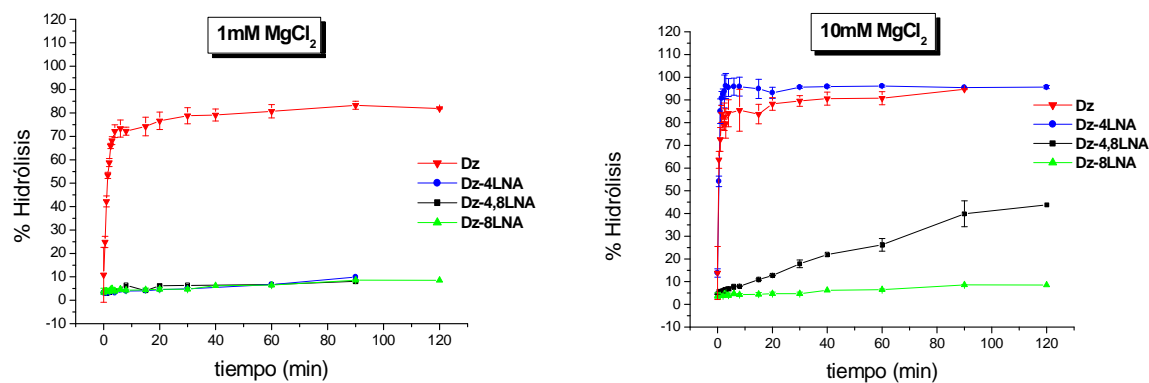
3-2.5 DNAzimas modificadas con otros nucleótidos modificados

Al evaluar el comportamiento de las DNAzimas modificadas con 2

3-2.5.1 2

constante y no presenta un aumento lineal acorde a lo esperado. Para el caso de Dz-4,8m el efecto es similar al observado para Dz-4m, por lo que no parece haber un efecto cooperativo tal como se observó para DNAzimas con dobles mutaciones 2

Comparando estos resultados con los obtenidos para las DNazimas mutadas con 2

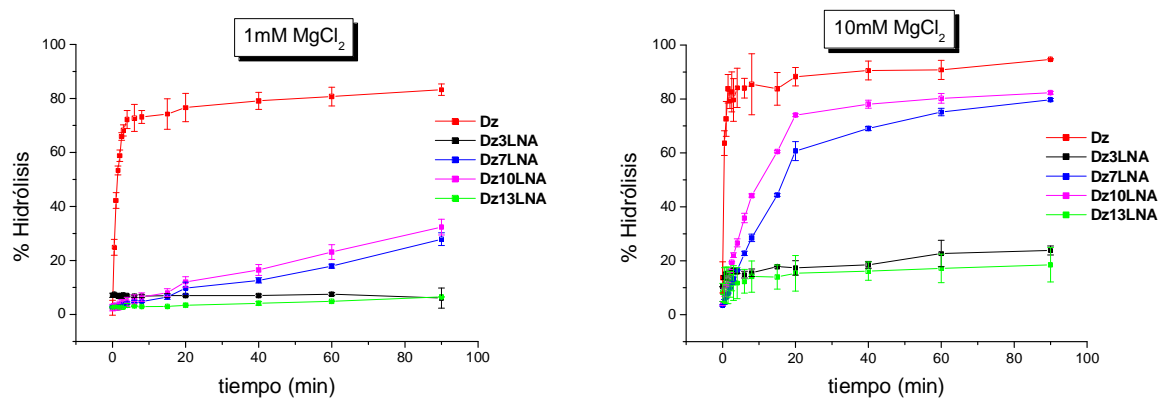


[MgCl ₂] (mM)	K _{obs} (min ⁻¹)			
	Dz	Dz-4LNA	Dz-8LNA	Dz-4,8LNA
1	0.74 ± 0.03	ND	ND	ND
10	2.4 ± 0.3	1.9 ± 0.1	ND	ND

ND: no detectado

Figura 3-13: Estudio cinético de DNAzimas modificadas con LNA-T.

Los resultados para Dz-8LNA y Dz-4,8LNA muestran una intolerancia a la mutación que, probablemente, sea debida a la rigidez del anillo furanósido. Lo mismo ocurre con la Dz-4LNA a bajas concentraciones de Mg²⁺ pero extrañamente, al aumentarla a 10mM, la actividad asciende a niveles comparables a los de la DNAzima



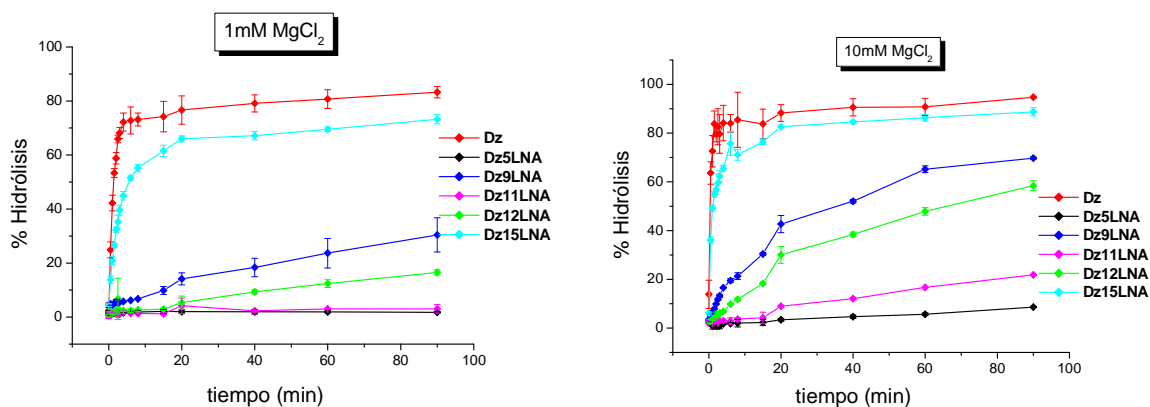
[MgCl ₂] (mM)	K _{obs} (min ⁻¹)				
	Dz	Dz-3LNA	Dz-7LNA	Dz-10LNA	Dz-13LNA
1	0.74 ± 0.03	ND	ND	ND	ND
10	2.4 ± 0.3	ND	0.056 ± 0.002	0.103 ± 0.005	ND

ND: no detectado

Figura 3-14: Estudio cinético de DNAzimas modificadas con LNA-C.

En este caso, también se observa un descenso de la actividad catalítica para todos los casos analizados. Tanto la Dz-3LNA como Dz-13LNA son completamente inactivas. La Dz-7LNA y la Dz-10LNA muestran un comportamiento similar, presentan un descenso importante de la actividad pero conservan la dependencia esperada al aumentar la concentración de Mg²⁺. A diferencia de Dz-7LNA, la Dz-7S tiene una actividad comparable a la DNAzima

La Figura 3-15 muestra los resultados cinéticos de las DNAzimas mutadas con LNA-adenosina.



[MgCl ₂] (mM)	K _{obs} (min ⁻¹)					
	Dz	Dz-5LNA	Dz-9LNA	Dz-11LNA	Dz-12LNA	Dz-15LNA
1	0.74 ± 0.03	ND	ND	ND	ND	0.3 0.01
10	2.4 ± 0.3	ND	0.049 0.006	ND	ND	0.73 0.06

Figura 3-15: Estudio cinético de DNAzimas modificadas con LNA-A.

Para las DNAzimas 5, 9, 11 y 12LNA se observa un gran descenso de la actividad. La Dz-15LNA, si bien tiene una actividad bastante menor a la de la DNAzima

actividad pero la disminuye en gran medida cuando se modifica con el 2'R. Por otra parte la posición C7 no distingue entre S o R, conservando para ambos casos una actividad comparables a la DNAsima

3-3.1 DNAzimas modificadas con (2'S) y/o (2'R)-2'-desoxi-2'-C-metiluridina

4-3.1.1 Estabilidad frente a DNAsa RQ1 y a lisado celular MCF-7

En primer lugar, se analizaron las DNAzimas modificadas con 2'-desoxi-2'-C-metiluridina en las posiciones T4 y/o T8. Se compararon sus estabildades frente a la DNAsa comercial RQ1 y ante un lisado de células MCF-7 de cáncer de mama. La Figura 3-17 muestra las cinéticas de degradación obtenidas.

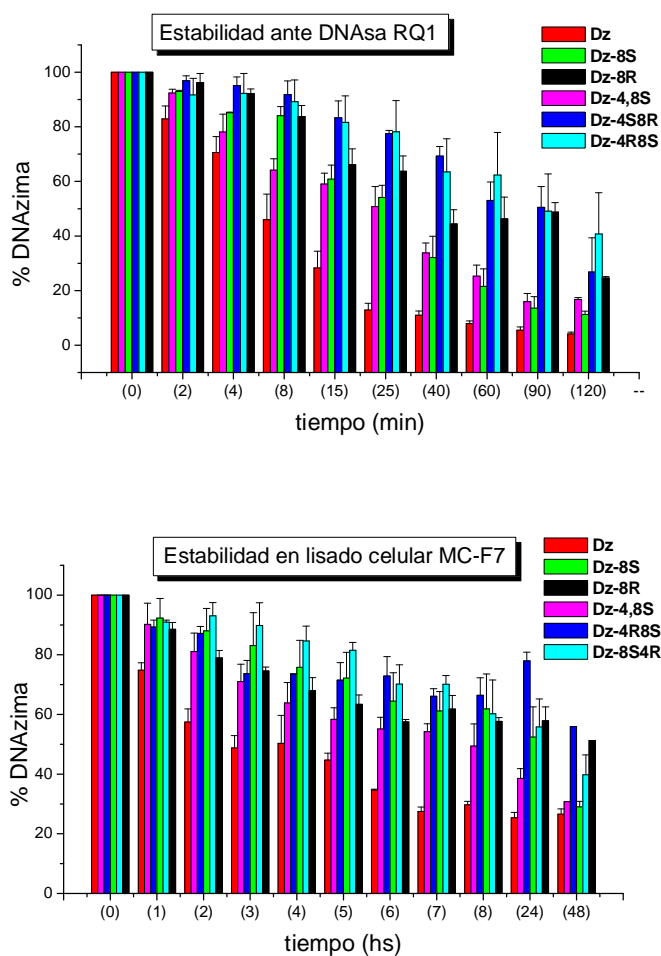


Figura 3-17: Estabilidad de DNAzimas modificadas frente a A) DNAsa RQ1 y B) Lisado de células MCF-7.

En ambos casos puede observarse un aumento de la estabilidad a lo largo del tiempo de las DNAzimas modificadas frente a la DNAsa

puede ser una estrategia interesante para proteger a las DNAzimas del ataque de endonucleasas.

Luego, se realizó una comparación entre la actividad a 1mM de Mg^{2+} y la estabilidad ante la nucleasa RQ1 a un tiempo fijo de 15min. Si bien, al modificar las DNAzimas la actividad puede verse afectada negativamente, su estabilidad aumenta a lo largo del tiempo. En la Figura 3-18 puede observarse que la relación actividad/resistencia está favorecida para las DNAzimas modificadas y a medida que aumenta el número de modificaciones la relación se incrementa.

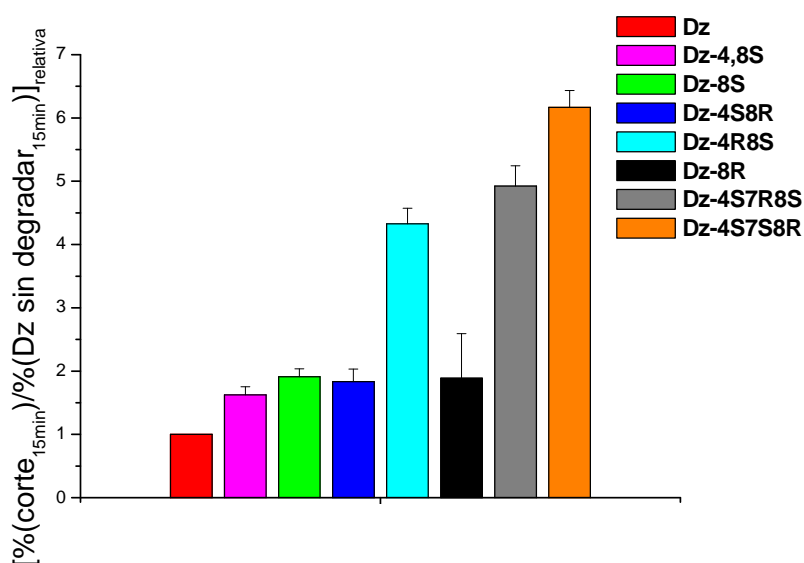


Figura 3-18: Relación actividad/resistencia relativa de DNAzimas modificadas.

Estos resultados permitieron elegir las DNAzimas con mejor relación actividad/resistencia para luego dirigirlas contra distintos ARNm blanco (Capítulo 4). Para el caso de ARNm del receptor de estrógeno α se utilizaron DNAzimas modificadas en dos posiciones (Dz-8S y Dz-4R8S). Esto se debe a que al momento de realizar los ensayos de inhibición de la expresión del RE- α todavía no se contaba con los resultados de actividad y estabilidad de las DNAzimas triplemente mutadas. Posteriormente, para hidrolizar los ARNm de STAT3 y del virus de hepatitis C se utilizaron las DNAzimas triplemente mutadas (Dz-4S7R8S y Dz-4S7S8R).

3-3.2 DNAsimas modificadas con (2'S) y/o (2'R)-2'-desoxi-2'-C-metilnucleótidos y 2'O-metilnucleótidos

3-3.2.1 Estabilidad ante DNAsas comerciales y DMEM/10%SFB

En esta etapa se evaluaron las DNAsimas que contienen tres modificaciones 2'-desoxi-2'-C-metilnucleótido en el núcleo catalítico y cuya actividad es comparable a la DNAsima sin modificar, (Figura 3-9, Dz-4S7R8S y Dz-4S7S8R). Para protegerlas frente a la degradación por exonucleasas, se modificaron cada uno de los extremo de los brazos de reconocimiento con dos fosforotioatos. Por otro lado, se diseñó un conjunto de DNAsimas que, a parte de tener las mismas modificaciones 2'-desoxi-2'-C-metilnucleótido que las anteriores, incluyen cuatro mutaciones en el núcleo catalítico con 2

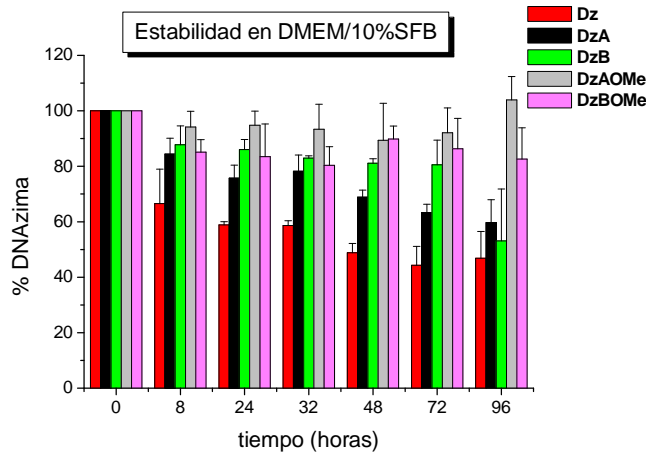


Figura 3-19: Cinética de degradación de las DNazimas modificadas en DMEM/10%SFB

Para el caso de las DNazimas tratadas con nucleasas comerciales, también se observa mayor estabilidad cuando están presentes las modificaciones. La Figura 3-20 presenta los resultados de degradaciones utilizando las DNAsas RQ1 y Mung Bean.

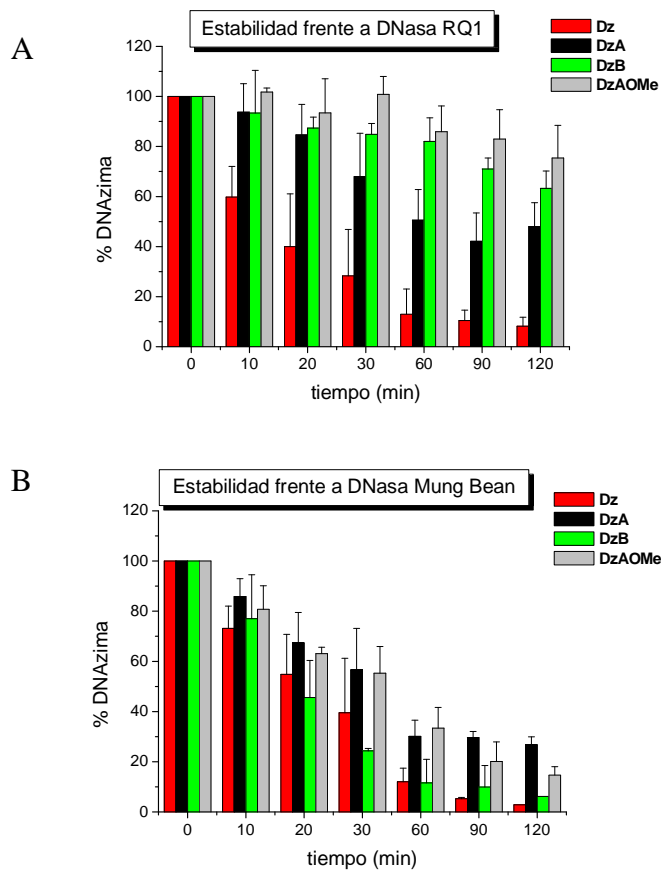


Figura 3-20: Cinética de degradación de las DNazimas modificadas en A) RQ1 DNasa B) Mung Bean DNasa.

Con estos resultados es evidente que las modificaciones utilizadas proporcionan un aumento de la estabilidad biológica de la DNAzima

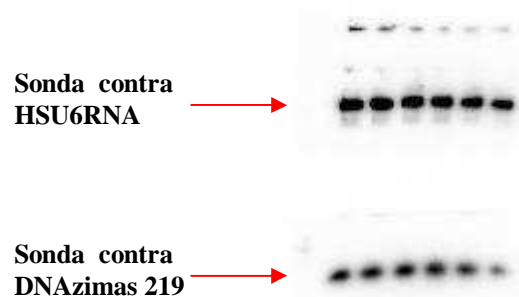


Figura 3-21: Southern blot sonda DNazimas 219 y sonda HSU6RNA.

Ensayos previos:

Antes de realizar el ensayo de transfección, extracción y cuantificación, se llevaron a cabo varias actividades para poner a punto la técnica y validarla:

1. Para determinar aproximadamente el límite de detección se realizó una curva de concentraciones decrecientes de DNazimas desde 4.5ug a 0.1ug (Figura 3-22). Si bien la detección es dependiente de la concentración de la sonda, de su marca radiactiva y de la eficiencia de transferencia del gel a la membrana, este ensayo nos permitió tener una idea aproximada de las concentraciones que se pueden detectar.

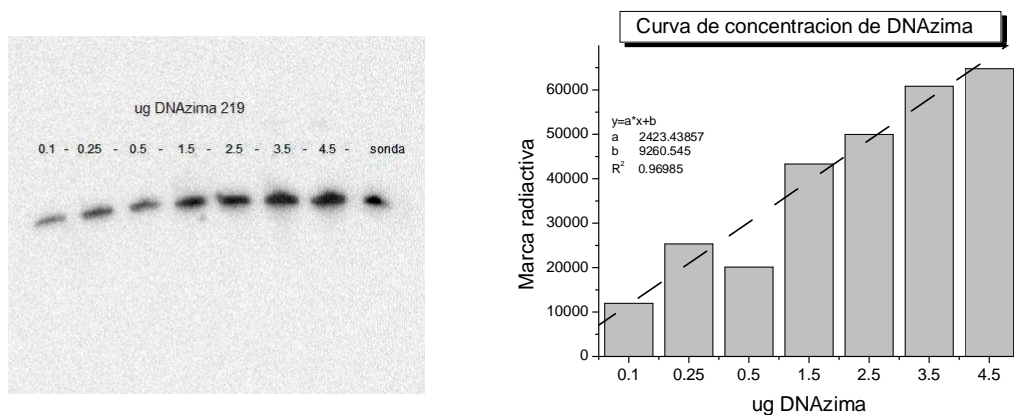


Figura 3-22: Southern blot - curva de concentración de la DNazima 219. Calles gel: de izquierda a derecha, 0,1; 0,25; 0,5; 1,5; 2,5; 3,5; 4,5 g de Dz-219, sonda

2. Dado que las DNAzimas ensayadas tienen varias modificaciones químicas que podían llegar a interferir en la hibridación de la sonda radiactiva y conducir a resultados erróneos, se realizó el southern blot utilizando la misma cantidad para cada DNAzima. Luego se cuantificó la marca radiactiva (Figura 3-23). El ensayo se realizó con 2ug y 0.5ug de DNAzima para descartar alguna dependencia con la concentración.

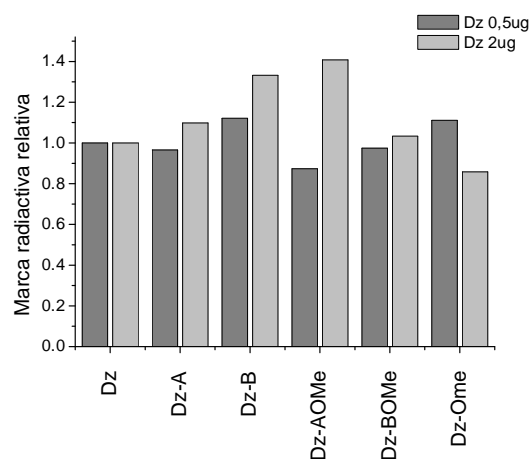


Figura 3-23: Southern blot para A) 0,5ug de DNAzimas y B) 2ug de DNAzimas. Calles 1) Dz-219, 2) Dz-219A 3) Dz-219B 4) Dz-219AOMe 5) Dz-219BOMe 6) Dz-219OMe. C) Cuantificación.

Tanto en el southern blot con 2ug como con 0.5ug no se observan diferencias significativas entre la DNAzima

Figura 3-24: Southern blot de la DNAzima remanente luego de 18h. de transfección y su cuantificación.
Sembrado: Producto de la extracción de RNA total y DNAzima de 1) 1 pocillo, 2) 2 pocillos, 3) 3 pocillos, 4) 4 pocillos.

El resultado obtenido para un solo pocillo es inesperado, dado que no se observa nada de marca, lo cual podría deberse a un error. Teniendo en cuenta la marca obtenida para dos pocillos sería de espera que con un solo pocillo se observara DNAzima. Igualmente, se decidió seguir adelante utilizando el producto de extracción de dos pocillos por punto.

Conociendo esta información, se llevó a cabo el ensayo de estabilidad transfectando 4.5ug de DNAzima y recogiendo a 18, 24 y 48 horas la DNAzima y el ARN total de dos pocillos. Los ensayos se realizaron por duplicado. La Figura 3-25 muestra la cantidad de DNAzimas remanente luego de 18, 24 y 48hs de la transfección.

Al analizar los resultados puede observarse una menor estabilidad de la DNAzimas

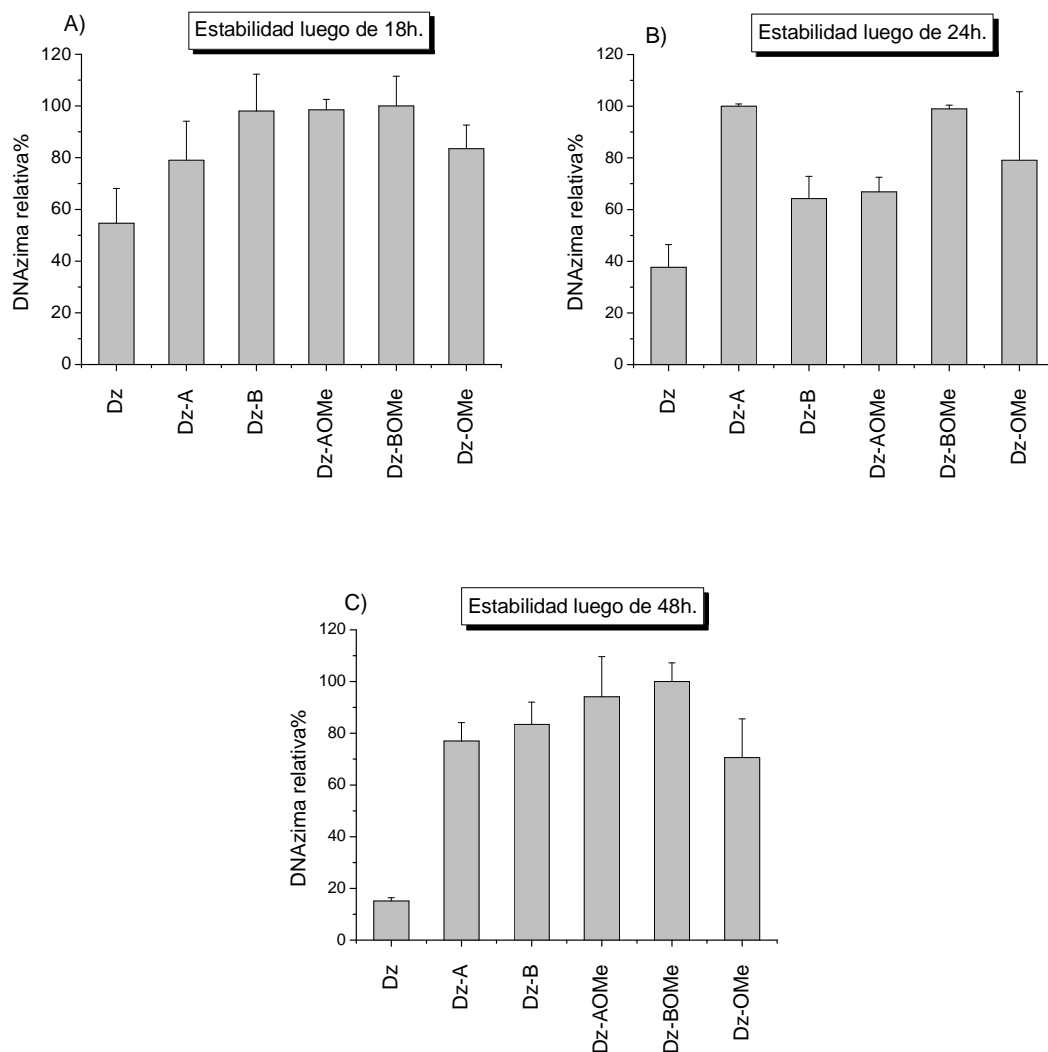


Figura 3-25: Estabilidad de las DNAzimas en cultivos celulares Huh-7. Cantidad de DNAzima relativa al ARN HSU6RNA luego de A) 18 horas, B) 24 horas y C) 48 horas

3-3.3 Conclusión

En esta etapa, se estudió la resistencia de DNAzimas modificadas con 2'-desoxi-2'-C-metilnucleótidos frente a distintos sistemas biológicos. En todos los casos se observa un aumento de la estabilidad nucleolítica respecto a la DNAzima

Capítulo 4

Estudio de Actividad en Sistemas Biológicos de DNAzimas Modificadas

4-1 Objetivo

El objetivo de este capítulo es evaluar y comparar la actividad de la DNazima

tumores desarrollan resistencia al tratamiento hormonal y no responden a este tipo de terapia². Estudios previos, han demostrado que la disminución de los niveles de RE- α en células tumorales de cáncer de mama conduce a apoptosis y disminución de la proliferación celular. Por lo tanto, el RE- α es un blanco de interés clínico y su inhibición representa un desafío interesante sobre todo para el tratamiento de tumores resistentes a la terapia hormonal³.

En esta etapa, se detallan las actividades realizadas con el objeto de inhibir la expresión del receptor de estrógeno α en células tumorales de cáncer de mama MCF-7 utilizando DNAzimas

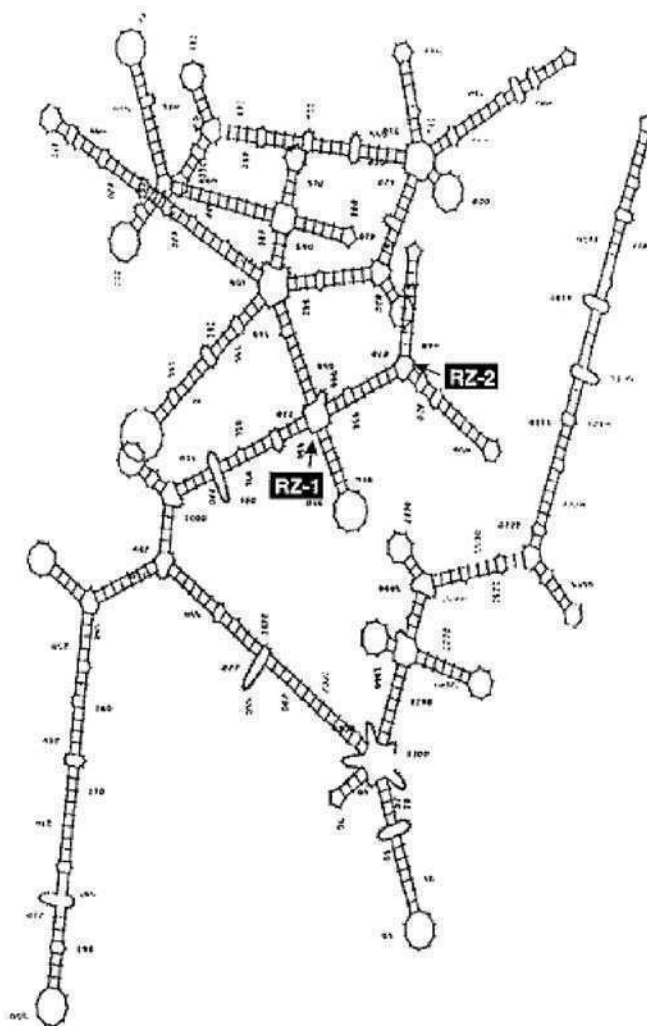


Figura 4-1: ARNm del Receptor de Estrógeno α humano. En rojo, las tres zonas de corte de las DNazimas utilizadas.

Las tres DNazimas

Dz-1 (+956) 5' TGGCTGGA GGCTAGCTACAACGA ACATATAG 3'
Dz-2 (+889) 5' GGACCAGA GGCTAGCTACAACGA TCCATAAT 3'
Dz-3 (+293) 5' CATGGTCA GGCTAGCTACAACGA GGTC CGTG 3'
SCR 5' AGTACGATCACGACTAGACGATCAGAGCATG 3'
Dz-2M 5' GGACCAGA GGCTAGCTACAACCA TCCATAAT 3'
Dz-2-8S 5' GGACCAGA GGCTAGCTACAACGA TCCATAAT 3'
Dz-2-4S8R 5' GGACCAGA GGCTAGCTACAACGA TCCATAAT 3'

 (2'S)-2'-desoxi-2'-C-metiluridina  (2'R)-2'-desoxi-2'-C-metiluridina.

4-2.2 Ensayos de inhibición en células MCF-7

Antes de utilizar las DNazimas modificadas con 2

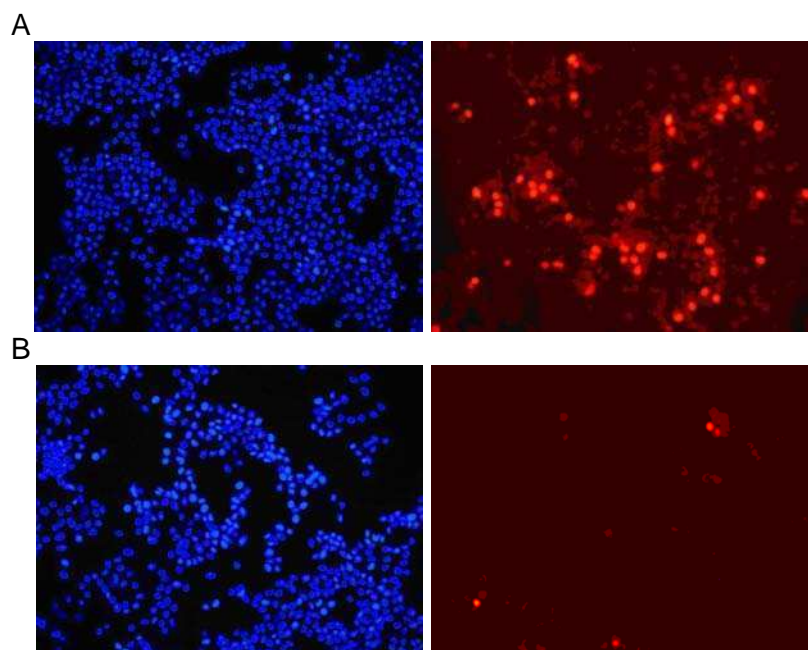


Figura 4-2 :A) tratamiento con secuencia scramble en concentraciones tóxicas tinción con DAPI (izquierda) y bromuro de etidio (derecha) B) tratamiento control.

Para corroborar la correcta transfección de las DNAzimas, se realizaron ensayos a diferentes tiempos de transfección utilizando una DNAzimas marcada con fluoresceína en el extremo 5'. Se mantuvieron las células en contacto con el medio y el complejo de transfección por un período de 2, 4 o 6 horas. Se utilizó un microscopio de fluorescencia para determinar la ubicación y tener una idea cualitativa de la cantidad de DNAzima transfectada. Luego de analizar cada tiempo se determinó que el tiempo óptimo de transfección era 4 horas. En la Figura 4-3 puede verse que luego de 4hs de transfección las DNAzimas se encuentran en el citoplasma celular.

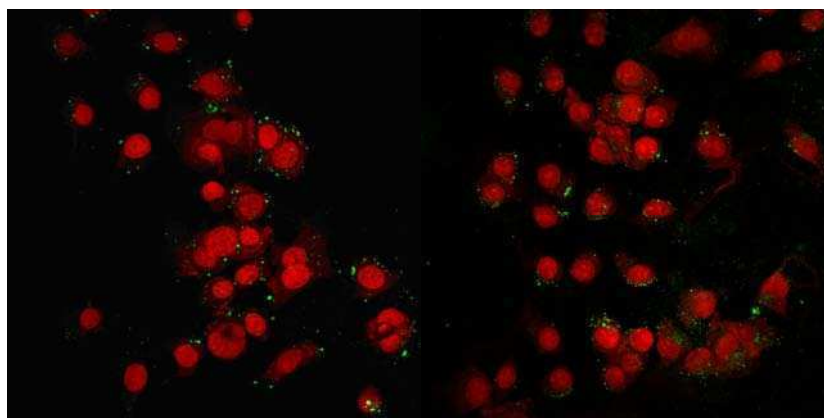


Figura 4-3: Microscopía confocal de las células MCF-7 transfectadas con un oligonucleótido marcado con fluoresceína (4 horas).

Luego, se realizó la transfección y el ensayo de inhibición con las tres DNAsimas

Por último, se sintetizaron las DNAzimas modificadas con 2'-desoxi-2'-C-metilnucleótidos contra la zona 2. La Figura 4-5 muestra el resultado de un western blot donde se puede observar una disminución del nivel de esta proteína respecto al control (células sin tratamiento) para la Dz.2 y las DNAzimas modificadas Dz-8S y Dz-4S8R. Nuevamente puede observarse una inhibición de la expresión del RE-a debido al efecto antisentido de los brazos de reconocimiento de la la Dz-2M.

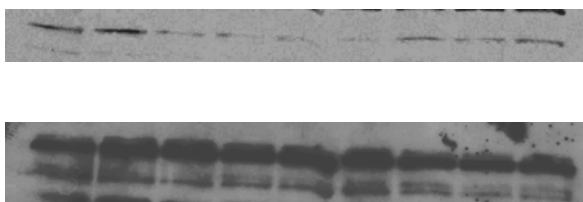


Figura 4-5: Western blot de células tratadas con DNAzimas modificadas con 2'-desoxi-2'-C-metilnucleótidos (Ctrol: células sin tratamiento, Tam: células tratadas con tamoxifeno)

4-2.3 Conclusión

En primer lugar, fue posible comparar la actividad catalítica de tres DNAzimas

4-3 Inhibición de STAT-3

La familia de proteínas transductoras de señales y activadoras de transcripción (STAT) cumplen un rol importante en la transmisión de señales citoplasmáticas relacionadas con factores de crecimiento y citoquinas, los cuales tienen receptores asociados mayormente con actividad tirosín-quinasa. Una vez activadas por fosforilación, las proteínas STAT tienen la función de regular la transcripción de numerosos genes con respuestas celulares de proliferación, apoptosis, angiogénesis, respuestas inmunes y diferenciación. Por lo tanto, la sobreexpresión de estas proteínas se traduce en procesos irregulares del tipo anti-apoptóticos y proliferativo, que están generalmente asociados al desarrollo de tumores⁶. La Tabla 4-1 muestra las proteínas STAT que se encuentran sobreexpresadas en distintos cánceres humanos.

Cáncer	Sobreexpresión
Mama	STAT1, STAT3, STAT5
Cabeza y Cuello	STAT1, STAT3, STAT5
Melanoma	STAT 3
Pulmón	STAT 3
Páncreas	STAT 3
Próstata	STAT 3
Ovario	STAT3
Leucemias	STAT1, STAT3, STAT5
Linfomas	STAT3
Mieloma	STAT1, STAT3

Tabla 4-1: Ejemplos de cánceres humanos donde se encuentra sobreexpresada alguna proteína de la familia STAT

Una de las proteínas más estudiadas de esta familia es STAT3, que ha sido reportada como necesaria para el crecimiento y la vida de numerosos tumores malignos humanos. También es sabido que el bloqueo de la activación o la expresión de STAT3 inhiben el crecimiento in vivo de diversos tumores⁷. Por lo tanto, esta proteína representa un blanco terapéutico interesante cuando el tumor desarrolla resistencia a la terapia hormonal. Una alternativa es la terapia de silenciamiento génico, se han realizado estudios en los cuales se logra inhibir la proliferación del tumor silenciando STAT3⁸. En esta línea de trabajo, el

⁶ Yu, Jove. The STATS of Cancer

laboratorio de la Dra. Patricia Elizalde (IBYME-CONICET) cuenta con gran experiencia en la influencia de STAT3 en el desarrollo tumoral⁹. Esta etapa incluye los resultados obtenidos por su grupo al intentar inhibir la expresión de STAT3 en células tumorales de cáncer de próstata utilizando las DNAzimas modificadas con 2'-desoxi-2'-C-metilnucleótidos sintetizadas en nuestro laboratorio.

4-3.1 DNAzimas utilizadas

Se eligieron tres posiciones de hidrólisis para dirigir las DNAzimas destinadas a inhibir la expresión de STAT3. Estas zonas fueron utilizadas con éxito como blanco de RNAi en la inhibición del ARNm de STAT3. La Dz-3 (zona 3: +445 ratón, +408 humanos), Dz-1A (zona1A: +1336 ratón) y Dz-1B (zona 1B: +1341, ratón). Como se explicó para el blanco ARNm del ER- α , en este caso también se utilizaron dos controles, SCR, y las DNAzimas con el núcleo catalítico inactivo debido a una mutación en la posición 14 (Dz-xx-M).

Dz-1a	5' TCAGGAAA GGCTAGCTACAACGA TTGACCAG 3'
Dz-1b	5' AAATTTGA GGCTAGCTACAACGA CAGCAACC 3'
Dz-3	5' ATGAAACA GGCTAGCTACAACGA CAACGTGG 3'
SCR Dz3	5' TGAGACCTGCTAGAGAATAACGAGCACACAG 3'
Dz-1a-A	5' TCAGGAAA GGC LAGC TACAACGA TTGACCAG 3'
Dz-1a-B	5' TCAGGAAA GGCTAG CTACA ACGA TTGACCAG 3'
Dz-1a-BOMe	5' TCAGGAAA GGCTAG CTACA ACGA TTGACCAG 3'
Dz-1a-OMe	5' TCAGGAAA GGCTAGCTACA ACGA TTGACCAG 3'
Dz-1a-M	5' TCAGGAAA GGCTAGCTACAAC CA TTGACCAG 3'
Dz-3-A	5' ATGAAACA GGC LAGC TACAACGA CAACGTGG 3'
Dz-3-B	5' ATGAAACA GGCTAG CTACA ACGA CAACGTGG 3'
Dz-3-BOMe	5' ATGAAACA GGCTAG CTACA ACGA CAACGTGG 3'
Dz-3-OMe	5' ATGAAACA GGCTAGCTACA ACGA CAACGTGG 3'
Dz-3-M	5' ATGAAACA GGCTAGCTACAAC CA CAACGTGG 3'

 (2'S)



4-3.2 Ensayos de inhibición en células C4HD

En primer lugar se pusieron a punto las condiciones de transfección, para ello se utilizó Fugene como agente de transfección y se evaluó el resultado de introducir en las células 4 o 10ug de DNazimas. La Figura 4-6 muestra dos experimentos independientes donde se cuantificó la cantidad de la proteína STAT-3 mediante la técnica de wester blot. Se utilizó el gen de actina para normalizar la carga y como control, células tratadas únicamente con el agente de transfección.

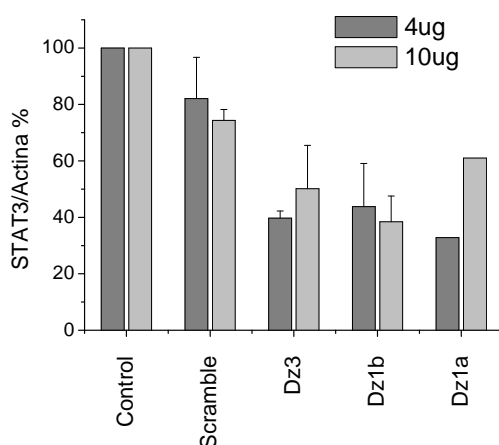


Figura 4-6: Inhibición de STAT3, tratamiento con 4 y 10ug de DNazimas

Dado que el efecto inhibitorio es similar para ambas concentraciones, se decidió seguir adelante utilizando como tratamiento 4ug de DNazimas o scramble.

La etapa siguiente consistió en realizar ensayos de inhibición con el conjunto de DNazimas modificadas para las tres zonas planteadas. Respecto a las DNazimas dirigidas a las zonas 1A y 1B no se observó un porcentaje de inhibición considerable. En cambio, algunas de las DNazimas dirigidas a la zona 3 mostraron una leve disminución en los niveles de STAT3. Luego de tres ensayos independientes se logró observar que las DNazimas Dz-3A, y Dz-3BOMe presentaban una leve inhibición. Dado que la Dz-3M no provocó un descenso de los niveles de STAT3, el efecto observado para Dz-3A y Dz-3BOMe podría considerarse independiente del antisentido. La Figura 4-7 muestra un gráfico de actividad relativa en función del tratamiento para las DNazimas dirigidas a la zona 3.

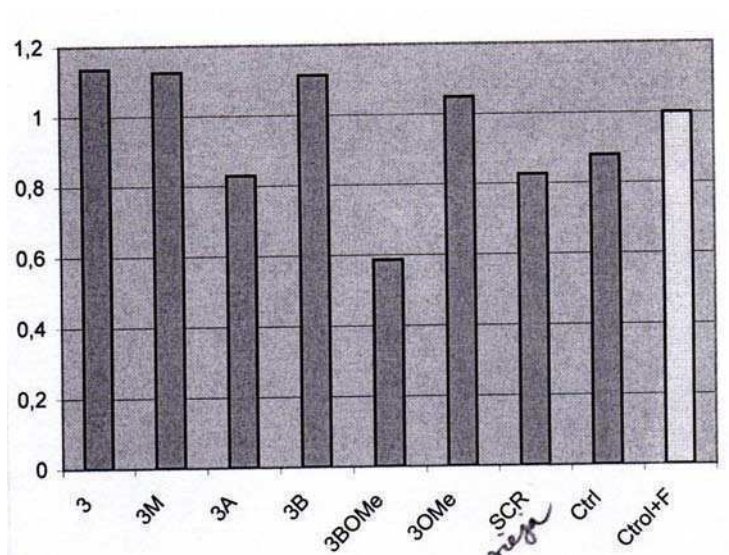


Figura 4-7: Actividad relativa según el tratamiento: Dz-3; Dz-3M; Dz-3A; Dz-3B; Dz-3BOMe; SCR; Ctrl=células sin tratamiento; Ctrl+F=células tratadas con Fugene únicamente.

Luego, se evaluó el efecto que generan las DNazimas modificadas en la proliferación de células tumorales C4HD. Para este estudio, se utilizaron las DNazimas dirigidas a la zona 3 y como inductor de la proliferación el progestágeno sintético acetato de medroxiprogesterona¹⁰ (MPA). El MPA induce la activación transcripcional de STAT3 y favorece la proliferación. Se realizaron dos ensayos por cada tratamiento, en presencia y ausencia de MPA. La Figura 4-8 muestra los resultados de estos ensayos donde puede observarse que la Dz-3A inhibe la proliferación celular. También hay una leve inhibición debida a la Dz-3-OMe. Para el resto de los tratamientos no hay un efecto propio de las DNazimas. Esto también se observa para la Dz-3M por lo que, nuevamente, es posible descartar un efecto inhibitorio antisentido debido al apareamiento de los brazos de reconocimiento con el ARNm blanco. Los controles con células sin tratamiento, células tratadas únicamente con el agente de transfección y células tratadas con la secuencia scramble no presentaron inhibición de la proliferación. Por lo tanto, el efecto observado para la Dz-3A y Dz-3-OMe puede adjudicarse a la actividad catalítica de estas DNazimas. Considerando las mejoras en la estabilidad presentadas en el Capítulo 3, estos resultados son interesantes ya que ambas DNazimas se encuentran modificadas en tres o cuatro posiciones con nucleósidos que imparten resistencia nucleolítica a las secuencias.

¹⁰ Proietti et. al. Progestins Induce Transcriptional Activation of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (Stat3) via a Jak- and Src-Dependent Mechanism in Breast Cancer Cells Molecular and Cellular Biology, **2005**, . 4826

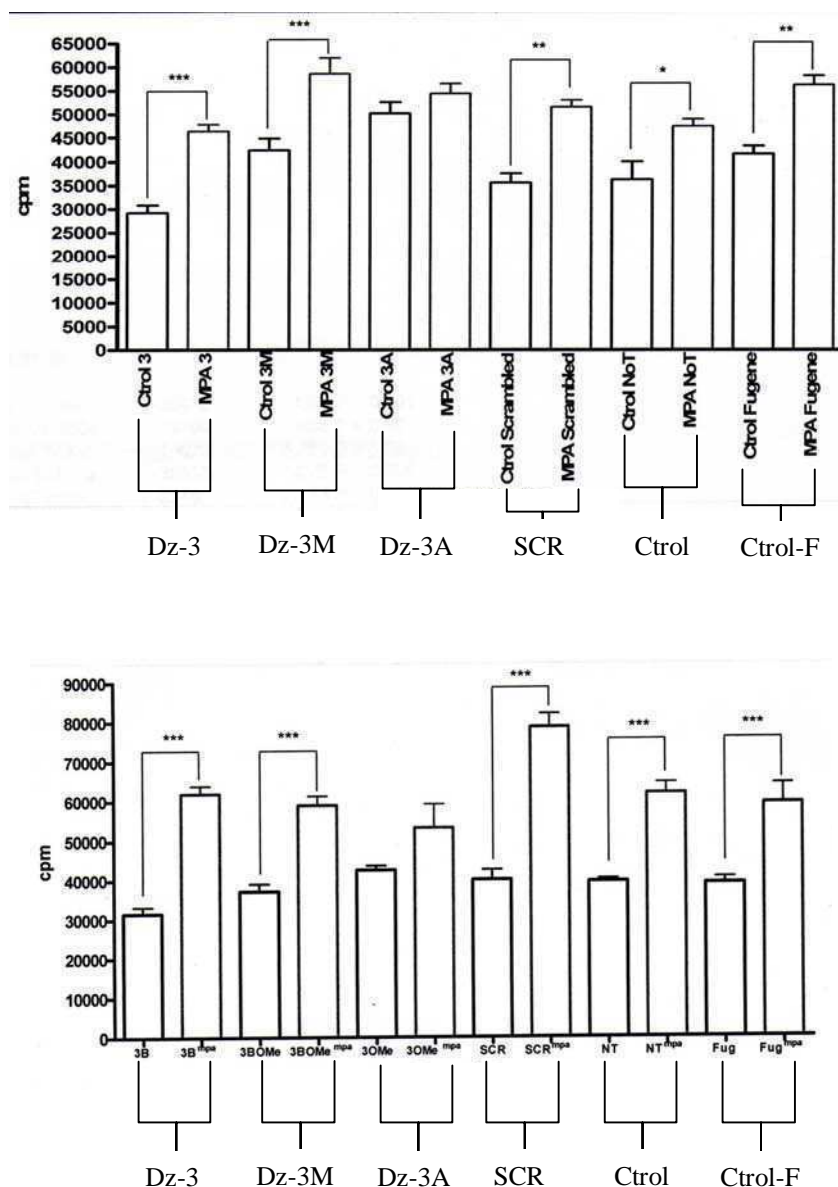


Figura 4-8: Ensayo de inhibición de la proliferación de células C4HD con y sin MPA. (Ctrl=células sin tratamiento, Ctrl-F= células tratadas únicamente con Fugne)

Por último, para la DNAsima 3A se optimizó el paso de transfección en busca de aumentar el efecto inhibitorio. Luego de evaluar cuatro agentes de transfección diferentes, se determinó que la transfección con lipofectamina presenta los valores más altos de inhibición. La Figura 4-9 muestra el resultado del wester blot para los cuatro tratamientos de transfección y el control. Luego de tres ensayos independientes se pudo concluir que la disminución de los niveles de STAT 3 debida a la Dz-3A es de aproximadamente 35%.

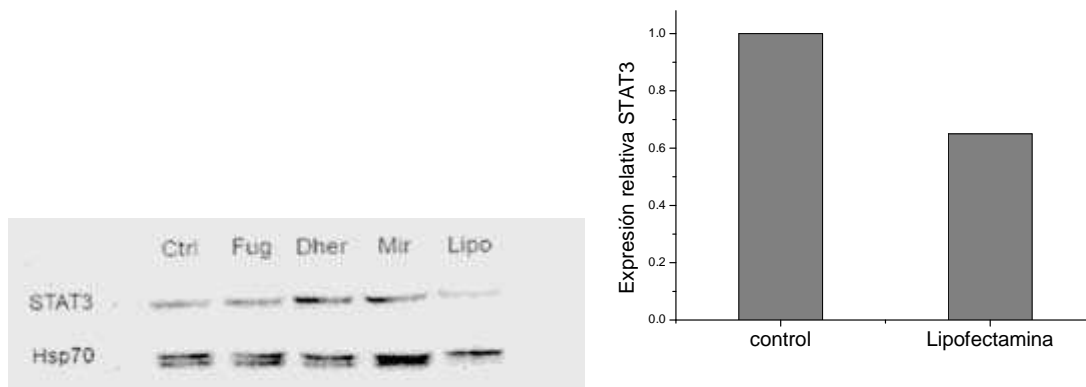


Figura 4-9: A) Wester blot para distintos tratamientos de transfección de la Dz-3A. (Ctrl=células sin tratamiento, Fug= Transfección con Fugene6, Dhar= Transfección con DharmaFECT, Mir= Transfección con MIR 2700) B) Cuantificación de la expresión de STAT3 relativa al control para el tratamiento con lipofectamina.

4-3.3 Conclusión

Durante estos estudios, fue posible comparar la actividad catalítica de DNazimas modificadas dirigidas a hidrolizar tres regiones del ARNm de la proteína STAT3 en células C4HD. En primer lugar, se realizó una evaluación comparativa de la actividad para las DNazimas

4-4 Inhibición de la expresión del Virus de Hepatitis C

El virus de la hepatitis C (HCV) afecta alrededor de 175 millones de personas en el mundo, de los cuales, aproximadamente un 70% desarrollan una infección crónica. La consecuencia más importante es el desarrollo de cirrosis y necesidad de trasplante. El índice de mortalidad es de entre un 2 y 5% de la población infectada. Hasta el momento, no existe una vacuna preventiva para esta enfermedad. Una vez adquirida, el tratamiento consiste en administración conjunta de interferón α y ribavirina, por un lapso prolongado. Sin embargo, la respuesta positiva a este tratamiento presenta resultados muy variados dependiendo del genotipo del virus, 40-50% de los pacientes infectados con el genotipo 1 y 4, y un 80% de los infectados con los genotipos 2 ó 3. A parte, las terapias asociadas a interferón α y ribavirina, cuando se administran durante un tiempo prolongado, tienen numerosos efectos adversos tales como depresión o anemia¹¹.

El HCV pertenece a la familia Flaviviridae, es un ARN simple cadena que consta de 9600 nucleótidos y contiene dos regiones no traducibles sumamente conservadas (UTR). Estas regiones tienen un rol fundamental en la traducción y replicación del virus. La síntesis de las proteínas comienza con el reclutamiento de cofactores y proteínas al sitio de unión a ribosoma (IRES) en la región 5' no traducible (5'UTR) del ARN viral¹². Dado que esta zona es sumamente conservada, y este proceso de traducción difiere del utilizado por la célula huésped, la secuencia del ARNm viral en la zona del IRES representa un blanco interesante para drogas anti-HCV¹³. Durante este trabajo se utilizaron DNAsimas

Los ensayos y resultados presentados en esta sección fueron realizados en el Departamento de Biología Molecular del Instituto de Parasitología y Biomedicina

SCR -MOD	5' CA T AGAGCGAACG C CGGCACGATGGCAGT 3'
SCR	5' CATAGAGCGAACGCCGGCACGATGGCAGT 3'
Dz-219	5' CCAGGCA GGCTAGCTACAACGA TGAGCGG 3'
Dz-219 A	5' CCAGGCA GG C AG C TACAACGA TGAGCGG 3'
Dz-219 B	5' CCAGGCA GG C AG T TACAACGA TGAGCGG 3'
Dz-219 AOMe	5' CCAGGCA GG C AG C TACA ACGA TGAGCGG 3'
Dz-219 BOMe	5' CCAGGCA GG C AG T TACA ACGA TGAGCGG 3'
Dz-219 OMe	5' CCAGGCA GGCTAGCTACA ACGA TGAGCGG 3'
Dz-219 M	5' CCAGGCA GGCTAGCTACA ACC A TGAGCGG 3'

T (2'S)
 C

4-4.2 Reacción de corte in vitro

La actividad de las DNazimas y de sus análogas modificadas fue ensayada frente a los transcritos 5'HCV-356 y 5'HCV-691, los cuales corresponden a los primeros 356 y 691 nucleótidos de la región 5' UTR del HCV. La reacción se llevó a cabo con un exceso de DNazima respecto al ARN sustrato y en presencia de Mg^{2+} . Se incubó durante una hora a $37^{\circ}C$ y los productos de corte fueron separados en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. En primer lugar, se evaluó la actividad relacionada con cada zona de corte utilizando las DNazimas sin modificaciones, Figura 4-11.

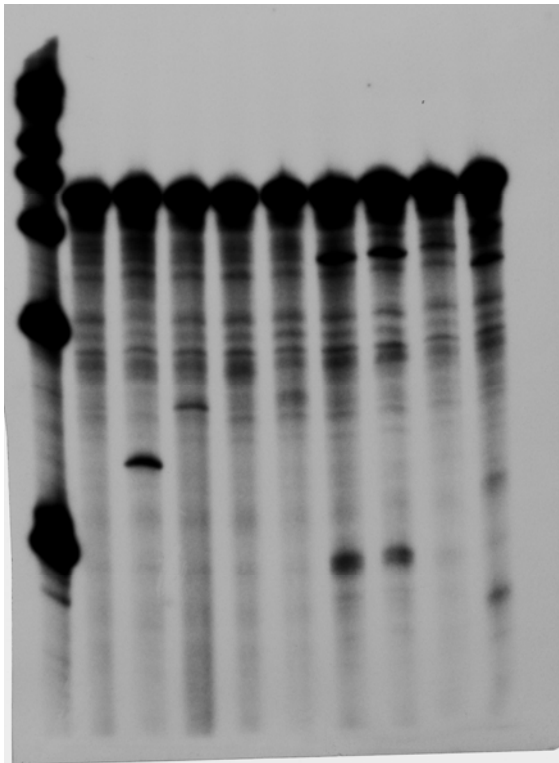


Figura 4-11: Productos de reacción de DNazimas

Para el caso de Dz-285 y Dz-288 se observan claramente los dos productos de corte correspondientes a la hidrólisis debida a las DNAzimas, tanto con el sustrato de 356nt como el de 691nt.

Para la reacción con Dz-143 y Dz-173 se pueden apreciar los productos de corte del extremo 5' únicamente al reaccionar con el sustrato de 356nt. Los productos de mayor peso molecular no se observan. Probablemente, esto es debido a que han sufrido sucesivas degradaciones inespecíficas. Con el sustrato 5'HCV-691 sólo se observan bandas muy tenues en la zona de 143 y 173, las de mayor peso molecular no pueden detectarse.

Por otro lado, las DNAzimas correspondientes a las zonas 219, 190 y 301 no presentan cortes característicos en las condiciones ensayadas, tanto con el transcripto de 356nt como con el de 691nt. Esto es extraño en el caso de Dz-219 dado que su eficiencia de corte ante un sustrato de 388nt había sido reportada². Igualmente, también podría haber ocurrido una degradación de los fragmentos de corte como se mencionó anteriormente.

Si bien en las calles de la Dz-263 se pueden llegar a encontrar las bandas relacionadas al corte, también se observa un aumento de la degradación inespecífica, lo cual podría deberse a una contaminación externa o bien a que la presencia de la DNAzima favorezca posiciones de corte, por ejemplo podría llegar a generar un cambio conformacional del ARN y favorecer una posición de hidrólisis espontánea.

El efecto de las modificaciones químicas sobre la actividad de la DNAzimas

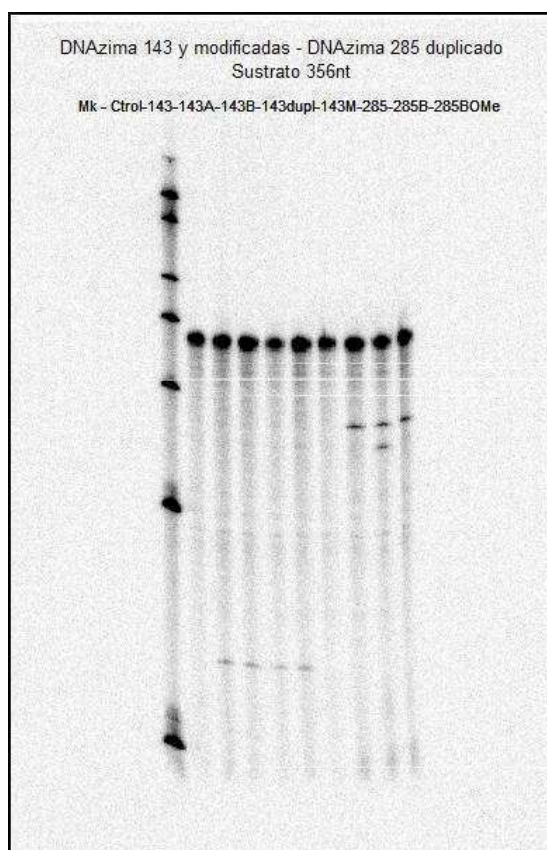


Figura 4-12: **A)** Productos de reacción de Dz-285 y sus análogas modificadas frente al sustrato 5'HCV-356nt. Calles: 1) Century Marker, 2) ARN sin tratamiento, 3) Dz285, 4) Dz285A, 5) Dz285AOMe, 6) Dz285B, 7) Dz285BOMe, 8) Dz285OMe 9) Dz285M 10) reacción sin DNAzima. **B)** Productos de reacción de Dz-143 y sus análogas modificadas frente al sustrato 5'HCV-356

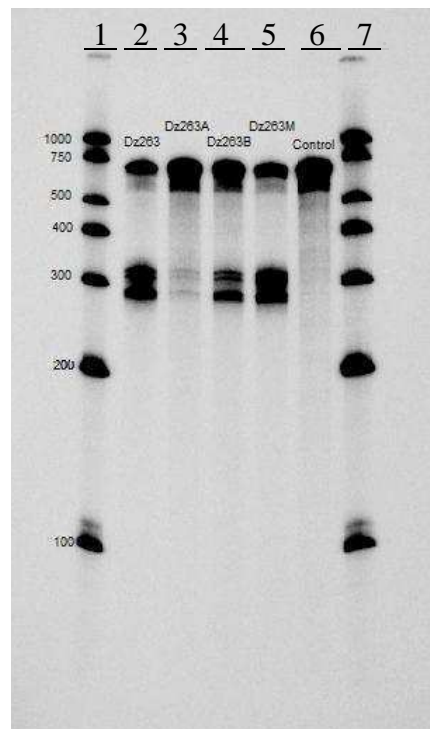


Figura 4-13: Productos de la reacción entre Dz-263 o sus análogas modificadas frente al sustrato 5'HCV-356. Calles: 1y7) Century Marker, 2) Dz263, 3) Dz263A, 4) Dz263B, 5) Dz 263M, 6) Reacción sin DNAzima.

4-4.3 Reacciones de Traducción in vitro

En esta etapa se utilizó el sistema Rabbit Reticulocyte Lysate System (Promega) para la traducción de un ARN dependiente de IRES el cual esta asociado a la luciferasa firefly (IRES-FLuc) y de un ARNm dependiente de CAP que codifica para la luciferasa de renilla (CAP-RLuc). El objetivo fue inhibir la síntesis de luciferasa dependiente de IRES utilizando las DNAzimas diseñadas y evaluar el efecto de las modificaciones sobre la traducción. La traducción de CAP-RLuc sirve de control normalizador. La actividad luciferasa resultante se ha determinado utilizando el kit Dual-Luciferase reporter assay system (Promega) (Figura 4-14).

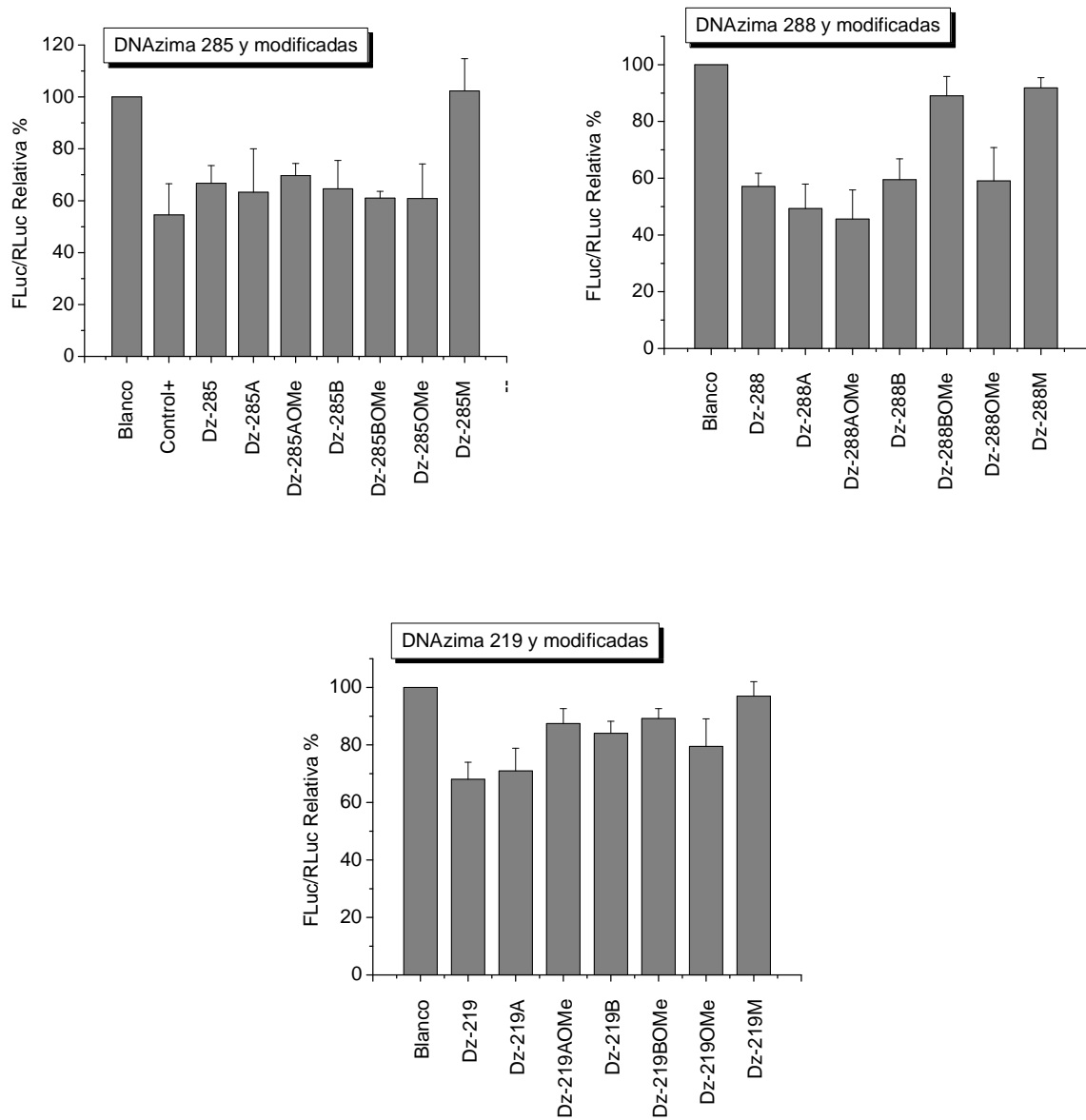


Figura 4-14: Traducción de IRES-FLuc relativo a CAP-RLuc. Efecto inhibitorio de las DNazimas. (Continúa)

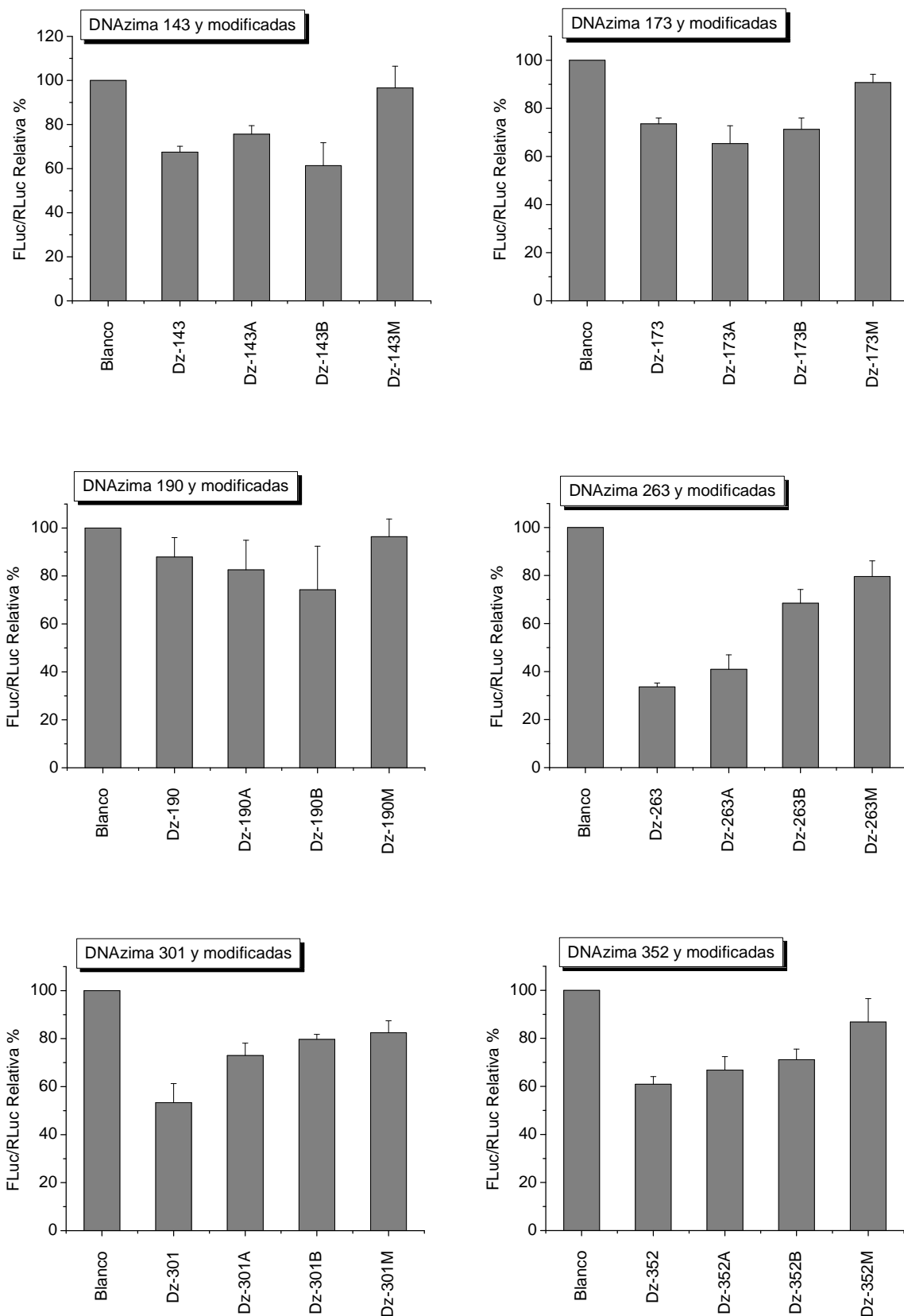


Figura 4-14: Traducción de IRES-FLuc relativo a CAP-RLuc. Efecto inhibitorio de las DNAsimas.

En el caso de las Dz-285 y Dz-288 se observa una traducción de entre un 50 y 70% mientras que con las Dz-285 M y Dz-288 M, las cuales poseen el núcleo catalítico inactivo, la traducción es mayor al 80%. Por lo tanto, se puede observar un efecto inhibitorio independiente del efecto antisentido. Generalmente, al introducir modificaciones químicas en el núcleo catalítico la cinética de hidrólisis disminuye un poco, pero en estos casos no se evidencia un efecto claro de las modificaciones sobre la actividad. Probablemente, esto se deba a que el tiempo de reacción de una hora es lo suficientemente largo como para sobrellevar estas pequeñas diferencias.

Para el caso de Dz-219 y Dz-190 el efecto sobre la traducción es muy leve, asemejándose en la mayoría de los casos al valor obtenido para las correspondientes DNAzimas inactivas M.

Para las zonas 143 y 173, podría pensarse que hay un leve efecto en la inhibición, pero en la mayoría de los casos no es muy importante, la traducción de IRES-FLuc está entre un 60 y 90%.

Para el caso de Dz-301 y Dz-352, el efecto sobre la traducción es importante para las DNAzimas sin modificar, aquí pareciera haber una pequeña diferencia entre DNAzimas sin modificar y las modificadas con los 2'C-metil-2'desoxinucleótidos.

Nuevamente, llama la atención el caso de Dz-263, la cual presentó la mayor inhibición. También en este caso parece evidenciarse un efecto en la actividad debido a las modificaciones. Por otra parte la Dz-263 M presenta un valor de 80%, un poco menor al del resto de las DNAzimas M, lo que podría indicar un mayor efecto antisentido en dicha zona, o algún tipo de corte inespecífico tal como se observó en las reacciones de corte con sustratos largos.

4-4.4 Ensayos de Traducción en células Huh-7

En esta etapa se realizó un ensayo de inhibición intracelular de la traducción del ARNmIRES-FLuc. Para ello, las células Huh-7 fueron transfectadas conjuntamente con IRES-FLuc, CAP-RLuc como control y con DNAzimas inhibitoras o Scramble. Este ensayo se realizó con las DNAzimas 285, 288, 263 y 352 y sus respectivas mutantes ya que fueron las más activas ante sustratos largos y en ensayos de traducción in vitro.

Ensayos previos:

1. En primer lugar, se evaluó el efecto tóxico que le genera a la célula ser transfectada con una secuencia de ADN de aproximadamente 30 bases y si el hecho de que esa secuencia esté modificada con 2'-C-metil-2'-desoxinucleotidos y 2'-O-metilnucleotidos aumenta dicha toxicidad. Para ello, se transfectaron cantidades crecientes de SCR o SCR-MOD y se compararon las traducciones de IRES-FLuc y CAP-RLuc (Figura 4-15).

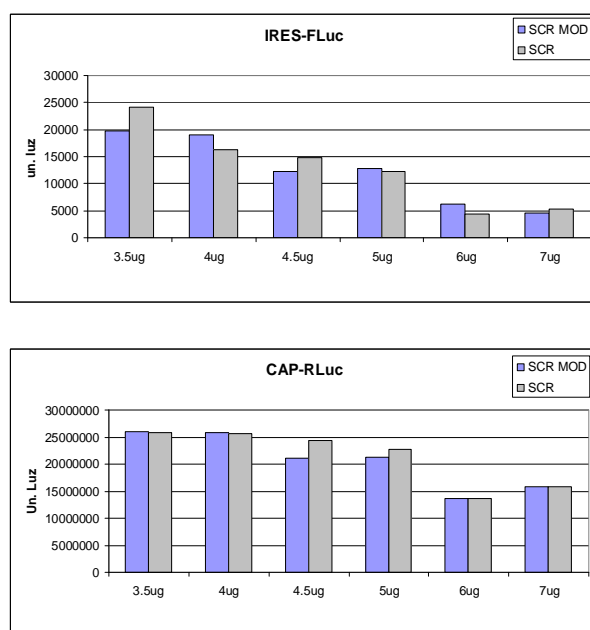


Figura 4-15: Traducción de IRES-FLuc y CAP-RLuc para células tratadas con cantidades crecientes de SCR o SCR-MOD.

Con este ensayo se pudo concluir que no hay una toxicidad extra asociada a las modificaciones introducidas en SCR-MOD por lo tanto, cualquier efecto inhibitorio observado al transfectar las DNAzimas puede ser adjudicado a su actividad RNasa.

2. También se evaluó la concentración óptima de DNAzima para lograr una buena inhibición. Para ello, se transfectaron cantidades constante de los mRNAs IRES-FLuc y CAP-RLuc pero se aumentó la cantidad de DNAzima transfectada. Al mismo tiempo se realizaron ensayos controles con igual cantidad de la secuencia Scramble (Figura 4-16).

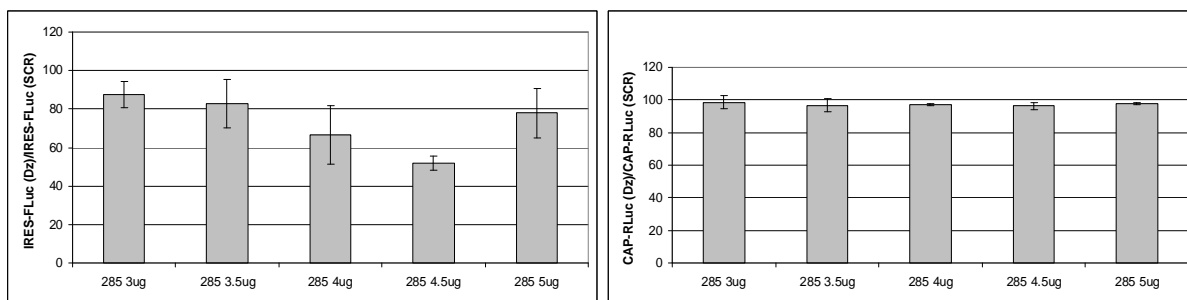


Figura 4-16: Actividad luciferasa relativa para distintas concentraciones de DNazima 285 y Scramble.

Teniendo en cuenta estos resultados se decidió utilizar 4.5ug de DNazima o del SCR control en los siguientes ensayos.

La reacción de inhibición se llevó a cabo transfectando 4.5ug de DNazima o Scramble, luego de 18hs se analizó la luminiscencia de IRES-FLuc y CAP-RLuc para cada tratamiento con el kit Dual-Luciferase reporter assay system (Promega). Se cuantificó la relación entre la traducción de IRES-FLuc y CAP-RLuc para cada tratamiento y se relativizó al valor obtenido para el scramble.

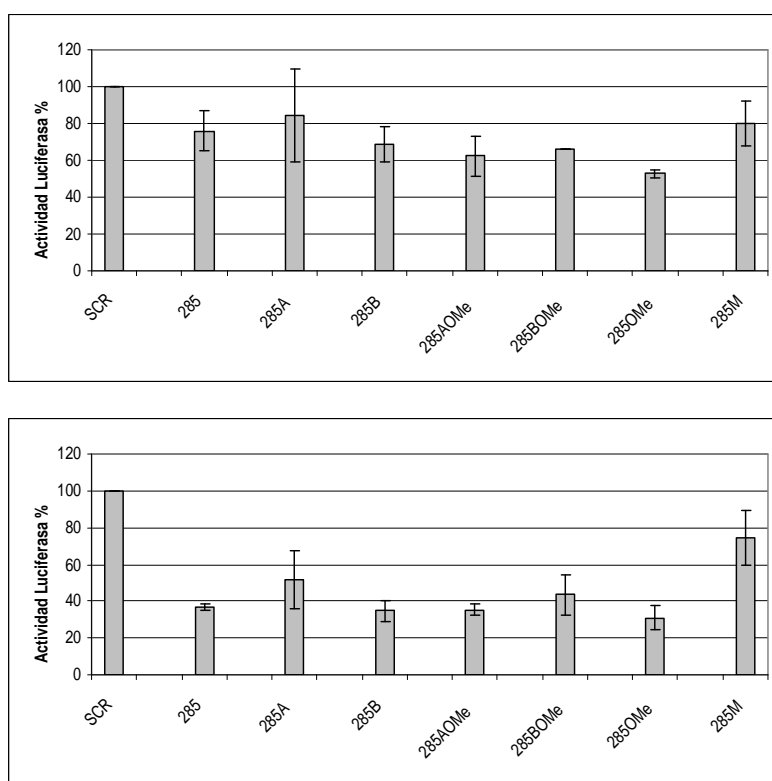


Figura 4-17: Actividad luciferasa relativa vs. Tratamiento. Ensayos de inhibición de traducción con Dz-285 y sus modificadas. **Act. Luc. Rel= (act.IRES/act.CAP)_{DNazima}/(act.IRES/act.CAP)_{SCR} *100**

La Figura 4-17 muestra los resultados obtenidos para la Dz-285 y sus mutantes, los gráficos corresponden a dos ensayos independientes realizados sobre diferentes cultivos celulares de Huh-7, cada uno por duplicado. En ambos casos se puede observar un efecto inhibitorio propio de las DNazimas

Al tratar las células con Dz-288 y sus modificadas se observa entre un 60 o 70 % de traducción respecto al scramble para todos los casos.(Figura 4-18).

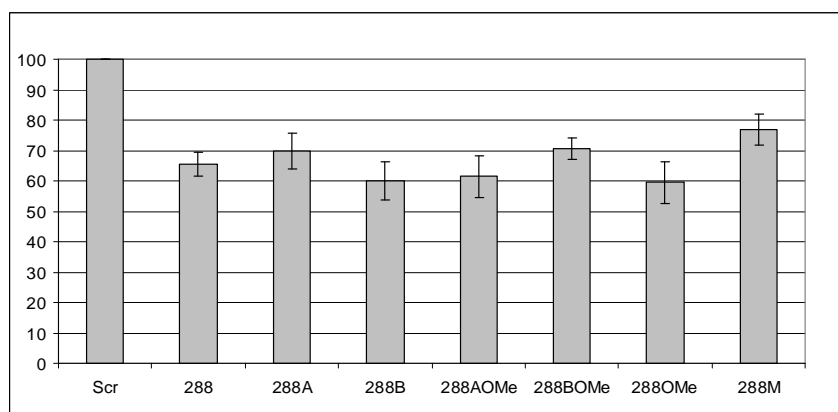


Figura 4-18: Actividad luciferasa relativa vs. tratamiento. Ensayos de inhibición de traducción con Dz-288 y modificadas. Eje y: **Act. Luc. Rel. = $(\text{act.IRES}/\text{act.CAP})_{\text{DNazima}} / (\text{act.IRES}/\text{act.CAP})_{\text{SCR}} * 100$**

También se analizó el efecto sobre la inhibición generado por las DNazimas 263 y, aunque no habían mostrado una buena actividad de corte in vitro, se evaluaron la Dz-352 y sus mutantes. Para estos casos, se realizó un único ensayo por duplicado (Figura 4-19). Estos resultados muestran una ausencia de inhibición de la traducción para todas las DNazimas ensayadas.

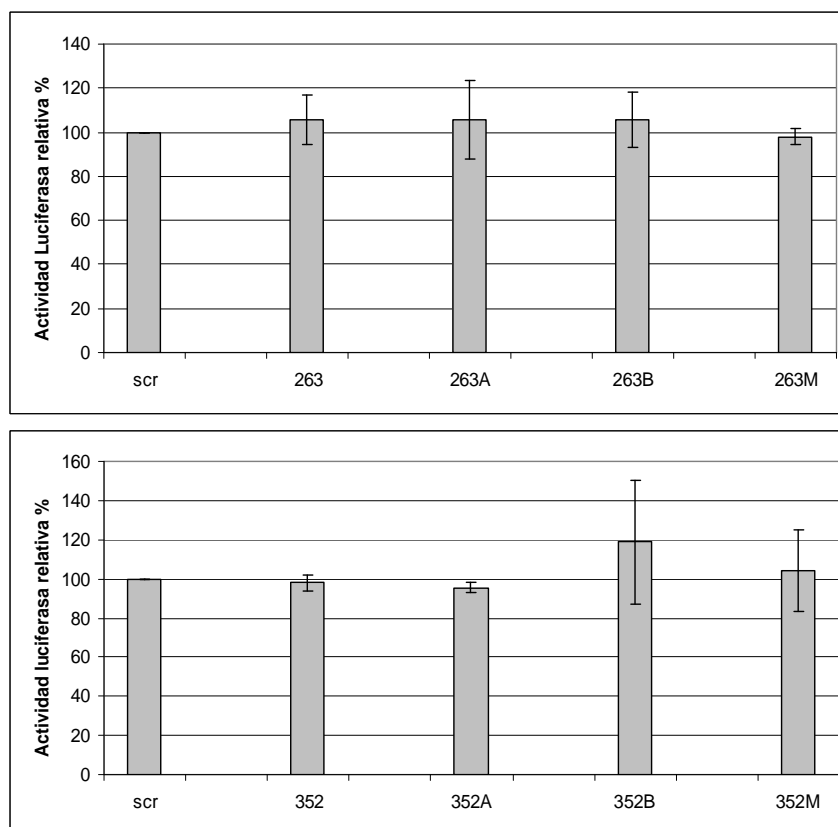


Figura 4-19: Actividad luciferasa relativa vs. Tratamiento. Ensayos de inhibición de traducción con Dz-263, Dz-352 y sus respectivas mutantes. $Act. Luc rel. = \frac{(act.IRES/act.CAP)_{DNAzima}}{(act.IRES/act.CAP)_{SCR}} * 100$

4-4.5 Reacción de corte en células Huh-7NS3

El objetivo de este ensayo fue evaluar la reacción de corte intracelular del ARN del HCV. Las células Huh-7NS3 contienen un plásmido que replica el ARN viral. Por lo tanto, luego de transfectar dichas células con DNazimas se puede evaluar directamente el corte sobre el ARN viral utilizando la técnica de PCR cuantitativa. En primer lugar, se realizó la inhibición con la DNazima 285 sin modificaciones utilizando GAPDH como control. En este caso, los resultados mostraron un descenso en los niveles del ARNm viral respecto al scramble. Por lo tanto sería de esperar, tal como ocurrió en los ensayos de corte, que las DNazimas modificadas muestren un porcentaje similar de inhibición. Dadas las limitaciones de tiempo de la estancia, no se pudo continuar con estos ensayos, pero podrán ser evaluados en futuros trabajos.

4-4.6 Conclusión

En esta etapa, se compararon las actividades de nueve DNazimas

Capítulo 5

Estudio Computacional de Nucleósidos y Oligonucleótidos Modificados

5-1 Objetivo

El objetivo de este capítulo es parametrizar los 2'-desoxi-2'-C-metilnucleósidos y estudiar su comportamiento conformacional al introducirlos como monómeros en oligonucleótidos simple cadena. Para ello, se utilizaron simulaciones computacionales aplicando técnicas de modelado molecular, minimización y dinámica molecular.

En la actualidad, los estudios sobre estructura basados en rayos-X y RMN son sumamente útiles para explorar la diversidad estructural de los ácidos nucleicos. Sin embargo, estas técnicas presentan limitaciones para generar una visión dinámica y global del sistema. Por otro lado, el estudio de los ácidos nucleicos mediante métodos teóricos ofrece la posibilidad de potenciar y extender la información estructural accesible mediante resultados dinámicos a nivel atómico. Esto brinda la posibilidad de profundizar en el estudio de la relación entre estructura, energética y dinámica, y establecer propiedades directamente relacionadas con la función biológica. En esta etapa, se utilizaron un conjunto de técnicas teóricas que involucran tanto a la mecánica clásica como cálculos de mecánica cuántica, con la finalidad de aportar información estructural dinámica que complemente al resto de los datos experimentales obtenidos.

Dentro de los métodos teóricos para el estudio de biomoléculas, la técnica de dinámica molecular con solvente explícito es una herramienta esencial debido a su capacidad para generar una descripción de los movimientos estructurales que ocurren en solución. La continua mejora de los campos de fuerza, de los algoritmos de simulación y de los recursos computacionales disponibles, permite un gran avance en el desarrollo del estudio por dinámica molecular de estructuras de ácidos nucleicos.

5-2 Análisis de los monómeros

Los 2'-desoxi-2'-C-metilnucleosidos han sido estructuralmente caracterizados mediante estudios conformacionales por RMN (D_2O y en un rango de temperaturas de 0-25 C). Los resultados indican que la fracción molar para la conformación norte de la (2

Resultados y Discusión - Capítulo 5: Estudio Computacional de Nucleósidos y Oligonucleótidos Modificados

para utilizarlos posteriormente en los estudios de dinámica molecular donde se los introduce en entornos de simple cadena.

En primer lugar, se analizaron los mínimos conformacionales correspondientes a la pseudorotación norte y sur según la configuración del carbono 2'. Se realizó una optimización de geometría utilizando mecánica molecular y permitiendo variar los ángulos del anillo furanósico. De este análisis se obtuvieron estructuras que se utilizaron como punto de partida para minimizaciones mecanocuánticas.

Cada uno de estos mínimos fue primero sometido a una optimización de geometría a nivel de Hartree-Fock (HF) con bases 3-21G. Este método es uno de los más simples y sirve para obtener una aproximación del estado fundamental en un tiempo razonable de cómputo. Incluye una simplificación de la ecuación de Schrödinger ya que no toma en cuenta explícitamente la correlación electrónica considerando la repulsión efectiva promedio de un electrón respecto al resto².

Las estructuras resultantes fueron utilizadas para una minimización más rigurosa con el método de Møller

mientras que los valores del mínimo conformacional de la (2

Por último, cada una de las estructuras minimizadas fue el punto de partida para simular los espectros de ^{13}C -RMN en agua. En esta etapa se utilizó el método GIAO a nivel HF 6-31G(d), la solvatación fue tenida en cuenta utilizando el modelo IEF-PCM y agua como solvente. El programa utilizado fue Gaussian 03W 6.0. Se realizó una comparación de los desplazamientos de ^{13}C obtenidos por este método, con los obtenidos experimentalmente. La Tabla 5-3 compara los valores obtenidos, de este análisis surge que los ángulos diedros de la estructura de los mínimos calculados concuerdan con los valores experimentales de RMN.

ppm	2'R		2'S	
	Experimental D ₂ O	HF 6-31G(d) H ₂ O	Experimental D ₂ O	HF 6-31G(d) H ₂ O
C4	165.70	167.22	163.04	167.22
C2	152.25	153.89	150.54	154.44
C6	142.34	150.56	141.10	150.56
C5	103.35	95.56	100.88	93.89
C1'	89.90	78.89	84.79	76.67
C4'	87.62	77.78	85.34	75.00
C3'	73.74	68.33	72.13	62.78
C5'	62.60	60.00	58.74	55.56
C2'	43.45	37.78	44.50	37.78
CH ₃	9.42	10.00	11.00	11.67

Tabla 5-3: Desplazamientos en espectros de RMN experimentales y calculados para los conformeros Sur de la (2'R)-2'-C-metil-2'-desoxiuridina y Norte de la (2'S)-2'-C-metil-2'-desoxiuridina.

Estas observaciones indican que los parámetros de las estructuras minimizadas podrían ser utilizados y reproducir correctamente las características de estos nucleósidos modificados en estudios de dinámica molecular de oligonucleótidos.

5-3 Análisis de oligonucleótidos

Como se mencionó anteriormente, los diastereoisómeros (2'S)-2'-desoxi-2'-C-metilnucleósidos tienen la propiedad de adoptar mayormente la conformación Norte (3

Resultados y Discusión - Capítulo 5: Estudio Computacional de Nucleósidos y Oligonucleótidos Modificados

cuando son incorporados en oligonucleótidos. Dentro de estas cadenas intervienen un gran número de fuerzas estructurales que pueden vencer las barreras conformacionales de los monómeros para dar como resultado una estructura macromolecular de menor energía aunque la conformación favorecida del azúcar dentro del oligonucleótido no sea exactamente igual a la observada en el nucleósido aislado.

Debido a que en este trabajo los 2'-desoxi-2'-C-metilnucleósidos se introdujeron dentro del núcleo catalítico de la DNAzimas

propiedades del agua en sistemas de simulación clásicos. Luego de estos pasos se cuenta con un archivo de topología y uno de coordenadas que describen al sistema de partida.

5-3.1.2 Minimización

Para iniciar una dinámica molecular se debe partir de una estructura estable que corresponda a un mínimo local de la superficie de energía potencial. De esta forma, se evita que la estructura presente problemas de inestabilidad a lo largo de la dinámica. Por lo tanto, es necesario realizar una serie de ciclos de minimización a la estructura inicial.

En la minimización de los primeros ciclos se utilizan algoritmos de steepest descent que utiliza el vector de máximo gradiente en cada iteración. Es muy eficiente y rápido para encontrar los mínimos locales. Pero para los últimos pasos de minimización es necesario someter a la estructura a minimizaciones de gradiente conjugado donde el vector en cada iteración tiene en cuenta la dirección anterior por lo que se puede obtener la convergencia con mayor rapidez.

5-3.1.3 Termalización

Antes de comenzar con la dinámica molecular, se debe termalizar y equilibrar por algunos nanosegundos a la estructura minimizada anteriormente. Para ello, el programa asigna velocidades iniciales según la distribución de Maxwell-Boltzman. Luego, la temperatura se va incrementando mediante pequeños aumentos hasta alcanzar el valor al cual se desarrollará la dinámica. De esta forma, nos aseguramos que la trayectoria sea estable y la estructura no colapse luego de iniciada la dinámica.

Durante los procesos de minimización y termalización, se controlan los valores de energía, presión y volumen para corroborar la estabilidad del sistema. También se analiza la desviación cuadrática media respecto a una estructura de referencia (RMSD) como control de estabilidad y convergencia.

5-3.1.4 Dinámica molecular

Por último, se inicia la dinámica molecular durante 15ns a 298K con el método Particle Mesh Ewald. Las variaciones de energía, y el RMSD producidos a lo largo de cada nanosegundo fueron analizados de manera de controlar la estabilidad del sistema. Una vez

Resultados y Discusión - Capítulo 5: Estudio Computacional de Nucleósidos y Oligonucleótidos Modificados

obtenidas las trayectorias se utilizó la función pucker del módulo ptraj del programa AMBER 9.0 para analizar la conformación del anillo furanósico tanto de las posiciones modificadas con las 2

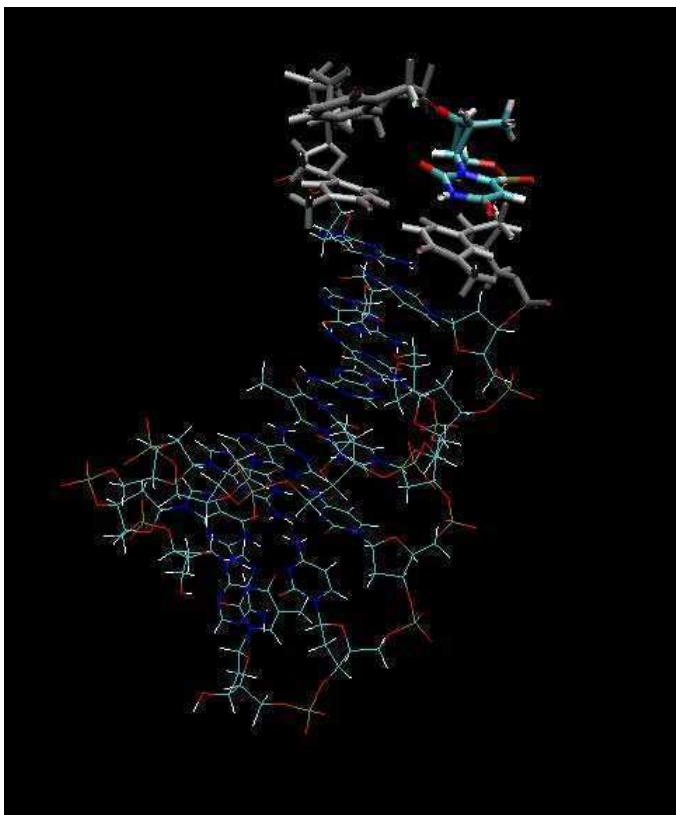


Figura 5-2: Estructura del loop1b-2S. En gris se destacan los nucleótidos de la zona simple cadena. La (2

carbono 2', únicamente se puede concluir observa que hay perturbación en ambas modificaciones.

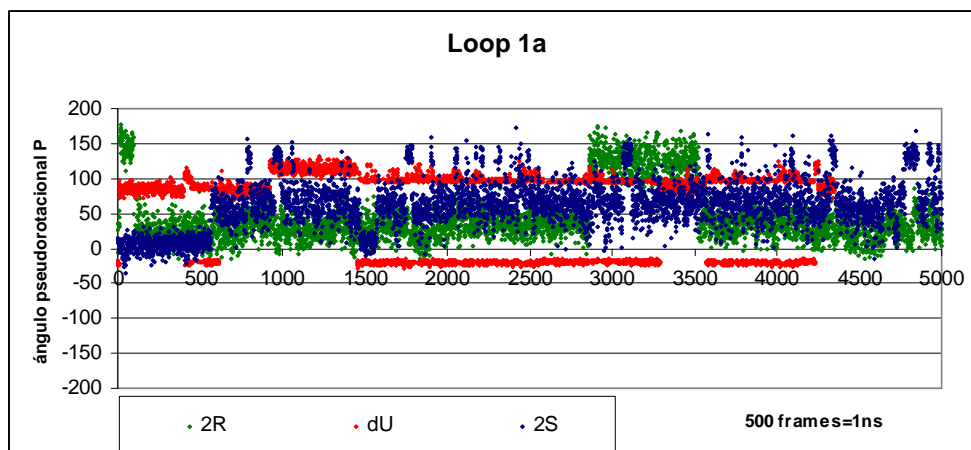


Figura 5-3: Ángulo pseudorotacional P a lo largo de los últimos 10ns de dinámica molecular. Rojo **Loop-1a dU₈**, Azul: **Loop-1a 2S₈**, Verde: **Loop-1a 2R₈**.

La Figura 5-4 muestra los valores del ángulo pseudorotacional del nucleótido número 9 de Loop-1b dU₉, Loop-1b 2R₉ y Loop-1b 2S₉. El conjunto de Loops-1b, presenta la misma estructura que los Loops 1a pero difiere en que la modificación se encuentra en el nucleótido número 9. Esta posición se ubica en el interior del loop formado por los cuatro nucleótidos. Nuevamente, se observa una dependencia de la conformación del azúcar según la modificación incorporada a esta posición. El nucleótido dU se encuentra mayoritariamente en una conformación tipo Este, al igual que en el Loop-1a dU₈. También se observan conformeros norte aunque en menor proporción que en el caso del Loop-1a. El azúcar del nucleótido 2S también alterna entre una conformación Norte y Este con rangos de valores de P bastante acotados. A diferencia de lo observado para el nucleótido dU el tiempo de residencia de cada conformero es comparable. El caso del nucleótido 2R es muy diferente a los dos anteriores ya que la conformación preferencial es del tipo Sur, al igual que lo que se observa para el nucleósido aislado. Es interesante destacar que este azúcar puede alcanzar valores de P en un rango de entre 0 y 60, lo que indica que la conformación Norte no se encuentra energéticamente restringida.

Al comparar los resultados del conjunto de los Loops-1a con los de Loops-1b se pueden establecer algunas diferencias para las posiciones modificadas con 2'-desoxi-2'-C-metiluridina. Al introducir las modificaciones en el extremo del loop (posición 8, grupo

Loops-1a) el rango de ángulos pseudorotacionales accesibles es muy amplio y no se observa una conformación preferencial a lo largo del tiempo. Para el caso en que las modificaciones se encuentren en el interior del loop (posición 9, grupo Loops-1b), la conformación del azúcar alterna entre zonas definidas del ciclo pseudorotacional con un tiempo de residencia considerable. Probablemente la libertad conformacional de la posición 8 sea menor que la de la posición 9 con lo cual la conformación fluctuará intentando alcanzar, si es posible, una conformación energéticamente favorable.

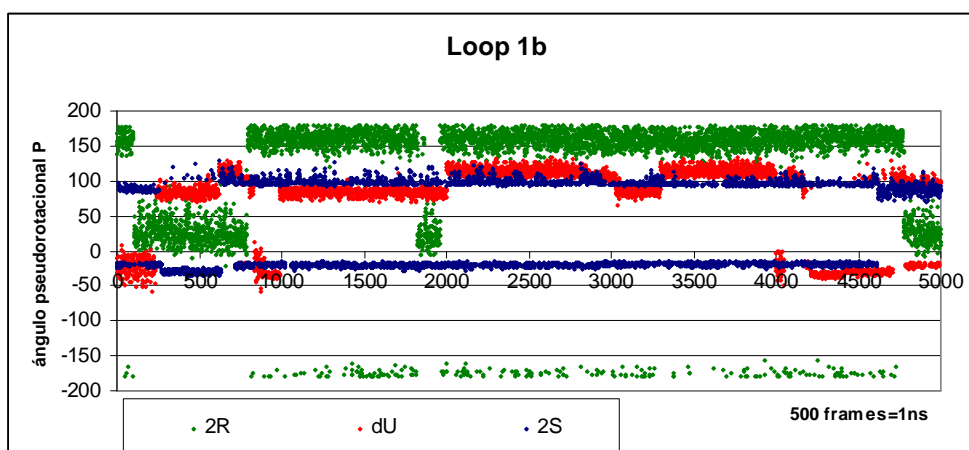


Figura 5-4: Ángulo pseudorotacional P a lo largo de los últimos 10ns de dinámica molecular. Rojo **Loop-1b dU₈**, Azul **Loop-1b 2S₈**, Verde **Loop-1b 2R₈**

La Figura 5-5 y la Figura 5-6 muestran los resultados conformacionales para los nucleótidos modificados y el control de los Loops-2a y Loops-2b respectivamente. El conjunto de Loops-2a y el de Loops-2b presentan características similares. El nucleótido dU presenta una conformación preferencial tipo Este a lo largo de la trayectoria analizada. Los Loop 2a-2S y Loop 2b-2S presentan una variación conformacional con valores de P entre 0 y 60 manteniendo para ambos casos una conformación cercana a la Norte tal como presentan los (2'S)-2

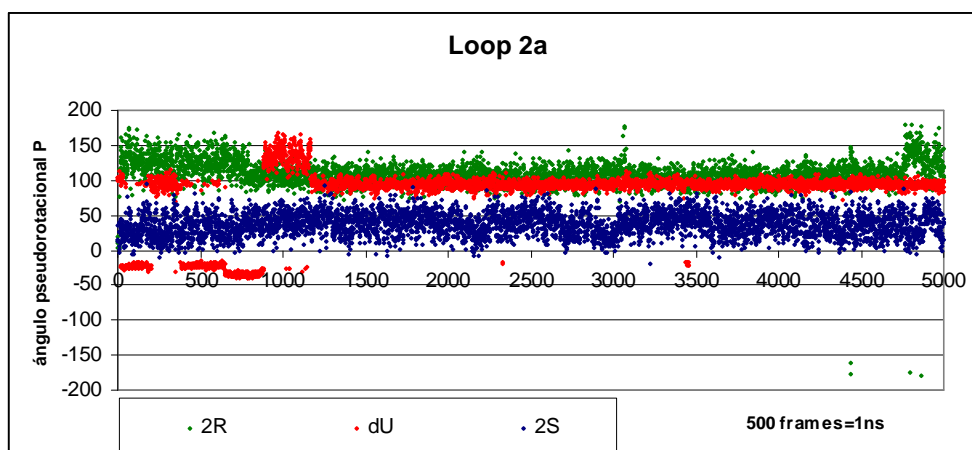


Figura 5-5: Ángulo pseudorotacional P a lo largo de los últimos 10ns de dinámica molecular. Rojo **Loop-2a dU₈**, Azul **Loop-2a 2S₈**, Verde **Loop-2b 2R₈**

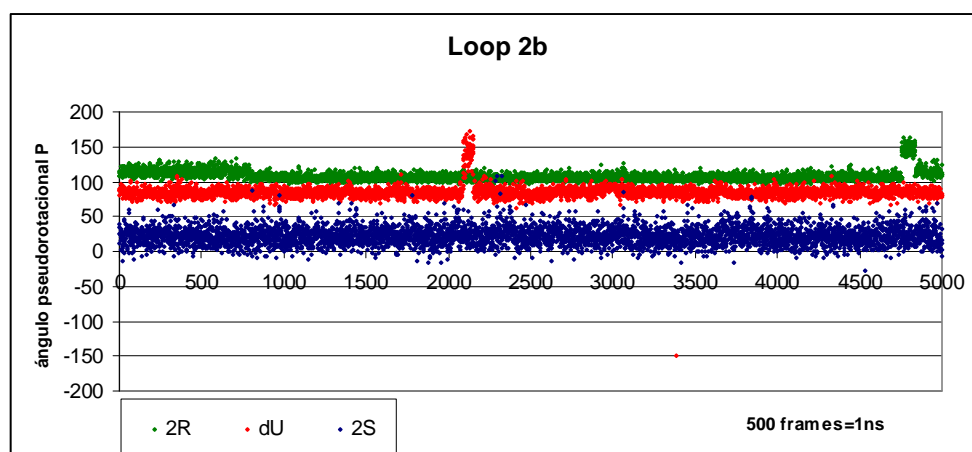


Figura 5-6: Ángulo pseudorotacional P a lo largo de los últimos 10ns de dinámica molecular. Rojo **Loop-2b dU₉**, Azul **Loop-2b 2S₉**, Verde **Loop-2b 2R₉**

5-3.3 Conclusiones

A lo largo de este capítulo se utilizaron técnicas computacionales de mecánica molecular y mecánica cuántica para obtener los parámetros para los diastereoisómeros (2'S) y (2'R)-2'-desoxi-2'-C-metiluridina. Estos resultados se utilizaron para generar librerías modificadas para describir ambos nucleósidos y poder analizarlos dentro de oligonucleótidos. Se analizó el comportamiento conformacional del anillo ribosídico de los nucleósidos modificados mediante dinámicas moleculares de loops simple cadena. Se obtuvieron resultados muy variados, los cuales fueron analizados comparativamente con el control 2'-desoxiuridina (dU). En base a los resultados, es posible concluir que las modificaciones (2'S)

Resultados y Discusión - Capítulo 5: Estudio Computacional de Nucleósidos y Oligonucleótidos Modificados

y (2'R)-2'-desoxi-2'-C-metiluridina generan una perturbación de los ángulos del anillo ribosídico respecto al control. También se observó que los azúcares modificados dentro de los oligonucleótidos no presentan las mismas características del nucleósido libre. La conformación accesible y el tiempo de residencia para los nucleósidos modificados son dependientes de la posición y del tamaño del loop utilizado.

Si bien no es posible extrapolar directamente los resultados computacionales al comportamiento de los 2'-desoxi-2'-C-metilnucleósidos dentro del núcleo catalítico de la DNazima

Conclusiones generales y proyecciones futuras

Conclusiones generales y proyecciones futuras

Conclusiones generales y proyecciones futuras

Conclusiones generales y proyecciones futuras

Conclusiones generales y proyecciones futuras

Conclusiones generales y proyecciones futuras

Capítulo 7

Materiales y Métodos

7-1 Materiales

7-1.1 Reactivos

Acetato de etilo	Sintorgan
Acetato de sodio	Aldrich
Acetonitrilo	J. T. Baker-Sintorgan
Ácido acético	Sintorgan
Acido Bórico	Gibco
Ácido clorhídrico (c)	Merck
Ácido p-toluensulfónico monohidrato	Aldrich
Ácido dicloroacético	Aldrich
Ácido tricloroacético	Aldrich
Ácido sulfúrico (c)	Merck
Acrilamida	Invitrogen
Adenosina	Aldrich - Fluka
Agarosa	Invitrogen
Agua deuterada	Aldrich
AIBN	Aldrich
Alcohol isoamílico	Aldrich
Amiduro de sodio	Aldrich
Amoníaco (c)	Merck- J. T. Baker
Anhídrido acético	J. T. Baker-Anedra
Argón	AGA
Azul de bromo fenol	Sigma
BDDDP	Riedel-de Haën
Benzofenona	Riedel-de Haën
Bicarbonato de sodio	Anedra
Bisulfito de sodio	J.T.Baker
Borohidruro de sodio	Aldrich
Bromuro de etidio	Gibco
Bromuro de metiltrifenilfosfonio	Aldrich
n-Butil litio 1.6 M en hexano	Aldrich
-Cianoetoxi-N,N-diisopropilaminoclorofosfina	ChemGenes
Citidina	Aldrich
Cloroformo	Sintorgan
Cloroformo deuterado	Aldrich
Cloruro de amonio	Merck
Cloruro de benzoílo	Aldrich
Cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo	Aldrich
Cloruro de magnesio	Aldrich
Cloruro de metoxioxalilo	Aldrich
Cloruro de p-toluensulfonilo	Aldrich
Cloruro de trimetilsililo	Aldrich
1,4-Diazabicyclo[2,2,2]octano	Aldrich
2,6-Diclorofenol	Aldrich
Diclorometano	Sintorgan-Merck
Dietilpirocarbonato	Aldrich
N,N-Diisopropiletilamina	Aldrich
4-Dimetilaminopiridina	Fluka
Dimetilformamida	Sintorgan

Materiales y Métodos - Capítulo 7

Dimetilsulfóxido	J. T. Baker
Dimetilsulfóxido deuterado	Aldrich
Dioxano	Sintorgan
Ditiotreitol	Aldrich
EDTA	Amresco - Gibco
Etanol absoluto	Sintorgan
Éter etílico	Sintorgan
5-Etiltietrasol	ChemGenes
Fase sólida (ADN)	ChemGenes
Fenol	Invitrogen
Fluoruro de tetrabutilamonio 1 M en THF	Aldrich
Formaldehido	Aldrich
Fosforamidas (ADN)	ChemGenes
Fosforamidas (2	

Trióxido de cromo	Anedra
TRIS	Invitrogen
Triton	Invitrogen
Trizol	Promega
Urea	Invitrogen
Uridina	Aldrich - Pharma
Xileno cianol	Sigma

7-1.2 Cromatografía, separación y purificación

Columna HPLC Kromasil 100 C ₁₈ (5 m 25 x 0.4)	Gibco
Placas de sílica gel 60F ₂₅₄ aluminio	Merck
Sílica C18	Amicon
Resina Dowex 50Wx4-200	Bio-Rad
Sephadex G-25	G.E Healthcare
Sílica gel 60F, grano 230-400	Merck
Membranas PDVF	Bio-Rad
Membrana Hybond N ⁺	Amersham

7-1.3 Enzimas

T4 polinucleótido quinasa	Invitrogen
Nucleasa RQ1	Promega
Nucleasa S1	Aldrich
BamH1	Roche
Inhibidor de RNAsa	Promega
T7 RNA polimerasa	Lab. Dr. Berzal
Taq certamp	Biotoools
Mung Bean	Epicentre
Taq	Biotoools
Inhibidores de Proteasas	Sigma
Flexi Rabbit Reticulocyte Lysate Systemde	Promega

7-1.4 Radioisótopos

γ - ³² P-Adenosina trifosfato	Perkin Elmer
α - ³² P-Adenosina, uridina, citidina, guanosina trifosfato	Perkin Elmer
L-[³⁵ S]-met L-[³⁵ S]	

Para DNA 691: Yanisch-Perron et. al. Gene 1985, 33, 103-107
plasmido PRLSV40

Para IRES-FLuc

Primer 5' T7P HCV

Primer 3' secpcDNA3

7-1.7 Buffers y soluciones

7-1.7.1 Southern blot

Buffer SSC (2x)

NaCl	0,3 M
Citrato de sodio	0,03 M
pH 7.0	

Buffer hibridización

PerfectHyb Plus Hybridization Buffer	SIGMA
--------------------------------------	-------

7-1.7.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS

Buffer L (1X)

TRIS BASE	0,35M
SDS	0,1%
pH=8,8	

Buffer M (1X)

TRIS BASE	0,15M
SDS	0,1%
pH=6,8	

Buffer de corrida (1X)

TRIS BASE	0,025M
SDS	0,1% (p/v)
Glicina	0,192M
pH=8,5	

Buffer de siembra (1X)

TRIS-HCl, pH6,8	10mM
SDS	2% p/v
EDTA	2Mm
Glicerol	5% (p/v)
-mercaptoetanol	1% (v/v)
Azul de bromofenol	0,1mg/ml

7-1.7.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida

TBE 5 x

Tris-HCl pH 8.3	445mM
Ácido bórico	44 mM

EDTA	10 mM
Buffer de siembra (desnat)	
TBE 1 x	
Urea	7 M
EDTA	17mM
Azul de bromofenol	0.1 %
Xileno cianol	0.1 %
Formamida	50%

7-1.7.4 Electroforesis en gel de agarosa

TAE 1x	
Tris/acetato	0.04M
EDTA	0.001M
Buffer de siembra	
Azul de bromofenol	0.4 %
Xileno cianol	0.4 %
Glicerol	50%
Agua	

7-1.7.5 Elución de ácidos nucleicos de geles de poliacrilamida

NH ₄ Ac	0.5M
SDS	0.1% p/v
EDTA	1mM
pH 8	

7-1.7.6 Reacción de hidrólisis de ARN utilizando DNazimas

Reacción	
Tris-HCl	50mM
pH 7.5	
Solución stop	
TBE 1 x	
EDTA	17 mM
Urea	7 M
Azul de bromofenol	0.1% p/v
Xileno cianol	0.1% p/v
Formamida	50%

7-1.7.7 HPLC

TEAA 10 x	
Acetato de trietilamonio	1M
pH 7	

7-1.7.8 Reacciones de marcación con $\gamma^{32}\text{P}$ en el extremo 5

Tripsina	BioRad
Optimem	Invitrogen
Oligofectamina	Sigma
Tamoxifeno	Aldrich
Anticuerpos primarios	Santa cruz
Anticuerpos secundarios	Sigma
Transfectin	BioRad
Suero fetal bovino	GIBCO
D-MEM /F-12, 1:1	GIBCO

7-1.10 Luminiscencia

ECL	GE Healcare Life Science
Placas fotosensibles	Kodak Scientific Imaging
Kit Dual-Luciferase reporter assay system	Promega

7-1.11 q-PCR

Hexámeros 10x	Applied Biosystem
RT MultiScribe	Applied Biosystem
PCR Master Mix 2x	Applied Biosystem
Sonda Taqman FT-275	Applied Biosystem
Pre-dev. Taqman 20x	Applied Biosystem

7-2 Equipamiento

RMN 500 MHz (UMYMFOR-Lanais)	Bruker
Rotavap	Büchi
Liofilizador	LABCON CO
Speed-vac	SAVANT
Sintetizador de Oligonucleótidos	ABI 392
	MARMADE 6
Espectrofotómetros UV-VIS	Ultraespec 2000 - Pharmacia
Nano drop	Thermo Scientific
HPLC-UV	Gilson
Luminómetro	FB12 Berthold
Phosphoimager -Storm	Applied Biosystem
Typhoon	GE healthcare
Mini-PROTEAN Tetra Cell	BIO-RAD
Trans-Blot Semi-Dry	BIO-RAD
Trans-Blot system	BIO-RAD
Densitómetro	BIO-RAD
Contador de centelleo	

7-3 Síntesis de monómeros

7-3.1 3

baño de hielo. Se deja reaccionar por 2 horas a temperatura ambiente. El transcurso de la reacción se controla mediante c.c.d. revelando por calentamiento a 50 C ya que el producto se descompone en contacto con la sílica dando una coloración marrón. Una vez completa, se vuelca la mezcla de reacción sobre AcOEt frío, se agrega sílica gel, se agita durante 15min y se filtra con microfibra de vidrio. El filtrado se concentra en vacío a temperatura menor a 30°C, se purifica en una columna de sílica gel sembrando el residuo en una pastilla y como solvente de elución se utiliza hexano:AcOEt 2:1.

Rendimiento 88,3% Mr: 484,7 Rf: 0.6 en hexano/AcOEt 1:2

Compuesto 3:

¹³C RMN (CDCl₃): (δ, ppm) 12.14, 12.32, 12.84, 12.92 (CHs isopropilos); 16.56, 16.59, 17.04, 17.19 (CH₃s isopropilos); 62.34 (C-5)

metilfenilfosfonio que no reaccionó, el exceso de NaNH_2 y el NaBr formado de la solución amarilla del iluro. Se elimina el NH_3 aplicando vacío a la mezcla y se vuelve a centrifugar. Posteriormente, se gotea lentamente la solución del iluro a una solución del compuesto **3** en tolueno. Se deja reaccionar durante 2 horas. a temperatura ambiente. La reacción se purifica directamente por columna de sílica gel en las condiciones citadas en A).

Rendimiento 60%.

Compuesto 4:

Espectro de ^{13}C RMN (CDCl_3): (δ , ppm) 12.50, 12.81, 12.97, 13.55 (CHs isopropilos); 16.80, 16.93, 18.98, 17.25, 17.32, 17.40 (CH_3 s isopropilos); 60.38 (C-5)

durante una hora y se controla por c.c.d. que no queden restos de reactivo. Luego, se agrega diazabicyclooctano, trietilamina y p-nitrofenol y se deja reaccionando por una noche a temperatura ambiente. Luego, se agrega diclorometano y se extrae con NaHCO₃ 1M. La fase orgánica se seca y se arma una pastilla de sílica. Los dos diastereómeros se purifican y separan en una columna de sílica con una mezcla de hexano: acetato de etilo 4:1 como solvente de elución.

Rendimiento 84-87%

Mr:605.8

Rf: 0.5-0.4 en hexano/AcOEt 2:1

Compuesto 6:

Espectro de ¹³C RMN (CDCl₃): (δ, ppm) 11.45 (CH₃); 12.48, 12.92, 12.98, 13.70 (CHs isopropilos); 16.88, 16.95, 17.04, 17.29, 17.31, 17.45, 17.47 (CH₃s isopropilos); 44,15 (C-2)

Compuesto 8:

Espectro de ^{13}C RMN (CDCl_3): (δ , ppm) 11.22 (CH_3); 12.50, 12.96, 13.39, 14.15 (CHs isopropilos); 16.78, 16.65, 17.22, 17.34, 17.52, 17.66, 17.79 (CH_3 s isopropilos); 43,99 (C-2)

7-3.8 (2)

7-3.9 (2)

7-3.10 (2'S) y (2'R)-2

A una solución de los compuestos **16** o **17** en piridina, enfriada en baño de hielo y bajo atmósfera de N₂ se le gotea lentamente cloruro de benzoilo. Se deja reaccionando a temperatura ambiente por dos horas. Luego, se evapora la piridina y se disuelve en CH₂Cl₂ y se extrae con NaHCO₃ 5% dos veces. El producto de extracción se purifica por cromatografía en sílica gel utilizando la mezcla hexano/AcoEt 1:1 como solvente de elución.

Rendimiento 91% **Mr:587,3** **Rf: 0,4 hexano/AcoEt 2:1**

Compuesto 18:

Espectro de ¹³C RMN (CDCl₃): (δ, ppm) 11.45 (CH₃), 12.49, 12.93, 13.01, 13.69 (CHs isopropilos); 16.90, 16.97, 17.04, 17.06, 17.28, 17.30, 17.40, 17.48 (CH₃s isopropilos); 44.75 (C-2)

Compuesto 21:

Espectro de ^{13}C RMN ($\text{CDCl}_3 + \text{PyD}_5$): (δ , ppm) 8.88 (CH_3), 44.24 (C-2)

7-3.14 (2)

7-3.15 2

7-3.17 5'-O-(4,4

Compuesto 30:

Espectro de ^{13}C RMN (CDCl_3): (δ , ppm) 62.34 (C-5)

Rendimiento 80% **Mr:716,3** **Rf: 0.6 hexano/AcOEt 2:1**

Compuesto 32:

Espectro de ^{13}C RMN (CDCl_3): (δ , ppm) 12.45, 12.53, 12.95, 13.47 (CHs isopropilos) 13.47, 16.75, 16.8, 16.90, 17.21, 17.23, 17.32, 17.42 (CH_3 s isopropilos); 60.80 (C-5)

7-3.22 (2)

7-3.23 5

7-4 **Síntesis de Oligonucleótidos**

7-4.1 **Síntesis**

Se utilizaron reactivos de la pureza requerida por los sintetizadores automáticos empleados. La pureza de las fosforamiditas fue evaluada mediante RMN 500MHz. Las DNazimas y oligonucleótidos fueron sintetizados con dos sintetizadores diferentes: Las condiciones de síntesis variaron dependiendo del sintetizador y de la modificación incorporada. A continuación se describen las condiciones para cada sintetizador:

Applied Biosystems 392 DNA/RNA synthesizer.

Para todos los casos se realizaron dos síntesis CE DMT-ON de 40nmol. Para el caso de oligonucleótidos modificados con 2'-desoxi-2'-C-metilnucleósidos, se variaron las condiciones estándar de los ciclos de síntesis. El paso 26 del ciclo para ADN (wait funcion 103) se modifica a 420seg para las fosforamiditas modificadas. El producto de ambas síntesis se purificó de forma conjunta.

Mermade 6 synthesizer

Para todos los casos se realizó una síntesis CE DMT-ON de 50nmol. Para las DNazimas modificadas se aumentaron al triple los tiempos de acoplamiento y se duplicó esta reacción

Luego de la síntesis se tratan los oligonucleótidos con amoníaco concentrado a 37 C durante una noche. Luego, se evaporan a sequedad en speed-vac, agregando durante el proceso de evaporación sucesivamente gotas de trietilamina de modo de no desproteger la posición 5

deseado. Las composiciones de las alícuotas se controlan por HPLC utilizando como solventes de elución TEAA 1x y ACN y el programa:

Tiempo (min)	% ACN
0	16
8	22
28	30
35	60
50	16
Flujo 0,7ml/min	

7-4.3 Desprotección del extremo 5'

El grupo protector dimetoxitritilo, se elimina con 300ul de HAcO 80% por cada 100nmol de oligonucleótido. Se deja reaccionar durante 1h a temperatura ambiente. Luego, se agrega igual volumen de etanol. Se evapora en speed-vac, agragando varios veces etanol y volviendo a evaporar. Por último, se agrega aproximadamente 500ul de agua estéril y se extrae con éter etílico 3 veces. Las pureza de las alícuotas se controlan por HPLC utilizando como solventes de elución TEAA 1x y ACN y el programa:

Tiempo (min)	% ACN
0	7
10	16
Flujo 0,7ml/min	

Las DNazimas y oligonucleótidos puros se liofilizan y se diluyen en agua estéril. Se mide la absorbancia a 260nm utilizando un nanodrop.

7-5 Modelado Molecular

7-5.1 Minimización y análisis conformacional de monómeros

La minimización y análisis conformacional de los nucleósidos modificados se realizó inicialmente con el programa Hyperchem 8.0 utilizando técnicas de mecánica molecular con el campo AMBER de este programa. Esta primera etapa, se realiza sin tener en cuenta los efectos de solvente, es decir en vacío. Sobre los mínimos conformacionales obtenidos, se realizaron cálculos mecanocuánticos utilizando el programa Gaussian 03W 6.0. Cada mínimo es primero sometido a una optimización de geometría a nivel de HF con bases 3-21G. Las

estructuras resultantes son la base para una nueva minimización más rigurosa utilizando MP2 6-31G(d).

Las estructuras de mínimos conformacionales obtenidos a nivel MP2 6-31G(d) fueron el punto de partida para simular los espectros de RMN en agua. En esta etapa, se utiliza el programa Gaussian 03W con el método GIAO a nivel HF 6-31G(d), la solvatación fue tenida en cuenta utilizando como modelo IEF-PCM y agua como solvente. Los resultados obtenidos fueron comparados con los espectros de RMN obtenidos experimentalmente.

7-5.2 Dinámicas moleculares de secuencias de loops simple cadena

Para realizar las dinámicas moleculares de los loops, se utilizó el programa AMBER 9. Las estructuras utilizadas fueron obtenidas de las bases de datos disponibles como archivos del tipo pdb y corresponden a estructuras analizadas por rayos X o RMN. Posteriormente, se las modifica con los nucleósidos modificados de interés.

Se utiliza el campo de fuerzas el **parm99.ff00** modificado con el campo **parmbsc0** el cual incluye mejoras para el análisis de ácidos nucleicos. Para los nucleótidos naturales se utilizaron las librerías de nucleótidos incluidas en el programa AMBER 9. Para los nucleótidos modificados se generaron los archivos de parámetros tomando como base las librerías existentes para nucleótidos naturales y editando las conectividades, ángulos, distancias y cargas según los parámetros obtenidos en la minimización y estudio conformacional de los monómeros. Las librerías de los nucleósidos modificados están detalladas en el Apéndice.

Una vez establecidos el campo de fuerzas y las librerías para todos los nucleótidos, se utiliza el modulo **Leap** del programa AMBER 9 para editar las secuencias. Este módulo permite completar con los átomos de hidrógeno ausentes en los archivos pdb, neutralizar las cargas negativas por adición de iones Na^+ y rodear al oligonucleótido con una caja de agua. Para este estudio se utiliza el modelo de aguas del tipo TIP3P formando una caja octaédrica de 12Å. El módulo Leap permite generar los archivos de topologías y coordenadas de todos los átomos incluidos en el sistema de estudio.

Una vez obtenidos los archivos de topologías y coordenadas se procede a realizar una minimización de la estructura. En primer lugar, se realizan ciclos de steepest descent para luego terminar con ciclos de gradiente conjugado. Posteriormente, partiendo de las estructuras minimizadas se realiza una termalización desde 0K a 355K utilizando dinámicas de langevin. Nuevamente, se obtienen los archivos de topologías y coordenadas para las estructuras

minimizadas que son el punto de partida para realizar las dinámicas moleculares. En el Apéndice se detallan los archivos con las condiciones utilizadas para cada tipo de ciclo de minimización o termalización.

Por último, se corrieron 15ns de dinámica molecular utilizando Particle Mesh Ewald (PME), los archivos y parámetros utilizados se detallan en el Apéndice.

Para analizar y visualizar los resultados de las trayectorias y de estructuras promedio se utiliza el módulo **ptraj** del programa AMBER 9 y el programa VMD y para analizar los parámetros propios de la estructura de ácidos nucleicos se utiliza el programa X3DNA.

7-6 Reacción de corte con sustratos cortos

7-6.1 Geles de poliacrilamida

En esta etapa, se usaron geles de poliacrilamida al 20% en condiciones desnaturalizantes

Urea	5mg
Acrilamida:NN-bisacrilamida. 40% (38:2)	5ml
TBE 5x	2ul
Agua	3ml
PSA 10%	100ul
TEMED	15ul

Se utiliza la cuba miniprotean tetra de Bio-Rad. El buffer de corrida es TBE 1x y la electroforesis se lleva a cabo a 15-20mA/minigel. Finalizada la separación, los geles se lavan con una solución de Agua/HAc/MeOH 8:1:1 durante 1h. para eliminar la urea y luego se secan para su posterior cuantificación.

7-6.2 Reacción de marcación

Se coloca 2ul de buffer A 10x, el ARN a marcar en 5' (hasta 500ng), 20uCi de γ -ATP ^{32}P y agua estéril hasta un volumen final de 20ul. Luego, se adicionan 20U de T4 polinucleótido quinasa y se incuba a 37 C durante una hora. La reacción se enfría en hielo y se agrega agua hasta alcanzar un volumen final de 100ul. Se extrae con 100ul de cloroformo/alcohol isoamílico 24:1 y la fase acuosa se purifica por sephadex-G25. La marca

de las alícuotas se determina con un contador de centelleo y la integridad del ARN marcado se controla con un gel de poliacrilamida al 20% en condiciones desnaturalizantes.

7-6.3 Reacción de hidrólisis

La reacción de corte con sustratos cortos se llevó a cabo en buffer Tris-HCl 50mM, pH 7.5. En un eppendorf se colocaron 10.000 cuentas del ARN de 17nt. marcado radiactivamente, 10pmol de ARN frío, 100pmol de DNazima y buffer hasta 20ul. La mezcla se desnaturaliza a 95 C durante un minuto luego se coloca a 37 C por 5 min. Transcurrido este tiempo, se extrae la alícuota de tiempo cero y se agrega MgCl₂ de modo de alcanzar la concentración deseada (0,5; 1; 5 o 10mM). Se extraen alícuotas de 0.75ul a diverso tiempos, se colocan en 10ul de buffer de corte y se enfría en hielo. Los productos de reacción se separan en un gel de poliacrilamida al 20% en condiciones desnaturalizantes. El gel seco se expone a una placa sensible a ³²P. Luego, se determina la marca radiactiva utilizando STORM y se cuantifica con el programa Image-Quant 5.0.

7-7 Ensayos de inhibición del RE-α en células MCF-7

7-7.1 Transfección

Los ensayos con células MCF-7 se realizaron en placas de 60mm de diámetro para realizar western blots y en placas de parmanox (Lab-Tek) de 8 pocillos para ensayos de microscopia confocal. Luego de 24h. de crecimiento en estufa a 37 C y 5% de CO₂, se corrobora que la confluencia se encuentre entre un 50 y 60% y se procede a la transfección. Para ello, se extrae el medio de crecimiento y se lavan con PBS 1x dos veces. Las DNazimas, disueltas en Opti-MEM, se incuban junto con la oligofectamina en Opti-MEM, por 20min a temperatura ambiente. La mezcla de transfección se gotea lentamente en la placa y se incuba por 4 horas en estufa de cultivo a 37°C y 5% de CO₂. Luego de este tiempo, se adiciona medio de crecimiento con suero fetal bovino 3x charcolizado. La siguiente tabla indica las cantidades utilizadas.

	DNazima/ODN [nmol]	Opti-MEM [ul]	Oligofectamina [ul]	Opti-MEM [ul]	Medio sin SFB [ul]	Vol. final [ul]	Medio con SFB 3x [ul]
Westrn blot	0.1	262	6	22,5	1200	1500	750
Confocal	0.013	32	1,6	6	160	200	100

7-7.2 Western Blot

Una vez finalizados los tratamientos, las células se lavan dos veces con PBS 1x, se traspasan a eppendorf y se centrifugan. Luego, se descarta el sobrenadante y se agrega buffer de lisis RIPA e inhibidores de proteasas, se incuba en hielo por 1h. Se centrifuga a 12.000rpm durante 20 minutos a 4°C. Se determina la concentración de proteínas del sobrenadante por el método de Bradford. Se siembran 50ug de proteína total disueltos en buffer de siembra, se calientan a 100 C por 2 min. y se separan en un gel de acrilamida con SDS al 12%. Las bandas se transfirieron a membranas de PDVF previamente activadas en metanol, se bloquearon toda la noche a 4°C con una solución 5% de leche descremada en PBS-Tween 0,1%, y se incubaron con los anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C. Luego se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS-Tween 0,1% y se incubaron los anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa durante una hora a temperatura ambiente y con agitación. La reacción antígeno-anticuerpo se detectó por reacción de quimioluminiscencia (ECL, GE) y placas fotosensibles. Se utilizó un densitómetro (Bio-Rad) para medir las bandas obtenidas y se utilizó el programa Molecular Analyst para cuantificarlas.

7-8 Reacción de corte in vitro

7-8.1 Procedimientos generales

7-8-1.1 **Purificación y precipitación de ARN o ADN**

Para purificar y precipitar ARN o ADN se llevó a cabo el siguiente protocolo:

- 1) Llevar hasta 150ul con agua estéril.
- 2) Extraer con 150ul de fenol, centrifugar por 3 min. a 13000rpm.
- 3) Tomar la fase acuosa y agregar 150ul de cloroformo-isoamílico 24:1. Extraer, centrifugar 3 min a 13000rpm.
- 4) Tomar la fase acuosa y agregarle 3 volúmenes de EtOH absoluto (450ul) y 0,1volúmenes de Na₂AcO 3M pH 6,1 (15ul) en el caso de ADN y pH 5,2 para precipitar ARN. También se puede agregar glucógeno para favorecer la precipitación.
- 5) Llevar a -20°C por 30min
- 6) Centrifugar a 13000g a 4°C durante 30min. Descartar el sobrenadante.
- 7) Agregar 250ul de EtOH 80%. Volver a centrifugar a 4°C por 5min.
- 8) Decantar el EtOH y colocar en el speed-vac sin secar la muestra por completo.
- 9) Resuspender en agua estéril y purificar, si es necesario, por sephadex-G25.

10) Medir la concentración con nano-drop o quickcounter dependiendo si tiene o no marca radiactiva.

7-8-1.2 Cuantificación de ARN radiactivo

Para conocer la concentración de un ARN marcado radiactivamente, se determinan las DPM utilizando un quickcounter y se aplica la siguiente fórmula:

$$[X] = \frac{DPM \times 1\mu Ci \times A}{2.2 \times 10^6 \times DPM \times B \times C \times f \times V}$$

Donde:

DPM = desintegraciones por minuto

A= pmol de UTP frío

B= cantidad de U por molécula de ARN

C= uCi UTP por reacción

f= factor de decaimiento de ³²P

V= volumen final

Día	f
-5	1.277
-4	1.216
-3	1.159
-2	1.100
-1	1.050
1	0.952
2	0.906
3	0.863
4	0.822
5	0.782

7-8-1.3 Geles de Poliacrilamida

En esta etapa, se usaron geles de poliacrilamida al 4% en condiciones desnaturalizantes.

Se utilizan geles de 10x20cm aproximadamente. Para 60ml gel se utiliza:

Urea	24,2mg
Acrilamida:NN-bisacrilamida 40% (38:2)	6ul
TBE10x	6ul
PSA 10%	375ul
TEMED	37,5ul

La corrida se realiza con buffer TBE 0,5X a 33mA. Una vez separadas las bandas, los geles se secan para su exposición y cuantificación

7-8.2 Síntesis del ADN molde para el sustrato 5'HCV-691

Se utiliza la construcción pU5'HCV-691 la cual deriva del plásmido puc19. Contiene la secuencia del genoma de HCV-1b desde la posición 1 a la 691 y en el extremo 5' tiene

incorporado la secuencia promotora para la T7 ARN polimerasa. Esta construcción fue digerida con BAMH1 y el producto linealizado fue utilizado para la transcripción del ARN sustrato 5'HCV-691.

Digestión de pU5'HCV-691 con BAM-H1:

BamH1 10U/ul	3ul
Buffer 10x	3ul
ADN	20ug
H ₂ O hasta Vol. final	30ul

La reacción se incubaba a 37°C por 2h, luego se analiza el estado de la reacción separando los productos de la misma en un gel de agarosa al 0,8% con 0,5ug/ml de bromuro de etidio. El producto de reacción, se extrae con fenol y cloroformo-isoamílico, se precipita y purifica por sephadex-G25, posteriormente se utiliza para realizar la transcripción del sustrato 5'HCV-691.

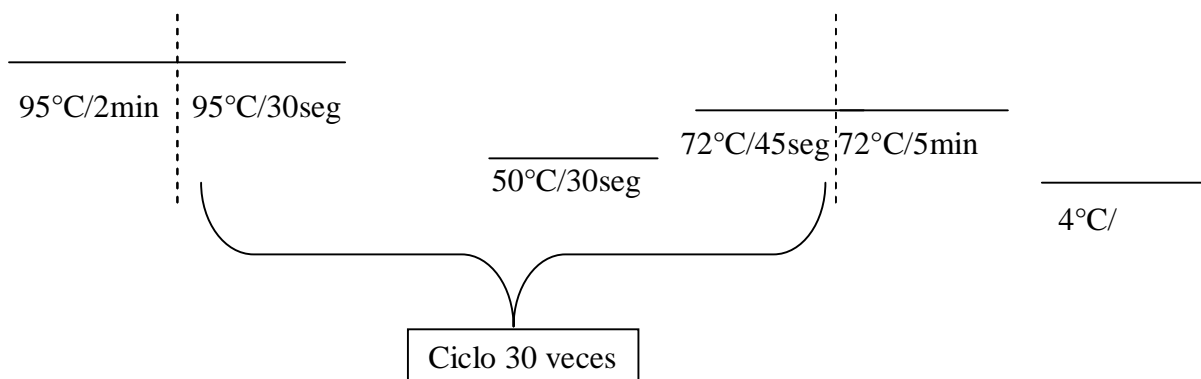
7-8.3 Síntesis del ADN molde para sustrato 5'HCV-356

Este ADN contiene los primeros 356nt del genoma del HCV. Se obtiene por PCR utilizando la construcción pU5'HCV-691 y los primers adecuados.

Reacción de PCR:

		Blanco
Primer 5'(5'T7HCV) (10pmol/ul)	2,5ul	2,5ul
Primer 3'(asHCV-372) (10pmol/ul)	2,5ul	2,5ul
dNTPs (2,5mM)	4ul	4ul
Buffer PCR 10x	5ul	5ul
ADN(PU 691)(50ng/ul)	1ul	-
TAQ (1U/ul)	1ul	1ul
Agua	34ul	35ul
Volumen Final	50ul	50ul

Programa de PCR:



Finalizada la PCR, se controla la pureza del ADN por gel de agarosa al 2% con 0,5ug/ml de bromuro de etidio. Se lleva hasta 150ul con agua, se purifica por extracción fenólica y con cloroformo-isoamílico y posteriormente se precipita. El precipitado se resuspende en agua estéril y se determina la concentración. Este ADN se utiliza para la transcripción del sustrato 5'HCV-356.

7-8.4 Transcripción de los sustratos 5'HCV-356 y 5'HCV-691

La transcripción de los sustratos 5'HCV- 356 y 5'HCV-691 se llevó a cabo tanto con marca radiactiva (caliente) como sin marca (frío).

Reacción de transcripción:

	Frío	Caliente
ADN molde	1 a 3 ug	1 a 3 ug
Buffer T7 ARN polimerasa (10x)	5ul	5ul
NTPs 10mM (10x)	5ul	-
NTPs 10mM - UTP en 1mM (10x)	-	5ul
$\alpha^{32}\text{P}$ -UTP 10uCi/ul	-	3ul
DTT 0,1M (10x)	5ul	5ul
Triton 0,1% (10x)	5ul	5ul
Inhibidor de RNAsa	0,5ul	0,5ul
T7 ARN polimerasa	3ul	3ul
H ₂ O hasta Volumen Final de	50ul	50ul

La reacción se incubaba a 37°C durante dos horas, luego se adiciona una unidad de RQ1 DNAsa por ug de ADN molde, se deja 30min a 37°C. Finalmente, se añade igual volumen de buffer de carga desnaturante 2x y se separan los productos en un gel de poliacrilamida al 4% en condiciones desnaturantes. Para el transcripto 5'HCV-691 esta etapa no se realiza ya que el ADN molde y el ARN difieren bastante en su peso molecular y pueden ser discriminados en un gel de acrilamida. Para detectar la banda correspondiente al ARN transcripto, el gel húmedo se expone unos minutos ante una placa radiográfica, para el caso de transcriptos radiactivos, o ante una placa de sílica gel con indicador fluorescente para transcriptos fríos. Se extrae el ARN de la banda del gel utilizando 300ul de buffer de elución a 4°C durante una noche. Por último, se purifica por extracción con fenol y cloroformo-isoamílico y se precipita. El ARN resultante se resuspende y se determina su concentración.

7-8.5 Reacción de hidrólisis de transcriptos con DNazimas

Reacción de corte:

Buffer 2X (Tris-HCl 100mM pH7,5 20mM MgCl ₂)	5ul
ARN ³² P	1ul (aprox 0.03pmol)
ARN frío	10pmol
DNAzima	100pmol
H ₂ O hasta volumen final	10ul

Se mezclan los reactivos y se desnaturalizan a 65°C durante 10min, luego se incuba la reacción a 37°C durante 1h. Finalizado este tiempo, se agregan 10ul de buffer desnaturalizante 2x. Se separan los productos de hidrólisis en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 4%. El gel seco, se expone en una placa sensible a ³²P o bien a una placa radiográfica y luego se revela.

7-9 Reacciones de Traducción in vitro

7-9.1 Obtención del ARN CAP-RLuc

7-9.1.1 Obtención del ADNmolde

Digestión del plásmido PRLSV40 con BamH1

ADN	20ug
Buffer 10x	10ul
BAMH1 10U/ul	5ul
H ₂ O hasta Vol. final	100ul

La reacción se incuba a 37°C por 2h, luego se analiza el estado de la reacción corriendo una alícuota de la misma en un gel de agarosa al 0,8% con 0,5ug/ml de bromuro de etidio. Se extrae con fenol y cloroformo-isoamílico, se precipita y cuantifica.

7-9.1.2 Transcripción

La transcripción (aprox 800nt) se realiza con el kit RIBO MAX Large Scale (Promega).

ADN molde	2,7ug
NTPs (25mM-GTP 2mM)	15ul
Buffer 5x	10ul
T7ARNpolimerasa	5ul
7metilG-Análogo de CAP(40mM)	3,75ul
H ₂ O hasta volumen final	50ul

Se incuba la reacción a 37°C por 2h. Transcurrido este tiempo, se agrega 5 unidades de RQ1 DNAsa y se deja por 30min a 37°C. Luego se extrae con fenol, CHCl₃-isoamílico y

precipita. Por último, se purifica por sephadex G25. Para corroborar la integridad del ARN se corre un gel de agarosa al 0,8% con formaldehído 2M. En este caso se utiliza buffer se siembra desnaturalizante y las muestras se calientan a 95°C por 1min antes de sembrarla. El gel se tiñe posteriormente con bromuro de etidio.

7-9.2 Obtención ARN-IRES- FLuc

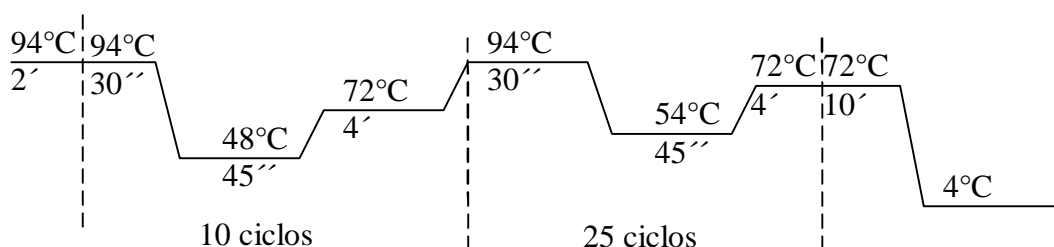
7-9.2.1 Obtención del ADNmolde

Este ADN se obtiene por PCR (2200nt)

Reacción:

		Blanco
Primer 5´T7P HCV 50pmol/ul	1ul	1ul
Primer 3´secpcDNA3 50pmol/ul	1ul	1ul
dNTPs (2,5mM)	8ul	8ul
Buffer (10x) (ojo es un buffer para PCR especiales)	10ul	10ul
ADN Template 100ng/ul	1ul	-
Taq certamp(1u/ul)	2ul	2ul
MgCl2 (50mM)	5ul	5ul
Agua hasta volumen final de	100ul	100ul

Condiciones de los ciclos de PCR:



Los primeros 10 ciclos son diferentes debido a que los primers no aparean bien, entonces se baja un poco la temperatura del ciclo a 48°C para favorecer el apareamiento. Luego, en los 25 ciclos siguientes se aumenta un poco la temperatura para alcanzar el valor óptimo de la Taq. Finalizada la PCR, se analiza la presencia de secuencias inespecíficas mediante un gel de agarosa al 0,8% con 0,5ug/ml de bromuro de etidio. Si no se observan secuencias inespecíficas, se purifica por extracción fenólica, cloroformo-alcohol isoamílico y luego se precipita. Si las hubiera, primero se debe purificar por gel de agarosa.

7-9.2.2 Transcripción

Reacción de transcripción:

ADN molde	6ug
NTPs (25mM)	30ul
Buffer 5x	20ul
T7ARN polimerasa	10ul
H ₂ O hasta volumen final de	100ul

Procedimiento ídem 7-9.1.2.

7-9.3 Reacción de traducción en lisado de reticulocitos

La reacción se llevó a cabo utilizando el kit Flexi Rabbit Reticulocyte Lysate System (Promega).

Reacción:

		Blanco
Extracto celular	4ul	4ul
Mix Aa sin Metionionina (1mM)	0,12ul	0,12ul
KCl(2,5M)	0,24ul	0,24ul
Mix L-[³⁵ S]-Met L-[³⁵ S]		

7-9.3.1 Electroforesis

Alícuota de reacción	2ul
H ₂ O	3ul
BufferLaemli 2X	5ul

Las alícuotas se desnaturalizaron a 95°C durante 40 segundos, luego se colocaron en hielo por 15min. Gel poliacrilamida desnaturalizante 12,5% p/v

Resolving (5ml)		Stacking (5ml)	
H ₂ O	1,68ml	H ₂ O	2,9ml
Buffer L	1,25ml	Buffer M	1,25ml
Acril:Bis 30:0,8	2,01ml	Acril:Bis 30:0,8	0,9ml
APS 10%	12,5ul	APS 10%	25ul
TEMED	20ul	TEMED	12,5ul

Se utiliza running Buffer con SDS 1x. Se fijan los voltios para no superar los 25mA. Se seca el gel y se expone por un mínimo de 5 h.

7-10 Ensayos de Traducción en células Huh-7

7-10.1 Crecimiento de células en placas de 24 pocillos

Un cultivo de células Huh-7 se hace crecer en medio DMEM con 10%SFB a 37 C y 5% de CO₂. Se realiza el conteo de células en una cámara de Neubauer y se separa la cantidad necesaria para sembrar 90.000 células por pocillo. Se centrifugan y resuspenden en el volumen necesario de DMEM 10%SFB para que queden 90.000 células/0,5ml (1500g 5min). Se resuspende muy bien y (para placas de 24 wells) se agregan 0,5ml por pocillo con cuidado de no hacer espuma. Los pocillos que no se usen igualmente tienen que estar cargados con medio para mantener la humedad de la placa. Una vez cargados todos los pocillos se hacen movimientos para que las células no queden en el centro y se ubiquen homogéneamente por toda la superficie del pocillo. Se dejan en estufa a 37°C durante 24h antes de realizar la transfección.

7-10.2 Transfección

Luego de 24h de crecimiento se desarrolla el siguiente protocolo:

- 1) Calentar durante 2min a 95°C separadamente el material a transfectar: la DNAzima, el IRES-FLuc y el CAP-RLuc. Luego dejar en hielo 15min.

2) En un tubo de poliestireno agregar (el uso de eppendorf dificulta el proceso de formación del complejo de transfección):

1ug ARN IRES-FLuc
0,5ug ARN CAP-RLuc
50ul OPTIMEM

3) Agregar la DNAzima al tubo de 2)

4) En otro tubo de poliestireno colocar:

50ul Optimem
3ul Transfectin (BIO-RAD)

5) Agregar el tubo de 4) al de 3)

6) Incubar 20 min sin agitación a temperatura ambiente.

7) Agregar al pocillo de a gotitas sin tocar el medio y tratando que sea lo más homogéneo posible.

8) Llevar a estufa de 37°C durante 18h para luego hacer la medición de eficiencia de traducción.

7-10.3 Medición de traducción

Luego de 18h de transfección de los ARNm y de las DNAzimas se lleva a cabo el siguiente protocolo:

- 1) Sacar el medio a los pocillos.
- 2) Lavar con 0,5ml de PBS 1x por pocillo, sacar el PBS
- 3) Agregar 100ul de Buffer de lisis 1x por pocillo (Promega- Passive Lysis buffer). Agitar por 5min (250rpm) hasta ver que se forman hilos debidos a la lisis celular. Resuspender bien todo el pocillo, pasar el contenido a un eppendorf. Centrifugar 30seg a 8000g
- 4) Medir luminiscencia con 20ul del sobrenadante utilizando el Kit Dual-Luciferase reporter assay system (Promega) (de 20 a 50ul según como haya sido la eficiencia de transfección).

7-11 Reacción de corte en células Huh-7NS3

7-11.1 Transfecciones

Idem transfecciones en Huh-7 pero en este caso solamente se transfectan 4.5ug de DNazima o scramble

7-11.2 Extracción de ARN total con TRIZOL

Luego de 18h de transfección se lleva a cabo el siguiente protocolo:

- 1) Lavar el cultivo con PBS 1x.
- 2) Añadir 200ul de Trizol, resuspender con una pipeta para favorecer la progresión de la lisis.
- 3) Pasar a un tubo e incubar las muestras bien homogeneizadas durante 5

dNTPs 25x	0,8ul
Buffer 10x	2ul
RNA guard (inh de RNAsas)	0,5ul
RT MultiScribe (Applied Biosystem)	0,5ul
H2O hasta Vol. Final	10ul

Se incuba durante 30min a 16°C y luego se incrementa la temperatura hasta 42°C. Una vez alcanzada esta temperatura se mantiene por 30min. Luego, se inactiva la enzima aumentando la temperatura a 85°C durante 5min. Posteriormente, se enfría a 4°C y congela a -20°C hasta su uso. Se realiza un blanco para GAPDH realizando el mismo proceso pero sin adicionar RT-MultiScribe.

7-11.3.2 q-PCR:

Se utilizan placas de 96 pocillos,

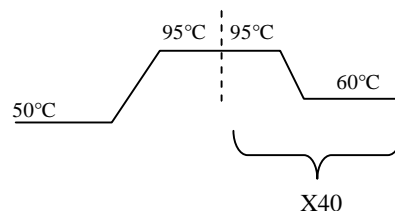
Para IRES de HCV:

cDNA	3ul
Sonda Taqman FT-275 (6pmol/ul)	0,5ul
Primer C-149 (10pmol/ul)	1ul
Primer C-342 (10pmol/ul)	1ul
PCR Master Mix 2x (applied Biosystem)	7,5ul
H ₂ O hasta Vol. final	15ul

Para GAPDH:

cDNA	3ul
Pre-dev. Taqman 20x (Applied Biosystem)	0,75ul
PCR Master Mix 2x (applied Biosystem)	7,5ul
H ₂ O hasta Vol. final	15ul

Ciclo:



7-12 Estabilidad de DNAsimas en células Huh-7

7-12.1 Extracción de ARN total y DNAsimas con Trizol

- 1) Lavar el cultivo con PBS 1x. Añadir 1 ml de Trizol por pocillo
- 2) Pasar a un tubo e incubar las muestras bien homogeneizadas durante 5

Gel desnaturalizante poliacrilamida 12%:

Para 15ml:

Urea	6,3gr
Acrilamida 38% Bis2%	4,5ml
TBE 10x	1,5ml
TEMED	9,4ul
APS 10%	94ul

La electroforesis se realiza en minigeles de 0.8mm a 15mA. Se utiliza buffer desnaturalizante con formamida y las muestras se calientan durante 1min a 95 C antes de sembrarse en el gel.

7-12.3 Transferencia

La transferencia se llevó a cabo con el siguiente protocolo:

- 1) Equilibrar el Gel en TBE 1x por 15min
- 2) Cortar membrana (Hybond N+ Amersham) y dos papeles Whatman del tamaño del gel. Humedecerlos en TBE 1x
- 3) Usar Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell de Bio-Rad
- 4) Montar el sandwich en el Semi-dry de la siguiente manera:

Ánodo
Papel de filtro
Membrana
Gel
Papel de filtro
Cátodo

Cuidar que no queden burbujas, empujarlas con una botellita o varilla. Marcar la posición del gel en la membrana

- 5) Transferencia: 300mA 30min
- 6) Fijar la membrana con UV (setear: 70000uJ/cm²) 15min de cada lado.

7-12.4 Hibridación

Para detectar las DNAzimas y el tARN en las membranas se llevó a cabo el siguiente protocolo de hibridación:

- 1) Humedecer la membrana en buffer SSC 2x (dejarlo aprox. 30min)
- 2) Pasar a la botella de hibridación
- 3) Agregar 7ml de buffer de hibridación (PerfectHyb Plus Hybridization Buffer SIGMA) y la sonda marcada.
- 4) Colocar en horno de hibridación a 65°C por 20 min.
- 5) Pasar a horno de hibridación a 40°C. Dejar ON
T_m DNAzima 219: 67°C
T_m s_{hs}U6snRNA: 68,9 °C
- 6) Sacar la sonda (guardarla, se puede reutilizar varias veces)
- 7) Lavar con SSC 2X por 15min 2 veces
- 8) Lavar con SSC 2X 0.2%SDS 2 o 3 veces 15min a 40°C
- 9) Sacar la membrana, secar un poquito y colocar en bolsa plástica y exponer ON.

7-13 Estabilidad de DNazimas

7-13.1 Estabilidad en DMEM 10%SFB:

Las DNazimas se desnaturalizan previamente durante un minuto a 95°C. Luego se lleva disueltas en DMEM 10%SFB en la siguiente proporción:

DMEM 10%SFB	20ul
DNazima	2ug

Se extraen alícuotas a 0, 8, 24, 32, 48, 72 y 96 horas, se agrega buffer desnaturizante 2x y los productos de degradación se separan en un gel de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturizantes. Los geles se colocan en una solución 1:10000 del agente intercalante fluorescente Start Gel (LONZA) en TBE1x durante 30min. Las bandas se detectan al scanear el gel con la opción de fluorescencia del Typhoon (Amersham).

7-13.2 Estabilidad ante nucleasas comerciales

Las DNazimas se desnaturalizan previamente durante un minuto a 95°C. Luego se lleva a cabo la siguiente reacción:

	RQ1	Mung Bean
DNazima	20ug	20ug
Buffer 10x	4ul	4ul
Nucleasa	0.4U	0.6U
H2O hasta Vol. Final	40ul	40ul

Se extraen alícuotas a 0, 10, 20, 30, 60, 90 y 120 minutos, se agrega buffer desnaturizante 2x y los productos de degradación se separan en un gel de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturizantes. Los geles se colocan en una solución 1:10000 del agente intercalante fluorescente Start Gel (LONZA) en TBE1x durante 30min. Las bandas se detectan al scanear el gel con la opción de fluorescencia del Typhoon (Amersham).

Anexo

Abreviaturas

5ETT	5-etiltio-1H-tetrazol
A	Adenosina
Aa	Amionácido
AchR	Receptor de acetilcolina
ACN	Acetonitrilo
AcO	Acetato
AcoEt	Acetato de Etilo
ADN	Acido desoxiribonucleico
AIBN	Azo-bis-isobutironitrilo
anh.	Anhidro
ARN	Ácido ribonucleico
BDDDP	2-tertbutilimino-2-dietilamino-1,3-dimetilperhidro-1,3,2-diazafosforin
BzCl	Cloruro de benzoílo
C	Citidina
CCD	Cromatografía en capa delgada
CPG	Esferas de vidrio de poro controlado
DABCO	Diazabiciclooctano
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DCA	Ácido dicloroacético
DCM	Diclorometano
DEPC	Dietilpirocarbonato
DLST	Dihidrolipoamida succiniltransferasa
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMT	Dimetoxitritilo
DMTCl	Cloruro de dimetoxitritilo
DMT-OFF	Secuencias sin dimetoxitritilo en 5'
DMT-ON	Secuencias con dimetoxitritilo en 5'
DNAzima	Desoxirribozima
DPM	Desintegraciones por minuto
DTT	1,4-ditiotritol
Dz	Desoxirriboxima
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
Egr-1	Early growth response factor-1
ER- α	Receptor de estrógeno α
FDA	Food and Drug Administration
FLuc	Luciferasa Firefly
G	Guanosina
HCV	Virus de hepatitis C

Anexo

HF	Hartree-Fock
HPLC-RP	Cromatografía líquida de alta resolución - fase reversa
IRES	Internal ribosome entry site
LNA	Lock nucleic acids
MP	Moller-Plesset
MPA	Acetato de medroxiprogesterona
NMI	N-metilimidazol
nt	Nucleótido
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1
PBS	Buffer fosfato salino
PDVF	Fluoruro de poliviniliden
Py	Piridina
RLuc	Luciferasa de Renilla
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMSD	Desviación cuadrática media
RNAi	ARN de interferencia
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
siRNA	Small inhibitory RNA
SSC	Citrato de sodio salino
STAT-3	Signal transducer and activator of transcription
T	Timidina
TAE	TRIS acético EDTA
Tamb	Temperatura ambiente
TBAF	Fluoruro de tetrabutilamonio
TBE	Tris/Borato/EDTA
TCA	Tricloroacético
TEA	Trietilamina
TEAA	Trietilaminoacético
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilediamina
TET	Tetrazol
THF	Tetrahidrofurano
TIPDSCI	1,3-dicloro-1,1,3,3-tetraisopropil-1,3-disiloxano
TMS	Trimetilsilano
TMSCl	Cloruro de tetrametilsilano
TNF	Tumor necrosis factor-alpha
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
U	Uridina
UTR	Untranslated Region
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VDUP1	Vitamin D3 upregulated protein-1

Publicaciones

Este trabajo de tesis dió origen a las siguientes publicaciones científicas:

10-23 DNAzyme modified with (2'R)- and (2'S)-2'-deoxy-2'-C-methyluridine in the catalytic core.

Laura Robaldo, Javier M Montserrat and Adolfo M Iribarren

Bioorg. Med. Chem. Lett. **2010**, 20, 15, 4367-70.

Influence of conformationally restricted nucleosides on the activity of 10-23 DNAzymes.

Laura Robaldo, Javier M. Montserrat, Adolfo M. Iribarren.

Bioorg. Med. Chem. Lett. (Enviado para su publicación)

Espectros de RMN

A continuación se listan los espectros de RMN-500MHz para ^1H , ^{13}C y ^{31}P de las fosforamiditas modificadas sintetizadas en este trabajo de tesis. Estas fosforamiditas fueron empleadas para la síntesis de las DNAzimas modificadas.

Para todos los casos, el solvente utilizado es cloroformo deuterado con tetrametilsilano como referencia. En estos espectros pueden observarse las señales de trietilamina la cual fue agregada intencionalmente para evitar la desprotección del extremo 5' por la acidez propia del cloroformo. En algunos casos se distinguen trazas de acetato de etilo ya que se emplea en el proceso de purificación de las fosforamiditas.

Anexo

(2

Anexo

(2

Anexo

(2

Anexo

(2

Anexo

(2

Anexo

(2

Anexo

(2

Anexo

(2

Anexo

(2

Anexo

(2

Anexo

(2

Anexo

(2

Anexo

5'-O-(4,4

Anexo

5'-O-(4,4

Anexo

5'-O-(4,4

Anexo

5'-O-(4,4

Anexo

5'-O-(4,4

Anexo

5'-O-(4,4

Estudios computacionales

Librería de monómeros modificados: Ejemplo para (2

Anexo

```
"C5" "CM" 0 -1 0.0
"H5" "HA" 0 -1 0.0
"C4" "C" 0 -1 0.0
"O4" "O" 0 -1 0.0
"N3" "NA" 0 -1 0.0
"H3" "H" 0 -1 0.0
"C2" "C" 0 -1 0.0
"O2" "O" 0 -1 0.0
"C3'" "CT" 0 -1 0.0
"H3'" "H1" 0 -1 0.0
"C2'" "CT" 0 -1 0.0
"H2'2" "HC" 0 -1 0.0
"CM" "CT" 0 -1 0.0
"HM1" "HC" 0 -1 0.0
"HM2" "HC" 0 -1 0.0
"HM3" "HC" 0 -1 0.0
"O3'" "OS" 0 -1 0.0
!entry.MEU.unit.boundbox array dbl
-1.000000
0.0
0.0
0.0
0.0
!entry.MEU.unit.childsequence single int
2
!entry.MEU.unit.connect array int
1
32
!entry.MEU.unit.connectivity table int atom1x int atom2x int flags
1 2 1
1 3 1
1 4 1
4 5 1
5 6 1
5 7 1
5 8 1
8 9 1
8 10 1
8 24 1
10 11 1
11 12 1
11 13 1
11 26 1
13 14 1
13 22 1
14 15 1
14 16 1
16 17 1
16 18 1
18 19 1
18 20 1
20 21 1
20 22 1
22 23 1
24 25 1
24 26 1
24 32 1
26 28 1
26 27 1
28 29 1
28 30 1
28 31 1
```

Anexo

```
!entry.MEU.unit.hierarchy table str abovetype int abovex str belowtype
int belowx
"U" 0 "R" 1
"R" 1 "A" 1
"R" 1 "A" 2
"R" 1 "A" 3
"R" 1 "A" 4
"R" 1 "A" 5
"R" 1 "A" 6
"R" 1 "A" 7
"R" 1 "A" 8
"R" 1 "A" 9
"R" 1 "A" 10
"R" 1 "A" 11
"R" 1 "A" 12
"R" 1 "A" 13
"R" 1 "A" 14
"R" 1 "A" 15
"R" 1 "A" 16
"R" 1 "A" 17
"R" 1 "A" 18
"R" 1 "A" 19
"R" 1 "A" 20
"R" 1 "A" 21
"R" 1 "A" 22
"R" 1 "A" 23
"R" 1 "A" 24
"R" 1 "A" 25
"R" 1 "A" 26
"R" 1 "A" 27
"R" 1 "A" 28
"R" 1 "A" 29
"R" 1 "A" 30
"R" 1 "A" 31
"R" 1 "A" 32
!entry.MEU.unit.name single str
"MEU"
!entry.MEU.unit.positions table dbl x dbl y dbl z
2.314489 1.776673 -0.478436
1.933410 3.073374 -1.081549
3.156547 0.871841 -1.292450
2.994369 2.142475 0.922974
2.156035 2.551837 2.019887
1.452687 1.753841 2.257803
1.604968 3.450028 1.741178
3.008252 2.847921 3.243186
2.447118 3.477373 3.933851
3.228121 1.605168 3.977231
4.558614 1.150950 3.777548
5.072002 1.095281 4.737461
4.538757 -0.306565 3.312624
4.316907 -0.672508 2.011175
4.145435 0.083636 1.259348
4.360319 -1.957589 1.633974
4.118886 -2.368545 0.211713
4.642747 -2.996990 2.589735
4.702951 -4.199184 2.336743
4.852825 -2.538493 3.874277
5.070434 -3.289149 4.634055
4.814724 -1.223882 4.292304
5.014668 -0.915001 5.455495
4.415606 3.377827 2.961306
4.412072 3.941489 2.028369
```

Anexo

```
5.230443 2.095696 2.779425
6.025106 2.060820 3.524673
5.668211 2.081313 1.781301
5.668211 2.081313 2.781301
5.668211 3.081313 1.781301
6.668211 2.081313 1.781301
5.029898 4.128649 3.998279
!entry.MEU.unit.residueconnect table int c1x int c2x int c3x int c4x
int c5x int c6x
1 32 0 0 0 0
!entry.MEU.unit.residues table str name int seq int childseq int
startatomx str restype int imagingx
"MEU" 1 33 1 "n" 0
!entry.MEU.unit.residuesPdbSequenceNumber array int
0
!entry.MEU.unit.solventcap array dbl
-1.000000
0.0
0.0
0.0
0.0
!entry.MEU.unit.velocities table dbl x dbl y dbl z
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
!entry.U5.unit.atoms table str name str type int typex int resx int
flags int seq int elmnt dbl chg
"H5T" "HO" 0 1 131072 1 1 0.442200
"O5'" "OH" 0 1 131072 2 8 -0.631800
"C5'" "CI" 0 1 131073 3 6 -0.006900
"H5'1" "H1" 0 1 131072 4 1 0.075400
"H5'2" "H1" 0 1 131072 5 1 0.075400
"C4'" "CT" 0 1 131072 6 6 0.162900
"H4'" "H1" 0 1 131072 7 1 0.117600
```

Anexo

```
"O4'" "OS" 0 1 131072 8 8 -0.369100
"C1'" "CT" 0 1 131072 9 6 0.068000
"H1'" "H2" 0 1 131072 10 1 0.180400
"N1'" "N*" 0 1 131072 11 7 -0.023900
"C6'" "CM" 0 1 131072 12 6 -0.220900
"H6'" "H4" 0 1 131072 13 1 0.260700
"C5'" "CM" 0 1 131072 14 6 0.002500
"H5'" "HA" 0 1 131072 15 1 0.004100
"C4'" "C" 0 1 131072 16 6 0.519400
"O4'" "O" 0 1 131072 17 8 -0.556300
"N3'" "NA" 0 1 131072 18 7 -0.434000
"H3'" "H" 0 1 131072 19 1 0.342000
"C2'" "C" 0 1 131072 20 6 0.567700
"O2'" "O" 0 1 131072 21 8 -0.588100
"C3'" "CT" 0 1 131072 22 6 0.071300
"H3'" "H1" 0 1 131072 23 1 0.098500
"C2'" "CT" 0 1 131072 24 6 -0.085400
"H2'2" "HC" 0 1 131072 25 1 0.071800
"CM" "CT" 0 1 131072 26 6 0.01795
"HM1" "HC" 0 1 131072 27 1 0.01795
"HM2" "HC" 0 1 131072 28 1 0.01795
"HM3" "HC" 0 1 131072 29 1 0.01795
"O3'" "OS" 0 1 131072 30 8 -0.523200
!entry.U5.unit.atomsptinfo table str pname str ptype int ptypex int
pelmnt dbl pchg
"H5T" "HO" 0 -1 0.0
"O5'" "OH" 0 -1 0.0
"C5'" "CT" 0 -1 0.0
"H5'1" "H1" 0 -1 0.0
"H5'2" "H1" 0 -1 0.0
"C4'" "CT" 0 -1 0.0
"H4'" "H1" 0 -1 0.0
"O4'" "OS" 0 -1 0.0
"C1'" "CT" 0 -1 0.0
"H1'" "H2" 0 -1 0.0
"N1'" "N*" 0 -1 0.0
"C6'" "CM" 0 -1 0.0
"H6'" "H4" 0 -1 0.0
"C5'" "CM" 0 -1 0.0
"H5'" "HA" 0 -1 0.0
"C4'" "C" 0 -1 0.0
"O4'" "O" 0 -1 0.0
"N3'" "NA" 0 -1 0.0
"H3'" "H" 0 -1 0.0
"C2'" "C" 0 -1 0.0
"O2'" "O" 0 -1 0.0
"C3'" "CT" 0 -1 0.0
"H3'" "H1" 0 -1 0.0
"C2'" "CT" 0 -1 0.0
"H2'2" "HC" 0 -1 0.0
"CM" "CT" 0 -1 0.0
"HM1" "HC" 0 -1 0.0
"HM2" "HC" 0 -1 0.0
"HM3" "HC" 0 -1 0.0
"O3'" "OS" 0 -1 0.0
!entry.U5.unit.boundingBox array dbl
-1.000000
0.0
0.0
0.0
0.0
!entry.U5.unit.childsequence single int
2
```


Anexo

```
!entry.U5.unit.connect array int
1
30
!entry.U5.unit.connectivity table int atom1x int atom2x int flags
1 2 1
2 3 1
3 4 1
3 5 1
3 6 1
6 7 1
6 8 1
6 22 1
8 9 1
9 10 1
9 11 1
9 24 1
11 12 1
11 20 1
12 13 1
12 14 1
14 15 1
14 16 1
16 17 1
16 18 1
18 19 1
18 20 1
20 21 1
24 25 1
24 26 1
24 22 1
22 23 1
22 30 1
26 27 1
26 28 1
26 29 1
!entry.U5.unit.hierarchy table str abovetype int abovex str belowtype
int belowx
"U" 0 "R" 1
"R" 1 "A" 1
"R" 1 "A" 2
"R" 1 "A" 3
"R" 1 "A" 4
"R" 1 "A" 5
"R" 1 "A" 6
"R" 1 "A" 7
"R" 1 "A" 8
"R" 1 "A" 9
"R" 1 "A" 10
"R" 1 "A" 11
"R" 1 "A" 12
"R" 1 "A" 13
"R" 1 "A" 14
"R" 1 "A" 15
"R" 1 "A" 16
"R" 1 "A" 17
"R" 1 "A" 18
"R" 1 "A" 19
"R" 1 "A" 20
"R" 1 "A" 21
"R" 1 "A" 22
"R" 1 "A" 23
"R" 1 "A" 24
"R" 1 "A" 25
```

Anexo

```
"R" 1 "A" 26
"R" 1 "A" 27
"R" 1 "A" 28
"R" 1 "A" 29
"R" 1 "A" 30
!entry.U5.unit.name single str
"U5"
!entry.U5.unit.positions table  dbf x  dbf y  dbf z
2.314489 1.776673 -0.478436
2.994369 2.142475 0.922974
2.156035 2.551837 2.019887
1.452687 1.753841 2.257803
1.604968 3.450028 1.741178
3.008252 2.847921 3.243186
2.447118 3.477373 3.933851
3.228121 1.605168 3.977231
4.558614 1.150950 3.777548
5.072002 1.095281 4.737461
4.538757 -0.306565 3.312624
4.316907 -0.672508 2.011175
4.145435 0.083636 1.259348
4.360319 -1.957589 1.633974
4.118886 -2.368545 0.211713
4.642747 -2.996990 2.589735
4.702951 -4.199184 2.336743
4.852825 -2.538493 3.874277
5.070434 -3.289149 4.634055
4.814724 -1.223882 4.292304
5.014668 -0.915001 5.455495
4.415606 3.377827 2.961306
4.412072 3.941489 2.028369
5.230443 2.095696 2.779425
6.025106 2.060820 3.524673
5.668211 2.081313 1.781301
5.668211 2.081313 2.781301
5.668211 3.081313 1.781301
6.668211 2.081313 1.781301
5.029898 4.128649 3.998279
!entry.U5.unit.residueconnect table  int c1x  int c2x  int c3x  int c4x
int c5x  int c6x
1 30 0 0 0 0
!entry.U5.unit.residues table  str name  int seq  int childseq  int
startatomx  str restype  int imagingx
"U5" 1 31 1 "n" 0
!entry.U5.unit.residuesPdbSequenceNumber array int
0
!entry.U5.unit.solventcap array dbf
-1.000000
0.0
0.0
0.0
0.0
!entry.U5.unit.velocities table  dbf x  dbf y  dbf z
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
```

Anexo

```
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
0.0 0.0 0.0
```

Minimización

Las estructuras se sometieron a tres etapas de minimización, cada una con condiciones diferentes.

1)

```
min AT: initial minimisation solvent + ions
&cntrl
  imin   = 1,
  maxcyc = 1000,
  ncyc   = 500,
  ntb    = 1,
  ntr    = 1,
  cut    = 10
/
Hold the RNA fixed
500.0
RES 1 22
END
END
```

2)

```
AT: initial minimisation solvent + ions
&cntrl
  imin   = 1,
  maxcyc = 2500,
  ncyc   = 100,
  ntb    = 1,
  ntr    = 0,
  cut    = 10
/
```

3)

```
AT: initial minimisation solvent + ions
&cntrl
  imin   = 1,
  maxcyc = 10000,
  ncyc   = 100,
```

Anexo

```
ntb    = 1,  
ntr    = 0,  
cut    = 10  
/
```

Termalización y primeros de la dinámica

```
#!/bin/bash -l  
#  
#$ -cwd  
#$ -j y  
#$ -S /bin/bash  
#
```

```
rm -f mdin  
cat <<eof >mdin
```

```
&cntrl  
  imin=0,irest=0,ntx=1,
```

```
  ntb=2,ntp=1,
```

```
  NSTLIM= 100000, DT=.0001,  
  NTC=2,NTF=2,nrespa=1,
```

```
  ntt=1,temp0=300.0,tautp=2.0,tempi=0,  
  ntp=1000,ntwx=1000,ntwv=0,ntwe=100,  
  nmropt=0,jar=0,
```

```
  cut = 12  
&end
```

```
&wt type='DUMPFREQ', istep1=10 /  
&wt type='END' /
```

```
DISANG=jarFijo.RST  
DUMPAVE=x.dat  
LISTIN=POUT  
LISTOUT=POUT
```

```
eof
```

```
sander -O -i mdin -o mdout -p x.top -c x.crd -r x.rst -ref x.ref -x x.tra -v x.vel -e x.ene
```

```
mv mdout AT_term.mdout  
mv x.tra AT_term.tra  
mv x.rst AT_term.rst  
cp AT_term.rst x.crd  
mv x.ene AT_term.ene
```

Anexo

```
rm -f mdin
cat <<eof >mdin
```

```
&cntrl
  imin=0,irest=1,ntx=7,
```

```
  ntb=2,ntp=1,
```

```
  NSTLIM= 500000, DT=.002,
  NTC=2,NTF=2,nrespa=1,
```

```
  ntt=1,temp0=300.0,tautp=2.0,tempi=300,
  ntp=1000,ntwx=1000,ntwv=0,ntwe=100,
  nmropt=0,jar=0,
```

```
  cut = 12
&end
```

```
&wt type='DUMPFREQ', istep1=10 /
&wt type='END' /
```

```
DISANG=jarFijo.RST
DUMPAVE=x.dat
LISTIN=POUT
LISTOUT=POUT
```

```
eof
```

```
eof
```

```
sander -O -i mdin -o mdout -p x.top -c x.crd -r x.rst -ref x.ref -x x.tra -v x.vel -e x.ene
```
