



Universitat de Girona

EL VIRUS DE L'HEPATITIS C I LA RIBONUCLEASA P HUMANA: ASPECTES BIOLÒGICS I TERAPÈUTICS

Anna NADAL MATAMALA

ISBN: 978-84-691-5822-7
Dipòsit legal: GI-637-2008



Universitat de Girona

Facultat de Ciències
Departament de Biologia

TESI DOCTORAL

**El virus de l'hepatitis C i la ribonucleasa P
humana: aspectes biològics i terapèutics**

Anna Nadal i Matamala

Girona, 2004



Universitat de Girona

Facultat de Ciències
Departament de Biologia

El virus de l'hepatitis C i la Ribonucleasa P humana: aspectes biològics i terapèutics

Memòria presentada per ANNA NADAL i MATAMALA, inscrita en el programa de doctorat de Microbiologia i Bioquímica aplicades del Departament de Biologia i del Departament EQATA, per optar al grau de doctora en biologia per la Universitat de Girona.

El present treball s'ha realitzat al Laboratori de Recerca de Medicina Interna-Hepatologia de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron sota la direcció dels doctors JORDI GÓMEZ i MARIA MARTELL i la tutoria de la doctora MARISA MOLINAS de la Universitat de Girona.

Vist i plau de,

Dr. Jordi Gómez Dra. Maria Martell
Directors de tesi

Dra. Marisa Molinas
Tutora

*El contingut sense mètode porta a la fantasia;
el mètode sense contingut al sofisme buit;
la substància sense forma a l'erudició estúpida;
la forma sense substància a l'especulació buida.*

Johann Wolfgang von Goethe

ABREVIATURES

BSA	Albúmina sèrica bovina
C	Regió core del virus de l'hepatitis C
CMVH	Citomegalovirus humà
cpm	Comptes per minut
Da	Daltons
DNA	Àcid desoxiribonucleic
DTT	1,4-ditio-DL-treitol
E	Regió estructural
E2	Regió estructural 2
EDTA	Àcid etilendiamina-tetraacètic
EGS	Seqüència guia externa
HVR-1	Regió hipervariable 1
IRES	Entrada interna al ribosoma
M1GS	RNA M1 unit a seqüència guia
mRNA	RNA missatger
NCR	Regió no codificant
NS	Regió no estructural
NS2	Regió no estructural 2
nt	nucleòtid
ORF	Pauta de lectura oberta
pb	Parell de bases
PBS	Tampó fosfat
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PM	Pes molecular
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluorur
pre-tRNA	Precursor de RNA de transferència
RNA	Àcid ribonucleic
RNasa	Ribonucleasa
RNasa H	Ribonucleasa H
RNasa MRP	Ribonucleasa MRP
RNasa P	Ribonucleasa P
rNTPs	Ribonucleòtids
rpm	Revolucions per minut
rRNA	RNA ribosomal
SDS	Dodecilsulfatsòdic
TBE	Tris-borat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamida
tRNA	RNA de transferència
TSE	Tris-sodiu-EDTA
Tyr	Tirosina
U	Unitat
VHB	Virus de l'hepatitis B
VHC	Virus de l'hepatitis C
VHD	Virus de l'hepatitis Delta
VHS	Virus de l'herpes simple

CONTINGUT

<u>ESTRUCTURA DE LA MEMÒRIA</u>	1
<u>PRESENTACIÓ</u>	3
<u>I. INTRODUCCIÓ</u>	7
1. La malaltia, 9	
2. El virus de l'hepatitis C, 10	
3. Els ribozims, 16	
4. La ribonucleasa P, 24	
5. Antecedents del VHC i la teràpia amb ribozims, 33	
6. Ribonucleasa MRP, 34	
7. Mimetisme molecular, 35	
<u>II. OBJECTIUS</u>	39
<u>III. MATERIAL I MÈTODES</u>	43
1. Transcripció <i>in vitro</i> d'RNA i purificació de transcrits, 45	
2. Purificació de la Ribonucleasa P humana, 53	
3. Accessibilitat de l'RNA del VHC a la ribonucleasa H, 60	
4. Ribonucleasa P humana i seqüències guia externes, 65	
5. Digestió d'RNA amb ribozims M1GS, 67	
6. Proves per a determinar de l'enzim responsable dels talls observats sobre l'RNA del VHC, 69	
7. Proves per a identificar i caracteritzar estructures tipus tRNA, 72	
8. Reaccions en presència d'alcohol, 73	
<u>IV. RESULTATS</u>	75
IV.1. Caracterització de l'estructura i variabilitat d'una regió del genoma del VHC per dirigir-hi la RNasa P, 77	
IV.2. Identificació d'estructures tipus tRNA a l'RNA del VHC: noves dianes terapèutiques, 97	
<u>V. DISCUSSIÓ GENERAL</u>	115
<u>VI. CONCLUSIONS</u>	131
<u>VII. BIBLIOGRAFIA</u>	135
<u>VIII. ÍNDEX</u>	155
Agraïments	163

Estructura de la memòria

Aquesta memòria consta dels següents apartats: Introducció, Objectius, Material i mètodes, Resultats, Discussió general, Conclusions, Bibliografia i Índex.

I. Introducció. S'ha estructurat en set punts diferents amb l'objectiu de donar una visió general del virus de l'hepatitis C, els ribozims i la seva aplicació terapèutica. Respecte els ribozims s'ha descrit especialment la ribonucleasa P.

II. Objectius. L'objectiu final del treball d'aquesta tesi és tallar *in vitro* l'RNA del VHC utilitzant com a ribozim la ribonucleasa P. S'ha pensat en dos models, la ribonucleasa P humana i el component RNA de la ribonucleasa P d'*E.coli*. Per estudiar l'aplicació d'aquests ribozims com a possible agents antivirals contra la infecció de VHC ens hem plantejat dos objectius principals: **II.1.** Caracterització de l'estructura i variabilitat d'una regió del genoma del VHC per dirigir-la la ribonucleasa P i **II.2.** Identificació i caracterització d'estructures tipus tRNA en el genoma del VHC: noves dianes terapèutiques.

III. Material i mètodes. Es descriu de forma detallada la metodologia utilitzada en la realització d'aquest treball.

IV. Resultats. Els resultats s'han agrupat en dos apartats que es corresponen amb els dos objectius principals d'aquest treball.

IV.1. Caracterització de l'estructura i variabilitat d'una regió del genoma del VHC per a dirigir-hi la RNasa P. Compren l'article I (Characterization of the structure and variability of an internal region of HCV RNA for M1 RNA guide sequence ribozyme targeting (2003). *Journal of General Virology* **84**, 1545-1548) i altres resultats no publicats. Tots aquests resultats fan referència a trobar una zona accessible dins d'una regió interna del genoma del virus i dirigir-hi l'activitat del ribozim ribonucleasa P.

IV.2. Identificació d'estructures tipus tRNA a l'RNA del VHC: noves dianes terapèutiques. Compren l'article II (Specific cleavage of hepatitis C virus RNA genome by human RNase P. (2002). *Journal of Biological Chemistry* **277**, 30606-30613) i altres resultats pendents per publicar (Increment del reconeixement de les estructures tipus tRNA del genoma del VHC per la RNasa humana en presència d'etanol i metanol). Tots aquests resultats fan referència a una nova interacció *in vitro* que hem descrit entre l'RNA del virus de l'hepatitis C i la ribonucleasa P humana, sense seqüències guia externes.

V. Discussió. Es discuteixen conjuntament les aportacions d'aquesta tesi.

VI. Conclusions.

VII. Bibliografia. Inclou de forma detallada tota la bibliografia citada en la Presentació, Introducció, Resultats no publicats, Altres resultats i Discussió general.

VIII. Índex.

PRESENTACIÓ

El virus de l'hepatitis C (VHC) és un virus d'RNA de cadena positiva que es classifica dins de la família *Flaviviridae*. L'interès per entendre la biologia d'aquest virus rau en el fet que provoca un hepatitis crònica que afecta a més de 170 milions de persones d'arreu del món (entre el 0,5% i 3% de la població d'Europa) i que d'aquests malalts el 30% desenvolupen una cirrosi hepàtica i entre el 2 i 3% un hepatocarcinoma.

Igual que en altres virus RNA, el virus de l'hepatitis C es caracteritza per tenir una elevada taxa de mutació ja que presenta un gran potencial evolutiu i una major capacitat d'acumular variació. De fet, el genoma del virus no es pot definir per una única seqüència sinó per una població de variants molt relacionades entre sí (Martell *et al.*, 1992). Aquesta elevada taxa de mutació és un dels principals causants de la baixa resposta als tractaments.

Els tractaments disponibles són llargs, cars, provoquen efectes secundaris considerables i només es resolen completament el 40% dels casos (McHutchison *et al.*, 1998). Per aquesta raó es busquen altres alternatives, altres solucions terapèutiques per combatre el virus entre les quals s'hi inclouen diferents estratègies: (i) modificacions del tractament estàndard, (ii) disseny de noves drogues per inhibir la funció de proteïnes virals (proteasa, helicasa i polimerasa) i (iii) la utilització de molècules antisentit i ribozims. Una de les estratègies més innovadores és la utilització de ribozims dirigits directament contra el genoma RNA del virus. Aquest treball es centra en l'estudi de les noves estratègies terapèutiques basades en ribozims, concretament la ribonucleasa P.

Els ribozims són molècules d'RNA amb activitat catalítica que tenen com a funció tallar RNA. Si bé els ribozims tenen una funció natural pròpia, la propietat de tallar RNA diferent del substrat natural els ha convertit en eines moleculars molt prometedores per a la teràpia gènica i també com a possibles agents antivirals.

La ribonucleasa P és una ribonucleoproteïna que està present en tots els organismes ja que és l'enzim responsable de la maduració dels precursors d'RNA de transferència (pre-tRNAs) (Robertson *et al.*, 1972). Es considera un ribozim perquè és el component RNA qui presenta l'activitat catalítica, tot i que les proteïnes juguen un paper molt important facilitant el reconeixement i interacció amb el substrat. El més interessant a nivell terapèutic és que s'ha demostrat que es pot dirigir la seva activitat cap a qualsevol RNA utilitzant una seqüència guia d'RNA que quan hibrida amb l'RNA diana, l'híbrid imita l'estructura secundària del substrat natural. S'han realitzat estudis *in vitro* i/o en cultiu amb el virus de l'hepatitis B (Werner *et al.*, 1998), els virus de la sida (Endo *et al.*, 2001; Kraus *et al.*, 2002), el virus de la grip (Plehn-Dujowich i Altman, 1998), el virus de l'herpes (Kawa *et al.*, 1998; Trang *et al.*, 2000) i citomegalovirus humà (Trang *et al.*, 2002). També s'ha estudiat l'aplicació d'aquest ribozim contra RNAs missatgers implicats en el càncer (Ma *et al.*, 2000; Cobaleda i Sanchez-Garcia, 2000).

En el cas del VHC, s'han estudiat ribozims dependents de seqüència (ribozims derivats d'RNAs satèl·lits i de viroides de plantes), sempre dirigits contra la regió més conservada del virus per evitar una disminució de l'eficiència del ribozim deguda a la variació de la diana. La ribonucleasa P és una endonucleasa d'activitat molt específica i es diferencia dels altres ribozims naturals en el sistema de reconeixement del substrat, ja que reconeix elements estructurals i no de seqüència (Altman, 1989; Altman, 1995). La nostra hipòtesi de treball és utilitzar el ribozim ribonucleasa P per tallar el genoma del VHC aprofitant la propietat que presenta aquest ribozim de reconèixer elements estructurals i no de seqüència ja que se sap que per a un mateix nombre de seqüències, el nombre d'estructures viables que pot adoptar l'RNA genòmic és molt més petit i per tant la variabilitat de la diana disminueix.

Ens proposem també trobar dianes alternatives a la regió més conservada del virus que, si bé és molt conservada l'estructura secundària i terciària de l'RNA dificulta l'accés dels ribozims.

I. INTRODUCCIÓ

I. INTRODUCCIÓ

1. La malaltia

L'hepatitis C va ser reconeguda com a malaltia per primera vegada el 1975, quan es va comprovar que la majoria de les hepatitis associades a transfusions sanguínies no eren causades per cap dels dos virus coneguts en aquell moment, el virus de l'hepatitis A i el virus de l'hepatitis B. La malaltia, que es podia transmetre als ximpanzés, es va anomenar "hepatitis no-A no-B". Fins el 1989, però, no es va poder caracteritzar, mitjançant clonació i seqüenciació, l'agent causant de la malaltia, que fins al moment s'anomenava virus de l'hepatitis no-A no-B (Choo *et al.*, 1989). El virus, llavors, es va anomenar "virus de l'hepatitis C (VHC)".

Cal destacar la importància decisiva i pionera de les tècniques de biologia molecular utilitzades en la caracterització de l'agent viral.

El VHC es troba àmpliament distribuït per tot el món infectant a més de 170 milions de persones (Cohen, 1999). La prevalença de la infecció varia des del 0,15% a Escandinàvia fins a un 24% a la població egípcia. A Europa occidental, aquest valor oscil·la entre el 0,15 i el 3%, estimant-se en prop de cinc milions el nombre de portadors (Trepo i Pradat, 1999) i en 1,6-6% la taxa de mortalitat (Seeff, 1997). A Espanya, la taxa de prevalença a la població adulta és del 1-2% (Suarez *et al.*, 1997) i a Catalunya d'un 2,64% (Sola *et al.*, 2002).

El VHC es transmet principalment per via parenteral, sent els receptors de sang o hemoderivats (pacients transfosos, hemofílics, hemodialitzats) (Mellor *et al.*, 1998; Miller i Purcell, 1990; Mellor *et al.*, 1995; Melton i Cortese, 1979; Kruger *et al.*, 1982; Eckstein i Lilley, 1996) i els addictes a les drogues per via parenteral el principal grup de risc. Abans de la implantació dels tests de crivellatge pel VHC, la incidència d'hepatitis C associada a transfusions (HCAT) era força elevada (fins a un 11% a Espanya (Esteban *et al.*, 1990)). Actualment, però, el risc de HCAT ha disminuït fins al 0,01-0,001% per unitat de transfusió (Schreiber *et al.*, 1996). Estudis de transmissió del VHC, de pacients infectats a personal sanitari o viceversa, demostren que aquesta és una via de transmissió poc freqüent (2-3% dins del personal sanitari) (Perez-Trallero *et al.*, 1992; Neal *et al.*, 1994). El VHC també es pot transmetre per contacte familiar i/o sexual i per via vertical (de mares a fills), però aquestes vies només expliquen el 10-15% dels casos d'hepatitis C.

El tret més característic de la infecció és la propensió a la cronicitat; més del 85% de les infeccions agudes esdevenen infeccions cròniques. D'aquestes, un 10-20% poden desenvolupar cirrosi hepàtica i un 1-5% un hepatocarcinoma.

2. El virus de l'hepatitis C

L'organització genòmica del VHC és semblant a la dels pestivirus i flavivirus, amb els que comparteix una homologia de seqüència (Miller i Purcell, 1990). Així, el virus de l'hepatitis C es classifica com un tercer gènere (*Hepacivirus*) dins de la família *Flaviviridae*, família que també comprèn els *Flavivirus* (virus de la febre groga, virus del Dengue,...) i els *Pestivirus* (virus del còlera porcí, virus de la diarrea bovina).

Les partícules víriques no han estat mai aïllades ni es disposa de sistemes de cultius estables, per tant tota la informació sobre l'organització genètica ha estat obtinguda a partir de l'anàlisi comparatiu de la seva seqüència amb la dels altres virus i del crivellatge genètic en sistemes *in vivo* o en cultiu. El grup de Volker Lohmann i col·laboradors, l'any 1999 va aconseguir establir un sistema de cultiu eficient, però basat en la transfecció d'RNAs subgenòmics del VHC (construccions genòmiques sense la regió estructural) (Lohmann *et al.*, 1999). Recentment s'ha publicat un treball on es demostra que s'ha aconseguit infectar hepatòcits humans amb plasma d'un pacient, detectar l'increment d'RNA viral i l'alliberament de partícules víriques en el sobrenedant de cultius cel·lulars (Aizaki *et al.*, 2003).

2.1. Estructura i funció del genoma del virus de l'hepatitis C

El VHC conté un genoma d'RNA de simple cadena positiva d'aproximadament 9.600 nucleòtids (Figura 1). A l'extrem 5' s'hi troba una regió no codificant (5'NCR) que comprèn els primers 341 nucleòtids del genoma (Han *et al.*, 1991) i la seva funció està relacionada amb la traducció. Immediatament després de la regió 5' no codificant (5'NCR) hi ha una pauta de lectura oberta (ORF) que acaba en un únic codó d'aturada i codifica una poliproteïna de 3.010 aminoàcids. A continuació l'extrem 3' no codificant (3'NCR), que malgrat es desconeixen les seves funcions exactes, s'ha demostrat que és essencial per a la replicació vírica (Kolykhalov *et al.*, 2000; Yanagi *et al.*, 1999).

La única poliproteïna generada és processada co- i postraduccionalment mitjançant proteases de l'hoste i víriques, donant lloc a les proteïnes estructurals (Core, E1 i E2-p7) i no estructurals (NS2-NS5B). Una peptidasa de l'hoste és responsable del processament de la regió Core-NS2 (Spaete *et al.*, 1992) i dues proteases víriques s'encarreguen del processament de la resta de la poliproteïna (NS2-NS5B) (Grakoui *et al.*, 1993). La seqüència de les proteïnes dins la poliproteïna del VHC és: NH₂-Core-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH (Neddermann *et al.*, 1997). L'esquema de l'organització genòmica del virus i la possible funció de les proteïnes que codifica cada regió es mostren a la figura 1.

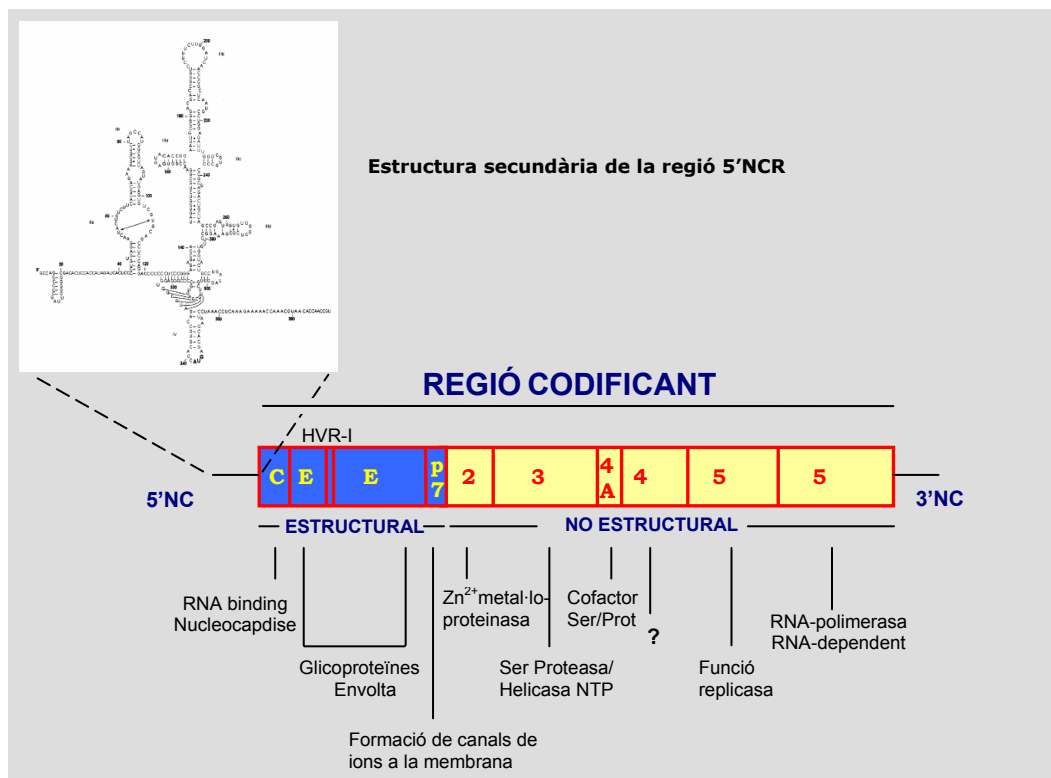


Figura 1. Esquema de l'organització genòmica del VHC i possible funció de les proteïnes.

2.2. Distribució en quasiespècie

Els virus RNA constitueixen el grup de paràsits més extens que es coneix, un 70% dels virus que infecten organismes diferenciats són virus RNA. En relació als seus hostes, els virus RNA presenten un gran potencial evolutiu i una major capacitat d'acumular variació que es tradueix en unes taxes de mutació uns quants ordres de magnitud superiors a les estimades pels genomes DNA. La base bioquímica de les elevades taxes de mutació dels genomes RNA és l'absència d'una activitat correctora encarregada de l'eliminació dels nucleòtids incorporats incorrectament durant l'activitat de les RNA polimerases (Steinhauer *et al.*, 1992).

Considerant la taxa de mutació dels virus RNA (10^{-3} - 10^{-5}) i la longitud de la seva seqüència genòmica ($3 \cdot 10^3$ - $3 \cdot 10^4$ pb), la majoria de les noves partícules víriques sintetitzades portaran, com a mínim, una mutació. Si a això li afegim l'elevada mida de la població, no és difícil imaginar que als virus RNA, el genoma víric (entès com un col·lectiu replicant) no té una estructura fixa; més aviat, està format per un conjunt de seqüències genòmiques estretament relacionades entre sí (*espectre de mutants*), distribuït al voltant d'una o més seqüències majoritàries (*seqüència principal*), respecte de les quals difereixen en una o més posicions. La seqüència formada pel nucleòtid més freqüent a cada posició és la *seqüència consens*. A aquesta distribució de seqüències, típica dels virus RNA se l'anomena *quasiespècie vírica* (Figura 2) (Domingo *et al.*, 1976; Domingo *et al.*, 1978). El concepte de quasiespècie va ser introduït per Manfred Eigen, l'any 1971, per descriure la dinàmica de les primeres seqüències autoreplicatives durant l'evolució prebiòtica (Eigen, 1971; Eigen i Schuster, 1979).

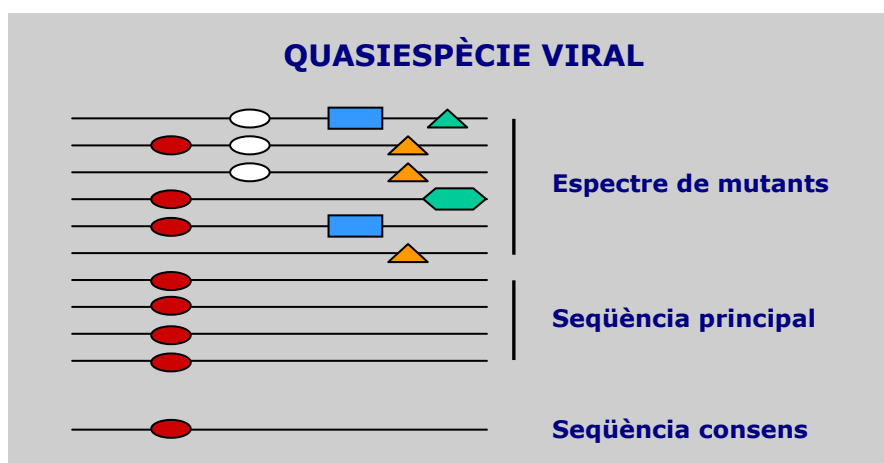


Figura 2. Representació de la distribució en quasiespècie del genoma dels virus RNA. Com es pot observar, les seqüències mutants es distribueixen al voltant de la seqüència principal, que en aquest cas és idèntica a la seqüència consens.

El virus de l'hepatitis C, com a virus RNA que és, presenta doncs una elevada variabilitat genètica. El nostre grup fou el primer en descriure, el 1992, la seva distribució en quasiespècie (Martell *et al.*, 1992). La seva taxa de mutació no ha pogut ser establerta degut a l'absència d'un sistema de cultiu estable i productiu, però sí es coneix la taxa de fixació de mutacions, o el que és el mateix, el nombre de mutacions que s'acumulen en el genoma víric per unitat de temps. Per al VHC, la taxa mitjana de fixació de mutacions varia entre 1,44 i $1,92 \cdot 10^{-3}$ substitucions per nucleòtid per any (Ogata *et al.*, 1991) i no és constant en el temps (per exemple, a la fase aguda és superior que a la crònica) (Bukh *et al.*, 1995; Okamoto *et al.*, 1992). Aquest valor és semblant al que presenten altres virus RNA causants d'infeccions persistents com el VIH i el virus de la febre aftosa.

La taxa de fixació de mutacions no es distribueix uniformement al llarg de tot el genoma del VHC. L'anàlisi de les diferents regions ha revelat que la menor taxa de fixació de mutacions correspon, d'acord amb la seva funció, a la regió 5' NCR amb un 90% d'homologia. A continuació les regions Core i NS3 (codifica per la principal proteasa vírica). El valor màxim de la taxa de fixació de mutacions el presenten les dues regions de l'envolta (E1 i E2) i la regió NS2, especialment els 27 primers aminoàcids de E2 que formen l'anomenada regió hipervariable 1 (HVR-1) (Okamoto *et al.*, 1992; Ogata *et al.*, 1991; Bukh *et al.*, 1995). La variabilitat genètica trobada a E1, E2 i NS2 podria estar relacionada amb la presència d'epítops antigènics en aquestes regions, com ara epítops de cèl·lules B a la regió HVR-1 de E2 i epítops de cèl·lules T citotòxiques a la regió NS2 (Bukh *et al.*, 1995; Koziel *et al.*, 1992).

2.3. Replicació del virus de l'hepatitis C

Malgrat ja fa 10 anys que es va obtenir la seqüència original del VHC (cDNA), la manca de sistemes de cultiu cel·lular estables ha provocat que molts aspectes de la infecció del VHC, com les estratègies de replicació víriques, siguin poc coneguts. El que sí es pot afirmar és que el VHC no s'integra en el genoma de la cèl·lula que infecta. Així com els flavivirus i pestivirus, el VHC replica via un intermediari de cadena negativa d'RNA (que es troba al fetge en una concentració de 10 a 10^3 vegades inferior que la cadena positiva (Wang *et al.*, 1992), a partir del qual s'originen les cadenes positives que són encapsidades dins el virió (Horiike *et al.*, 1993). Actualment s'assumeix, com a la majoria dels virus RNA, que la replicació vírica té lloc al citoplasma (Lohmann *et al.*, 1997). Els coneixements sobre els mecanismes moleculars de la replicació es basen en l'analogia amb altres virus estretament relacionats com són flavivirus i pestivirus, i la caracterització de

proteïnes recombinants de VHC. Utilitzant aquesta informació limitada, el cicle de replicació es pot resumir tal i com es presenta a la figura 3.

Diversos estudis semblen indicar que el VHC té la capacitat de regular el nivell de replicació a les cèl·lules infectades. Les quantitats de proteïnes virals i RNA en el teixit infectat són molt baixes - es considera que la vida mitja d'un virió és de 3-5 hores i el tant per cent aproximat de producció de 10^{12} partícules per dia; si s'assumeix que aproximadament el 10% dels hepatòcits d'un fetge estan infectats i que el fetge en conté uns 2×10^{11} , cada cèl·lula infectada produiria per dia 50 virions (Neumann *et al.*, 1998)-. Aquesta baixa capacitat replicativa li permetria persistir a la majoria de cèl·lules sense provocar un dany hepàtic aparent (Agnello *et al.*, 1998).

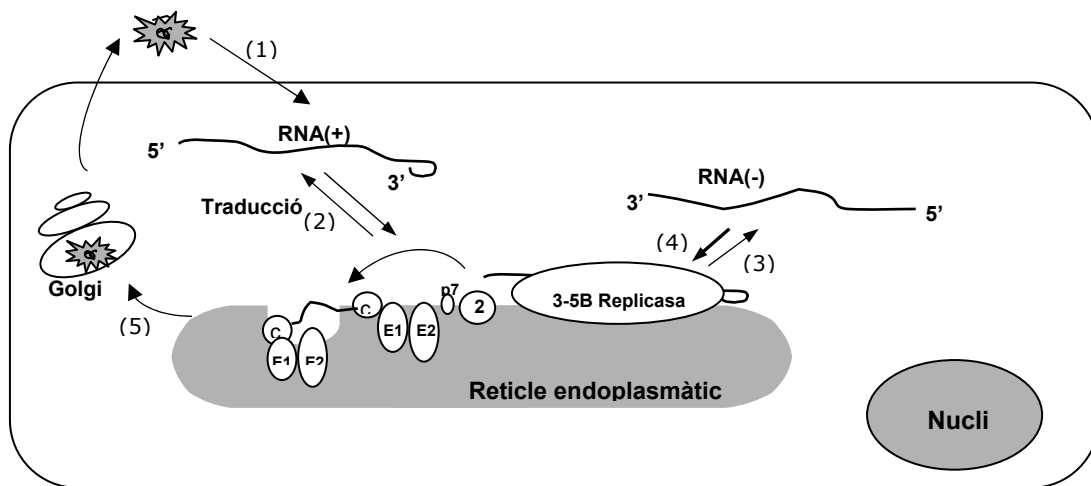


Figura 3. Model hipotètic del cicle de replicació del VHC, modificat de Bartenschlager i Lohman, 2000. (1) Unió i penetració a la cèl·lula hoste. El virus allibera el seu RNA genòmic ((+)RNA) en el citoplasma; (2) l'RNA genòmic es tradueix, es processa la poliproteïna i les proteïnes virals es mantenen a la membrana del reticle endoplasmàtic. Es forma el complex de replicació (3-5B Replicasa); (3) les cadenes positives d'RNA s'utilitzen com a motlle per a la síntesi dels intermediaris d'RNA de cadena negativa ((-)RNA); (4) a partir de les cadenes negatives s'obtenen més molècules (+)RNA que es poden utilitzar per a la síntesi de més cadenes negatives, per a l'expressió de proteïnes o poden ser encapsidades dins del virió interaccionant amb les proteïnes estructurals; (5) els virus s'alliberen de la cèl·lula infectada a través de l'aparell de Golgi.

2.4. Traducció del genoma del virus de l'hepatitis C

Les proteïnes del VHC s'obtenen del processament de la única poliproteïna que es sintetitza durant la traducció directa de l'RNA genòmic. La poliproteïna es tradueix al reticle endoplasmàtic rugós i és processada co- i post-traduccionalment per signalases cel·lulars i dos proteïnes virals.

L'estratègia utilitzada per a la traducció és diferent a la dels RNAs missatgers cel·lulars ja que és independent de cap (Houghton, 1996), però molt comuna entre els virus RNA de cadena positiva (Hellen i Sarnow, 2001). La traducció s'inicia quan la subunitat 40S del ribosoma s'uneix directament a una seqüència interna de la regió 5' no codificant del genoma. El domini requerit per a la unió amb el ribosoma s'anomena IRES (*Internal Ribosome Entry Side*), que tal i com el seu nom abreujat indica correspon al lloc d'entrada interna al ribosoma. Concretament, l'IRES del VHC s'estén des de la posició 40 de l'extrem 5' fins el nucleòtid 372 (Figura 1) (Fukushi *et al.*, 1994; Honda *et al.*, 1996; Rijnbrand *et al.*, 1996; Reynolds *et al.*, 1995) on el codó AUG d'inici de la traducció es troba a la base 342. En el cas del VHC, la subunitat 40S del ribosoma s'uneix específicament amb l'IRES, sense la intervenció de factors d'inici de la traducció (eIFs), de manera que el codó AUG es situa molt a prop del lloc P del ribosoma (Pestova *et al.*, 1998). Posteriorment, s'uneixen al complex IRES/40S el factor eIF2, GTP i el tRNA iniciador i es forma el complex 48S on l'anticodó s'aparella amb el codó d'inici (Hellen i Sarnow, 2001).

S'ha vist també que alguns factors poden influenciar l'activitat de l'IRES, com per exemple l'extrem 3' no codificant del genoma (Ito *et al.*, 1998) o alguns factors cel·lulars com l'antigen La (Ali i Siddiqui, 1995).

Els elements IRES van ser identificats per primera vegada en picornavirus (Belsham i Sonenberg, 1996) i fins a l'actualitat s'han descrit, a més de en el virus de l'hepatitis C (Tsukiyama-Kohara *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 1992; Reynolds *et al.*, 1995) i picornavirus, en pestivirus (Poole *et al.*, 1995), en el virus de la paràlisi crònica *cricket paralysis virus* (Wilson *et al.*, 2000) i alguns RNAs missatgers eucariotes (Bernstein *et al.*, 1995; Jackson, 1996; Carter *et al.*, 2000) (<http://www.rangueil.inserm.fr/IRESdatabase>). Es caracteritzen per ser elements genètics rics en estructura secundària i terciària, tot i que entre virus presenten diferències de seqüència, longitud i estructura (Martinez-Salas, 1999). Si bé el mecanisme d'unió al ribosoma no està del tot determinat, es creu que l'estructura dels dominis amb els que s'organitza la regió IRES juga un paper clau en la interacció amb el ribosoma (Jackson, 1996) i que alguns d'aquests elements estructurals podrien ser els responsables de la funció (Lytle *et al.*, 2001).

2.5. Tractament de l'hepatitis C

Fins fa poc temps, l'únic tractament contra el virus de l'hepatitis C era l'interferó, però només era efectiu en un 20% dels pacients. L'any 1998 es varen publicar dos estudis, un a *New England Journal of Medicine* (McHutchison *et al.*, 1998) i l'altre a *Lancet*

(Poynard *et al.*, 1998), on es demostrava que la combinació de l'interferó amb la ribavirina augmentava l'èxit de la teràpia d'un 13-19% (només interferó) a un 38-43% (interferó més ribavirina). Tot i la millora en el tant per cent d'èxit que ha suposat la introducció de la ribavirina en el tractament els resultats no són satisfactoris ja que encara hi ha molts pacients que no responen i els efectes secundaris són considerables.

Es busquen doncs altres alternatives, altres solucions terapèutiques per combatre el virus entre les quals s'hi inclouen diferents estratègies: (i) modificacions del tractament estàndard amb interferó, (ii) generació i identificació d'interferons amb millors característiques farmacèutiques, (iii) disseny de noves drogues per inhibir la funció de proteïnes virals (proteasa, helicasa i polimerasa) i (iv) la utilització de molècules antisentit i ribozims.

Una de les estratègies més innovadores i prometedores és la utilització de ribozims dirigits directament contra el genoma del virus. Si bé el genoma RNA és un dels components amb més tendència a la variació, és també on s'hi localitzen zones molt conservades. La regió 5' no codificant, amb un 90% d'homologia, s'ha convertit en el principal candidat.

3. Els ribozims

Els ribozims són molècules d'RNA que actuen com a catalitzadors químics i des del seu descobriment l'any 1981 (Cech *et al.*, 1981; Guerrier-Takada *et al.*, 1983) s'ha vist que estaven implicats en diferents processos biològics: mecanismes de replicació en genomes d'RNA (Robertson *et al.*, 1992; Daros *et al.*, 1994), maduració d'RNAs de transferència (Guerrier-Takada *et al.*, 1983), processament d'introns (Cech *et al.*, 1981) i fins i tot en el procés de traducció cel·lular (Eckstein, 1997; Ban *et al.*, 2000; Nissen *et al.*, 2000).

La majoria de ribozims d'origen natural que s'han descrit, a excepció del ribosoma, catalitzen un tall en l'esquelet fosfodièster d'altres seqüències d'RNA, independentment del procés biològic on participen (Taula 1) i es caracteritzen per tenir clarament diferenciats un domini catalític i un domini de reconeixement del substrat (Hampel i Tritz, 1989; Zaug i Cech, 1986; Forster i Symons, 1987; Uhlenbeck, 1987; Puerta-Fernandez *et al.*, 2003). En tots els casos l'especificitat és molt elevada i ve determinada per la interacció RNA-RNA que es produeix entre el ribozim i el substrat, on el mateix RNA ribozímic és el responsable del

reconeixement, interacció i activitat catalítica (Figura 4). Remarcar el fet que la majoria d'ells, tal i com es descriu a la taula, reconeixen com a diana una seqüència. Només la ribonucleasa P reconeix una estructura, una característica molt interessant que s'aprofitarà en aquesta tesi.

Taula 1. Descripció i aplicacions terapèutiques dels ribozims naturals (Gómez *et al.*, 2003).

Ribozim	Mida (nts)	Origen/font	Activitat catalítica	Funció	Aplicació terapèutica
<i>Hammerhead</i>	31-42 (seqüència mínima)	Viroïdes patògens de plantes, RNA satèl·lit	Tall específic seqüència	Autoprocessament RNA	Digestió d'RNA: viral, oncogènic o mutat
<i>Hairpin</i>	50 (seqüència mínima)	Viroïdes patògens de plantes, RNA satèl·lit	Tall específic seqüència	Autoprocessament RNA	Digestió d'RNA: viral, oncogènic o mutat
Introns grup I	413 en <i>Tetrahymena thermophila</i>	Eucariotes, procariotes i bacteriòfags	Tall específic seqüència i lligació RNA	Eliminació introns	Reparació d'RNA mutat
Introns grup II	887 en mitocondri de llevat	Orgànuls eucariotes i procariotes	Tall específic seqüència i lligació DNA	Eliminació introns	Reparació de DNA
VS ribozim	154	Mitocondri <i>neurospora</i>	Tall específic seqüència i lligació RNA	Autoprocessament i lligació d'RNA no codificant	Proposat per digestió d'RNA estructurat
Virus Hepatitis Delta (VHD)	85 (necessaris)	VHD (satèl·lit d'RNA del VHB)	Tall específic seqüència	Autoprocessament	Reparació d'RNA
Spliceosoma (U2+U6 snRNAs)	180, 100	Eucariotes	Tall específic seqüència i lligació RNA	<i>splicing</i>	Reparació mRNA mutat
Ribosoma (23S rRNA)	2600	Eucariotes i procariotes	Peptidil transferasa	Síntesi de l'enllaç peptídic	
RNasa P	Bacteris: 340-410 Humana: 344	Totes les cèl·lules i orgànuls que sintetitzen tRNA	Tall específic d'estructura	Processament tRNA	Digestió d'RNA viral

3.1. Aplicacions terapèutiques

La propietat que presenten els ribozims de tallar específicament RNA, ha convertit aquestes molècules en eines moleculars molt prometedores per a la teràpia gènica i com a possibles agents antivirals. En el seu context natural, però, la majoria de ribozims (excepte la ribonucleasa P) catalitzen reaccions intramoleculares (en *cis*) (Hampel i Tritz, 1989; Kruger *et al.*, 1982; Hutchins *et al.*, 1986; Perrotta i Been, 1991) i com a conseqüència no poden ser considerats com a vertaders enzims ja que durant el curs de la reacció es modifiquen (Figura 4).

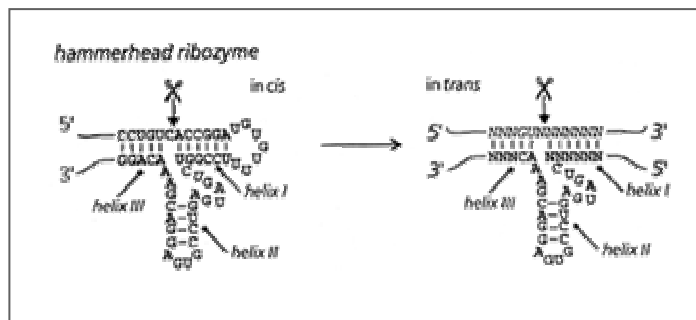


Figura 4. Model del mecanisme de tall del ribozim *hammerhead* natural (en *cis*) i terapèutic (en *trans*). De Quan Du, 1999. (<http://academic.brooklyn.cuny.edu/chem/zhuang/QD/toppage1.htm>).

Els ribozims naturals, però, es poden convertir en ribozims terapèutics per destruir teòricament qualsevol RNA. Els ribozims terapèutics són ribozims normalment modificats per ser més estables i estan dissenyats per processar substrats en *trans* en reaccions bimoleculares (Hampel i Tritz, 1989; Zaug i Cech, 1986; Branch i Robertson, 1991; Puerta-Fernandez *et al.*, 2003), on el domini de reconeixement del substrat és específic per l'RNA a inactivar i el domini catalític idèntic al del ribozim natural (Figura 4).

A la taula 1 es resumeixen les aplicacions terapèutiques dels ribozims naturals i a la figura següent (Figura 5) es mostren les estructures secundàries d'alguns dels ribozims desenvolupats per a teràpia gènica.

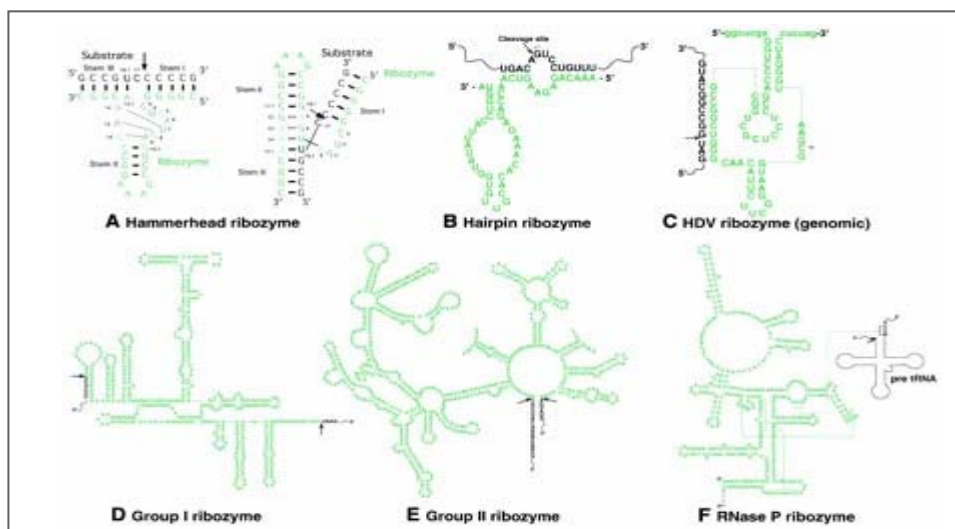


Figura 5. Estructura secundària d'alguns ribozims. Els nucleòtids de color verd corresponen al domini catalític i els de color negre el substrat. Les fletxes indiquen les posicions de tall. De Takagi *et al.*, 2001.

(en el cas de la ribonucleasa P entre la seqüència diana i la seqüència guia) i l'estructura terciària pot dificultar l'accés del ribozim mitjançant impediments estèrics (sobretot en ribozims de mida gran). Així doncs, previ a l'assaig d'activitat, ja sigui *in vitro* o en cultiu, és aconsellable identificar regions accessibles on poder dirigir el ribozim ja que s'ha observat que dianes localitzades en regions conegudes com a poc estructurades són més efectives que les localitzades en estructures estables (Vickers *et al.*, 2000).

La identificació *in vitro* de zones poc estructurades o obertes es pot realitzar utilitzant mètodes químics (Peattie i Gilbert, 1980; Brunel i Romby, 2000; Ehresmann *et al.*, 1987; Moazed *et al.*, 1986) i enzimàtics (Knapp, 1989), combinats amb models de predicció d'estructura secundària (Jaeger *et al.*, 1990; Mathews *et al.*, 1999) (adreces de programes de predicció d'estructura: <http://mfold2.wustl.edu>; <http://bioinfo.math.rpi.edu/~zukerm/rna/>; <http://www.tbi.univie.ac.at/~ivo/RNA/>);. Dins dels mètodes enzimàtics *in vitro* un dels més utilitzats és l'assaig amb oligonucleòtids antisentit i ribonucleasa H. La ribonucleasa H reconeix dúplex DNA-RNA (Hausen i Stein, 1970) i degrada l'RNA en sentit 3'→5' (Crooke *et al.*, 1995). L'estudi d'accessibilitat consisteix en assajar la ribonucleasa H amb oligonucleòtids de longitud determinada i complementaris, a intervals molt poc distants, de l'RNA diana. S'ha descrit que els impediments estructurals afecten l'accés de l'oligonucleòtid antisentit i inhibeixen l'activitat de la ribonucleasa H (Lima *et al.*, 1997), per tant el percentatge de tall reflecteix l'accessibilitat de l'RNA.

Els models de predicció d'estructura secundària i els estudis d'accessibilitat *in vitro* s'han utilitzat com a eines per a la selecció de dianes accessibles per a la teràpia amb ribozims (De Young *et al.*, 1994; Scherr i Rossi, 1998; Birikh *et al.*, 1997; Ho *et al.*, 1996; Jarvis *et al.*, 1996; Scherr *et al.*, 2000). Malgrat tot, la correlació entre l'eficiència de tall del ribozim *in vitro* i en cultiu a vegades és variable (Bertrand *et al.*, 1994; Crisell *et al.*, 1993; Dropulic i Jeang, 1994; De Young *et al.*, 1994; Jarvis *et al.*, 1996), degut en part a les interaccions RNA viral-proteïna que poden bloquejar la interacció amb el ribozim (Nakamura, 2001; Brodersen i Ramakrishnan, 2003). Així doncs, la tercera aproximació consisteix en fer un crivellatge de les regions accessibles en l'ambient cel·lular. Per a l'estudi d'accessibilitat *in vivo* s'utilitza el mètode del dimetil sulfat (DMS) (Liu i Altman, 1995; Zaug i Cech, 1986). Aquest component químic entra a les cèl·lules i modifica els nucleòtids exposats, és a dir els que es localitzen en regions accessibles.

3.1.2. Ribozims com a agents antivirals

La propietat dels ribozims terapèutics de tallar específicament qualsevol RNA diana fa que es converteixin en possibles dianes terapèutiques, a més a més de qualsevol RNA missatger de virus de DNA o RNA, els propis genomes RNA. Molts dels patògens humans que contribueixen a un impacte social i econòmic més important són precisament virus d'RNA i per aquesta raó s'han convertit en un dels principals focus de recerca de la teràpia amb ribozims. El virus de la sida i de l'hepatitis C en són un bon exemple.

A la taula següent (Taula 2) es resumeixen els virus que fins al moment han estat objecte d'estudis amb ribozims. S'hi inclouen també les dianes escollides en cada cas, l'efecte sobre l'RNA diana i les conseqüències sobre el cicle del virus en cultiu. Remarcar que de tots els ribozims naturals descrits a la taula 1 només el ribozim *hammerhead*, el *hairpin* i la ribonucleasa P s'estudien com a possibles agents antivirals.

3.1.3. Altres aplicacions terapèutiques

Els ribozims poden ser utilitzats per a altres aplicacions diferents que les estratègies antivirals les quals han contribuït a ampliar el ventall d'aplicacions dins del camp de la teràpia gènica (Lewin i Hauswirth, 2001). Així tenim que s'estan desenvolupant per exemple ribozims per ser dirigits contra oncogens o RNA missatger mutat (Kijima i Scanlon, 2000; James i Gibson, 1998; Kuwabara *et al.*, 1998; Cobaleda i Sanchez-Garcia, 2000). Dins del mateix camp també, recentment s'han incorporant nous ribozims, ja no com a destructors d'RNA sinó com a possibles reparadors gènics (Sullenger i Cech, 1994; Lan *et al.*, 1998; Watanabe i Sullenger, 2000). Finalment, a més a més de les aplicacions terapèutiques no es pot descartar la utilització de ribozims per a estudis funcionals ja sigui de gens virals (Dunn *et al.*, 2001) o eucariotes (Suyama *et al.*, 2003; Kawasaki *et al.*, 2003).

Virus	Ribozim	Diana	Eficiència ribozim
VHC	<i>Hammerhead</i>	regió 5'NCR	90% inhibició replicació (quimera HCV-PV) (1)
		regió 5'NCR RNA (-)	Eliminació RNA (2) Eliminació RNA (2)
	<i>Hammerhead</i> + Interferó	5'NCR	98% (HH+IFN), amb dosis tres vegades més baixes d'interferó (3)
	<i>Hairpin</i>	regió 5'NCR	Fase I assaig clínic (1,4)
		Core	79% reducció partícules retrovirals (5)
VHB	<i>Hammerhead</i>	mRNA gen HBx	Reducció de proteïna, efecte antireplicatiu i disminució de malalties associades (6,7)
	<i>Hairpin</i>	proteïna X polimerasa RNA pregenòmic	80% inhibició infecció (8) 80% inhibició infecció (8) Inhibició replicació viral (9)
	<i>Hairpin</i> -nucleasa resistent	mRNA antigen superf. RNA pregenòmic	Disminució nivell d'antigen (10) Bloqueig cicle (10)
	RNasa P humana	mRNA antigen superf.	<i>in vitro</i> (11)
VIH-1	<i>Hammerhead</i>	mRNA gen <i>tat</i>	Inhibició replicació >80% (12-14) Reducció significativa mRNA, pot ser efectiu en molts aïllats (15) Reducció significativa mRNA <i>gag</i> , reducció nivell antigen p24 (16) Supressió activitat vírica (17) Reducció activitat HIV (18,19)
		mRNA gen <i>env</i> (estudi multidiana)	
		mRNA gen <i>gag</i>	
	<i>Hairpin</i>	mRNA gen <i>pol</i> regió 5'LTR	Reducció activitat HIV (18) Inhibició 95%, observen relació entre expressió del ribozim i avantatge selectiu (20) Inhibició replicació, observen que una sola mutació afecta significativament el nivell de inhibició (21) Inhibició replicació, efectiu en diferents soques (22) Fase I assaig clínic (23) Fase I assaig clínic (23)
		regió 5'LTR	
		mRNA gen <i>rev/env</i>	
		mRNA gen <i>pol</i> regió 5'LTR mRNA gen <i>pol</i>	
		regió 5'LTR	
RNasa P humana	regió 5'LTR	Inhibició replicació i patologia associada a la infecció (24,25)	
RNasa P d' <i>E.coli</i> (M1RNA+EGS)	regió 5'LTR	Inhibició replicació (26)	

Virus	Ribozim	Diana	Eficiència ribozim
Virus grip	<i>Hairpin</i>	segment 5' RNA viral	70-80% resistència a infecció (27)
	RNasa P humana	mRNA polimerasa i proteïna càpsida	Inhibició completa replicació quan es dirigeix contra els dos mRNAs alhora (28)
VHS-1	RNasa P humana	mRNA TK	Reducció 80% mRNA i expressió proteïna (29)
	RNasa P d' <i>E. coli</i> (M1GS)	mRNA TK activador transcripció ICP4	Reducció 80% mRNA i expressió proteïna 80% (30) Reducció 80% de l'activador, reducció 1000 vegades replicació viral (31)
	RNasa P d' <i>E. coli</i> (M1GS modificada i seleccionada)	mRNA TK	Reducció 95-99% mRNA i expressió proteïna (32)
CMVH	RNasa P humana (EGS basats en DNA)	mRNA proteasa PR	Reducció 80-90% expressió proteasa, reducció 300 vegades creixement viral (33)
	RNasa P d' <i>E. coli</i> (M1GS)	mRNAs proteïnes regulació transcripció (iE1/iE2)	Reducció 80-97% expressió proteïnes, reducció 3000 vegades creixement viral (34,35)
		mRNA proteasa PR	Reducció 80% expressió proteasa, reducció 100 vegades creixement viral (36)
Papiloma (HPV-16)	<i>Hairpin</i>	mRNA HPV-16 E6/E7	Inhibició expressió mRNA, disminució creixement cèl·lules i prevenció immortalitat (37)
Paperes	<i>Hairpin</i> <i>Hammerhead</i>	mRNA nucleocàpsida	Reducció del mRNA i progènie (38)

Taula 2. Utilització de ribozims com a possibles agents antivirals. Relació dels virus i ribozims estudiats així com la diana escollida i l'eficiència d'inhibició. Quan no queda especificat a la taula, l'eficiència d'inhibició fa referència a cultiu. Abreviacions: VHC (virus de l'hepatitis C), VHB (virus de l'hepatitis B), VIH-1 (virus de la immunodeficiència humana tipus 1), VHS-1 (virus de l'herpes simple tipus 1) i CMV (citomegalovirus). Referències: (1) (Macejak *et al.*, 2000); (2) (Lieber *et al.*, 1996); (3) (Macejak *et al.*, 2001); (4) (Usman i Blatt, 2000); (5) (Welch *et al.*, 1996); (6) (Kim *et al.*, 1999); (7) (Weinberg *et al.*, 2000); (8) (Welch *et al.*, 1997); (9) (zu Putlitz *et al.*, 1999); (10) (Morrissey *et al.*, 2002); (11) (Werner *et al.*, 1998); (12) (Sun *et al.*, 1995); (13) (Wang *et al.*, 1998); (14) (Jackson *et al.*, 1998); (15) (Chen *et al.*, 1992); (16) (Sarver *et al.*, 1990); (17) (Giordano *et al.*, 2000); (18) (Koizumi *et al.*, 1998); (19) (Klebba *et al.*, 2000); (20) (Yu *et al.*, 1993); (21) (Yamada *et al.*, 1994); (22) (Yu *et al.*, 1995); (23) (Wong-Staal *et al.*, 1998); (24) (Kraus *et al.*, 2002); (25) (Hnatyszyn *et al.*, 2001); (26) (Endo *et al.*, 2001); (27) (Tang *et al.*, 1994); (28) (Plehn-Dujowich i Altman, 1998); (29) (Kawa *et al.*, 1998); (30) (Liu i Altman, 1995); (31) (Trang *et al.*, 2000a); (32) (Kilani *et al.*, 2000); (33) (Dunn *et al.*, 2001); (34) (Trang *et al.*, 2000b); (35) (Trang *et al.*, 2002); (36) (Trang *et al.*, 2003); (37) (Alvarez-Salas *et al.*, 1998); (38) (Albuquerque-Silva *et al.*, 1999).

4. La ribonucleasa P

4.1. Descripció i funció

La ribonucleasa P (RNasa P) va ser descoberta per Hugh Robertson i col·laboradors l'any 1972 quan buscaven l'enzim responsable de la maduració del precursor de l'RNA de transferència de la tirosina (pre-tRNA^{Tyr}) en *E.coli* (Robertson *et al.*, 1972). Els RNAs de transferència es transcriuen en forma de precursors (pre-tRNA) i es converteixen en RNAs de transferència (tRNA) després d'un procés de maduració (Altman, 1975). La ribonucleasa P és un dels enzims clau que participa en aquest procés tallant el fragment 5' dels precursors per generar l'extrem 5' madur dels tRNAs funcionals (Robertson *et al.*, 1972) (Figura 7).

La ribonucleasa P és un enzim essencial, funcionalment molt conservat, que s'ha trobat en totes les cèl·lules examinades, tant eucariotes com procariotes (Gold *et al.*, 1988) i en tots els compartiments cel·lulars que sintetitzen tRNAs: mitocondris (Hollingsworth i Martin, 1986) i cloroplasts (Gegenheimer, 1995).

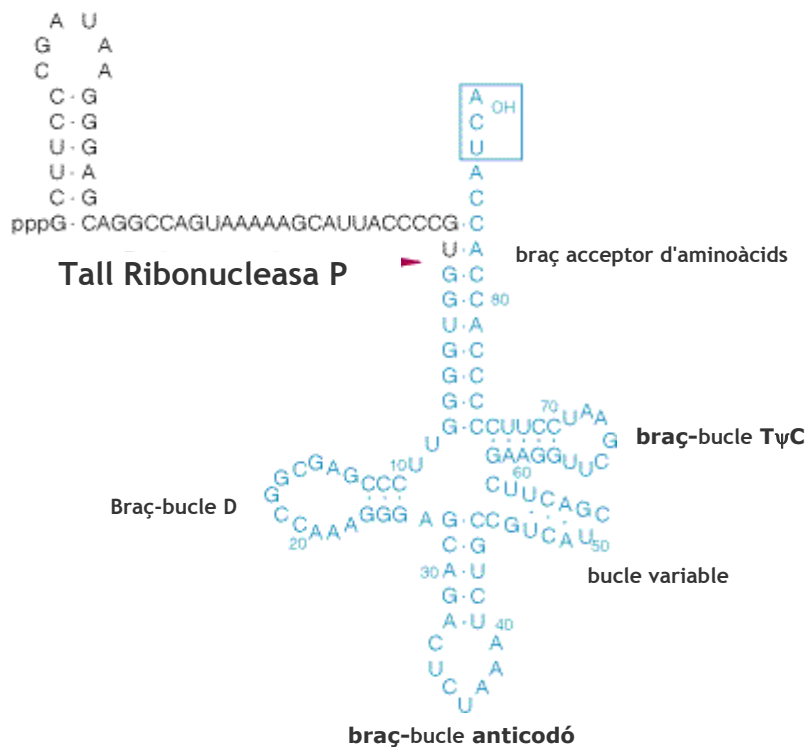


Figura 7. Estructura secundària d'un precursor d'RNA de transferència. S'indica el nom que rep cada domini estructural i la posició on talla la ribonucleasa P (indicada per una fletxa). Després del tall s'obté el fragment 5' (nucleòtids en negre) i el tRNA madur (nucleòtids en blau).

La majoria de ribonucleases P que s'han descrit són ribonucleoproteïnes, contenen un domini d'RNA essencial per a la catàlisi i subunitats proteïques (bases de dades: <http://www.mbio.ncsu.edu/RNaseP/home.html>; <http://www.ibiblio.org/pub/academic/biology/molbio/rnase-p/additions/NAR96.html>). L'excepció la trobem en alguns cloroplasts de plantes on s'ha observat que amb l'activitat ribonucleasa P no co-purifica cap RNA (Gegenheimer, 1995).

La ribonucleasa P entra dins la categoria de ribozim perquè és el component RNA qui presenta l'activitat catalítica tot i que les proteïnes juguen un paper molt important en el reconeixement i interacció amb el substrat. Així ho demostren varis estudis *in vitro* on s'observa que les proteïnes afecten la reactivitat de l'RNA incrementant l'afinitat del complex per el substrat (Biswas *et al.*, 2000; Guerrier-Takada *et al.*, 1983; Reich *et al.*, 1988). Semblant a altres ribozims, la RNasa P és també un metal·loenzim, i requereix ions divalents com a cofactors, preferentment magnesi (Mg^{2+}). Tot i que la funció d'aquests ions no està del tot determinada, s'ha proposat que poden estar implicats en el plegament de l'RNA, la interacció amb el substrat i l'activitat catalítica (Beebe *et al.*, 1996; Kurz i Fierke, 2000).

El mecanisme de catàlisi de la ribonucleasa P s'ha estudiat en bacteris, arqueobacteris i eucariotes. En termes generals aquest mecanisme es pot diferenciar del que porten a terme altres ribozims en tres aspectes: (i) actua via intermolecular, (ii) no genera intermediaris units de forma covalent i (iii) talla el substrat mitjançant una hidròlisi en comptes d'una transesterificació. Els productes que es generen són un extrem 5'-fosfat i un extrem 3' hidroxil (Robertson *et al.*, 1972), característica que s'utilitza per a confirmar que la ribonucleasa P és la responsable del tall i que comparteixen molt poques RNases com per exemple la ribonucleasa III (Robertson, 1990).

4.2. Varietats de Ribonucleasa P

La ribonucleasa P és un enzim essencial per a la viabilitat de les cèl·lules i s'ha proposat com una de les activitats enzimàtiques més antigues (Maizels i Weiner, 1994). La composició i característiques entre els dominis fil·logenètics i orgànuls que sintetitzen precursors de tRNA presenten diferències (Darr *et al.*, 1992).

4.2.1. Ribonucleasa P bacteriana

La ribonucleasa P bacteriana està formada per un RNA d'entre 350-410 nucleòtids i una única subunitat proteica molt poc conservada, molt bàsica i amb una massa molecular entre 12 i 14 kDa que representa aproximadament el 10% de la massa de

l'holoenzim (Pace i Brown, 1995; Frank i Pace, 1998; Brown, 1999) (<http://www.mbio.ncsu.edu/RNaseP/main.html>).

Dins d'aquesta categoria, la ribonucleasa P d'*E.coli* és una de les més ben caracteritzades i estudiades. Està composta per una subunitat proteica de 119 aminoàcids i aproximadament 13.7 KDa (proteïna C5) i un component RNA de 377 nucleòtids anomenat RNA M1. Les RNases P bacterianes presenten una propietat que les diferencia de les altres, el component RNA és capaç de tallar *in vitro* i sense la presència de la proteïna el seu substrat natural en unes condicions elevades de Mg^{2+} (Guerrier-Takada *et al.*, 1983). Tot i això, les proteïnes són totalment imprescindibles a l'hora de processar els pre-tRNA *in vivo* (Frank i Pace, 1998) i *in vitro*, si s'afegeix la subunitat proteica a la reacció el tant per cent de tall augmenta considerablement (Guerrier-Takada i Altman, 1984).

4.2.2. Ribonucleasa P humana

La ribonucleasa P humana és sens dubte una de les RNases P eucariotes més estudiades i caracteritzades degut a l'interès per a l'aplicació terapèutica. Està formada per un component RNA (RNA H1) de 344 nucleòtids (Bartkiewicz *et al.*, 1989) i fins al moment se li han descrit 10 proteïnes associades diferents (Guerrier-Takada *et al.*, 2002; Jarrous i Altman, 2001), que contribueixen aproximadament al 50% de la massa del complex (Bartkiewicz *et al.*, 1989; Kline *et al.*, 1981; Jayanthi i Van Tuyle, 1992; Yuan i Altman, 1995) (Taula 3). Sis d'aquestes proteïnes mostren similitud moderada amb les corresponents homòlogues de *Saccharoyices cerevisiae* i algunes subunitats proteiques Rpp (Rpp 21, Rpp29 i Rpp30) i hPop5 s'ha descrit que també es conserven en arqueobacteris (Koonin *et al.*, 2001) (Taula 1). El contrari del que passa amb la RNasa P bacteriana, el component RNA no és capaç de processar els pre-tRNAs sense les subunitats proteiques, tot i contenir les regions més conservades del centre catalític (Chen i Pace, 1997; Frank *et al.*, 2000). El fet que la RNasa P eucariota presenti diferents proteïnes i en un contingut més elevat, podria explicar la major dependència de l'RNA vers les proteïnes per aconseguir l'estructura tridimensional correcta (Tranguch *et al.*, 1994). No es pot descartar tampoc que les proteïnes hagin adquirit funcions que la RNasa P bacteriana conserva encara en el component RNA (Xiao *et al.*, 2002).

Subunitat	Mr/PI	Funció/interacció	Homologia ^a
Rpp14 ^b	14/7.6	Unió al substrat ^c	
Rpp20 ^d	20/8.6	ATPasa/Helicasa ^e	Pop7/Rpp2
Rpp21 ^c	21/9.6	Unió al substrat ^c	Rpr2
Rpp25 ^g	25/9.7	Unió a l'RNA H1 ^g	
Rpp29 ^b	29/10.2	Unió al substrat ^c	Pop4
Rpp30 ⁱ	30/9.2	Unió l'RNA H1	Rpp1
Rpp38 ⁱ	38/9.6	Localització ^h /Unió l'RNA H1	–
Rpp40 ^d	40/5.2		
hPop1 ^j	115/9.6	Localització	Pop1
hPop5 ^k	19/7.9		Pop5
RNA H1 ^l	105/	Catàlisi	Rpr1

Taula 3. Descripció i possible funció de les subunitats de la ribonucleasa P humana. També s'hi inclou la homologia amb les proteïnes de la ribonucleasa P de llevat. Notes: Pop7 és idèntica a Rpp2 (Stolc *et al.*, 1998) i Rpp29 es coneix com a hPop4 (van Eenennaam *et al.*, 1999). Mitjançant l'anàlisi de mobilitat en gel *shift* s'ha descrit que Rpp14, Rpp21, i Rpp29 recombinants s'uneixen al precursor de tRNA (Jarrous i Altman, 2001). Rpp29, Rpp38 i Pop1 podrien funcionar com a localitzadors nucleolars de l'RNA H1 (Jacobson *et al.*, 1995; van Eenennaam *et al.*, 2000). Rpp21, Rpp29, Rpp30, i Pop5 tenen homòlegs en arqueobacteris. Modificat de Jarrous, 2002.

Referències: ^a(Chamberlain *et al.*, 1998); ^b(Jarrous *et al.*, 1999); ^c(Jarrous i Altman, 2001); ^d(Jarrous *et al.*, 1998); ^e(Li i Altman, 2001); ^f(Jiang i Altman, 2001); ^gGuerrier-Takada i Altman, dades no publicades; (Jiang *et al.*, 2001); ^h(Jarrous *et al.*, 1999); ⁱ(Eder *et al.*, 1997); ^j(Lygerou *et al.*, 1996b); ^k(van Eenennaam *et al.*, 2001); ^l(Ame *et al.*, 2001).

Pel que fa referència a l'RNA, estudis d'hibridacions *in situ* i microinjecció d'RNA H1 marcat en cèl·lules humanes n'han revelat la presència en el nucleoplasma, compartiment perinuclear i citoplasma (Lee *et al.*, 1996). Respecte a les proteïnes s'ha descrit que poden moure's ràpidament d'un compartiment a l'altre dins del nuclèol, especialment la Rpp29 i Rpp38 (Chen i Huang, 2001). Tot i que encara falta per a determinar com s'uneixen les subunitats per a la construcció del complex, els estudis suggereixen que la ribonucleasa P humana és un enzim nuclear però (Jarrous *et al.*, 1999; Lewis i Tollervey, 2000; Pederson i Politz, 2000) que no es pot definir com una entitat fixa degut a la organització dinàmica i flexible de les estructures nuclears (nuclèol inclòs) (Wei *et al.*, 1998).

Tal i com s'observa a la taula 4, també s'ha detectat RNA H1 en el citoplasma (Lee *et al.*, 1996). A part de la funció nuclear, en les cèl·lules eucariòtiques s'ha descrit una activitat semblant en el mitocondri que intervé en la maduració dels precursors de tRNA mitocondrials (Doersen *et al.*, 1985). El component RNA de la ribonucleasa P mitocondrial es transcriu a partir d'un gen nuclear i un estudi realitzat per Puranam i Attardi (2001) amb cèl·lules HeLa ha demostrat que l'RNA de la ribonucleasa P

mitocondrial és idèntic a l'RNA H1. El transport d'RNA H1 cap al mitocondri podria explicar-ne la detecció en el citoplasma.

Subunitat	Citoplasma	Nucleoplasma	Cossos de Cajal	Nuclèol	Mitocondri
H1 RNA	+	+++		+	+
Rpp14		+		+++	
Rpp21		+++		+	
Rpp29		+	+++	+++	
Rpp30		+		+++	
Rpp38		+	+++	+++	
Rpp40				+++	
hPop1		+		+++	
hPop5		+		+++	

Taula 4. Localització d'algunes subunitats de la ribonucleasa P humana a dins de la cèl·lula. La localització de la subunitat d'RNA H1 es va determinar per anàlisi de citometria d'RNA (Wolin i Matera, 1999), les subunitats proteiques mitjançant el mètode d'immunofluorescència (Jarrous *et al.*, 1999; Jarrous i Altman, 2001; Lygerou *et al.*, 1996b; van Eenennaam *et al.*, 1999). Quan la senyal s'indica amb el signe + significa que la fluorescència era visible en el compartiment assenyalat; quan s'indica amb +++ fa referència a una senyal molt intensa. Modificat de Jarrous, 2002.

La maduració de l'extrem 5' dels precursors de tRNA es regula de diferents maneres dins les cèl·lules, modulant l'activitat de la ribonucleasa P humana o controlant l'expressió de les seves proteïnes. L'antigen La és un dels factors que participa en la regulació de l'activitat de la Ribonucleasa P, s'ha detectat en el nucli i el citoplasma i actua unint-se als precursors de tRNA i bloquejant així el lloc de tall de la ribonucleasa P (Maraia i Intine, 2001; Fan *et al.*, 1998; Intine *et al.*, 2000).

4.3. Reconeixement del substrat

En un mateix organisme pot haver-hi entre 30 i 150 varietats de precursors de tRNA diferents i la ribonucleasa P els reconeix i processa tots (Söll, 1993). A més, generalment pot processar els pre-tRNAs d'altres espècies.

Estudis que comparen seqüències de diferents precursors de tRNA d'un mateix organisme o entre organismes, conclouen que la seqüència primària del precursors no és molt conservada, ni a la zona que envolta la posició de tall de la ribonucleasa P. No és probable doncs que el reconeixement del substrat estigui dictat per la

seqüència dels precursors. Quin és així l'element comú que comparteixen tots els precursors i que els confereix l'habilitat de ser reconeguts per la RNasa P?

Els resultats que es van obtenir a partir de càlculs d'energia lliure mínima i de proves químiques i enzimàtiques (Wrede *et al.*, 1979) van suggerir que tots els pre-tRNAs comparteixen una estructura secundària i terciària comuna, independentment de quina sigui la seqüència primària (Swerdlow i Guthrie, 1984) (Figura 7). La confirmació que són els elements estructurals els que intervenen en el reconeixement del substrat deriva d'un estudi que va revelar que la mutació d'un sol nucleòtid que alteri l'estructura secundària o terciària dels precursors, té com a conseqüència una disminució del processament (McClain *et al.*, 1987).

La majoria de motius estructurals relacionats amb el reconeixement es troben en el domini tRNA (Frank i Pace, 1998). El grup de Sidney Altman i col·laboradors va realitzar diferents estudis amb ribonucleasa P d'*E.coli* i humana per determinar quins motius estaven directament implicats en el reconeixement. Si bé per els dos ribozims s'ha descrit que el substrat mínim és una molècula bastant més petita que els precursors de tRNA els requeriments estructurals són lleugerament diferents.

La ribonucleasa P d'*E.coli* reconeix i processa una molècula que simplement conté el braç acceptor de l'aminoàcid, el braç-bucle T, el fragment 5' i una seqüència de l'extrem 3' terminal (McClain *et al.*, 1987) (Figura 7 i 9). S'ha comentat a l'inici d'aquest apartat que les seqüències de les espècies de tRNAs són diferents. Els pre-tRNA bacterians es caracteritzen per tenir la seqüència -CCA a l'extrem 3'. Aquesta seqüència és imprescindible per el reconeixement del substrat (Guerrier-Takada i Altman, 1984).

D'altra banda, la combinació de varies tècniques ha permès determinar que el component RNA M1 i la proteïna C5 de la ribonucleasa P d'*E.coli* s'uneixen a diferents motius estructurals dels precursors. El component RNA s'organitza en dos subdominis: el domini catalític (implicat en el reconeixement del braç acceptor de l'aminoàcid, el lloc de tall i la seqüència 3' terminal -CCA) (Biswas *et al.*, 2000; Chen i Pace, 1997; Frank *et al.*, 2000; Tranguch *et al.*, 1994; Talbot i Altman, 1994; Loria *et al.*, 1998; Pannucci *et al.*, 1999) i el domini d'unió al substrat (reconeixement i interacció amb el braç-bucle T) (Niranjanakumari *et al.*, 1998; Vioque *et al.*, 1988) (Figura 8). Les proteïnes, tot i no estar relacionades directament amb la catàlisi, contribueixen en el reconeixement del substrat unint-se directament al fragment 5' dels precursors i augmentant així l'afinitat per el substrat (Chamberlain *et al.*, 1996; Crary *et al.*, 1998; Yoo i Wolin, 1997). Es creu que aquesta unió permetria que el complex diferenciés entre substrat (pre-tRNA) i producte (tRNA) i evitaria així un

inhibició per tRNA madur, la concentració del qual és més elevada dins la cèl·lula (Crary *et al.*, 1998).

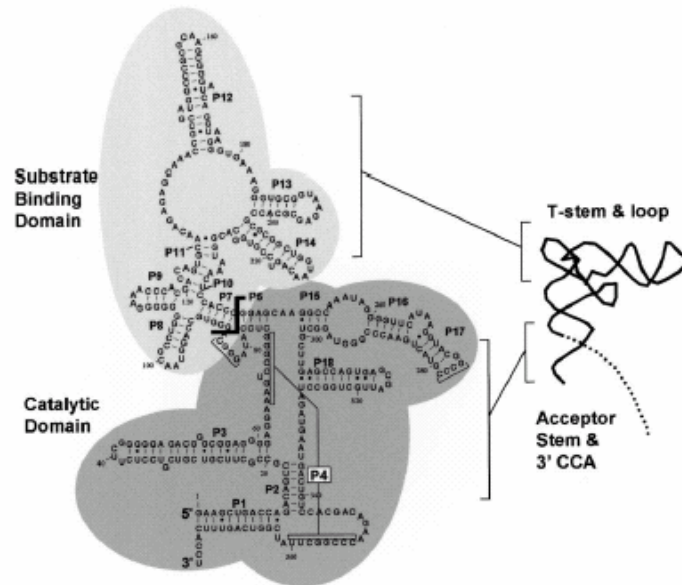


Figura 8. Estructura secundària i organització del component RNA de la ribonucleasa P d'*E.coli*. Es diferencien els dos dominis principals del component RNA : de color gris clar els domini d'unió al substrat i de color gris fosc el domini catalític. De Christian *et al.* 2002.

Així doncs, el substrat mínim que reconeix la RNasa P d'*E.coli* no conté ni el braç-bucle D, ni el braç-bucle de l'anticodó, ni el bucle variable dels precursors, de manera que el braç acceptor i el braç T formen una doble hèlix d'RNA contínua (Figura 9). La ribonucleasa P humana en canvi no és capaç de reconèixer aquest substrat mínim, necessita un mínim de 2 nucleòtids entre el braç acceptor i el braç T que substitueixin els altres tres motius estructurals (Yuan i Altman, 1995; Carrara *et al.*, 1995). Tot i que aquest tres motius estructurals pròpiament dits no són essencials per el reconeixement o processament de la RNasa P humana, sí que podrien contribuir d'alguna manera en la col·locació dels pre-tRNAs en el centre catalític (Yuan i Altman, 1995). S'ha proposat que alguna de les proteïnes podria ser la responsable d'aquesta interacció (Yuan i Altman, 1995).

Si bé s'ha descrit que la RNasa P humana mesura la longitud dels dos braços en parell de bases (12-13 pb), talla en un lloc específic, gairebé sempre, davant d'una guanina (Yuan i Altman, 1995), i que algunes subunitats proteiques interaccionen físicament amb els precursors de tRNA (Taula 3) (True i Celander, 1998), no es coneix encara el sistema exacte de reconeixement de l'holoenzim.

4.4. Aplicacions terapèutiques de la RNasa P d'*E.coli* i humana

Com que la ribonucleasa P reconeix motius estructurals i no una seqüència determinada, és molt poc probable que la majoria d'RNAs diana continguin una estructura semblant als pre-tRNAs. L'any 1990 Sidney Altman i col·laboradors van desenvolupar un mètode efectiu i enginyós per poder aplicar la ribonucleasa P com a ribozim terapèutic aprofitant les dades derivades dels estudis d'estructura mínima. Després de convertir els substrats mínims en bimolècules que la ribonucleasa P reconeixia i processava (Forster i Altman, 1990; Yuan *et al.*, 1992), varen aconseguir convertir qualsevol RNA en un substrat diana per a la ribonucleasa P creant una estructura que mimetitzés el substrat natural. La tècnica consisteix en dissenyar una molècula d'RNA que quan hibrida amb l'RNA diana mimetitza l'estructura dels precursors de tRNA. L'estructura de l'híbrid és reconeguda per la ribonucleasa P que talla l'RNA diana en una posició predeterminada (Figura 9 i 10). Aquestes seqüències d'RNA s'anomenen seqüències guia externes (EGS) perquè guien la ribonucleasa P cap a la posició específica per on s'ha de tallar l'RNA diana (Forster i Altman, 1990; Yuan *et al.*, 1992). En un primer moment els experiments es varen realitzar amb la ribonucleasa P de *E.coli* però ràpidament es varen estendre a la ribonucleasa P humana.

4.4.1. Disseny de seqüències guia externes

Les pautes per dissenyar les seqüències guia externes varien segons s'hi s'utilitza com a ribozim la ribonucleasa P d'*E.coli* o la humana ja que els substrats mínims descrits són diferents.

RNA M1 (Ribonucleasa P d'*E.coli*)

Les primeres seqüències guia externes testades amb l'RNA M1 consistien en una seqüència de 13 nucleòtids complementària l'RNA diana i la seqüència -CCA a l'extrem 3'terminal (Figura 9). La doble hèlix de 13 parells de bases mimetitza el braç acceptor i el braç T. Les primeres evidències que el mètode funcionava en cultiu es varen obtenir dissenyant EGS contra l'RNA missatger de la β -galactosidasa i la fosfatasa alcalina en *E.coli* (Guerrier-Takada *et al.*, 1995).

L'RNA M1 però, es pot convertir en un ribozim específic més eficaç si se li uneix de manera covalent a l'extrem 3' terminal la seqüència guia externa (Guerrier-Takada *et al.*, 1995; Liu i Altman, 1995; Frank *et al.*, 1994). A aquest ribozim se l'ha anomenat RNA M1GS i s'ha descrit que és més efectiu inhibint l'expressió de gens virals i la replicació de virus en cultiu (Kilani *et al.*, 2000; Liu i Altman, 1995; Trang *et al.*, 2000a; Trang *et al.*, 2000b) (Figura 9).

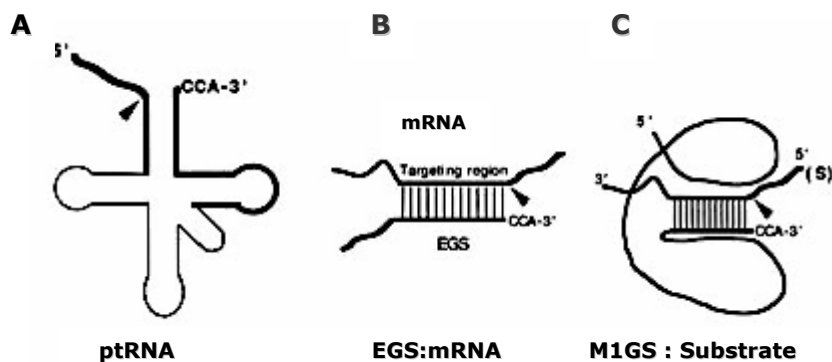


Figura 9. Esquema on es representa: (A) un precursor de tRNA (ptRNA), (B) un model de substrat EGS:mRNA per a la ribonucleasa P d'*E.coli* i RNA M1 i (C) un ribozim M1GS amb la seqüència GS específica per hibridar amb el substrat diana d'RNA. De Kilani *et al.*, 2002.

Ribonucleasa P humana

Per tal de que una seqüència guia externa dirigeixi l'activitat de la ribonucleasa P humana cap a una diana determinada ha d'estar formada, des de l'extrem 3' a 5', per una seqüència de 7 nucleòtids complementària al RNA diana, seguida del braç-bucle T dels precursors de tRNA i una seqüència de 5-6 nucleòtids complementària també al RNA diana. La seqüència guia externa es dissenya de manera que entre les dues hèlix complementàries romanguin dos nucleòtids del substrat sense hibridar els quals substitueixen el braç-bucle D, el braç-bucle de l'anticodó i el bucle variable dels precursors. La hibridació entre els 7 primers nucleòtids i l'RNA diana mimetitza el braç acceptor d'aminoàcids dels precursors de tRNA (Figura 10). La posició de tall sempre serà just abans d'una guanina, tal i com té lloc en els precursors de tRNA (Plehn-Dujowich i Altman, 1998).

Les primeres evidències que el mètode funcionava es varen obtenir dirigint la ribonucleasa P contra l'RNA missatger que codifica per la β -galactosidasa i per la cloramfenicol acetiltransferasa (CAT), *in vitro* i en cultiu (Yuan *et al.*, 1992).

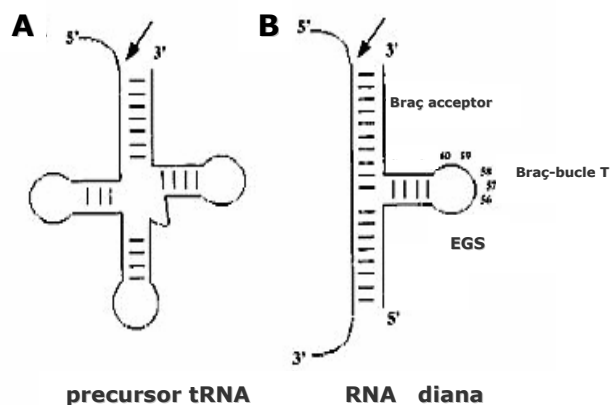


Figura 10. (A) Estructura d'un precursor de tRNA. (B) Esquema d'una seqüència guia externa (EGS) unida a un RNA diana. La hibridació es produeix mitjançant interaccions Watson i Crick entre la seqüència guia i la seqüència complementària de l'RNA diana. En ambdós esquemes s'indica amb un fletxa la posició de tall de la ribonucleasa P humana. De Ma *et al.*, 2000.

4.4.2. Teràpia antiviral amb la ribonucleasa P

La ribonucleasa P i les seqüències guia s'han utilitzat amb èxit com a mètode per inactivar RNAs virals *in vitro* i en cultiu. Els EGS s'han dissenyat per guiar la ribonucleasa P endògena cap a RNAs missatgers que codifiquen per proteïnes imprescindibles per als virus. Paral·lelament també s'ha utilitzat el ribozim RNA M1GS per a la inhibició d'RNAs virals. Actualment la majoria de treballs van dirigits cap a l'aplicació de l'RNA M1GS com a ribozim terapèutic, ja que presenta uns rendiments d'inhibició més elevats.

Els treballs publicats fins al moment es resumeixen a la taula 2.

5. Antecedents del VHC i la teràpia amb ribozims

Ja s'ha dit a l'inici d'aquesta introducció que el virus de l'hepatitis C és un virus d'RNA que no s'integra al genoma i per tant això el converteix en un bon candidat per a la teràpia amb ribozims dirigits directament contra el genoma del virus. S'han estudiat ribozims del tipus *hammerhead* o *hairpin* dirigits contra la zona més conservada del virus, la regió 5' no codificant (Taula 2). Actualment el ribozim *hammerhead* es troba en fase I d'assaig clínic (Macejak *et al.*, 2000).

Els ribozims *hammerhead* i *hairpin* estan formats per un motiu catalític i una seqüència complementària a l'RNA contra el qual van dirigits (Figura 5). Perquè es produeixi el tall és necessari que hibridin completament l'RNA i el domini de reconeixement del substrat del ribozim i per això es diu que aquests ribozims són dependents de seqüència. De fet, s'ha vist que quan existeixen bases desaparellades entre l'RNA diana i el ribozim terapèutic prop de la posició de tall, l'eficiència del ribozim disminueix significativament (Zoumadakis *et al.*, 1994; Werner i Uhlenbeck, 1995). Tal i com s'ha esmentat anteriorment, però, el genoma del VHC no es pot definir per una única seqüència sinó per una població de variants molt relacionades entre sí (Martell *et al.*, 1992), per tant una de les limitacions del potencial terapèutic ve determinada per la susceptibilitat de la interacció entre el ribozim i els substrat degut a l'elevada taxa de mutació.

La ribonucleasa P es presenta com una eina terapèutica addicional als ribozims derivats de viroides i presenta avantatges respecte els anteriors. El fet de que reconegui una estructura i no una seqüència incrementa les possibilitats d'èxit quan es dirigeix contra un virus molt variable ja que per un mateix nombre de seqüències diferents, el nombre d'estructures viables és molt més petit i per tant la variabilitat

de la diana disminueix. Si bé les seqüències guia externes també han d'hibridar amb l'RNA diana, no són molècules catalítiques i la seva funció només consisteix en guiar la ribonucleasa P. S'ha descrit que la hibridació entre una seqüència guia externa i l'RNA permet fins a quatre aparellaments incorrectes (Plehn-Dujowich i Altman, 1998).

6. Ribonucleasa MRP

En eucariotes, la ribonucleasa P nuclear està molt relacionada amb una altra ribonucleoproteïna que s'anomena ribonucleasa MRP (RNasa MRP). La RNasa MRP intervé en el processament de precursors d'RNA ribosomal (rRNA), concretament generant l'extrem 5' madur de l'RNA ribosomal 5.8S (Lygerou *et al.*, 1996a; Schmitt i Clayton, 1993; Chu *et al.*, 1994). També s'ha detectat RNasa MRP en el mitocondri i es creu que pot estar implicada en el processament d'RNA mitocondrial (Chang i Clayton, 1989).

La ribonucleasa MRP, igual que la ribonucleasa P, es localitza majoritàriament en el nucli (Reimer *et al.*, 1988; Kiss *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1994; Jacobson *et al.*, 1995) conté una subunitat RNA essencial i vàries subunitats proteiques (Schmitt i Clayton, 1993; Shuai i Warner, 1991). Els components RNAs de la ribonucleasa P i MRP presenten similituds de seqüència i d'estructura (Gold *et al.*, 1989; Karwan, 1993) i comparteixen 6 de les subunitats proteiques descrites a la taula 3, Rpp20, Rpp29, Rpp30, Rpp38, hPop1 i hPop5 (Lygerou *et al.*, 1996b; Pluk *et al.*, 1999; van Eenennaam *et al.*, 1999).

En procariotes la RNasa MRP no existeix. Els quatre RNAs ribosomals s'obtenen del processament d'un únic precursor que conté elements tRNA entre les regions que codifiquen per els rRNAs. La ribonucleasa P és una de les activitats que participa en la maduració dels RNAs ribosomals reconeixent i processant aquests elements tRNA.

El fet que durant l'evolució els precursors de rRNA eucariotes hagin modificat els motius tRNA, imprescindible perquè la RNasa P els processés, explicaria l'aparició d'un altre enzim adaptat a un substrat que no conté elements tRNA. Les semblances entre les dos enzims i altres evidències suggereixen que la RNasa MRP ha evolucionat a partir de la RNasa P (Morrissey i Tollervey, 1995; Karwan, 1993).

La ribonucleasa MRP no talla els precursors de tRNA *in vitro* (Karwan, 1993; Bennett *et al.*, 1992) ja que s'ha comprovat que mutants negatius d'RNasa MRP en *S.cerevisiae* només acumulen un rRNA 5.8S amb l'extrem 5' no processat (Schmitt i Clayton, 1993). Sí que s'ha vist en canvi que mutants negatius d'RNasa P acumulen, a més a més de pre-tRNAs amb l'extrem 5' sense madurar, un rRNA 5.8S aberrant amb 35 nucleòtids més a l'extrem 3' i que la ribonucleasa P reconeix i talla els pre-rRNA 5.8S *in vitro* (Chamberlain *et al.*, 1996). Tot i que de moment no s'ha demostrat que la ribonucleasa P intervingui directament en el processament de rRNA ribosomal en eucariotes, no es pot descartar la possibilitat que actuï indirectament en el processament formant part, juntament amb la RNasa MRP i altres *snoRPS* (*small nucleolar ribonucleoproteins*), d'un complex de processament de rRNA ubicat en el nuclèol (Chamberlain *et al.*, 1996). S'ha determinat mitjançant hibridacions *in situ* que una quantitat petita d'RNasa P i RNasa MRP es troben associades dins les cèl·lules, més concretament en el nuclèol (Lee *et al.*, 1996).

7. Mimetisme molecular

El mimetisme és un sofisticat mecanisme que presenten animals i plantes que consisteix en imitar formes o colors amb finalitats tant diverses com atacar, escapar, amenaçar o pol·linitzar. Aquesta estratègia, però, no queda restringida al món dels animals i plantes sinó que s'estén també a nivell molecular i en aquest context s'anomena mimetisme molecular.

En el cas de l'RNA el mimetisme està relacionat amb l'estructura secundària i terciària que adopta la molècula ja que s'ha demostrat que l'estructura general o els diferents tipus d'estructures locals que pot formar són qui determinen la funció biològica. Així doncs el concepte de mimetisme d'RNA s'aplica quan l'estructura d'una molècula d'RNA ha evolucionat per interaccionar amb una proteïna o complex macromolecular que normalment s'uneix a un RNA diferent (Springer *et al.*, 1998). Un dels mimetismes d'RNA més descrit i estudiat és el de l'RNA de transferència (tRNA).

7.1. Estructures tipus tRNA

Les estructures d'RNA que imiten els RNAs de transferència s'anomenen estructures tipus tRNA (*tRNA-like structures* (TLS)) i per definició són aquelles estructures que tenen l'habilitat de reaccionar de manera eficient amb un o més enzims específics dels tRNAs (Mans *et al.*, 1991). Precisament, la identificació i caracterització d'aquestes estructures es porta a terme utilitzant enzims del metabolisme dels RNAs de transferència. Tal i com s'ha esmentat anteriorment, la ribonucleasa P és un dels enzims clau i per tant la presència d'una estructura que sigui reconeguda i processada pel ribozim es considera un indicador d'aquest tipus de mimetisme (Robertson *et al.*, 1972; Joshi *et al.*, 1982; Komine *et al.*, 1994). En el metabolisme del tRNA però hi participen més enzims i s'ha vist que, *in vitro*, aquestes estructures poden ser modificades per més d'un. Un dels altres enzims utilitzats per a la identificació és l'aminoacil transferasa (Joshi *et al.*, 1978; Komine *et al.*, 1994; Litvak *et al.*, 1973).

Afegir també que una prova complementària és l'aplicació de models de predicció d'estructura secundària d'RNA amb la finalitat de trobar similituds amb l'estructura típica de fulla de trèvol dels tRNAs.

L'any 1970, el grup de Pinck i col·laboradors va descriure per primera vegada la presència d'una estructura tipus tRNA a l'extrem 3' del genoma del virus del mosaic groc del nap (*turnip yellow mosaic virus* (TYMV)) (Pinck *et al.*, 1970) i des de llavors s'han proposat cinc grups diferents de virus de plantes -tymovirus, tobavirus, tobavirus, bromovirus, cucumovirus, hordeivirus (Haenni *et al.*, 1982; Hall, 1979; Mans *et al.*, 1991)- que contenen estructures que són reconegudes de manera eficient amb enzims específics dels RNAs de transferència (Felden *et al.*, 1994; Ahlquist *et al.*, 1981).

Tot i que s'ha demostrat que *in vitro* l'extrem 3' del genoma pot acceptar un aminoàcid i el d'alguns tymovirus i bromovirus pot ser processat per la ribonucleasa P d'*E.coli* (Green i Vold, 1988; Guerrier-Takada *et al.*, 1988), només s'ha observat l'aminoacilació d'alguns d'aquests RNAs virals *in vivo* (Joshi *et al.*, 1978; Joshi *et al.*, 1982). Falta encara per determinar la funció o funcions exactes d'aquestes estructures en el genoma dels virus però es creu que podria està relacionada amb la replicació del genoma, i que degut a la semblança amb els tRNA potser no es pot descartar una possible participació en el mecanisme de traducció (Barends *et al.*, 2003).

Finalment afegir que tot i que les estructures millor caracteritzades les trobem a l'extrem 3' d'aquests patògens de plantes, també s'han descrit estructures tipus tRNA en regions internes de l'RNA de virus de plantes (Baumstark i Ahlquist, 2001), a l'extrem 5' de l'RNA de la partícula de reconeixement de senyals (*signal recognition particle* (SRP)) tant eucariota com procariota (Zwieb, 1989) i a l'extrem 5' d'alguns RNAs missatgers d'*E.coli* (Lestienne *et al.*, 1984; Ames *et al.*, 1983; Dardel *et al.*, 1990).

7.2. Altres substrats naturals de la ribonucleasa P

El substrat natural més comú de la ribonucleasa P són els precursors de tRNA però no es pot considerar l'únic. Si bé la funció més ben definida de l'enzim és la maduració del fragment 5' dels precursors RNAs de transferència, s'ha descrit que la ribonucleasa P d'*E.coli* processa, *in vivo*, l'extrem 5' del precursor de l'RNA 4.5S, l'RNA de la partícula de reconeixement de senyals en bacteris (Bourgaize i Fournier, 1987; Bothwell *et al.*, 1976), el precursor de l'RNA 10Sa (Komine *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1990) i l'RNA missatger policistrònic de l'operó histidina (Alifano *et al.*, 1994). Tots els substrats que són processats *in vivo* per la ribonucleasa P d'*E.coli* es caracteritzen per tenir estructures tipus tRNA en la zona de reconeixement de la ribonucleasa P.

II. OJBECTIUS

II. OBJECTIUS

L'objectiu final d'aquesta tesi és tallar, *in vitro*, l'RNA del VHC utilitzant com a ribozim la ribonucleasa P. S'ha pensat en dos models, la ribonucleasa P humana i el component RNA de la ribonucleasa P d'*E.coli*. Per estudiar l'aplicació d'aquests ribozims com a possible agents antivirals contra la infecció de VHC ens hem plantejat dos objectius principals. Per una banda i previ a l'assaig d'activitat **(II.1)** caracteritzar l'accessibilitat i la variabilitat d'una regió del genoma del VHC amb la finalitat de localitzar una diana on dirigir el tall amb potencial terapèutic. Per altra banda, derivat d'un resultat inesperat que va sorgir durant la realització d'aquest treball i on es va observar en els experiments control que la ribonucleasa P humana tallava l'RNA del VHC en absència de seqüències guia **(II.2)** caracteritzar una nova interacció *in vitro* directe entre l'RNA del VHC i la ribonucleasa P humana i **(II.2.3)** estudiar l'estructura de les zones de tall i aprofundir en la seva funció biològica i interès terapèutic.

II.1. Caracterització de l'estructura i variabilitat d'una regió del genoma del VHC per dirigir-hi la ribonucleasa P

L'accessibilitat i el baix potencial de variació d'un RNA diana són requeriments imprescindibles per a l'èxit de la teràpia amb ribozims. En el cas del VHC, la regió 5' no codificant es considera un bon candidat a la teràpia ja que és la regió més conservada però té un inconvenient, l'elevat grau d'estructuració.

El nostre objectiu és trobar una zona alternativa a la regió 5' no codificant que sigui menys estructurada i accessible a la ribonucleasa P. S'estudiaran dos models de ribonucleasa P, la RNasa P humana dirigida per seqüències guia externes i el component RNA de la ribonucleasa P d'*E.coli* unit covalentment a una seqüència guia (ribozim M1GS).

Per assolir aquest objectiu ens proposem els següents objectius concrets:

II.1.1. Estudiar l'accessibilitat de la regió E2/NS2 del genoma del virus utilitzant el mètode d'hibridació amb oligonucleòtids antisentit i assaig amb ribonucleasa H. (article I)

II.1.2. Analitzar la variabilitat de la regió E2/NS2, especialment la zona determinada com a més accessible. (article I i Resultats no publicats)

II.1.3. Posar a punt el mètode de purificació de ribonucleasa P humana a partir de cèl·lules HeLa. (article II, descrit de manera molt detallada a Material i Mètodes)

II.1.4. Dirigir l'activitat RNasa P cap a l'RNA genòmic del VHC, *in vitro*. (article I i Resultats no publicats)

II.1.5. Analitzar l'efecte de l'estructura secundària i terciària de l'RNA substrat en l'accessibilitat a les seqüències guia i la RNasa P. (article I i Resultats no publicats)

II.1.6. Constatar si el mètode d'hibridació amb oligonucleòtids antisentit i assaig amb ribonucleasa H és vàlid per predir llocs accessibles on dirigir la RNasa P. (article I i Resultats no publicats)

II. Identificació i caracterització d'estructures tipus tRNA en el genoma del VHC

Ens hem proposat identificar l'enzim responsable dels talls observats sobre el genoma del virus quan l'RNA viral s'incuba amb extracte de RNasa P humana sense seqüències guia externes. A més, com que la ribonucleasa P és un ribozim que es diferencia dels altres perquè el reconeixement de l'RNA substrat es basa en trets estructurals i no de seqüència ens hem plantejat estudiar l'estructura de les zones de tall amb la finalitat de proposar noves dianes terapèutiques.

En relació a aquest objectiu ens proposem els següents objectius concrets:

II.2.1. Confirmar si la ribonucleasa P humana és l'enzim responsable del talls. (article II)

II.2.2. Donada la variabilitat del genoma del VHC, analitzar si el tall de la RNasa P és una propietat general del virus. (article II)

II.2.3. Estudiar l'estructura de les zones de tall i aprofundir en la seva funció biològica i interès terapèutic. (article II i altres resultats)

III. MATERIAL I MÈTODES

III. MATERIAL I MÈTODES

Durant la realització d'aquesta tesi doctoral s'han posat a punt en el nostre laboratori alguns dels mètodes descrits en els articles. És per aquest motiu que s'ha considerat interessant descriure'ls d'una manera més detallada en aquests apartats.

1. Transcripció *in vitro* d'RNA i purificació de transcrits

Durant el procés de transcripció és quan s'utilitza una quantitat més gran de radioactivitat i per tant s'han d'extremar les precaucions ja habituals a l'hora de treballar amb el radioisòtop ^{32}P . A més a més, al treballar sempre amb RNA, molt més sensible que el DNA, s'han de tenir una sèrie de precaucions.

Precaucions en el treball amb RNA: el principal problema són les ribonucleases (RNases), uns enzims molt estables difícils d'eliminar, resistents a l'autoclau, que solen trobar-se a tots els teixits. La pell és també una font d'RNases, per tant, treballarem sempre amb guants. És important no utilitzar en el laboratori RNases comercials com per exemple RNasa A. Pel que fa al material, tractar-lo sempre en condicions lliures d'RNases (guants) i sempre que sigui possible usar material d'un sol ús. Sinó, el millor sistema per eliminar les RNases és mantenir el material que es pugui un mínim de 6 hores a 200°C. El material que no resisteix el forn i no és d'un sol ús seria ideal tenir-lo només per treballs amb RNA sinó, rentar-lo molt bé amb aigua i sabó, esbandir molt bé amb aigua destil·lada i passar-hi etanol 70% o absolut, tornar a esbandir amb aigua destil·lada estèril. Treballar sempre amb tubs de vidre i siliconitzats al 2% per evitar que l'RNA s'enganxi a la paret del tub. La solució de silicona s'obté barrejant cloroform i silicona a una proporció 98:2.

1.1. Preparació del DNA motlle

1.1.1. VHC

Vector pN(HCV1-4728) Bluescript: vector de transcripció cedit per la Dra. Guerrier-Takada de la *Universitat de Yale* on s'hi troba clonat un fragment del genoma del VHC des de la posició 1 a la 4728. Aquesta seqüència es troba en la base de dades del *GenBank* i té com a referència S62220.

A la taula següent es descriuen els enzims de restricció utilitzats per linearitzar el vector, la mida del transcrit viral que s'obté després de realitzar la transcripció *in vitro* i el nom que reben aquests substrats.

Enzim restricció	Mida del transcrit	Nom
<i>Rsr II</i>	3032 nts (1-3032)	S _{II}
<i>Bam HI</i>	1360 nts (1-1360)	S _{III}
<i>Sac II</i>	641 nts (1-641)	S _{IV}

Vector pGEM-3z(HCV2486-3040): subclonatge del fragment que inclou des del nucleòtid 2486 fins el 3040 del genoma del VHC i que correspon a l'inici de la regió NS2. L'insert es va obtenir mitjançant el mètode de PCR i utilitzant com a motlle vector pN(1-4728) Bluescript i com a encebadors HCV-2487*ecoRI* (5'-CTTGAATTCGGGAGTATGTC-3' i HCV-3040*bamHI* (5'-TAAGGATCCCATGAGCGGTC-3')

L'insert es va clonar en el *polilinker* del vector pGEM-3z entre les dianes de restricció *EcoRI* i *BamHI*, sota el control del promotor de la RNA polimerasa de bacteriòfag T7. Quan es digereix amb l'enzim de restricció *BamHI* i es realitza una transcripció *in vitro* s'obté un transcrit de 554 nucleòtids que anomenem S_I.

1.1.2. Precursor de tRNA de *E. coli* (pre-tRNA^{Tyr})

Vector pTyrT: és el vector de transcripció que conté la seqüència del pre-tRNA^{Tyr} d'*E. coli*, substrat natural de la ribonucleasa P (cedit per la Dra. Guerrier-Takada de la Universitat de Yale). Si es digereix amb l'enzim de restricció *FokI* s'obté, després d'una reacció de transcripció *in vitro*, el pre-tRNA^{Tyr} amb la seqüència -CCA terminal a l'extrem 3'.

1.1.3. RNA M1 d'*E. coli*

Vector pFL117: vector de transcripció derivat de pUC19 que conté el gen de l'RNA M1 de la ribonucleasa P d'*E. coli* (cedit per el Dr. Fenyong Liu, *Universitat de Berkeley*). Per utilitzar-lo com a motlle per a la transcripció de l'RNA M1 s'ha de digerir amb l'enzim de restricció *FspI*. S'obté un RNA de 340 nucleòtids.

1.1.4. VHB

pGem-3Z(HBV 1400-1800): vector de transcripció on hi ha clonat un fragment (nt 1400-nt 1800) del mRNA de l'antigen de superfície del VHB, subtipus *adr* (número d'accés al *Genbank*, V00866). Quan es digereix amb l'enzim de restricció *FspI* i es realitza una transcripció *in vitro* s'obté el transcrit de 400 nucleòtids.

1.2. Transcripció marcada d'RNA (vector de transcripció)**1.2.1. Síntesi d'RNA: reacció de transcripció**Material

- Tubs de vidre de 2ml siliconitzats
- Plasmidi linearitzat o producte de PCR

Solucions i reactius

- T7 RNA polimerasa i tampó T7 5x corresponent (Promega)
- Barreja de rNTPs a 2mM cadascun (Amersham Biosciences)
- DTT 0.1M (Promega)
- RNasin (20U/ μ l) (Promega)
- [α -³²P]-GTP 10 μ Ci/ μ l, 3000Ci/mmol (Amersham Biosciences Biosciences)
- DNasa I (1U/ μ l) (Promega)
- TSE1x: 50mM Tris HCl pH 7.5, 100mM NaCl, 1mM EDTA

Protocol

1. Reacció (25 μ l), 1hora a 37°C.

Aigua	7.5 μ l
Tampó T7 5x	5 μ l
DTT 0.1M	1.25 μ l
RNasin 20U/ μ l	0.5 μ l
rNTPs 2mM	5 μ l
[α - ³² P]-GTP	4 μ l
DNA	0.5-1 μ g
T7RNA pol 20U/ μ l	1 μ l

2. Tractar amb 0.5 μ l de DNasa I i continuar incubant a 37°C durant 5 min.
3. Augmentar el volum fins a 1ml amb tampó TSE 1X .
4. Afegir 0.5ml de fenol (pH 5.5), agitar amb el vòrtex durant 1 min i centrifugar a temperatura ambient durant 4 min.
5. Recuperar la fase aquosa (1ml) i passar-la a un tub siliconitzat de 2 ml.
6. Afegir 1ml d'etanol absolut a la mostra i barrejar bé.
7. Guardar els 2 ml de mostra en gel picat.

1.2.2. Purificació d'RNA marcat

a. Columna de CF-11

El primer pas de la purificació del transcrit consisteix en una cromatografia i es fa mitjançant una columna de CF-11. La CF-11 és una resina de cel·lulosa que s'utilitza entre d'altres coses per purificar RNA de simple i doble cadena. En aquest protocols va utilitzar per separar els transcrits d'RNA dels ribonucleòtids no incorporats durant la reacció de transcripció i dels fragments de DNA no digerits després del tractament amb DNasa I.

Material

- Xeringa de vidre de 1 ml
- Llana de vidre siliconitzada (Serva)
- Resina de cel·lulosa CF-11 (Sigma)
- Córex de 30 ml siliconitzat

Solucions i reactius

- Tampó TSE1x: 50mM Tris-HCl pH 7.5, 100mM NaCl, 1mM EDTA
- Solució de precipitació: 10% glicogen (20mg/ml) i 90% d'acetat de sodi 3M a pH 5.2
- Etanol 100%

Protocol

1. Introduir a la part final d'una xeringa de vidre de 1ml unes tres capes de llana de vidre i fixar la xeringa en un suport.
2. Deixar compactar per gravetat 0.2 ml de resina. Un cop compactada esperar uns 15 min abans no es comencen els rentats previs a la càrrega de la mostra.
3. Equilibrar la resina amb (respectar l'ordre): 1ml de TSE1x, 1ml d'aigua i 3 ml d'una barreja de TSE1x:etanol (volum:volum).
4. Carregar i deixar eluir els 2ml de mostra.
5. Rentar amb 3 ml de TSE1x:etanol (volum:volum).
6. Eluir l'RNA amb 2ml d'aigua.
7. Passar els 2ml a un córex siliconitzat al 2% i afegir 200µl de solució de precipitació i 5 ml d'etanol 100%. Agitar amb vòrtex.
8. Posar a precipitar la mostra tota la nit a -20°C.
9. Centrifugar a 12000g i 4°C durant 1hora i 30 min.
10. Eliminar el sobrenedant per decantació i amb una pipeta *Pasteur* estirada treure les gotes que queden d' etanol.
11. Assecar el pèl·let entre 3 i 5 min en una bomba de buit.
12. Afegir al tub córex 10µl d'aigua.
13. Ressuspendre el pèl·let d'RNA de la següent manera:
 - 13.1. Agitar amb un vòrtex durant 2 min.
 - 13.2. Unir les microgotes que es generen durant l'agitació. Com que el tub està siliconitzat, els 10µl d'aigua no s'escampen pel córex i formen una gota fàcil de recollir.

- 13.3. Repetir el procés un total de 5 vegades (sempre amb els mateixos 10 μ l).
 13.4. Comprovar amb un comptador *Geiger* que l'RNA marcat s'ha ressuspès totalment.

b. Electroforesi en gel de poliacrilamida desnaturalitzant

Aquest mètode electroforètic s'utilitza per separar a través d'una matriu de poliacrilamida amb presència d'un agent desnaturalitzant i sota l'acció d'un camp elèctric, fragments de DNA o RNA en funció del nombre de bases (Maniatis i Efstratiadis, 1980). L'agent desnaturalitzant que s'utilitza habitualment és la urea i el que fa és suprimir l'aparellament de bases entre àcids nucleics de manera que la migració del DNA i RNA és independent de la composició de bases i de la seqüència.

b.1. Preparació dels gels

Material

- Equip d'electroforesi
 - vidres 16.5x16.5 cm i gomes selladores de silicona (TDI)
 - pinta i separadors 0.4mm (BioRad)
 - cubeta vertical (TDI)
 - font d'electroforesi

Solucions i reactius

- Solucions d'electroforesi desnaturalitzant:
 - Solució d'acrilamida 40%: 19:1, acrilamida:bisacrilamida (Sigma)
 - Tampó TBE 10x: 1M Tris pH 8.3, 0.9M àcid bòric i 10mM EDTA (Sigma)
 - Urea (Roche Diagnostics)
 - Persulfat amònic 10% (Sigma)
 - TEMED (Sigma)

Protocol

1. Muntar els vidres amb els separadors (0.4 mm), segellar els marges amb una goma de silicona i encaixar-los bé amb l'ajuda d'unes pinces de plàstic.
2. Prepara la solució d'acrilamida al 4% i abocar-la entre els vidres.

	volum per un gel
acrilamida 40%	1.75 ml
Tampó TBE 10X	1.5 ml
Urea	7.35 gr
aigua destil·lada	fins a 15 ml
persulfat amònic 10%	120 μ l
TEMED	12 μ l
TOTAL	15 ml

3. Posar la pinta i deixar polimeritzar uns 30 min.
4. Posar els vidres amb el gel polimeritzat a la cubeta d'electroforesi amb tampó TBE 1X. Netejar bé les butxaques amb el tampó per treure les restes d'acrilamida i urea.

Observacions

És aconsellable connectar el sistema a la font d'electroforesi i iniciar el corrent elèctric abans de carregar les mostres per dues raons: la primera, per escalfar el gel perquè així les mostres corren millor i la segona, per eliminar els ions cianat que es formen degut de la descomposició de la urea. Aquests ions poden interferir en la migració de la mostra.

b.2. Purificació dels fragments d'RNA marcat

Material

- Bisturí
- Equip d'autoradiografia
 - Films d'autoradiografia Kodak X-Omat (Amersham Biosciences)
 - Casset d'autoradiografia (Amersham Biosciences)
 - Pantalla d'intensificació Kodak Biomax MS (Amersham Biosciences)
 - Líquid revelador i fixador (Agfa)
 - Paper 3MM
 - Film transparent i cinta adhesiva
- Córex de 30 ml siliconitzat
- Tubs de vidre de 2ml siliconitzats

Solucions i reactius

- Tampó de càrrega amb formamida (tampó F): 0.3% blau de bromofenol, 0.3% blau de xilencianol, 10mM EDTA pH 7.5 i 97.5% formamida desionitzada
- Tampó d'elució T1: 10mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA
- Solució de precipitació: 10% glicogen (20mg/ml) (Roche Diagnostics) i 90% d'acetat de sodi 3M pH 5.2
- Etanol 100%

Protocol

1. Afegir als 20µl de mostra 40µl de tampó de càrrega F.
2. Carregar les mostres al gel.
3. Fer córrer els gels a una intensitat constant de 20mA durant 30 min.
4. Treure només un dels vidres de manera que l'altre vidre es converteixi en un suport pel gel.
5. Posar el vidre que té el gel sobre un paper 3MM de manera que es toquin el vidre i el paper. Tapar el gel amb film transparent i fixar els marges amb cinta adhesiva.
6. Fer marques radioactives a unes etiquetes i posar-les al voltant del gel, sobre el film transparent.
7. Exposar el gel amb un film d'autoradiografia i dins un casset durant 2-4 min.
8. Revelar el film en una cambra fosca:
 - 8.1. Posar el film amb líquid revelador durant 1-2 minuts.
 - 8.2. Rentar amb aigua destil·lada durant 1 minut.

- 8.3. Introduir el film en líquid fixador durant 3-4 minuts.
- 8.4. Rentar amb força aigua destil·lada.
- 8.5. Deixar assecar el film.
9. Emmarcar en el film i amb un retolador el fragment d'RNA que interessa tallar.
10. Tallar amb un bisturí el film per la zona emmarcada. D'aquesta manera s'obté una finestreta que permet tallar el fragment d'RNA del gel.
11. Posar el film sobre el gel de manera que coincideixin exactament les marques del film amb les marques radioactives de les etiquetes del voltant del gel. Fixar el film amb cinta adhesiva.
12. Tallar amb un bisturí la part del gel que queda dins la finestreta i posar el fragment d'acrilamida dins un córex siliconitzat amb 2ml de tampó T1.
13. Deixar eluint tota la nit a temperatura ambient i amb agitació (250min^{-1}).
14. Recollir els 2ml amb una pipeta *Pasteur* estirada i siliconitzada i passar-los a un córex siliconitzat.
15. Afegir 200 μl de solució de precipitació i 5ml d'etanol 100% i agitar.
16. Posar a precipitar durant 1-2 hores a -80°C .
17. Seguir el protocol detallat a l'apartat 1.2.2.a del punt 9→13 per obtenir els transcrits d'RNA que ens serviran com a substrat.
18. L'RNA marcat es guarda a -20°C en un tub de vidre siliconitzat.

b.3. Quantificació dels transcrits

Material

- Comptador de centelleig Beckman LS 6500
- Líquid de centelleig Opti-Phase (Wallac)
- Tubs per el comptador
- Dilució 1/50 de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$ 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$
-

Protocol

1. Agafar 1 μl del transcrit marcat i posar-lo en un tub.
2. Agafar 1 μl de la dilució 1/50 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$ 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ i posar-lo en un tub.
3. Afegir 2ml de líquid de centelleig.
4. Introduir els tubs en el comptador de centelleig amb el programa corresponent a ^{32}P .
5. El resultat s'obté en comptes per minut (cpm). Per calcular els μg de transcrit obtinguts aplicar la següent fórmula:

$$\frac{\mu\text{g rNTPs}}{\text{cpm}_{1/50 [\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}} \times 50 \times \mu\text{l} [\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}} = \frac{\mu\text{g transcrit}}{\text{cpm}_{\text{transcrit}}} \quad (1)$$

En l'equació (1):

$\mu\text{g rNTPs}$ = μg de ribonucleòtids que es posen a la reacció de transcripció

$\text{cpm}_{1/50 [\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}}$ = valor en cpm de 1 μl de la dilució 1/50 de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$

$\mu\text{l}[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP} = \mu\text{l de } [\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}10\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ que es posen en la reacció de transcripció

$\text{cpm}_{\text{transcrit}} = \text{valor en cpm de } 1\mu\text{l de transcrit marcat}$

$\mu\text{g transcrit} = \text{incògnita. El valor que s'obté són } \mu\text{g de transcrit per } \mu\text{l.}$

6. Per calcular la molaritat del transcrit s'aplica la següent fórmula un cop obtingut el resultat de la fórmula anterior:

$$\text{Molaritat} = \frac{\mu\text{mol transcrit}}{\mu\text{l}} = \frac{\mu\text{g transcrit} / \text{PM}_{\text{transcrit}}}{\mu\text{l}}$$

1.3. Transcripció marcada d'RNA (DNA de cadena simple)

Aquest mètode s'anomena transcripció de Milligan (Milligan *et al.*, 1987) i no utilitza un vector de transcripció com a motlle per a la T7 RNA polimerasa. El DNA que s'utilitza com a motlle consisteix en una cadena de DNA simple, complementària al RNA que interessa obtenir i la seqüència complementària del promotor T7 a l'extrem 3' (5'...CCCTATAGTGAGTCGTATTA-3'). Perquè la reacció de transcripció comenci s'afegeix com a encebador el promotor T7 (5'-TAATACGACTCACTATA-3').

a. Motlle de DNA.

Aquest mètode es va utilitzar per obtenir un transcrit de 45 nucleòtids ja que no es disposava de la seqüència de DNA clonada en un vector de transcripció. El motlle de DNA (5'-CGCGCGCGTCCGCCAGGAGAAGGAAAAGCAACACGACATACTCCCTATAGTGAGTCGTATTA-3') es va dissenyar per obtenir un transcrit des de la posició 2728 fins a la 2772 del genoma del VHC.

b. Reacció de transcripció.

Material:

- Promotor T7 (Sigma)
- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP } 10\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ (Amersham)
- T7 RNA polimerasa i també T7 5x i T7 10x corresponent (Promega)
- DNasa I (1U/ μl) (Promega)
- RNasin 20U/ μl (Promega)
- Tubs de vidre 2ml siliconitzats

Solucions:

- Barreja de rNTPs a 20mM cadascun (Pharmacia)
- DTT 0.1M (Promega)
- PEG 400mg/ml
- BSA 1mg/ml
- TSE1x: 50mM Tris HCl pH7.5, 100mM NaCl, 1mM EDTA

Protocol:

1. Barrejar en un volum de 5 μ l, DNA motlle 0.6mM final i promotor T7 0.72mM final.
2. Incubar a 90°C durant 2 min i afegir-hi 5 μ l de tampó T7 10x prèviament escalfat a 55°C.
3. Incubar a 55°C durant 3 min.
4. Deixar a temperatura ambient durant 15 min
5. Agafar-ne 1 μ l i barrejar-lo amb 49 μ l de tampó T7 5x.
6. Reacció (50 μ l), 12 hores a 37°C.

Aigua	25.05 μ l
Tampó T7 10 X	4.5 μ l
DTT 0.1M	1 μ l
RNasin 20U/ μ l	0.2 μ l
PEG 400mg/ml	5 μ l
rNTPs 20mM	2.5 μ l
BSA 1mg/ml	2.5 μ l
[α - ³² P]-GTP	1 μ l
Promotor/DNA 1/50	1 μ l
T7RNA pol 20U/ μ l	0.75 μ l

7. Continuar segons el protocol de l'apartat 1.2.1.a partir del punt 2.

1.4. Transcripció freda d'RNA

La transcripció freda d'RNA es va realitzar per obtenir un transcrit de VHC no marcat. El protocol de transcripció i purificació és el mateix que en el cas del punt 1.2 amb la única diferència que en la reacció de transcripció no s'afegeix [α -³²P]-GTP.

Cada vegada però que es realitza una transcripció freda s'ha de preparar paral·lelament una transcripció marcada per poder seguir el procés. Això es fa per dues raons:

- En el moment de purificar la banda del gel de poliacrilamida la banda corresponent al transcrit no marcat no es veu. S'ha de carregar el transcrit marcat a la butxaca del costat. Com que es tracta del mateix transcrit correran amb la mateixa mobilitat electroforètica i per tant només es tracta de dibuixar una finestreta paral·lela a la banda que correspon al transcrit marcat.
- Per a la quantificació de transcrit fred es considera que s'aconsegueix la mateixa molaritat que de transcrit marcat.

2. Purificació de la Ribonucleasa P humana

La ribonucleasa P es va purificar a partir de 30 grams de cèl·lules HeLa i seguint el protocol de Bartkiewicz i col·laboradors (Bartkiewicz *et al.*, 1989) amb algunes

modificacions, introduïdes principalment en el mètode de seguiment de la ribonucleoproteïna.

Les cèl·lules es varen recollir entre 2 i 3 dies abans de l'inici del procés de purificació i en aquest moment presentaven un 95% de viabilitat mesurada per tinció amb un colorant vital.

2.1. Preparació i empaquetament de la resina

El primer pas de purificació es va dur a terme utilitzant un dels mètodes més convencionals per purificar proteïnes, la cromatografia d'intercanvi iònic. Aquesta cromatografia consisteix en separar substàncies d'una determinada càrrega a través d'una columna que conté un material de càrrega oposada. Les proteïnes amb més càrrega s'uneixen més fort a la resina i són les que es mouen més a poc a poc i per tant elueixen últimes. Degut a la càrrega majoritàriament negativa que proporciona el component RNA de la ribonucleasa P es va escollir una resina d'intercanvi aniònic, més concretament la DEAE-Sefarosa. La sefarosa constitueix la matriu i els grups *dimetilaminoetil* (DEAE) la càrrega positiva. Es va utilitzar la resina DEAE-Sefarosa CL-6B de la casa comercial Sigma. La DEAE-Sefarosa està dissolta en un 20 % d'etanol per evitar contaminacions microbianes i aproximadament un 80 % de la solució és realment resina. Per a la purificació es necessiten 160 ml de resina compactada i per tant de la solució se n'agafen 200 ml. La columna que es va utilitzar per a la purificació té un sistema de doble cilindre. El més intern és on es compactarà la resina i es passarà la mostra. L'extern serveix per connectar-hi un flux continu d'aigua a 4°C per tal de mantenir sempre la resina i la mostra en fred.

Material

- Columna de cromatografia XK26 i accessoris (Amersham Biosciences)
- Resina *DEAE-Sepharose* CL-6B® (Sigma)
- Bomba peristàtica LKB P-1 (Amersham Biosciences)

Solucions i reactius

- Tampó A 50mM NH₄Cl: 20mM Tris HCl pH 7, 15mM MgCl₂, 50mM NH₄Cl i 10% glicerol

Protocol

1. Equilibrar els 250 ml de DEAE-Sepharosa amb 150 ml de tampó A 50mM NH₄Cl. Rentar en un vas de precipitats 4-5 vegades.
2. Empaquetar la resina dins la columna amb tampó A 50mM NH₄Cl i regular el flux (aproximadament 7min/10ml) mitjançant una bomba peristàtica.
3. Passar 1 volum (150 ml) de tampó A 50 mM NH₄Cl. En aquest punt es pot parar el flux.

Observacions

Per mantenir el volum de la columna i evitar canvis de força iònica i pH és molt important empaquetar la resina a les mateixes condicions que s'eluirà la mostra.

El flux d'entrada a la columna està regulat per una bomba peristàltica i s'ha de mantenir constant durant els rentats previs i durant la mateixa elució.

Desgasificar durant 30 min tots els tampons que passen per la columna i evitar durant tot el procés que entrin bombolles a la columna.

A partir del punt 2 totes les solucions que entrin a la columna estaran regulades per la bomba peristàltica.

2.2. Preparació de la mostra

Es parteix de cèl·lules pel·letitzades repartides en 2 falcons de 50 ml amb 15 grams a cadascun. Els rentats i l'homogeneïtzació es van fer per separat i es van unir al punt 5.

Material

- 30 grams cèl·lules HeLa (Fontlab 2000)
- Homogeneïtzador i èmbol (Fisher)
- Tubs de borosilicat de 30ml per a homogeneïtzar (Braun)

Solucions i reactius

- PBS1x
- TKM: 10mM Tris pH 7, 10mM KCl, 0.15mM MgCl₂, 10% glicerol
- PMSF 0.1M
- DTT 1M (Promega)
- Tris-HCl pH 7 1M, MgCl₂ 1M i NH₄Cl 5M

Protocol

1. Eliminar per decantació el medi de cultiu i rentar 3 vegades amb PBS fred (aproximadament 30 ml a cada rentat).
2. Rentar 2 vegades amb TKM fred, passar les cèl·lules a dos tubs de borosilicat i afegir-hi a cadascun TKM fins a 30 ml.
3. Just en el moment abans d'homogeneïtzar afegir 60µl de PMSF 0.1M i 30µl de DTT 1M a cada tub de borosilicat.
4. Homogeneïtzar la mostra a 4°C i a força velocitat, fins que el moviment de l'èmbol sigui relativament lleuger.
5. Unir els 60 ml d'homogeneïtzat i augmentar el volum fins a 150 ml amb TKM fred. Repartir la mostra en 6 tubs córex de 30 ml cadascun.
6. Centrifugar a 8.000g i 4°C durant 25 min i treure el sobrenedant (fracció S20) amb pipeta de plàstic.
7. Ajustar la fracció S20 a 20mM Tris pH 7, 10mM NH₄Cl i 15mM MgCl₂.

Observacions

S'ha de treballar sempre amb gel picat per mantenir en tot moment la mostra a 4°C i evitar d'aquesta manera la inactivació de la ribonucleasa P. Mantenir sempre els tampons a 4°C.

2.3. Gradient de clorur d'amoni: elució de la ribonucleasa P

Material

- Gradientòmetre GM-1 (Amersham Biosciences)
- Col·lector de fraccions LKB-MediFrac (Amersham Biosciences)

Solucions i reactius

- Tampó A 100mM NH₄Cl: 20mM Tris HCl pH 7, 15mM MgCl₂, 100mM NH₄Cl i 10% glicerol
- Tampó A 350mM NH₄Cl: 20mM Tris HCl pH 7, 15mM MgCl₂, 350mM NH₄Cl i 10% glicerol

Protocol

1. Carregar la mostra equilibrada a la columna.
2. Quan hagi entrat tot el volum de mostra, rentar la columna amb 5 volums de tampó A 100 mM NH₄Cl.
3. Iniciar un gradient lineal de NH₄Cl des de 100 mM fins 350 mM. Es passen 500 mL de gradient. El gradient s'aconsegueix connectant la bomba a un gradientòmetre (GM-1) que té dos recipients cilíndrics que es comuniquen. En el primer s'hi introdueixen 250 ml de tampó A 100mM i en el segon 250 ml de tampó A 350 mM. S'obre la connexió entre els dos tampons i es connecta l'agitador que porta incorporat el primer recipient. El resultat és la formació d'un gradient lineal de NH₄Cl que va entrant a la columna a través de la bomba.
4. Recollir fraccions de 10 ml amb un col·lector. Guardar les fraccions a 4°C a mesura que es van recollint.

2.4. Determinació de les fraccions que contenen RNasa P

Per tal de determinar quines fraccions contenen RNasa P i sobretot que fos activa, es van realitzar dos assajos paral·lels: (i) una detecció del component RNA H1 i (ii) un assaig d'activitat sobre el substrat natural.

A més a més també es va seguir el component RNA de la ribonucleasa MRP, una ribonucleoproteïna que co-purifica amb la ribonucleasa P.

2.4.1. Detecció del component RNA de la RNasa P

La detecció del component RNA de la ribonucleasa P i MRP es va dur a terme utilitzant la tecnologia Taqman (Roche Molecular Biochemicals) i la tècnica de RT-PCR a temps real (Abi Prism 7700, PE Biosystems). El protocol que es va seguir és el que s'utilitza per a la quantificació d'RNA de VHC en mostres de sèrum i fetge humà descrit per (Martell *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 2000) però amb els conjunt d'encebadors i sonda específics per a la ribonucleasa P i MRP. Amb l'objectiu de poder detectar en una mateixa reacció l'amplificació de l'RNA de la RNasa P i MRP es varen utilitzar sondes conjugades amb fluorocroms diferents (PCR *Multiplex*). Les parelles d'encebadors i sondes específics van ser:

Human H1 RNA (número d'accés a GenBank: X15624.1)

```

1 ATGGGCGGAG GGAAGCTCAT CAGTGGGGCC ACGAGCTGAG TGCCTCCTGT CACTCCACTC
61 CCATGTCCCT TGGGAAGGTC TGAGACTAGG GCCAGAGGCG GCCCTAACAG GGCTCTCCCT
121 GAGCTTCAGG GAGGTGAGTT CCCAGAGAAC GGGGCTCCGC GCGAGGTCAG ACTGGGCAGG
181 AGATGCCGTG GACCCCGCCC TTCGGGGAGG GGCCCGGCGG ATGCCCTCTT TGCCGGAGCT
      PH1-213 PH1-228
      <----->
241 TGGAACAGAC TCACGGCCAG CGAAGTGAGT TCAA TGGCTG AGGTGAGGTA CCCCAGGG
      PH1-274
301 GACCTCATAA CCCAATTCAG ACCACTCTCC TCCGCCCAT

```

Human Th RNA (número d'accés a GenBank: M29212.1)

```

1 GTTCGTGCTG AAGGCCTGTA TCCTAGGCTA CACTGAGG ACTCTGTTCC TCCCCTTCC
61 GCCTAGGGGA AAGTCCCCGG ACCTCGGGCA GAGAGTGCCA CGTGCATACG CACGTAGACA
      MRP-90
121 TTCCCCGCTT CCCACTCCAA AGTCGCCAA GAAGCGATTC CCGCTGAGCG GCGTGGCGCG
      MRP-145
181 GGGGCGTCAT CCGTCAGCTC CCTCTAGTTA CGCAGGCAGT GCGTGTCCGC GCACCTACCA
      MRP-210
241 CACGGGGCTC AATTCTCAGC GCGGCTGT

```

2.4.2. Assaig d'activitat sobre el substrat natural**a. Reacció**

Per l'assaig d'activitat es va utilitzar com a substrat el precursor del tRNA de la tirosina d'*E.coli*. El substrat natural marcat es va obtenir seguint el protocol de l'apartat 1.2 i utilitzant com a motlle de DNA el vector *pTyrT* (apartat 1.1.2).

Material

- Tubs de vidre de 2ml siliconitzats

Solucions i reactius

- Tampó P 5x: 50mM Hepes KOH pH 7.5, 50mM MgOAc, 500mM NH₄OAc
- PEG 400mg/ml
- RNasin (20u/μl) (Promega)

Protocol

Per a cada reacció es barregen en un volum final de 10μl: 1μl de transcrit marcat 18nM, 3μl d'aigua, 2μl de tampó P 5X, 1μl de PEG, 1μl RNasin i 2μl directes de la fracció de 10 ml recollida del gradient de clorur d'amoni. Les mostres s'incuben a 30°C durant 30 min i després d'aquest temps es posen en gel.

Observacions

Les fraccions quan es treuen de la nevera es mantenen en gel i les reaccions també es preparen en gel per mantenir l'RNA a 4°C.

També es preparen dos controls negatius: un primer on només s'hi posa aigua i pre-tRNA^{Tyr} i un segon on es prepara una reacció sense afegir-hi mostra procedent de cap fracció.

b. Electroforesi en gel de poliacrilamida desnaturalitzant

Material

- Equip d'electroforesi

Solucions i reactius

- Solucions d'electroforesi desnaturalitzant
- tRNA (1µg/µl)
- Tampó de càrrega F: 0.3% blau de bromofenol, 0.3% blau de xilencianol, 10mM EDTA pH 7.5 i 97.5% formamida desionitzada
- Fenol pH 5.5

Protocol

- Preparació dels gel:

En aquest cas es segueix el protocol descrit a 1.2.2.b.1 amb les següents modificacions:

- Els separadors i la pinta tenen un gruix de 1.5mm.
- El volum per a cada gel és de 30ml.

- Preparació de les mostres:

1. S'afegeix 1µl de tRNA als 10µl de reacció.
2. Es fa una extracció de proteïnes afegint a la mostra 1µl de fenol (pH 5.5) i barrejant molt bé amb la micropipeta.
3. Afegir a cada mostra 20µl de tampó de càrrega F.
4. Carregar les mostres al gel.
5. Fer córrer els gels a una intensitat constant de 35mA durant 30 min.

c. Autoradiografia

Material

- Equip d'autoradiografia

Protocol

1. Muntar el gel directament sobre un paper 3MM prèviament recobert amb film transparent.
2. Tapar el gel amb film transparent i fixar els marges amb cinta adhesiva sobre el paper 3MM prèviament recobert.
3. Marcar amb tinta radioactiva i en un extrem del suport, pròxim al gel, el punt d'inici de la migració i els colorants.
4. Exposar el gel amb un film d'autoradiografia dins un casset i sota l'efecte d'una pantalla.
5. Posar el casset a -80°C tota la nit.
6. Revelar el film (segons punt 8 de l'apartat 1.2.2.b.2).

Observacions

És important posar els gels el més ràpid possible a -80°C per evitar la difusió dels fragments d'RNA.

La pantalla només és activa a -80°C i en aquestes condicions permet que el temps d'exposició del film sigui quatre vegades inferior.

2.5. Centrifugació amb gradient de glicerol

El glicerol és una de les substàncies que s'utilitza per fraccionar proteïnes mitjançant el mètode de centrifugació isopícnica i té una avantatge respecte d'altres soluts i és que contribueix a mantenir la estructura de les proteïnes evitant la desnaturalització. El mètode de centrifugació isopícnica s'utilitza per separar proteïnes o altres substàncies a través d'un gradient de densitat que es forma amb la dissolució d'un solut com pot ser el glicerol o la sacarosa. Quan es diposita una mostra sobre el gradient i es centrifuga el tub a gran velocitat, les proteïnes sedimenten fins que la seva densitat correspon exactament a la del gradient.

Material

- Gradientòmetre SG (Amersham Biosciences)
- Tubs per ultracentrífuga (Kontron Instruments)
- Columnes de filtració 15 Biomax 5K de 15 ml (Millipore)
- Sistema per punxar tubs d'ultracentrífuga (Hoefer Scientific Instruments)
- Tubs de vidre de 2ml siliconitzats

Solucions i reactius

- Tampó G 15% glicerol: 50mM Tris HCl pH 8, 10mM MgCl_2 , 100mM KCl i 15% glicerol
- Tampó G 25% glicerol: 50mM Tris HCl pH 8, 10mM MgCl_2 , 100mM KCl i 25% glicerol

Protocol

1. Preparar 6 tubs amb un gradient lineal de glicerol entre el 15% i el 25%. Es preparen amb un gradientòmetre utilitzant el tampó G al 15% i 25%. En total es preparen per a cada tub 11ml de gradient lineal de glicerol.
2. Unir les fraccions que contenen RNasa P i presenten activitat positiva (segons el resultat apartat 2.4.).
3. Concentrar la mostra utilitzant columnes de filtració Millipore de 15 ml (volum d'exclusió 5.000 Da) centrifugant a 2000g i 4°C . El volum final ha de ser de 6 ml.
4. Carregar a la part superior de cada tub de gradient i en molt de compte 1 ml de mostra concentrada.
5. Equilibrar molt bé els tubs i centrifugar a 35.000rpm i 4°C durant 23 hores.
6. Punxar el primer tub amb l'ajuda d'una agulla. El sistema de recollida de mostra és el següent:

- 6.1. Preparar entre 40 i 45 tubs de vidre siliconitzats i numerats del 1 al 45.
- 6.2. Recollir seqüencialment 8 gotes a cada tub.
- 6.3. Punxar el segon tub de gradient. Recollir també la mostra de 8 gotes en 8 gotes i en els mateixos tubs inicials, de manera que les 8 primeres gotes del segon gradient es recullen en el tub n^o1.
- 6.4. Repetir el mateix per a cada gradient. Les 8 gotes s'afegeixen sempre al tub numerat inicial. D'aquesta manera al final s'obtenen entre 40 i 45 tubs amb 1.5 ml de mostra a cadascun.

Observacions

Els gradients de glicerol es preparen 24 hores abans i es deixen a 4°C. Les mostres es poden guardar a 4°C si entre el fraccionament i els experiments posteriors no transcorren més de 24 hores. En cas contrari és millor guardar-les a -80°C.

2.6. Determinació de les fraccions positives

Per determinar quines fraccions contenen ribonucleasa P es va realitzar un assaig d'activitat sobre el pre-tRNA. Es va seguir el protocol del punt 2.4.2 amb una modificació.

Material

- Columnes de filtració 0.5 Biomax 5K de 0.5ml (Millipore)

Protocol

1. Agafar 1µl de la fracció n^o1,2,3 i 4 i barrejar-los. Fer el mateix amb les fraccions successives, sempre barrejant de quatre en quatre. S'obtingran entre 10 i 11 alíquotes.
2. Preparar les reaccions com en el punt 2.4.2 però en aquest cas afegir 2µl de cada barreja.
3. Carregar la mostra a un gel de poliacrilamida desnaturalitzant al 4% i exposar en un film d'autoradiografia tota la nit.
4. Concentrar individualment les fraccions amb activitat positiva mitjançant columnes de filtració de 0.5ml, centrifugant a 10.000 g i a 4°C fins a un volum final de 100µl.
5. Fer un assaig individual de cadascuna de les fraccions sobre el pre-tRNA^{Tyr} d'*E.coli*, seguir protocol apartat 2.4.2.
6. Fer alíquotes de 10 µl de cada fracció concentrada i guardar-les a -80°C.

3. Accessibilitat de l'RNA del VHC a la ribonucleasa H

3.1. Marcatge d'oligonucleòtids amb Quinasa

3.1.1. Disseny dels oligonucleòtids de DNA

La regió del genoma del VHC que es va escollir per dur a terme l'estudi d'accessibilitat va ser la No Estructural 2 (NS2). Per a l'estudi es varen dissenyar deu oligonucleòtids de DNA (18 bases cadascun) complementaris al genoma del

virus entre les posicions 2658-2865. Entre cada oligonucleòtid de DNA es varen deixar de 3 a 5 nucleòtids sense hibridar.

Els oligonucleòtids dissenyats van ser els següents:

Nom*	Seqüència
C2658	5' -TGATGTACCAAGCGGCAC-3'
C2678	5' -CGCCATAGAAAGCATATG-3'
C2700	5' -CCCAGGGACCAGCCTGCC-3'
C2724	5' -AGAGGAGCAGGAGCAGCG-3'
C2745	5' -AAGCTCGTGGTGGTAATG-3'
C2767	5' -GCCATCTCCCGGTCCATG-3'
C2786	5' -CGCGCCTCCGCACGATGC-3'
C2810	5' -CAATAATGCCAGACCCAC-3'
C2829	5' -TGTAATATGGCGTCAAGG-3'
C2848	5' -AGCCTAGCGAGGAACACC-3'

*El número correspon a la posició més 5' del genoma del VHC on comença l'oligonucleòtid complementari.

3.1.2. Marcatge amb quinasa

La polinucleòtid quinasa de bacteriòfag T4 és un enzim que s'utilitza per marcar l'extrem 5'-hidroxil de DNA o RNA de simple o doble cadena. Catalitza la transferència del grup γ -fosfat de l'ATP a l'extrem 5'-OH (Richardson, 1971). Per el marcatge s'utilitza $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ i la reacció pot tenir lloc mitjançant una fosforilació directa o una reacció d'intercanvi. En el nostre cas l'hem utilitzat per marcar l'extrem 5'-OH d'oligonucleòtids de DNA

Material

- $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$, 5000 Ci/mmol (Amersham Biosciences Biosciences)

Solucions i reactius

- T4 polinucleòtid Quinasa i tampó 10x corresponent (Roche Diagnostics)
- Solució de precipitació: 10% glicogen i 90% d'acetat de sodi 3M a pH 5,2
- Etanol 100% a -20°C

Protocol

1. Per a cada reacció es barregen en un volum final de 10 μl : 1 μl d'oligonucleòtid (100 pmols/ μl), 2 μl de $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$, 1 μl de T4 polinucleòtid Quinasa i 1 μl de tampó 10x.

2. Incubar la mostra a 37°C durant 1 hora.
3. Afegir 90µl d'aigua i homogeneïtzar.
4. Afegir 100µl de fenol pH 7.5, agitar amb el vòrtex i centrifugar 4 min a 12000 rpm.
5. Recuperar la fase aquosa i precipitar el DNA amb 10µl de solució de precipitació i 2,5 volums d'etanol absolut fred. Deixar a -20°C tota la nit.
6. Centrifugar a 14.000 rpm i 4°C durant 45 min.
7. Eliminar el sobrenedant, deixar assecat el pèl·let a 37°C durant 5 min i ressuspendre amb 100µl aigua per tal d'obtenir una concentració d'oligonucleòtid marcat a 1µM.

3.2. Accessibilitat de l'RNA a oligonucleòtids de DNA: anàlisi mitjançant gels de retardament (*Gel Shift*)

Les reacció de hibridació es varen portar a terme utilitzant transcrit del VHC (S_I) no marcat (apartat 1.3) i oligonucleòtid de DNA marcat (apartat 3.1).

3.2.1 Reacció de hibridació

Material

- Tubs de vidre de 2ml siliconitzats

Solucions i reactius

- Tampó H 5x: 100mM-HCl pH 7.8, 250mM KCl, 50mM MgCl₂, 5mM DTT
- tRNA (0,5µg/µl)

a. Reacció estàndard

Protocol

1. Barrejar en un tub de vidre siliconitzat: 2µl de transcrit fred 3nM, 2µl oligonucleòtid de DNA marcat 100nM , 2µl de tampó H 5x, 1µl tRNA i 3 µl d'aigua.
2. Incubar a 37°C durant 1 hora.
3. Posar en gel

Nota Per a cada reacció es va realitzar sempre un control on no es va afegir transcrit fred. També es prepara un tub amb transcrit marcat 0.6 nM final.

b. Pretractament a 90°C

Protocol

1. Barrejar en un tub de vidre siliconitzat: 2µl de transcrit fred 3nM, 2µl d'oligonucleòtid marcat 100nM i 3 µl d'aigua.
2. Incubar la mostra a 90°C durant 1 min. Incubar paral·lelament en un altre tub de vidre siliconitzat tampó H 5x.
3. Afegir a la mostra 2µl de tampó H 5X calent, barrejar bé amb la micropipeta i deixar la mostra 20 min a temperatura ambient.
4. Afegir 1µl tRNA i incubar a 37°C durant 1 hora.
5. Posar en gel.

Nota Per a cada reacció també es va realitzar sempre un control on no es va afegir transcrit fred i un tub amb transcrit marcat 0.6nM final.

3.2.2. Electroforesi en gel de poliacrilamida no desnaturalitzant

L'electroforesi en gel de poliacrilamida no desnaturalitzant s'utilitza per separar fragments de DNA de doble cadena a través d'una matriu de poliacrilamida, sense la presència d'un agent desnaturalitzant i sota l'acció d'un camp elèctric. En el nostre cas s'ha utilitzat per córrer híbrids RNA-DNA.

Material

- Equip d'electroforesi
- Equip d'autoradiografia

Solucions i reactius

- Solucions d'electroforesi no desnaturalitzant
 - Solució d'acrilamida: 30:1.5, acrilamida:bisacrilamida
 - Tampó MES 5x: 200mM Tris-acètic pH 7.2, 60mM NaAc, 6.25mM EDTA
 - Persulfat amònic 10% (Sigma)
 - TEMED (Sigma)
- Tampó de càrrega amb sacarosa: sacarosa 50%, 0.2% blau de bromofenol i 0.004mM Tris pH 7.6

Protocol

→ Preparació dels gels: el protocol per preparar els gels és el mateix que s'ha descrit en el punt 2.4.2.b amb les següents modificacions:

- En comptes del tampó TBE 5x o 1x s'utilitza el tampó MES 5x o 1x.
- La solució de poliacrilamida es prepara en una proporció diferent, acrilamida/bisacrilamida 30:1.5.
- No s'afegeix UREA ja que és un agent desnaturalitzant.

→ Preparació i càrrega de les mostres:

1. Afegir 2.5µl de tampó de càrrega amb sacarosa 1x a cada mostra.
2. Carregar les mostres al gel.
3. Córrer les mostres a una intensitat de 15mA i a 4°C durant 2 hores.
4. Visualitzar els resultats en un film d'autoradiografia (seguir apartat 2.4.2.c).

Observacions

És important mantenir a 4°C el gel durant l'electroforesi ja que la calor generada pel pas de corrent elèctric pot provocar la desnaturalització de l'híbrid DNA-RNA.

3.3. Cinètiques de tall amb Ribonucleasa H

La Ribonucleasa H és una endonucleasa que degrada la cadena d'RNA d'híbrids DNA-RNA mantenint la cadena de DNA intacta (Gubler, 1987). No degrada en canvi àcids nucleics de simple cadena o de doble cadena de DNA o RNA.

Material

- Tubs de vidre de 2ml siliconitzats
- Equip d'electroforesi
- Equip d'autoradiografia

Solucions i reactius

- Ribonucleasa H (1U/ μ l) (Promega)
- Tampó H 5x: 100mM-HCl pH 7.8, 250mM KCl, 50mM MgCl₂, 5mM DTT
- Tampó de càrrega F: 0.3% blau de bromofenol, 0.3% blau de xilencianol, 10mM EDTA pH 7.5 i 97.5% formamida desionitzada
- Solucions d'electroforesi desnaturalitzant

3.3.1. Pretractament a 37°C

Protocol

1. Barrejar en un tub de vidre siliconitzat: 6 μ l de transcrit marcat 3nM, 6 μ l d'oligonucleòtid de DNA no marcat 75nM, 6 μ l de tampó H 5x, 1 μ l tRNA i 8.5 μ l d'aigua.
2. Incubar a 37°C durant 5 min.
3. Recollir 5 μ l de mostra i posar-la ràpidament en gel. Aquest punt es designa com a temps 0.
4. Afegir als 25 μ l restants, 2.5 μ l d'RNasa H.
5. Incubar a 37°C.
6. Recollir 5 μ l de mostra al min 5, 15, 30 i 60. Posar cada vegada el tub ràpidament en gel.
7. Afegir 10 μ l de tampó de càrrega F a cada mostra i carregar en un gel de poliacrilamida desnaturalitzant al 4%.
8. Visualitzar el resultat en un film d'autoradiografia.

3.3.2. Pretractament a 90°C

1. Barrejar en un tub de vidre siliconitzat: 6 μ l de transcrit del VHC marcat 3nM, 6 μ l oligonucleòtid de DNA no marcat 75nM i 8.5 μ l d'aigua.
2. Incubar la mostra a 90°C durant 1 min. Incubar també en un altre tub de vidre siliconitzat tampó H 5x.
3. Afegir a la mostra 6 μ l de tampó H 5X calent, barrejar bé amb la micropipeta i deixar la mostra 20 min a temperatura ambient.
4. Afegir 1 μ l tRNA.
5. Seguir segons punts 3→8 apartat 3.3.1.

Observacions

En els dos protocols descrits és molt important barrejar molt bé amb la micropipeta abans de recollir mostra al llarg del temps. Després de recollir-les és aconsellable afegir ràpidament el tampó de càrrega i posar les mostres en gel. Fins i tot és millor si en comptes de gel es posen en un bany de neu carbònica i isopropanol per tal d'aturar de seguida les reaccions.

Nota Per a cada reacció es va realitzar sempre un control on no es va afegir oligonucleòtid de DNA. També es prepara un tub només amb transcrit marcat 0.6 nM final.

4. Ribonucleasa P humana i seqüències guia externes

4.1. Disseny de seqüències guia externes (EGS)

Les seqüències guia es varen dissenyar d'acord amb els criteris comentats a la introducció i que es basen en els resultats de Yuan i Altman, 1992 (Yuan *et al.*, 1992).

Les seqüències guia externes estan formades per dues parts: una part comuna (17 nts) que correspon a la seqüència del braç-bucle T dels precursors de tRNA (Figura 1, nucleòtids negres) i una part variable (Figura 1, nucleòtids grisos) que és la que hibrida amb l'RNA diana, en aquest cas el VHC. Un cop plegades han de presentar la següent estructura:

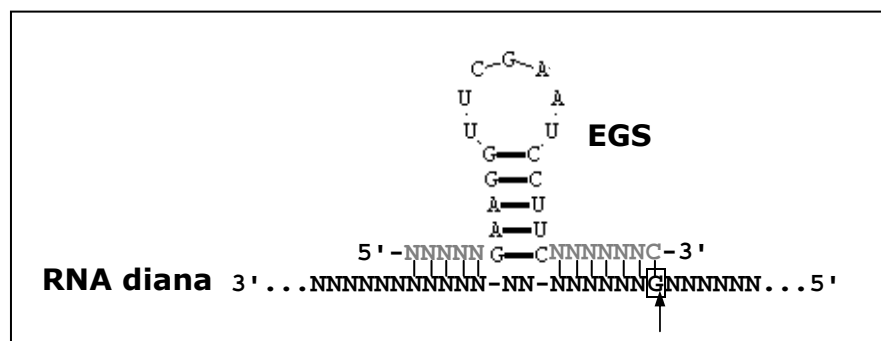


Figura 1. Esquema d'una seqüència guia externa.

Es varen dissenyar tres seqüències guia externes per guiar la ribonucleasa P cap a les següents posicions del genoma del VHC:

- EGS-2682: (5'-**CCCAGCAAGGUUCGAAUCCUUCACCAGCC**-3') posició de tall entre nucleòtids 2861-2862.
- EGS-2743: (5'-**GUGGUCAAGGUUCGAAUCCUUCUAAUGUC**-3') posició de tall entre nucleòtids 2742-2743.
- EGS-2770: (5'-**CCAUCCAAGGUUCGAAUCCUUCCCGGUCC**-3') posició de tall entre nucleòtids 2770-2771.

4.2. Marcatge amb quinasa d'EGS

El marcatge amb quinasa de les seqüències guia externes es va realitzar de la mateixa manera que el marcatge del oligonucleòtids antisentit.

Es va seguir el protocol de l'apartat 3.1.2.

4.3. Hibridació entre RNA i EGS (*Gel Shift*)

Les reacció de hibridació es varen portar a terme utilitzant transcrit del VHC (S_I) no marcat (apartat 1.4) i la seqüència guia marcada (apartat 4.2) seguint el protocol de l'apartat 3.2.

4.4. Reacció de tall

L'assaig amb ribonucleasa P i EGS es va dur a terme utilitzant com substrats un transcrit de 45 nucleòtids marcat (apartat 1.3) i el transcrit S_I marcat (el mateix transcrit de 554 nts que es va utilitzar per a l'estudi d'accessibilitat).

Material

- Tub de vidre de 2ml siliconitzat
- Equip d'electroforesi
- Equip d'autoradiografia

Solucions i reactius

- Tampó P 5x: 50mM Hepes KOH pH 7.5, 50mM MgOAc, 500mM NH_4Oac
- RNasin (20U/ μ l) (Promega)
- PEG 400mg/ml
- Fenol pH 5.5
- tRNA (1 μ g/ μ l)
- SDS 10%
- EDTA 100mM
- Proteinasa K (1mgr/ml) (Roche Diagnostics)
- Tampó de càrrega F: 0.3% blau de bromofenol, 0.3% blau de xilencianol, 10mM EDTA pH 7.5 i 97.5% formamida desionitzada
- Solucions d'electroforesi desnaturalitzant

Protocol

1. Barrejar en un tub de vidre siliconitzat: 1 μ l de transcrit marcat 18nM, 1 μ l de EGS 150nM i 3 μ l d'aigua.
2. Incubar la mostra a 90°C durant 1 min. Incubar paral·lelament en un altre tub de vidre siliconitzat tampó P 5x.
3. Afegir a la mostra 2 μ l de tampó P 5X calent, barrejar bé amb la micropipeta i deixar la mostra 20 min a temperatura ambient.
4. Afegir 1 μ l de PEG, 1 μ l RNasin i 1 μ l de ribonucleasa P purificada.
5. Incubar a 30°C durant 30 min.
6. Posar el tub en gel.
7. Afegeix 1 μ l de tRNA als 10 μ l de reacció.
8. Pre-incubar una alíquota de proteinasa K a 65°C durant 5 minuts.
9. Afegir a la mostra 0.7 μ l de EDTA 100mM, 0.7 μ l de SDS 10% i 0.5 μ l de proteinasa K pre-incubada.
10. Incubar a 65°C durant 12 minuts.
11. Afegir a cada mostra 20 μ l de tampó de càrrega.
12. Carregar en un gel de poliacrilamida desnaturalitzant al 4%.
13. Visualitzar el resultat en un film d'autoradiografia.

Nota

Sempre es preparen dos controls negatius: un primer on només s'hi posa aigua i transcrit marcat i un segon on es prepara una reacció sense afegir-hi EGS.

5. Digestió d'RNA amb ribozims M1GS

5.1. Construcció del ribozim M1GS específic

Per a convertir l'RNA M1 d' *E. coli* en un ribozim que tallés específicament el genoma del VHC, es va unir de manera covalent a l'extrem 3' de l'RNA M1 una seqüència guia (GS) complementària a l'RNA diana. El DNA motlle per a la transcripció *in vitro* es va construir mitjançant PCR utilitzant el vector de transcripció pFL117 (apartat 1.1.3). Com a encebador dret es va utilitzar l'oligonucleòtid 101 (5'-GGAATTCTAATACGACTCACTATAGAAGCTGACCAGACAGTCGCC-3') i com a encebadors invers quatre oligonucleòtids diferents per crear els quatre ribozims específics: M1HCV2682 (5'-GTGGT**GGCTGGTCCCTGG**atgaccatg-3'), M1HCV2734 (5'-GTGGT**GCTCCTCTTGACA**atgaccatg-3'), M1HCV2743 (5'-GTGGT**GACATTACCACCA**atgaccatg-3') i M1HCV2770 (5'-GTGGT**GGACCGGAGATG**atgaccatg-3'). La seqüència de cada encebador invers es divideix en tres fragments diferents. En minúscula, una seqüència de 10 nucleòtids complementària al vector pFL117 i comuna per els quatre oligonucleòtids; en majúscules i negreta la seqüència guia, responsable de la hibridació amb la zona diana de l'RNA del VHC i diferent en cada oligonucleòtid; subratllada, la seqüència que proporcionarà a l'híbrid GS-RNA diana l'extrem 3'-CCA, imprescindible pel reconeixement del substrat. La mida dels diferents M1GS és de 450 nucleòtids.

5.2. Assaig d'activitat

L'assaig d'activitat per testar la capacitat catalítica dels diferents M1GSs contra la regió NS2 del VHC es va dur a terme utilitzant el transcrit S_I marcat, el mateix que es va utilitzar per a l'estudi d'accessibilitat.

5.2.1. Plegament i calibració dels ribozims M1GSs

Previ a la reacció d'assaig contra el transcrit viral, és important plegar els ribozims perquè adoptin la conformació activa i calibrar-los per determinar a quina concentració s'han d'utilitzar. La calibració es va dur a terme utilitzant com a substrat el precursor del tRNA de la tirosina d'*E. coli*. Amb la calibració es determina la quantitat de ribozim que s'utilitzarà per els assajos amb VHC i que correspon a la concentració de M1GS capaç de tallar, aproximadament, un 80% del pre-tRNA^{Tyr} en una proporció molar ribozim:substrat de 1:1.

a. Plegament ribozims

Material

- Tubs de plàstic de 1,5ml siliconitzats
-

Solucions i reactius

- Tampó de plegament 2x: 10mM Tris pH 7.5, 2mM MgCl₂, 20mM NH₄ Cl

Protocol

1. Barrejar la mateixa quantitat en volum de M1GS marcat o no marcat i tampó de plegament 2x.
2. Incubar la mostra a 75°C durant 1 minut.
3. Deixar refredar la mostra fins que el bany arribi a 37°C.
4. Utilitzar immediatament el ribozim o guardar-lo al congelador.

b. Calibració dels ribozims

Material

- Tub de vidre de 2ml siliconitzat
- Equip d'electroforesi
- Equip d'autoradiografia

Solucions i reactius

- Tampó M 10x: 0.5M Tris pH 7.5, 1M NH₄Cl
- 1M MgCl₂
- PEG 400mg/ml
- RNasin (20U/μl) (Promega)
- Tampó de càrrega F 7M urea: 0.3% blau de bromofenol, 0.3% blau de xilencianol, 10mM EDTA pH 7.5, 7M urea i 97.5% formamida desionitzada.
- Solucions d'electroforesi desnaturalitzant

Protocol

1. Barrejar en una reacció de 10μl finals pre-tRNA^{Tyr} marcat (2-10nM), 1μl de tampó M 10X, 1μl 1M MgCl₂, 1μl de PEG, M1GS RNA marcat o no marcat (2-10nM). En cada reacció la proporció molar substrat:ribozim és constant, 1:1.
2. Incubar la mostra a 37°C durant 1 h.
3. Afegir 20μl de tampó de càrrega F 7M urea.
4. Carregar les mostres en un gel de poliacrilamida desnaturalitzant al 10%.
5. Visualitzar el resultat en un film d'autoradiografia.

Observacions

Tot i que els M1GSs es poden assajar marcats, és preferible utilitzar-los no marcats i sobretot en el cas de substrats més grans que el propi M1GS. D'aquesta manera les bandes que s'observen en el film d'autoradiografia deriven exclusivament del substrat.

5.2.2. Reacció de tall amb M1GSs

Material

- Tub de vidre de 2ml siliconitzat
- Equip d'electroforesi
- Equip d'autoradiografia

Solucions i reactius

- Tampó M 10x: 0.5M Tris pH 7.5, 1M NH₄Cl
- 1M MgCl₂
- PEG 400mg/ml
- Tampó de càrrega F 7M urea: 0.3% blau de bromofenol, 0.3% blau de xilencianol, 10mM EDTA pH 7.5, 7M urea i 97.5% formamida desionitzada.
- Solucions i reactius d'electroforesi desnaturalitzant

Protocol

1. Barrejar en una reacció de 10µl finals: 1µl transcrit viral S_I marcat 80 nM, 1µl de tampó M 10X, 1µl MgCl₂ 1M, 1µl de PEG, 1µl M1GS RNA no marcat 80 nM.
2. Incubar la mostra a 37°C durant 1 h.
3. Afegir 20µl de tampó de càrrega F 7M urea.
4. Carregar les mostres en un gel de poliacrilamida desnaturalitzant al 4%.
5. Visualitzar el resultat en un film d'autoradiografia.

6. Proves per a determinar l'enzim responsable dels talls observats en el genoma del VHC

6.1. Reacció de tall *in vitro*

Els assajos *in vitro* de l'activitat catalítica de la ribonucleasa P humana sobre l'RNA del VHC es varen realitzar amb quatre transcrits virals diferents, S_I, S_{II}, S_{III} i S_{IV}, prèviament descrits a l'apartat 1. També es va realitzar un control amb un transcrit de VHB (apartat 1).

Material

- Tub de vidre de 2ml siliconitzat
- Equip d'electroforesi
- Equip d'autoradiografia

Solucions i reactius

- Tampó P 5x: 50mM Hepes KOH pH 7.5, 50mM MgOAc, 500mM NH₄OAc
- RNasin (20U/µl) (Promega)
- PEG 400mg/ml
- tRNA (1µg/µl)
- SDS 10%

- EDTA 100mM
- Proteïnasa K (1mgr/ml) (Roche Diagnostics)
- Tampó de càrrega F: 0.3% blau de bromofenol, 0.3% blau de xilencianol, 10mM EDTA pH 7.5 i 97.5% formamida desionitzada
- Solucions d'electroforesi desnaturalitzant

Protocol

1. Barrejar en un tub de vidre siliconitzat: 1 μ l de transcrit viral marcat 18nM i 4 μ l d'aigua.
2. Incubar la mostra a 90°C durant 1 min. Incubar paral·lelament en un altre tub de vidre siliconitzat tampó P 5x.
3. Afegir a la mostra 2 μ l de tampó P 5X calent, barrejar bé amb la micropipeta i deixar la mostra 20 min a temperatura ambient.
4. Afegir 1 μ l de PEG, 1 μ l RNasin i 1 μ l de ribonucleasa P purificada.
5. Incubar a 30°C durant 30 min.
6. Posar el tub en gel i afegir immediatament 1 μ l de tRNA.
7. Pre-incubar una alíquota de proteïnasa K a 65°C durant 5 minuts.
8. Afegir a la mostra 0.7 μ l d'EDTA 100mM, 0.7 μ l de SDS 10% i 0.5 μ l de proteïnasa K pre-incubada.
9. Incubar a 65°C durant 12 minuts.
10. Afegir a cada mostra 20 μ l de tampó de càrrega 1x.
11. Carregar en un gel de poliacrilamida desnaturalitzant al 4%.
12. Visualitzar el resultat en un film d'autoradiografia.

Observacions

Es molt important respectar **l'ordre** i **les quantitats** a afegir dels reactius, sobretot quan es pleguen els substrats incubant **un minut** a 90°C i **afegint** el tampó P 5x calent. En aquest punt la mostra s'ha d'evaporar el menys possible, ja que la concentració de les sals del tampó per evaporació d'aigua pot provocar un plegament diferent del substrat i modificar-ne l'estructura. Com que la ribonucleasa P reconeix estructures, aquesta modificació pot afectar directament al reconeixement i al rendiment de la catàlisi.

6.2. Immunoprecipitació de l'activitat RNasa P

6.2.1. Immunoprecipitació

La immunoprecipitació de la ribonucleasa P es va dur a terme utilitzant un sèrum que contenia anticossos anti-Th procedent d'un pacient que patia una malaltia autoimmune (cedit per la Dra. Gelpí de l'Hospital de Sant Pau de Barcelona). Paral·lelament es va realitzar un control amb sèrum d'un pacient sa.

Material

- Tubs de plàstic de 1,5ml siliconitzats
- Agitador

Solucions i reactius

- Proteïna A-Sefarosa (Amersham Biosciences Biosciences)
- Tampó TMKT (10mM Tris-HCl, pH 7.5, 10mM MgCl₂, 100mM KCl, 0.02% Tween 20)
- Antisèrum
- Tampó P 5x: 50mM Hepes KOH pH 7.5, 50mM MgOAc, 500mM NH₄OAc

Protocol

1. Rentar amb 50µl de tampó TMKT 125 µg, en pes sec, de proteïna A-Sefarosa. Repetir-ho tres vegades.
2. Ressuspendre la proteïna A-Sefarosa en 30µl de tampó TMKT.
3. Incubar amb 0.5µl d'antisèrum a temperatura ambient, durant 1 hora i amb agitació moderada.
4. Donar un toc de centrífuga, eliminar el sobrenedant i rentar el pèl·let amb 50µl de tampó TMKT. Repetir-ho 3 vegades.
5. Continuar rentant el pèl·let amb 50µl de tampó P 1x. Repetir-ho 4 vegades.
6. Ressuspendre amb micropipeta i molt suaument (igual que durant els rentats) el pèl·let amb 30µl de tampó P 1x.
7. Incubar a 4°C i durant 2h amb 2.5µl de ribonucleasa P purificada (agitació moderada).
8. Donar un toc de centrífuga i separar el sobrenedant del pèl·let. Guardar el sobrenedant en gel picat.
9. Rentar el pèl·let amb 50µl de tampó P 1x. Repetir-ho 3 vegades.
10. Ressuspendre el pèl·let, molt suaument, amb 18µl de tampó P 1x. Guardar en gel picat.

Nota

Un cop s'afegeix la ribonucleasa P mantenir les mostres sempre en gel picat. 125µg de proteïna A-Sefarosa equivalen a un volum de 12µl.

6.2.2. Assaig d'activitat

L'assaig per comprovar si l'activitat RNasa P havia immunoprecipitat es va realitzar utilitzant com a substrat el pre-tRNA^{Tyr}. Un cop determinat que l'anticòs capturava l'activitat RNasa P, es varen dur a terme els assajos amb els transcrits virals S_I, S_{II} i S_{III}. Tots aquests assajos es varen realitzar segons les condicions de l'apartat 6.1 amb les següents modificacions. En comptes d'afegir 1µl d'RNasa P purificada es varen afegir els 30µl de sobrenedant o de pèl·let en tampó P 1x.

6.3. Inhibició competitiva

Es va testar l'activitat de la RNasa P sobre els transcrits virals S_I, S_{II} i S_{III}, en presència de concentracions creixents de substrat natural (pre-tRNA^{Tyr}). Les reaccions es varen dur a terme d'acord amb les condicions de l'apartat 6.1, mantenint constant a cada reacció la concentració de transcrit viral marcat (1.8nM) i

variant la concentració de pre-tRNA^{Tyr} (0.225, 0.45, 0.9, 1.8, 3.6 i 7.2 nM). La quantitat d'RNasa P que s'afegeix a cada reacció és de 1µl.

6.4. Estudi de les variants de VHC

6.4.1. Construcció i obtenció de les variants de VHC

Les variants de VHC es van obtenir a partir d'una col·lecció d'aïllats virals naturals de pacients infectats que disposa el nostre laboratori. Les seqüències clonades d'aquesta llibreria corresponen a un fragment del genoma del virus entre les posicions 2641-2872 de la regió NS2. Per tal d'allargar per l'extrem 3' el transcrit corresponent a cada variant, es varen amplificar per PCR fragments des de la posició 2641-2921 del genoma del virus utilitzant com a motlle el vector on estaven clonades les seqüències variants i com a encebadors HCV-2639 (5'-ACAGGATCCAGTCCTTCCTTGTTCTTCT-3') i HCV-2871 (5'-AACGAATTCCCACACATGCAAGTGCGCCTCAGCTCTGGTGATAAGATATTGTAACCA-3'). Els inserts es varen subclonar en el *poli*linker del vector pGEM-4z[®] (Promega) entre les dianes de restricció *Bam*HI i *Eco*RI, sota el control del promotor de la RNA polimerasa de bacteriòfag T7.

La seqüència corresponent al transcrit S_i, la que anomenem "seqüència salvatge", es va subclonar de la mateixa manera per ser utilitzada com a control de les reaccions de tall amb RNasa P. Per obtenir els diferents substrats d'RNA es va digerir el vector amb l'enzim de restricció *Eco*RI i realitzar una reacció de transcripció tal i com es descriu a l'apartat 1.2.

6.4.2. Reaccions de tall

Aquests assajos es varen realitzar seguint el protocol de l'apartat 6.1.

7. Proves per identificar i caracteritzar estructures tipus tRNA

Tal i com s'ha comentat a la introducció, les estructures d'RNA que imiten els RNAs de transferència s'anomenen estructures tipus tRNA (TLS). El genoma del VHC conté dues estructures que imiten els tRNAs ja que la ribonucleasa P les reconeix i processa. Per tal de caracteritzar aquestes estructures i determinar quin és el grau de mimetisme amb els RNAs de transferència es varen realitzar experiments de competició amb transcrits virals i el substrat natural.

Prèviament als assajos de competició, es va determinar la concentració d'RNasa P que s'havia d'utilitzar a les reaccions per no estar en condicions de saturació. L'assaig es va realitzar utilitzant com a substrat el pre-tRNA^{Tyr}. Les reaccions es varen portar a terme segons l'apartat 6.1 i les quantitats testades d'RNasa P van ser: 0.125, 0.25, 0.5, 1 i 2µl de l'extracte). Com que es treballa amb concentracions

molt petites és preferible fer dilucions amb tampó P 1x. Es va escollir la concentració d'RNasa P que tallava en un 20-30% el substrat natural.

Per a l'assaig de competició es va incubar el substrat natural marcat (concentració constant 1.8nM final) amb concentracions creixents de transcrit viral (0.9-180nM) seguint el protocol de l'aparat 6.1. La quantitat d'RNasa P que es va afegir va ser la determinada a l'experiment anterior.

8. Reaccions en presència d'alcohol

Aquests assajos es varen realitzar segons el protocol de l'apartat 6.1 i afegint etanol o metanol a la reacció. Es varen provar quatre concentracions diferents de cada alcohol, 10, 20, 30 i 40%. Tant l'etanol com el metanol es van afegir just abans d'introduir la RNasa P a la mostra.

IV. RESULTATS

IV.1. Caracterització de l'estructura i variabilitat d'una regió del VHC per dirigir-hi la RNasa P

IV.2. Identificació d'estructures tipus tRNA a l'RNA del VHC: noves dianes terapèutiques per a la RNasa P

IV.1. Caracterització de l'estructura i variabilitat d'una regió del genoma del VHC per dirigir-hi la RNasa P

A nivell molecular, l'accessibilitat i el baix potencial de variació d'un RNA diana són requeriments imprescindibles per a l'èxit de la teràpia amb ribozims. Els resultats que es presenten a continuació aporten dades sobre aquests dos requeriments d'una regió interna del genoma del virus de l'hepatitis C, la regió E2/NS2.

Per l'estudi d'accessibilitat d'una s'ha aplicat el mètode de la hibridació amb oligonucleòtids antisentit i la digestió d'híbrids DNA-RNA mitjançant la ribonucleasa H. A partir d'aquest estudi s'ha identificat una zona relativament oberta on dirigir un ribozim on en aquest treball s'ha apostat per la ribonucleasa P combinada amb seqüència guia.

La variabilitat de la regió E2/NS2 havia estat estudiada en el nostre laboratori en treballs anteriors (Cabot *et al.*, 1997). Aprofitant aquestes dades, es va voler fer un anàlisi del potencial de variació de la regió no només per conèixer la variació en una zona concreta sinó per determinar com afecta a l'estabilitat i especificitat de la hibridació amb les seqüències guia i el reconeixement de la ribonucleasa P humana o de l'RNA M1.

S'han estudiat dos models d'RNasa P, la ribonucleasa P humana guiada per seqüència guia externa (EGS) i l'RNA M1 de la ribonucleasa P d'*E.coli* unit a la seqüència guia per l'extrem 3' (ribozim M1GS). Els resultats *in vitro* mostren que s'ha aconseguit dirigir tant la ribonucleasa P humana com el ribozim M1GS cap a l'RNA del VHC i tallar-lo en una posició predeterminada tot i que en una eficiència de tall baixa. A més, es va voler determinar la validesa del mètode utilitzat per localitzar zones accessibles a la RNasa P comparant l'accessibilitat de l'RNA diana a la ribonucleasa H i als dos models de ribonucleasa P.

Els resultats mostren que la zona accessible és variable i que només es conserven entre set i nou posicions a cada seqüència diana òptima de tretze nucleòtids.

Article I

Characterization of the structure and variability of an internal region of hepatitis C virus RNA for M1 RNA guide sequence ribozyme targeting

Anna Nadal¹, Hugh D. Robertson², Jaime Guardia¹ and Jordi Gómez¹.
"Characterization of the structure and variability of an internal region of hepatitis C virus RNA for M1 RNA guide sequence ribozyme targeting" . *Journal of general virology*. Vol. 84, (2003) : p. 1545-1548

DOI 10.1099/vir.0.18898-0

¹ Servicio de Medicina Interna-Hepatología, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, 08035 Barcelona, Spain

² Department of Biochemistry, Weill Medical College of Cornell University, New York, NY 10021, USA

Abstract

Accessibility to folded RNA and low potential of variation in the target RNA are crucial requirements for ribozyme therapy against virus infections. In hepatitis C virus (HCV), the sequence of the 5'UTR is conserved but the highly folded RNA structure severely limits the number of accessible sites. To expand investigation of targeting in the HCV genome, we have considered an internal genomic region whose sequence variation has been widely investigated and which has a particularly conserved RNA structure, which makes it accessible to the human RNase P *in vitro*. We have first mapped the accessibility of the genomic RNA to complementary DNAs within this internal genomic region. We performed a kinetic and thermodynamic study. Accordingly, we have designed and assayed four RNase P M1 RNA guide sequence ribozymes targeted to the selected sites. Considerations of RNA structural accessibility and sequence variation indicate that several target sites should be defined for simultaneous attack.

Published ahead of print on 31 March 2003 as DOI 10.1099/vir.0.18898-0.

Altres resultats no publicats

Un dels objectius d'aquest treball de tesi és caracteritzar l'estructura i variabilitat d'una regió interna del genoma del virus de l'hepatitis C per dirigir-hi un tall amb potencial terapèutic utilitzant el ribozim ribonucleasa P. Els dos models d'RNasa P proposats són la ribonucleasa P humana guiada per seqüència guia externa (EGS) i el ribozim M1GS. L'estudi de l'estructura de la regió E2/NS2 per trobar zones accessibles on dirigir els ribozims i l'anàlisi del potencial de variació de la zona han estat descrits a l'article I juntament amb les dades per el model M1GS. En aquest apartat s'aporten els resultats dels experiments realitzats amb ribonucleasa P humana i seqüències guia externes. S'ha estudiat també si el model de processament de la RNasa H és vàlid per a determinar zones de l'RNA del virus accessibles a la ribonucleasa P humana.

Accessibilitat de l'RNA del VHC a la RNasa P humana guiada per seqüències guia externes

La figura que s'inclou a continuació i la figura 17 deriven dels resultats que s'han presentat a l'article I sobre la caracterització de l'estructura de la regió E2/NS2 del genoma del VHC i resumeixen l'accessibilitat a la ribonucleasa H de la zona estudiada. De fet, el disseny de les seqüències guia externes, igual que la seqüència guia dels ribozims M1GS s'ha basat en aquests resultats. Tal i com es discuteix a l'article I el tant per cent de tall i la diferència entre els pretractaments (37°C o 90°C) dóna una idea del grau d'estructuració i per tant es dedueix que: (i) les zones que hibriden amb els oligonucleòtids 2786, 2829 i 2848 estan molt estructurades i que (ii) la millor zona per dirigir el tall és la que hibrida amb els oligonucleòtids C2724 i C2745.

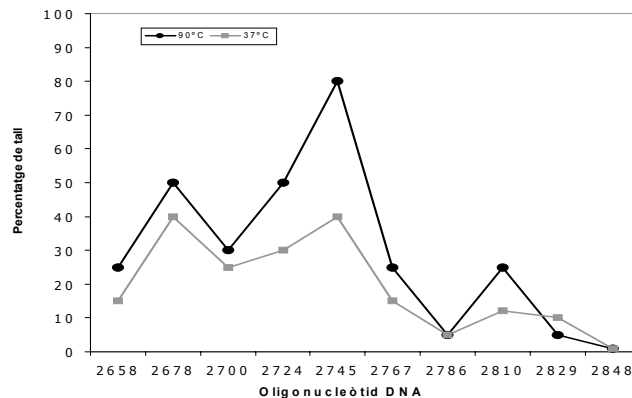


Figura 11. Gràfica que representa el resultat de l'estudi del grau d'estructuració i accés a la ribonucleasa H de la zona interna 2658-2863 del la regió NS2 del genoma del VHC. Es representa el tant per cent de tall de la ribonucleasa H sobre el transcrit VHC(2486-3040) per a cada oligonucleòtid testat després de 60 minuts d'incubació. Es diferencien els dos pretractaments, de color negre el de 90°C i de color gris el de 37°C.

1. Disseny de seqüències guia externes

Fins a aquest punt, però, s'ha assumit que el model de ribonucleasa H i oligonucleòtids de DNA és paral·lel al de ribonucleasa P i seqüències guia externes i per tant la zona més accessible determinada segons l'estudi hauria de ser la millor per dirigir-hi la ribonucleasa P i els EGS. Per a comprovar realment si els models són paral·lels es varen dissenyar les següents seqüències guia externes: L'EGS-2682, dissenyat per hibridar a una zona d'accessibilitat mitjana, l'EGS-2734 i 2743 per hibridar a la zona més accessible i l'EGS-2770, a una zona molt estructurada (Figura

11). Els EGS es varen dissenyar d'acord amb els criteris de l'apartat 4.1 del material i mètodes. Degut als requeriments que s'han comentat a la introducció les seqüències guia externes no es van poder dissenyar de manera que hibridessin exactament amb la seqüència de l'RNA complementària als oligonucleòtids antisentit. La posició de tall a la seqüència de l'RNA del VHC s'indica a la figura 12.

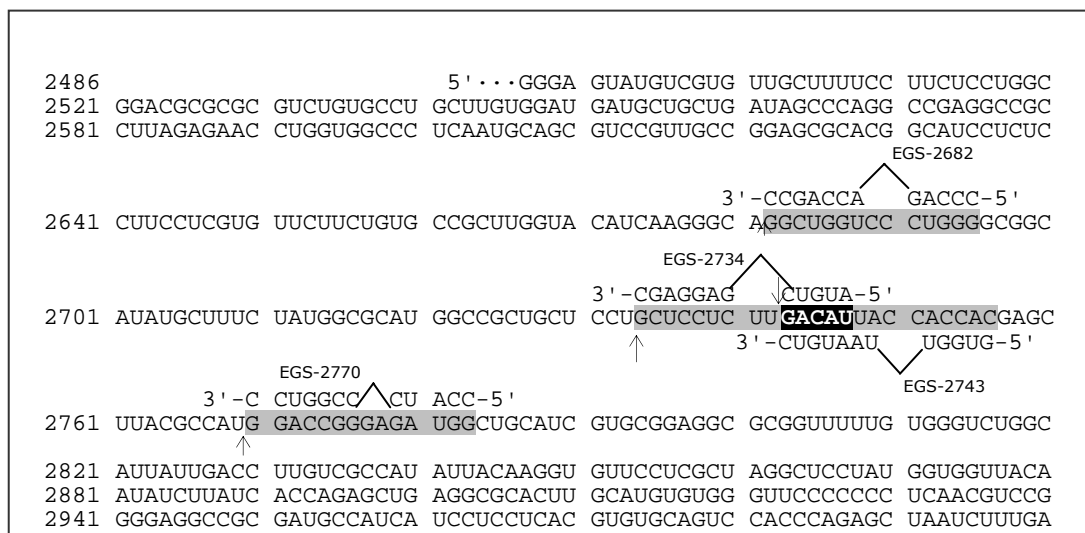


Figura 12. Seqüència del genoma del VHC des de la posició 2486 fins a la 3040. Marcats de color gris els nucleòtids que hibriden amb cada seqüència guia externa. Les línies en forma de triangle representen el braç-bucle T dels precursors de tRNA (part comuna a tots els EGS). Les fletxes indiquen la posició de tall. Nota: degut a que l'EGS-2734 i l'EGS-2743 es solapen, els nucleòtids comuns s'indiquen de color blanc amb el fons més fosc.

2. Hibridació entre seqüència guia externa i transcrit viral

Tal i com s'ha comentat al material i mètodes les seqüències guia externes estan formades per una part comuna que correspon a la seqüència del braç-bucle T dels pre-tRNA i una part variable que correspon als nucleòtids complementaris al RNA diana. El més important però és que hibridin formant l'estructura de braç-bucle T ja que és el que reconeix la ribonucleasa P. Abans de realitzar l'assaig amb ribonucleasa P, EGS i transcrit viral es varen dur a terme experiments de hibridació per els tres EGS dissenyats per comprovar que les seqüències guia externes i l'RNA substrat hibridaven i per comparar-los amb els resultats obtinguts utilitzant oligonucleòtids antisentit. El mètode consisteix en incubar transcrit viral no marcat amb un EGS marcat i analitzar el resultat en funció del percentatge de hibridació. Per tal de tenir una informació sobre l'estabilitat de l'estructura del substrat es va incloure un pretractament a 90°C.

Per aquest experiment es varen utilitzar les seqüències guia externes marcades amb [γ - 32 P]-ATP (apartat 4.2 del material i mètodes) i el transcrit del VHC

(2486-3040) no marcat (apartat 1.1 i 1.4 del material i mètodes). Les reaccions de hibridació i la visualització dels resultats es varen dur a terme segons el protocol de l'apartat 4.3 del material i mètodes.

A la part A de la figura 13 es mostra el resultat de les hibridacions analitzades en gel de poliacrilamida no desnaturalitzant. La part B de la figura correspon als experiments de hibridació entre transcrit i oligonucleòtid de DNA que hibrida a la mateixa zona. Si es comparen els resultats dels dos models s'observa que coincideixen. La seqüència guia externa 2743 s'ha dissenyat per hibridar a la zona més accessible (oligonucleòtid C2745) i efectivament és el resultat que presenta una banda amb intensitat més gran. Respecte els altres dos també es pot comprovar que tenen el mateix comportament que els oligonucleòtids antisentit.

Els experiments de tall amb ribonucleasa P dirigida per seqüències guia externes es varen realitzar amb un pretractament a 90°C ja que s'ha vist que facilita la hibridació.

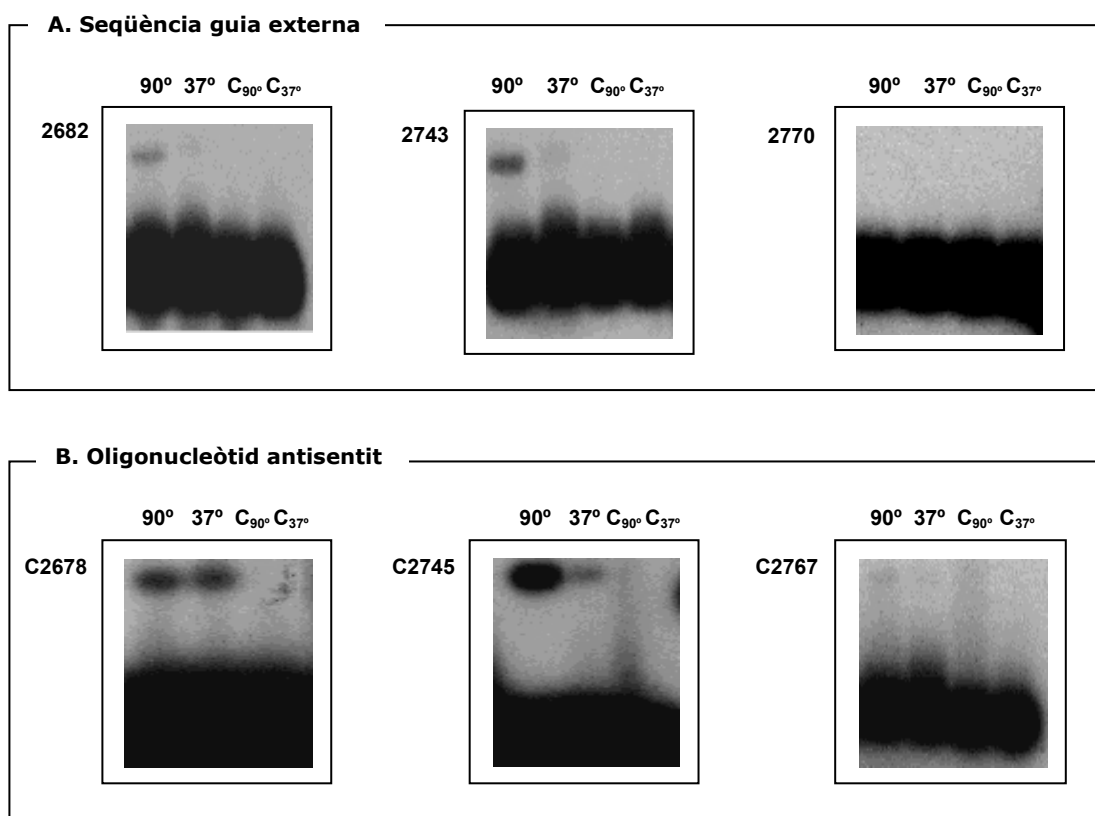


Figura 13. Experiments de hibridació amb el transcrit viral i els EGS analitzats en gel de poliacrilamida no desnaturalitzant. Es diferencien els dos pretractaments, 90 i 37°C i s'inclou el resultat dels dos controls, C_{90°} i C_{37°}, dels pretractaments on l'EGS marcat no es va incubar amb transcrit VHC(2486-3040) (part A). La part B correspon als experiments de hibridació amb els oligonucleòtids antisentit paral·lels.

3. Tall d'un transcrit del VHC

3.1. Assaig sobre un transcrit de 45 nucleòtids

Una vegada comprovat que les seqüències guia externes dissenyades per a guiar la ribonucleasa P hibridaven, es va realitzar l'assaig sobre un transcrit del VHC. L'assaig es va posar a punt utilitzant un transcrit de 45 nucleòtids que agafava just la zona determinada com a la més accessible. El transcrit es va obtenir segons l'apartat 1.3. del material i mètodes. La seqüència guia externa utilitzada és la EGS-2743 i dirigeix la ribonucleasa P cap a la posició 2742-2743 del genoma del virus (Figura 14), generant unes bandes producte de 30 i 15 nucleòtids. La reacció es va dur a terme segons les condicions descrites a l'apartat 4.4 del material i mètodes.

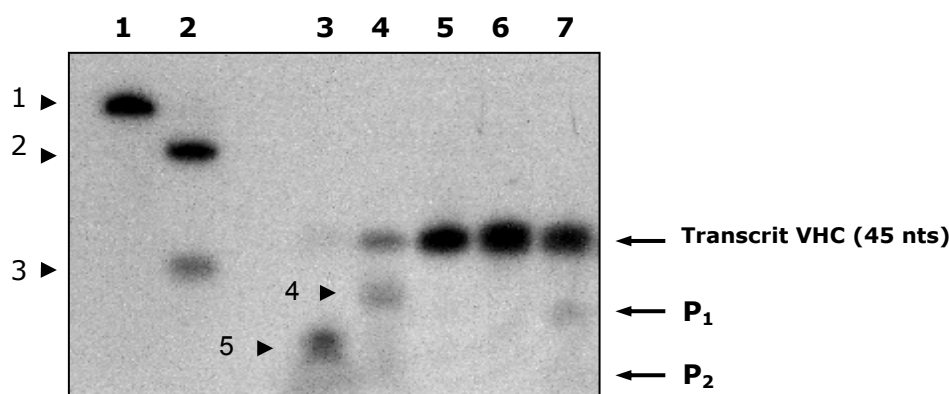


Figura 14. Assaig sobre un transcrit del VHC utilitzant la ribonucleasa P guiada per una seqüència guia externa. El resultat s'ha analitzat en un gel de poliacrilamida desnaturalitzant al 8% i visualitzat en un film d'autoradiografia. Els triangles assenyalen bandes de referència: (1) 131 nts, (2) 88 nts, (3) 43 nts, (4) 35 nts i (5) 20 nts. Carril 5, transcrit viral, carril 6, transcrit incubat amb ribonucleasa P i carril 7 transcrit incubat amb ribonucleasa P i seqüència guia externa (EGS-2743). P_1 i P_2 corresponen a les bandes derivades del tall produït per la ribonucleasa P guiada per l'EGS-2743.

En el resultat d'aquest assaig s'observa que quan s'incuba ribonucleasa P humana i EGS-2743 amb transcrit viral (carril 7) es produeix un tall específic que no s'observa quan el transcrit només s'incuba amb ribonucleasa P (carril 6). El patró de bandes ens indica que és específic i té lloc en una posició determinada ja que només s'observen dues bandes producte.

La mida de les bandes P_1 i P_2 s'ha determinat de dues maneres diferents. La primera comparant la mobilitat de les bandes amb les dels carrils 1-4, que ens serveixen com a referència i la segona mitjançant un càlcul numèric utilitzant el programa *Kodak Digital Science 1DTM*. Els dos resultats indiquen que el producte més gran (P_1) correspon a la banda de 30 nucleòtids i el més petit (P_2) a la de 15 nts.

Tot i ser la zona més accessible, però, el tant per cent de tall obtingut és baix, d'aproximadament un 10%.

3.2. Assaig sobre un transcrit de 554 nucleòtids

L'assaig es va repetir utilitzant un transcrit més gran de 554 nucleòtids (transcrit S_1), el mateix que es va utilitzar en les cinètiques de tall amb ribonucleasa H i que comprèn la regió 2486-3040 de l'RNA del VHC. Tot i que es va assajar amb les quatre seqüències guia externes només es mostra el resultat per a dues d'aquestes, l'EGS-2734 i 2743 (Figura 15).

Les condicions dels assajos són les que es descriuen a l'apartat 4.4 del material i mètodes.

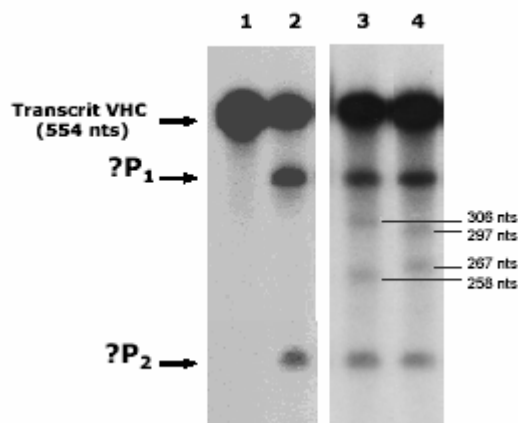


Figura 15. Assaig sobre un transcrit del VHC de 554 nucleòtids utilitzant com a ribozims la ribonucleasa P humana guiada per seqüències guia externes. El producte de la reacció de tall s'ha analitzat en un gel de poliacrilamida desnaturalitzant al 4% i visualitzat en un film d'autoradiografia.

Carril 1 transcrit, carril 2 transcrit incubat amb ribonucleasa P, carril 3 transcrit incubat amb ribonucleasa P i seqüència guia 2734 i carril 4 transcrit incubat amb ribonucleasa P i seqüència guia 2743. La mida de les bandes producte s'ha deduït per mobilitat electroforètica

La figura 15 mostra el resultat de l'assaig realitzat amb el transcrit més gran (carril 3 i 4) i els controls corresponents (carrils 1 i 2). En els carrils 3 i 4, la banda que s'indica com a transcrit viral correspon al substrat que no s'ha tallat. Les fletxes de la part dreta indiquen dues bandes producte que no s'observen en el carril sense EGS, i que per tant es dedueix que deriven del tall dirigit amb la seqüència guia externa. Amb aquest experiment hem confirmat que utilitzant un transcrit dotze vegades més gran el tall sobre l'RNA es manté i amb el mateix tant per cent (10%).

Fent referència als altres EGS dir que també es varen testar sobre aquest transcrit i es varen obtenir en cada cas les dues bandes de mida esperada. La mida de les bandes varia en funció d'on està dissenyada la seqüència guia externa, obtenint en cada cas un patró de bandes diferent. La gràfica de la figura 16 resumeix el resultat per a cada seqüència guia testada. Com a màxim

s'ha obtingut un 10% de tall que correspon a l'EGS que hibrida a la zona més accessible.

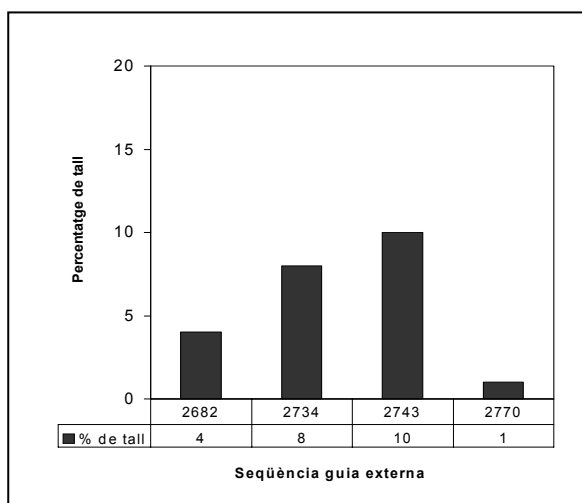
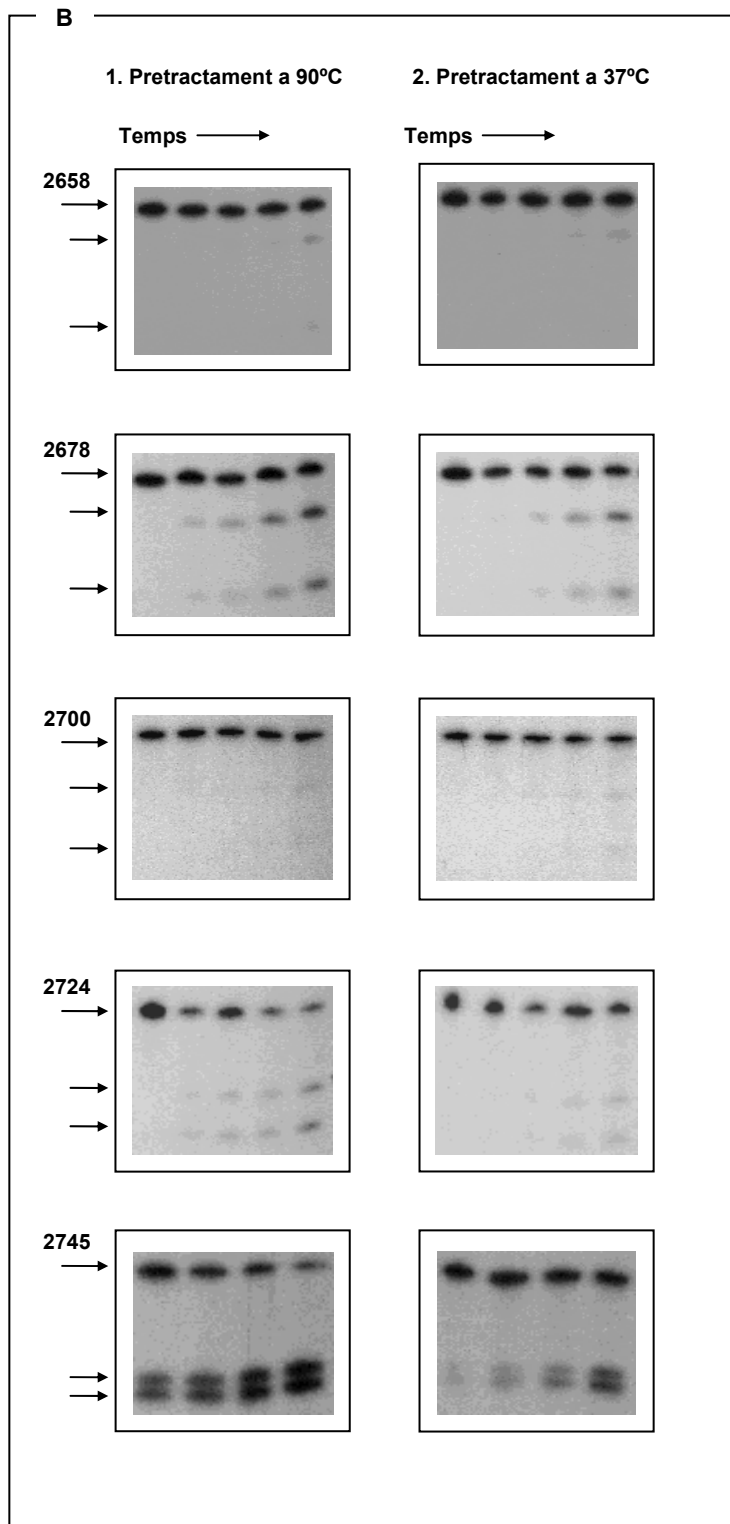
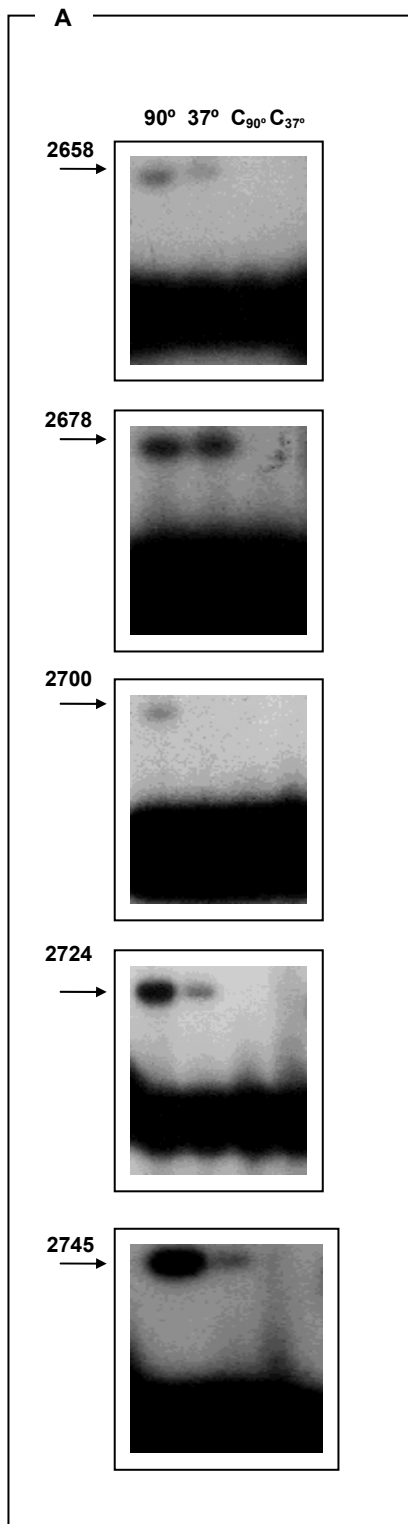


Figura 16. Representació gràfica del tant per cent de tall obtingut per a cadascuna de les seqüències guia externes utilitzades.

Utilitzant aquest transcrit més gran però vam obtenir un resultat inesperat. Tal i com s'observa a la figura 15 a més a més de les bandes derivades del tall dirigit amb seqüència guia apareixen dues bandes d'intensitat considerable que també s'observen en el carril control (P_1 i P_2). Aquests productes s'han observat per a cadascun dels EGS testats i en cada reacció control, és a dir, quan no s'afegeix seqüència guia externa. Aquest tall es pot definir com a reproduïble (s'observa en totes les reaccions control i les que contenen EGS), específic (genera dues bandes producte molt ben definides), eficaç (el tant per cent de tall és aproximadament d'un 50%) i independent de seqüència guia (es produeix igualment quan només s'incuba amb extracte de ribonucleasa P amb transcrit viral). Tot i que és la primera vegada que es parla d'extracte, s'ha de tenir en compte que després del procés de purificació s'obté ribonucleasa P concentrada però no totalment pura (la ribonucleasa P no és comercial). Per tant la primera pregunta que ens fem després d'observar aquests resultats és si realment la ribonucleasa P és la responsable del tall sobre l'RNA del virus o bé alguna altra RNasa contaminant procedent de l'extracte purificat. La identificació de l'enzim responsable del tall ha donat lloc a la publicació de l'article II.



Continua →

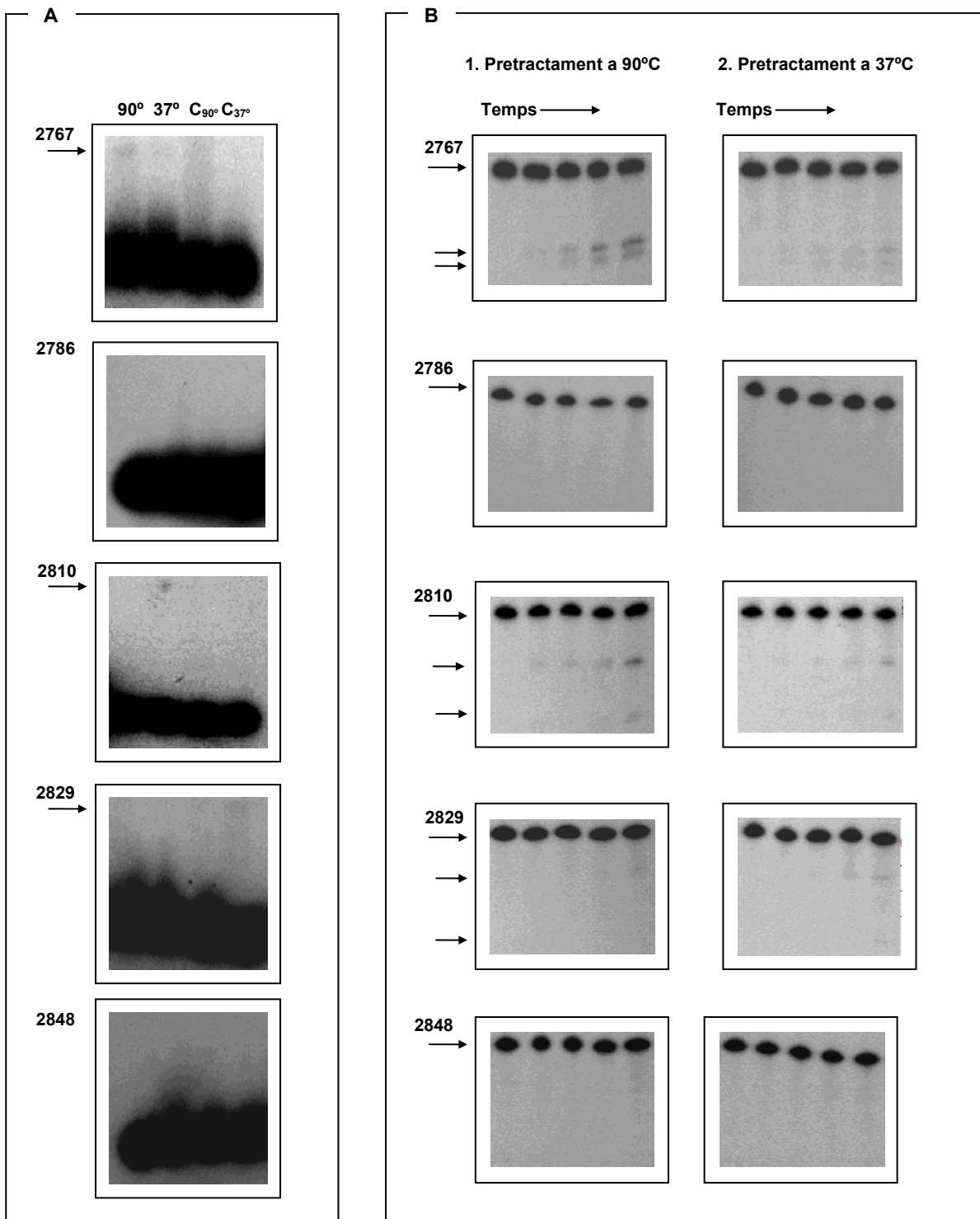


Figura 17. Reaccions de hibridació amb els oligonucleòtids antisentit (sèrie A) i cinètiques de tall amb ribonucleasa H (sèrie B). Inclou els resultats publicats a l'article I que no havien estat mostrats prèviament. (A): resultat de les hibridacions analitzades en gel de poliacrilamida no desnaturalitzant. Es diferencien els dos pretractaments, 90 i 37°C i s'inclou el resultat de dos controls, C_{90°} i C_{37°}. Les fletxes indiquen la presència d'híbrid RNA-DNA. (B): resultat de la reaccions amb ribonucleasa H analitzades en gel de poliacrilamida desnaturalitzant. Es diferencien els dos pretractaments, a 90°C i a 37°C. Es mostra el producte de la reacció al llarg del temps al minut 0,5,15,30 i 60.

IV.2. Identificació d'estructures tipus tRNA a l'RNA del VHC: noves dianes terapèutiques

En aquesta part del treball s'han caracteritzat, en col·laboració amb el grup del Dr. Hugh Robertson del departament de bioquímica del *Weill Medical College of Cornell University* de Nova York, dos talls observats sobre el genoma del VHC quan aquest s'incuba amb extracte de ribonucleasa P humana en absència de seqüències guia externes. Els resultats que es presenten demostren que la ribonucleasa P humana, i no un altre enzim contaminant de l'extracte purificat, és la responsable dels talls específics que es localitzen a l'entrada interna al ribosoma (IRES) i entre la regió estructural i no estructural. Per a la caracterització s'han aplicat diferents tècniques que es poden dividir en mètodes directes (*RNA fingerprinting*, realitzat al laboratori de Nova York) i indirectes (immunoprecipitació i inhibicions competitives).

La ribonucleasa P és un dels enzims del metabolisme del tRNA que s'utilitza per identificar estructures similars al tRNA en substrats diferents del substrat natural. El fet que la ribonucleasa P reconegui i talli el genoma del VHC en dues posicions determinades suggereix que, a les zones de tall, el virus conté estructures tipus tRNA. A més, tot i que el VHC és molt variable, els resultats mostren que l'estructura d'aquestes regions segurament es manté, ja que la ribonucleasa P reconeix i talla l'RNA fins i tot quan hi ha canvis en la seqüència.

D'altra banda, s'ha volgut estudiar l'efecte de solvents orgànics com l'etanol o el metanol en l'eficiència de tall de la ribonucleasa P humana ja que s'ha descrit que pot estimular l'activitat d'enzims d'RNA. L'efecte dels solvents s'ha examinat sobre el substrat natural i sobre l'RNA del virus de l'hepatitis C, concretament les dues estructures tipus tRNA descrites a l'article II. Els resultats mostren que la RNasa P comparteix amb els altres ribozims la capacitat de mantenir l'activitat i especificitat en presència d'alcohol però presenta un comportament diferent en funció del substrat utilitzat. Si bé l'alcohol no estimula l'activitat de la RNasa P humana, la presència de fins un 30% d'etanol o metanol a la reacció afavoreixen el tall sobre les dues estructures tipus tRNA.

Article II

Specific cleavage of hepatitis C virus RNA genome by human RNase P

Anna Nadal[‡], María Martell[‡], J. Robin Lytle[§], Alita J. Lyons[§], Hugh D. Robertson[§], Beatriz Cabot[‡], Juan I. Esteban[‡], Rafael Esteban[‡], Jaime Guardia[‡], and Jordi Gómez^{‡#}. "Specific Cleavage of Hepatitis C Virus RNA Genome by Human RNase P^{*}". *Journal of biological chemistry*. Vol. 277, issue 34 (August 23, 2002) : 30606-30613

[doi:10.1074/jbc.M203595200](https://doi.org/10.1074/jbc.M203595200)

From the [‡] Servicio de Medicina Interna-Hepatología, Area de Investigación Básica, Hospital Valle de Hebrón, Barcelona 08035, Spain and the [§] Department of Biochemistry, Weill Medical College of Cornell University, New York, New York 10021

Originally published In Press as on June 11, 2002

Abstract

We have found that RNase P from HeLa cells specifically and efficiently cleaves hepatitis C virus (HCV) transcripts *in vitro*. The evidence includes identification of the 5'-phosphate polarity of the newly generated termini at position A²⁸⁶⁰ as well as immunological and biochemical assays. Active cleavage has been shown in five dominant sequences of HCV "quasispecies" differing at or near the position of cleavage, demonstrating that this is a general property of HCV RNA. During the analysis, a second cleavage event was found in the 3' domain of the internal ribosome entry site. We have found that HCV RNA competitively inhibits pre-tRNA cleavage by RNase P, suggesting that HCV RNA has structural similarities to tRNA. This finding sets HCV apart from other pathogens causing serious human diseases and represents the first description of human RNase P-viral RNA cleavage. Here we discuss the possible meaning of these RNase P-accessible structures built into the viral genome and their possible role *in vivo*. Moreover, such structures within the viral genome might be vulnerable to attack by therapeutic strategies.

* Work in New York was supported by National Institutes of Health Grant DK-56424. Work in Barcelona was funded by Ministerio de Ciencia y Tecnología Grants SAF1999-0108 and BIO00-0347, Ministerio de Sanidad y Consumo Grant FISS-01/1351, and the Hospital Vall d'Hebron. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "*advertisement*" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

To whom correspondence and requests for materials should be addressed: Laboratorio de Medicina Interna-Hepatología, Area de Investigación Básica (B), Hospital Vall d'Hebron, Paseo Vall d'Hebrón 119-129, Barcelona 08035, Spain. Tel.: 34-93-4894034; Fax: 34-93-4894032; E-mail: jgomez@hg.vhebron.es.

Altres resultats

Increment del reconeixement de les estructures tipus tRNA del genoma del VHC per la RNasa P humana en presència d'etanol i metanol

Increment del reconeixement de les estructures tipus tRNA del genoma del VHC per la RNasa P humana en presència d'etanol i metanol

L'etanol i el metanol són dos solvents orgànics que poden estimular l'activitat d'enzims d'RNA. Per exemple, se sap des dels anys 60 que aquests solvents afavoreixen una reacció catalitzada per la subunitat gran del ribosoma procariota i que està relacionada amb la formació de l'enllaç peptídic durant la síntesi de proteïnes (Monro *et al.*, 1969; Monro, 1967). L'RNA M1, la subunitat RNA de la ribonucleasa P d'*E.coli*, no només és capaç d'hidrolitzar els precursors de tRNA en presència d'aquests solvents sinó que s'ha vist que un 10% d'etanol a la reacció n'incrementa fins a dues vegades el rendiment (Guerrier-Takada *et al.*, 1986), comportament que comparteix també la ribonucleasa P de *Bacillus subtilis* (Gardiner *et al.*, 1985). Un altre ribozim, l'intró de *Tetrahymena termofila*, mostra activitat catalítica en presència d'un 20% d'etanol (Hanna i Szostak, 1994).

Si bé aquestes són reaccions molt diferents sembla que la presència d'etanol les afavoreix i que el mecanisme d'afectació és comú i relacionat amb les interaccions RNA-RNA. Es creu que en la reacció catalitzada per la subunitat 50S, l'etanol facilitaria la unió del substrat amb el "lloc P o donador" del ribosoma (Monro *et al.*, 1968). En el cas de l'RNA M1, s'especula que els solvents orgànics podrien afavorir canvis en la conformació del ribozim o del substrat que depenen d'interaccions hidrofòbiques (Guerrier-Takada *et al.*, 1986). Finalment, per el ribozim *Tetrahymena termofila* es proposa que l'etanol podria estabilitzar ribozims mutants que contenen bases no aparellades a la zona de tall.

No s'ha estudiat mai l'efecte de l'etanol o el metanol sobre l'activitat de la ribonucleasa P humana. L'objectiu d'aquesta part del treball és comprovar si la RNasa P humana processa, igual que tots els ribozims anteriors, el seu substrat natural en presència d'aquests solvents orgànics. A més, s'ha volgut estudiar l'efecte dels solvents sobre les estructures tipus tRNA del genoma del virus de l'hepatitis C descrites a l'article II amb la finalitat d'estudiar el seu comportament en un ambient més hidrofòbic imitant així condicions particulars de l'interior de les cèl·lules com podrien ser les membranes, que és on replica el VHC o els ribosomes, on es tradueix (s'ha descrit que la superfície del ribosoma 70S presenta hidrofobicitat (Singh i Rao, 2002)).

1. Activitat de la RNasa P humana sobre el pre-tRNA^{Tyr} en presència d'alcohol

L'assaig d'activitat de la RNasa P humana sobre el substrat natural en presència d'alcohol es va realitzar segons les condicions descrites a l'apartat 8 del material i mètodes i utilitzant com a substrat el precursor de tRNA de la tirosina. Es varen provar quatre percentatges diferents d'etanol i metanol, 10, 20, 30 i 40%. Destacar que la RNasa P humana afegida a cada reacció corresponia a una quantitat capaç de tallar aproximadament el 25% del substrat natural, en les condicions habituals de pH, concentració de sals i temperatura, per evitar així treballar en condicions de saturació i poder analitzar millor l'efecte real dels solvents en l'eficiència de tall.

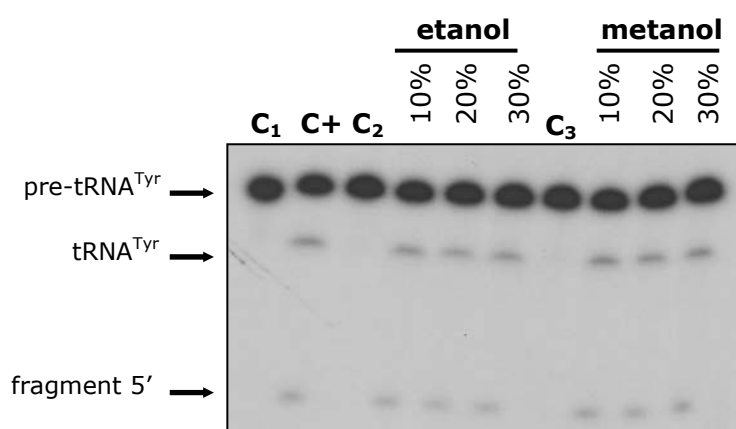


Figura 18. Assaig de la ribonucleasa P humana sobre el substrat natural (pre-tRNA^{Tyr}) en presència de concentracions creixents d'etanol i metanol. Els productes de la reacció (tRNA^{Tyr} i fragment 5') s'han analitzat en un gel de poliacrilamida al 4% i visualitzat en un film d'autoradiografia. C₁, pre-tRNA^{Tyr} marcat. C+, substrat natural incubat amb RNasa P en les condicions òptimes. C₂, pre-tRNA^{Tyr} incubat en presència del 30% d'etanol. Carrils 4-6, pre-tRNA^{Tyr} incubat amb RNasa P humana en presència de 10, 20 i 30% d'etanol. C₃, pre-tRNA^{Tyr} incubat en presència del 30% de metanol. Carrils 8-10, pre-tRNA^{Tyr} incubat amb RNasa P humana en presència de 10, 20 i 30% de metanol.

Els resultats mostren que la ribonucleasa P humana és activa en presència d'alcohol ja que reconeix i processa el pre-tRNA^{Tyr} en presència d'un 30% d'etanol i metanol (Figura 18). L'eficiència de tall però, disminueix considerablement quan la reacció conté un 40% d'algun dels dos solvents orgànics (no es mostra resultat). A més, el fet que només s'observin dues bandes producte indica que el tall produït en presència d'aquests solvents és específic i el fet que mostrin la mateixa mobilitat electroforètica que les bandes producte del carril control (C+) revela que el tall té lloc entre les mateixes bases. No obstant, no sembla que aquests solvents estimulin l'activitat de la RNasa P humana ja que en cap cas s'observa un increment de la intensitat de les bandes producte (Figura 18).

2. Activitat de la RNasa P humana sobre l'RNA del VHC en presència d'alcohol

Dels resultats de l'apartat anterior es conclou que la RNasa P humana manté l'activitat i especificitat en presència d'alcohol i que els solvents no afecten la interacció amb el ribozim (fins a un màxim d'un 30% d'alcohol a la reacció). Les estructures tipus tRNA que conté el genoma del virus són similars al tRNA però no iguals i estan incloses en una estructura més gran, per tant, podrien tenir un comportament diferent del substrat natural en presència d'alcohol. La finalitat dels assajos que es presenten a continuació és veure l'efecte de l'etanol i el metanol sobre les estructures tipus tRNA i l'estructura general i analitzar algun possible canvi de conformació utilitzant l'assaig amb la ribonucleasa P humana.

Els assajos sobre RNA del VHC es van realitzar utilitzant com a substrat dos transcrits del VHC: el transcrit S_I que inclou l'estructura tipus tRNA descrita a la regió NS2 i el transcrit S_{IV} que inclou l'estructura trobada a la regió IRES (apartat 1.1.1 del material i mètodes). Les condicions dels assajos són les que es descriuen a l'apartat 8 del material i mètodes.

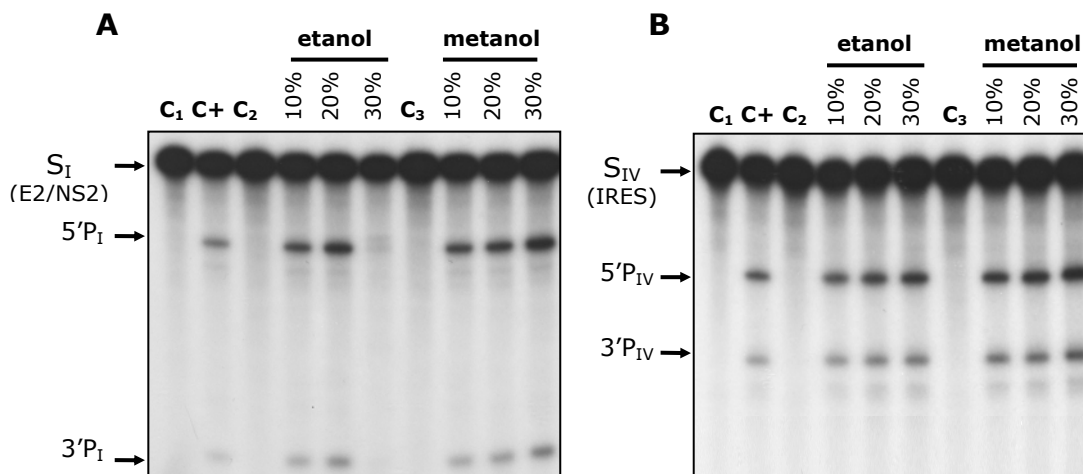


Figura 19. Assaig de la ribonucleasa P humana sobre el transcrit S_I (A) i el transcrit S_{IV} (B) en presència de concentracions creixents d'etanol i metanol. Els productes de la reacció [producte 5' ($5'P$) i producte 3' ($3'P$)] s'han analitzat en un gel de poliacrilamida al 4% i visualitzat en un film d'autoradioagrafia. C_1 , transcrit marcat. $C+$, transcrit viral incubat amb RNasa P en les condicions òptimes. C_2 , transcrit incubat en presència del 30% d'etanol. Carrils 4-6, reaccions de tall en presència de concentracions creixents d'etanol (10, 20 i 30%). C_3 , transcrit viral incubat en presència del 30% de metanol. Carrils 8-10, incubat amb RNasa P humana en presència de 10, 20 i 30% de metanol.

Nota: destacar que els experiments es varen repetir tres vegades i que la reacció on el substrat S_I s'incuba amb RNasa P en presència del 30% el tant per cent de tall oscil·la.

Els resultats de la figura 19 mostren que la ribonucleasa P humana talla l'RNA viral en presència d'alcohol i amb la mateixa especificitat que el control positiu, és a dir en absència de solvents. En canvi, a diferència del substrat natural, s'observa que l'etanol i el metanol afavoreixen significativament l'eficiència de tall. L'augment gradual de la intensitat de les bandes producte reflecteix una correlació entre el tant per cent de tall i la concentració de solvent orgànic. No obstant, el fet que en presència d'etanol no s'observi més eficiència que en presència de metanol, suggereix que no hi ha dependència entre el tant per cent de tall i la hidrofobicitat.

Derivat dels resultats de l'apartat anterior es pot descartar que l'augment del percentatge de tall sigui degut a una estimulació de l'activitat de la RNasa P. Es proposa doncs que la millora en el reconeixement pot ser deguda a una reestructuració dels motius tipus tRNA, facilitant el reconeixement i la interacció amb la RNasa P o bé a una "desestructuració" d'una estructura d'ordre superior on poden estar incloses les estructures tipus tRNA, contribuint a que estiguin més accessibles.

Per tal de descartar una d'aquestes dues possibilitats, es van realitzar els mateixos assajos utilitzant com a substrat una seqüència variant minoritària seleccionada al nostre laboratori. Aquesta seqüència presenta diferències respecte la seqüència salvatge: conté una mutació a la regió IRES, molt a prop de la posició de tall de la ribonucleasa P humana ($A^{368} \rightarrow G^{368}$) i té la particularitat de ser considerablement més sensible a la RNasa P (Piron *et al.*, en preparació). Creiem que l'augment en el percentatge detall es degut a un increment del reconeixement i que aquesta mutació contribueix a que l'estructura tipus tRNA de la seqüència variant s'assembli més al tRNA que l'estructura salvatge (Piron *et al.*, en preparació).

En canvi, quan aquest mutant s'incuba amb ribonucleasa P en presència d'etanol i metanol no s'observa increment en l'eficiència de tall (potser degut a que l'estructura ja no es pot assemblar més al tRNA). Proposem que la diferència de comportament de les dues seqüències en presència dels solvents afavoreix l'explicació que l'augment del tant per cent de tall de la seqüència salvatge és degut a un increment del reconeixement de les estructures tipus tRNA per part de la ribonucleasa P, causat per una reestructuració, més que a una millora de l'accessibilitat.

V. DISCUSSIÓ GENERAL

IV. DISCUSSIÓ GENERAL

A nivell molecular, l'estructura i la variabilitat són característiques de l'RNA diana que poden limitar l'eficiència d'un ribozim com a agent antiviral i per tant factors que s'han de tenir en compte a l'hora d'escollir la regió on dirigir-los. En el cas del VHC, la regió 5' no codificant seria un bon candidat a una possible teràpia amb ribonucleasa P ja que és una regió molt conservada, però té un inconvenient, el grau d'estructuració limita el nombre de llocs accessibles. L'estructura d'aquesta regió s'ha resolt utilitzant diverses tècniques, entre d'altres enzimàtiques (Lyons *et al.*, 2001) i s'ha vist que és majoritàriament complexa, fet que la converteix en molt poc accessible sobretot quan s'utilitzen ribozims grans. Part d'aquest treball de tesi s'ha centrat en trobar una zona del genoma del VHC alternativa a la regió 5' no codificant on dirigir-hi un tall amb potencial terapèutic, ja sigui utilitzant la ribonucleasa P humana dirigida per seqüències guia externes o el ribozim M1GS.

D'altra banda, la descripció d'una interacció específica, *in vitro*, entre l'RNA del VHC i la ribonucleasa P humana ha portat a identificar dues estructures tipus tRNA en el genoma del virus. La presència d'aquestes estructures en l'RNA del VHC replanteja l'estratègia terapèutica inicial ja que la similitud amb el tRNA les fa susceptibles a l'atac de la ribonucleasa P, directament, en absència de seqüències guia externes.

Accessibilitat de la regió E2/NS2 a la ribonucleasa P

S'ha descrit que regions no estructurades o amb fragments de simple cadena llargs són les millors per convertir-se en dianes per a la hibridació amb oligonucleòtids de DNA antisentit (Ecker *et al.*, 1992; Lima *et al.*, 1992; Patzel *et al.*, 1999; Scherr *et al.*, 2000; Vickers *et al.*, 2000) i que l'estructura secundària i terciària influeix en l'accessibilitat de la ribonucleasa H i per tant en l'eficiència de tall (Lima *et al.*, 1997). Es pot considerar doncs que les zones que hibriden amb l'oligonucleòtid i mostren una eficiència de tall elevada són poc estructurades o accessibles.

L'estudi d'accessibilitat revela que la regió 2658-2869 del genoma del virus conté dominis oberts i tancats i que la transició entre uns i altres no és brusca si es compara amb altres regions d'estructura coneguda (regió 5' no codificant). Els resultats es poden dividir en tres grups segons l'eficiència de hibridació amb l'oligonucleòtid antisentit i el tant per cent de tall de la ribonucleasa H: en zones relativament obertes o accessibles (C2724 i C2745), d'accessibilitat mitjana (C2658, C2678, C2700 i C2767), poc accessibles (C2786, C2810 i C2829) i tancades o no accessibles (C2848) (Figura 11 i 17). Dels experiments amb ribonucleasa H es dedueix també que aquesta zona no conté dominis que presentin dues conformacions amb accessibilitat diferent ja que la intensitat de les bandes producte incrementa de manera gradual al llarg del temps (Figura 17).

La zona més accessible i per tant la candidata per dirigir-hi la ribonucleasa P humana combinada amb seqüència guia externa o ribozims M1GS és la que hibrida amb els oligonucleòtids C2724 i C2745 (posicions 2724-2763). D'altra banda, de l'estudi d'accessibilitat es conclou també que la zona complementària a l'oligonucleòtid antisentit C2848 (posicions 2848-2865) es plega formant una estructura local estable. De fet, una de les estructures tipus tRNA del genoma del VHC que s'han descrit a l'article II es localitza just en aquesta zona (l'anàlisi mitjançant el mètode d'RNA *fingerprinting* situa la posició de tall entre el nucleòtid 2860 i el 2861). D'altra banda, com que la posició de tall de la RNasa P es localitza just a l'extrem de la zona on es va realitzar l'estudi d'accessibilitat, vam considerar convenient realitzar un assaig amb RNasa H amb quatre oligonucleòtids antisentit dissenyats per hibridar des de la posició 2862-2940. Els resultats revelen que efectivament, la zona que envolta la posició de tall de la RNasa P humana es plega de forma estable (Figura 20).

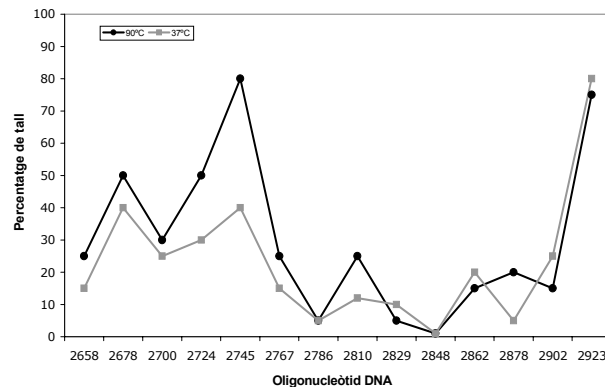


Figura 20. Gràfica on es mostra el resultat de l'accessibilitat a la ribonucleasa H de la zona interna 2658-2940 de la regió NS2 del genoma del VHC després de 60 minuts d'incubació. Es diferencien els dos pretractaments, de color negre el de 90°C i de color gris el de 37°C.

Amb aquest estudi no només hem determinat una zona accessible on dirigir el tall sinó que s'ha obtingut informació sobre l'estructura i accessibilitat de tota la regió. Tot i que l'RNA substrat és un transcrit que correspon a una regió interna del genoma (posicions 2486-3040) s'assumeix que l'estructura descrita és fiable ja que l'estudi es va realitzar a la zona central del transcrit (posicions 2658-2869) desestimant així estructures poc estables o poc reals que es poden formar als extrems "artificials" del transcrit.

Finalment, dir, que es pot esperar un plegament semblant de l'RNA dins la cèl·lula. S'han publicat pocs treballs on es compara l'estructura d'una RNA sintètic amb el mateix RNA intracel·lular, però proposen que l'estructura és similar (Doktycz *et al.*, 1998), tot i que per algunes seqüències mostra patrons de sensibilitat diferents.

La ribonucleasa P dirigida per seqüència guia com a agent antiviral

Efecte de l'estructura de l'RNA substrat

L'eficiència d'un ribozim dirigit a una zona accessible disminueix si en comptes d'un substrat petit s'aplica sobre un RNA llarg (Heidenreich i Eckstein, 1992). Per tal d'evitar impediments estructurals que interferissin amb l'activitat dels ribozims el primer assaig es va realitzar sobre un substrat de 45 parells de bases que agafava només la zona caracteritzada com a més accessible. Amb aquests assajos *in vitro* es demostra que tant el model de ribonucleasa P combinat amb la seqüència guia EGS-2743 com el ribozim M1HCV-2743 són capaços de produir un tall dirigit i específic sobre l'RNA substrat (Figura 21).

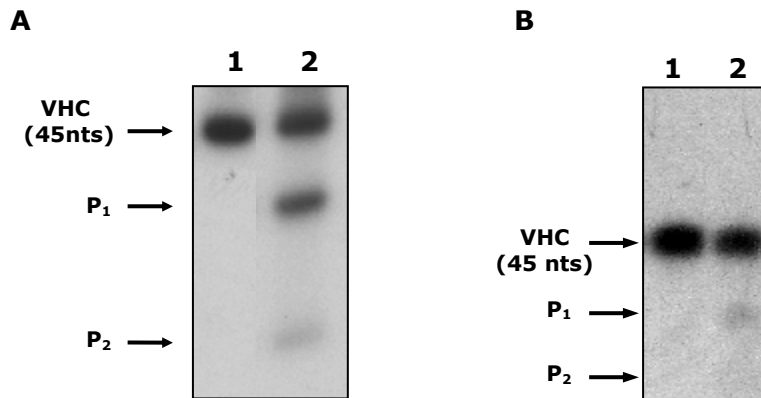


Figura 21. Assaig sobre un transcrit del VHC utilitzant (A) el ribozim M1GS M1HCV-2743 i (B) la ribonucleasa P humana combinada amb l'EGS-2743. En el cas de la part A el resultat s'ha analitzat en un gel de poliacrilamida desnaturalitzant al 8% i en el cas de la part B al 4%. Carril 1, transcrit viral incubat amb tampó i carril 2 transcrit incubat amb RNasa P. P₁ i P₂ corresponen a les bandes derivades del tall.

Quan els assajos es realitzen amb el transcrit més gran -el mateix de l'estudi d'accessibilitat (554nts)- el tall dirigit a la zona més accessible es manté, però l'eficàcia del ribozim M1HCV-2743 disminueix considerablement. Donada l'elevada eficiència del ribozim digerint el substrat de 45 nts, aquesta reducció de l'activitat es podria explicar per impediments estèrics o repulsions electrostàtiques entre l'estructura del substrat i el ribozim quan s'utilitza l'RNA llarg. De l'estudi d'accessibilitat s'ha deduït que és un RNA en general estructurat i amb alguna estructura local estable. Per tant, tot i dirigir el ribozim M1HCV-2743 cap a la zona accessible, l'estructura del voltant podria interferir en l'accessibilitat.

El disseny de noves seqüències guia per dirigir la ribonucleasa P humana o l'RNA M1 cap a altres dianes determinades com a menys accessibles ha permès avaluar l'efecte de l'estructura en l'eficiència de tall. Els resultats mostren que tant la ribonucleasa P humana com l'RNA M1 són sensibles als impediments estructurals de la diana ja que el patró d'accessibilitat varia, amb alguna petita diferència, de la mateixa manera que el patró de tall de la ribonucleasa H. La disminució tant notable en l'eficiència de tall que mostra el ribozim M1HCV-2743 quan s'incuba amb un RNA dotze vegades més llarg i la diferència de tall entre els ribozims M1HCV-2734 i M1HCV-2743 demostren que l'habilitat del ribozim per tallar un RNA llarg de manera eficaç no només depèn de l'accessibilitat de la seqüència diana per hibridar amb la seqüència guia (GS) sinó també de l'estructura terciària del substrat. A més, podem descartar que les diferències de tall observades entre els diferents ribozims M1GS siguin degudes a algun efecte de la seqüència guia ja que hem comprovat que

l'eficiència de tall sobre el substrat natural és la mateixa independentment de quina sigui la seqüència guia unida a l'RNA M1.

Ja s'ha comentat que l'assaig de ribonucleasa H i oligonucleòtids antisentit forma part del conjunt de tècniques *in vitro* que s'utilitzen per estudiar l'accessibilitat d'un RNA per localitzar possibles dianes terapèutiques. S'han publicat treballs que utilitzen aquest mètode per predir l'estructura i localitzar zones accessibles on dirigir el ribozim *hammerhead* o *hairpin* (Amarzguioui *et al.*, 2000), però no hi ha treballs anteriors on s'hagi aplicat per trobar zones accessibles a la ribonucleasa P. En el cas del ribozim RNasa P, és previsible que la ribonucleasa H sigui un bon mètode per localitzar dianes accessibles ja que és una molècula gran, tal com ho són la RNasa P humana o els ribozims M1GSs. Els resultats que s'han presentat confirmen que és vàlid utilitzar aquest model per localitzar dianes accessibles on dirigir la ribonucleasa P ja que el patrons d'accessibilitat coincideixen.

Efecte de la variabilitat

Ja s'ha dit en varies ocasions durant aquesta tesi, que les limitacions dels ribozims com a agents antivirals són degudes, en gran part, a l'estructura que adopta el substrat (Branch, 1998) però també a l'elevada taxa de mutació que presenten els virus d'RNA durant la infecció .

Per tal de considerar l'efecte del potencial de variació, es va dividir la regió 2658-2869 del genoma del VHC en dianes potencials consecutives de 13 bases de llarg. Es van observar entre tres i dotze mutacions per cada motiu i restringint l'estudi a la regió determinada com a més accessible (nt 2724-2763) es van observar entre quatre i set mutacions (Figura 22). La interacció de la seqüència guia amb el substrat és susceptible a la variació de la diana per tant aquestes mutacions podrien inhibir l'eficiència, tant de ribonucleasa P humana com del ribozim M1GS, evitant el reconeixement específic entre la seqüència guia i la diana. No obstant, en el cas de la ribonucleasa P humana s'ha vist que és relativament poc sensible a les variacions de la diana ja que reconeix híbrids RNA-EGS que contenen bases no aparellades (Guerrier-Takada *et al.*, 1997). Es creu que tres o quatre mutacions són les que es necessiten, com a mínim, per afectar l'estabilitat de l'híbrid (Plehn-Dujowich i Altman, 1998). En canvi, la interacció de la seqüència guia del ribozim M1GS amb la diana és més crítica pel reconeixement i eficiència. Si bé s'ha vist la longitud òptima de la seqüència guia és de 13 nucleòtids, la longitud crítica és de 5 nucleòtids (Liu i Altman, 1995).

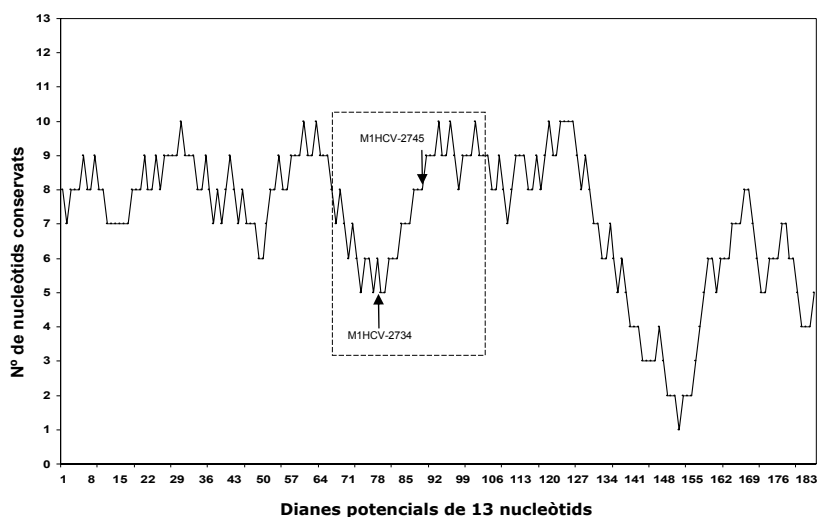


Figura 22. Perfil de la conservació de nucleòtids a la regió 2658-2869 del genoma del VHC. La gràfica representa el nombre de nucleòtids conservats a cada diana potencials de 13 bases després de l'alineament de 78 seqüències consens de sèrum i fetge de 39 pacients crònics. La regió determinada com a més accessible s'indica amb un quadre de línies discontinües i les fletxes senyalen les posicions de tall.

Regió E2/NS2 com a diana terapèutica

Dels resultats d'accessibilitat i d'anàlisi mutacions es dedueix que aquesta regió interna del genoma és variable i estructuralment parlant limitada i que l'estratègia terapèutica requeriria un atac simultani de diverses dianes. De fet, en el cas de la ribonucleasa P d'*E.coli* s'ha vist que utilitzant dues seqüències guia dirigides contra un mateix mRNA l'eficiència, analitzada en termes de reducció d'mRNA, augmenta (Guerrier-Takada *et al.*, 1997). Amb la ribonucleasa P humana també s'han realitzat experiments semblants amb el virus de la grip i s'ha descrit que dirigint simultàniament dues seqüències guia contra dos mRNAs, que codifiquen per proteïnes essencials del virus, la producció de partícules virals s'inhibeix de manera més eficient que escollint com a diana un sol mRNA (Plehn-Dujowich i Altman, 1998).

Malgrat tot, creiem que el fet de ser una regió variable no invalida la proposta de convertir-la en una diana terapèutica alternativa a regions més conservades. El nombre de mutacions observades dóna informació de la capacitat o potencial de variació i per tant reflecteix com varia una regió que està sotmesa a fortes forces selectives, tal i com es descriu per la regió E2/NS2 (Cabot *et al.*, 2000). En canvi, una zona conservada, el més probable és que sigui conservada per preservar la funció que realitza i per tant, habitualment, no està sotmesa a una pressió selectiva positiva significativa. Un ribozim, igual que qualsevol altre tipus de tractament, és

una pressió selectiva que pot forçar que una seqüència variï i es converteixi en resistent. Si aquesta resistència confereix un avantatge selectiu, el virus mutant creix respecte als altres. La diferència entre una regió conservada i una de variable és que si bé la variable pot crear més fàcilment resistències, està habitualment sotmesa a selecció i per tant més fàcil de preveure com varia.

L'eficiència de tall observada *in vitro* en ambdós models de ribonucleasa P però, és relativament baixa. En el cas de la ribonucleasa P humana no hi ha treballs que hagin realitzat experiments de tall en paral·lel que permetin comparar la sensibilitat *in vitro* i en cultiu. Per tant és difícil de preveure si el tant per cent de tall seria superior, igual o inferior dins les cèl·lules. Però el fet que estudis amb altres virus, com el virus de la grip o de l'herpes simple, s'hagin obtingut uns rendiments tant elevats de inhibició quan els assajos es porten a terme en cultiu fa pensar que en el nostre cas podríem esperar-ne uns bons resultats. Els ribozims M1GS en canvi, el més probable és que augmentessin l'activitat dins les cèl·lules ja que s'ha descrit per ribozims M1GS dirigits contra RNA missatger de virus de l'herpes simple, que l'eficiència de tall augmenta fins a 5 vegades quan s'incuben amb extracte de ribonucleasa P parcialment purificada (Altman i Kirsebom L.A., 1999; Liu i Altman, 1995).

Noves dianes terapèutiques per a la ribonucleasa P

Identificació d'estructures tipus tRNA en el genoma del VHC

El resultat inesperat que s'han obtingut durant la realització d'aquest treball de tesi és la troballa que la ribonucleasa P humana talla l'RNA genòmic del VHC en absència de seqüències guia externes. De fet, no era gens evident que el VHC fos substrat de la RNasa P humana ja que des del seu descobriment només s'han descrit dos substrats per la ribonucleasa P eucariota, els precursors de tRNA i un precursor d'RNA ribosomal (Chamberlain *et al.*, 1996; Clayton, 1994). Els resultats presentats a l'article II es van obtenir de l'aplicació de tècniques diferents i demostren que la ribonucleasa P és la responsable del tall i descarten la interacció amb altres ribonucleases com per exemple la RNasa MRP. El mètode de l'RNA *fingerprinting* i l'anàlisi químic de l'RNA tallat i no tallat (mètodes directes) confirmen que els talls observats tenen lloc entre dos bases específiques i que la química d'aquest tall és característica de la ribonucleasa P. Els resultats de la inhibició competitiva i immunoprecipitació (mètodes indirectes) revelen que el pre-tRNA inhibeix en un 50% l'RNA del VHC en una relació molar 1:1 i que un sèrum que conté anticossos anti-Th elimina l'activitat de tall del sobrenadant per trobar-la a l'immunoprecipitat.

Com que el sistema de reconeixement del substrat és via estructural i no seqüència dependent (Altman, 1989; Altman, 1995; Jarrous i Altman, 2001), la sensibilitat a la ribonucleasa P és un fort indicador de que el virus conté estructures similars al substrat natural, és a dir tipus tRNA. La ribonucleasa P talla l'RNA viral per dues posicions específiques, entre els nucleòtids 361-363 i 2861-2862. Es proposa doncs que el virus presenta dues estructures similars al tRNA, una dins de la regió d'entrada al ribosoma (IRES) i l'altre a una regió interna, just entre la regió estructural i no estructural. Els resultats de competició inversa que s'han utilitzat per definir el mimetisme de tRNA a l'article II i on s'observa que l'RNA viral competeix amb el substrat natural i inhibeix el processament natural de la ribonucleasa P confirmen l'existència d'aquestes estructures i donen una idea de la seva semblança amb el tRNA.

S'han trobat a més altres evidències que justifiquen l'existència d'aquestes estructures tipus tRNA. Els resultats que s'han obtingut de l'aplicació d'un model de predicció d'estructura secundària a la zona on es localitza el tall intern confirmen que l'estructura compleix els requeriments característics del que s'ha descrit com a substrat mínim de la ribonucleasa P (Yuan i Altman, 1995). Pel que fa el tall situat a l'entrada interna al ribosoma, està molt a prop d'una estructura terciària de l'IRES que s'anomena *pseudoknot* (Wang *et al.*, 1995), la qual es considera un element comú de les estructures tipus tRNA (Mans *et al.*, 1990).

Ja s'ha comentat a la introducció que l'antigen La és un dels factors responsables de la regulació de la maduració dels precursors de tRNA ja que s'uneix als pre-tRNAs i bloqueja l'activitat de la RNasa P humana. A més, també s'ha descrit que aquest antigen s'uneix a l'element IRES del VHC, molt a prop del codó AUG estimulando l'inici de la traducció (Ali *et al.*, 2000). De fet, es creu que el domini RNA de l'antigen La s'uneix a l'estructura que envolta el codó AUG, inclòs el *pseudoknot* (Ali i Siddiqui, 1997; Pudi *et al.*, 2003). Com que l'antigen La reconeix els precursors de tRNA i en el cas de l'IRES s'uneix molt a prop del codó d'inici de la traducció, just on es proposa l'estructura tipus tRNA, creiem que aquest podria ser un altre argument a favor de la presència d'aquestes estructures.

El virus de l'hepatitis C, però, es caracteritza per ser molt variable i en canvi tots els assajos es van dur a terme sobre una única seqüència viral. Si bé una d'aquestes estructures tipus tRNA s'ha descrit a la regió més conservada del genoma, l'IRES, l'altre s'ha localitzat en una regió variable, la regió E2/NS2. Amb la finalitat d'estudiar com podia influir aquesta variació en l'eficiència de tall de la ribonucleasa P es varen analitzar diverses seqüències mutants. Els resultats indiquen que la sensibilitat a la RNasa P és un propietat general del VHC o dit d'una altra manera,

que aquestes dues estructures tipus tRNA són característiques del genotip 1b del VHC.

D'altra banda, derivat dels assajos amb el substrat natural es conclou que l'etanol o el metanol no modifiquen l'activitat de la ribonucleasa P humana ja que la RNasa P talla amb la mateixa eficiència el pre-tRNA en absència i presència d'alcohol. En canvi, la ribonucleasa P reconeix i talla de manera més eficient les estructures tipus tRNA en presència d'aquests solvents. Creiem que aquesta diferència de comportament es pot interpretar com un increment de la semblança d'aquestes estructures cap al substrat natural i que per tant aquest tipus d'ambient més hidrofòbic estimula el mimetisme de tRNA, degut potser, a que s'afavoreixen interaccions que en un ambient més polar es repel·lien.

Funció biològica de les estructures tipus tRNA

Dins la dinàmica de la quasiespècie viral es generen seqüències noves constantment que estan sotmeses a fortes pressions selectives. La contínua selecció de seqüències que contenen aquestes estructures sensibles a la RNasa P fa pensar que no només hi són presents sinó que són essencials per la biologia del virus. No obstant, no s'ha demostrat ni la presència de l'RNA del virus de l'hepatitis C en el nucli (Bartenschlager i Lohmann, 2000), que és on es localitza la major part de ribonucleasa P, ni la presència d'RNAs subgenòmics en el citoplasma (Moradpour *et al.*, 1998), descartant així una possible participació de la ribonucleasa P en el cicle de replicació del virus. Amb la finalitat, però, d'aconseguir més evidències per confirmar o descartar aquesta participació es varen realitzar uns assajos en col·laboració amb el grup de la Dra. Encarnación Martínez-Salas del Centre de Biologia Molecular Severo Ochoa de Madrid.

Es va utilitzar un sistema de cultius cel·lulars i vectors bicistrònics (Lopez de Qinto i Martínez-Salas, 1998; Martínez-Salas, 1999) on es va encaixar entre els dos cistrons, d'activitat fàcilment quantificable, el fragment del genoma del VHC sensible a la RNasa P humana. Es varen dissenyar dos tipus de vectors, uns dirigits al nucli i els altres al citoplasma i es va avaluar l'activitat dels dos cistrons en vectors amb i sense insert. A més també es va dur a terme una extracció d'RNA per analitzar mitjançant la tècnica de transferència de Northern i hibridació amb sonda radioactiva la presència/absència d'RNA tallat. Els resultats apunten a què la ribonucleasa P no participa activament en el cicle biològic del virus ja que el nivell d'expressió dels dos gens marcadors o cistrons és el mateix independentment de si els vectors

transfectats tenen o no insert. No es va detectar tampoc mitjançant la transferència de Northern RNA tallat (comunicació personal de la Dra. Maria Piron).

Si bé es pot descartar que la ribonucleasa P humana talli el genoma del VHC *in vivo*, no es pot assignar encara una funció a les estructures tipus tRNA. Creiem però que la seva presència podria permetre al genoma interaccionar amb factors cel·lulars que intervenen en la biologia del tRNA, particularment en el cas de l'estructura tipus tRNA que es localitza a l'element IRES. El tall observat en aquesta zona està molt a prop del codó AUG d'inici de la traducció i segons un estudi publicat l'any 2001 on es van caracteritzar els motius estructurals de l'IRES del virus de l'hepatitis C que s'unien al ribosoma 80S, la seqüència que comprèn des del codó AUG (nt 342-344) fins la posició 374 està protegida per el ribosoma quan el complex es tracta amb la ribonucleasa T1 i la ribonucleasa pancreàtica A (Lytle *et al.*, 2001). La ribonucleasa P humana talla entre les posicions 361-363 per tant és molt probable que l'estructura tipus tRNA interaccioni amb alguna de les subunitats del ribosoma. Aquests resultats juntament amb el fet que l'estructura és similar al tRNA apunten a una possible participació d'aquesta estructura en el mecanisme de traducció de l'RNA viral. De fet, molt dels factors cel·lulars relacionats amb la traducció mimetitzen la forma del tRNA (Ramakrishnan, 2002). A més, el fet que en presència d'etanol i metanol l'estructura possiblement s'assembli més al tRNA fa pensar que, si es donés una interacció amb el ribosoma, s'afavoriria més l'estructura tipus tRNA.

Continuant en aquesta línia d'investigació, Hugh Robertson i col·laboradors han publicat recentment un article (Lyons i Robertson, 2003) on es proposa que l'estructura tipus tRNA de l'IRES no seria exclusiva del genoma del virus de l'hepatitis C sinó que podria ser una propietat comuna de tots els elements IRES. Utilitzant la sensibilitat a la ribonucleasa P per identificar mimetisme de tRNA, van assajar IRES de diferents virus, relacionats i no relacionats amb el VHC. Els resultats són interessants ja que tots els IRES són processats *in vitro* per la ribonucleasa P humana i en tres d'ells la posició de tall també es localitza molt a prop del codó AUG. D'altra banda, en el cas de que aquesta estructura tipus tRNA es definís com a una característica general i essencial per a l'inici de la traducció seria la primera vegada que es descriu un motiu estructural i funcional comú en tots els IRES.

Pel que fa l'estructura tipus tRNA descrita just a l'inici de la regió no estructural no sembla que hi hagi, si més no de moment, una explicació funcional òbvia. No deixa de ser interessant, però, que aquesta estructura es situï entre dos locus tan diferents del genoma com són la codificació de proteïnes estructurals o no estructurals. De fet, es va considerar la possibilitat que aquesta estructura interaccionés també amb el ribosoma o que formés part d'una segon element IRES

amb la finalitat d'obtenir, per part del virus, més quantitat de proteïnes no estructurals que estructurals. No obstant, els resultats dels assajos de transfecció en cèl·lules que es van realitzar en col·laboració amb la Dra. Encarnación Martínez-Salas descarten de moment aquesta interacció amb el ribosoma.

Les estructures tipus tRNA: futures dianes terapèutiques

Independentment, però, de la funció que tinguin aquestes estructures en el cicle vital del virus, la similitud amb el tRNA les converteix en noves dianes terapèutiques. Per tant, creiem que seria convenient replantejar l'estratègia terapèutica inicial per dues raons. La primera perquè el genoma del virus ja té dues estructures similars al tRNA i d'aquesta manera no seria necessari crear-les mitjançant seqüències guia externes, per convertir el genoma del VHC en una diana específica que sigui reconeguda per la ribonucleasa P. La segona perquè els assajos en cultiu descarten la possibilitat que la ribonucleasa P humana tingui un paper essencial en el cicle de replicació del virus, però també la probabilitat que la interacció amb l'RNA viral descrita *in vitro* es produeixi *in vivo*. Davant d'aquestes evidències creiem que ens hem de qüestionar si la teràpia amb ribonucleasa P endògena és viable, i ens ho hem de plantejar independentment de si s'utilitza combinada amb seqüències guia externes o directament contra les estructures tipus tRNA.

Malgrat tot, l'RNA del VHC continua essent susceptible a l'atac amb ribonucleasa P, tot i descartar la teràpia amb RNasa P endògena. Els candidats sobre els quals s'està treballant actualment al laboratori amb l'objectiu de trobar una eina terapèutica capaç de reconèixer les estructures tipus tRNA que conté el genoma del VHC i tallar l'RNA per una posició específica són l'RNA M1 i el component RNA de la RNasa P del cianobacteri *Synechocystis* sp. PCC6803 (cedit per el Dr. Agustín Vioque de la Universitat de Sevilla-CSIC). La diferència principal entre aquests dos ribozims rau en el reconeixement del substrat. Si bé s'ha descrit com a imprescindible en el cas del ribozim M1 que l'RNA diana contingui la seqüència -CCA 3' terminal característica del pre-tRNA bacterians (Guerrier-Takada i Altman, 1984), s'ha vist que el component RNA de la RNasa P de cianobacteris processa millor els pre-tRNAs quan no conté aquesta seqüència (Pascual i Vioque, 1999). La diferència és important ja que les estructures tipus tRNA descrites al genoma del VHC no tenen la seqüència -CCA.

Els primers assajos *in vitro* s'han realitzat utilitzant com a substrat un fragment de l'RNA del virus que inclou l'IRES. Els resultats mostren que tot i treballar a les condicions òptimes (el substrat natural és processat amb una eficiència del 90%), el

ribozim d'*E.coli* no talla l'RNA viral (Figura 23). En canvi, la subunitat RNA catalítica de la RNasa P de *Synechocystis* sí que és capaç de tallar l'RNA (Figura 23). Davant d'aquesta evidència es va considerar interessant veure si el ribozim tallava el genoma del virus per la mateixa posició que la RNasa P humana. S'ha vist que si bé el tall també es localitza molt a prop del codó AUG, no es situa exactament entre els mateixos nucleòtids, fet que suggereix alguna diferència en el sistema de reconeixement (Sabariegos *et al.*, en preparació).

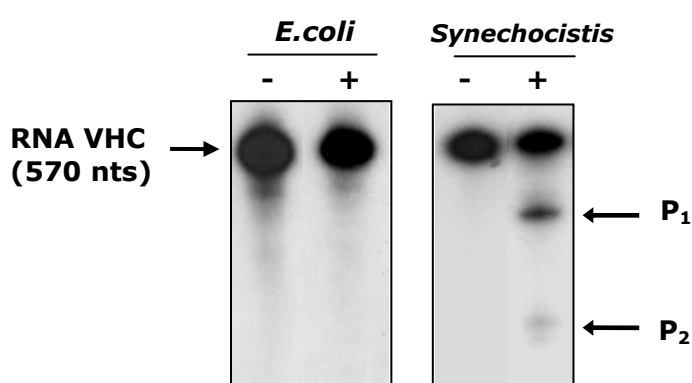


Figura 23. Assaig sobre un transcrit que inclou la regió IRES del VHC utilitzant les subunitats catalítiques d'RNA de la RNasa P d'*E.coli* i de *Synechocystis* sp. PCC6803. El resultat s'ha analitzat en un gel de poliacrilamida desnaturalitzant al 8% i visualitzat en un film d'autoradiografia. P₁ i P₂ corresponen a les bandes derivades del tall produït per la subunitat RNA de la RNasa P de *Synechocystis*. Els símbols -, + indiquen absència i presència de ribozim respectivament.

Si bé creiem que s'hauria de determinar exactament la posició de tall, analitzar si el ribozim reconeix i talla l'estructura tipus tRNA de la regió NS2 així com les diferents seqüències mutants i millorar el tant per cent de tall, pensem que aquest ribozim es pot convertir en una futura eina terapèutica per combatre la infecció per virus de l'hepatitis C.

No obstant, tot i que el genoma del virus contingui estructures tipus tRNA i aquestes es proposin com a noves dianes terapèutiques no s'ha de descartar la teràpia amb ribozims M1GS. S'ha vist que en general les estructures d'RNA, siguin o no d'RNAs virals, estan relacionades amb funcions importants (Rajagopalan i Malter, 1997; Gray i Wickens, 1998; Bashirullah *et al.*, 1998) que impliquen interaccions amb factors cel·lulars. Tal i com s'ha comentat anteriorment, el fet que les estructures tipus tRNA siguin una característica del genoma del virus podria ser un indicador que tenen alguna funció important però també, per el que s'acaba de dir, que

probablement no estaran sempre accessibles dins les cèl·lules degut a interaccions amb proteïnes i sobretot, en el cas de l'estructura descrita a l'IRES, amb el ribosoma i l'antigen La.

Si això fos així, es podria pensar en un atac múltiple de ribozims M1GSs dirigits contra la zona accessible combinats amb el component RNA de la RNasa P de *Synechocystis*. De fet, segurament a causa de la naturalesa variable del virus, el millors resultats contra la infecció de VHC sempre s'han vist en tractaments combinats, com per exemple el d'interferó amb ribavirina (McHutchison *et al.*, 1998; Poynard *et al.*, 1998) o interferó amb ribozim *hammerhead* (Macejak *et al.*, 2001).

VI. CONCLUSIONS

VI. CONCLUSIONS

1. De l'estudi d'accessibilitat realitzat en un fragment dins la regió NS2 del genoma del VHC utilitzant el model de ribonucleasa H i oligonucleòtids antisentit es conclou que:
 - 1.a. La zona que es localitza entre les posicions 2724-2766 és la més accessible i es proposa doncs com a la més idònia per a dirigir-hi un ribozim.
 - 1.b. La zona entre els nucleòtids 2848-2866 és la menys accessible i s'hi dedueix una estructura local estable.
2. És possible dirigir la ribonucleasa P humana combinada amb seqüència guia externa o el ribozim M1GS cap a la zona accessible amb l'objectiu de tallar, *in vitro*, l'RNA del virus de l'hepatitis C.
3. De l'estudi d'accessibilitat i l'anàlisi de mutacions es dedueix que aquesta regió interna del genoma és variable i d'accessibilitat limitada. L'estratègia terapèutica requeriria un atac simultani de diverses dianes.
4. És vàlid utilitzar el model d'oligonucleòtids antisentit i ribonucleasa H per a determinar el grau d'accessibilitat d'un RNA amb la finalitat de definir una zona adequada per a dirigir-hi la ribonucleasa P humana combinada amb seqüència guia externa o el ribozim M1GS.

5. La ribonucleasa P humana reconeix i talla específicament el genoma del VHC en absència de seqüències guia externes. S'han descrit dues posicions de tall: a la regió IRES entre els nucleòtids 361-363, prop del codó AUG d'inici de la traducció i a la regió NS2 entre els nucleòtids 2861-2862, prop de la zona d'unió entre la regió estructural i no estructural.
6. L'accessibilitat a la ribonucleasa P i el resultat de les competicions inverses indiquen que l'estructura de les zones de tall és similar al tRNA. El fet que les estructures es mantinguin tot i l'elevada taxa de mutació de l'RNA viral evidencia la seva importància en el genoma del virus.
7. L'accessibilitat a la ribonucleasa P es pot definir com una propietat del genoma del VHC en el genotip 1b.
8. L'RNA del VHC es pot descriure com a un substrat natural nou, *in vitro*, per a la ribonucleasa P, a més a més del pre-tRNA i del pre-rRNA, tot i que els assajos en cultiu utilitzant vectors bicistrònics descarten la interacció i el tall *in vivo*.
9. L'etanol o el metanol no modifiquen l'activitat de la ribonucleasa P humana. En canvi, la ribonucleasa P reconeix i talla de manera més eficient les estructures tipus tRNA en presència d'aquests solvents.
10. Independentment de la funció que portin a terme les estructures tipus tRNA en el genoma del virus es proposen com a noves dianes per a la teràpia amb ribonucleasa P. Els assajos preliminars *in vitro* amb diferents ribonucleases P procariotes, revelen que el component RNA de la ribonucleasa P de *Synechocystis* sp. PCC6803 pot ser un bon candidat.

VII. BIBLIOGRAFIA

VII. BIBLIOGRAFIA

- Agnello V, Abel G, Knight GB i Muchmore E.** (1998). Detection of widespread hepatocyte infection in chronic hepatitis C. *Hepatology* **28**, 573-584.
- Ahlquist P, Dasgupta R i Kaesberg P.** (1981). Near identity of 3- RNA secondary structure in bromoviruses and cucumber mosaic virus. *Cell* **23**, 183-189.
- Aizaki H, Nagamori S, Matsuda M, Kawakami H, Hashimoto O, Ishiko H, Kawada M, Matsuura T, Hasumura S, Matsuura Y, Suzuki T i Miyamura T.** (2003). Production and release of infectious hepatitis C virus from human liver cell cultures in the three-dimensional radial-flow bioreactor. *Virology* **314**, 16-25.
- Albuquerque-Silva J, Milican F, Bollen A i Houard S.** (1999). Ribozyme-mediated decrease in mumps virus nucleocapsid mRNA level and progeny in infected vero cells. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **9**, 279-288.
- Ali N, Pruijn GJ, Kenan DJ, Keene JD i Siddiqui A.** (2000). Human La antigen is required for the hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation. *J.Biol.Chem.* **275**, 27531-27540.
- Ali N i Siddiqui A.** (1995). Interaction of polypyrimidine tract-binding protein with the 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA genome and its functional requirement in internal initiation of translation. *J Virol* **69**, 6367-6375.
- Ali N i Siddiqui A.** (1997). The La antigen binds 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA in the context of the initiator AUG codon and stimulates internal ribosome entry site-mediated translation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **94**, 2249-2254.
- Alifano P, Rivellini F, Piscitelli C, Arraiano CM, Bruni CB i Carlomagno MS.** (1994). Ribonuclease E provides substrates for ribonuclease P-dependent processing of a polycistronic mRNA. *Genes Dev.* **8**, 3021-3031.
- Altman S.** (1975). Biosynthesis of transfer RNA in Escherichia coli. *Cell* **4**, 21-29.
- Altman S.** (1989). Ribonuclease P: an enzyme with a catalytic RNA subunit. *Adv.Enzymol.Relat Areas Mol.Biol.* **62**, 1-36.
- Altman S.** (1995). RNase P in research and therapy. *Biotechnology (N.Y.)* **13**, 327-329.
- Altman S i Kirsebom L.A.** (1999). The RNA world. Gesteland RF i Atkins JF. 351-380. Cold Spring Harbour Lab Press Plainview, CSH, NY.

- Alvarez-Salas LM, Cullinan AE, Siwkowski A, Hampel A i DiPaolo JA.** (1998). Inhibition of HPV-16 E6/E7 immortalization of normal keratinocytes by hairpin ribozymes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **95**, 1189-1194.
- Amarzguioui M, Brede G, Babaie E, Grotli M, Sproat B i Prydz H.** (2000). Secondary structure prediction and in vitro accessibility of mRNA as tools in the selection of target sites for ribozymes. *Nucleic Acids Res.* **28**, 4113-4124.
- Ame JC, Schreiber V, Fraulob V, Dolle P, de Murcia G i Niedergang CP.** (2001). A bidirectional promoter connects the poly(ADP-ribose) polymerase 2 (PARP-2) gene to the gene for RNase P RNA. structure and expression of the mouse PARP-2 gene. *J.Biol.Chem.* **276**, 11092-11099.
- Ames BN, Tsang TH, Buck M i Christman MF.** (1983). The leader mRNA of the histidine attenuator region resembles tRNA^{His}: possible general regulatory implications. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **80**, 5240-5242.
- Ban N, Nissen P, Hansen J, Moore PB i Steitz TA.** (2000). The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *science* **289**, 905-920.
- Barends S, Bink H, van den Worm S, Pleij CW i Kraal B.** (2003). Entrapping Ribosomes for Viral Translation: tRNA Mimicry as a Trojan Horse. *Cell* **112**, 123-129.
- Bartenschlager R i Lohmann V.** (2000). Replication of hepatitis C virus. *J Gen.Virol* **81**, 1631-1648.
- Bartkiewicz M, Gold H i Altman S.** (1989). Identification and characterization of an RNA molecule that copurifies with RNase P activity from HeLa cells. *Genes Dev.* **3**, 488-499.
- Bashirullah A, Cooperstock RL i Lipshitz HD.** (1998). RNA localization in development. *Annu.Rev.Biochem.* **67**, 335-394.
- Baumstark T i Ahlquist P.** (2001). The brome mosaic virus RNA3 intergenic replication enhancer folds to mimic a tRNA^{TpsiC}-stem loop and is modified in vivo. *RNA* **11**, 1652-1670.
- Beebe JA, Kurz JC i Fierke CA.** (1996). Magnesium ions are required by *Bacillus subtilis* ribonuclease P RNA for both binding and cleaving precursor tRNA^{Asp}. *Biochemistry* **35**, 10493-10505.
- Belsham GJ i Sonenberg N.** (1996). RNA-protein interactions in regulation of picornavirus RNA translation. *Microbiol.Rev.* **60**, 499-511.
- Bennett JL, Jeong-Yu S i Clayton DA.** (1992). Characterization of a *Xenopus laevis* ribonucleoprotein endoribonuclease. Isolation of the RNA component and its expression during development. *J.Biol.Chem.* **267**, 21765-21772.
- Bernstein J, Shefler I i Elroy-Stein O.** (1995). The translational repression mediated by the platelet-derived growth factor 2/c-sis mRNA leader is relieved during megakaryocytic differentiation. *J.Biol.Chem.* **270**, 10559-10565.
- Bertrand E, Pictet R i Grange T.** (1994). Can hammerhead ribozymes be efficient tools to inactivate gene function? *Nucleic Acids Res.* **22**, 293-300.
- Birikh KR, Berlin YA, Soreq H i Eckstein F.** (1997). Probing accessible sites for ribozymes on human acetylcholinesterase RNA. *RNA.* **3**, 429-437.
- Biswas R, Ledman DW, Fox RO, Altman S i Gopalan V.** (2000). Mapping RNA-protein interactions in ribonuclease P from *Escherichia coli* using disulfide-linked EDTA-Fe. *J.Mol.Biol.* **296**, 19-31.
- Bothwell AL, Garber RL i Altman S.** (1976). Nucleotide sequence and in vitro processing of a precursor molecule to *Escherichia coli* 4.5 S RNA. *J.Biol.Chem.* **251**, 7709-7716.
- Bourgaize DB i Fournier MJ.** (1987). Initiation of translation is impaired in *E. coli* cells deficient in 4.5S RNA. *Nature* **325**, 281-284.
- Branch AD.** (1998). A good antisense molecule is hard to find. *Trends Biochem.Sci.* **23**, 45-50.

- Branch AD i Robertson HD.** (1991). Efficient trans cleavage and a common structural motif for the ribozymes of the human hepatitis delta agent. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **88**, 10163-10167.
- Brodersen DE i Ramakrishnan V.** (2003). Shape can be seductive. *Nature Structural Biology* **10**, 78-80.
- Brown EA, Zhang H, Ping LH i Lemon SM.** (1992). Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs. *Nucleic.Acids.Res.* **20**, 5041-5045.
- Brown GG, Gadaleta G, Pepe G, Saccone C i Sbisa E.** (1986). Structural conservation and variation in the D-loop-containing region of vertebrate mitochondrial DNA. *J Mol Biol* **192**, 503-511.
- Brown JW.** (1999). The Ribonuclease P Database. *Nucleic Acids Res.* **27**, 314.
- Brown JW, Hunt DA i Pace NR.** (1990). *Nucleic Acids Res.* **18**, 2820.
- Brunel C i Romby P.** (2000). Probing RNA structure and RNA-ligand complexes with chemical probes. *Methods Enzymol.* **318**, 3-21.
- Bukh J, Miller RH i Purcell RH.** (1995). Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin.Liver Dis.* **15**, 41-63.
- Cabot B, Esteban JI, Martell M, Genesca J, Vargas V, Esteban R, Guardia J i Gomez J.** (1997). Structure of replicating hepatitis C virus (HCV) quasispecies in the liver may not be reflected by analysis of circulating HCV virions. *J.Virol.* **71**, 1732-1734.
- Cabot B, Martell M, Esteban JI, Sauleda S, Otero T, Esteban R, Guardia J i Gomez J.** (2000). Nucleotide and aminoacid complexity of hepatitis C virus quasispecies in serum and liver. *J.Virol.* **74**, 805-811.
- Campbell TB, McDonald CK i Hagen M.** (1997). The effect of structure in a long target RNA on ribozyme cleavage efficiency. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4985-4993.
- Carrara G, Calandra P, Fruscoloni P i Tocchini-Valentini GP.** (1995). Two helices plus a linker: a small model substrate for eukaryotic RNase P. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**, 2627-2631.
- Carter MS, Kuhn KM i Sarnow P.** (2000). Sonenberg N, Hershey JWB i Mathews MB. Translational control of gene expression. 615-635. Cold Spring Harbour Press, Cold Spring Harbour Laboratory.
- Cate JH, Yusupov MM, Yusupova GZ, Earnest TN i Noller HF.** (1999). X-ray Crystal Structures of 70S Ribosome Functional Complexes. *science* **285**, 2095-2104.
- Cech TR, Zaugg AJ i Grabowski PJ.** (1981). In vitro splicing of the ribosomal RNA precursor of Tetrahymena: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. *Cell* **27**, 487-496.
- Chamberlain JR, Lee Y, Lane WS i Engelke DR.** (1998). Purification and characterization of the nuclear RNase P holoenzyme complex reveals extensive subunit overlap with RNase MRP. *Genes Dev.* **12**, 1678-1690.
- Chamberlain JR, Pagàn-Ramos L, Kindelberger DW i Engelke DR.** (1996). An RNase P RNA subunit mutation affects ribosomal RNA processing. *Nucleic Acids Res.* **24**, 3158-3166.
- Chang DD i Clayton DA.** (1989). Mouse RNAase MRP RNA is encoded by a nuclear gene and contains a decamer sequence complementary to a conserved region of mitochondrial RNA substrate. *Cell* **56**, 131-139.
- Chen CJ, Banerjee AC, Harmison GG, Haglund K i Schubert M.** (1992). Multitarget-ribozyme directed to cleave at up to nine highly conserved HIV-1 env RNA regions inhibits HIV-1 replication-potential effectiveness against most presently sequenced Hiv-1 isolates. *Nucleic Acids Res.* **20**, 4581-4589.

- Chen D i Huang S.** (2001). Nucleolar components involved in ribosome biogenesis cycle between the nucleolus and nucleoplasm in interphase cells. *J.Cell Biol.* **153**, 169-176.
- Chen JL i Pace NR.** (1997). Identification of the universally conserved core of ribonuclease P RNA. *RNA.* **3**, 557-560.
- Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW i Houghton M.** (1989). Isolation of cDNA clone derived from a blood-borne non A non B viral hepatitis genome. *Science.* **244**, 359-362.
- Christian EL, Zahler NH, Kaye NM i Harris ME.** (2002). Analysis of substrate recognition by the ribonucleoprotein endonuclease RNase P. *Methods* **28**, 307-322.
- Chu S, Archer RH, Zengel JM i Lindahl L.** (1994). The RNA of RNase MRP is required for normal processing of ribosomal RNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, 659-663.
- Clayton DA.** (1994). A nuclear function for RNase MRP. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, 4615-4617.
- Cobaleda C i Sanchez-Garcia I.** (2000). In vivo inhibition by a site-specific catalytic RNA subunit of RNase P designed against the BCR-ABL oncogenic products: a novel approach for cancer treatment. *Blood* **95**, 731-737.
- Cohen J.** (1999). The scientific challenge of hepatitis C. *science* **285**, 26-30.
- Crary SM, Niranjanakumari S i Fierke CA.** (1998). The protein component of Bacillus subtilis ribonuclease P increases catalytic efficiency by enhancing interactions with the 5' leader sequence of pre-tRNA^{Asp}. *Biochemistry* **37**, 9409-9416.
- Crisell P, Thompson S i James W.** (1993). Inhibition of HIV-1 replication by ribozymes that show poor activity in vitro. *Nucleic Acids Res.* **21**, 5251-5255.
- Crooke ST, Lemonidis KM, Neilson L, Griffey R, Lesnik EA i Monia BP.** (1995). Kinetic characteristics of Escherichia coli RNase H1: cleavage of various antisense oligonucleotide-RNA duplexes. *Biochem.J.* **312 (Pt 2)**, 599-608.
- Dardel F, Panvert M i Fayat G.** (1990). Transcription and regulation of expression of the Escherichia coli methionyl-tRNA synthetase gene. *Mol.Gen.Genet.* **223**, 121-133.
- Daros JA, Marcos JF, Hernández C i Flores R.** (1994). Replication of avocado sunblotch viroid: evidence for a symmetric pathway with two rolling circles and hammerhead processing. *Proc Natl Acad.Sci.U.S.A* **96**, 12813-12817.
- Darr SC, Brown JW i Pace NR.** (1992). The varieties of ribonuclease P. *Trends Biochem.Sci.* **17**, 178-182.
- De Young MB, Kincade-Denker J, Boehm CA, Riek RP, Mamone JA, McSwiggen JA i Graham RM.** (1994). Functional characterization of ribozymes expressed using U1 and T7 vectors for the intracellular cleavage of ANF mRNA. *Biochemistry* **33**, 12127-12138.
- Doersen CJ, Guerrier-Takada C, Altman S i Attardi G.** (1985). Characterization of an RNase P activity from HeLa cell mitochondria. Comparison with the cytosol RNase P activity. *J.Biol.Chem.* **260**, 5942-5949.
- Doktycz MJ, Larimer FW, Pastrnak M i Stevens A.** (1998). Comparative analyses of the secondary structures of synthetic and intracellular yeast MFA2 mRNAs. *Proc Natl Acad.Sci.U.S.A* **95**, 14614-14621.
- Domingo E, Flavell RA i Weissmann C.** (1976). In vitro site-directed mutagenesis: generation and properties of an infectious extracistronic mutant of bacteriophage Qbeta. *Gene* **1**, 3-25.
- Domingo E, Sabo D, Taniguchi T i Weissmann C.** (1978). Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population. *Cell* **13**, 735-744.

- Dropulic B i Jeang KT.** (1994). Intracellular susceptibility to ribozymes in a tethered substrate-ribozyme provirus model is not predicted by secondary structures of human immunodeficiency virus type 1 RNAs in vitro. *Antisense Res.Dev.* **4**, 217-221.
- Dunn W, Trang P, Khan U, Zhu J i Liu F.** (2001). RNase P-mediated inhibition of cytomegalovirus protease expression and viral DNA encapsidation by oligonucleotide external guide sequences. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**, 14831-14836.
- Ecker DJ, Vickers TA, Bruce TW, Freier SM, Jenison RD, Manoharan M i Zounes M.** (1992). Pseudo--half-knot formation with RNA. *science* **257**, 958-961.
- Eckstein F.** (1997). Exogenous application of ribozymes for inhibiting gene expression. *Ciba Found.Symp.* **209**, 207-212.
- Eckstein F i Lilley DMJ.** (1996). *Nucleic Acids and Molecular Biology.* Springer, Berlin.
- Eder PS, Kekuda R, Stolc V i Altman S.** (1997). Characterization of two scleroderma autoimmune antigens that copurify with human ribonuclease P. *Proc Natl Acad.Sci.U.S.A* **94**, 1101-1106.
- Ehresmann C, Baudin F, Mougel M, Romby P, Ebel JP i Ehresmann B.** (1987). Probing the structure of RNAs in solution. *Nucleic Acids Res.* **15**, 9109-9128.
- Eigen M.** (1971). Self organization of matter and the evolution of biological macromolecules. *Naturwissenschaften* **58**, 465-523.
- Eigen M i Schuster P.** (1979). *The hypercycle. A principle of natural self-organization.* Springer-Verlag. Berlin.
- Endo Y, Miyano-Kurosaki N, Kitano M, Habu Y i Takaku H.** (2001). Effective inhibition of HIV-1 replication in cultured cells by external guide sequences and ribonuclease. *Nucleic Acids Res.Suppl* , 213-214.
- Esteban JI, Gonzalez A, Hernandez JM, Viladomiu L, Sanchez C, Lopez-Talavera JC, Lucea D, Martin-Vega C, Vidal X i Esteban R.** (1990). Evaluation of antibodies to hepatitis C virus in a study of transfusion- associated hepatitis. *N.Engl.J.Med.* **323**, 1107-1112.
- Fan H, Goodier JL, Chamberlain JR, Engelke DR i Maraia RJ.** (1998). 5' processing of tRNA precursors can Be modulated by the human La antigen phosphoprotein. *Mol Cell Biol.* **18**, 3201-3211.
- Felden B, Florentz C, McPherson A i Giege R.** (1994). A histidine accepting tRNA-like fold at the 3'-end of satellite tobacco mosaic virus RNA. *Nucleic Acids Res.* **22**, 2882-2886.
- Forster AC i Altman S.** (1990). Similar cage-shaped structures for the RNA components of all ribonuclease P and ribonuclease MRP enzymes. *Cell* **62**, 407-409.
- Forster AC i Symons RH.** (1987). Self-cleavage of virusoid RNA is performed by the proposed 55-nucleotide active site. *Cell* **50**, 9-16.
- Frank DN, Adamidi C, Ehringer MA, Pitulle C i Pace NR.** (2000). Phylogenetic-comparative analysis of the eukaryal ribonuclease P RNA. *RNA.* **6**, 1895-1904.
- Frank DN, Harris ME i Pace NR.** (1994). Rational design of self-cleaving pre-tRNA-ribonuclease P RNA conjugates. *Biochemistry* **33**, 10800-10808.
- Frank DN i Pace NR.** (1998). Ribonuclease P: unity and diversity in a tRNA processing ribozyme. *Annu.Rev.Biochem.* **67**, 153-180.
- Fukushi S, Katayama K, Kurihara C, Ishiyama N, Hoshino FB, Ando T i Oya A.** (1994). Complete 5' noncoding region is necessary for the efficient internal initiation of hepatitis C virus RNA. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **199**, 425-432.
- Gardiner KJ, Marsh TL i Pace NR.** (1985). Ion dependence of the Bacillus subtilis RNase P reaction. *J.Biol.Chem.* **260**, 5415-5419.

- Gegenheimer P.** (1995). Structure, mechanism and evolution of chloroplast transfer RNA processing systems. *Mol.Biol.Rep.* **22**, 147-150.
- Giordano V, Jin DY, Rekosh D i Jeang KT.** (2000). Intravirion targeting of a functional anti-human immunodeficiency virus ribozyme directed to pol. *Virology* **267**, 174-184.
- Gold HA, Craft J, Hardin JA, Bartkiewicz M i Altman S.** (1988). Antibodies in human serum that precipitate ribonuclease P. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **85**, 5483-5487.
- Gold HA, Topper JN, Clayton DA i Craft J.** (1989). The RNA processing enzyme RNase MRP is identical to the Th RNP and related to RNase P. *science* **245**, 1377-1380.
- Gómez J, Nadal A, Sabariego R, Beguiristain N, Martell M i Piron M.** (2003). Three properties of the hepatitis C virus RNA genome related to antiviral strategies based on RNA-therapeutics : variability, structural conformation an tRNA mimicry. *Curr. Pharma. Design.* (En premsa).
- Grakoui A, McCourt DW, Wychowski C, Feinstone SM i Rice CM.** (1993). Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase: determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites. *J.Virol.* **67**, 2832-2843.
- Gray NK i Wickens M.** (1998). Control of translation initiation in animals. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* **14**, 399-458.
- Green CJ i Vold BS.** (1988). Structural requirements for processing of synthetic tRNAHis precursors by the catalytic RNA component of RNase P. *J.Biol.Chem.* **263**, 652-657.
- Gubler U.** (1987). Second-strand cDNA synthesis: classical method. *Methods Enzymol.* **152**, 325-329.
- Guerrier-Takada C i Altman S.** (1984). Catalytic activity of an RNA molecule prepared by transcription in vitro. *science* **223**, 285-286.
- Guerrier-Takada C, Eder PS, Gopalan V i Altman S.** (2002). Purification and characterization of Rpp25, an RNA-binding protein subunit of human ribonuclease P. *RNA.* **8**, 290-295.
- Guerrier-Takada C, Gardiner K, Marsh T, Pace N i Altman S.** (1983). The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* **35**, 849-857.
- Guerrier-Takada C, Haydock K, Allen L i Altman S.** (1986). Metal ion requirements and other aspects of the reaction catalyzed by M1 RNA, the RNA subunit of ribonuclease P from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **25**, 1509-1515.
- Guerrier-Takada C, Li Y i Altman S.** (1995). Artificial regulation of gene expression in *Escherichia coli* by RNase P. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**, 11115-11119.
- Guerrier-Takada C, Salavati R i Altman S.** (1997). Phenotypic conversion of drug-resistant bacteria to drug sensitivity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**, 8468-8472.
- Guerrier-Takada C, van Belkum A, Pleij CW i Altman S.** (1988). Novel reactions of RNAase P with a tRNA-like structure in turnip yellow mosaic virus RNA. *Cell* **53**, 267-272.
- Haenni AL, Joshi S i Chapeville F.** (1982). tRNA-like structures in the genomes of RNA viruses. *Prog.Nucleic Acid Res.Mol Biol.* **27**, 85-104.
- Hall TC.** (1979). Transfer RNA-like structures in viral genomes. *Int.Rev.Cytol.* **60**, 1-26.
- Hampel A i Tritz R.** (1989). RNA catalytic properties of the minimum (-)STRSV sequence. *Biochemistry* **28**, 4929-4933.
- Han JH, Shyamala V, Richman KH, Brauer MJ, Irvine B, Urdea MS, Tekamp-Olson P, Kuo G, Choo QL i Houghton M.** (1991). Characterization of the terminal regions of hepatitis C viral RNA: identification of conserved sequences in the 5' untranslated region and poly(A) tails at the 3' end. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **88**, 1711-1715.

- Hanna M i Szostak JW.** (1994). Suppression of mutations in the core of the Tetrahymena ribozyme by spermidine, ethanol and by substrate stabilization. *Nucleic Acids Res.* **22**, 5326-5331.
- Hausen P i Stein H.** (1970). Ribonuclease H. An enzyme degrading the RNA moiety of DNA-RNA hybrids. *Eur.J.Biochem.* **14**, 278-283.
- Heidenreich O i Eckstein F.** (1992a). Hammerhead ribozyme-mediated cleavage of the long terminal repeat RNA of human immunodeficiency virus type 1. *J.Biol.Chem.* **267**, 1904-1909.
- Heidenreich O i Eckstein F.** (1992b). Hammerhead ribozyme-mediated cleavage of the long terminal repeat RNA of human immunodeficiency virus type 1. *J.Biol.Chem.* **267**, 1904-1909.
- Hellen CU i Sarnow P.** (2001). Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev.* **15**, 1593-1612.
- Hnatyszyn H, Spruill G, Young A, Seivright R i Kraus G.** (2001). Long-term RNase P-mediated inhibition of HIV-1 replication and pathogenesis. *Gene Ther.* **8**, 1863-1871.
- Ho SP, Britton DH, Stone BA, Behrens DL, Leffet LM, Hobbs FW, Miller JA i Trainor GL.** (1996). Potent antisense oligonucleotides to the human multidrug resistance-1 mRNA are rationally selected by mapping RNA-accessible sites with oligonucleotide libraries. *Nucleic Acids Res.* **24**, 1901-1907.
- Hollingsworth MJ i Martin NC.** (1986). RNase P activity in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* depends on both mitochondrion and nucleus-encoded components. *Mol.Cell Biol.* **6**, 1058-1064.
- Honda M, Ping LH, Rijnbrand RC, Amphlett E, Clarke B, Rowlands D i Lemon SM.** (1996). Structural requirements for initiation of translation by internal ribosome entry within genome-length hepatitis C virus RNA. *Virology* **222**, 31-42.
- Horiike N, Nonaka T, Kumamoto I, Kajino K, Onji M i Ohta Y.** (1993). Hepatitis C virus plus- and minus- strand RNA in hepatocellular carcinoma and adjoining nontumorous liver. *J.Med.Virol.* **41**, 312-315.
- Houghton M.** (1996). Hepatitis C virus. Fields BN, Knipe DN i Howley PN. Field 's Virology. **3rd**, 1035-1057. Lippincott-Raven, Philadelphia,PA.
- Hutchins CJ, Rathjen PD, Forster AC i Symons RH.** (1986). Self-cleavage of plus and minus RNA transcripts of avocado sunblotch viroid. *Nucleic Acids Res.* **14**, 3627-3640.
- Intine RV, Sakulich AL, Koduru SB, Huang Y, Pierstorff E, Goodier JL, Phan L i Maraia RJ.** (2000). Control of transfer RNA maturation by phosphorylation of the human La antigen on serine 366. *Mol Cell* **6**, 339-348.
- Ito T, Tahara SM i Lai MM.** (1998). The 3'-untranslated region of hepatitis C virus RNA enhances translation from an internal ribosomal entry site. *J Virol* **72**, 8789-8796.
- Jackson RJ.** (1996). A comparative view of initiation site selection mechanisms. Hershey JWB, Mathews MB i Sonenberg N. Translational control. 71-112. Cold Spring Harbour, NY, Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Jackson WHJ, Moscoso H, Nechtman JF, Galileo DS, Garver FA i Lanclos KD.** (1998). Inhibition of HIV-1 replication by an anti-tat hammerhead ribozyme. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **245**, 81-84.
- Jacobson MR, Cao LG, Wang YL i Pederson T.** (1995). Dynamic localization of RNase MRP RNA in the nucleolus observed by fluorescent RNA cytochemistry in living cells. *J.Cell Biol.* **131**, 1649-1658.
- Jaeger JA, Turner DH i Zuker M.** (1990). Predicting optimal and suboptimal secondary structure for RNA. *Methods Enzymol.* **183**, 281-306.
- James HA i Gibson I.** (1998). The therapeutic potential of ribozymes. *Blood* **91**, 371-382.

- Jarrous N.** (2002). Human ribonuclease P: subunits, function, and intranuclear localization. *RNA*. **8**, 1-7.
- Jarrous N i Altman S.** (2001). Human ribonuclease P. *Methods Enzymol.* **342**, 93-100.
- Jarrous N, Eder PS, Guerrier-Takada C, Hoog C i Altman S.** (1998). Autoantigenic properties of some protein subunits of catalytically active complexes of human ribonuclease P. *RNA*. **4**, 407-417.
- Jarrous N, Wolenski JS, Wesolowski D, Lee C i Altman S.** (1999). Localization in the nucleolus and coiled bodies of protein subunits of the ribonucleoprotein ribonuclease P. *J.Cell Biol.* **146**, 559-572.
- Jarvis TC, Wincott FE, Alby LJ, McSwiggen JA, Beigelman L, Gustofson J, DiRenzo A, Levy K, Arthur M, Matulic-Adamic J, Karpeisky A, Gonzalez C, Woolf TM, Usman N i Stinchcomb DT.** (1996). Optimizing the cell efficacy of synthetic ribozymes. Site selection and chemical modifications of ribozymes targeting the proto-oncogene c-myc. *J.Biol.Chem.* **271**, 29107-29112.
- Jayanthi GP i Van Tuyle GC.** (1992). Characterization of ribonuclease P isolated from rat liver cytosol. *Arch.Biochem.Biophys.* **296**, 264-270.
- Jiang T i Altman S.** (2001). Protein-protein interactions with subunits of human nuclear RNase P. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**, 920-925.
- Jiang T, Guerrier-Takada C i Altman S.** (2001). Protein-RNA interactions in the subunits of human nuclear RNase P. *RNA*. **7**, 937-941.
- Joshi S, Chappeville F i Haenni AL.** (1982). Length requirement for tRNA-specific enzymes and cleavage specificity at the 3' end of turnip yellow mosaic virus RNA. *Nucleic Acids Research* **10**, 1947-1962.
- Joshi S, Haenni AL, Hubert E, Huez G i Marbaix G.** (1978). In vivo aminoacylation and 'processing' of turnip yellow mosaic virus RNA in *Xenopus laevis* oocytes. *Nature* **275**, 339-341.
- Karwan R.** (1993). RNase MRP/RNase P: a structure-function relation conserved in evolution? *FEBS Lett.* **319**, 1-4.
- Kawa D, Wang J, Yuan Y i Liu F.** (1998). Inhibition of viral gene expression by human ribonuclease P. *RNA*. **4**, 1397-1406.
- Kawasaki H, Kuwabara T, Miyagishi M i Taira K.** (2003). Identification of functional genes by libraries of ribozymes and siRNAs. *Nucleic Acids Res.Suppl* , 331-332.
- Kijima H i Scanlon KJ.** (2000). Ribozyme as an approach for growth suppression of human pancreatic cancer. *Mol.Biotechnol.* **14**, 59-72.
- Kilani AF, Trang P, Hsu JS, Kim J, Nepomuceno E, Liou K i Liu F.** (2000). RNase P ribozymes selected in vitro to cleave a viral mRNA effectively inhibit expression in cell culture. *J.Biol.Chem.* **14**, 10611-10622.
- Kim HP, Lee JY, Jeong JK, Bae SW, Lee HK i Jo I.** (1999). Nongenomic stimulation of nitric oxide release by estrogen is mediated by estrogen receptor alpha localized in caveolae. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **263**, 257-262.
- Kiss T, Marshallsay C i Filipowicz W.** (1992). 7-2/MRP RNAs in plant and mammalian cells: association with higher order structures in the nucleolus. *EMBO J.* **11**, 3737-3746.
- Klebba C, Ottmann OG, Scherr M, Pape M, Engels JW, Grez M, Hoelzer D i Klein SA.** (2000). Retrovirally expressed anti-HIV ribozymes confer a selective survival advantage on CD4+ T cells in vitro. *Gene Ther.* **7**, 408-416.
- Kline L, Nishikawa S i Soll D.** (1981). Partial purification of RNase P from *Schizosaccharomyces pombe*. *J.Biol.Chem.* **256**, 5058-5063.

- Knapp G.** (1989). Enzymatic approaches to probing of RNA secondary and tertiary structure. *Methods Enzymol.* **180**, 192-212.
- Koizumi M, Ozawa Y, Yagi R, Nishigaki T, Kaneko M, Oka S, Kimura S, Iwamoto A, Komatsu Y i Ohtsuka E.** (1998). Design and anti-HIV-1 activity of hammerhead and hairpin ribozymes containing a stable loop. *Nucleosides Nucleotides* **17**, 207-218.
- Kolykhalov AA, Mihalik K, Feinstone SM i Rice CM.** (2000). Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements en the 3' nontranslated-region are essential for virus replication in vivo. *J.Virol.* **74**, 2046-2051.
- Komine Y, Kitabatke M, Yokogawa T, Nishikawa K i Inokuchi H.** (1994). A tRNA-like structure is present in 10Sa RNA, a small stable RNA from E. coli. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **91**, 9923-9227.
- Koonin EV, Wolf YI i Aravind L.** (2001). Prediction of the archaeal exosome and its connections with the proteasome and the translation and transcription machineries by a comparative-genomic approach. *Genome Res.* **11**, 240-252.
- Koziel MJ, Dudley D, Wong JT, Dienstag J, Houghton M, Ralston R i Walker BD.** (1992). Intrahepatic cytotoxic T lymphocytes specific for hepatitis C virus in persons with chronic hepatitis [published erratum appears in J Immunol 1993 Mar 15;150(6):2563]. *J.Immunol.* **149**, 3339-3344.
- Kraus G, Geffin R, Spruill G, Young AK, Seivright R, Cardona D, Burzawa J i Hnatyszyn HJ.** (2002). Cross-clade inhibition of HIV-1 replication and cytopathology by using RNase P-associated external guide sequences. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **99**, 3406-3411.
- Kruger K, Grabowski PJ, Zaug AJ, Sands J, Gottschling DE i Cech TR.** (1982). Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. *Cell* **31**, 147-157.
- Kurz JC i Fierke CA.** (2000). Ribonuclease P: a ribonucleoprotein enzyme. *Curr.Opin.Chem.Biol.* **4**, 553-558.
- Kuwabara T, Warashina M, Tanabe T, Tani K, Asano S i Taira K.** (1998). A novel allosterically trans-activated ribozyme, the maxizyme, with exceptional specificity in vitro and in vivo. *Mol.Cell* **2**, 617-627.
- Lan N, Howrey RP, Lee SW, Smith CA i Sullenger BA.** (1998). Ribozyme-mediated repair of sickle beta-globin mRNAs in erythrocyte precursors. *science* **280**, 1593-1596.
- Lee B, Matera AG, Ward DC i Craft J.** (1996). Association of RNase mitochondrial RNA processing enzyme with ribonuclease P in higher ordered structures in the nucleolus: a possible coordinate role in ribosome biogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**, 11471-11476.
- Lestienne P, Plumbridge JA, Grunberg-Manago M i Blanquet S.** (1984). Autogenous repression of Escherichia coli threonyl-tRNA synthetase expression in vitro. *J.Biol.Chem.* **259**, 5232-5237.
- Lewin AS i Hauswirth WW.** (2001). Ribozyme gene therapy: applications for molecular medicine. *Trends Mol Med.* **7**, 221-228.
- Lewis JD i Tollervey D.** (2000). Like attracts like: getting RNA processing together in the nucleus. *science* **288**, 1385-1389.
- Li K, Smagula CS, Parsons WJ, Richardson JA, Gonzalez M, Hagler HK i Williams RS.** (1994). Subcellular partitioning of MRP RNA assessed by ultrastructural and biochemical analysis. *J.Cell Biol.* **124**, 871-882.
- Li Y i Altman S.** (2001). A subunit of human nuclear RNase P has ATPase activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**, 441-444.

- Lieber A, He CY, Polyak SJ, Gretch DR, Barr D i Kay MA.** (1996). Elimination of hepatitis C virus RNA in infected human hepatocytes by adenovirus-mediated expression of ribozymes. *J Virol* **70**, 8782-8791.
- Lima WF, Mohan V i Crooke ST.** (1997). The influence of antisense oligonucleotide-induced RNA structure on Escherichia coli RNase H1 activity. *J Biol.Chem.* **272**, 18191-18199.
- Lima WF, Monia BP, Ecker DJ i Freier SM.** (1992). Implication of RNA structure on antisense oligonucleotide hybridization kinetics. *Biochemistry* **31**, 12055-12061.
- Litvak S, Tarrago A, Tarrago-Litvak L i Allende JE.** (1973). Elongation factor-viral genome interaction dependent on the aminoacylation of TYMV and TMV RNAs. *Nat.New Biol.* **241**, 88-90.
- Liu F i Altman S.** (1995). Inhibition of viral gene expression by the catalytic RNA subunit of RNase P from Escherichia coli. *Genes Dev.* **9**, 471-480.
- Lohmann V, Korner F, Herian U i Bartenschlager R.** (1997). Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. *J.Virol.* **71**, 8416-8428.
- Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L i Bartenschlager R.** (1999). Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line [see comments]. *science* **285**, 110-113.
- Lopez de Qinto S i Martinez-Salas E.** (1998). Parameters influencing translational efficiency in aphthovirus IRES-based bicistronic expression vectors. *Gene* **217**, 51-56.
- Loria A, Niranjanakumari S, Fierke CA i Pan T.** (1998). Recognition of a pre-tRNA substrate by the Bacillus subtilis RNase P holoenzyme. *Biochemistry* **37**, 15466-15473.
- Lygerou Z, Allmang C, Tollervey D i Seraphin B.** (1996a). Accurate processing of a eukaryotic precursor ribosomal RNA by ribonuclease MRP in vitro. *science* **272**, 268-270.
- Lygerou Z, Pluk H, van Venrooij WJ i Seraphin B.** (1996b). hPop1: an autoantigenic protein subunit shared by the human RNase P and RNase MRP ribonucleoproteins. *EMBO J.* **15**, 5936-5948.
- Lyons AJ, Lytle JR, Gómez J i Robertson HD.** (2001). Hepatitis C virus internal ribosome entry site RNA contains a tertiary structural element in a functional domain of stem-loop II. *Nucleic Acids Res.* **29**, 2535-2541.
- Lyons AJ i Robertson HD.** (2003). Detection of tRNA-like structure through RNase P cleavage of viral internal ribosome entry site RNAs near the AUG start triplet. *J.Biol.Chem.* **278**, 26844-26850.
- Lytle JR, Wu L i Robertson HD.** (2001). The Ribosome Binding Site of Hepatitis C Virus mRNA. *J.Virol.* **75**, 7629-7636.
- Ma M, Benimetskaya L, Lebedeva I, Dignam J, Takle G i Stein CA.** (2000). Intracellular mRNA cleavage induced through activation of RNase P by nuclease-resistant external guide sequences. *Nat.Biotechnol.* **18**, 58-61.
- Macejak DG, Jensen KL, Jamison SF, Domenico K, Roberts EC, Chaudhary N, von C, I, Bellon L, Tong MJ, Conrad A, Pavco PA i Blatt LM.** (2000). Inhibition of hepatitis C virus (HCV)-RNA-dependent translation and replication of a chimeric HCV poliovirus using synthetic stabilized ribozymes. *Hepatology* **31**, 769-776.
- Macejak DG, Jensen KL, Pavco PA, Phipps KM, Heinz BA, Colacino JM i Blatt LM.** (2001). Enhanced antiviral effect in cell culture of type 1 interferon and ribozymes targeting HCV RNA. *J Viral.Hepat.* **8**, 400-405.
- Maizels N i Weiner AM.** (1994). Phylogeny from function: evidence from the molecular fossil record that tRNA originated in replication, not translation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, 6729-6734.

- Maniatis T i Efstratiadis A.** (1980). Fractionation of low molecular weight DNA or RNA in polyacrylamide gels containing 98% formamide or 7 M urea. *Methods Enzymol.* **65**, 299-305.
- Mans RM, Pleij CW i Bosch L.** (1991). tRNA-like structures. Structure, function and evolutionary significance. *Eur.J.Biochem.* **201**, 303-324.
- Mans R, Guerrier-Takada C, Altman S i Pleij C.** (1990). Interaction of RNase P from *Escherichia coli* with pseudoknotted structures in viral tRNAs. *Nucleic Acids Res.* **18**, 3479-3487.
- Maraia RJ i Intine RV.** (2001). Recognition of nascent RNA by the human La antigen: conserved and divergent features of structure and function. *Mol Cell Biol.* **21**, 367-379.
- Martell M, Esteban JI, Quer J, Genesca J, Weiner A, Esteban R, Guardia J i Gomez J.** (1992). Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J.Virol.* **66**, 3225-3229.
- Martell M, Gómez J, Esteban JI, Sauleda S, Quer J, Cabot B, Esteban R i Guardia J.** (1999). High-throughput real-time reverse transcription-PCR quantitation of hepatitis C virus RNA. *Journal of Clinical Microbiology* **37**, 327-332.
- Martinez-Salas E.** (1999). Internal ribosome entry site biology and its use in expression vectors. *Curr.Opin.Biotechnol.* **10**, 458-464.
- Mathews DH, Sabina J, Zuker M i Turner DH.** (1999). Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J.Mol.Biol.* **288**, 911-940.
- McClain WH, Guerrier-Takada C i Altman S.** (1987). Model substrates for an RNA enzyme. *science* **238**, 527-530.
- McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM, Rustgi VK, Goodman ZD, Ling MH, Cort S i Albrecht JK.** (1998). Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group [see comments]. *N.Engl.J.Med.* **339**, 1485-1492.
- Mellor J, Haydon G, Blair C, Livingstone W i Simmonds P.** (1998). Low level or absent in vivo replication of hepatitis C virus and hepatitis G virus/GB virus C in peripheral blood mononuclear cells. *J.Gen.Virol.* **79**, 705-714.
- Mellor J, Holmes EC, Jarvis LM, Yap PL, Simmonds P i International Collaborators.** (1995). Investigation of the pattern of hepatitis C virus sequence diversity in different geographical regions: implication for virus classification. *J Gen.Virol* **76**, 2493-2507.
- Melton DA i Cortese R.** (1979). Transcription of cloned tRNA genes and the nuclear partitioning of a tRNA precursor. *Cell* **18**, 1165-1172.
- Miller RH i Purcell RH.** (1990). Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestivirus and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **87**, 2057-2061.
- Milligan JF, Groebe DR, Witherell GW i Uhlenbeck OC.** (1987). Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. *Nucleic Acids Res.* **15**, 8783-8798.
- Moazed D, Stern S i Noller HF.** (1986). Rapid chemical probing of conformation in 16 S ribosomal RNA and 30 S ribosomal subunits using primer extension. *J.Mol.Biol.* **187**, 399-416.
- Monro RE.** (1967). Catalysis of peptide bond formation by 50 S ribosomal subunits from *Escherichia coli*. *J.Mol.Biol.* **26**, 147-151.
- Monro RE, Cerna J i Marcker KA.** (1968). Ribosome-catalyzed peptidyl transfer: substrate specificity at the P-site. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **61**, 1042-1049.
- Monro RE, Staehelin T, Celma ML i Vazquez D.** (1969). The peptidyl transferase activity of ribosomes. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* **34**, 357-368.

- Moradpour D, Kary P, Rice CM i Blum HE.** (1998). Continuous human cell lines inducibly expressing hepatitis C virus structural and nonstructural proteins. *Hepatology* **28**, 192-201.
- Morrissey DV, Lee PA, Johnson DA, Overly SL, McSwiggen JA, Beigelman L, Mokler VR, Maloney L, Vargeese C, Bowman K, O'Brien JT, Shaffer CS, Conrad A, Schmid P, Morrey JD, Macejak DG, Pavco PA i Blatt LM.** (2002). Characterization of nuclease-resistant ribozymes directed against hepatitis B virus RNA. *J Viral.Hepat.* **9**, 411-418.
- Morrissey JP i Tollervey D.** (1995). Birth of the snoRNPs: the evolution of RNase MRP and the eukaryotic pre-rRNA-processing system. *Trends Biochem.Sci.* **20**, 78-82.
- Nakamura Y.** (2001). Molecular mimicry between protein and tRNA. *J Mol Evol* **53**, 282-289.
- Neal KR, Jones DA, Killey D i James V.** (1994). Risk factors for hepatitis C virus infection. A case-control study of blood donors in the Trent Region (UK). *Epidemiol.Infect.* **112**, 595-601.
- Neddermann P, Tomei L, Steinkuhler C, Gallinari P, Tramontano A i De Francesco R.** (1997). The nonstructural proteins of the hepatitis C virus: structure and functions. *Biol.Chem.* **378**, 469-476.
- Neumann AU, Lam NP, Dahari H, Gretch DR, Wiley TE, Layden TJ i Perelson AS.** (1998). Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *science* **282**, 103-107.
- Niranjanakumari S, Kurz JC i Fierke CA.** (1998). Expression, purification and characterization of the recombinant ribonuclease P protein component from *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.* **26**, 3090-3096.
- Nissen P, Hansen J, Ban N, Moore PB i Steitz TA.** (2000). The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *science* **289**, 920-930.
- Ogata N, Alter HJ, Miller RH i Purcell RH.** (1991). Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **88**, 3392-3396.
- Okamoto H, Kojima M, Okada S, Yoshizawa H, Iizuka H, Tanaka T, Muchmore EE, Peterson DA, Ito Y i Mishiro S.** (1992). Genetic drift of hepatitis C virus during an 8.2-year infection in a chimpanzee: variability and stability. *Virology* **190**, 894-899.
- Pace NR i Brown JW.** (1995). Evolutionary perspective on the structure and function of ribonuclease P, a ribozyme. *J.Bacteriol.* **177**, 1919-1928.
- Pannucci JA, Haas ES, Hall TA, Harris JK i Brown JW.** (1999). RNase P RNAs from some Archaea are catalytically active. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 7803-7808.
- Pascual A i Vioque A.** (1999). Substrate binding and catalysis by ribonuclease P from cyanobacteria and *Escherichia coli* are affected differently by the 3' terminal CCA in tRNA precursors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 6672-6677.
- Patzel V, Steidl U, Kronenwett R, Haas R i Sczakiel G.** (1999). A theoretical approach to select effective antisense oligodeoxyribonucleotides at high statistical probability. *Nucleic Acids Res.* **27**, 4328-4334.
- Peattie DA i Gilbert W.** (1980). Chemical probes for higher-order structure in RNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **77**, 4679-4682.
- Pederson T i Politz JC.** (2000). The nucleolus and the four ribonucleoproteins of translation. *J.Cell Biol.* **148**, 1091-1095.
- Perez-Trallero E, Cilla G, Alcorta M, Elosegui ME i Saenz-Dominguez JR.** (1992). [Low risk of acquiring the hepatitis C virus for the health personnel]. *Med.Clin.(Barc.)* **99**, 609-611.
- Perrotta AT i Been MD.** (1991). A pseudoknot-like structure required for efficient self-cleavage of hepatitis delta virus RNA. *Nature* **350**, 434-436.

- Pestova TV, Shatsky IN, Fletcher SP, Jackson RJ i Hellen CU.** (1998). A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes Dev.* **12**, 67-83.
- Pinck M, Yot P, Chapeville F i Durantón HM.** (1970). Enzymatic binding of valine to the 3' end of TYMV-RNA. *Nature* **226**, 954-956.
- Piron M, Nadal A, Guardia J i Gómez J.** Characterization of the tRNA-like domain determinants near the hepatitis C virus RNA AUG initiator codon. (En preparació).
- Plehn-Dujowich D i Altman S.** (1998). Effective inhibition of influenza virus production in cultured cells by external guide sequences and ribonuclease P. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**, 7327-7332.
- Pluk H, van Eenennaam H, Rutjes SA, Pruijn GJ i van Venrooij WJ.** (1999). RNA-protein interactions in the human RNase MRP ribonucleoprotein complex. *RNA*. **5**, 512-524.
- Poole TL, Wang C, Popp RA, Potgieter LN, Siddiqui A i Collett MS.** (1995). Pestivirus translation initiation occurs by internal ribosome entry. *Virology* **206**, 750-754.
- Poynard T, Marcellin P, Lee SS, Niederau C, Minuk GS, Ideo G, Bain V, Heathcote J, Zeuzem S, Trepo C i Albrecht J.** (1998). Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). *Lancet* **352**, 1426-1432.
- Pudi R, Abhiman S, Srinivasan N i Das S.** (2003). Hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation is stimulated by specific interaction of independent regions of human La autoantigen. *J.Biol.Chem.* **278**, 12231-12240.
- Puerta-Fernández E, Romero-López C, Barroso-delJesús A i Berzal-Herranz A.** (2003). Ribozymes: recent advances in the development of RNA tools. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 75-97.
- Puranam RS i Attardi G.** (2001). The RNase P associated with HeLa cell mitochondria contains an essential RNA component identical in sequence to that of the nuclear RNase P. *Mol.Cell Biol.* **21**, 548-561.
- Rajagopalan LE i Malter JS.** (1997). Regulation of eukaryotic messenger RNA turnover. *Prog.Nucleic Acid Res.Mol.Biol.* **56**, 257-286.
- Ramakrishnan V.** (2002). Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell* **108**, 557-572.
- Reich C, Olsen GJ, Pace B i Pace NR.** (1988). Role of the protein moiety of ribonuclease P, a ribonucleoprotein enzyme. *science* **239**, 178-181.
- Reimer G, Raska I, Scheer U i Tan EM.** (1988). Immunolocalization of 7-2-ribonucleoprotein in the granular component of the nucleolus. *Exp.Cell Res.* **176**, 117-128.
- Reynolds JE, Kaminski A, Kettinen HJ, Grace K, Clarke BE, Carroll AR, Rowlands DJ i Jackson RJ.** (1995). Unique features of internal initiation of hepatitis C virus RNA translation. *EMBO J.* **14**, 6010-6020.
- Rijnbrand RC, Abbink TE, Haasnoot PC, Spaan WJ i Bredenbeek PJ.** (1996). The influence of AUG codons in the hepatitis C virus 5' nontranslated region on translation and mapping of the translation initiation window. *Virology* **226**, 47-56.
- Robertson HD.** (1990). Escherichia coli Ribonuclease III. *Methods Enzymol.* **181**, 189-202.
- Robertson HD.** (1992). Replication and evolution of viroid-like pathogens. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **176**, 213-219.

- Robertson HD, Altman S i Smith JD.** (1972). Purification and properties of a specific Escherichia coli ribonuclease which cleaves a tyrosine transfer ribonucleic acid precursor. *J.Biol.Chem.* **247**, 5243-5251.
- Sabariegos R, Nadal A, Gómez J.** Procariotic ribozymes cleave HCV RNA. *En preparació.*
- Sarver N, Cantin EM, Chang PS, Zaia JA, Ladne PA, Stephens DA i Rossi JJ.** (1990). Ribozymes as potential anti-HIV-1 therapeutic agents. *science* **247**, 1222-1225.
- Scherr M i Rossi JJ.** (1998). Rapid determination and quantitation of the accessibility to native RNAs by antisense oligodeoxynucleotides in murine cell extracts. *Nucleic Acids Res.* **26**, 5079-5085.
- Scherr M, Rossi JJ, Sczakiel G i Patzel V.** (2000). RNA accessibility prediction: a theoretical approach is consistent with experimental studies in cell extracts. *Nucleic Acids Res.* **28**, 2455-2461.
- Schmitt ME i Clayton DA.** (1993). Nuclear RNase MRP is required for correct processing of pre-5.8S rRNA in Saccharomyces cerevisiae. *Mol.Cell Biol.* **13**, 7935-7941.
- Schreiber GB, Busch MP, Kleinman SH i Korelitz JJ.** (1996). The Risk of Transfusion-Transmitted Viral Infections. *N.Engl.J.Med.* **334**, 1685-1690.
- Seeff LB.** (1997). Natural history of hepatitis C. *Hepatology* **26**, 21S-28S.
- Shuai K i Warner JR.** (1991). A temperature sensitive mutant of Saccharomyces cerevisiae defective in pre-rRNA processing. *Nucleic Acids Res.* **19**, 5059-5064.
- Singh R i Rao ChM.** (2002). Chaperone-like activity and surface hydrophobicity of 70S ribosome. *FEBS Lett.* **527**, 234-238.
- Sola R, Cruz DC, Hombrados M, Planas R, Coll S, Jardi R, Sunyer J, Covas MI i Marrugat J.** (2002). [Prevalence of hepatitis B and hepatitis C viruses in different counties of Catalonia, Spain: cross-sectional study]. *Med.Clin.(Barc.)* **119**, 90-95.
- Söll D.** (1993). The RNA world. Gesteland RF i Atkins JF. 157. Cold Spring Harbor Lab Press Plainview, New York.
- Spaete RR, Alexander D, Rugroden ME, Choo QL, Berger K, Crawford K, Kuo C, Leng S, Lee C i Ralston R.** (1992). Characterization of the hepatitis C virus E2/NS1 gene product expressed in mammalian cells. *Virology* **188**, 819-830.
- Springer M, Portier C i Grunberg-Manago M.** (1998). RNA mimicry in the translational apparatus. Simons RW i Grunberg-Manago M. RNA structure and function. 377-413. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Steinhauer DA, Domingo E i Holland JJ.** (1992). Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene* **122**, 281-288.
- Stolc V, Katz A i Altman S.** (1998). Rpp2, an essential protein subunit of nuclear RNase P, is required for processing of precursor tRNAs and 35S precursor rRNA in Saccharomyces cerevisiae. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**, 6716-6721.
- Suarez A, Viejo G, Navascues CA, Garcia R, Diaz G, Saro C i Roman FJ.** (1997). [The prevalence of hepatitis A, B and C viral markers in the population of Gijon between 26 and 65 years old]. *Gastroenterol.Hepatol.* **20**, 347-352.
- Sullenger BA i Cech TR.** (1994). Ribozyme-mediated repair of defective mRNA by targeted, trans-splicing. *Nature* **371**, 619-622.
- Sun LQ, Wang L, Gerlach WL i Symonds G.** (1995). Target sequence-specific inhibition of HIV-1 replication by ribozymes directed to tat RNA. *Nucleic Acids Res.* **23**, 2909-2913.
- Suyama E, Kawasaki H i Taira K.** (2003). Use of a ribozyme library for validation of gene functions and cellular pathways. *Nucleic Acids Res.Suppl* , 253-254.

- Swerdlow H i Guthrie C.** (1984). Structure of intron-containing tRNA precursors. Analysis of solution conformation using chemical and enzymatic probes. *J.Biol.Chem.* **259**, 5197-5207.
- Takagi Y, Warashina M, Stec WJ, Yoshinari K i Taira K.** (2001). Recent advances in the elucidation of the mechanisms of action of ribozymes. *Nucleic Acids Res.* **29**, 1815-1834.
- Talbot SJ i Altman S.** (1994). Kinetic and thermodynamic analysis of RNA-protein interactions in the RNase P holoenzyme from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **33**, 1406-1411.
- Tanaka T, Kato N, Cho MJ, Sugiyama K i Shimotohno K.** (1996). Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome. *J Virol* **70**, 3307-3312.
- Tang XB, Hobom G i LD.** (1994). Ribozyme mediated destruction of influenza A virus in vitro and in vivo. *J Med.Virol* **42**, 385-395.
- Trang P, Hsu A, Zhou T, Lee J, Kilani AF, Nepomuceno E i Liu F.** (2002a). Engineered RNase P ribozymes inhibit gene expression and growth of cytomegalovirus by increasing rate of cleavage and substrate binding. *J Mol Biol* **15**, 573-586.
- Trang P, Kilani A, Kim J i Liu F.** (2000a). A ribozyme derived from the catalytic subunit of RNase P from *Escherichia coli* is highly effective in inhibiting replication of herpes simplex virus 1. *J Mol Biol* **301**, 817-826.
- Trang P, Kilani A, Lee J, Hsu A, Liou K, Kim J, Nassi A, Kim K i Liu F.** (2002b). RNase P ribozymes for the studies and treatment of human cytomegalovirus infections. *J.Clin.Virol.* **25 Suppl 2**, S63-S74.
- Trang P, Kim K, Zhu J i Liu F.** (2003). Expression of an RNase P ribozyme against the mRNA encoding human cytomegalovirus protease inhibits viral capsid protein processing and growth. *J.Mol.Biol.* **328**, 1123-1135.
- Trang P, Lee M, Nepomuceno E, Kim J, Zhu H i Liu F.** (2000b). Effective inhibition of human cytomegalovirus gene expression and replication by a ribozyme derived from the catalytic RNA subunit of RNase P from *Escherichia coli*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **97**, 5812-5817.
- Tranguch AJ, Kindelberger DW, Rohlman CE, Lee JY i Engelke DR.** (1994). Structure-sensitive RNA footprinting of yeast nuclear ribonuclease P. *Biochemistry* **33**, 1778-1787.
- Trepo C i Pradat P.** (1999). Hepatitis C virus infection in Western Europe. *J.Hepatol.* **31 Suppl 1**, 80-83.
- True HL i Celander DW.** (1998). Protein components contribute to active site architecture for eukaryotic ribonuclease P. *J.Biol.Chem.* **273**, 7193-7196.
- Tsukiyama-Kohara K, Iizuka N, Kohara M i Nomoto A.** (1992). Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J.Virol.* **66**, 1476-1483.
- Uhlenbeck OC.** (1987). A small catalytic oligoribonucleotide. *Nature* **328**, 596-600.
- Usman N i Blatt LM.** (2000). Nuclease-resistant synthetic ribozymes: developing a new class of therapeutics. *J.Clin Invest* **106**, 1197-1202.
- van Eenennaam H, Jarrous N, van Venrooij WJ i Pruijn GJ.** (2000). Architecture and function of the human endonucleases RNase P and RNase MRP. *IUBMB.Life* **49**, 265-272.
- van Eenennaam H, Lugtenberg D, Vogelzangs JH, van Venrooij WJ i Pruijn GJ.** (2001). hPop5, a protein subunit of the human RNase MRP and RNase P endoribonucleases. *J.Biol.Chem.* **276**, 31635-31641.
- van Eenennaam H, Pruijn GJ i van Venrooij WJ.** (1999). hPop4: a new protein subunit of the human RNase MRP and RNase P ribonucleoprotein complexes. *Nucleic Acids Res.* **27**, 2465-2472.

- Vickers TA, Wyatt JR i Freier SM.** (2000). Effects of RNA secondary structure on cellular antisense activity. *Nucleic Acids Res.* **28**, 1340-1347.
- Vioque A, Arnez J i Altman S.** (1988). Protein-RNA interactions in the RNase P holoenzyme from *Escherichia coli*. *J.Mol.Biol.* **202**, 835-848.
- Wang C, Le SY, Ali N i Siddiqui A.** (1995). An RNA pseudoknot is an essential structural element of the internal ribosome entry site located within the hepatitis C virus 5' noncoding region. *RNA.* **1**, 526-537.
- Wang JT, Sheu JC, Lin JT, Wang TH i Chen DS.** (1992). Detection of replicative form of hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells. *J.Infect.Dis.* **166**, 1167-1169.
- Wang L, Witherington C, King A, Gerlach WL, Carr A, Penny R, Cooper D, Symonds G i Sun LQ.** (1998). Preclinical characterization of an anti-tat ribozyme for therapeutic application. *Human Gene Ther* **9**, 1283-1291.
- Watanabe T i Sullenger BA.** (2000). Induction of wild-type p53 activity in human cancer cells by ribozymes that repair mutant p53 transcripts. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 8490-8494.
- Wei X, Samarabandu J, Devdhar RS, Siegel AJ, Acharya R i Berezney R.** (1998). Segregation of transcription and replication sites into higher order domains. *science* **281**, 1502-1506.
- Weinberg M, Passman M, Kew M i Arbuthnot P.** (2000). Hammerhead ribozyme-mediated inhibition of hepatitis B virus X gene expression in cultured cells. *J Hepatol* **33**, 142-151.
- Welch PJ, Tritz R, Yei S, Barber J i Yu M.** (1997). Intracellular application of hairpin ribozyme genes against hepatitis B virus. *Gene Ther.* **4**, 736-743.
- Welch PJ, Tritz R, Yei S, Leavitt M, Yu M i Barber J.** (1996). A potential therapeutic application of hairpin ribozymes: in vitro and in vivo studies of gene therapy for hepatitis C virus infection. *Gene Ther.* **3**, 994-1001.
- Werner M, Rosa E, Nordstrom JL, Goldberg AR i George ST.** (1998). Short oligonucleotides as external guide sequences for site-specific cleavage of RNA molecules with human RNase P. *RNA.* **4**, 847-855.
- Werner M i Uhlenbeck OC.** (1995). The effect of base mismatches in the substrate recognition helices of hammerhead ribozymes on binding and catalysis. *Nucleic Acids Res.* **23**, 2092-2096.
- Wilson JE, Powell MJ, Hoover SE i Sarnow P.** (2000). Naturally occurring dicistronic cricket paralysis virus RNA is regulated by two internal ribosome entry sites. *Mol.Cell Biol.* **20**, 4990-4999.
- Wolin SL i Matera AG.** (1999). The trials and travels of tRNA. *Genes Dev.* **13**, 1-10.
- Wong-Staal F, Poeschla EM i Looney DJ.** (1998). A controlled, Phase 1 clinical trial to evaluate the safety and effects in HIV-1 infected humans of autologous lymphocytes transduced with a ribozyme that cleaves HIV-1 RNA. *Human Gene Ther* **9**, 2407-2425.
- Wrede P, Wurst R, Vournakis J i Rich A.** (1979). Conformational changes of yeast tRNAPhe and *E. coli* tRNA^{2Glu} as indicated by different nuclease digestion patterns. *J.Biol.Chem.* **254**, 9608-9616.
- Xiao S, Scott F, Fierke CA i Engelke DR.** (2002). Eukaryotic ribonuclease P: a plurality of ribonucleoprotein enzymes. *Annu.Rev.Biochem.* **71**, 165-189.
- Yamada O, Kraus G, Leavitt MC, Yu M i Wong-Staal F.** (1994). Activity and cleavage site specificity of an anti-HIV-1 hairpin ribozyme in human T cells. *Virology* **205**, 121-126.
- Yanagi M, St Claire M, Emerson SU, Purcell RH i Bukh J.** (1999). In vivo analysis of the 3' untranslated region of the hepatitis C virus after in vitro mutagenesis of an infectious cDNA clone. *Proc Natl Acad.Sci.U.S.A* **96**, 2291-2295.

- Yoo CJ i Wolin SL.** (1997). The yeast La protein is required for the 3' endonucleolytic cleavage that matures tRNA precursors. *Cell* **89**, 393-402.
- Yu M, Ojwang J, Yamada O, Hampel A, Rapaport J, Looney D i Wong-Staal F.** (1993). A hairpin ribozyme inhibits expression of diverse strains of human immunodeficiency virus type 1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **90**, 6340-6344.
- Yu M, Poeschla E, Yamada O, Degrandis P, Leavitt MC, Heusch M, Yees JK, Wong-Staal F i Hampel A.** (1995). In vitro and in vivo characterization of a second functional hairpin ribozyme against HIV-1. *Virology* **206**, 381-386.
- Yuan Y i Altman S.** (1995). Substrate recognition by human RNase P: identification of small, model substrates for the enzyme. *EMBO J.* **14**, 159-168.
- Yuan Y, Hwang ES i Altman S.** (1992). Targeted cleavage of mRNA by human RNase P. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89**, 8006-8010.
- Zaug AJ i Cech TR.** (1986). The intervening sequence RNA of Tetrahymena is an enzyme. *science* **231**, 470-475.
- Zoumadakis M, Neubert WJ i Tabler M.** (1994). The influence of imperfectly paired helices I and III on the catalytic activity of hammerhead ribozymes. *Nucleic Acids Res.* **22**, 5271-5278.
- zu Putlitz J, Yu Q, Burke JM i Wands JR.** (1999). Combinatorial screening and intracellular antiviral activity of hairpin ribozymes directed against hepatitis B virus. *J Virol* **73**, 5381-5387.
- Zwieb C.** (1989). Structure and function of signal recognition particle RNA. *Prog.Nucleic Acid Res.Mol.Biol.* **37**, 207-234.

VIII. ÍNDEX

ÍNDEX

CONTINGUT

ESTRUCTURA DE LA MEMÒRIA 1

PRESENTACIÓ 3

I. INTRODUCCIÓ 7

1. La malaltia, 9

2. El virus de l'hepatitis C, 10

2.1. Estructura i funció del genoma del virus de l'hepatitis C, 11

2.2. Distribució en quasiespècie, 12

2.3. Replicació del virus de l'hepatitis C, 13

2.4. Traducció del genoma del virus de l'hepatitis C, 14

2.5. Tractament de l'hepatitis C, 15

3. Els ribozims, 16

- 3.1. Aplicacions terapèutiques, 17
 - 3.1.1 L'RNA com diana terapèutica, 19
 - 3.1.2 Ribozims com a agents antivirals, 21
 - 3.1.3. Altres aplicacions terapèutiques, 21

4. La ribonucleasa P, 24

- 4.1. Descripció i funció, 24
- 4.2. Varietats de Ribonucleasa P, 25
 - 4.2.1. Ribonucleasa P bacteriana, 25
 - 4.2.2. Ribonucleasa P humana, 26
- 4.3. Reconeixement del substrat, 28
- 4.4. Aplicacions terapèutiques de la RNasa P d'*E.coli* i humana, 31
 - 4.4.1. Disseny de seqüències guia externes, 31
 - RNA M1 (Ribonucleasa P d'E.coli)*, 31
 - Ribonucleasa P humana*, 32
 - 4.4.2. Teràpia antiviral amb la ribonucleasa P, 33

5. Antecedents del VHC i la teràpia amb ribozims, 33

6. Ribonucleasa MRP, 34

7. Mimetisme molecular, 35

- 7.1. Estructures tipus tRNA, 35
- 7.2. Altres substrats naturals de la ribonucleasa P, 37

II. OBJECTIUS 39

III. MATERIAL I MÈTODES..... 43

1. Transcripció *in vitro* d'RNA i purificació de transcrits,45

- 1.1. Preparació del DNA motlle, 46
 - 1.1.1. VHC, 46
 - 1.1.2. Precursor de tRNA de *E. coli* (pre-tRNA^{Tyr}), 46
 - 1.1.3. RNA M1 d'*E.coli*, 46
 - 1.1.4. VHB, 47
- 1.2. Transcripció marcada d'RNA (vector de transcripció), 47
 - 1.2.1. Síntesi d'RNA: reacció de transcripció, 47

- 1.2.2. Purificació d'RNA marcat, 48
 - a. Columna de CF-11, 48
 - b. Electroforesi en gel de poliacrilamida desnaturalitzant, 49
 - b.1. Preparació dels gels, 49
 - b.2. Purificació dels fragments d'RNA marcat, 50
 - b.3. Quantificació dels transcrits, 51
- 1.3. Transcripció marcada d'RNA (DNA de cadena simple), 52
 - a. Motlle de DNA, 52
 - b. Reacció de transcripció, 52
- 1.4. Transcripció freda d'RNA, 53

2. Purificació de la Ribonucleasa P humana, 53

- 2.1. Preparació i empaquetament de la resina, 54
- 2.2. Preparació de la mostra, 55
- 2.3. Gradient de clorur d'amoni: elució de la ribonucleasa P, 56
- 2.4. Determinació de les fraccions que contenen RNasa P, 56
 - 2.4.1. Detecció del component RNA de la RNasa P, 56
 - 2.4.2. Assaig d'activitat sobre el substrat natural, 57
 - a. Reacció, 57
 - b. Electroforesi en gel de poliacrilamida desnaturalitzant, 58
 - c. Autoradiografia, 58
- 2.5. Centrifugació amb gradient de glicerol, 59
- 2.6. Determinació de les fraccions positives, 60

3. Accessibilitat de l'RNA del VHC a la ribonucleasa H, 60

- 3.1. Marcatge d'oligonucleòtids de DNA amb quinasa, 60
 - 3.1.1. Disseny dels oligonucleòtids de DNA, 60
 - 3.1.2. Marcatge amb quinasa, 61
- 3.2. Accessibilitat de l'RNA a oligonucleòtids de DNA (gels de retardament), 62
 - 3.2.1 Reacció de hibridació, 62
 - a. Reacció estàndard, 62
 - b. Pretractament a 90°C, 62
 - 3.2.2. Electroforesi en gel de poliacrilamida no desnaturalitzant, 63
- 3.3. Cinètiques de tall amb Ribonucleasa H, 63
 - 3.3.1. Pretractament a 37°C, 64
 - 3.3.2. Pretractament a 90°C, 64

4. Ribonucleasa P humana i seqüències guia externes, 65

- 4.1. Disseny de seqüències guia externes (EGS), 65
- 4.2. Marcatge amb quinasa d'EGS, 65
- 4.3. Hibridació entre RNA i EGS (*Gel Shift*), 66
- 4.4 Reacció de tall, 66

5. Digestió d'RNA amb ribozims M1GS, 67

- 5.1. Construcció del ribozim M1GS específic, 67
- 5.2. Assaig d'activitat, 67
 - 5.2.1. Plegament i calibració dels ribozims M1GSs, 67
 - a. Plegament ribozims, 68
 - b. Calibració dels ribozims, 68
 - 5.2.2. Reacció de tall amb M1GSs, 69

6. Proves per a determinar l'enzim responsable dels talls observats en el genoma del VHC, 69

- 6.1. Reacció de tall *in vitro*, 69
- 6.2. Immunoprecipitació de l'activitat RNasa P, 70
 - 6.2.1. Immunoprecipitació, 70
 - 6.2.2. Assaig d'activitat, 71
- 6.3. Inhibició competitiva, 71
- 6.4. Estudi de les variants de VHC, 72
 - 6.4.1. Construcció i obtenció de les variants de VHC, 72
 - 6.4.2. Reaccions de tall, 72

7. Proves per identificar i caracteritzar estructures tipus tRNA, 72

8. Reaccions en presència d'alcohol, 73

IV. RESULTATS 75

IV.1. Caracterització de l'estructura i variabilitat d'una regió del VHC per dirigir-hi la RNasa P, 77

Article I: Characterization of the structure and variability of an internal region of HCV RNA for M1 RNA guide sequence ribozyme targeting, 79

Altres resultats no publicats, 85

Accessibilitat de l'RNA del VHC a la RNasa P humana guiada per seqüències
guia externes, 89

1. Disseny de seqüències guia externes, 89
2. Hibridació entre seqüència guia externa i transcrit viral, 90
3. Tall d'un transcrit del VHC, 92
 - 3.1. Assaig sobre un transcrit de 45 nucleòtids, 92
 - 3.2. Assaig sobre un transcrit de 554 nucleòtids, 93

IV.2. Identificació d'estructures tipus tRNA a l'RNA del VHC: noves dianes terapèutiques, 97

Article II: Specific cleavage of hepatitis C virus RNA genome by human RNase P, 99

Altres resultats, 109

Increment del reconeixement de les estructures tipus tRNA del genoma del VHC
per la RNasa humana en presència d'etanol i metanol, 111

1. Activitat de la RNasa P humana sobre el pre-tRNA^{Tyr} en presència
d'alcohol, 112
2. Activitat de la RNasa P humana sobre l'RNA del VHC en presència
d'alcohol, 113

V. <u>DISCUSSIÓ GENERAL</u>	115
VI. <u>CONCLUSIONS</u>	131
VII. <u>BIBLIOGRAFIA</u>	135
VIII. <u>ÍNDEX</u>	155
Agraïments	163

AGRAÏMENTS

Voldria donar les gràcies a totes les persones que d'una manera o altre han estat al meu costat durant tot aquest temps i han contribuït en la realització d'aquest treball.

A la Dra. Maria Martell i al Dr. Jordi Gómez per la seva direcció, confiança, formació, llibertat i sobretot disponibilitat en tot moment.

Al Dr. Juan I. Esteban per l'oportunitat que m'ha donat de realitzar aquesta tesi en el laboratori de Medicina Interna-Hepatologia de l'hospital Vall d'Hebron. Al Dr. Rafael Esteban i al Dr. Jaume Guàrdia per el seu suport incondicional al laboratori.

A la Maria Piron, la Tere, en Josep, en Pere, la Bea, la Nerea, la Charo, la Raquel, l'Eli i l'Anna Jofré l'amistat, els ànims i les estones que hem passat junts, fent i no fent ciència.

Al Dr. Hugh Robertson de la *Cornell University* de Nova York, per els seus consells sempre tan aprofitables.

Al Dr. Fenyong Liu de la *University of California* la oportunitat que m'ha donat de conèixer un continent nou i els ribozims M1GS. A tota la gent del seu laboratori, especialment en Walter, en Phong, en Manfred i molt especialment a les Suzettes.

A la Dra. Marisa Molinas per acceptar ser la meva tutora de tesi, els seus consells i ajut.

A la Dra. Maria Pla per introduir-me en el món de la ciència, donar-me la oportunitat de tornar a Girona i sobretot la seva confiança i paciència en la recta final.

Als meus pares per el seu suport, entusiasme i confiança dipositada en mi.

Finalment, m'agradaria dedicar aquest treball a en Narcís i donar-li les gràcies per la seva ajuda, paciència, comprensió i sobretot per estar al meu costat en tot moment.

