



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

ANÁLISIS DE RNAs CATALÍTICOS EN RETROELEMENTOS DE PLANTAS

Máster "Biotecnología molecular y celular de plantas"

Autora:

Andrea Martín Guindal

Directores científicos:

Marcos de la Peña del Rivero

Amelia Cervera Olagüe

Tutora UPV:

M^a Purificación Lisón Párraga

Enero 2018, Valencia.

Resumen:

Las pequeñas ribozimas de autocorte como los motivos cabeza de martillo (HHR), twister (Tw) o hepatitis- δ (HDV), son moléculas de RNA con capacidad autocatalítica que recientemente se han encontrado en numerosos genomas a lo largo del árbol de la vida. Datos previos han mostrado que las ribozimas HHR y HDV se encuentran con frecuencia en elementos genéticos móviles como los retrotransposones, elementos que han colonizado de forma eficiente la mayoría de genomas eucariotas.

En este trabajo se ha centrado en la caracterización de dos ribozimas genómicas de plantas, Tw y HHR, siguiendo dos líneas de trabajo distintas: Por un lado, se ha llevado a cabo una búsqueda bioinformática de ribozimas Tw en genomas eucarióticos que reveló su presencia de forma conservada dentro de retrotransposones LINE de la familia RTE. En el caso ilustrativo del genoma de manzano (*Malus domestica*) se han encontrado cerca de 1500 Tw que pudieron clasificarse en tres variantes. La mayoría de las secuencias genómicas de estos motivos son versiones truncadas en el extremo 5', a menudo justo antes del punto de corte de la ribozima, lo que sugiere que el RNA autoprosesado del retroelemento sería el molde para la retrotranscripción e integración del elemento en el genoma. El análisis cinético de varios de estos motivos Tw genómicos truncados, reveló un autocorte co-transcripcional eficiente, a pesar de la ausencia de la hélice del extremo 5' o del punto canónico de corte. Estos resultados asemejan a las ribozimas Tw con las HDV encontradas en otros retroelementos LINE, ya que ambas procesarían el extremo 5' del RNA del retrotransposón a través de motivos de autocorte independientes de la secuencia genómica localizada aguas arriba del punto de corte. Los datos aquí presentados confirman la presencia conservada de ribozimas de autocorte en retrotransposones de plantas y animales, lo que explicaría la presencia generalizada de dichos RNAs catalíticos en genomas de eucariotas y sugieren la existencia de más RNAs catalíticos codificados en estos elementos móviles.

Paralelamente, se ha profundizado en el estudio y caracterización del retrozima del fresón (*Fragaria ananassa*), FaRtz, un retrotransposón no autónomo que contiene ribozimas HHR en sus regiones LTR. Este tipo de retrotransposón de plantas se caracteriza por presentar un intermediario de retrotransposición circular, el cual se acumula a concentraciones elevadas en tejidos de *F. ananassa*. Para estudiar con más detalle el ciclo biológico y propagación de los retrozimas en los genomas de plantas, se ha comenzado la puesta a punto de los protocolos de transformación de *Arabidopsis thaliana* para obtener líneas transformantes estables que expresen FaRtz en presencia y ausencia de un promotor exógeno. Además, se han obtenido mediante el sistema GoldenBraid 3.0 distintas construcciones de un retrozima con una de sus HHR mutada e incapaz de catalizar su autocorte, para ensayos de transformación transitoria en *Nicotiana benthamiana* y estable en *A. thaliana*.

ribozimas; cabeza de martillo, twister, retrotransposones; LINE, RTE, retrozimas.

Abstract:

Self-cleaving ribozymes such as the hammerhead (HHR), the hepatitis- δ (HDV) or the twister (Tw) motifs, are a group of small catalytic RNAs with a numerous and widespread occurrence in the genomes of organisms from all domains of life. Previous data showed that HHR and HDV ribozymes are frequently found in mobile genetic elements such as retrotransposons, which have efficiently colonized most eukaryotic genomes. In this work, we have characterized two genomic ribozymes from plants, as Tw and HHR, following two different lines of research.

Firstly, our bioinformatic mining of twister ribozymes reveals their conserved occurrence in LINE retrotransposons of the RTE superfamily. Twister motifs are found encoded in the 5' UTR of most RTEs of plants, as well as in several metazoan families of this clade of retroelements. The illustrative case of the RTEs present in the apple genome (*Malus domestica*) reveals the presence of ~1500 Tw ribozymes of the type P1 that can be classified into three similar variants. Most of the genomic ribozyme sequences correspond to 5'-truncated versions at the precise cleavage site, which suggests that the self-cleaved RNA of the retroelement would be the template for retrotranscription and genome integration. Moreover, kinetic analysis of several of these genomic Tw revealed efficient co-transcriptional self-processing in the absence of stable P1 stems or canonical self-cleavage sites. Consequently, and in a similar way as observed for the HDV ribozymes found in other LINEs, these retroelements would seem to process their 5' RNA end through self-cleaving motifs regardless of the upstream sequences where they are embedded. Altogether, our data confirms the conserved presence of self-cleaving ribozymes in plant and animal retrotransposons, which explains the widespread occurrence of these catalytic RNAs in eukaryotic genomes and suggests that more catalytic RNAs may be found encoded in other mobile genetic elements.

At the same time, we have deepened in the study of a retrozyme from strawberry (*Fragaria ananassa*), *FaRtz*, a non-autonomous retrotransposon with HHR ribozymes. This type of retrotransposon is characterized by having a circular RNA (circRNA) as intermediate, which accumulates in high concentrations in *F. ananassa* tissues. To study in more detail the life cycle and the propagation of the retrozymes in the genome of plants, we have tried to set up the protocol for genetic transformation of *Arabidopsis thaliana* plants in order to obtain stable expression lines of the retrotransposons under different promoters/terminators. In addition, we have created constructions of the retrozyme mutated in one of its two HHR, which is not able to self-cleave. The constructions with the mutated retrozyme have been validated by transient expression in *Nicotiana benthamiana* plants under different promoters. Experiments have been initiated to obtain stable expression lines of both retrozymes, natural and mutated, in *A. thaliana* plants.

ribozymes, hammerhead, twister, retrotransposons; LINE, RTE, retrozymes.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Ribozimas	1
1.2 Ribozimas pequeñas de autocorte	2
1.2.1 Ribozima de cabeza de martillo (HHR).....	3
1.2.2 Ribozima twister (Tw)	4
1.2.3 Ribozimas del agente delta de la hepatitis humana (HDV)	6
1.3 Retrotransposones y su relación con las ribozimas pequeñas de autocorte.....	7
3. MATERIALES Y MÉTODOS	14
3.1 Ribozima twister	14
3.1.1 Extracción del DNA genómico de <i>Malus domestica</i>	14
3.1.2 Clonación del motivo Tw dentro del genoma de <i>Malus</i>	14
3.1.3 Transformación bacteriana, minipreps y midipreps.....	14
3.1.4 Transcripciones y cinéticas transcripcionales (<i>Run-off transcription</i>)	15
3.1.5 Cinéticas postranscripcionales.....	15
3.2 Retrozima de <i>Fragaria ananassa</i>	16
3.2.1 Puesta a punto del protocolo de transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i>	16
3.2.2 Construcciones del retrozima de <i>Fragaria ananassa</i> en pMOG800	16
3.2.3 Diseño y obtención de construcciones del retrozima de <i>F. ananassa</i> defectivo para el autocorte mediante el sistema GoldenBraid.....	17
3.2.4 Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con vectores binarios de expresión.....	19
3.2.5 Transformación estable de <i>Arabidopsis thaliana</i> mediante inmersión floral	19
3.2.6 Recogida de semillas.	20
3.2.7 Selección en placa de Petri de semillas transformadas con construcciones del retrozima FaRtz por resistencia a kanamicina.....	20
3.2.8 Selección en maceta de plántulas transformadas con construcciones del retrozima mutado FaRtzM por resistencia a glufosinato	21
3.2.9 Extracción de DNA para genotipado	21
3.2.10 Genotipado mediante PCR.....	21
3.2.11 Transformación transitoria de <i>Nicotiana benthamiana</i> con construcciones del retrozima FaRtz en pMOG800	21
3.2.12 Extracción de RNA.....	22
3.2.13 Northern blot.....	22

4. RESULTADOS	24
4.1 Ribozimas twister (tw) en genomas de plantas	24
4.1.1 Búsqueda bioinformática del motivo Tw	24
4.1.2 Motivo Tw-Md asociado a retrotransposón RTE	26
4.1.3 Eficacia catalítica de Tw-1Md y Tw-36Md	27
4.1.4 Importancia de la estructura para la catálisis de autocorte.....	28
4.1.5 Análisis del autocorte en condiciones post-transcripcionales:	33
4.2 Retrozima de <i>Fragaria ananassa</i>	35
4.2.1 Puesta a punto del protocolo de transformación genética estable de <i>Arabidopsis thaliana</i> con construcciones del retrozima de <i>Fragaria ananassa</i> FaRtz.....	35
4.2.2 Obtención de líneas de <i>A. thaliana</i> transformadas con el retrozima FaRtz de <i>F. ananassa</i>	38
4.2.3 Diseño y obtención de construcciones con el retrozima de <i>F. ananassa</i> defectivo para el autocorte mediante el sistema GoldenBraid.....	39
4.2.4 Expresión transitoria en <i>N. benthamiana</i> del retrozima de <i>F. ananassa</i> defectivo para el autocorte.....	43
4.2.5 Obtención de líneas de <i>A. thaliana</i> transformadas con el retrozima de <i>F. ananassa</i> defectivo para el autocorte	44
5. CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN	45
5.1 Ribozima twister	45
5.2 Retrozima de <i>F. ananassa</i>	47
6. REFERENCIAS	50
ANEXO I.....	55
Cebadores.....	55
ANEXO II.....	56
Vectores y unidades utilizados en las construcciones de GoldenBraid.....	56
ANEXO III.....	57
Secuencia del retrotransposón completo de <i>M. domestica</i>	57

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Ribozimas

Durante años, uno de los paradigmas mejor asentados de la biología molecular fue la presunción de que las proteínas eran las únicas macromoléculas con capacidad de catálisis química en los seres vivos, las llamadas enzimas. Sin embargo, en 1982 se descubrió la capacidad catalítica de ciertas moléculas de RNA que, sin codificar información para la síntesis de proteínas, eran capaces de promover su propio autocorte (actividad en *cis*) al demostrar el autoprosesamiento del intrón del RNA ribosomal del protozoo *Tetrahymena* (Kruger *et al.*, 1982). Algo más tarde, se demostró la capacidad catalítica del RNA de la RNAsa P bacteriana para mediar el corte de los tRNAs (actividad en *trans*) (Guerrier-Takada *et al.*, 1983). Al mantenerse la RNAsa P invariable al final de la reacción este RNA catalítico presentaba por tanto capacidad de recambio, de forma similar a lo que ocurre con las enzimas proteicas. Por todo ello, estas moléculas recibieron el nombre de ribozimas.

Probablemente la mayor prueba de la importancia de las ribozimas en los sistemas biológicos sea el hecho de que algo tan fundamental para la vida como es el ribosoma, sea en realidad una ribozima (Nissen *et al.*, 2000). Otros ejemplos de ribozimas naturales son el autoprosesamiento de los intrones del Grupo I (Kruger *et al.*, 1982) y II (Peebles *et al.*, 1986), el procesado del tRNA por la RNAsa P (Guerrier-Takada *et al.*, 1983), las ribozimas pequeñas de autocorte (Hutchins *et al.*, 1986; Prody *et al.*, 1986), o el propio espliceosoma (Valadkhan y Manley, 2001).

En la actualidad se han identificado múltiples clases de ribozimas, así como la mayoría de sus mecanismos de catálisis, tanto en el caso de ribozimas naturales, como de ribozimas artificiales, de gran interés biotecnológico. Sin embargo, cabe destacar que con la salvedad del ribosoma, que cataliza la formación de enlaces peptídicos, la totalidad de las ribozimas naturales descritas hasta la fecha se limitan a la catálisis de rotura y/o ligación del enlace fosfodiéster del ácido ribonucleico. Esta catálisis es lograda tanto por la complementariedad de bases como por las interacciones terciarias existentes en los propios RNAs catalíticos, siendo por tanto la estructura terciaria de la ribozima la que conforma el núcleo activo y la especificidad del corte en un punto concreto de la molécula, de forma similar a lo que ocurre en las enzimas proteicas (Doherty y Doudna, 2001).

En cuanto al mecanismo preciso de catálisis de las ribozimas, es similar al descrito para muchas proteínas ribonucleasas, donde el oxígeno 2' de una ribosa ataca al fosfato 3' en una reacción de tipo S_N-2 , provocando la formación de un fosforano bpiramidal próximo al estado de transición. La rotura del enlace con el oxígeno 5' da lugar a un fosfato cíclico 2'-3', y a un extremo 5'-OH. En la reacción inversa (ligación) es el nucleófilo 5'-OH quien ataca al fosfato cíclico para de nuevo dar lugar al enlace fosfodiéster (Timothy *et al.*, 2011) (Figura 1).

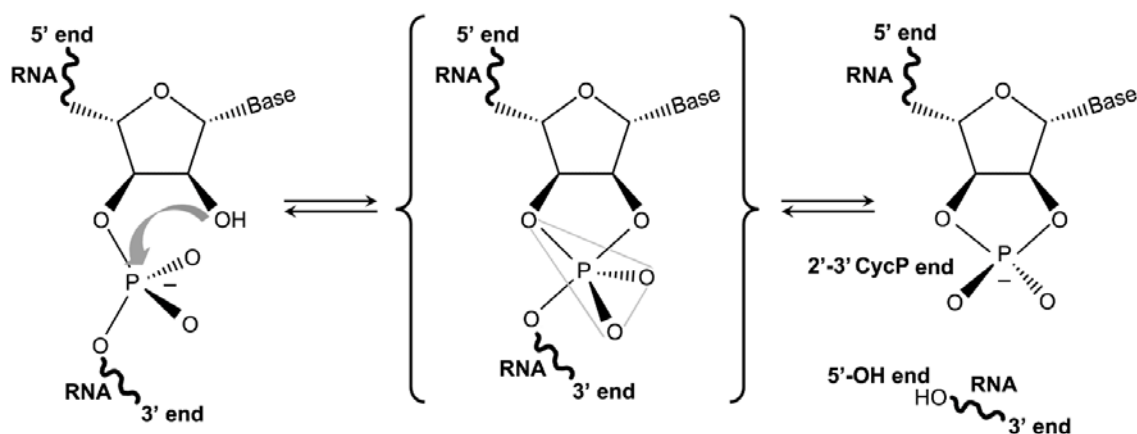


Figura 1: Mecanismo de la reacción de transesterificación del RNA catalizado por las ribozimas de autocorte. Modificado de De la Peña *et al.*, 2017.

El origen evolutivo de las ribozimas aún no ha sido dilucidado, pero sus propiedades catalíticas han proporcionado una nueva visión de la estructura, bioquímica y versatilidad del RNA (Ferré-D'Amaré y Scott, 2010). Todo ello apoya fuertemente la hipótesis del mundo prebiótico basado en el RNA, en la cual se postula que las moléculas precursoras de la vida debieron de ser susceptibles de portar información genética, pero a la vez, ser capaces de desempeñar funciones catalíticas, entre ellas su propia replicación (Gilbert, 1986).

Atendiendo a su función principal, la mayoría de ribozimas naturales pueden separarse en dos grupos (Serganov y Patel, 2007): ribozimas de corte-ligación (*Splicing ribozymes*) y ribozimas de corte (*Cleaving ribozymes*), pudiendo ser así mismo de actividad *cis* o *trans*.

Las ribozimas de corte en *cis* constituyen la familia de ribozimas pequeñas (entre 50 y 150 nucleótidos) de autocorte, también denominadas ribozimas nucleolíticas, ya que realizan su autoescisión entre dos nucleótidos concretos.

1.2 Ribozimas pequeñas de autocorte

Englobadas bajo este término se encuentran hasta el momento nueve familias diferentes de ribozimas naturales: las ribozimas cabeza de martillo (*hammerhead* o HHR), horquilla (*hairpin* o HPr), ribozimas del agente delta del virus de la hepatitis humana (HDV), ribozima del satélite varkud (VS), ribozima de la glucosamina-6-fosfato sintasa (glms), twister (Tw), twister sister (TwS), hatchet y pistol.

Durante años estas ribozimas se han considerado fósiles vivientes, remanentes del mundo RNA, y cuya presencia actual estaba restringida a los genomas de RNA de ciertos agentes infecciosos subvirales como viroides y satélites virales. Sin embargo,

recientemente se ha encontrado que las ribozimas pequeñas de autocorte se hallan dispersas en los genomas de todo tipo de organismos, desde virus y procariontes hasta eucariotas, incluido el ser humano.

1.2.1 Ribozima de cabeza de martillo (HHR)

Las ribozimas de cabeza de martillo, HHR, fueron las primeras ribozimas descritas en la literatura dentro de la familia de las ribozimas pequeñas de autocorte.

Originalmente, el motivo HHR fue descubierto formando parte del RNA de satélites virales (Prody *et al.*, 1986) y viroides (Hutchins *et al.*, 1986), donde participa en el procesamiento de los transcritos multiméricos resultantes de la replicación por círculo rodante, típica de estos agentes infecciosos. Posteriormente, esta ribozima fue hallada en el DNA repetitivo de los genomas de animales tan dispares como tritones (Epstein *et al.*, 1987), tremátodos (Ferbeyre *et al.*, 1998) y grillos de cueva (Rojas *et al.*, 2000). Más recientemente, se demostró la existencia de ribozimas HHR en genomas de organismos distribuidos por todo el árbol de la vida (De la Peña y García-Robles, 2010a), incluyendo el ser humano (De la Peña y García-Robles, 2010b), convirtiendo a HHR en la ribozima pequeña de autocorte con mayor dispersión en la biosfera (Hamman *et al.*, 2012).

En cuanto a su estructura, la ribozima HHR presenta tres hélices (nombradas como hélices I, II y III), dos de las cuales están cerradas con bucles terminales (bucles 1, 2 y 3) (Figura 2A). Estas hélices se disponen en torno a un centro catalítico compuesto por 15 nucleótidos esenciales para la catálisis, y por tanto, muy conservados en todas las isoformas de la ribozima HHR (Figura 2). La disposición de las hélices en torno al centro catalítico favorece la adopción por parte de la ribozima de una forma de letra gamma (γ) donde el bucle 1 interactúa de manera terciaria con el bucle 2 (De la Peña *et al.*, 2003). Dependiendo de qué hélice presente los extremos 3' y 5' del RNA, la ribozima presentará una conformación u otra, existiendo tres posibles tipos de HHR (tipo I, II o III) (Figura 2B).

Las primeras estructuras cristalizadas de la ribozima HHR (Pley *et al.*, 1994; Scott *et al.*, 1995) correspondieron a una ribozima artificial mínima (carente de ambos bucles 1 y 2). Estos cristales mostraron el centro catalítico en un estado llamado “pre-catalítico” que necesitaba una importante reordenación para que los residuos esenciales llegaran a atacar al residuo diana. Esta incongruencia fue resuelta en 2003, cuando se describieron las interacciones terciarias existentes entre las hélices I y II de HHR, que permitían la correcta estabilización del sitio activo, acelerando así el autocorte en condiciones fisiológicas donde existe una baja concentración de magnesio (De la Peña *et al.*, 2003; Khvorova *et al.*, 2003). Esta reorganización del centro activo derivada de dichas interacciones terciarias se confirmó definitivamente con la resolución de la estructura cristalográfica de una ribozima natural completa (Matrick y Scott, 2006). En este nuevo cristal la posición óptima de todos los residuos implicados en el centro

activo, estabilizado gracias a las interacciones terciaras de los bucles, permitió conformar definitivamente el modelo de catálisis como de tipo ácido-base.

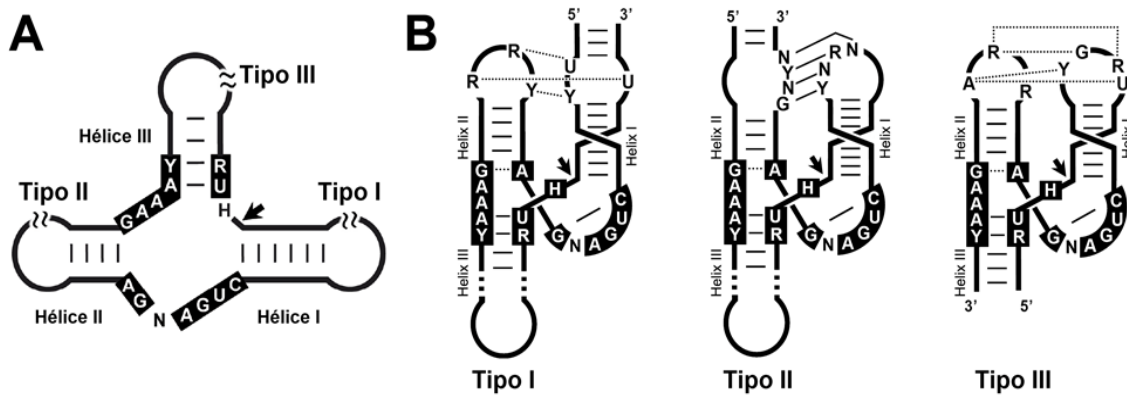


Figura 2: **A** Representación clásica de la estructura secundaria de la ribozima de cabeza de martillo, HHR. Las hélices I, II y III rodean a un centro catalítico de 15 nucleótidos, de los que 13 están altamente conservados (cajas negras), donde R representa bases púricas e Y bases pirimidínicas. **B** Representación de la estructura secundaria y terciaria de los tres tipos de ribozimas HHR naturales descritos. Las interacciones habituales entre los bucles de las hélices I y II están señaladas con líneas punteadas (apareamientos no Watson-Crick) o con líneas sólidas (apareamientos Watson-Crick). Modificado de De la Peña *et al.*, 2017.

Las posibles funciones biológicas que justifiquen la presencia de HHRs en los genomas de multitud de organismos, tanto eucariotas como procariotas son, por el momento, poco conocidas. Algunas de las HHRs en eucariotas aparecen a menudo ligadas a diferentes clases de transposones, tanto autónomos, como por ejemplo en los elementos Penélope (Cervera y De la Peña, 2014), como no autónomos, por ejemplo en los llamados retrozimas de plantas (Cervera *et al.*, 2016), objeto de parte de este trabajo. Otras HHRs se han encontrado muy conservadas dentro de regiones no codificantes de genes de vertebrados como reptiles, aves y mamíferos, dentro de UTRs (Martick *et al.*, 2008) o intrones (De la Peña y García-Robles, 2010b), postulándose que podrían tratarse de nuevas formas de regulación genética adquiridas a través de la domesticación de las ribozimas de retroelementos presentes en metazoos inferiores (García-Robles *et al.*, 2012; Hamman *et al.*, 2012).

1.2.2 Ribozima twister (Tw)

Mediante análisis bioinformáticos, en 2014 se identificó un nuevo pequeño motivo de RNA autocatalítico altamente conservado en genomas de procariotas y de algunos eucariotas (Roth *et al.*, 2014). A partir de 2690 variantes de secuencia de estos motivos se dedujo una estructura consenso formada por una región apareada interrumpida por bucles y/o hélices

intermedias (Figura 3), dando como resultado tres posibles bucles (L1, L2 y L4) separados por tres regiones apareadas (hélices P1, P2 y P4), y estando el punto de corte localizado en el bucle L1. Sin embargo, la mayoría de motivos ribozimáticos de este tipo, presentan una hélice adicional, P3, en la región 5' de L2, y en un menor número de casos una hélice P5 en su región 3' (Figura 3).

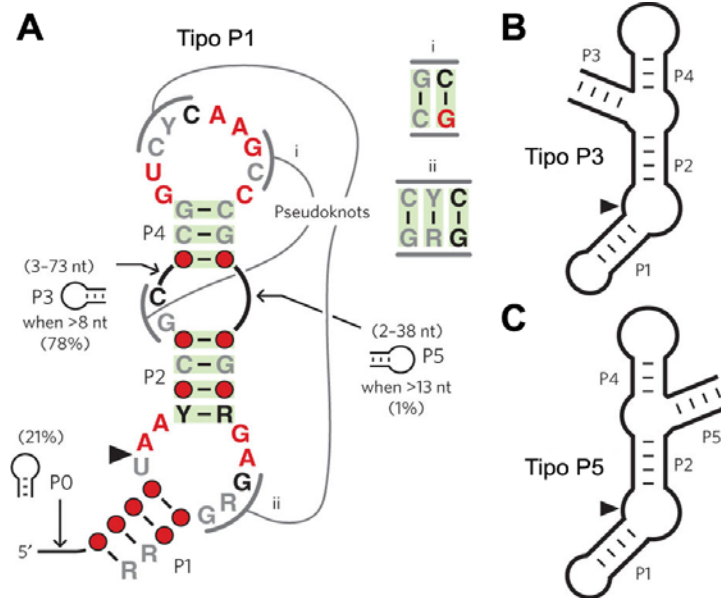


Figura 3: Estructuras consenso de la ribozima Tw. Las puntas de flecha representan los puntos de autocorte del RNA. **A:** Estructura consenso de Tw en conformación tipo P1 basada en 2690 secuencias. Los nucleótidos grises, negros y rojos indican un alto porcentaje de conservación, 75%, 90% y 97%, respectivamente. Los nucleótidos no conservados a nivel de secuencia son representados mediante círculos. La sombra verde indica apareamiento predicho en base a la covariación natural. La letra R se corresponde con bases púricas e Y se corresponde con bases pirimidínicas. Los pseudonudos predichos están señalados como "i" y "ii". Los porcentajes entre paréntesis muestran la cantidad de ribozimas que eventualmente pueden presentar estructuras extras no presentes en la consenso, así como el tamaño de estas estructuras. **B y C:** Estructura consenso en conformación P3 y P5 respectivamente. Modificado de Roth *et al.*, 2014.

Análisis estructurales y filogenéticos indican la existencia de interacciones terciarias entre nucleótidos de los bucles L1, L2 y L3, lo que permite la formación de dos pseudonudos. Esta conformación del motivo tan característica le valió a este nuevo ribozima el nombre de twister (Tw) (Roth *et al.*, 2014). Atendiendo a qué hélice contenga los extremos 5' y 3' del RNA, y de forma similar a lo descrito para la ribozima HHR, Tw puede presentar tres conformaciones posibles, denominadas tipo P1, tipo P3 o tipo P5.

En 2014 se consiguió resolver la estructura cristalográfica de una Tw mínima que no contenía las hélices P3 ni P5. Esta ribozima, correspondiente a la descrita en el genoma de arroz (*Oryza sativa*), confirmó la existencia de los pseudonudos entre bucles, así como el posible mecanismo catalítico de este RNA (Figura 4) (Liu *et al.*, 2014). Dicho

mecanismo de catálisis correspondía a una reacción ácido-base (Figura 1) idéntico al propuesto para otras ribozimas pequeñas de autocorte (Roth *et al.*, 2014), y que no requiere de la presencia de metales divalentes para llevarse a cabo.

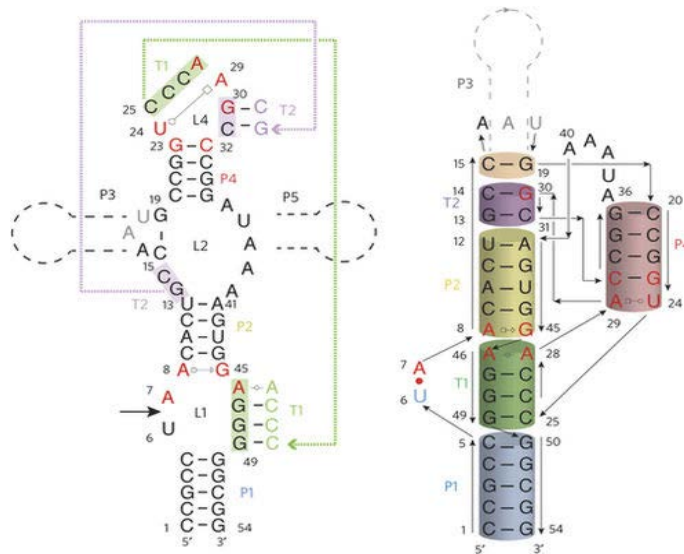


Figura 4: **Izquierda:** Secuencia de la estructura mínima cristalizada de la ribozima Tw de *O. sativa*. El punto de corte queda indicado mediante una flecha negra. Las interacciones entre bucles vienen señaladas por flechas de colores, así como los nucleótidos necesarios para dichas interacciones. La posición de las hélices P3 y P5 de otras ribozimas Tw está señalada mediante líneas discontinuas. En rojo se muestran aquellos nucleótidos conservados en más de un 97%. **Derecha:** Ilustración esquemática de las interacciones terciarias de la ribozima Tw de *O. sativa*. Modificado de Liu *et al.*, 2014.

1.2.3 Ribozimas del agente delta de la hepatitis humana (HDV)

El agente delta de la Hepatitis humana (HDV) es un RNA satélite del virus B de la Hepatitis humana (HBV). Pese a ser un patógeno propio de los seres humanos el HDV comparte características con viroides y satélites virales vegetales como son el pequeño tamaño de su genoma (1679 nt), el hecho de ser una molécula de RNA circular y la presencia de ribozimas de autocorte en ambas polaridades del RNA genómico. Estas ribozimas se encuentran implicadas en el procesamiento de las copias multiméricas del genoma viral, que sigue un mecanismo de replicación de círculo rodante (Been et Wickham, 1997). En cuanto a la estructura secundaria de las ribozimas HDV, estas están formadas por cinco regiones helicoidales (P1.1, P1, P2, P3 y P4) (Figura 5), formando un doble pseudonudo entre P1.1 y P2.

En genomas eucariotas se detectaron bioinformáticamente multitud de estas ribozimas HDV (Webb *et al.* 2009) que a menudo se localizaban en las regiones 5' UTR de retrotransposones tipo LINE, indicando una posible implicación de estos motivos ribozimáticos en el procesamiento de elementos móviles (Eickbush y Eickbush, 2010).

Estudios sobre el procesamiento de este extremo 5' de retrotransposones LINE parecen también indicar que las ribozimas tipo HDV actuarían a diferentes niveles durante la retrotransposición, no solo procesando el extremo 5' del RNA del transposón, sino también actuando como promotores en la traducción del marco de lectura abierto (ORF) del retroelemento, y facilitando su inserción en un nuevo locus genómico (Bibillo *et al.*, 2004; Ruminiski *et al.*, 2011).

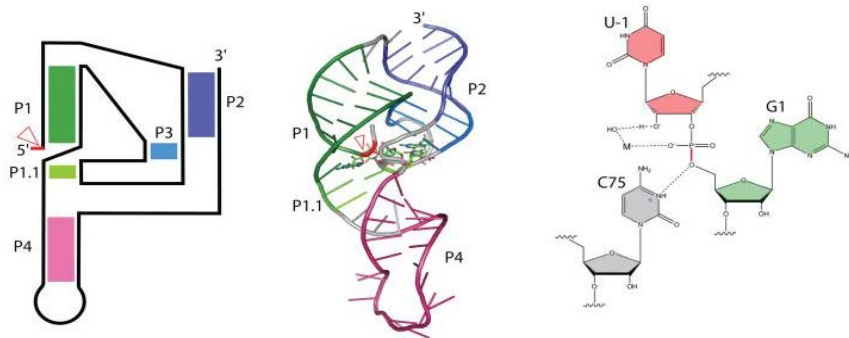


Figura 5: **Izquierda:** Esquema de la estructura canónica de las ribozimas tipo HDV. El triángulo rojo indica el punto de corte, mientras que las bandas coloreadas marcan cada hélice. **Centro:** Representación de la ribozima HDV mínima cristalizada, los colores, y símbolos indican regiones equivalentes a las marcadas en la Imagen izquierda. **Derecha:** modelo del sitio de autocorte de la ribozima HDV donde se resaltan las interacciones de los nucleótidos clave en la reacción. Modificado de Jiménez *et al.*, 2015.

1.3 Retrotransposones y su relación con las ribozimas pequeñas de autocorte

Los elementos transponibles (TEs) son secuencias de DNA capaces de desplazarse a través del genoma gracias a su capacidad para duplicarse o escindirse, e insertarse en otro punto diferente al de partida, dentro del material genético celular. Más allá del interés que pueda suscitar su origen evolutivo o los efectos, normalmente deletéreos, que su inserción pueda acarrear en el genoma del organismo que los porta, estos elementos son un objetivo de estudio primordial si se considera que el componente mayoritario de los genomas eucariotas son TEs, especialmente en vegetales, donde por ejemplo cerca del 80% del genoma de maíz está compuesto por estos elementos móviles (Schnable *et al.*, 2009; Bennetzen *et al.*, 2005; Morgante *et al.*, 2005). Esta enorme cantidad de material genético no directamente asociado a ninguna función biológica concreta, es una de las explicaciones clave para la “paradoja del valor C” por la cual el tamaño del genoma de un organismo no es proporcional a su complejidad fisiológica (Feschotte *et al.*, 2002).

Los TEs se dividen en dos grandes clases: retrotransposones (TE de clase I), que presentan un intermediario de RNA propagándose vía retrotransposición e integrándose como cDNA, y transposones (TE de clase II), cuyo intermediario es una molécula de DNA. En los retrotransposones dichos pasos de retrotranscripción y

posterior integración del cDNA se llevan a cabo mediante una retrotranscriptasa (RT) y una endonucleasa/integrasa (EN/IN), codificadas por el propio retrotransposón en caso de que este sea autónomo (en *cis*), o por otro elemento transponible si el retrotransposón es de los llamados no-autónomos (en *trans*).

Los retrotransposones a su vez pueden dividirse en 5 grupos, atendiendo a su estructura y modo de integración (Wicker *et al.*, 2007): retrotransposones LTR (por *Long Terminal Repeats*), DIRS, PLEs (por *Penelope-Like Elements*), LINEs y SINEs (por *Long y Short Interspersed Nucleotide Elements* respectivamente).

Orden	Superfamilia	Estructura	TSD	Código	Presencia
LTR	<i>Copia</i>	→ GAG AP INT RT RH →	4-6	RLC	P, M, F, O
	<i>Gypsy</i>	→ GAG AP RT RH INT →	4-6	RLG	P, M, F, O
	<i>Bel-Pao</i>	→ GAG AP RT RH INT →	4-6	RLB	M
	<i>Retrovirus</i>	→ GAG AP RT RH INT ENV →	4-6	RLR	M
	<i>ERV</i>	→ GAG AP RT RH INT ENV →	4-6	RLE	M
DIRS	<i>DIRS</i>	→ GAG AP RT RH YR ←	0	RYD	P, M, F, O
	<i>Ngaro</i>	→ GAG AP RT RH YR → → →	0	RYN	M, F
	<i>VIPER</i>	→ GAG AP RT RH YR → → →	0	RYV	O
PLE	<i>Penelope</i>	← RT EN →	Variable	RPP	P, M, F, O
LINE	<i>R2</i>	RT EN	Variable	RIR	M
	<i>RTE</i>	APE RT	Variable	RIT	M
	<i>Jockey</i>	ORF1 APE RT	Variable	RIJ	M
	<i>L1</i>	ORF1 APE RT	Variable	RIL	P, M, F, O
	<i>I</i>	ORF1 APE RT RH	Variable	RII	P, M, F
SINE	<i>tRNA</i>		Variable	RST	P, M, F
	<i>7SL</i>		Variable	RSL	P, M, F
	<i>5S</i>		Variable	RSS	M, O

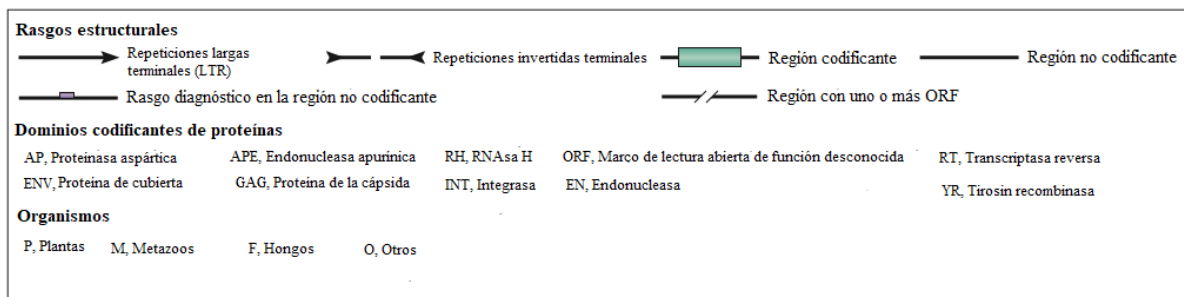


Figura 6: Representación esquemática de los elementos genéticos móviles de tipo I (retrotransposones) según su orden y superfamilia. Modificado de Wicker *et al.*, 2007.

El grupo de los retrotransposones tipo LINE está compuesto por elementos autónomos con un marco de lectura abierto (ORF) que codifica tanto la RT como la EN, además de un promotor interno de la RNA polimerasa II en su región 5', el cual permite la transcripción del retroelemento completo (Kapitonov *et al.*, 2009).

El mecanismo de retrotransposición e integración de los elementos LINE es de tipo transcripción reversa mediada por diana (*target-primed reverse transcription*) (TPRT), por el cual un corte en el DNA diana (TSD) deja un extremo 3' hidroxilo libre que funciona como cebador para la transcripción reversa del RNA codificado por el elemento.

Se han descrito diferentes tipos de retrotransposones LINE: como los retroelementos R2, Jockey, L1, I y los RTEs, tratados en este trabajo, entre otros (Wiker *et al.*, 2007). Estos retroelementos tipo RTE se caracterizan por codificar una endonucleasa apurinica-apirimidínica (APE) en el dominio N-terminal de la RT y por dar lugar a diversos ejemplos de transferencia horizontal (Adelson *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2017; Kordis y Gubensek, 1997).

En cuanto a los retroelementos LTR, los retrotransposones más abundantes en los genomas de plantas, se caracterizan por presentar en ambos extremos 5' y 3' secuencias llamadas repeticiones largas terminales (*Long-Terminal-Repeats*) (LTR). En el caso de que el retrotransposón LTR sea autónomo, podrá codificar hasta cinco proteínas: un antígeno específico de grupo (GAG), una proteasa, una integrasa, una transcriptasa inversa y una ribonucleasa H. En las superfamilias Retrovirus y ERV también existe información para una proteína de cubierta.

En 2016 se encontró en diversos genomas de plantas un nuevo elemento LTR no perteneciente a ninguna de las superfamilias descritas con anterioridad. Por tratarse de un retrotransposón no autónomo que portaba ribozimas HHR se le denominó retrozima (Cervera *et al.*, 2016). En estos retrozimas cada HHR se encuentra inmersa en una de las dos secuencias repetidas (las regiones LTR) que se sitúan en los extremos del retrotransposón (Figura 7). Estas dos LTRs se encuentran separadas entre sí por secuencias no codificantes de entre 600-1000 pb que presentan una alta variabilidad incluso en especies filogenéticamente cercanas. A su vez el retrozima se encuentra flanqueado por TSDs de 4 pb, características de los retrotransposones tipo LTR (Figura 7)

Los extremos 5' y 3' de las LTRs, así como los motivos de unión al cebador (PBS) y las regiones de polipurinas (PPT) presentes en los retrozimas, son muy similares a los descritos en los retroelementos LTR del tipo Ty3-gypsy (Figura 7). Este hecho sugiere que la maquinaria codificada por estos transposones autónomos podría ser la responsable de la retrotransposición de los retrozimas, ya que estos carecen de información codificante para cualquier proteína. Además, se encontró que los retrozimas siguen un patrón transcripcional peculiar al acumularse en la célula en forma de RNAs circulares (circRNA) y lineales del tamaño delimitado por sus HHRs (Figura 8), tal y como se ha hallado en diferentes tejidos mediante análisis por hibridación northern blot y RT-PCR (Cervera *et al.*, 2016).

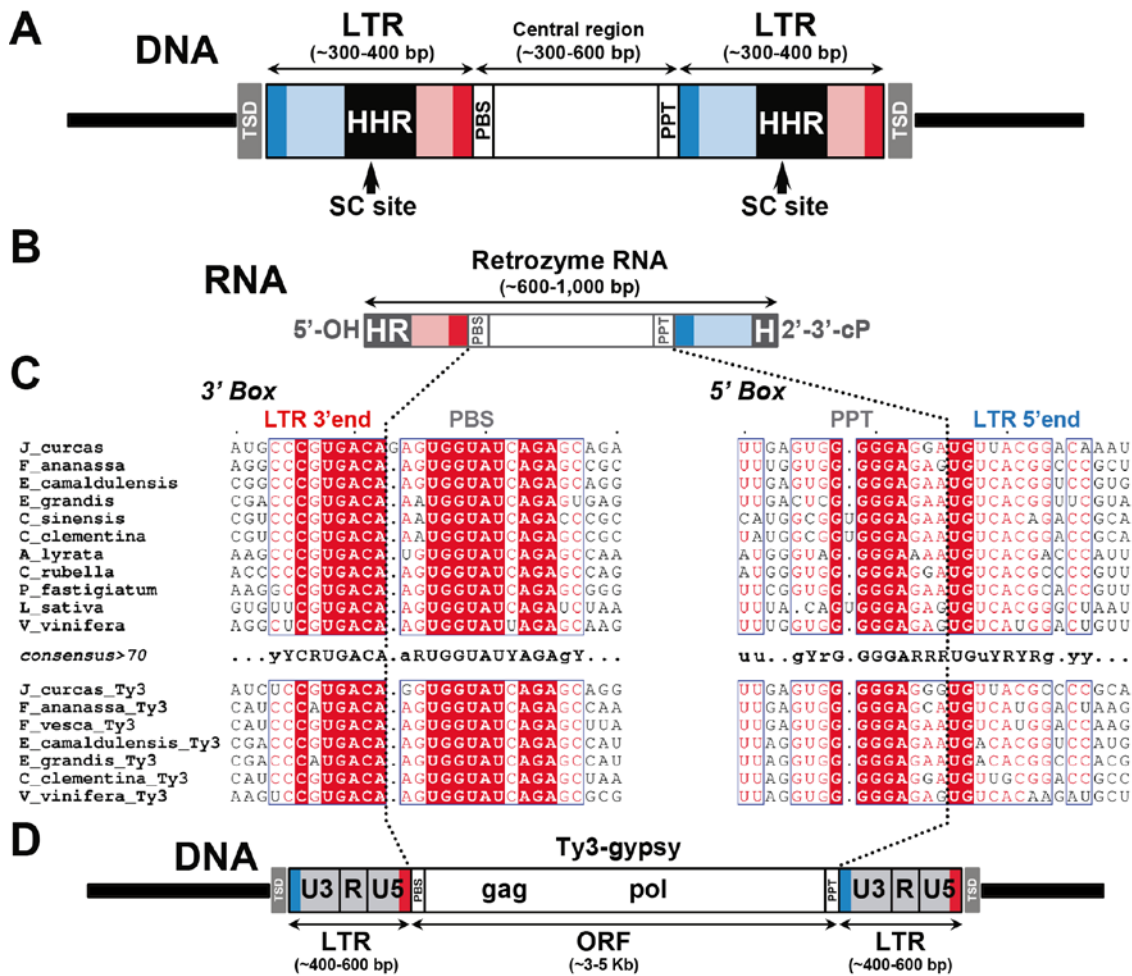


Figura 7: A: Representación esquemática de los retrozimas genómicos de plantas. La secuencia del retrozima está flanqueada por los motivos TSDs, representados en gris y por las secuencias repetidas propias de los elementos LTR en azul (5') y rojo (3'). Se indican los motivos de unión al cebador (PBS) y las regiones de polipurinas (PPT). La región central, representada en blanco, corresponde a la secuencia variable no codificante. El punto de corte de cada motivo se indica con una flecha. B: RNA derivado del retrozima tras la mediación del corte por los motivos HHR. C: Alineamiento que muestra la homología existente entre los retrozimas (arriba), y los retrotransposones tipo Ty3-gypsy (abajo) en diferentes especies vegetales. La secuencia consenso se muestra en el medio, donde las bases totalmente conservadas (100% de homología) se muestran en mayúsculas, mientras que las conservadas por debajo del 70% se muestran como puntos. D: Esquema de los retrotransposones Ty3-gypsy típicos de genomas de plantas. La región LTR se representa en gris, estando dividida en tres fragmentos, U3, U5 y R, necesarios para la retrotransposición del elemento. Las cajas 5' y 3' conservadas se muestran en azul y rojo, respectivamente. Las proteínas codificadas por estos elementos quedan indicadas como GAG y Pol. Modificado de Cervera *et al.*, 2016.

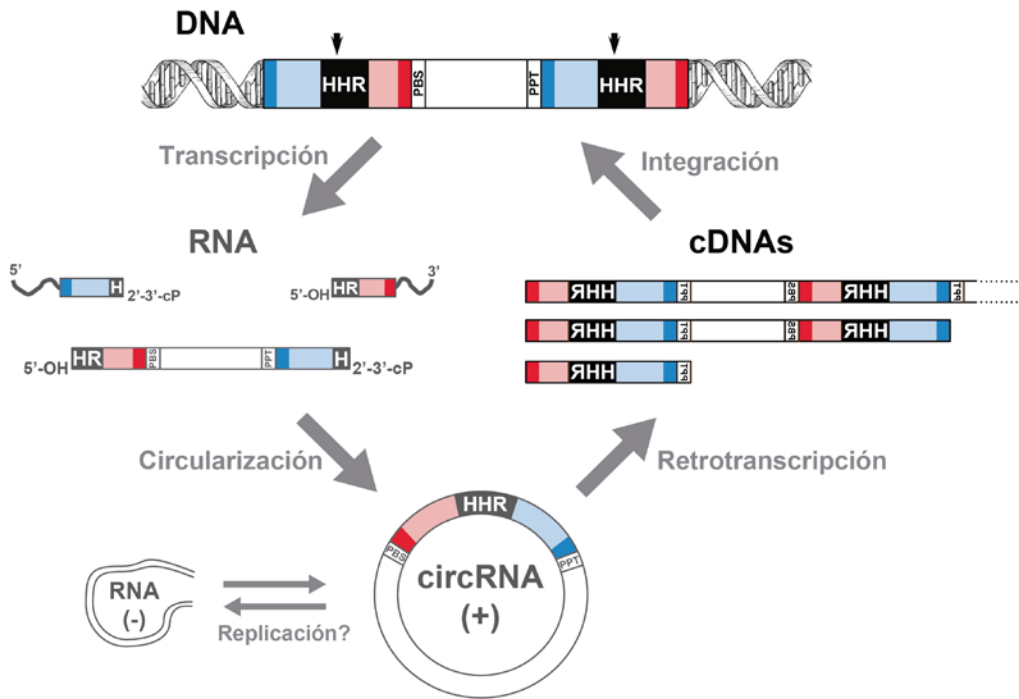


Figura 8: Modelo del ciclo de retrotransposición de los retrozimas. Durante la transcripción del retrozima genómico ambos motivos HHR mediarían su autocorte para dar un RNA lineal. Los extremos libres de esta forma lineal serían ligados para dar un RNA circular que pueda ser replicado y tomado como molde para la retrotranscriptasa de un retrotransposón autónomo, lo que permitiría la obtención de cDNAs completos y su posterior integración genómica. Modificado de Cervera *et al.*, 2016.

Los retrozimas presentan una distribución irregular por los diferentes genomas vegetales siendo frecuentes en ciertas especies pero estando totalmente ausentes en su forma activa en otras cercanas filogenéticamente. Por ejemplo, el genoma de berenjena (*Solanum melongena*) contiene más de 150 motivos HHR funcionalmente activos, mientras que en otras solanáceas cercanas, como el tomate o la patata no se han podido detectar.

En el trabajo de Cervera *et al.* (2016), se describieron 90 ribozimas HHR en el genoma de fresa (*Fragaria ananassa*). Mediante análisis por hibridación northern blot de extractos de RNA procedentes de hojas y flores se demostró que los transcritos del retrozima de polaridad positiva se acumulan de forma abundante, con más de 0.1 ng de RNA del retrozima por μg de RNA total (Figura 9).

La clonación y secuenciación de estos RNAs mostró que estas intermediarios circulares presentan una alta variabilidad de secuencia, de forma similar a lo descrito en retrozimas de otras especies vegetales (Cervera *et al.*, 2016). La heterogeneidad de estos circRNAs sugiere que podrían estar sufriendo un proceso de replicación de círculo rodante llevada a cabo por polimerasas proclives a errores, o que podrían estar siendo sometidos a intensos procesos de edición del RNA.

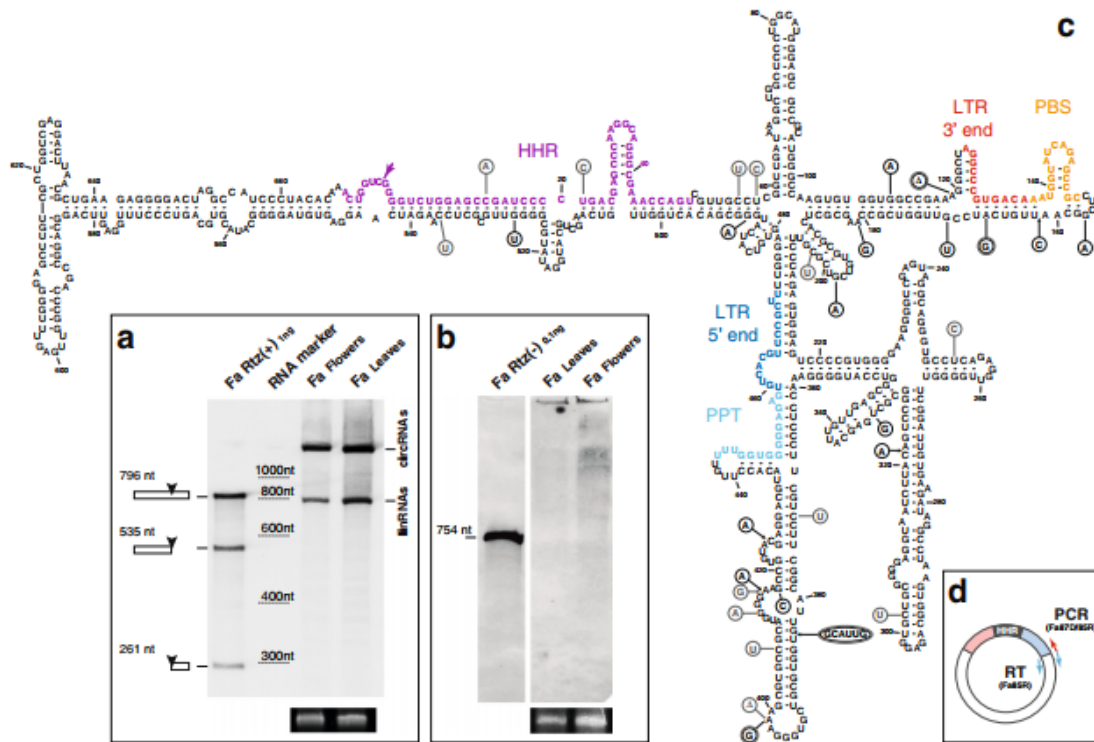


Figura 9: Retrozima de *F. ananassa*. **A:** Northern blot de RNA extraído de hojas y flores de fresa en condiciones nativas. **B:** Northern blot del RNA desnaturalizado. **C:** Estructura secundaria según su mínima energía libre del circRNA del retrozima de *F. ananassa* procedente de hoja. El motivo HHR se marca en púrpura, mientras que la regiones LTR 5' y 3' Se indican en azul y rojo respectivamente. Las secuencias del PPT y el PBS quedan a su vez en azul y naranja. Los círculos indican puntos de variabilidad entre los clones encontrados en diferentes tejidos o ejemplares, correspondiendo las flechas a inserciones y los triángulos a deleciones. **D:** Representación esquemática del circRNA del retrozima. Se indican con flechas la posición de los cebadores utilizados para los experimentos basados en PCR. Modificado de Cervera *et al.*, 2016.

Los retrozimas no son el único caso de elementos transponibles que contienen motivos riboenzimáticos de autocorte en su secuencia, se han descrito también ribozimas en retrotransposones tipo LINE, concretamente ribozimas HDV asociadas al extremo 5' del elemento R2 (Eickbush y Eickbush, 2010; Ruminski *et al.*, 2011) y otras pequeñas ribozimas de autocorte dentro de RTEs, así como ribozimas HHR en elementos PLE (Cervera y De la Peña, 2014) y en retrotransposones LTR como las retrozimas (Cervera *et al.*, 2016). Todo esto parece indicar una conexión directa entre la familia de las ribozimas pequeñas de autocorte y la retrotransposición del DNA en eucariotas (De la Peña *et al.*, 2017).

2. OBJETIVOS

En este trabajo se persiguieron dos objetivos principales centrados en la caracterización de dos tipos de ribozimas genómicas de plantas:

- I) Estudiar la dispersión del motivo catalítico Tw dentro de los genomas vegetales, así como determinar su eficiencia catalítica y valorar su posible papel biológico.

- II) Poner a punto la técnica de transformación genética de *Arabidopsis thaliana* y obtener distintas construcciones del retrozima procedente de *Fragaria ananassa* para conseguir líneas de expresión estable con las que realizar experimentos in vivo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ribozima twister

3.1.1 Extracción del DNA genómico de *Malus domestica*

El material genético de *M. domestica* de las variedades Granny y Brookfield fue obtenido a partir de tejido foliar de ejemplares adultos y sanos procedentes de invernadero. La obtención del DNA se llevó a cabo mediante extracción por cloroformo-CTAB (modificado de Dhakshanamoorthy y Selvaraj, 2009). Se tomaron 0.2g de tejido de cada variedad, que fueron triturados mediante fricción con vástago en 500 µl de tampón CTAB precalentado a 60°C. Las muestras fueron incubadas a 60°C durante una hora. Posteriormente se centrifugaron 5 minutos a 12.000g y 4°C para eliminar los restos celulares. El sobrenadante fue tratado con 500 µl de cloroformo-alcohol isoalímico (24:1 (v/v)). Se agitó en vortex y se centrifugó 5 minutos a 12.000 g y 4°C. La fase acuosa se pasó a un nuevo tubo donde se añadió etanol al 96% y AcNa a 120 µM. Se incubó durante 10 min aprox. a -80°C y posteriormente se centrifugó durante media hora a 4°C y 20.000 g. El sobrenadante fue decantado y el precipitado, una vez eliminado el resto de etanol, resuspendido en 50 µl de agua miliQ.

3.1.2 Clonación del motivo Tw dentro del genoma de *Malus*

Se realizó una PCR sobre el genoma con cebadores fosforilados (Anexo I) próximos a los dominios Tw hallados informáticamente, obligando al cebador reverso a presentar una diana EcoRI que permitiera la clonación dentro del plásmido pBlueScript KS+. La PCR se llevó a cabo en un volumen de reacción de 50ul con una concentración de DNA de 4 ng y utilizando la enzima PrimeSTAR (Takara Bio INC.) como polimerasa. El producto de PCR fue llevado a electroforesis en un gel de poliacrilamida nativo (poliacrilamida 5%, TAE (Tris 4 mM, ácido acético 190 µM, EDTA 0.1 mM, pH 7,5)). Las bandas correspondientes al motivo Tw fueron cortadas para su extracción de la matriz del gel mediante homogeneización física y tratamiento con fenol:cloroformo:alcohol isoalímico (25:24:1) (Sambrock y Russell, 2006), para después precipitarse con etanol. Los amplicones purificados se insertaron en las dianas EcoRI y BamHI del plásmido pBlueScript KS+. En cuanto a las construcciones mutantes fueron obtenidas bien por PCR o bien sintetizadas químicamente (gBlock Gene Fragment, IDT. USA).

3.1.3 Transformación bacteriana, minipreps y midipreps

Tras la clonación de las construcciones de interés estas se utilizaron para transformar bacterias *E.coli* DH5α quimiocompetentes mediante el sistema de choque térmico (5

min en hielo; 1 min a 42°C; 2 min en hielo), para después dejar crecer el cultivo a 37°C durante media hora y proceder a plaquearlo sobre LB con el antibiótico de selección, en este caso ampicilina 50 µg/ml.

Para la obtención de muestra que poder secuenciar a fin de comprobar la integridad de la secuencia Tw, se llevaron a cabo minipreps mediante kit comercial (High Pure Plasmid Isolation Kit, Roche). Se procedió de igual manera para obtener material para la transcripción, mediante midipreps por kit commercial (Roche).

3.1.4 Transcripciones y cinéticas transcripcionales (*Run-off transcription*)

Para poder proceder a la transcripción el plásmido portador de las diversas construcciones Tw fue linearizado mediante digestión por EcoRI (Takara) durante 3h a 37°C. Las reacciones de transcripción contenían un tampón compuesto por: Tris-HCl 40 mM pH8, MgCl₂ 6 mM, espermidina 2 mM, albúmina de suero bovino 0,5 mg/ml libre de ARNasa, Triton X-100 al 0.1%, ditiotretitol 10 mM, UTP 1 mM, CTP 1 mM, ATP 1 mM (o [α-32P] ATP para la obtención de transcritos marcados radiactivamente) y GTP 1 mM; 0.4 U/µl de inhibidor de la ribonucleasa hepática porcina (Takara), así como 20 ng/µl de DNA plasmídico y 4 U/µl de la RNA polimerasa del fago T7 (Takara).

En el caso de las cinéticas co-transcripcionales se tomaron alícuotas a diferentes tiempos poniendo fin a la reacción mediante la adición del tampón de parada (8 M urea, 50% formamida, 50 mM EDTA, 0.1% cianol de xileno y azul de bromofenol) en un volumen dos veces superior al tomado en la alícuota, para inmediatamente después incubarse en hielo. Los productos de la transcripción fueron separados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizantes (Poliacrilamida 5%, urea 8 M, TBE 89 mM). Antes de cargar las muestras en el gel estas eran desnaturalizadas previamente sometiéndolas a 98°C durante 2 minutos para después pasar a hielo. Los geles fueron revelados mediante tinción con bromuro de etídio o en el caso de transcripciones en presencia de nucleótidos marcados radiactivamente, mediante fotoestimulación del P-32 y visionado en FLA-5100 phosphorimager (Fujifilm) con placas de Imagen BAS-MP 2040S (Fujifilm).

En el caso de las transcripciones para obtener transcritos de RNA completos necesarios para los estudios de cinéticas postranscripcionales, la banda correspondiente al tamaño del transcrito completo fue cortada y eluida de la matriz del gel RNA.

3.1.5 Cinéticas postranscripcionales

A partir del transcrito completo extraído, se tomó entre 5 y 50 ng de RNA marcado, llevándose a un volumen de reacción de 21 µl con tampón Heppes 0.5 M (pH 7.5) en

tubos non-stick libres de RNAsas (Ambion). El RNA se sometió a desnaturalización durante 2 min a 94°C para lentamente dejar caer la temperatura hasta 25°C. Pasados 15 min a 25°C se tomó una muestra correspondiente al tiempo 0, para después añadir Mg⁺² a 1 mM, dando inicio a la reacción de autocorte. Al tomar cada alícuota la muestra era llevada del tubo de reacción a un nuevo Eppendorf con el doble del volumen tomado de tampón de parada (8 M urea 50% formamida, 50 mM EDTA, 0.1% cianol de xileno y azul de bromofenol) para inmediatamente incubarse a 0°C.

3.2 Retrozima de *Fragaria ananassa*

3.2.1 Puesta a punto del protocolo de transformación de *Arabidopsis thaliana*

Los distintos protocolos ensayados para la esterilización de las semillas aparecen recogidos en la tabla 2 de resultados.

Como medio de germinación *in vitro* se utilizó Murashige & Skoog (Murashige y Skoog, 1962) compuesto por Sacarosa (Merk) 10 g/l, sales MS (Duchefa) 2,15 g/l, 2-Morfolino-etanosulfónico monohidrato (MES) (Merk) 0,5 g/l y 0.7% agar bacteriológico (Duchefa). El medio se esterilizó y el antibiótico fue añadido antes de plaquear, evitando siempre incorporarlo cuando el medio superaba los 45°C. Antes de llevar las placas cerradas a la cámara de cultivo *in vitro* (24°C, 16h de luz, 8h de oscuridad) se mantuvieron durante 24h a 4°C para sincronizar su germinación (estratificación).

3.2.2 Construcciones del retrozima de *Fragaria ananassa* en pMOG800

Se partió de cuatro construcciones con el retrozima de *F. ananassa* clonadas en el vector binario de transformación pMOG800 (Figura 18). El retrotransposón completo empleado, FaRtz, se corresponde con la copia genómica más similar a los RNAs detectados en esta especie (Cervera et al., 2016). El retrozima FaRtz se introdujo tanto en solitario como bajo el control de un promotor doble 35S del virus del mosaico de coliflor (CaMV) y el terminador del inhibidor de la proteinasa de patata (PoPit) (Figura 18). Los retrozimas se clonaron tanto en orientación directa como en reversa con respecto al gen de resistencia a la kanamicina (neomicínfosfotransferasa II) (NptII), en el sitio de clonación múltiple situado dentro del T-DNA del vector binario pMOG800 (Knoester et al., 1998). Las cuatro construcciones con el retrozima FaRtz se utilizaron para la puesta a punto del protocolo de transformación estable de *Arabidopsis thaliana*.

3.2.3 Diseño y obtención de construcciones del retrozima de *F. ananassa* defectivo para el autocorte mediante el sistema GoldenBraid

Se obtuvieron distintas construcciones multigénicas con el retrozima de *F. ananassa* mutado en una de sus HHR, incapaz de llevar a cabo su autocorte, mediante el sistema de ensamblado modular GoldenBraid 3.0 (Vázquez-Vilar *et al.*, 2017). El retrozima mutado se ensambló tanto en solitario como bajo el control de distintos promotores constitutivos (Figura 19), con el gen de resistencia al herbicida glufosinato (BASTA) y con el gen de la proteína verde fluorescente (GFP) en el plásmido binario pDBG3 (Vázquez-Vilar *et al.*, 2017) (Anexo II).

Se partió del mismo retrozima completo de *F. ananassa*, FaRtz, utilizado en las construcciones realizadas en el vector pMOG800, pero conteniendo una mutación (G > T) en uno de los residuos catalíticos de la HHR situada en la LTR en 3' (Figura 20). Esta mutación elimina la capacidad de autocortarse del ribozima (De la Peña *et al.*, 2017), y por tanto de generar un RNA con extremos compatibles con una tRNA ligasa que pudiera catalizar su circularización una vez transcrito (De la Peña y Cervera, 2017).

El retrozima se amplificó por PCR usando cebadores que le añadieron extremos adecuados para ser unido a un promotor y un terminador (clonado como fragmento del gen de interés, fGOI), o para utilizarse directamente como una unidad transcripcional completa (como unidad TU). El protocolo para ambas PCR fue obtenido a partir de la página web del servicio de GoldenBraid cloning (<https://gbcloning.upv.es/>) (Anexo II). Debido a que el retrozima contiene dos secuencias LTR idénticas, los cebadores sugeridos por la web GoldenBraid no resultaron adecuados para amplificar el retrotransposón completo, ya que anillaban en ambas secuencias. Para solucionarlo el retrozima se clonó como dos fragmentos separados (retal 1 y retal 2). La PCR se realizó en un volumen final de 10 µl utilizando 0.1 µl de enzima PrimeSTAR (Takara Bio INC.), 2 µl del tampón comercial para la enzima (Takara Bio INC.), 2.5 mM de dNTPs y 100 µM de los cebadores indicados (Anexo I). La reacción se llevó a cabo durante 30 ciclos de 10 s a 98°C, 10 s a 60°C, y 1 min a 72°C tal y como especifica la página web del servicio de GoldenBraid.

Finalizada la PCR, los productos de la reacción fueron purificados con el kit MSB Spin PCRapace (Strattec Molecular) para eliminar el tampón y demás componentes de la PCR.

Con el retrozima FaRtzM con ambos tipos de extremo (TU y fGOI) se llevó a cabo una reacción de digestión-ligación de cada producto con el plásmido de domesticación pUPD2 (GB0307). El protocolo de reacción fue el indicado por la web del servicio, utilizando para un volumen final de 10 µl, 10 U del enzima de restricción BsmBI (Thermo Fisher Scientific), 3 U de T4 ADN ligasa (Promega), 1 µl del tampón comercial para la ligasa, 75ng del plásmido y 40 ng de cada retal.

Todas las reacciones de digestión-ligación aquí referidas fueron llevadas a cabo en un termociclador durante 25 ciclos a 2 min 37°C y 5 min 16°C, tal y como especifica la web de GoldenBraid.

El plásmido conteniendo el retrozima domesticado se utilizó para transformar bacterias *E.coli* DH5 α , las cuales se seleccionaron por resistencia a cloranfenicol (marcador de selección de pUPD2), para posteriormente aislar los plásmidos realizando una miniprep con el kit EZNA Mini Plasmid Kit I (Omega).

Para obtener la construcción del retrozima FaRtzM como unidad transcripcional (sin promotores, clonada como TU) en el plásmido binario pDBG3 α 1 (parte GB0015), se llevó a cabo una reacción de digestión-ligación multipartita, con 75 ng del retrozima en pUPD2, 75 ng de pDBG3 α 1, 10 U de BSAI (Thermo Fisher Scientific), 3 U de T4 ADN ligasa (Promega) y 1 μ l del tampón comercial para la ligasa, llegando a un volumen final de 10 μ l. En el caso de las construcciones de FaRtzM clonada como fGOI, se incluyeron en la reacción 75 ng del plásmido con el promotor del virus del mosaico de la coliflor (CoMV) P35S (GB0552) y del terminador del CoMV, T35S (GB0036), del promotor del gen de la nopalina sintasa de *A. tumefaciens*, Pnos (GB0555), el terminador del gen de la nopalina sintasa Tnos (GB0037) (Anexo II).

De nuevo se transformó *E. coli* DH5 α con los plásmidos conteniendo las construcciones, seleccionándose con kanamicina (marcador de selección de pDBG3 α 1) y aislándose los plásmidos con una miniprep.

Paralelamente, y debido a que la unidad transcripcional pUPD-Tnos:BASTA:Pnos (GB0023) depositada en el servicio de GoldenBraid se encontraba en un plásmido no compatible con las construcciones de RtzM en pDBG3 α 1, hubo que llevar a cabo una reacción digestión-ligación idéntica a las anteriores para situar la pieza en el vector pDGB3 α 2R que permite cambiar su polaridad y llevar a cabo el ensamblaje con las construcciones de FaRtzM. Tras la miniprep correspondiente para la TU de BASTA, se llevó a cabo una reacción digestión-ligación bipartita entre las construcciones de FaRtzM en pDBG3 α 1 y la TU de BASTA en pDGB3 α 2R, incluyendo como vector de destino el plásmido binario pDGB Ω 1 (GB0019), de nuevo añadiendo 75 ng de las construcciones en pDBG3 α 1, 75 ng de la construcción de BASTA en pDGB3 α 2R, 75 ng de pDGB Ω 1, 10 U de BsBI (Thermo Fisher Scientific), 3 U de T4 ADN ligasa (Promega) y 1 μ l del tampón comercial para la ligasa, enrasando a 10 μ l finales.

Además, para añadir el gen de la GFP a la construcción con FaRtzM y el gen de resistencia a glufosinato, primero se pasó la unidad transcripcional pDGB1 α 1-P35S:GFP:Tnos (GB0359) al plásmido pDGB3 Ω 2 (GB0021). Para ello se realizó otra reacción digestión-ligación entre la TU GFP y el vector mediador SF Twister (GB1236), con el vector pDGB3 Ω 2 como destino, utilizando para 10 μ l de reacción 75 ng de cada parte, 10 U de BsBI (Thermo Fisher Scientific), 3 U de T4 ADN ligasa (Promega) y 1 μ l del tampón comercial para la ligasa.

Finalmente se ensamblaron las tres TUs mediante una última reacción digestión-ligación bipartita con las distintas construcciones de FaRtzM más BASTA y la TU de

GFP, con pDBG3 α 1 como vector de destino, igualmente en una reacción de 10 μ l utilizando 75 ng de cada construcción, 75 ng del plásmido destino pDGB α 1, 10 U de BsaI (Thermo Fisher Scientific), 3 U de T4 ADN ligasa (Promega) y 1 μ l del tampón comercial para la ligasa (Figura 17).

Todas las partes de GoldenBraid, así como los vectores utilizados, fueron cedidos amablemente por el equipo de Diego Orzáez.

3.2.4 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* con vectores binarios de expresión

Las bacterias electrocompetentes de *A. tumefaciens* LB C58 o LBA 4044 se transformaron con las distintas construcciones en el plásmido binario mediante electroporación. Se tomaron alícuotas de 100 μ l de las bacterias congeladas con glicerol 10% ((v/v)), a las que se les añadió 100 ng de plásmido. Tras 5 minutos de incubación en hielo, los cultivos fueron transferidos a cubetas de electroporación de 2 mm (Bio-Rad) donde recibieron un pulso eléctrico de 50 μ F, 1.8 Kv, 150 Ω (MicroPulser, Bio-Rad). Inmediatamente después del pulso se añadió 1 ml de LB atemperado a 28°C. Tras una incubación de 2h a 28°C las alícuotas fueron plaqueadas en LB agar con 50 μ g/ml de kanamicina y 50 μ g/ml de rifampicina.

3.2.5 Transformación estable de *Arabidopsis thaliana* mediante inmersión floral

Se tomó una colonia resistente de cada construcción para realizar un precultivo, llevándolas a 5 ml de medio líquido LB con 100 μ g/ml de rifampicina y 50 μ g/ml de kanamicina. El precultivo se mantuvo toda la noche en agitación (240 rpms) a 28°C.

De estos precultivos se tomaron 100 μ l para llevarlos a 100 ml de medio LB líquido con 50 μ g/ml de kanamicina, para igualmente mantenerse toda la noche en agitación (240 rpms) a 28°C.

Los cultivos se centrifugaron al día siguiente 10 minutos a 5000 rpm a temperatura ambiente, y las bacterias precipitadas se resuspendieron en 50 ml de sacarosa al 5% (p/v). Las suspensiones de *A. tumefaciens* en sacarosa se depositaron en contenedores de poca profundidad donde se añadieron 500 μ l/l de surfactante. Se comparó la efectividad de dos surfactantes distintos, XIAMETER OFX-5211(Down Corning) (Mireault *et al.*, 2014) y SILWET-77

La transformación genética en *Arabidopsis* se llevó a cabo mediante la técnica de inmersión floral (*floral dip*), por la cual las inflorescencias de la planta son sumergidas en una disolución de *A. tumefaciens* y surfactante, quedando las bacterias adheridas al órgano floral para la transformación de la semilla (Clough *et al.*, 1998). Dicha inmersión

en la disolución de transformación se llevó a cabo sumergiendo todos los tallos vegetales al volcar la maceta (tras pasar 3-4 días sin agua) sobre los contenedores de la disolución, manteniéndolas así aproximadamente 2 min. Las plantas, una vez empapadas con la suspensión, fueron envueltas en film plástico transparente, para favorecer la penetración de la bacteria con el aumento de humedad. Tras 24 h, los plásticos fueron abiertos, y a las 48 h fueron retirados completamente.

En cada maceta se cultivaron 5 plantas de *Arabidopsis* sometidas a podado de las silicuas formadas y de los bulbos florales maduros 7 días antes de la transformación.

3.2.6 Recogida de semillas.

Cuando las plantas presentaron todas las silicuas formadas y mostraban inicios de senescencia foliar se retiró el riego, acelerando el proceso de maduración. Ya con las silicuas secas los tallos se introdujeron dentro de un sobre de papel que se cerró en paralelo a las rosetas de la planta, evitando el escape de semillas. Las macetas con estos sobres fueron secadas durante 1-2 semanas en una sala de secado (25°C, 15% humedad, aproximadamente), hasta que la apariencia de la planta fue de total senectud. Posteriormente los sobres con tallos y semillas, se secaron de nuevo durante 24 h a 37°C.

El contenido de cada sobre fue volcado en un tamiz, donde se aislaron las semillas por tamaño, para posteriormente someterlas a -20°C durante 24h, para eliminar *trips* y otros posibles organismos dañinos para la semilla.

3.2.7 Selección en placa de Petri de semillas transformadas con construcciones del retrozima FaRtz por resistencia a kanamicina

Se ensayaron tres métodos distintos para la esterilización y la siembra de las semillas (Tabla 3). El primer método consistió en la siembra en masa con top-agar (agar bacteriológico al 5% (p/v)) fundido, distribuyéndose por toda la placa de medio de germinación con las semillas embebidas en él. El segundo método consistió en la distribución de las semillas, esterilizadas por diferentes métodos (Tabla 2) dejándolas caer desde papel de filtro estéril dispersándolas sobre la placa.

En todos los casos, las semillas se sembraron en el medio de germinación Murashige & Skoog (Murashige y Skoog, 1962) ya descrito anteriormente. El medio se complementó además con el antibiótico adecuado para la selección de resistencia. Antes de llevar las placas a la cámara de cultivo in vitro a 24°C y fotoperiodo largo (16h de luz 8h de oscuridad), donde permanecieron en torno a 10 días, las placas cerradas se estratificaron, manteniéndolas 24h a 4°C para sincronizar su germinación (estratificación).

3.2.8 Selección en maceta de plántulas transformadas con construcciones del retrozima mutado FaRtzM por resistencia a glufosinato

Las semillas de la T1 transformadas con las construcciones obtenidas mediante el sistema GoldenBraid fueron estratificadas durante 24h a 4°C antes de ser sembradas en maceta. A las dos semanas tras su germinación fueron fumigadas con una disolución de 0.02% ((v/v)) del herbicida FINALE (glufosinato-amónico 150 g/l a(Bayer) y 0.01% ((v/v)) de Silwet L-77.

3.2.9 Extracción de DNA para genotipado

La extracción de DNA de las plantas a genotipar se llevó a cabo con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico 25:24:1 ((v/v)/v) añadiendo a 0.2 g de material 2 ml de fenol: cloroformo isoamílico (25:24:1), y 2.5 ml de tampón de extracción (EDTA 15 mM pH 7, 0.8% dodecilsulfato sódico (SDS), Tris 0.1 M pH 9, y 14.3 mM 2-Mercaptoetanol). La rotura del material se llevó a cabo mediante trituración con Polytron (Kinematica). Las muestras se centrifugaron 15 minutos a 4000 rpm a temperatura ambiente. Se tomaron 2 ml de sobrenadante al que se añadieron 200 µl de acetato sódico 3 M pH 5.5, y 6.7 ml de etanol al 96%. Tras una noche en incubación a -20°C las muestras volvieron a centrifugarse 15 minutos a 4000 rpm a temperatura ambiente. El sobrenadante se eliminó por decantación para dejar secar el precipitado durante media hora, tras lo cual se resuspendió en 100 µl de agua miliQ.

3.2.10 Genotipado mediante PCR

La presencia del transgén en las plantas de la T1 y T2 se confirmó mediante PCR. Para ello, se tomaron 40 ng de DNA para un volumen de reacción de 10 µl, utilizando la ADN polimerasa iTaq (INtRON Biotechnology). Para el genotipado se utilizaron cebadores para la amplificación de fragmentos del gen de resistencia y del retrozima, dando estos últimos diferentes tamaños según la polaridad del retrozima con respecto a la resistencia a Kanamicina (Anexo I).

3.2.11 Transformación transitoria de *Nicotiana benthamiana* con construcciones del retrozima FaRtz en pMOG800

Se prepararon precultivos de 5 ml de LB con 50 µg/ml de kanamicina y 50 µg/ml rifampicina. Tras una noche en agitación a 28°C, 20 µl del precultivo fueron llevados a

30 ml de LB líquido con 50 µg/ml rifampicina, a los que se añadió acetosiringona 0.3 mM y tampón MES 15 mM. De nuevo se incubó 12 h a 28°C en agitación (240 rpms). Cuando la densidad óptica del cultivo llegó 0.6, se centrifugó éste 15 minutos a 4000 rpm a temperatura ambiente, resuspendiéndose el precipitado en 10 ml de agua miliQ estéril. De nuevo se centrifugó 15 minutos a 4000 rpm a temperatura ambiente, para a continuación resuspender el precipitado en 10 ml de una disolución compuesta por MgCl₂ 0.2 M, tampón MES 0.2 M y acetosiringona 1 mM. El cultivo se diluyó con agua miliQ hasta obtener una densidad óptica menor a 0.5. Tras 3 h a temperatura ambiente en agitación (240 rpms), los cultivos se cargaron en jeringuillas sin agujas, donde se inyectaron a presión en 3 puntos diferentes de hojas sanas de *N. benthamiana*.

3.2.12 Extracción de RNA

Se tomó aproximadamente 1 cm² de cada hoja agroinfiltrada de *N. benthamiana*, pasando la muestra inmediatamente a nitrógeno líquido para evitar la actividad de las RNAsas. A las muestras congeladas se les añadió 500 µl del reactivo comercial Trizol (Ambion) para ser homogeneizadas por método físico (vástago). Las muestras se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 100 µl de Cloroformo: Isoamílico (24:1), para después permanecer 45 min en incubación a temperatura ambiente. Las muestras fueron centrifugadas a 4°C a 4000 rpm durante 15 minutos. Aproximadamente 200 µl de sobrenadante fueron llevados a un tubo nuevo al que se añadió 250 µl de Isopropanol. Tras 10 min de incubación a temperatura ambiente las muestras se centrifugaron a 4°C a 4000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue decantado y el precipitado resuspendido en un volumen de 500 µl de etanol 75%. Tras una centrifugación a 4°C a 4000 rpm durante 5 min el sobrenadante fue eliminado y el precipitado se dejó secar al aire. Ya seca, la muestra se resuspendió en 30 µl de agua miliQ y fue almacenada a -20°C hasta su utilización.

3.2.13 Northern blot

Las muestras de RNA fueron separadas en un gel desnaturalizante de poliacrilamida (poliacrilamida 5% (v/v), TBE 89 mM, Urea 8 M) a 200 V.

Antes de realizar la electrotransferencia la membrana (Hybond-N, GE Healthcare) junto al gel desnaturalizante fueron equilibrados con tampón de transferencia (fosfato sódico 25 mM, pH 6.5). Tras este equilibrado se montó el *sandwich* de electrotransferencia, la cual fue llevada a cabo a 4°C y 1 A, durante aproximadamente una hora y media. Realizada la transferencia, la membrana se dejó secar sobre un

termobloque a 41°C. El gel de poliacrilamida fue observado en el transiluminador para comprobar la total transferencia de las bandas de RNA.

Una vez seca, la membrana fue llevada a luz ultravioleta durante 3 min para fijar las muestras de RNA a su superficie. Ya fijada, la membrana fue bloqueada mediante inmersión en la disolución de hibridación 50% formamida, 15 mM cloruro sódico, 150 µM citrato sódico, pH 7.4, 0.1% N-lauroilsarcosina, 0.02% (p/v) SDS, 2% disolución de bloqueo (Roche) durante 30 min a 68°C en rotación constante. Pasado este tiempo se añadieron 200 µl de sonda complementaria al retrozima y marcada con dioxigenina (DIG), la cual fue desnaturalizada previamente. Tras una noche de incubación a 68°C en rotación constante, la sonda fue retirada y la membrana lavada dos veces con tampón SSC 2x (600 mM cloruro sódico, 0.3M citrato sódico pH 7.4), 0.1% (p/v) dodecilsulfato sódico (SDS), a temperatura ambiente 5 min, y otros dos lavados de 15 min con SSC (60 mM cloruro sódico, 6 mM citrato sódico pH 7.4), 0.1% (p/v) SDS a 68°C.

Posteriormente se realizó un primer lavado con 8 ml de tampón (ácido maleico 0.1 M, NaCl 0.15 M pH7.5, más 0.3% (p/v) Tween 20 (monolaurato de polioxietilen(20)sorbitano, Sigma) durante 10 min, para posteriormente bloquear la membrana con 10 ml de tampón anterior con reactivo de bloqueo (Roche) al 1% (p/v) durante aproximadamente 30 min. Se realizaron dos lavados con el tampón ácido Maleico 0.1 M, NaCl 0.15 M pH7.5, 0.3% (p/v) Tween 20 (Sigma) durante 15 min, para después sumergir la membrana 5 min en tampón Tris-HCl 0.1M pH9 y NaCl 0.1M. Realizados estos lavados, se incubó la membrana con el sustrato quimioluminiscente CSPD (Roche) (dilución 1:100 en tampón Tris-HCl 0.1M pH9, NaCl 0.1M,) manteniendo la membrana en oscuridad durante 5 min. Finalmente la quimioluminiscencia fue detectada con una cámara LAS-3000 (Fujifilm).

4. RESULTADOS

4.1 Ribozimas twister (tw) en genomas de plantas

4.1.1 Búsqueda bioinformática del motivo Tw

Con el objetivo de conocer la distribución de la ribozima Tw en genomas de plantas se empleó el programa de búsqueda de motivos estructurales RNAmotif (Macke *et al.*, 2001), utilizando la base de datos de genomas de plantas Phytozome 12.0 (<http://phytozome.jgi.doe.gov>). Basándose en la estructura consenso descrita originalmente para el motivo Tw (Roth *et al.*, 2014), se encontraron diversas secuencias compatibles con la estructura secundaria de esta ribozima (Figura 4) en diversos genomas de plantas superiores como fueron *Amborella trichopoda*, *Solanum lycopersicum* o *Malus domestica*, entre otras.

Estas secuencias iniciales fueron lanzadas contra la base de datos *viridiplantae* utilizándose la herramienta BLAST (NCBI, National Library of Medicine. Bethesda, USA) encontrándose multitud de homologías en diversas especies vegetales, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas (Figura 10). En estas búsquedas destacó el caso que presentaba el genoma de manzano (*Malus domestica*) que contenía gran cantidad de secuencias compatibles con la formación del motivo Tw.

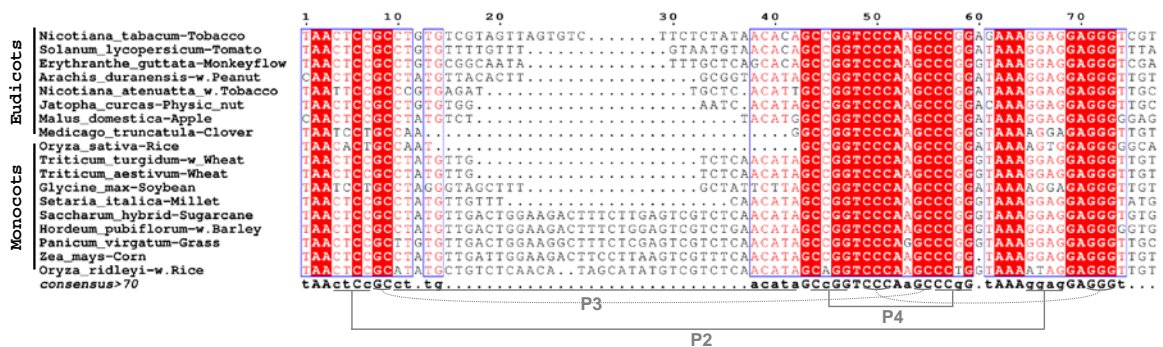


Figura 10: Alineamiento de las secuencias de DNA susceptibles de formar motivos twister detectadas en diferentes especies vegetales, tanto mono como dicotiledóneas. Únicamente se muestran las secuencias alineadas desde el punto de corte del motivo Tw. Como puede apreciarse la zona de mayor variabilidad en secuencia y tamaño es, en todas ellas, la correspondiente a la hélice 3, mientras que el resto del motivo presenta secuencias muy conservadas.

Curiosamente, entre las abundantes secuencias detectadas solo dos motivos pudieron reconocerse como ribozimas Tw completas, aunque incluso estas dos presentaban una hélice P1 relativamente débil y un punto de corte diferente al canónico descrito (U|AA). Estos dos motivos completos se denominaron Tw-1Md (localizada en dos copias idénticas en los cromosomas 2 y 16) y Tw-36Md (localizada en el cromosoma 2)

(Figura 11). Tw-1Md presentaba una hélice P1 formada por 6 apareamientos (2 de ellos pares G-U débiles) así como una adenina justo antes del punto de corte (A|AA), mientras que Tw-36Md presentaba una hélice P1 aún más débil (6 pares de bases de los que 4 son G-U), así como una guanina antes del punto de corte (G|AA). La mayor diferencia entre ambas Tw estaba en su hélice P3, que en el caso de Tw-36Md incluía una inserción de 7 nt, así como un desapareamiento de un par de nucleótidos en la base de la misma.

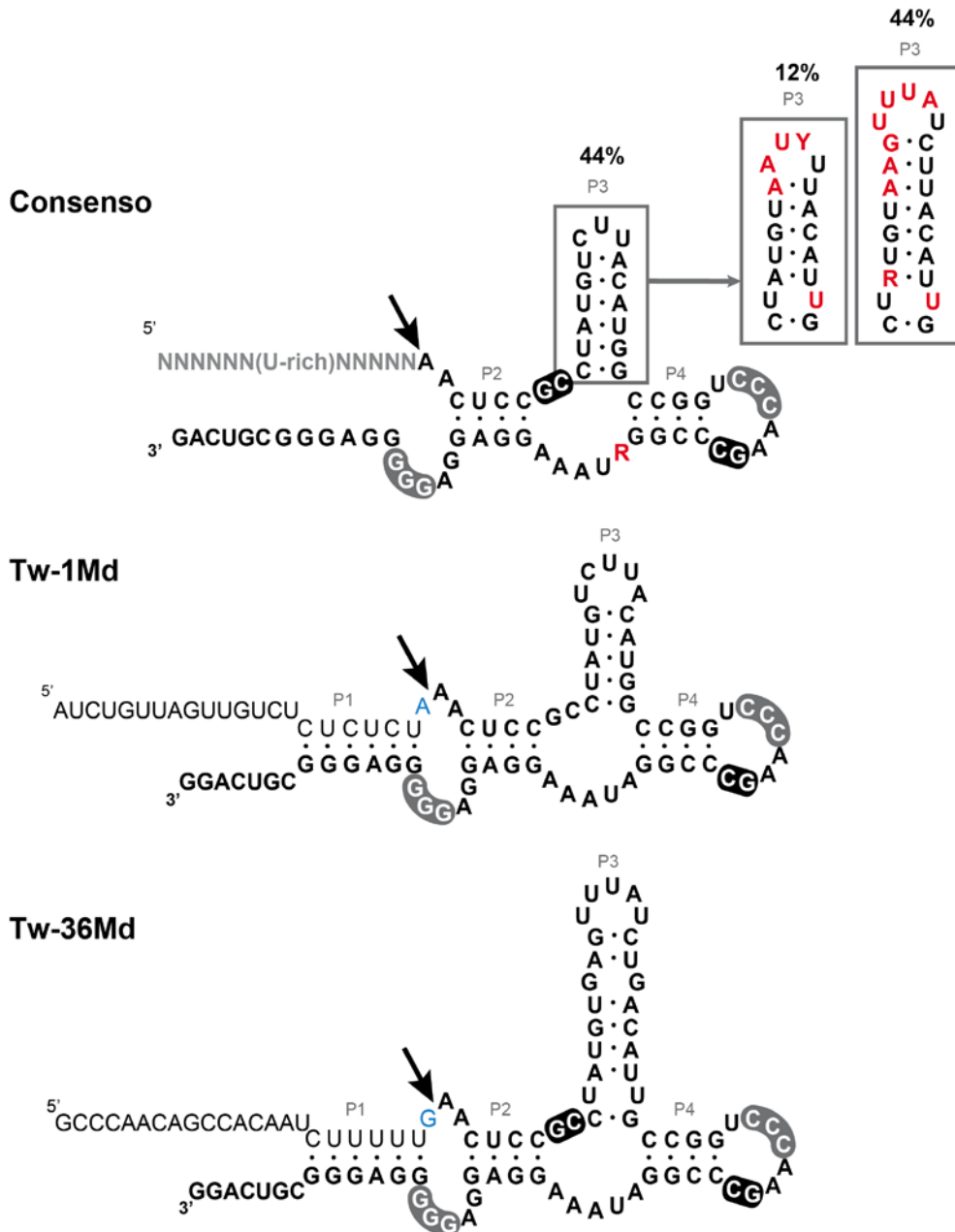


Figura 11: Secuencias RNA de los motivos Consenso, Tw-1Md y Tw-36Md. Las flechas señalan el punto de corte mientras las bases marcadas en rojo son las de mayor variabilidad. En la secuencia consenso R representa bases púricas mientras Y se refiere a pirimidínicas y N a bases de cualquier tipo. U-rich indica una región rica en uracilos. Los nucleótidos en azul representan cambios en el sitio de corte respecto al consenso U|AA.

Además, dentro del genoma de *M. domestica* se detectaron otras 1435 secuencias análogas a Tw, a excepción del extremo 5' aguas arriba del sitio de corte, que se correspondía a secuencias no conservadas y normalmente ricas en nucleótidos timina. Estas secuencias no permitían la formación de una hélice P1 estable ni presentaban el sitio de corte canónico de Tw (U|AA). Entre estas 1435 copias detectadas, un 44% eran similares a la secuencia Tw-1Md (a excepción esa secuencia 5' aguas arriba del punto de corte). Otro 44%, sin embargo, eran similares al motivo Tw-36Md, presentando la inserción de 7 nucleótidos ya comentada. El 12% de las copias restantes, presentaba características intermedias entre las dos anteriores, con una inserción de solo 4 nucleótidos y permitiendo también la formación de un desapareamiento extra en la base de la hélice P3 (Figura 11). Estas secuencias de motivos Tw pertenecientes a los tres tipos se encontraron en un alto número de copias dispersas por los 17 cromosomas que conforman el genoma de *M. domestica*.

4.1.2 Motivo Tw-Md asociado a retrotransposición RTE

Continuando con el análisis bioinformático de los motivos Tw en *M. domestica*, se llevaron a cabo comparaciones de las secuencias que rodean dichos motivos utilizando la herramienta BLASTx (nucleótido a proteína). Para este estudio, se tomaron hasta 3 kb de secuencias genómicas tanto aguas arriba como aguas debajo de los diversos motivos Tw-Md detectados previamente. Siguiendo esta aproximación se encontró de forma sistemática la existencia de una ORF cercana (50-100 pb) a las regiones 3' de los motivos Tw con elevada homología a dominios endonucleasa (EN) y retrotranscriptasa (RT), típicos de retrotransposones LINE (Anexo III). Secuencias con ORFs similares (EN-RT) han sido descritas previamente en multitud de genomas vegetales y anotadas como retrotransposones de la superfamilia RTE (Wicker *et al.*, 2017).

Para confirmar la asociación de estos ribozimas Tw con dicha familia de retroelementos RTE, se realizó manualmente una inspección de los extremos 5' de ejemplos de este transposón recogidos en la base de datos para DNA repetitivo Repbase (www.girinst.org/replibase/, Genetic Information Research Institute). De esta forma se encontró que efectivamente, en muchos, aunque no en todos los retroelementos tipo RTE, aparecían secuencias capaces de adoptar la estructura del motivo Tw. Además, se encontró que no solo los retrotransposones RTE de plantas como *M. domestica* contenían motivos Tw, sino que también existe una presencia conservada de este ribozima en multitud de secuencias RTE de animales vertebrados e invertebrados.

4.1.3 Eficacia catalítica de Tw-1Md y Tw-36Md

Para comprobar la actividad catalítica de los motivos Tw descritos bioinformáticamente en el genoma de *M. domestica*, se llevó a cabo un análisis de las propiedades de autocorte de varios de estos ribozimas. Para ello, primero las ribozimas fueron clonadas a partir de tejido foliar de *Malus domestica* var. *Granny* y var. *Brookfield*. Mediante PCRs con cebadores específicos se obtuvieron tanto clones de Tw-1Md como de Tw-36Md, ambos a partir de ambas variedades. Construcciones de estos ribozimas bajo el control del promotor de transcripción de la T7 polimerasa se utilizaron para llevar a cabo una primera prueba de autocorte durante la transcripción (*Run-off transcription*) (Figura 12). Tras una hora y media de reacción de transcripción, las muestras fueron llevadas a electroforesis en gel de poliacrilamida, donde se pudo apreciar la existencia de tres bandas para cada motivo Tw (una mayor, correspondiente al RNA completo sin autocortar y dos menores correspondientes a los fragmentos resultantes del autocorte), de tamaños acordes a los predichos bioinformáticamente según la posición del punto de corte de cada uno.

Para poder cuantificar con detalle la capacidad de autocorte de ambos motivos Tw, el experimento se repitió incluyendo en la mezcla de transcripción ATP con fósforo³², con el objetivo de determinar la intensidad de cada banda mediante autorradiografía. Así se observó que para Tw-1Md, el porcentaje de autocorte tras una hora de transcripción era del 84%, mientras que para Tw-36Md era de tan solo el 58% (Figura 12).

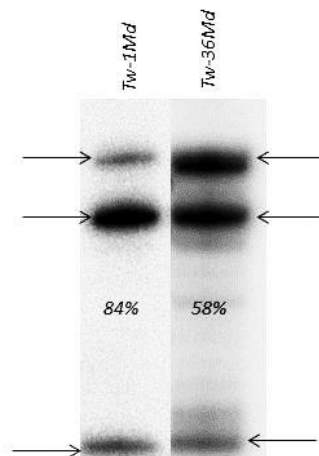


Figura 12: Electroforesis revelada por fotoestimulación de la cinética transcripcional de Tw-1Md y Tw-36Md. La banda superior de cada carril corresponde a los RNAs íntegros sin autocortar, mientras que las inferiores corresponden a los dos fragmentos resultantes del RNA cortado (siendo la de mayor tamaño el fragmento de RNA 3' y la de menor el fragmento 5'). La diferencia de tamaño entre Tw-1Md y Tw-36Md corresponde a la inserción en P3 (Figura 11). El porcentaje de autocorte se calculó a partir de la intensidad de la señal de las bandas por unidad del área a cuantificar ((P-B)/mm²).

Estos resultados indicaban, por un lado, que las dos ribozimas Tw ensayadas eran catalíticamente activas, a pesar de presentar hélices P1 relativamente débiles y secuencias no canónicas en sus sitios de corte. No obstante, se puede también deducir que las capacidades catalíticas y/o de plegamiento de estos dos motivos Tw, y especialmente en el caso de Tw-36Md, estarían claramente alejadas de la idealidad, ya que tal y como se ha descrito previamente para motivos Tw canónicos, lo esperable es que el autocorte durante la transcripción de una ribozima Tw alcance valores próximos al 100% (Roth et al. 2014). En cualquier caso, y a pesar de la reducción de las capacidades autocatalíticas observadas, la más que apreciable capacidad de autocorte de ambos motivos *in vitro* nos estaría indicando que los requerimientos de secuencia y estructura de los motivos Tw podrían ser más relajados de lo predicho, y que quizás estos dos motivos Tw en el genoma de manzano no fueran los únicos funcionales.

4.1.4 Importancia de la estructura para la catálisis de autocorte

Tras los primeros ensayos de autocorte durante la transcripción mencionados anteriormente, se intentó realizar un estudio del autocorte del RNA en condiciones post-transcripcionales. Para ello es necesario purificar las moléculas de RNA no autocortado que son obtenidas mediante una transcripción en presencia de un oligonucleótido bloqueante que evita su actividad catalítica (ver material y métodos). No obstante, los ensayos con los RNAs así purificados derivados de las construcciones Tw-1Md y Tw-36Md dieron lugar a moléculas esencialmente inactivas, que no parecían recuperar su estructura tras el proceso de purificación y replegamiento (resultados no mostrados). Sabiendo que la velocidad de catálisis de la ribozima Tw es una de las más altas descritas en la literatura (con tiempos de vida media inferiores a 1 s; Roth *et al.*, 2014), se consideró la posibilidad de que las moléculas analizadas tuvieran afectado su correcto plegamiento, lo que junto con sus hélice P1 atípicas y sus sitios de corte no canónicos, impediría al RNA adoptar las conformaciones terciarias necesarias para la reacción de autocorte. Para facilitar el plegamiento correcto de los motivos y minimizar en lo posible la subestimación de las capacidades de autocorte, se creó un motivo Tw-1Md sin los extremos 5' y 3' superfluos (Tw-1Md_{sh}, Figura 13) que no se espera que intervengan en la estructura de los ribozimas (Figura 14). A partir de este punto, y habiendo observado las dificultades de autocorte de la variante Tw-Md36, el resto del trabajo se realizó únicamente con ribozimas basadas en Tw-1Md_{sh} carentes de esas colas, que sí que se comportaron de forma más eficiente en condiciones post-transcripcionales.

Vista la cantidad de motivos Tw truncados antes del punto de corte que se detectaron en el genoma de *M. domestica*, y el hecho de que los motivos Tw-1Md y Tw-36Md, pese a sus modificaciones con respecto al motivo canónico, fueran claramente funcionales, surgió la pregunta de si el resto de copias genómicas también podían

presentar cierta capacidad autocatalítica *in vivo*, siendo por tanto funcionales para la actividad del retrotransposón, o por el contrario eran copias carentes de actividad y efectivamente truncadas durante la replicación del elemento.

Para demostrar esta hipótesis, se sintetizó por un lado un primer mutante nulo para la hélice P1, Tw-P1NullA, que sustituyera la secuencia 5' del motivo Tw-1Md, por una cola de adeninas que impide el cierre de la hélice (Figura 13). Sobre dicha construcción Tw-P1NullA se sustituyó la adenina anterior al punto de corte por un uracilo, base encontrada en el 75% de los motivos Tw descritos originalmente (Roth *et al.*, 2014) dando lugar a la construcción Tw-P1NullB que carece igualmente de hélice P1, pero contiene el sitio de corte canónico (U|AA).

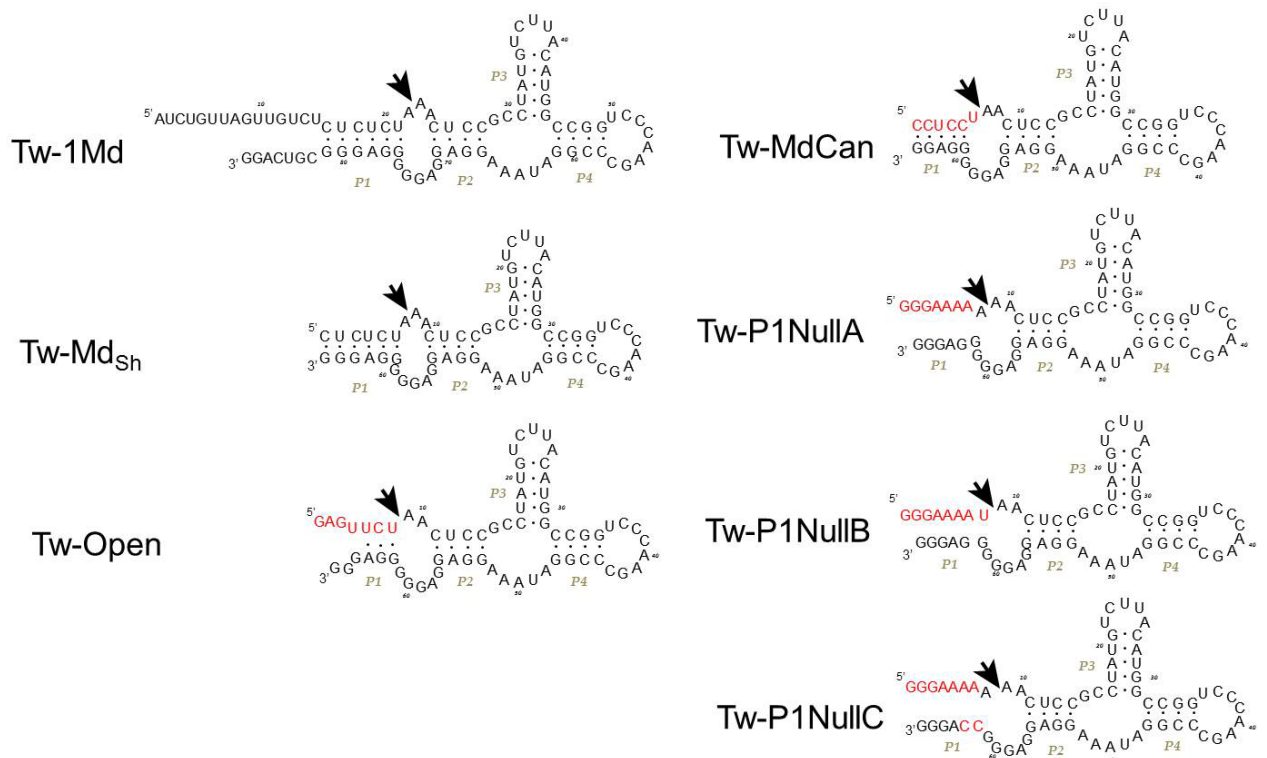


Figura 13: Estructuras secundarias predichas para los RNAs de las diferentes construcciones mutantes de Tw-1Md. Las flechas indican el punto de corte. En rojo se muestran las modificaciones en la secuencia con respecto a Tw-1Md. Comparando la estructura de Tw-1Md con Tw-1Md_{Sh} se pueden ver las regiones terminales eliminadas en el resto de construcciones para facilitar su plegamiento.

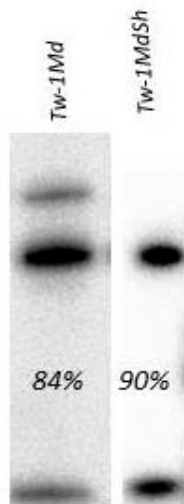


Figura 14: Cinética transcripcional de Tw-1Md y Tw-1Md_{Sh}. Como puede apreciarse la eliminación de las colas terminales incrementa la eficacia catalítica al no generar problemas de plegamiento.

Otra de las construcciones obtenidas, consistió en cambiar dos de las últimas guaninas en el extremo 3' por citosinas (Tw-P1NullC) (Figura 13). El objetivo de este RNA sería comprobar si las interacciones terciarias de uno de los pseudonudos, formado por un triple par G-C, podrían estar siendo alteradas debido a estas dos guaninas extra desapareadas. Igualmente, para determinar el papel de una hélice P1 de muy baja estabilidad, similar a lo encontrado mayoritariamente en las formas naturales en *M. domestica*, se obtuvo una construcción con una hélice P1 de tan solo 3 apareamientos pero conteniendo un sitio de corte canónico U|AA (Tw-Open) (Figura 13). Finalmente, y para poder determinar una eficacia catalítica de referencia, se sintetizó una construcción de un motivo Tw canónico (Tw-MdCan) basado en la secuencia de manzano pero que presentara tanto una alta estabilidad de la hélice P1 como un sitio de autocorte canónico (U|AA), similar en su conjunto a las Tw procariontas descritas en el artículo original (Roth et al., 2014). Esta construcción mantiene por tanto la mayoría de las peculiaridades de las secuencias Tw halladas en manzano pero permitiendo comparar la eficacia catalítica máxima esperada para un dominio Tw canónico con la eficacia que presentan de forma general las posibles formas naturales “atípicas” presentes en gran número en el genoma de manzano.

Con estas construcciones se llevaron a cabo diversas cinéticas co-transcripcionales siguiendo el protocolo descrito previamente en la literatura (Long y Uhlenbeck, 1994) (Figura 14). A partir de los datos de autocorte obtenidos se halló la eficacia catalítica relativa de cada motivo Tw sometiendo los porcentajes de autocorte a un ajuste a la ecuación $F = F_{\infty}(1 - e^{-Kt})$ (Stage-Zimmermann y Uhlenbeck, 1998), siendo F la fracción de producto generado a distintos tiempos, F_{∞} la fracción del producto en el tiempo final de la reacción y K la constante observada de primer orden del autocorte (K_0). Los

valores medios que se obtuvieron para las diferentes eficacias catalíticas de cada motivo Tw se muestran en la Tabla 1.

A partir de los valores obtenidos se pudo observar que el motivo Tw más eficaz es, como cabía esperar, el motivo Tw-MdCan que presentaba las secuencias canónicas tanto para el sitio de corte como para la hélice P1. Este motivo mostró una velocidad de autocorte casi 5 veces superior a la variante natural Tw-1Md, caracterizada por una hélice P1 más débil y un sitio de autocorte no canónico. Por otro lado, dicha construcción natural, y en comparación con el resto de mutantes ensayados, mostró la mayor velocidad de autocorte en los ensayos.

Se aprecia que conforme los motivos van teniendo una hélice P1 más desapareada su eficacia disminuye, sin embargo, la diferencia entre Tw-P1NullB ($K_o=0.12 \text{ min}^{-1}$), totalmente abierto pero con un sitio de corte canónico, y Tw-P1NullA ($K_o=0.026 \text{ min}^{-1}$), totalmente abierto, pone de manifiesto la importancia de conservar el uracilo que conforma el punto de corte canónico. El hecho de tener tanto la hélice P1 como las interacciones terciarias alteradas, como es el caso del mutante Tw-P1NullC, reduce enormemente la eficacia, sin embargo, este mutante es aún capaz de reaccionar, informando de que efectivamente, la estructura secundaria del motivo Tw es más flexible de lo que había sido descrita.

Tabla 1: Promedio de las constantes catalíticas observadas (K_o) para los diferentes mutantes Tw utilizados en este trabajo.

Tw-MdCan	Tw-MdSh	Tw-Open	Tw-P1NullA	Tw-P1NullB	Tw-NullC
$K_o = 3.2 \text{ min}^{-1}$	$K_o = 0.71 \text{ min}^{-1}$	$K_o = 0.5 \text{ min}^{-1}$	$K_o = 0.026 \text{ min}^{-1}$	$K_o = 0.12 \text{ min}^{-1}$	$K_o = 0.016 \text{ min}^{-1}$

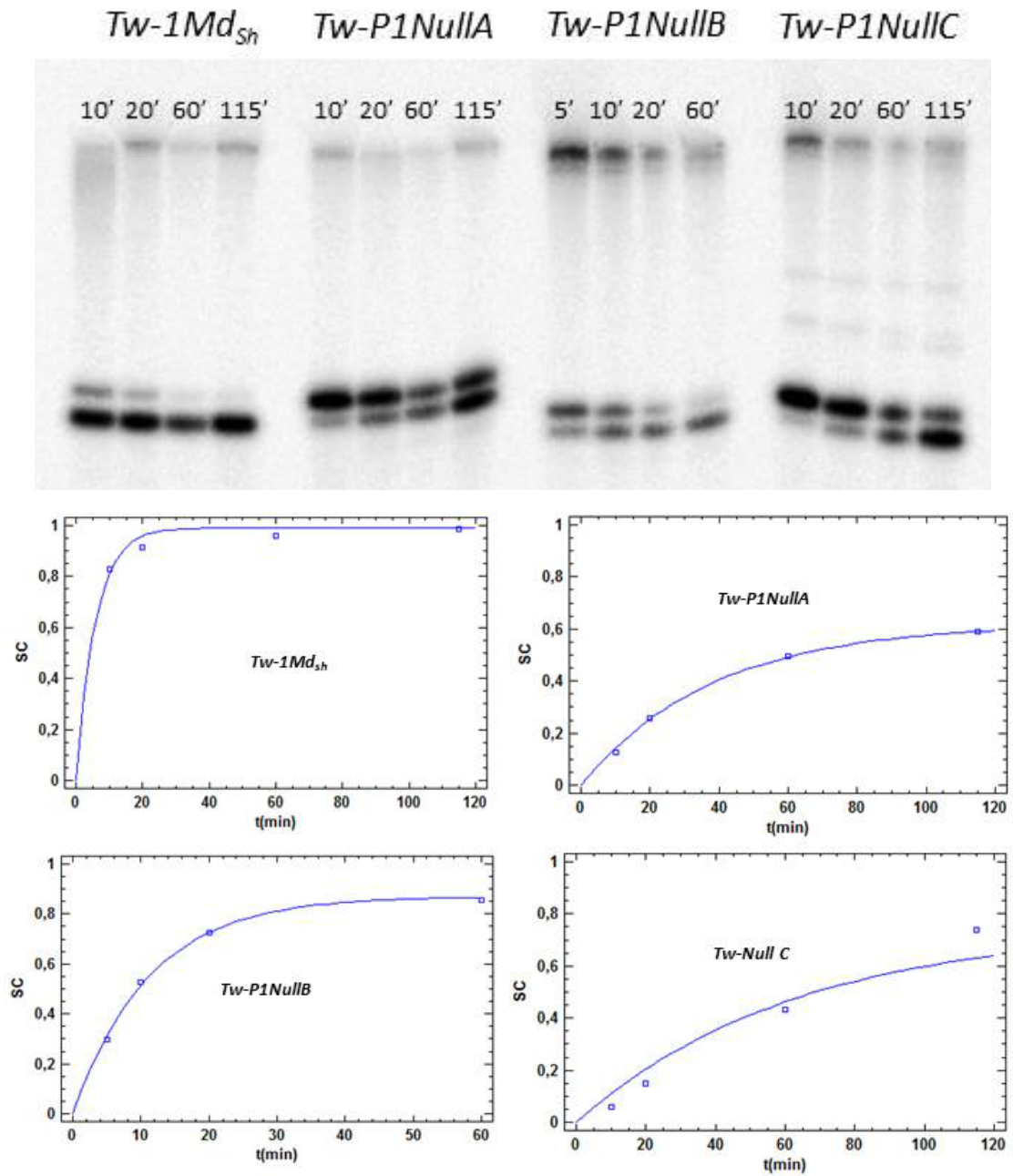


Figura 15: Cinética transcripcional de Tw-1Md; Tw-P1NullA; Tw-NullB y Tw-P1NullC. El mismo experimento fue llevado a cabo hasta 5 veces con los diferentes mutantes. Las gráficas expresan el porcentaje de autocorte en tanto por uno a diferentes tiempos. La Imagen de autoradiografía muestra el incremento de autocorte conforme avanza el tiempo expresado en minutos, cabe destacar que la banda correspondiente a la región 5' del autocorte coeluye en el gel de poliacrilamida conjuntamente con el nucleótido marcado, por lo que no puede ser cuantificado de manera directa, su señal se estimó como un 15% de la señal de la banda del extremo 3' a partir de los datos obtenidos en cinéticas postranscripcionales.

4.1.5 Análisis del autocorte en condiciones post-transcripcionales:

Para caracterizar las capacidades autocatalíticas del motivo ribozimático Tw desde un punto de vista estrictamente químico y en ausencia de proteínas, es necesario aislar el transcrito íntegro de RNA, como ya se ha comentado esto se realiza a partir de una transcripción en presencia de un oligonucleótido de DNA que hibride y bloquee el autocorte de Tw. De esta forma, es posible obtener el RNA completo que, una vez purificado y plegado en su conformación activa, y bajo condiciones controladas de pH, Mg^{2+} y temperatura, dará lugar a la reacción de autocorte en ausencia de proteínas y otras macromoléculas, tal y como ocurría en las cinéticas co-transcripcionales.

De esta forma, los transcritos completos de Tw-1Md y Tw-P1NullB (sin hélice P1 pero un sitio de corte canónico U|AA) fueron desnaturalizados y llevados a 25°C en presencia de tampón Hepes (pH 6.5) y 1 mM Mg^{2+} , para un tiempo de reacción total de varias horas (Figura 16). En estas condiciones experimentales se obtiene que la velocidad de reacción de Tw-Md_{Sh} es sensiblemente más lenta que la observada en condiciones co-transcripcionales, necesitando hasta 13 minutos para superar un autocorte del 50% de sus moléculas. Por otro lado, el RNA de Tw-P1NullB necesitó más de 3 horas para alcanzar dicho 50%. Se pudieron así calcular las constantes observadas de autocorte, de tan solo $K_0=0.1 \text{ min}^{-1}$ para la construcción Tw-Md_{Sh}, y unos escasos $K_0=0.006 \text{ min}^{-1}$ para el mutante sin la hélice P1, Tw-P1NullB. Estos valores no solo son mucho menores de los obtenidos para dichos ribozimas en condiciones co-transcripcionales, sino que también están muy por debajo del potencial esperado para una ribozima Tw canónica, que en condiciones experimentales similares a las aquí utilizada se ha calculado que puede alcanzar valores de K_0 superiores a los 10 min^{-1} (o lo que es lo mismo tiempos de vida media inferiores a 1 s) (Roth et al. 2014).

Desafortunadamente, los intentos por determinar el valor de la K_0 de la construcción canónica, Tw-MdCan, en condiciones post-transcripcionales realizados en este trabajo resultaron del todo infructuosos. Por un lado, el eficiente autocorte de esta ribozima ya durante la reacción de transcripción impidió la obtención de cantidades significativas del transcrito primario no autocortado, a pesar de utilizar diversas concentraciones del oligonucleótido bloqueante. Más aún, debida a esta alta eficacia, las pequeñas cantidades de Tw-MdCan que se lograron obtener sufrían un elevado autocorte durante el mismo proceso de purificación, impidiendo cualquier estudio cinético posterior. Por todo ello, y aunque no se pudo llegar a una cuantificación de la constante observada de autocorte, se puede concluir que la ribozima Tw canónica presentaría unas capacidades de autocorte post-transcripcional muy superiores a cualquiera del resto de construcciones aquí analizadas.

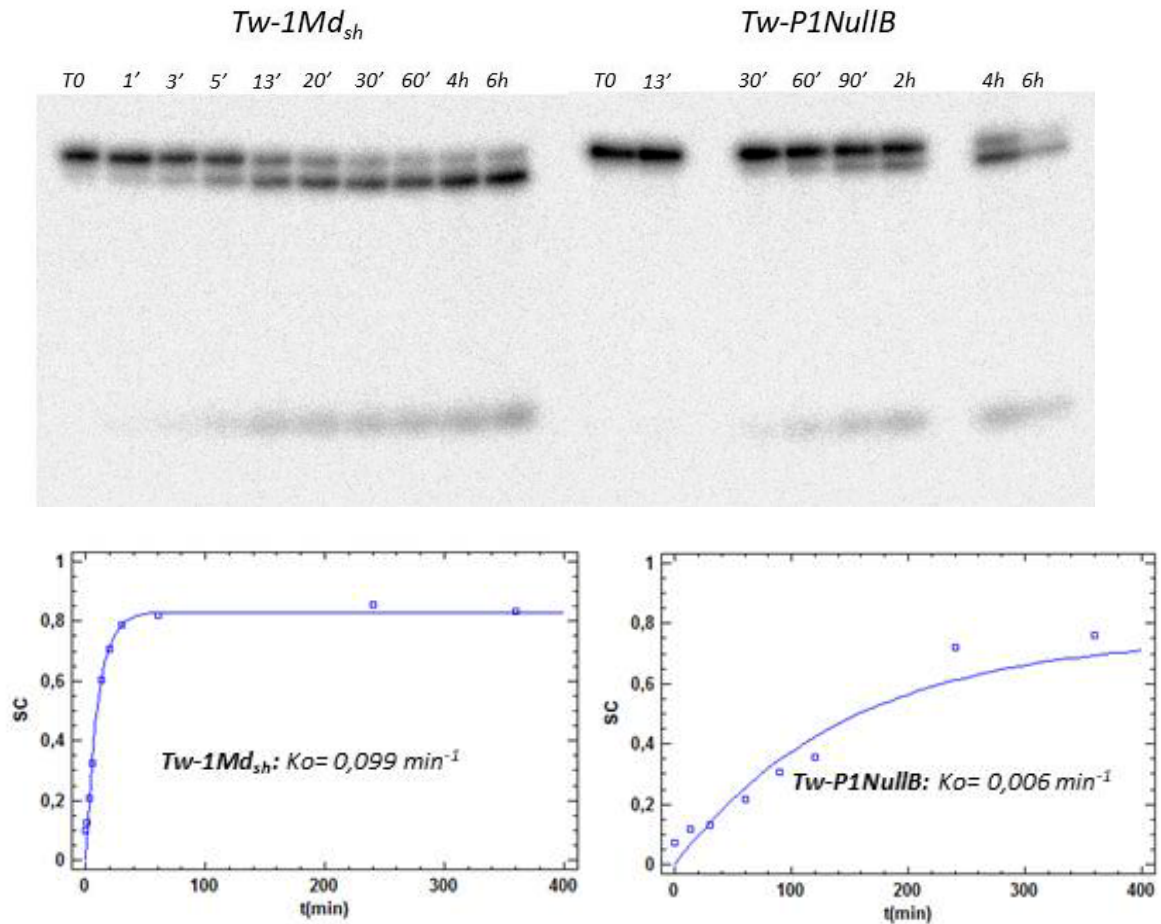


Figura 16: Cinética postranscripcional de Tw-Md_{sh} y Tw-P1NullB. Las gráficas expresan el porcentaje de autocorte en tanto por uno frente al tiempo expresado en minutos, así como la K_0 obtenida al someter los datos al análisis de mínimos cuadrados ya descrito.

4.2 Retrozima de *Fragaria ananassa*

Con el propósito de analizar distintos aspectos del ciclo de vida y propagación de los retrozimas de plantas, se tomó como modelo uno de los retrozimas hallados en el genoma de fresa, *Fragaria ananassa*. Con este fin se propuso la obtención de plantas que expresaran de forma estable y constitutiva dicho retrozima, así como una versión mutada del mismo incapaz de catalizar el autocorte del intermediario de transposición.

4.2.1 Puesta a punto del protocolo de transformación genética estable de *Arabidopsis thaliana* con construcciones del retrozima de *Fragaria ananassa* FaRtz.

4.2.1.1 Esterilización y sembrado.

La puesta a punto del protocolo de transformación estable se comenzó con un ensayo para comparar diferentes sistemas de esterilización y sembrado. El sistema utilizado originalmente (Protocolo 1, Tabla 2) consistía en un lavado con lejía comercial durante 5 minutos, lejía al 50% durante 3 minutos y varios lavados con agua miliQ estéril, para después plaquear las semillas mediante el sistema de siembra en masa con top-agar. Sin embargo, se observó que este protocolo dejaba *Agrobacterium* activo, suponiendo una fuente de error para el genotipado por PCR, por ello se le añadió un lavado de 3 minutos con etanol al 96%, dejando secar las semillas sobre papel de filtro estéril dentro de cabina, para después ser dispersadas de nuevo sobre placas MS-kanamicina 50 µg/ml (Protocolo 2, Tabla 2). Este nuevo método con lejía más alcohol demostró ser demasiado severo, dejando un alto porcentaje de semillas sin germinar. Finalmente se optó por someter el material a una incubación en movimiento con alcohol al 70% durante 5 minutos, seguida de otra incubación durante 2 minutos con etanol 96% para después dejar secar sobre papel estéril (Protocolo 3, Tabla 2), siendo este último el protocolo adoptado para el resto del trabajo, al ser el que mejor representa el compromiso entre esterilidad y viabilidad.

Protocolo	1ª esterilización	2ª esterilización	Lavados	Plaqueado	Resultado
Nº1	5 min lejía comercial 100%	3 min lejía comercial 50%	4 lavados agua estéril	Sembrado con top-agar	Contaminación por levaduras y restos de <i>Agrobacterium</i>
Nº2	5 min lejía comercial 100%	3 min lejía comercial 50%	2 min etanol 96%	Secado en papel de filtro estéril	Escasa viabilidad de las semillas
Nº3	5 min etanol 70%	2 min etanol 96%		Secado en papel de filtro estéril	Semillas viables. Sin problemas de contaminación

Tabla 2: Protocolos de esterilización ensayados.

4.2.2 Selección de resistencia

Debido a que aún con el nuevo procedimiento de esterilización quedaban todavía en las placas pequeñas colonias de *Agrobacterium C58*, se decidió incluir también 50 µg/ml ampicilina en las placas de MS-kanamicina 50 µg/ml. Por comparación entre el crecimiento de plántulas resistentes en placas MS, MS-kanamicina 50 µg/ml, y MS-kanamicina 50 µg/ml -ampicilina 50 µg/ml, se observó que existía cierto efecto tóxico acumulativo en la combinación de los dos antibióticos, perjudicando el crecimiento vegetal.

Se observó que aproximadamente de cada 5000 semillas sembradas (0.1 mg de material), apenas 1 o 2 plántulas conseguían alcanzar el tamaño de transplante, y aun así llegaban tan deterioradas a tierra que morían antes de conseguir incluso cantidad de material vegetal suficiente para su genotipado.

Por este motivo, y pese a que se utilizaba la concentración de kanamicina recomendada por la bibliografía (50 µg/ml), se pensó que el sistema de selección podría estar siendo demasiado estricto. Se llevó a cabo entonces un ensayo comparando distintas concentraciones de kanamicina en el medio de selección: 30 µg/ml, 25 µg/ml y 15 µg/ml.

El resultado obtenido fue que a una concentración de kanamicina de 30 µg/ml apenas existían diferencias con la concentración original de 50 µg/ml, mientras que con 15 µg/ml parecía no existir selección, determinado que 25 µg/ml de kanamicina era la concentración adecuada para la selección de estas construcciones (Tabla 3).

[Kanamicina]	Semillas plaqueadas	Plántulas en edad de transplante	Plantas transgénicas
50 µg/ml	5000 aprox.	3	Muertas en tierra
30 µg/ml	5000 aprox.	6	Muertas en tierra
25 µg/ml	5000 aprox.	8	Casos positivos
15 µg/ml	5000 aprox.	85	Falsos positivos

Tabla 3: Concentraciones de kanamicina ensayadas, como puede apreciarse a 50 µg/ml no se consigue material que genotipar, mientras que a 15 µg/ml el número de falsos positivos (plantas que sobreviven al antibiótico sin ser realmente resistentes y por tanto no portando el transgén) es muy elevado.

Paralelamente se puso a punto un sistema de genotipado mediante PCR para confirmar los resultados de la selección fenotípica mediante resistencia a kanamicina. Vistos los numerosos problemas que el fenotipado presentaba, se desarrolló un sistema de PCR que permitiera distinguir la presencia del gen de resistencia del T-DNA (NptII) así como la presencia del transgén (para casos de falso positivo en la selección de plantas resistentes pero no transgénicas), y del gen de resistencia del plásmido pMOG800 (NptIII) (descartando la posibilidad de falsos positivos por la presencia de *Agrobacterium*) según el tamaño del amplicón (Figura 17).

Cebadores (ver Anexo I)	Segmento amplificado	Tamaño del amplicón
134D-134R.	NptIII (Resistencia kanamicina en pMOG800).	700 pb
137D-137R.	NptII (Resistencia kanamicina en T-DNA).	785 pb
138D-137R.	Fragmento entre Pnos y NptII del T-DNA.	995 ob

Tabla 4: Cebadores utilizados, fragmentos amplificados y tamaño de las bandas utilizados para genotipar mediante PCR las plantas seleccionadas mediante resistencia a kanamicina.

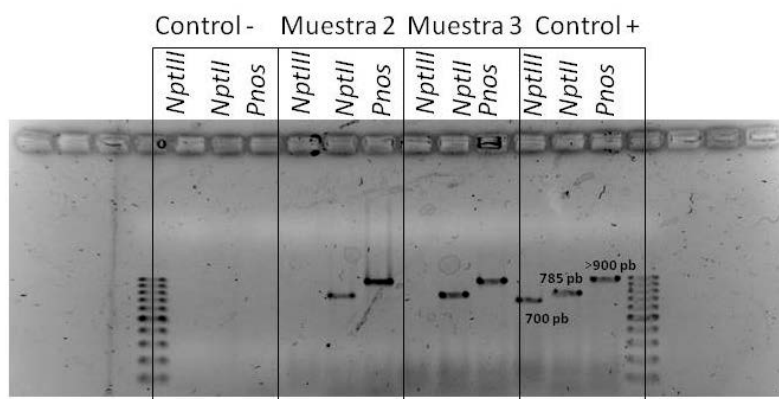


Figura 17: Ejemplo del resultado esperable para un genotipado por PCR con este sistema. Como puede verse ambas muestras son positivas para la presencia del transgén (PCR para Pnos), positivas para la resistencia (NptII) y negativas para contaminación por *Agrobacterium* (NptIII).

4.2.1.3 Comparación de surfactantes para la inmersión floral

También como parte de la puesta a punto del protocolo de transformación genética, se comparó la eficacia del uso del surfactante XIAMETER OFX-5211 (3-(Polioxietileno) propilheptametiltrisiloxano) frente al tradicional Silwet L-77 (Polietilen glicol mono (3-(tetrametil-1-(trimetilsiloxi) disiloxanil) propil) eter). Tal y como queda reflejado en el trabajo de Mireault et al., 2014, la eficacia de XIAMETER es considerablemente mayor que la de Silwet, sin embargo, presenta efectos citotóxicos a ciertas concentraciones lo que puede acabar con el parental de las semillas transformadas. A esto se añade que solo pudo obtenerse XIAMETER OFX-5211(Dow Corning), siendo XIAMETER OFX-0309 (3-(3-Hidroxiopropil)-heptametiltrisiloxano, acetato etoxilado)(Norac Concepts Inc.) el compuesto utilizado en la publicación. Debido a esta diferencia en formulación se llevó a cabo una comparativa de la eficacia de transformación de *Arabidopsis thaliana* ecotipo *Columbia* con Silwet L-77 y XIAMETER OFX-5211. El resultado que se obtuvo fue que si bien es cierto que las plantas embebidas en el medio de transformación con XIAMETER OFX-5211 presentan cierta necrosis en los tejidos más empapados, por ejemplo en aquellas regiones que quedan en contacto con el plástico de cubierta tras la transformación, y a que se debe ser más estricto en el plazo de retirada de dichos plásticos, no se observaron diferencias apreciables en la eficiencia de transformación de ambos coadyuvantes, por lo que debido a su disponibilidad se decidió continuar con XIAMETER OFX-5211.

4.2.2 Obtención de líneas de *A. thaliana* transformadas con el retrozima FaRtz de *F. ananassa*

Una vez puesto a punto el método de transformación estable utilizando el surfactante XIAMETER OFX-5211y MS-kanamicina 30 µg/ml como factor de selección, se procedió a llevarlo a cabo con tres construcciones diferentes del retrozima FaRtz, bajo un promotor 35s (construcción llamada P+T-); un promotor 35s y un terminador Tnos (construcción P+T+), y el retrozima por sí sola (construcción P-T-) (Figura 18). Estas construcciones con diferentes reguladores se realizaron con el fin de obtener una línea de expresión estable en la que estudiar distintos aspectos del ciclo de vida del retrotransposón, así como valorar los posibles efectos deletéreos causados por la transcripción del retrozima.

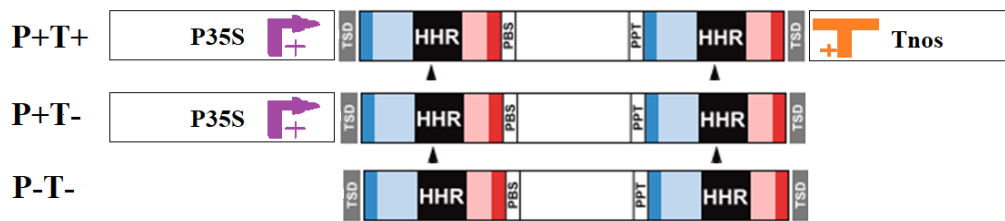


Figura 18: Esquema de las construcciones realizadas mediante el sistema tradicional por enzimas de restricción. Las flechas moradas indican la presencia de un promotor, mientras que las T naranjas señalan un terminador.

Tanto la puesta a punto del protocolo de transformación como la transformación con estas construcciones se llevó a cabo con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* C58, que produjo una baja tasa de transformación, causada, en parte por los problemas encontrados durante los procesos de selección y trasplante de las plantas. En este momento se continúa con la selección de las semillas, no habiéndose obtenido aún líneas estables. Paralelamente, ya se ha comenzado la transformación de plantas con otra cepa de *Agrobacterium*, LBA4404, en busca de una mayor eficiencia.

4.2.3 Diseño y obtención de construcciones con el retrozima de *F. ananassa* defectivo para el autocorte mediante el sistema GoldenBraid

Para aportar mayor solidez a la hipótesis de que el circRNA del retrozima es efectivamente fruto de la ligación del RNA autocortado por las ribozimas (Cervera *et al.*, 2016), se generaron nuevas construcciones con el retrozima de *F. ananassa* mutado en una de sus HHR. Para ello se optó por el sistema de ensamblado de unidades transcripcionales GoldenBraid 3.0 (Sarrion-Perdigones *et al.*, 2011). Este sistema modular supone un ahorro de tiempo cuando se pretende obtener distintas construcciones multigénicas, y permite mayor plasticidad, al trabajar con unidades transcripcionales que funcionan como bloques genéticos estandarizados e intercambiables. Aprovechando la disponibilidad de bloques de expresión con los que cuenta GoldenBraid, se sustituyó el marcador de selección, hasta ahora kanamicina, por el herbicida BASTA (glufosinato-amónico) debido a las facilidades de aplicación que éste ofrece. Además se incorporó un bloque de expresión con la proteína verde fluorescente (GFP), como gen marcador para poder diferenciar las inserciones del retrozima debidas a la transformación (que presentaran el gen de GFP contiguo al retrozima) de las inserciones debidas a una posterior movilización del elemento por retrotransposición (y que por tanto no presentarán el gen de la GFP aguas abajo).

Mediante el sistema GoldenBraid 3.0 se obtuvieron tres nuevas construcciones (Figura 19) con un retrozima de *F. ananassa* mutado aislado o bajo el control de distintos promotores y terminadores (promotor 35S del virus del mosaico de coliflor CaMV o promotor del gen de la nopalina sintasa de *A. tumefaciens*. La mutación puntual, en la

HHR situada en la LTR 3', consistió en la sustitución de la guanina clave del centro catalítico, que actúa como base en la catálisis, por una timina (Figura 20) impidiendo la reacción ácido-base del autocorte. Por tanto, el retrotransposón mutado FaRtzM, una vez transcrito, sólo puede autocortarse en la HHR de la LTR 5', dando lugar a un intermediario de transposición incorrectamente procesado, con un extremo 5'-OH, y un extremo 3' al que le falta el fosfato cíclico 2'-3' habitual (Figura 8).

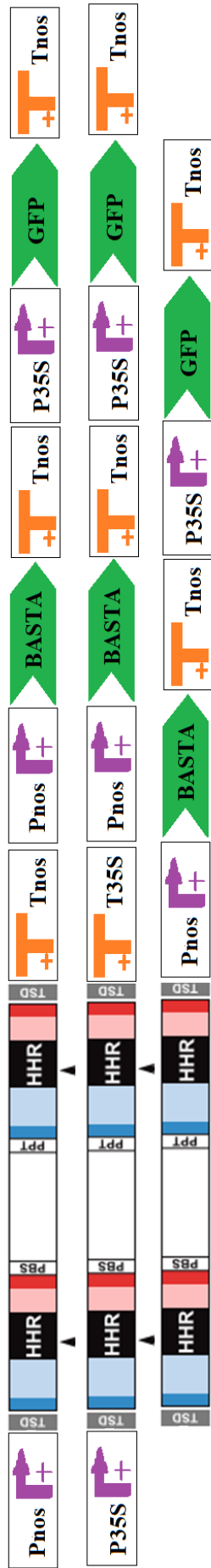


Figura 19: Esquema de las construcciones genéticas del retrozima mutado RtFaM, obtenidas mediante el sistema GoldenBraid. Las flechas moradas indican la presencia de un promotor, mientras que las T naranjas señalan un terminador.

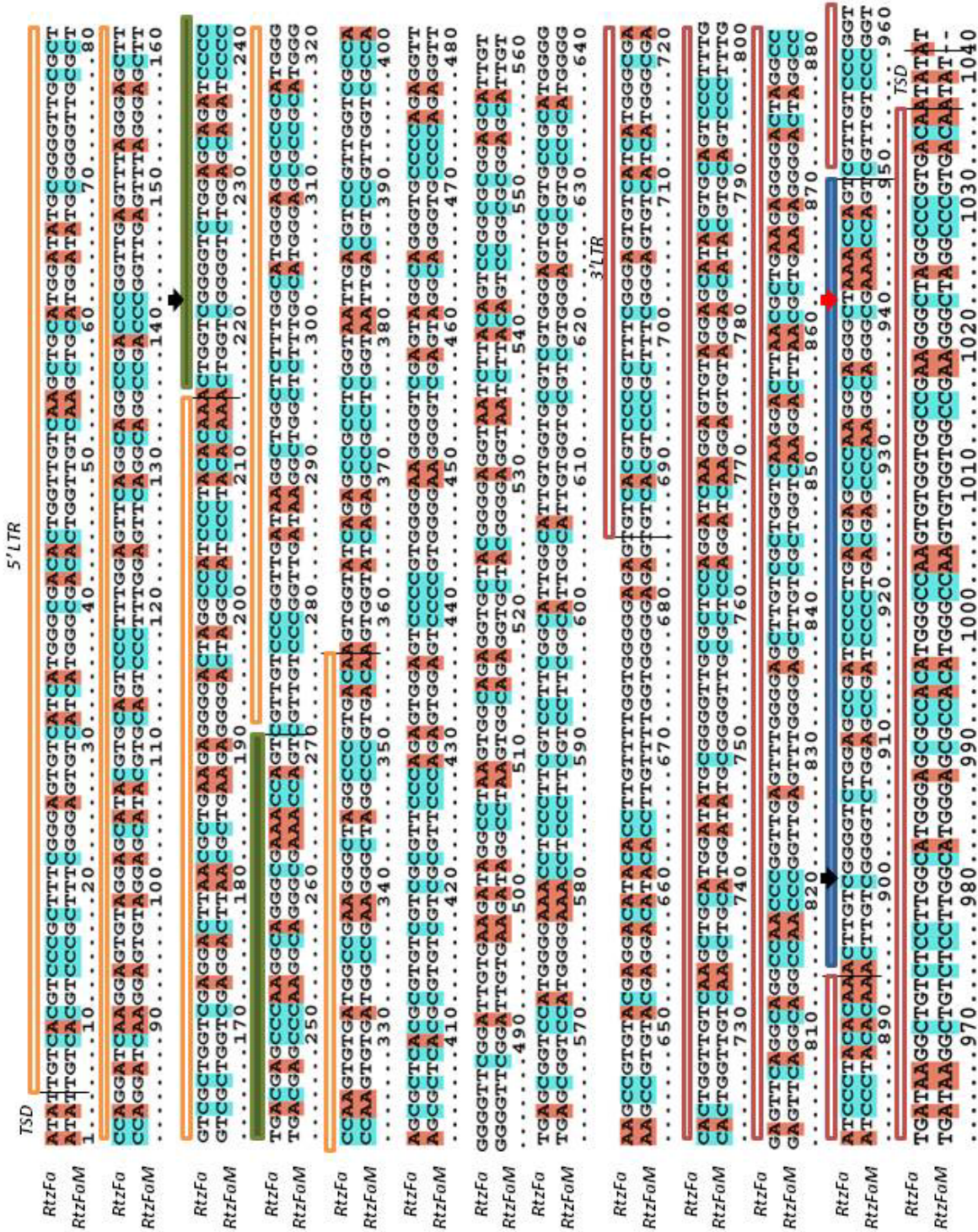


Figura 20: Secuencia del retrozima mutado completo. Las regiones TSD quedan indicadas, la retrozima 5'HHR se muestra como un rectángulo verde incluido dentro de la LTR 5' (rectángulo naranja), mientras que la HHR 3' mutada se indica con un rectángulo azul dentro de la región LTR 3' (rectángulo rojo). Los puntos de corte de ambas HHR se indican con una flecha negra, mientras que la mutación se muestra con una flecha roja.

4.2.4 Expresión transitoria en *N. benthamiana* del retrozima de *F. ananassa* defectivo para el autocorte

Las construcciones con el retrozima mutado FaRtzM, obtenidas mediante el sistema GoldenBraid, se validaron mediante su expresión transitoria en la planta modelo *Nicotiana benthamiana*.

Seis días después de la agroinfiltración se extrajo la totalidad del RNA del tejido foliar y se realizó un ensayo de hibridación northern blot para detectar el RNA del retrozima en un gel PAGE desnaturizante (Figura 21). En la membrana se observó una banda con un tamaño correspondiente al RNA lineal de FaRtzM completo, otra correspondiente al fragmento 5' del transcrito con un único corte en la HHR 5', y otro al fragmento para el transcrito 3' (Figura 21), pero ninguna correspondiente al RNA circular del retrozima, apoyando la hipótesis de que el circRNA del retrozima es efectivamente fruto de la ligación del RNA autocortado por las ribozimas (Cervera *et al.*, 2016).

En cuanto a las tres construcciones, los resultados bajo el promotor y terminador 35S mostraron una transcripción muy intensa del retrozima, mientras que se observó una transcripción bastante más baja de la construcción bajo el promotor y terminador Nos, tal y como se esperaba. En cuanto al retrozima sin reguladores, no se detectó transcripción del retrotransposón mediante northern blot.

De todo lo anterior se deriva que las construcciones de FaRtzM bajo un promotor 35S o Nos se transcriben activamente en plantas de *N. benthamiana* transformadas transitoriamente. Además, se demuestra que el RNA del retrozima defectivo para el autocorte en una de sus HHR es incapaz de formar intermediarios circulares en *N. benthamiana*, los cuales sí que se producen cuando se expresa transitoriamente el retrozima sin mutar (Cervera *et al.*, 2016).

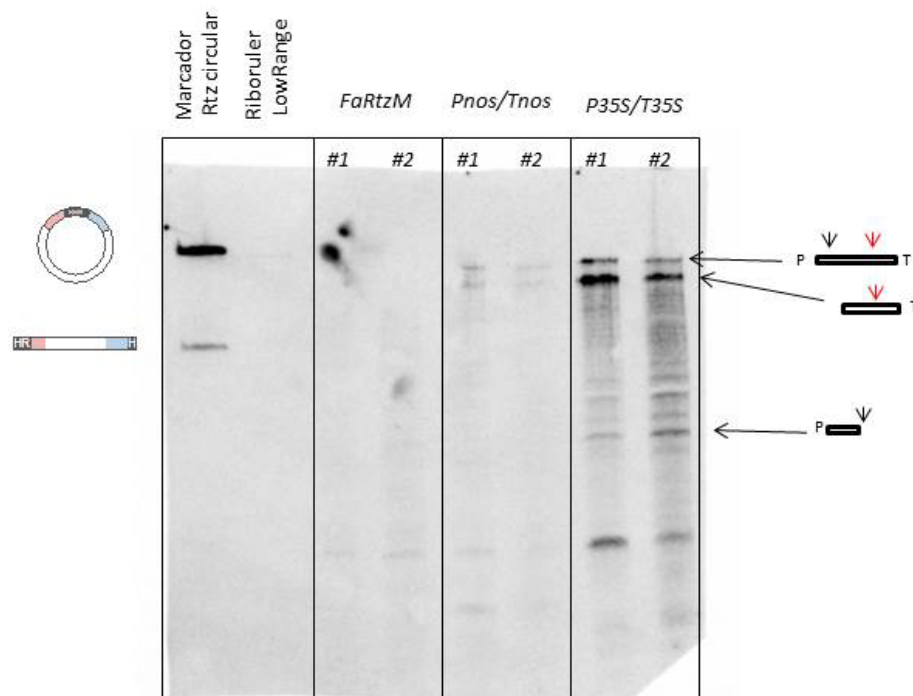


Figura 21: Análisis northern blot del RNA total extraído de *N. benthamiana* transformadas por agroinfiltración con distintas construcciones del retrozima mutado FaRtzM. El primer carril de la izquierda contiene el marcador de RNA circular obtenido *in vitro* mediante transcripción y ligación con tRNA ligasa, la banda superior corresponde al circRNA, mientras que la inferior corresponde a un bajo porcentaje de moléculas que se han autocortado *in vitro*. El segundo carril corresponde al marcador de peso molecular (no visible al no hibridar con la sonda). El resto de carriles corresponde a la construcción FaRtzM, el retrozima solo o bajo los pares Pnos/Tnos y P35S/T35S, tal y como se indica. La banda superior corresponde al tamaño esperado para el transcrito completo, desde el punto de inicio de la transcripción hasta el terminador, la segunda banda se corresponde con el fragmento entre el punto de corte de la ribozima HHR funcional (punta de flecha negra) hasta el terminador (incluyendo la HHR mutada, señalada con una punta de flecha roja); la banda inferior es el fragmento entre el inicio de la transcripción y el punto de corte de la HHR funcional.

4.2.5 Obtención de líneas de *A. thaliana* transformadas con el retrozima de *F. ananassa* defectivo para el autocorte

Las construcciones del retrozima mutado validadas en *N. benthamiana*, se introdujeron en la cepa LBA 4404 de *Agrobacterium thumefaciens* para transformar *A. thaliana* mediante inmersión floral usando el protocolo puesto a punto con las construcciones del retrozima intacto en pMOG800.

En este momento ya se han obtenido semillas de la primera generación transformante (T1), y están siendo seleccionadas mediante exposición al herbicida FINALE (glufosinato-amónico 150 g/l).

5. CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

5.1 Ribozima twister

Los análisis bioinformáticos realizados en este trabajo permiten concluir en primer lugar que la ribozima Tw está ampliamente distribuida en los genomas de plantas angiospermas, tanto mono- como dicotiledóneas. No obstante, dichos motivos Tw de plantas difieren ligeramente de los motivos canónicos descritos originalmente en procariontes y otros organismos (Roth *et al.*, 2014). Los análisis del presente trabajo demuestran además que los motivos Tw eucarióticos presentan un extremo 5' truncado, justo hasta el punto de corte, afectando tanto a la formación de la hélice conservada P1 como al sitio de corte canónico. Por otro lado, el estudio de los motivos Tw en el genoma de *M. domestica* ha permitido descubrir que esta ribozima está habitualmente asociada a una ORF codificante para una endonucleasa y una retrotranscriptasa (Figura 22) (secuencia concreta de *M. domestica* en Anexo III).

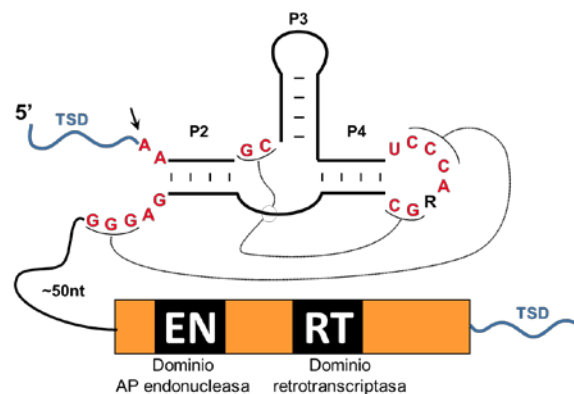


Figura 22: Representación esquemática de los motivos Tw ligados a la endonucleasa y retrotranscriptasa halladas aguas abajo. Se representa una ribozima consenso, en rojo los nucleótidos más conservados. Las líneas representan interacciones terciarias. Los segmentos en azul se corresponden a las dianas de inserción genómica (TSD o Target Site Duplications). Secuencia ejemplo en Anexo III.

Esta apreciación permitió revelar que los motivos Tw de *M. domestica* formarían parte del extremo 5' de retrotransposones tipo LINE, y más concretamente, de elementos pertenecientes a la superfamilia de los transposones RTE (Wicker *et al.*, 2007). Comprobamos además que este hecho no era exclusivo de los Tw hallados en el genoma de manzana, sino que la presencia de motivos Tw se extiende a multitud de retroelementos RTE en otros genomas vegetales y también animales. Esto sugiere que la ribozima Tw estaría implicada en el ciclo replicativo de estos retroelementos, de forma similar a lo descrito previamente para ribozimas como HDV en otras familias de retrotransposones LINE como el R2 (Eickbush y Eickbush, 2010; Ruminski *et al.* 2011). Cabe destacar que, muy recientemente, se ha descrito que los retroelementos de la superfamilia RTE existentes en los genomas de angiospermas se deben probablemente

a uno o más eventos de transferencia horizontal desde genomas de artrópodos a plantas (Gao *et al.*, 2017). Si se observan los extremos 5' de los RTEs de animales y plantas anotados por Gao *et al.* (2017) se pueden encontrar los motivos Tw analizados en el presente trabajo. Además, se observa que los TSDs (secuencia genómica que se repite en los extremos 5' y 3' del transposón durante el proceso de movilización) localizados en el extremo 5' de estos retroelementos, acaban justo en el punto correspondiente al sitio de autocorte predicho para la ribozima Tw (Figura 21) (Anexo III). Por todo ello se deduce que estos retrotransposones RTE con motivos Tw utilizarían como molde para la retrotranscripción e inserción genómica la molécula de RNA autocortada mediante la ribozima Tw conservada en el extremo 5'.

Name	Plant species/family	Accession number	3'-terminal motif	TSD
Hbr-RTE	<i>Hevea brasiliensis</i> /Euphorbiaceae	AJJZ010194017 (6162-2925)	(GTTGAGTTAA)2	GTAATTTTGTAATTT
Bvu-RTE	<i>Beta vulgaris</i> /Amaranthaceae	AYZW01017469 (11125-14568)	(TGTT)2	AGTAACAACAGGTGAA
Stu-RTE	<i>Solanum tuberosum</i> /Solanaceae	HQ896308 (64754-68786)	(TTG)6	TTTGAACCTCCCTTTT
Sco-RTE	<i>Solanum commersonii</i> /Solanaceae	JXZD01061961 (5854-1703)	(TTG)9	CATTACTAATACC
Nsy-RTE	<i>Nicotiana sylvestris</i> /Solanaceae	ASAF01052010 (3175-7246)	(TTG)5TTA	AATATGGGTCGG
Nta-RTE	<i>Nicotiana tabacum</i> /Solanaceae	AYMY01147160 (11693-15822)	(TTG)3TTA	ACATTTAGGCAAC
Nto-RTE	<i>Nicotiana tomentosiformis</i> /Solanaceae	ASAG01019631 (4270-8016)	(TTG)5TTA	TTTATTTT
Can-RTE	<i>Capsicum annuum</i> /Solanaceae	ASJV01011402 (16651-13000)	(TTG)6	ATTCTATTATGTA
Pbr-RTE	<i>Pyrus x bretschneideri</i> /Rosaceae	AJSU01017981 (2979-272)	(TTG)8	TTACTCTGTTTTGAGAGT
Mdo-RTE	<i>Malus domestica</i> /Rosaceae	ACYM01103212 (256-3545)	(TTG)7	TGTAGACTAAATGATA
Gma-RTE	<i>Glycine max</i> /Fabaceae	AC235444 (69306-66062)	(TTG)9	CATCTTTAATTTGGT
Gso-RTE	<i>Glycine soja</i> /Fabaceae	AZNC01046407 (17282-20457)	(TTG)6	AATTTTCATA
Mtr-RTE	<i>Medicago truncatula</i> /Fabaceae	AC149806 (30242-33273)	(TTG)5	TAATGCAATAAAAGCTTAA
Aip-RTE	<i>Arachis ipaensis</i> /Fabaceae	JQIO01000181 (628744-631951)	(TTG)4(TTTG)1(TTG)2	ATTCAATTAATGTATTA
Ahy-RTE	<i>Arachis hypogaea</i> /Fabaceae	HQ637178 (47266-50482)	TTG(TTTG)3TTG	TATGGTTATCTCAATCA
Mno-RTE	<i>Morus notabilis</i> /Moraceae	ATGF01002889 (51898-48719)	(TTG)5	AGAATAAAAACA
Cha-RTE	<i>Cleome hassleriana</i> /Cleomaceae	AOU01012705 (14901-18169)	(TTG)3TTA	TTTTATGAAAAA
Ach-RTE	<i>Actinidia chinensis</i> /Actinidiaceae	AONS01001806 (14550-18348)	(TTTG)2	TATACCAATATAAAC
Atri-RTE	<i>Amborella trichopoda</i> /Amborellaceae	AWHE01043936 (38341-41531)	(TGA)6	TCTAGCAAGCATAAT
Ttu-RTE	<i>Triticum turgidum</i> /Poaceae	CT009588 (108323-105135)	(TTG)5	TTATGAAGTGTGGTGTGTC
Tae-RTE	<i>Triticum aestivum</i> /Poaceae	CT009585 (74624-71434)	(TTG)5	TTATGAAGTGTGGTGTGTC
Tur-RTE	<i>Triticum urartu</i> /Poaceae	AOTI010086595 (12352-9050)	(TTG)5	TAAAGTTTGTAAATAGAAGTA
Ata-RTE	<i>Aegilops tauschii</i> /Poaceae	AF091802 (6604-9545)	(TTG)8	TAGCCAACATAATCCAGT
Sof-RTE	<i>Saccharum officinarum</i> /Poaceae	KF184817 (90241-93611)	(TTG)6	TAGAATGAAATGGCATT
Sit-RTE	<i>Setaria italic</i> /Poaceae	AGNK01002449 (203223-199864)	(TTG)6	TAGAGACAGACAATATCA
Bdi-RTE	<i>Brachypodium distachyon</i> /Poaceae	ADDN01001608 (13419-16760)	(TTG)16	TACCTACGGCCGCCACC
Pvi-RTE	<i>Panicum virgatum</i> /Poaceae	AC243230 (10717-15469)	(TTG)3	ATATTGTGAAAAAT
Ogr-RTE	<i>Oryza granulata</i> /Poaceae	ALNT01002995 (6674-3762)	(TTG)8	TACCACAAACAAG
Hvu-RTE	<i>Hordeum vulgare</i> /Poaceae	AJ001317 (7515-4421)	(TTG)7	ATTGCCAAGTATCAACTA
Zma-RTE	<i>Zea mays</i> /Poaceae	AJ850302 (10510-8736)	(TTG)7	ATTCCTCATCAGAAGTAA

Tabla 5: Elementos RTE anotados por Gao *et al.*, 2017. Todos los elementos citados muestran estructuras Tw más o menos alteradas con respecto al motivo canónico y como se muestra en la Imagen 2 de este trabajo. En todos los casos el motivo Tw aparece inmediatamente aguas abajo del TSD 5' (Anexo III)

En el ilustrativo caso del genoma de manzano (*M. domestica*), se identificaron más de 1400 posibles motivos Tw que, atendiendo sobre todo a su hélice P3, se clasificaron en tres tipos diferentes (Figura 11). La elevada variabilidad de secuencias y tamaños que presenta esta hélice P3 en particular, tanto en los motivos Tw de *M. domestica* como en Tw halladas en otros genomas de plantas (Figura 10), permite concluir que ni su secuencia ni su estructura serían determinantes para la catálisis u otras funcionalidades del motivo ribozimático.

Por otro lado, tal y como queda reflejado en este trabajo, si bien la conformación tridimensional de Tw es fundamental para su autocorte (Liu *et al.*, 2014), las copias genómicas que no poseen hélice P1 y/o sitio de autocorte canónico U|AA no parecen carecer totalmente de capacidad autocatalítica. Los análisis de autocorte *in vitro* realizados, especialmente en condiciones co-transcripcionales (tal y como actúa Tw y otros ribozimas *in vivo*), mostraron que las ribozimas Tw, tanto con hélice P1 débil, como sin hélice P1 alguna o sitio de corte canónico U|AA, mantienen suficiente actividad de autocorte como para ser detectables en los ensayos *in vitro*, aunque con una eficiencia claramente por debajo del motivo canónico. Estos resultados indicarían que la práctica totalidad de las ribozimas Tw halladas en el genoma de *M. domestica* y otros organismos aparentemente truncadas antes del punto de corte, en realidad retendrían la suficiente actividad de autocorte como para llevar a cabo el autoprosesado co-transcripcional del extremo 5' del RNA del retrotransposón. Sin embargo, no se puede descartar una segunda opción, y es que solo unas pocas copias genómicas de Tw que sí mantengan una hélice P1 estable y/o sitio de corte canónico sean las únicas capaces de replicarse e integrarse de manera truncada en el genoma, dando lugar al resto de copias cercenadas pero biológicamente inactivas que deberían perderse por deriva genética. No obstante, y en el caso particular de manzano, donde se aprecia que la práctica totalidad de elementos Tw parecerían potencialmente activos, es más probable concluir que las hélices P1 cerradas serían solo fruto de la inserción del retrotransposón en una TSD que aparearía por casualidad con el extremo 3' del motivo, no siendo en absoluto un requisito indispensable para la catálisis, ni por tanto, para la actividad del retrotransposón. Por otro lado, la existencia de un uracilo precediendo el punto de corte sí que parece tener un efecto importante en la catálisis del RNA de Tw, especialmente en ausencia total de la hélice P1, como quedó patente en los experimentos *in vitro* realizado con los mutantes NullA/C y NullB (Figura 3).

5.2 Retrozima de *F. ananassa*

Los experimentos aquí presentados muestran que el retrozima de *F. ananassa* con uno de sus dos motivos HHR inactivos, el situado en la LTR 3' en concreto, no da lugar a intermediarios circulares (circRtz) detectables por northern blot. Este resultado implica que es necesario al menos un extremo 2',3'-fosfodiéster, fruto del autocorte de la HHR en la LTR 3', para que se produzca la circularización del RNA del retrozima *in vivo*. Este dato se halla en consonancia con la hipótesis de que dicho circRtz es fruto de la ligación del RNA autocortado del retrozima por una ligasa de la planta (Cervera *et al.*, 2016), posiblemente una tRNA ligasa cloroplástica homóloga a la que se ha demostrado que es capaz catalizar la circularización del RNA del retrozima *in vitro* (Cervera *et al.*, 2016). Esta tRNA ligasa, además, se ha descrito como implicada en la circularización de distintos viroides de la familia *Avsunviroidae* en sus plantas huésped

(Nohales *et al.*, 2012), los cuales presentan muchas características en común con los circRtz (De la Peña y Cervera, 2017). En el futuro se planea obtener construcciones tanto con la HHR de la LTR 5' inactivada como con las dos HHR inactiva para seguir investigando la hipótesis de la circularización mediada por una tRNA ligasa.

También próximamente se plantea obtener construcciones idénticas a las realizadas por el sistema GoldenBraid (Figura 19) con el retrozima intacto, sin alterar ninguna de sus HHR. De esta forma, gracias al etiquetado por parte de la GFP del retrozima insertado mediante transformación, podrá evaluarse la capacidad de movilización del elemento en las líneas de expresión estable. Esto se debe a que ambas unidades transcripcionales (el retrozima y la GFP) se encontrarán inmediatamente colindantes en las inserciones debidas a la transformación de la planta por el plásmido binario. Sin embargo, si el retrozima es capaz de moverse en las generaciones siguientes, las nuevas copias del elemento estarán desligadas de la presencia de GFP, siendo solo las inserciones por transformación las etiquetadas con el marcador.

Si la hipótesis del intermediario circular de retrotransposición es correcta, la capacidad de movilización de la construcción mutada FaRtzM será nula. Sin embargo, la movilización del retrozima intacto en el genoma de otra planta distinta a la de su origen, como es *A. thaliana*, teniendo en cuenta que los retrozimas son elementos transponibles no autónomos, supondría la existencia en *Arabidopsis* de retrotransposones homólogos a los existentes en fresa, capaces de prestarle su maquinaria de retrotransposición al retrozima.

Otro de los experimentos que permitirán realizar las líneas de expresión estable del retrozima, tanto del natural como del mutado, será la secuenciación de su transcriptoma. Esto ayudará a estudiar la variabilidad existente entre los RNAs del retrozima(s) hallados en una misma especie, que no parece reflejar la variabilidad existente entre las formas genómicas (Cervera *et al.*, 2016). El origen de esta variabilidad aún no ha sido dilucidado, pudiendo ser debido a la replicación de los circRtz por un mecanismo de círculo rodante, llevada a cabo por una polimerasa de la planta propensa a error, así como por una posible edición postranscripcional del RNA del retrozima (Cervera *et al.*, 2016; De la Peña y Cervera, 2017). La comparación del transcriptoma de las líneas transformadas con el retrozima natural y con el retrozima defectivo para la circularización (sin posibilidad de replicarse por círculo rodante, por tanto), ayudará aclarar este último punto.

Cabe destacar que el hecho de que en el northern blot correspondiente a plantas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con la construcción FaRtzM sin elementos reguladores añadidos no se detectara el RNA del retrozima no tiene que implicar necesariamente que este elemento no posea promotores crípticos. Podría tenerlos, pero dar pie a una transcripción en niveles por debajo de límite de detección del northern blot. Además, hay que considerar que el retrozima está siendo expresado fuera de su genoma huésped, por lo que de existir ciertas secuencias promotoras, estas podrían estar

siendo pasadas por alto por la maquinaria celular de *N. benthamiana* si éstas son específicas de su especie de origen.

6. REFERENCIAS

- Adelson, D.L.; Raison, J. M.; Edgar, R.C. (2009). Characterization and distribution of retrotransposons and simple sequence repeats in the bovine genome. *PNAS*. 106(31): 12855-12860.
- Been M.D.; Wickham, G. S. (1997). Self-cleaving ribozymes of hepatitis delta virus RNA. *Eur. J. Biochem.*, 247:741-753.
- Bennetzen, J. (2005). Transposable elements gene creation and genome rearrangement in flowering plants. *Curr. Opin. Genet*, 15: 621-627.
- Bibillo, A.; Eickbush, T.H. (2004). End-to-end template jumping by the reverse transcriptase encoded by the R2 retrotransposon. *J. Biol. Chem.*, 279:14945–14953.
- Cervera, A.; De la Peña, M. (2014). Eukaryotic penelope-like retroelements encode hammerhead ribozyme motifs. *Mol Biol Evol.*, 31: 2941-2947.
- Cervera, A.; Urbina, D.; De la Peña, M. (2016). Retrozymes are a unique family of non-autonomous retrotransposons with hammerhead ribozymes that propagate in plants through circular RNA. *Genome Biol.*, 17:135.
- Clough, S.; Bent, A. F. (1998): Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 1:735-743.
- De la Peña, M.; Gago, S.; Flores, R. (2003). Peripheral regions of natural hammerhead ribozymes greatly increase their self-cleavage activity. *EMBO J.*, 22: 5561-5570.
- De la Peña, M.; García-Robles, I. (2010a). Ubiquitous presence of the hammerhead ribozyme motif along the tree of life. *RNA*, 16: 1943-1950.
- De la Peña, M.; García-Robles, I. (2010b). Intronic hammerhead ribozymes are ultraconserved in the human genome. *EMBO Rep.*, 11: 711-716.
- De la Peña, M.; García-Robles, I., Cervera, A. (2017). The Hammerhead ribozyme: A long story for a short RNA. *Molecules*. 22(1): 78
- Dhakshanamoorthy, D.; Selvaraj R. (2009). Extraction of genomic DNA from *Jatropha* sp. using modified CTAB method. *Rom. J. Biol.-Plant. Biol.*, 54:117–125.
- Doherty, E.; Doudna, J. (2001). Ribozyme structures and mechanisms. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct*, 30: 457-475.
- Eickbush, D.G.; Eickbush, T.H. (2010). R2 retrotransposons encode a self-cleaving ribozyme for processing from an rRNA cotranscript. *Mol. Cell. Biol.*, 30:3142-3150.
- Epstein, L.M.; Gall, J.G. (1987). Self-cleaving transcripts of satellite DNA from the newt. *Cell*, 48: 535-543

- Fedor, M.J. (2000). Structure and function of the hairpin ribozyme. *J Mol Biol.*, 297: 269-291.
- Feldstein, P.A.; Buzayan, J.M.; chng, G. (1989). Two sequences participating in the autolytic processing of satellite tobacco ringspot virus complementary RNA. *Gene*, 82: 53-61.
- Ferbeyre, G.; Smith, J.M.; Cedergren, R. Schistosome satellite DNA encodes active hammerhead ribozymes. (1998). *Mol. Cell. Biol.*, 18: 3880-3888.
- Ferré-D'Amaré, A. R.; Scott, W.G. (2010). Small Self-cleaving Ribozymes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 2: a003574.
- Feschotte, C., Jiang, N.n Wessler, S. (2002). Plant transposable elements: where genetics meets genomics. *Nature Rev. Genet.*, 3: 329-341.
- Gao, D.; Chu, Y.; Xia, H.; Xu, C.; Heyduk, K.; Abernathy, B.; Ozias-Akins, P.; Leebens-Mack, J.H.; Jackson, S.A. (2017). Horizontal transfer of non-LTR retrotransposons from arthropods to flowering plants. *Society for Molecular Biology and Evolution*. Public domain.
- Gebetsberger, J.; Micura, R. (2017). Unwinding the twister ribozyme from structure to mechanism. *WIREs RNA*. 8 (3). doi: 10.1002/wrna.1402.
- Gilbert, W. (1986). Origin of life: The RNA world. *Nature*, 319: 618.
- Guerrier-Takada C.; Gardiner K.; Marsh T.; Pace N.; Altman S. (1983). The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell*, 35: 849-857.
- Hammann, C.; Lupták, A.; Perreault, J.; De la Peña, M. (2012). The ubiquitous hammerhead ribozyme *RNA*, 18: 871–885.
- Hampel, A.; Tritz, R. (1989). RNA catalytic properties of the minimum (-)sTRSV sequence. *Biochemistry*, 28: 4929-33.
- Hutchins, C.J.; Rathjen, P.D.; Forster, A.C.; Symons, R.H. (1986). Self-cleavage of plus and minus RNA transcripts of avocado sunblotch viroid. *Nucleic Acids Res.*, 14:3627-3240.
- Jimenez, R. M.; Polanco, J. A.; Lupták, A. (2015). Chemistry and Biology of Self-Cleaving Ribozymes. *Trends Biochem Sci.*, 40: 648-661.
- Kaper, J.M.; Tousignant, M.E.; Steger, G. (1988). Nucleotide sequence predicts circularity and self-cleavage of 300-ribonucleotide satellite of arabis mosaic virus. *Biochem Biophys Res Commun.*, 154: 318-325.
- Kapitonov, V.V.; Tempel, S.; Jurka, J. (2009). Simple and fast classification of non-LTR retrotransposons based on phylogeny of their RT domain protein sequence. *Gene*. 448(2): 207-213.

- Khvorova, A.; Lescoute, A.; Westhof, E; Jayasena, S.D. (2003). Sequence elements outside the hammerhead ribozyme catalytic core enable intracellular activity. *Nat Struct Biol.*, 10:708-712.
- Knoester, M., van Loon, L.C., van den Heuvel, J., Hennig, J., Bol, J.F. and Linthorst, H. (1998) Ethylene-insensitive tobacco lacks nonhost resistance against soil-borne fungi. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 95, 1933–1937.
- Kordis, D.; Gubensek, F.; (1997). Bov-B long interspersed repeated DNA (LINE) sequences are present in *Vipera ammodytes* phospholipase A2 genes and in genomes of Viperidae snakes. *Eur. J. Biochem.* 246(3): 772-9.
- Kruger, K.; Grabowski P.J.; Zaug A.J.; Sands J.; Gottschling D.E.; Cech T.R. (1982). Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell*, 31: 147-157.
- Lazinski, D. W.; Taylor, J. M. (1995). Intracellular cleavage and ligation of hepatitis delta virus genomic RNA: regulation of ribozyme activity by cis-acting sequences and host factors. *J. Virol.*, 69: 1190–1200.
- Liu, Y.; Wilson, T. J.; McPhee, S. A.; Lilley D.M.J. (2014). Crystal structure and mechanistic investigation of the twister ribozyme. *Nat. Chem. Biol.*, 10: 739-744.
- Long, D.M., Uhlenbeck, O.C. (1994). Kinetic characterization of intramolecular and intermolecular hammerhead RNAs with stem II deletions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91(15): 6977-81.
- Macke, T. J.; Ecker, D. J.; Gutell, R. R.; Gautheret, D.; Case, D. A.; Sampatha, R. (2001). RNAMotif, an RNA secondary structure definition and search algorithm. *Nucleic Acids Res.* 2001 29: 4724–4735.
- Martick, M.; Horan, L.H.; Noller, H.F.; Scott, W.G. (2008). A discontinuous hammerhead ribozyme embedded in a mammalian messenger RNA. *Nature*, 454: 899-902.
- Martick, M.; Scott, W. G. (2006). Tertiary Contacts Distant from the Active Site Prime a Ribozyme for Catalysis. *Cell*, 126: 309-320.
- Mireault, C.; Paris, L-E.; Germain, H. (2014). Enhancement of the Arabidopsis floral dip method with XIAMETER OFX-0309 as alternative to Silwet L-77 surfactant. *Botany* 92: 1-3.
- Morgante, M. (2006). Plant genome organisation and diversity: the year of the junk!. *Curr. Opi. Biotech*, 17: 168-173.
- Murashige, T.; Skoog, F.(1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia plantarum*. Vol:15.

- Nissen, P.; Hansen, J.; Ban, N.; Moore, P.B.; Steitz, T.A. (2000). The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science*, 289: 920-930.
- Peebles, C.L.; Perlman, P.S.; Mecklenburg, K.L.; Petrillo, M.L.; Tabor, J.H.; Jarrell, K.A.; Cheng, H.L. (1986). A self-splicing RNA excises an intron lariat. *Cell*. 44(2):213-23.
- Pley, H.W.; Flaherty, K.M.; McKay, D.B. (1994). Three-dimensional structure of a hammerhead ribozyme. *Nature*, 372:68-74.
- Prody, G.A.; Bakos, J.T.; Buzayan, J.M.; Schneider, I.R.; Bruening, G. (1986). Autolytic processing of dimeric plant virus satellite RNA. *Science*, 231: 1577-1580.
- Rogers y Bendich. (1985). Plant Genomics DNA Extrac on Usig CTAB. *Plant Molecular Biology*, 5:69-79.
- Rojas, A. A.; Vazquez-Tello, A.; Ferbeyre, G.; Venanzetti, F.; Bachmann, L.; Paquin, B.; Sbordoni, V.; Cedergren, R. (2000). Hammerhead-mediated processing of satellite pDo500 family transcripts from Dolichopoda cave crickets. *Nucleic Acids Res.*, 28: 4037-4043.
- Roth, A.; Weinberg, Z.; Chen, A.G.Y.; Kim, P.B.; Ames, T.D.; Breaker R.R. (2014). A widespread self-cleaving ribozyme class is revealed by bioinformatics. *Nat. Chem. Biol.*, 10 (1): 56-60.
- Rubino, L.; Tousignant, M.E.; Steger, G.; Kaper, J.M. (1990). Nucleotide sequence and structural analysis of two satellite RNAs associated with chicory yellow mottle virus. *J Gen Virol.*, 71: 1897-1903.
- Ruminski, D.J.; Webb, C.H.; Riccitelli, N.J.; Lupták(2011). A Processing and translation initiation of non-long terminal repeat retrotransposons by hepatitis delta virus (HDV)-like self-cleaving ribozymes. *J. Biol. Chem.*, 286:41286-41295.
- Salehi-Ashtiani, K.; Lupták, A.; Litovchick, A.; Szostak, J.W. (2006). A genomewide search for ribozymes reveals an HDV-like sequence in the human CPEB3 gene. *Science*, 313:1788-1792.
- SanMiguel, P., Bennetzen, J. (1998). Evidence that a recent increase in maize genome size was caused by the massive amplification of intergene retrotransposons. *Ann. Bot.* 82: 37-44.
- Sarrion-Perdigones, A., Falconi, E.E., Zandalinas, S.I., Juárez, P., Fernández-del-Carmen, A., Granell, A., Orzaez, D. (2011). GoldenBraid: an iterative cloning system for standardized assembly of reusable genetic modules. *PLoS One* 6(7): e21622.
- Scott, W. G.; Finch, J. T.; Klug, A. (1995). The crystal structure of an AII-RNA hammerhead ribozyme: A proposed mechanism for RNA catalytic cleavage. *Cell*, 81: 991-1002

- Scott, W.G.; Horan, L.H.; Martick, M. (2013). The Hammerhead Ribozyme: Structure, Catalysis and Gene Regulation. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, 120: 1-3.
- Serganov, A. ; Patel, D. J. (2007). Ribozymes, riboswitches and beyond: regulation of gene expression without proteins. *Nat Rev Genet.*,8 (10): 776-790.
- Schnable, P.S.; Ware, D.;Fulton, R.S.;Stein, J.C.;Wei, F.; Pasternak, S.; *et al.* (2009). The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science*, 326: 1112-5.
- Stage-Zimmermann, T.K.; Uhlenbeck, O.C. (1998). Hammerhead ribozyme kinetics. *RNA.*, 4: 875-89.
- Timothy, J. W.; Lilley D.M. (2011). Do the hairpin and VS ribozymes share a common catalytic mechanism based on general acid–base catalysis? A critical assessment of available experimental data. *RNA.*, 17: 213–221.
- Valadkhan, S.; Manley, J.L. (2001). Splicing-related catalysis by protein-free snRNAs. *Nature*, 413: 701-707.
- Vogler, C.; Spalek, K.; Aerni, A.; Demougin, P.; Müller, A.; Huynh, K.D.; Papassotiropoulos, A.; De Quervain, D.J. (2009). CPEB3 is associated with human episodic memory. *Front. Behav. Neurosci.*, 4:3-4.
- Webb, C.H.; Riccitelli, N.J.; Ruminski, D.J.; Lupták, A. (2009). Widespread occurrence of self-cleaving ribozymes. *Science*, 326:953.
- Wicker, T.; Sabot, F.; Hua-Van, A.; Bennetzen, J. L.; Capy, P.; Chalhoub, B.; Flavell, A.; Leroy, P.; Morgante, M.; Panaud, O.; Paux, E.; SanMiguel, P.; Schulman, A. H. (2007). A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nature Reviews*, 8: 973-982.

ANEXO I

Cebadores

Clonación Tw-1Md_D	ATCTGTTAGTTGTCTCTCTCTAAACTCC
Clonación Tw-36Md_D	CCCAACAGCCACAATCTTTTTGAAC
Clonación Tw-Md_R (*)	GCTGT CGAaTt CCTGACGCCCTCCCC
137D_NptII	GATTGAACAAGATGGATTGCAC
137R_NptII	ACTCGTCAAGAAGGCGATAGAAG
134D_NptIII	AAAATACCGCTGCGTAAAAGATAC
134R_NptIII	CTTGATCCCCAGTAAGTCAAAAA
138D_Pnos	CTTGATCCCCAGTAAGTCAAAAA
Fgoi_retal1_D	GCGCCGTCTCGCTCGCCATATATTGTCACGTCCCGCTTTC
Fgoi_retal1_R/ TU_retal1_R	GCGCCGTCTCGGTTTCCCCATGGACCGCTCA
Fgoi_retal2_D/TU_retal2_D	GCGCCGTCTCGAAACCTCCCTTCGTCCTTCG
Fgoi_retal2_R	GCGCCGTCTCGCTCAAAGCATATTGTCACGGGCCTAGCC
TU_retal1_D	GCGCCGTCTCGCTCGGGAGATATTGTCACGTCCCGCTTTC
TU_retal2_R	GCGCCGTCTCGCTCAAGCGATATTGTCACGGGCCTAGCC

(*): En minúscula se muestran los nucleótidos cambiados para forzar una diana EcoRI.

ANEXO II

Vectores y unidades utilizados en las construcciones de GoldenBraid

Vectores	
pUPD2	GB0307
pDGB3_α1	GB0015
pDGB3_α2R	GB0018
pDGB3_Ω1	GB0019
pDGB3_Ω2	GB0021
SF (pTwister): Paso de α a Ω	GB1236

Unidades	
P35S no ATG, pUPD	GB0552
Pnos no ATG, pUPD	GB0555
Tnos:BASTA:Pnos, pUPD	GB0023
P35S:GFP:Tnos, pDGB1_α1	GB0359
Tnos, pUPD	GB0037
T35S, pUPD	GB0036

