

**ANÁLISIS DEL AUTOCORTE
RIBOZIMÁTICO Y LA EXPRESIÓN DE
LOS RETROELEMENTOS TIPO
PENÉLOPE EN LA ESPECIE
Selaginella moellendorffii.**

Universitat Politècnica de València (UPV)

**Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural
(ETSEAMN)**

TRABAJO FIN DE GRADO - BIOTECNOLOGÍA (2019/2020)

Autora:

Alba Seguí Pérez

Director científico:

Marcos de la Peña del Rivero

Tutor UPV:

Ismael Rodrigo Bravo



Valencia, 5 de julio de 2020

ANÁLISIS DEL AUTOCORTE RIBOZIMÁTICO Y LA EXPRESIÓN DE LOS RETROELEMENTOS TIPO PENÉLOPE EN LA ESPECIE *Selaginella moellendorffii*

Autora: Alba Seguí Pérez

Director científico: Marcos de la Peña del Rivero

Tutor UPV: Ismael Rodrigo Bravo

Valencia, julio de 2020

RESUMEN

A principio de los años 80 se descubrieron unas moléculas catalíticas cuyo centro activo estaba compuesto completamente por RNA y que se denominaron RNAs catalíticos o *ribozimas*. Desde su descubrimiento hasta ahora se han producido muchos avances en este campo que han permitido descubrir diferentes tipos de ribozimas. Entre las ribozimas naturales conocidas, el grupo más numeroso es el de las pequeñas ribozimas de autocorte. Dentro de este grupo, destacan las ribozimas cabeza de martillo o *hammerhead* (HHR), las primeras en describirse y probablemente las mejor estudiadas. Datos previos a este trabajo indican que las HHR se encuentran distribuidas en multitud de genomas a lo largo de toda la escala biológica. Además, muchos de estos motivos catalíticos se han encontrado con frecuencia en elementos genéticos móviles como son los retrotransposones. En este proyecto se ha trabajado con una primitiva planta vascular, *Selaginella moellendorffii*, cuyo genoma contiene retrotransposones de la familia de elementos similares a Penélope (PLEs), que se caracterizan por contener en su secuencia ribozimas de cabeza de martillo.

Para poder conocer el funcionamiento y las características de los transposones PLE y sus ribozimas en *S. moellendorffii*, se comprobó inicialmente el poder de autoescisión de dichas ribozimas. Para ello, primero se clonaron en plásmidos varios fragmentos del retrotransposón incluyendo la secuencia de la ribozima HHR. A continuación, se realizaron diversos ensayos de autocorte bajo diferentes condiciones (co-transcripcionales, post-transcripcionales, diversos tiempos de incubación...) para comprobar la eficiencia catalítica de la ribozima. Los resultados obtenidos *in vitro* mostraron muy bajas tasas de autocorte de la HHR. Estudios previos apuntaban que las ribozimas de los elementos PLE se disponen como dímeros en tándem. Esta disposición concreta y los resultados obtenidos de baja escisión de manera individual refuerzan la idea de que las ribozimas de los elementos Penélope de *S. moellendorffii* funcionarían más eficientemente como dímeros. Por tanto, futuros pasos en la investigación de las ribozimas en elementos PLE de *S. moellendorffii* consistirán en la realización de construcciones diméricas, de las cuales se esperan mayores tasas de escisión.

Por otro lado, en este estudio también se comprobó si los elementos Penélope se estaban expresando en planta. Para ello, se extrajo RNA total de plantas de *S. moellendorffii* y se realizaron ensayos de hibridación *Northern* usando sondas marcadas con

digoxigenina. Mediante estos estudios se comprobó la existencia de una banda de RNA del tamaño esperado para el elemento PLE de *S. moellendorffii* (~5 kb), lo que sugiere que este elemento transponible realmente se podría estar expresando en la planta. Para completar esta línea de trabajo, será necesario comprobar la amplificación por RT-PCR del RNA detectado por análisis *Northern*.

La elucidación de las tasas de escisión y del funcionamiento de ribozimas que se encuentran en organismos como *S. moellendorffii* proporciona las bases necesarias para poder comprender el funcionamiento de estos motivos en los genomas de multitud de especies. Con este conocimiento se podrá utilizar con mayor precisión ribozimas artificiales capaces de escindir secuencias específicas. Tanto las ribozimas naturales como las nuevas ribozimas creadas son cada vez más utilizadas en terapia génica para tener un control de la expresión genética.

PALABRAS CLAVE

Selaginella moellendorffii; elementos tipo Penélope (PLE); ribozimas de cabeza de martillo (HHR); retrotransposones

ANALYSIS OF RIBOZYMATIC AUTO-CLEAVING AND THE EXPRESSION OF PENELOPE-LIKE RETROELEMENTS IN THE SPECIES *Selaginella moellendorffii*

Author: Alba Seguí Pérez

Scientific director: Marcos de la Peña del Rivero

UPV Tutor: Ismael Rodrigo Bravo

Valencia, July 2020

SUMMARY

At the beginning of the 80s, catalytic molecules whose active centre was composed entirely of RNA were discovered and were called catalytic RNAs or *ribozymes*. Since their discovery until now, many advances have been made in this field that have led to the discovery of different types of ribozymes. Among the known natural ribozymes, the most numerous group is the small self-cleaving ribozymes. Within this group, hammerhead ribozymes (HHR) stand out, the first to be described and probably the best studied. Previous data indicate that hammerhead ribozymes are distributed in multitude of genomes throughout the biological scale. Furthermore, many of these catalytic motifs have been frequently found in mobile genetic elements such as retrotransposons. In this project we have worked with a primitive plant, *Selaginella moellendorffii*, whose genome contains retrotransposons of the Penelope-like elements family (PLEs), which are characterized by containing hammerhead ribozymes in its sequence.

In order to find out how PLE transposon and their ribozymes in *S. moellendorffii* work and which characteristics they have, the self-cleaving capabilities of these ribozymes were initially tested. For this purpose, several fragments of the retrotransposon including the HHR ribozyme sequence were first cloned into plasmids. Then, several transcription tests were performed under different conditions (co-transcriptionally, post-transcriptionally, different incubation times...) to check the self-cleaving efficiency of the ribozyme. The results obtained showed very low rates of self-cleaving of this HHR. Previous studies pointed out that ribozymes of PLE elements are arranged as tandem dimers. This particular arrangement and the expected low excision results individually reinforce the idea that ribozymes from *S. moellendorffii* PLEs would function more efficiently as dimers. Therefore, the next step in the investigation of ribozymes from *S. moellendorffii* would be to get dimeric constructs, from which higher cleavage rates are expected.

On the other hand, in this study we also checked whether the Penelope elements were being expressed in plants. For this purpose, total RNA was extracted from *S. moellendorffii* plants and Northern hybridization test were performed using probes marked with digoxigenin. These studies proved the existence of an RNA band of the expected size for the PLE of *S. moellendorffii* (~5kb), suggesting that this transposable element is being expressed in the plant. To complete this work line, it will be necessary to amplify by RT-PCR and to sequence the RNA detected by Northern analysis.

The elucidation of the cleavage rates and functioning of ribozymes found in organisms such as *Selaginella moellendorffii* provides the necessary basis for understanding the functioning of these motifs in the genomes of many other species. With this knowledge, artificial ribozymes capable of cleaving specific sequences could be used more precisely. Both natural and newly created ribozymes are increasingly used in gene therapy to control gene expression.

KEYWORDS

Selaginella moellendorffii; Penelope-like elements (PLE); hammerhead ribozymes (HHR); retrotransposons

ANÀLISI DE L'AUTOTALL RIBOZIMÀTIC I L'EXPRESSIÓ DELS RETROELEMENTS TIPUS PENÉLOPE EN L'ESPÈCIE *Selaginella* *moellendorffii*.

Autor: Alba Seguí Pérez

Director científic: Marcos de la Peña del Rivero

Tutor UPV: Ismael Rodrigo Bravo

València, juliol de 2020

RESUM

A principi dels anys 80 es van descobrir unes molècules catalítiques el centre actiu de les quals estava compost completament per RNA i que es van anomenar RNAs catalítics o *ribozims*. Des del seu descobriment fins ara s'han produït molts avanços en aquest camp que han permès descobrir diferents tipus de ribozims. Entre els ribozims naturals coneguts, el grup més nombrós és el dels petits ribozims d'autotall. Dins d'aquest grup, destaquen els ribozims cap de martell o *hammerhead* (HHR), els primers a descriure's i, probablement, els millor estudiats. Dades prèvies indiquen que els HHR es troben distribuïts en multitud de genomes al llarg de tota l'escala biològica. A més, molts d'aquests motius catalítics s'han trobat amb freqüència en elements genètics mòbils com són els retrotransposons. En aquest projecte s'ha treballat amb una primitiva planta vascular, *Selaginella moellendorffii*, el genoma de la qual conté retrotransposons de la família d'elements tipus Penèlope (PLEs), que es caracteritzen per contindre en la seua seqüència ribozims de cap de martell.

Per a poder conèixer el funcionament i les característiques dels transposons PLE i els seus ribozims en *S. moellendorffii*, es va comprovar inicialment el poder d'autoescissió d'aquests ribozims. Per tal d'estudiar-ho, primer es van clonar en plasmidis diversos fragments del retrotransposó incloent la seqüència del ribozim HHR. A continuació, es van realitzar diversos assajos de transcripció sota diferents condicions (co-transcripcionals, post-transcripcional, diferents temps de incubació...) per a comprovar l'eficiència catalítica del ribozim. Els resultats obtinguts van mostrar taxes molt baixes d'autotall del HHR. Estudis previs apuntaven que els ribozims dels elements PLE es disposen com a dímers en tàndem. Aquesta disposició concreta i els resultats esperats de baixa escissió de manera individual reforcen la idea que els ribozims dels elements Penèlope funcionarien més eficientment com a dímers. És per això que el següent pas en l'estudi dels ribozims en elements PLE de *S. moellendorffii* consistiria en la realització de construccions dimèriques, de les quals s'esperen majors taxes d'escissió.

D'altra banda, en aquest estudi també es va considerar important comprovar si els elements Penèlope s'estaven expressant en les plantes. Per fer-ho, es va extreure RNA total de plantes de *S. moellendorffii* i es van realitzar assajos d'hibridació *Northern* utilitzant sondes marcades amb digoxigenina. Mitjançant aquests estudis es va comprovar l'existència d'una banda d'RNA de la grandària esperada per a l'element PLE de *S. moellendorffii* (~5 kb), la qual cosa suggereix que aquest element transposable realment

s'estaria expressant en la planta. Per a completar aquesta línia de treball, serà necessari l'amplificació per RT-PCR i seqüenciació del RNA detectat per anàlisi *Northern*.

L'elucidació de les taxes d'escissió i del funcionament de ribozims que es troben en organismes com *Selaginella moellendorffii* proporciona les bases necessàries per a poder comprendre el funcionament d'aquests motius en els genomes de multitud d'espècies. Amb aquest coneixement es podrà utilitzar amb major precisió ribozims artificials capaços d'escindir seqüències específiques. Tant els ribozims naturals com els nous ribozims creats són cada vegada més utilitzats en teràpia gènica per a tindre un control de l'expressió genètica.

PARAULES CLAU

Selaginella moellendorffii; elements tipus Penélope (PLE); ribozims cap de martell (HHR); retrotransposons

AGRADECIMIENTOS

Quiero aprovechar estas líneas para agradecer a todas esas personas que me han ayudado y apoyado a lo largo de esta etapa de mi vida.

En primer lugar, quisiera agradecerle a Marcos De la Peña la oportunidad que me ha dado al abrirme las puertas de su laboratorio. Por enseñarme y guiarme en todo momento. Gracias por todo el cariño que le has dedicado a este trabajo a pesar de la situación tan caótica. Del mismo modo, quisiera agradecerle al resto de compañeros del laboratorio (Amelia, María, Pedro...) por recibirme cada día con una sonrisa y explicarme todo aquello que no acababa de entender. Gracias por hacer mi trabajo en el laboratorio más fácil.

También quisiera agradecerle a Ismael Rodrigo su dedicación como profesor y las ganas incansables de que seamos unos verdaderos profesionales.

No quiero olvidar a los profesores que me han acompañado a lo largo de mi vida universitaria, gracias a los cuales he podido adquirir los conocimientos necesarios para llevar a cabo este trabajo.

Por último, quisiera dar las gracias a Sergi, Miguel, Paula, Carmen, Marina, Clara y Cristina por haber estado siempre a mi lado y por haber compartido tantos momentos juntos durante estos cuatro años. A Aitana, Neus, María y Ariadna por todo el apoyo brindado. A mis padres y a mi hermana, por todo.

ÍNDICE

ÍNDICE DEL DOCUMENTO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. RIBOZIMAS	1
1.1.1. La familia de las pequeñas ribozimas de autocorte	2
1.2. RETROTRANSPONES	4
1.2.1. Elementos similares a Penélope	5
1.3. HHR ASOCIADAS A PLEs EN <i>S. moellendorffii</i>	6
1.4. POSIBLES APLICACIONES FUTURAS DE LAS RIBOZIMAS	7
1.4.1. Interruptores basados en ribozimas (<i>riboswitches</i>)	8
1.4.2. Aplicaciones terapéuticas	9
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS	12
3.1. ESTUDIO DEL AUTOCORTE DE HHR EN <i>Selaginella moellendorffii</i>	12
3.1.1. Búsqueda bioinformática de la secuencia.	12
3.1.2. Extracción del DNA genómico de <i>S. moellendorffii</i>	12
3.1.3. Clonación del retrotransposón PLE con la secuencia de la ribozima HHR.	12
3.1.4. Transformación bacteriana	13
3.1.5. Transcripción <i>in vitro</i> de los plásmidos que contienen la secuencia ribozimática	14
3.1.6. Cinética post-transcripcional del RNA purificado	14
3.1.7. Futuros experimentos: Construcción del dímero ribozimático	15
3.2. EXPRESIÓN DE PLE EN <i>S. moellendorffii</i>	16
3.2.1. Extracción de RNA de la planta	16
3.2.2. <i>Northern blot</i>	16
3.2.3. Futuros experimentos: Amplificación por RT-PCR y clonación del elemento PLE detectado	18
4. RESULTADOS	20
4.1. ESTUDIO DEL AUTOCORTE DE LA HHR DE <i>S. moellendorffii</i>	20
4.1.1. Clonación de la ribozima HHR de <i>S. moellendorffii</i>	20
4.1.2. Transcripción <i>in vitro</i> de las construcciones SM-1 y SM-4	21
4.1.3. Obtención de nuevas construcciones truncadas a partir de SM-1	22
4.1.4. Transcripción <i>in vitro</i> de las construcciones SM-1, SM-1A, SM-1B y SM-1C	23
4.1.5. Análisis cinético de SM-1A y SM-1B	25
4.1.6. Futuros experimentos: construcción de los dímeros ribozimáticos	27

4.2.	ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LOS ELEMENTOS PLE EN <i>S. moellendorffii</i> .	27
4.2.1.	<i>Northern blot</i>	28
5.	DISCUSIÓN	30
6.	CONCLUSIONES	32
6.1.	PRESPECTIVAS FUTURAS	32
7.	BIBLIOGRAFÍA	33
	ANEXOS	37
1.	Clon SM-1.....	37
2.	Clon SM-1A	37
3.	Clon SM-1B	38
4.	Clon SM-1C	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reacciones catalizadas por RNAs catalíticos	2
Figura 2. Representación de la estructura de la ribozima de cabeza de martillo (HHR)	4
Figura 3. Representación esquemática de elementos similares a Penélope (PLE).....	5
Figura 4. Representación esquemática de las ribozimas de cabeza de martillo (HHR) asociadas a elementos similares a Penélope (PLE) en la planta <i>S. moellendorffii</i>	6
Figura 5. Estrategias para la expresión génica controlada por aptámeros	8
Figura 6. Esquema con los pasos para realizar dímeros ribozimáticos a partir de los clones SM-1A y SM-1C.....	15
Figura 7. Esquema con los pasos para realizar la RT-PCR y la posterior clonación en pBlueScript de los fragmentos de interés detectados en el análisis <i>Northern</i>	19
Figura 8. Representación esquemática de los vectores	21
Figura 9. Análisis del autocorte de las construcciones SM-1 y SM-4	22
Figura 10. Construcciones truncadas obtenidas a partir de SM-1	23
Figura 11. Transcripción <i>in vitro</i> de SM-1, SM-1A, SM-1B y SM-1C con nucleótidos no marcados.	24
Figura 12. Transcripción <i>in vitro</i> de SM-1, SM-1A, SM-1B y SM-1C con nucleótidos marcados	25
Figura 13. Análisis cinético de las construcciones SM-1A y SM-1B.....	26
Figura 14. Gel electroforético con el producto de la amplificación para la realización de los dímeros	27
Figura 15. Determinación del nivel de impurezas en preparaciones de RNA de Sela1 y Sela2.....	28
Figura 16. Resultados del análisis <i>Northern blot</i> para detectar la expresión de PLE en <i>S. moellendorffii</i>	29
Figura 17. Conformación de ribozima cabeza de martillo (HHR) como monómero vs. dímero.....	31

ABREVIATURAS

APS	Amonio Peroxodisulfato
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio
DDT	Dicloro difenil tricloroetano
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EN	Endonucleasa
HHR	Ribozima de cabeza de martillo o <i>hammerhead</i>
kb	Kilobase, 1000 pares de bases
nt	Nucleótido
NTP	Nucleótido trifosfato
ORF	Marco de lectura abierto
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PLE	Elementos similares a Penélope o <i>Penelope-like elements</i>
PLTR	<i>Pseudo-long terminal repeats</i>
PSA	Persulfato amónico
rmp	Revoluciones por minuto
RPI	Inhibidor de las proteínas RNasas
RT	Transcriptasa reversa
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
SDS	Dodecilsulfato sódico
SSC	Tampón de citrato de sodio salino
TBE	Tampón formado por Tris, borato y EDTA.
TEMED	N,N,N',N' tetrametil-etilendiamina
TERT	Telomerasa transcriptasa reversa
TEs	Elementos transponibles
Tris	Tris hidroximetil aminometano
UTP	Uridina trifosfato
UTRs	Regiones sin traducir

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. RIBOZIMAS

Las ribozimas o RNAs catalíticos son enzimas cuyo centro catalítico está compuesto exclusivamente por RNA, con lo cual no se requiere la participación directa de proteínas para producir la catálisis. Hasta hace casi 40 años se creía que en biología las únicas moléculas con capacidad catalítica eran las proteínas. No fue hasta el 1982 cuando se descubrió que ciertas moléculas de RNA también tenían esta capacidad (Kruger et al., 1982). Este primer ejemplo de ribozimas eran los llamados intrones autocatalíticos del Grupo I, en los que se comprobó que era el propio RNA que promovía su autocorte, o también llamada actividad en *cis*. En 1983, otro grupo publicó un artículo (Guerrier-Takada et al., 1983) donde se demostró que el RNA de la ribonucleasa P es la subunidad catalítica que media el corte de tRNA con actividad en *trans*. La RNAsa P se mantenía invariable al final de la reacción catalítica, por lo tanto, tenía capacidad de recambio de manera similar a las enzimas proteicas.

El descubrimiento de las ribozimas hizo plausible la hipótesis del “Mundo del RNA”, donde se postula que en un mundo biológico primitivo tanto el material genético como las enzimas estarían formadas por RNA y no por DNA y proteínas. Este concepto fue reforzado con el descubrimiento en el año 2000 de que los ribosomas son en realidad ribozimas (Nissen et al., 2000). En esta investigación se descubrió que las propiedades catalíticas del ribosoma se situaban en un centro activo formado únicamente por ácido ribonucleico.

Aparte de los intrones del Grupo I, el ribosoma o el procesamiento del tRNA por la RNAsa P, existen otras clases de ribozimas naturales como por ejemplo el autoprosesamiento de los intrones del Grupo II, las ribozimas pequeñas de autocorte (Tanner, 1999) o el propio *spliceosoma* (Butcher, 2009). En la actualidad, se han descrito múltiples grupos de ribozimas naturales y sus correspondientes mecanismos de catálisis. Asimismo, también se han diseñado ribozimas artificiales con un gran interés biotecnológico.

Normalmente el RNA catalítico se clasifica según su tamaño y mecanismo de reacción. Se ha visto que los RNAs catalíticos de gran tamaño (entre 150-3000 nucleótidos) catalizan reacciones que generan productos con hidroxilos en 3' y fosfatos en 5' (Figura 1A), mientras que los RNAs catalíticos de pequeño tamaño (35-150 nucleótidos) catalizan reacciones que generan productos con un fosfato cíclico en 2'-3' y un hidroxilo en el extremo 5' (Figura 1B) (Tanner, 1999).

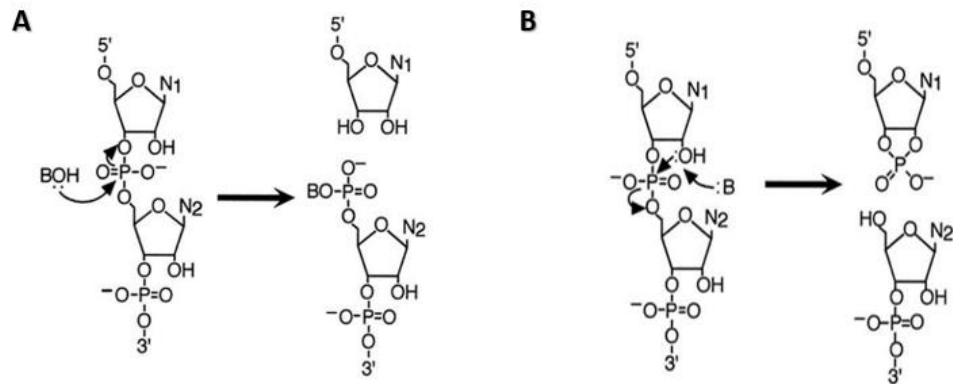


Figura 1. Reacciones catalizadas por RNAs catalíticos. **A.** Corte generado por RNAs catalíticos de gran tamaño (150-3000 nucleótidos) que generan productos con hidroxilo en 3' y fosfato en 5'. **B.** Mecanismo de reacción de RNAs catalíticos de pequeño tamaño (35-150 nucleótidos) donde la reacción se inicia por la activación del hidroxilo 2'. Los productos resultantes contienen un fosfato cíclico en 2'-3' y un hidroxilo en el extremo 5'. En ambos (A) y (B), se observa que el número neto de enlaces se conserva durante la reacción. La figura ha sido obtenida de Tanner (1999).

Cabe destacar que la mayoría de las ribozimas naturales descritas hasta la fecha se limitan a la catálisis de rotura y/o ligación del enlace fosfodiéster del RNA. Las ribozimas se suelen autocortar en una ubicación específica de su secuencia, utilizando el emparejamiento de bases y las interacciones terciarias para ayudar a alinear el sitio de corte dentro del centro catalítico (Doherty y Doudna, 2001).

1.1.1. La familia de las pequeñas ribozimas de autocorte

Englobadas bajo el término “pequeñas ribozimas de autocorte” se encuentran aquellas ribozimas con un tamaño que varía entre los 35 a los 150 nucleótidos. Hasta el momento se han descubierto nueve familias de pequeñas ribozimas naturales distintas: las ribozimas de cabeza de martillo (*hammerhead* o HHR), ribozimas de 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*. Cada una de estas ribozimas tiene una arquitectura general única y su estudio ha sido fundamental para la comprensión de la versatilidad estructural, bioquímica y biológica del RNA.

1.1.1.1. Roles biológicos de las pequeñas ribozimas de autocorte

Se han conseguido dilucidar algunas de las funciones que realizan las pequeñas ribozimas de autocorte en los sistemas biológicos; a pesar de ello, aún queda mucho por aprender sobre el significado biológico de estos curiosos RNAs catalíticos. Su abundancia y amplia distribución sugieren que cumplen funciones importantes en la naturaleza. Desde su descubrimiento, se sabe que los RNAs de autocorte desempeñan funciones cruciales en la replicación en círculo de algunos organismos con genomas de RNA circular, como viroides o RNAs satélite de virus de plantas. Más recientemente, se han encontrado como

partes de numerosos retrotransposones y en casos aislados se ha demostrado que jugarían papeles en la biogénesis de mRNA y la regulación génica (García-Robles et al., 2012; Jimenez et al., 2015; C. E. Weinberg et al., 2019). No obstante, la biología de estas ribozimas comunes sigue siendo un área de investigación muy poco explorada.

1.1.1.2. *Hammerhead*

Dentro de las pequeñas ribozimas de autocorte, las ribozimas cabeza de martillo (*hammerhead* o HHR) son el grupo de ribozimas más ampliamente estudiado durante los últimos 30 años porque su pequeño tamaño y su actividad catalítica los convierten en excelentes modelos para la investigación de la función del RNA (Murray et al., 1998).

Motivos como la HHR o la HPr fueron descubiertos formando parte del RNA de satélites virales participando en el procesado de los transcritos resultantes de la replicación por círculo rodante (Prody et al., 1986). Unos años más tarde, esta ribozima se encontró en el DNA repetitivo de genomas animales tan distintos como tritones (Epstein y Gall, 1987), tremátodos (Ferbeyre et al., 1998) y grillos de cueva (Rojas et al., 2000). Más recientemente y gracias a los avances en la bioinformática y las bases de datos, se pudieron realizar búsquedas de similitud. Estas búsquedas fueron fundamentales para el descubrimiento de la naturaleza generalizada de las ribozimas cabeza de martillo, demostrando, así, como esta pequeña molécula que sufre autocorte se distribuye por toda la biosfera (De La Peña y García-Robles, 2010a). Estas búsquedas se completaron con investigaciones posteriores (Hammann et al., 2012; Perreault et al., 2011; Seehafer et al., 2011) donde se asentó definitivamente la hipótesis de una ribozima cabeza de martillo ubicua en los genomas.

En la actualidad, las funciones biológicas de las ribozimas HHR que justifiquen su presencia en los genomas de multitud de organismos, son poco conocidas. Hasta el momento, se han observado HHRs en genomas eucariotas asociados a diferentes clases de retrotransposones, ya sean autónomos, como por ejemplo los elementos tipo Penélope (Cervera y De La Peña, 2014), los cuales se van a tratar en este trabajo, o bien los retotransposones no autónomos, como los retrozimas de animales (Cervera y De La Peña, 2020) y plantas (Cervera et al., 2016). Además, se han descrito otras HHRs altamente conservadas dentro de regiones no codificantes de genes de vertebrados superiores, en intrones (De La Peña y García-Robles, 2010b) y dentro de 3' UTRs (Martick et al., 2008). El análisis bioinformático sugiere que estas ribozimas intrónicas podrían ofrecer una nueva forma de regulación genética adquirida a través de la domesticación de las ribozimas de retroelementos presentes en metazoos inferiores (García-Robles et al., 2012).

En relación con la **estructura** de esta ribozima, las HHR presentan tres hélices (I, II y III), dos de las cuales están cerradas por bucles terminales (bucles 1, 2 y 3), tal y como se muestra en la figura 2A. Las hélices se distribuyen alrededor del centro catalítico, el cual está formado por unos 15 nucleótidos, 13 de ellos altamente conservados en la práctica totalidad de las ribozimas HHR naturales descritas. Esta distribución de las hélices en torno al centro catalítico favorece que la ribozima adopte una forma de letra gamma (γ) en la cual el bucle 1 interacciona de manera terciaria con el bucle 2. El hecho de que la mayoría de

las ribozimas contengan la secuencia conservada y características estructurales similares indica que esta conformación tridimensional es la necesaria para que se lleve a cabo la escisión. Las ribozimas HHR pueden tener diferentes topologías y, por lo tanto, se pueden clasificar en tres posibles tipos (tipo I, II o III) dependiendo de que hélice presente los extremos 3' y 5' del RNA (Figura 2B).

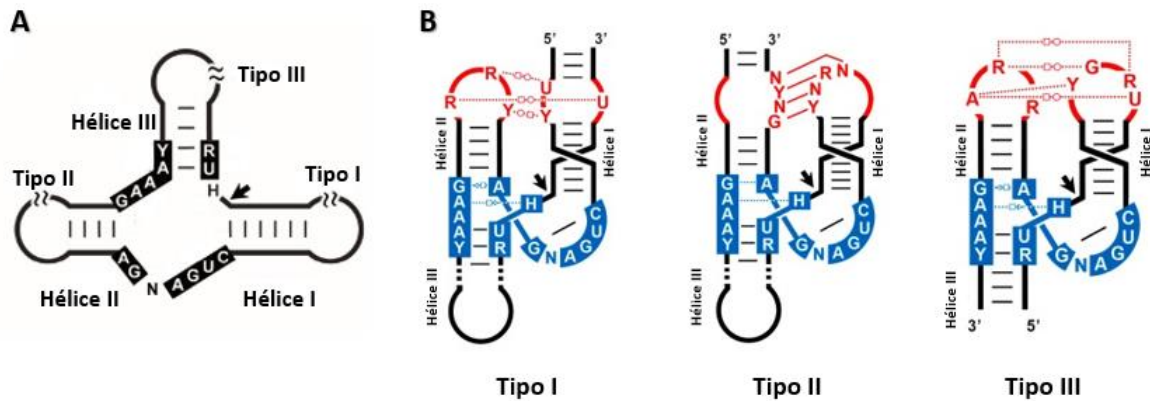


Figura 2. Representación de la estructura de la ribozima de cabeza de martillo (HHR). Los nucleótidos altamente conservados se incluyen dentro de una caja (en A coloreada de negro y en B de azul). R representa las bases púricas e Y representa las bases pirimidínicas. **A.** Representación clásica de la estructura secundaria de HHR formada por las tres hélices (I, II, III) que rodean el centro catalítico compuesto por 15 nucleótidos. **B.** Representación esquemática de la estructura terciaria de HHR naturales. Las interacciones terciarias que se producen entre la hélice I y la hélice II aparecen de color rojo. Las interacciones de Watson-Crick se indican con líneas continuas mientras que las líneas punteadas indican apareamientos no Watson-Crick. Imagen modificada de De La Peña et al. (2017).

1.2. RETROTRANSPOSONES

El DNA genómico en muchos eucariotas está compuesto, en gran medida, de elementos transponibles (*transposable elements* o TEs). Es sorprendente observar cómo en genomas vegetales, un elevado porcentaje del DNA está compuesto por TEs, y así por ejemplo, el 85% del genoma de maíz está constituido por estos elementos móviles (Schnable et al., 2009). Estos elementos pueden desplazarse e insertarse de manera autónoma en diferentes partes del genoma de una célula. Los TEs más comunes en los genomas eucariotas son los retrotransposones. Un retrotransposón es un tipo de elemento genético móvil que puede mover copias de sí mismo a diferentes ubicaciones dentro del genoma mediante una transcripción reversa de su RNA intermediario. En este proceso, el retrotransposón se copia primero del *locus* genómico mediante su transcripción en RNA. Luego, este intermediario de RNA es copiado por transcripción reversa en un cDNA que se inserta nuevamente en el genoma en una nueva ubicación. Para facilitar este proceso, los retrotransposones generalmente codifican proteínas como las transcriptasas reversas (RT) y las endonucleasas (EN) (Gladyshev y Arkhipova, 2007; Weinberg et al., 2019).

Los retrotransposones se pueden dividir en 5 grandes grupos teniendo en cuenta los mecanismos básicos de transposición y la similitud de secuencia: retrotransposones LTR (*Long Terminal Repeats*), DIRS (*Dictyostelium Intermediate Repeat Sequence*), PLEs

(*Penelope-Like Elements*), LINEs y SINEs (*Long y Short Interspersed Nucleoide Elements*) (Wicker et al., 2007).

1.2.1. Elementos similares a Penélope

Los elementos similares a Penélope (*Penelope-like elements* o PLEs) son una clase generalizada pero no muy estudiada de TEs, que se encuentran en una gran variedad de genomas eucariotas, principalmente amebas, hongos y animales (excluyendo mamíferos) (Arkhipova, 2006; Evgen'ev y Arkhipova, 2005).

En cuanto a su **estructura**, los PLE genómicos están delimitados por dos repeticiones directas (PLTR) que flanquean un único marco de lectura abierto (ORF) que suele codificar un factor con dos dominios: una transcriptasa reversa (RT), similar a la RT de las telomerasas eucarióticas, y una endonucleasa (EN) con el motivo GIY-YIG (Figura 3). Se ha visto que los PLEs tienen un promedio de aproximadamente 3 kb y que los PLTR siempre contienen variantes mínimas de la ribozima de cabeza de martillo (HHR) (Cervera y De la Peña, 2014).



Figura 3. Representación esquemática de elementos similares a Penélope (PLE). Las repeticiones directas flanqueantes (PLTR) se muestran como flechas negras y el ORF mediante un rectángulo naranja. Figura extraída y modificada de Cervera y De la Peña, (2014).

Los PLEs a menudo se encuentran adyacentes entre sí en una disposición en tándem. Esta disposición en tándem probablemente sea necesaria para que el elemento se exprese (Schostak et al., 2008).

Según lo descrito con anterioridad, son varias las características estructurales que distinguen a los PLEs de las otras clases de elementos transponibles que contienen transcriptasa reversa (RT): la presencia del dominio endonucleasa GIY-YIG, la capacidad de retener intrones, y la organización en tándem parcial. Además, en estudios filogenéticos anteriores (Arkhipova et al., 2003), se detectó que los PLEs no pertenecen a las clases de retrotransposón LTR ni a los retrotransposones no LTR. En cambio, estos motivos ocuparían un lugar especial en la filogenia de los retroelementos, puesto que comparten un antepasado común con la telomerasa transcriptasa reversa (TERT). Las TERTs son una clase altamente especializada de RT no móviles responsables del mantenimiento de los extremos cromosómicos lineales en la mayoría de los eucariotas. De hecho, los únicos genes que contienen RTs eucariotas conocidos que carecen de dominios EN son los RT de telomerasa (TERT).

En posteriores estudios (Gladyshev y Arkhipova, 2007), describieron un subconjunto de PLEs que también carecen de dominios EN dentro de regiones teloméricas. Se encontraron estos motivos en rotíferos bdeloideos, hongos basidiomicetos,

estramenópilos y plantas, como la primitiva *Selaginella moellendorffii*. Las especies estudiadas pertenecían a cuatro reinos eucariotas distintos.

1.3. HHR ASOCIADAS A PLEs EN *S. moellendorffii*

En este proyecto se estudiarán las HHRs existentes en *Selaginella moellendorffii*, una planta vascular no floreciente. Se trata de un primitivo organismo vegetal que apareció aproximadamente hace 410 millones de años. Actualmente se utiliza como organismo modelo y es clave en los estudios de evolución en plantas. El tamaño del genoma de esta especie es de aproximadamente 100 megapares de bases, siendo uno de los genomas más pequeños encontrado en plantas.

En el año 2007, se describió en esta primitiva planta la presencia de elementos similares a PLE deficientes de EN (Gladyshev y Arkhipova, 2007). Estos elementos se situaban en las regiones teloméricas del genoma vegetal. En el año 2010, se describió la presencia generalizada de las ribozimas de cabeza de martillo en genomas tanto bacterianos como eucariotas, incluyendo el caso de *S. moellendorffii* (De La Peña y García-Robles, 2010a). Posteriormente, en 2014, se encontró que las HHR en *S. moellendorffii* estaban asociadas a la familia PLE de esta planta (Cervera y De La Peña, 2014). En concreto, el motivo HHR se encontraba situado en los dos PLTR que flanquean la RT de dichos elementos PLE (Figura 4).

Al igual que en todos los PLEs descritos en la literatura, las ribozimas HHR de *S. moellendorffii* son motivos de tipo I, que es un tipo de motivo más relacionado con genomas de metazoos que de plantas (Cervera et al., 2016).

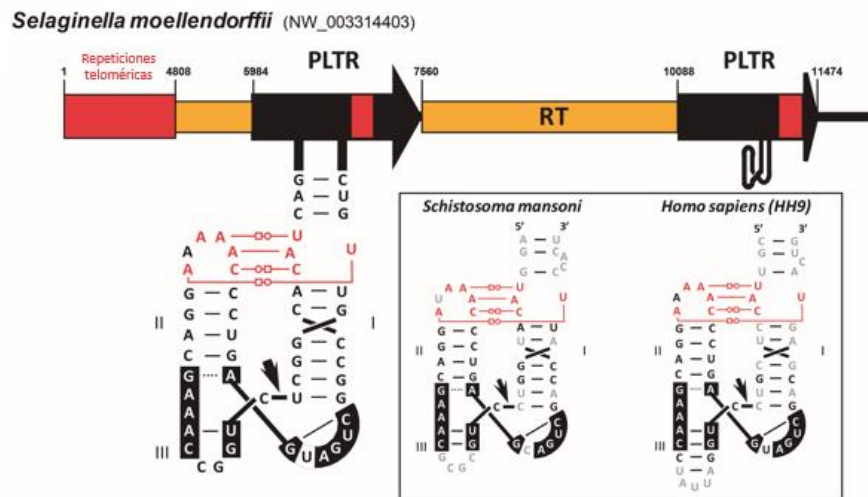


Figura 4. Representación esquemática de las ribozimas de cabeza de martillo (HHR) asociadas a elementos similares a Penélope (PLE) en la planta *S. moellendorffii*. La secuencia que se muestra es la correspondiente a la entrada NW_003314403. HHR se encuentra dentro de las regiones PLTR flanqueando la RT. En el recuadro derecho se representan esquemáticamente las HHR encontradas en *S. mansoni* y en *Homo sapiens*. Las diferencias en la secuencia se encuentran de color gris. Figura extraída y modificada de Cervera y De la Peña (2014).

Un aspecto importante que se debe destacar de la estructura de las HHR incluidas en los PLE de esta planta es que, de forma similar a lo encontrado para otras HHRs de PLEs y retrozimas de metazoos, tiene el tallo de la hélice III extremadamente corto (Cervera y De la Peña, 2014). En estudios anteriores se hipotetizó que las ribozimas de cabeza de martillo con estructuras con hélices III cortas son termodinámicamente inestables (Forster et al., 1988) y que para que la HHR adopte su conformación activa, es más recomendable que la ribozima contenga un hélice III larga (Birikh et al., 1997). El análisis posterior mostró que es probable que estos RNAs no se fragmenten como monómeros, sino que tengan que formar dímeros (Lünse et al., 2017). Por lo tanto, el diseño en tándem frecuente del PLE podría ayudar a los pares de ribozimas de cabeza de martillo adyacentes a formar dímeros para que puedan autocortarse (C. E. Weinberg et al., 2019).

A parte de *S. moellendorffii*, se han encontrado HHRs con hélices III cortas en otros organismos como *Homo sapiens* (4 pb) o *Schistosoma mansoni* (2 pb) (Figura 4), sin embargo, la hélice de *S. moellendorffii* sigue siendo especialmente corta (1 solo pb), lo que indica una muy probable baja actividad de autocorte (Cervera y De La Peña, 2014).

A pesar de todas las características hasta ahora descritas que convierten a esta HHR de *S. moellendorffii* en particular, y las HHRs de PLEs animales en general, en una particularidad muy excepcional dentro de los elementos móviles, estas ribozimas no han sido aún funcionalmente analizadas. Por tanto, es importante poder analizar las propiedades catalíticas de estas ribozimas, así como la expresión de los elementos PLE que las contienen, para poder determinar las funciones biológicas que desempeñan. Además, un mejor conocimiento del mecanismo de autocorte de estas ribozimas tan particulares, ya sea monomérico o dimérico, permitirá el impulso en futuras aplicaciones biotecnológicas de estos motivos.

1.4. POSIBLES APLICACIONES FUTURAS DE LAS RIBOZIMAS

Aunque el primer RNA catalítico se descubriera en 1982 (Kruger et al., 1982), actualmente sigue siendo un tema de investigación importante. Se busca tanto la elucidación de estructuras y mecanismos que aún no han sido descritos, como las posibles aplicaciones de estas ribozimas. Además, uno de los grandes desafíos es comprender el papel biológico de los motivos catalíticos de RNA que se encuentran distribuidos a lo largo del árbol de la vida.

Durante los años 80 se descubrieron e identificaron varias clases de ribozimas presentes en la naturaleza. Asimismo, se pretendió esclarecer la estructura y los mecanismos catalíticos de los motivos descubiertos. Tiempo más tarde, el método de SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*) (Agresti et al., 2005; Bartel y Szostak, 1993), desarrollado originalmente para la selección de ligandos de RNA de alta afinidad a partir de una librería aleatoria, se adaptó para la selección de ribozimas y así se consiguió ampliar el espectro de catálisis *in vitro* de éstas. El conocimiento obtenido de estos estudios generó una enorme cantidad de datos que contribuyó a la comprensión y diseño de nuevas ribozimas, con propiedades novedosas. Además, el auge de la bioinformática ha permitido que el desarrollo de estas nuevas ribozimas sea más sencillo.

Las áreas de investigación actuales se centran en la ingeniería o diseño de ribozimas para la regulación artificial de la expresión génica. Es decir, se pretende usar las ribozimas como elementos reguladores en biología sintética y medicina molecular.

1.4.1. Interruptores basados en ribozimas (*riboswitches*)

Los interruptores basados en ribozimas son estructuras artificiales compuestas por un aptámero (reconoce de manera específica los ligandos) y una plataforma de expresión (Soukup y Breaker, 1999). Regularn, de manera dependiente del ligando, la expresión génica a nivel de la traducción. Su funcionamiento es el siguiente: la unión del ligando al aptámero induce un cambio conformacional en la plataforma de expresión que produce la activación o desactivación de la expresión génica. La ribozima se encontrará en el 5' o en el 3'-UTR del transcrito y tendrá dos posibles conformaciones: la activa y la inactiva (Figura 5).

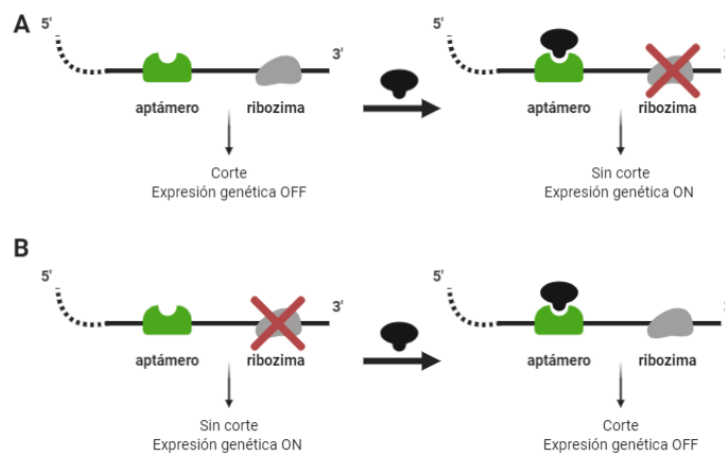


Figura 5. Estrategias para la expresión génica controlada por aptámeros. La ribozima está representada en color gris, el aptámero está relleno de color verde y el ligando es de color negro. **A.** La expresión de los genes se consigue mediante la inhibición dependiente del ligando de la ribozima. En ausencia del ligando no se da la traducción y, por tanto, no se produce expresión génica. **B.** La expresión génica se suprime por la activación de la ribozima inducida por el ligando y la posterior división del ARNm. Por otro lado, en ausencia del ligando se produce traducción.

Combinando las ribozimas con los aptámeros, se consiguió que la actividad de las ribozimas dependiera del ligando y, por lo tanto, que fuera inducible. Es decir, la actividad de escisión de la ribozima en una transcripción estaría controlada por el aptámero y su unión al ligando. Además de las señales químicas (interruptores sensibles al ligando), se pueden usar señales físicas (luz o temperatura) para controlar la actividad (Müller et al., 2016).

En relación con las HHR, se ha demostrado que estas pueden funcionar como interruptores. En primer lugar, el equipo liderado por Mulligan insertó la HHR en la región 5'-UTR, la 3'-UTR y en una región intrónica de mRNA eucariota, la escisión autocatalítica de la HHR resultó en una desestabilización del mRNA por degradación y, por lo tanto, una disminución en la expresión génica (Yen et al., 2004). Más tarde, se consiguió que las HHR

funcionaran como interruptores sensibles a ligando (Maung y Smolke, 2007). Sin embargo, para que las HHR sean útiles como interruptores, estas deben tener una elevada actividad de escisión (Balke et al., 2014).

1.4.2. Aplicaciones terapéuticas

El desarrollo de ribozimas para tratar para diversos tipos de enfermedades supone un paso más allá en la utilización de las HHR. Las aplicaciones actuales de la terapia génica emplean tanto ribozimas de origen natural como ribozimas desarrolladas *in vitro* mediante selección (Bartel y Szostak, 1993).

Para suministrar las ribozimas terapéuticas se pueden utilizar dos estrategias (Lewin y Hauswirth, 2001). En primer lugar, se pueden suministrar de manera directa, aunque este método no es recomendable puesto que la vida media del RNA en fluidos corporales, inyecciones o con aplicación tópica es de segundos y, por lo tanto, no es práctica. En segundo lugar, y siendo la principal alternativa al suministro directo, se encuentra el suministro de genes que codifican ribozimas mediante vectores de terapia génica viral. El vector viral más adecuado es el virus adenoasociado (AAV). Este virus es fácil de producir con un elevado título y pureza y puede infectar a una amplia variedad de células. Además, no estimula una respuesta inmune ni inflamación (Hernandez et al., 1999) y al integrarse en el genoma puede residir largos períodos de tiempo.

1.4.2.1. Ribozimas anticancerígenas

Se ha visto que *in vitro* las ribozimas HHR han sido capaces de cortar ARNm de oncogenes como Ras o Bcr-Abl. Sin embargo, las pruebas *in vivo* hasta el momento no han dado la respuesta esperada ya que se deben tener en cuenta muchos factores como el tamaño o la diseminación del tumor. Un buen ejemplo de resultados favorables es el que está dando la ribozima antitumoral Angiozyme (Weng y Usman, 2001) (dirigida al receptor del factor de crecimiento endotelial vascular-VEGF) la cual bloquea la angiogénesis.

1.4.2.2. Ribozimas antivirales

Uno de los principales focos en la investigación de terapia génica mediante ribozimas ha sido el de bloquear la replicación de los virus de RNA y los retrovirus, ya que, al tener su genoma en forma de RNA la inhibición de la replicación es más sencilla. Existen ribozimas HHR antivirales contra el VIH-1, virus de la hepatitis C y B (Lewin y Hauswirth, 2001).

Sin duda alguna, el VIH ha sido el virus que más frecuentemente se ha utilizado como diana de ribozimas HHR. Existen numerosos ensayos de estas ribozimas contra diferentes regiones del genoma viral, mayoritariamente frente a las secuencias de empaquetamiento (Ψ), la región 5' UTR y los genes *ENV*, *GAG*, *POL* y *TAT*. Muchos de

estos ensayos han demostrado la eficiencia de las HHR en la inhibición de la replicación del VIH en cultivos celulares consiguiendo unas disminuciones espectaculares de los niveles del RNA viral (Barroso Del Jesus y Berzal Herranz, 2011).

En cuanto a su uso contra el virus de la hepatitis B (VHB), las ribozimas desarrolladas se han centrado en la represión del gen HBx. Este gen codifica un activador transcripcional proteico implicado en la replicación viral y en el desarrollo de enfermedades asociadas a la infección de VHB (Weinberg et al., 2000). Asimismo, también se han estudiado diversos HHR contra el virus de la hepatitis C (VHC). De estas investigaciones se obtuvieron muy buenos resultados en cuanto a la reducción de la carga viral (Barroso Del Jesus y Berzal Herranz, 2011).

1.4.2.3. Ribozimas para enfermedad genética dominante

En el caso de las enfermedades genéticas causadas por mutaciones recesivas, las terapias génicas se basan en complementar el gen defectuoso. Sin embargo, en el caso de las enfermedades genéticas causadas por mutaciones dominantes, la introducción de un gen no sería efectivo. Normalmente, las enfermedades hereditarias dominantes surgen tanto de la acumulación de proteínas que no son funcionales o están mal plegadas como de la hiperactivación de genes (Lewin y Hauswirth, 2001). En estos casos, la expresión del gen debe ser limitada o, en el mejor de los casos, silenciada. Para estas enfermedades, las ribozimas son una herramienta muy útil ya que se utilizan para reducir la expresión de un gen patógeno al digerir el mRNA que codifica.

En definitiva, tanto el estudio de las propiedades catalíticas de las ribozimas como la expresión de los elementos PLE que las contienen puede aportar una información muy valiosa sobre las funciones biológicas que realizan. En adición, los resultados obtenidos proporcionarían las bases necesarias para el diseño de ribozimas artificiales con funciones determinadas.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

En el presente trabajo se ha profundizado en el estudio de las ribozimas de cabeza de martillo asociadas a PLE en la planta *Selaginella moellendorffii*. Se persiguen dos objetivos principales centrados en la caracterización esta ribozima:

- I. Determinar la actividad catalítica de la ribozima de cabeza de martillo (HHR) de manera monomérica y estudiar si el autocorte aumenta cuando el motivo se encuentra de forma dimérica.
- II. Validar que el elemento PLE situado en los telómeros se expresa en la planta en condiciones normales.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ESTUDIO DEL AUTOCORTE DE HHR EN *Selaginella moellendorffii*

3.1.1. Búsqueda bioinformática de la secuencia.

En un trabajo previo realizado en nuestro grupo (Cervera y De la Peña, 2014), se identificó bioinformáticamente la presencia de motivos de la ribozima de cabeza de martillo (HHR) en el genoma de la planta *Selaginella moellendorffii* asociados a elementos transponibles tipo PLE en los telómeros de la planta. Dicha identificación se realizó utilizando el software RNAmotif de búsqueda de secuencias basado en estructura secundaria (Macke, 2001). Una de estas secuencias corresponde a la entrada NW_003314403.1, sobre la cual se diseñaron los oligonucleótidos y el resto de los experimentos presentados en este Trabajo de Fin de Grado.

3.1.2. Extracción del DNA genómico de *S. moellendorffii*

La extracción del DNA genómico de *S. moellendorffii* se realizó siguiendo el protocolo CTAB-cloroformo descrito por Porebski et al., 1997 con algunas modificaciones. Brevemente, las hojas se homogeneizaron en tampón de extracción CTAB con un homogeneizador Polytron (Kinematica) y se incubaron a 60 °C durante 60 min. El homogeneizado se mezcló con un volumen igual de cloroformo y alcohol isoamílico (24:1 v/v). El DNA en la fase acuosa se precipitó con 2.5 volúmenes de etanol al 100% y 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M, se disolvió en agua Milli-Q y se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific).

3.1.3. Clonación del retrotransposón PLE con la secuencia de la ribozima HHR.

A partir del DNA genómico purificado de *S. moellendorffii*, se realizaron diversas PCRs utilizando los oligonucleótidos siguientes:

177R_BamHI CCGCAGGGATCCAATCCRGCGAGATCGCGGC

194D_EcoRI TCTCCGCGAATTCGATGACTCCCAGGGTCTGG

La secuencia subrayada corresponde con el sitio de escisión de BamHI y EcoRI, respectivamente.

Dichos cebadores amplifican una región de en torno a 1 kb del retroelemento PLE de *S. moellendorffii* correspondiente a su Región Terminal Larga o PLTR, que incluye la ribozima HHR. Los reactivos utilizados para las PCRs fueron los siguientes: Tampón 5x (Takara Inc.), NTPs, oligonucleótidos, la enzima polimerasa Prime Star (Takara Inc.) y aproximadamente 5 ng del molde de DNA.

MATERIALES Y MÉTODOS

El producto amplificado se purificó en un gel PAGE 5% nativo y se clonó en un vector pBlueScript II KS (+) haciendo uso de los enzimas de restricción BamHI y EcoRI incluidos en los cebadores. La construcción así obtenida se denominó SM-1. Por otro lado, y basándonos en la construcción SM-1, se construyó un control negativo con la HHR mutada de forma puntual y siguiendo el protocolo de mutagénesis dirigida de QuickChange (Agilent), que se denominó SM-4. Las construcciones obtenidas fueron confirmadas por secuenciación.

A partir de la construcción SM-1, también se obtuvieron por PCR diversas construcciones acortadas de la misma. Se emplearon cuatro cebadores para obtener 3 tamaños del clon SM-1 distintos (SM-1A, SM-1B y SM-1C):

197D_reduceSM1-A	GTAGAGTCGGCACCGAGAGTCGG
197D_reduceSM1-B	CGGACTYGCGCCACGTGACAGAG
197D_reduceSM1-C	CCGAAGTCATTCTCCGCGACTACC
197R_T3_reverse_pBS	CCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCG

Las amplificaciones se realizaron y purificaron como se ha descrito anteriormente, aunque usando esta vez los cebadores previamente fosforilados. Las construcciones se obtuvieron por circularización de los amplificados usando ligasa de DNA de T4 (Takara Inc.).

3.1.4. Transformación bacteriana

Una vez obtenidos los clones iniciales SM-1 y SM-4 con las construcciones de interés, estos fueron transformados en bacterias *Escherichia coli*. Para llevar a cabo la transformación, se utilizó el método del choque térmico en el cual el cultivo pasa por diferentes temperaturas durante un tiempo concreto (5 minutos a 0 °C, 1 minuto a 42 °C y 3 minutos a 0 °C). Los cambios de temperatura aumentan la permeabilidad de las membranas bacterianas permitiendo la entrada de moléculas de DNA, como los plásmidos. Posteriormente se añadió medio de cultivo LB (Luria-Bertani) y se dejó que el cultivo creciera a 37 °C durante veinte minutos. Transcurrido este tiempo se añadió más medio LB (100 ml), pero esta vez con el antibiótico de selección Ampicilina (100 mg/ml). Se dejó la población de *E. coli* en incubación toda la noche a 37 °C.

Para la obtención del plásmido se utilizó el *kit* de aislamiento plasmídico Genopure Plasmid Midi Kit (Roche). El procedimiento se basa en un protocolo de lisis alcalina modificado en el cual mediante diversas centrifugaciones en columnas equilibradas se adquiere un DNA concentrado sin impurezas. Para comprobar la concentración del DNA purificado se recurrió al espectrofotómetro de barrido espectral NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific).

3.1.5. Transcripción *in vitro* de los plásmidos que contienen la secuencia ribozimática

En primer lugar, en torno a 10 µg del plásmido SM-1 y SM-4 se linearizaron mediante la enzima XbaI, la cual se dejó actuar durante tres horas a 37 °C. Para desactivar la enzima XbaI, se añadió una mezcla de cloroformo y alcohol isoamílico (24:1 v/v). El sobrenadante se recuperó y precipitó con 3 volúmenes de etanol y 1/10 de acetato sódico. Tras 10 minutos a -80 °C se centrifugó a 15000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. A continuación, se decantó el etanol y se resuspendió el DNA con 20 µl de agua. Se comprobó la concentración final del DNA recuperado mediante el espectrofotómetro de barrido espectral NanoDrop.

La reacción de transcripción se llevó a cabo utilizando los siguientes reactivos: 2 µl de Tampón de transcripción (Takara Inc), 2 µl NTP, 0.5 µl RPI, 1 µl de polimerasa T3 RNA, 1 µg de DNA linealizado de los clones SM-1 y SM-4 y H₂O hasta completar los 20 µl de volumen total. Los tubos se incubaron durante 2 horas a 37°C. A continuación, los productos de la transcripción fueron separados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizantes (poliacrilamida 5%, urea 8 M, TBE 89 mM).

Seguidamente se realizó una transcripción siguiendo el mismo protocolo explicado anteriormente, pero con los fragmentos de DNA de SM-1A, SM-1B, SM-1C y SM-1. Los productos de la transcripción se separaron mediante una electroforesis en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 10% (16.8 g de urea, 6.2 ml de agua, 4 ml de TBE 10x, 11 ml de Tampón A, 30 µl de TEMED y 0.5 ml de PSA).

Además de la transcripción con nucleótidos no marcados explicada anteriormente, también se realizó una transcripción con un nucleótido marcado radiactivamente. Los fragmentos de DNA utilizados fueron los mismos: SM-1A, SM-1B, SM-1C y SM-1. El protocolo utilizado sigue los mismos pasos que las transcripciones anteriores con la diferencia de que en esta transcripción se añade un NTP radioactivo a la mezcla de los cuatro NTPs. En este caso, el NTP radioactivo utilizado fue α-ATP (³²P).

3.1.6. Cinética post-transcripcional del RNA purificado

Para realizar el estudio de cinética post-transcripcional, trazas de RNA de las construcciones SM-1A y SM-1C, marcados radiactivamente y previamente purificados, se incubaron a 25°C en tampón Tris-HCl (pH 7.5) 50 mM y ausencia de iones magnesio. Se tomó una alícuota que representa el tiempo 0, y se comenzó la reacción de autocorte mediante la adición de MgCl₂ a la concentración final de interés (10 o 50 mM). A diferentes tiempos se tomaron alícuotas, y para poner fin a las reacciones se adicionó el tampón de parada compuesto por 50% formamida, 8 M Urea, 100 mM EDTA. De nuevo, los productos de la transcripción fueron separados mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante.

3.1.7. Futuros experimentos: Construcción del dímero ribozimático

Dada la paralización del proyecto con motivo de la pandemia de la COVID-19 no fue posible la realización de estos experimentos. Sin embargo, se encuentran debidamente planificados a continuación.

Para la construcción del dímero de HHR, en primer lugar, se debería amplificar mediante una PCR el fragmento correspondiente a la ribozima. Se va a realizar la construcción de dímeros en los plásmidos que contienen los clones SM-1A y SM-1C. Se aplicaría el mismo protocolo de PCR explicado anteriormente, pero con los siguientes cebadores: en el clon SM-1A se va a utilizar el 197D_reduceSM1-A como cebador directo y 157-PLTR como cebador reverso, en cambio, en el clon SM-1C se va a utilizar el 197D_reduceSM1-C como cebador directo y 157-PLTR como cebador reverso. En ambos casos, los cebadores deben estar fosforilados. Los tamaños esperados de la amplificación son de aproximadamente 270 pb para SM-1A y 400 pb para SM-1C. Para poder seleccionar los fragmentos con el tamaño deseado se realizaría una electroforesis en un gel PAGE 5% nativo con los productos de la PCR. Una vez desarrollada la electroforesis, se teñiría de bromuro y se cortan las bandas correspondientes al fragmento amplificado.

A continuación, se insertarán los fragmentos amplificados y purificados en los plásmidos de manera que ambas ribozimas estén en tándem (Figura 6). Por último, se llevará a cabo una transcripción *in vitro* utilizando el mismo protocolo explicado anteriormente. El producto de la transcripción será separado en un gel PAGE nativo.

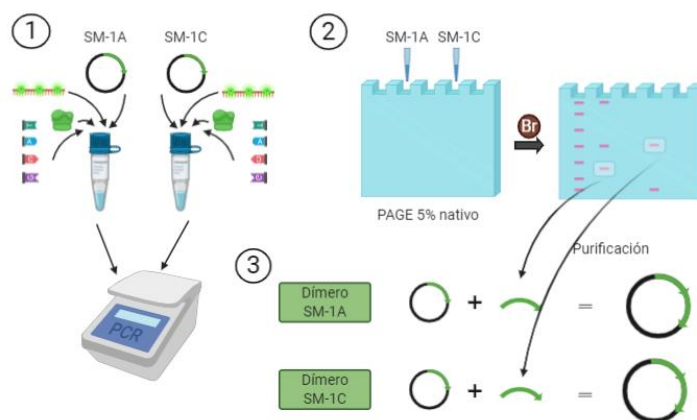


Figura 6. Esquema con los pasos para realizar dímeros ribozimáticos a partir de los clones SM-1A y SM-1C. En el primer paso, se muestran los clones SM-1A y SM-1C junto con el resto de los reactivos necesarios para llevar a cabo la PCR (cebadores fosforilados, polimerasa Prime Star, nucleótidos...). En el segundo paso, el gel que contiene los productos de la PCR es teñido con bromuro. Las bandas con los tamaños correspondientes a HHR son cortadas y el DNA es purificado. En el tercer paso, los fragmentos se insertan en el plásmido que previamente contiene una secuencia con HHR de manera que se forma un dímero.

3.2. EXPRESIÓN DE PLE EN *S. moellendorffii*

3.2.1. Extracción de RNA de la planta

Se recogieron 2 g de muestra de *S. moellendorffii* (viveros FlosaB, Valencia). Para que el experimento fuese más robusto se llevó a cabo por duplicado teniendo así dos muestras de la planta. Estas muestras se denominaron Sela 1 y Sela 2, siendo el protocolo utilizado el mismo en ambos casos. La muestra biológica se colocó en un tubo de 30 ml junto con 10 ml de Tris-HCl 0.2 M, 200 µl de NaCl 5 M, 100 µl Tritón 10% y 20 µl de β-mercaptoetanol. Se centrifugó 20 minutos a 8000 rpm. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y se añadieron 1.25 ml de SDS 5%, 1.25 ml EDTA 0.1M y 15 ml de fenol a pH 7, se agitó vigorosamente para a continuación centrifugarlo 8 minutos a 8000 rpm. Una vez desechado el sobrenadante se añadieron 2.5 ml de etanol, 10 min a -80 °C seguido de centrifugación 20 minutos a 14000 rpm.

Una vez extraído el RNA de las dos muestras se cuantificó la cantidad de RNA obtenida mediante NanoDrop. Por otro lado, también se realizó un gel PAGE 5% (28.6 ml H₂O, 4ml TAE (10x), 6.7 ml Acrilamida 5%, 60 µl TEMED y 0.6 ml PSA 10%) con la finalidad de examinar las impurezas no eliminadas en la extracción.

3.2.2. Northern blot

La hibridación *Northern* es una técnica analítica de detección específica de moléculas de RNA a partir de una mezcla compleja. El proceso se divide en 3 etapas: una electroforesis en gel para separar el RNA según el tamaño de los fragmentos, seguidamente se transfiere a una membrana que se hibrida con una sonda molecular marcada química o radiactivamente, y finalmente se visualiza.

3.2.2.1. Sonda

Para la realización de la sonda se utilizó el clon SM-1 obtenido. En primer lugar, el plásmido conteniendo dicho clon se linealizó con la enzima HindIII a 37 °C durante tres horas. A continuación, el DNA se limpió, precipitó en etanol y cuantificó tal y como se ha descrito anteriormente. Para la obtención de la sonda, el DNA se somete a una transcripción de su polaridad reversa y complementaria usando tampón 10X T7 (Takara Inc.), DTT 5 mM, NTPs 1 mM incluyendo Dig-UTP (con digoxigenina) a 0.2 mM, inhibidor de RNasas RPI, polimerasa T7 y 1 µg del DNA. Los reactivos fueron incubados durante 2 horas a 37 °C. La sonda marcada con digoxigenina es reconocida por un anticuerpo que lleva conjugada fosfatasa alcalina. Gracias a este marcaje, las bandas serán visualizadas en el equipo de quimioluminiscencia.

3.2.2.2. *Electroforesis*

La electroforesis se realizó en un gel desnaturalizante al 5% (16.8 g de Urea, 11.5 ml de agua estéril, 3.5 ml de tampón TBE 10x, 5.8 ml de solución A, 30 µl de TEMED y 0.5 ml de APS a una tensión de 200V y una corriente de 55 mA). En el gel se corrieron las muestras Sela 1 y Sela 2, un marcador de peso molecular de 200 a 6000 nt y distintas diluciones de RNA de la planta. Las diluciones se utilizarán como controles.

3.2.2.3. *Transferencia del gel a una membrana de nylon*

Tras realizar la electroforesis, el RNA separado en bandas fue transferido a una membrana de nylon. En primer lugar, se atemperó el tampón de transferencia (Na-PO₄ 25 mM, pH 6,5) a 4 °C y se cortaron dos trozos de papel Whatman 3MM (15x15 cm), la membrana de nylon y el gel. Se equilibraron por separado tanto la membrana como el gel con el tampón de transferencia durante 10 minutos en agitación. Para transferir el RNA, se recurrió al montaje tipo sándwich en el cual en el lado del cátodo se dispuso un papel de Whatman 3MM húmedo y el gel desnaturalizante y, por otro lado, en el ánodo se colocó el otro papel Whatman 3MM húmedo y la membrana de Nylon. Se eliminaron las burbujas que había entre la membrana y el gel. A continuación, se colocó el sándwich en el aparato de electrotransferencia y se aplicó 1 A y 24 V durante una hora y media en un cuarto frío. Al finalizar, se dispuso la membrana sobre un papel 3MM para que se secase.

3.2.2.4. *Prehibridación e hibridación*

La prehibridación se realiza con el fin de bloquear las regiones de la membrana sin ácidos nucleicos transferidos. De esta manera la sonda solo se unirá a las bandas que se quieren detectar. La membrana de Nylon se coloca en un tubo de hibridación donde se adicionan 10 ml de tampón de hibridación (Roche) y se deja incubar 30 minutos a una temperatura de 68 °C. A continuación, se añade al tubo la sonda marcada y previamente desnaturalizada. Se deja incubando el tubo con la membrana y la sonda toda la noche a 68 °C.

3.2.2.5. *Lavados*

En este paso se pretende lavar el excedente de sonda presente en la membrana. Primeramente, se elimina la sonda de manera suave mediante 2 lavados de 5 minutos a temperatura ambiente con SSC 2x y 0.1% SDS. A continuación, se realizan dos lavados de 15 minutos a 68°C con SSC 0.1x y 0.1% SDS para eliminar de manera más específica la sonda unida a RNAs parcialmente similares y evitar así las hibridaciones inespecíficas.

3.2.2.6. *Revelado*

El proceso de revelado se lleva a cabo a temperatura ambiente. En primer lugar, y siguiendo las recomendaciones del fabricante (Roche), se realiza un lavado con Tampón 1 y 0.3% Tween 20 durante 10 minutos. Al finalizar el paso anterior, el contenido líquido es eliminado del tubo y se pasa a bloquear la membrana. El bloqueo se realiza adicionando al tubo una solución de Tampón 1 y agente bloqueante durante media hora. Seguidamente, se añade 1 µl de anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina durante 30 minutos. Pasado este tiempo, es necesario eliminar el exceso de anticuerpo, para lo que se realizan dos lavados con Tampón 1 y 0.3% Tween durante 15 minutos. A continuación, se realiza un lavado con Tampón 3. Se elimina el contenido del tubo para poder adicionar una solución compuesta por 5 ml de Tampón 3 y 25 µl de sustrato CDP-Star, que se dejará actuar durante 5 minutos. El CDP-Star es un sustrato sensible y quimioluminiscente para la fosfatasa alcalina que permite detectar aquellas moléculas que hayan sido previamente marcadas con fosfatasa alcalina. Por último, la membrana se saca del tubo mediante unas pinzas planas y se coloca entre láminas de plástico transparente en la oscuridad. El resultado final de la hibridación *Northern* fue visualizado en el equipo de quimioluminiscencia Fujifilm LAS-3000.

3.2.3. **Futuros experimentos: Amplificación por RT-PCR y clonación del elemento PLE detectado**

De nuevo, este experimento no pudo ser realizado a causa de la paralización por el COVID-19. La previsión de los pasos a realizar se explica a continuación.

Para realizar este experimento, partimos del gel desnaturalizante que contiene la banda de interés. En primer lugar, se cortaría la banda y el RNA se extraería por el método *crush-and-soak* (Petrov et al., 2013), y se precipitaría finalmente en etanol. Se centrifuga la muestra a 15000 rpm durante 15 min a 4 °C, se decanta el sobrenadante y se deja secar el sedimento al aire. Por último, se resuspende el sedimento de RNA en agua.

El RNA purificado sería retrotranscrito mediante el kit SuperScript IV Reverse Transcriptase (ThermoFisher) en el que primeramente se alinea el cebador al RNA, después se prepara la mezcla de reactivos y finalmente se añade esa mezcla al RNA alineado con el cebador. Los reactivos que se utilizarían son los siguientes: RT reaction setup (20 µl), 5× SSIV Buffer (4.0 µl), 10 mM dNTP mix (10 mM cada uno) (1.0 µl), 100 mM DTT (1.0 µl), RPI (inhibidor de RNAsas) (0.5 µl), 2 µM del cebador específico (1.0 µl), la enzima SuperScript IV Reverse Transcriptase (200 U/µl) (1.0 µl), el molde de RNA (aproximadamente 1 ng-1 µg del RNA total) y H₂O (20 µl). A continuación, el fragmento de cDNA se amplifica por PCR con cebadores previamente fosforilados utilizando la DNA polimerasa Prime Star. El producto resultante de la PCR se clonaría en un vector pBlueScript KS (+) (Agilent) y se secuenciaría mediante el método de Sanger (Figura 7).

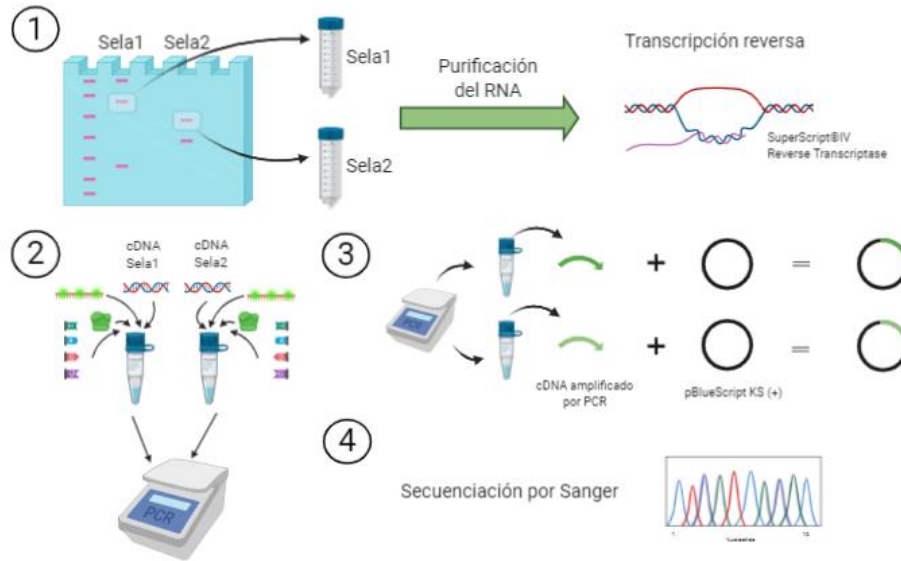


Figura 7. Esquema con los pasos para realizar la RT-PCR y la posterior clonación en pBlueScript de los fragmentos de interés detectados en el análisis Northern. En primer lugar, se cortan las bandas correspondientes a los fragmentos de interés de las muestras Sela1 y Sela2. Una vez purificado el RNA, se produce una transcripción reversa mediante el kit SuperScript IV Reverse Transcriptase. En segundo lugar, se produce una PCR con cDNA obtenido anteriormente. En tercer lugar, el producto amplificado se inserta en un vector pBlueScript KS (+). En último lugar, el fragmento es secuenciado por el método de Sanger.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. ESTUDIO DEL AUTOCORTE DE LA HHR DE *S. moellendorffii*

Para conocer las características catalíticas de la ribozima HHR en la planta primitiva *S. moellendorffii*, se parte de los resultados obtenidos en un trabajo previo de nuestro laboratorio (Cervera y De La Peña, 2014), donde se identificó la presencia de ribozimas de cabeza de martillo o HHRs asociadas a elementos transponibles tipo PLE en los telómeros de la especie *S. moellendorffii*. En el presente estudio, se pretende analizar en profundidad las propiedades de autocorte de la ribozima en cuestión.

4.1.1. Clonación de la ribozima HHR de *S. moellendorffii*

Para llevar a cabo la clonación de la ribozima HHR de *S. moellendorffii*, primero se extrajo el DNA de la planta mediante un protocolo estándar basado en el detergente CTAB. Se cuantificó la concentración y pureza del DNA extraído mediante un espectrofotómetro NanoDrop, obteniendo una concentración de 1680 ng/μl y un grado de pureza aceptable (proporciones 260/280:1,81 y 260/230:2,21). A partir del DNA genómico obtenido anteriormente se realizó una PCR para amplificar la región del DNA correspondiente al extremo 5' del retroelemento PLE conteniendo la HHR. Los cebadores utilizados para esta amplificación se diseñaron a partir de la secuencia NW_003314403.1 obtenida bioinformáticamente en el trabajo de Cervera y De La Peña, 2014. Dichos cebadores contenían sitios de restricción EcoRI y BamHI que permitieron clonar el producto amplificado de en torno a 1 kb en un vector pBlueScript previamente linealizado con dichas enzimas (Figura 8). La construcción obtenida se denominó SM-1, cuya secuencia (Ver anexo) fue confirmada por secuenciación Sanger en el servicio de secuenciación del IBMCP. Como control negativo, se generó a partir de SM-1 una secuencia con la ribozima HHR mutada mediante mutagénesis dirigida y que se denominó SM-4, fue igualmente confirmada por secuenciación (Ver anexo).

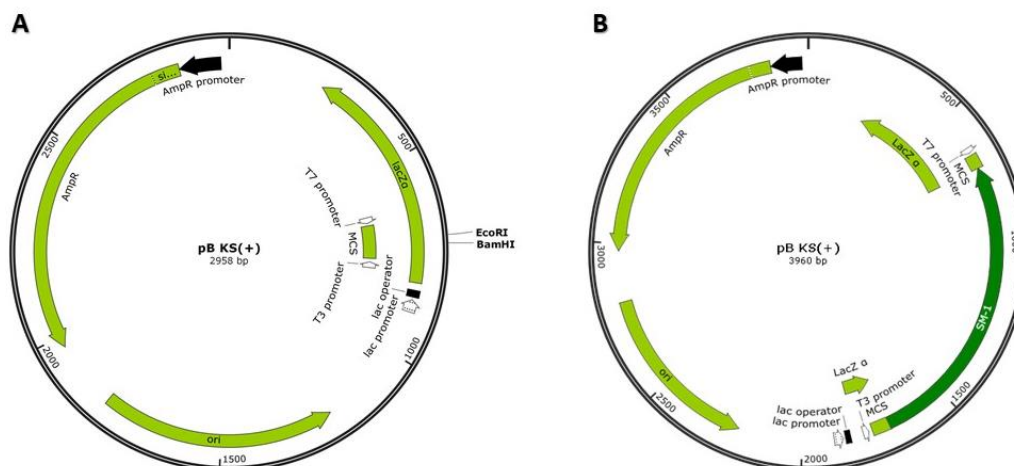


Figura 8. Representación esquemática de los vectores. *A.* Representación esquemática del vector pBlueScript donde se indica la posición de las enzimas de restricción BamHI y EcoRI. *B.* Representación esquemática del vector pBlueScript una vez se ha clonado el fragmento de PCR SM-1 de aproximadamente 1Kb.

4.1.2. Transcripción *in vitro* de las construcciones SM-1 y SM-4

Con objeto de comprobar el nivel de autocorte de la HHR de *S. moellendorffii*, los plásmidos correspondientes a las construcciones SM-1 y SM-4 fueron transformados en *E. coli* y se incubaron toda la noche en 250 ml de medio LB con Ampicilina. Los plásmidos fueron purificados mediante un kit comercial de “midiprep” (Ver Materiales y Métodos), y la concentración de DNA purificado fue determinada mediante el NanoDrop. Los resultados del espectrofotómetro mostraron una concentración de DNA de 1.7 µg/µl en SM-1 y 1.2 µg/µl en SM-4. Para llevar a cabo la transcripción *in vitro*, unos 10 µg de cada plásmido se linealizaron con la enzima de restricción XbaI y la concentración de DNA se volvió a cuantificar espectrofotométricamente, siendo de 0.8 µg/µl para SM-1 y 0.6 µg/µl para SM-4.

Se realizaron las transcripciones de los plásmidos empleando la RNA polimerasa T3 (Ver Materiales y Métodos). Una vez realizada la transcripción, los productos resultantes fueron separados mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (Figura 9). En ambos casos, no se llegan a apreciar niveles de autocorte específicos de la HHR, y únicamente se observa un ligero degradado del RNA primario, algo habitual en experimentos de transcripción *in vitro*. Esto no es de extrañar para el caso de la construcción SM-4, ya que la HHR de dicha construcción presenta una mutación inactivadora que impide dicho corte. Sin embargo, para el caso de la construcción SM-1 sí que se esperaban ciertos niveles de autocorte, aunque estos pudieran ser débiles, y quizás por ello no apreciables en las condiciones de transcripción y detección utilizadas. Además, se debe destacar que el nivel de transcripción obtenido en el experimento con la construcción SM-1 fue particularmente escaso, y muy inferior al obtenido para SM-4, lo que dificulta aún más la visualización de cualquier fragmento específico de autocorte.

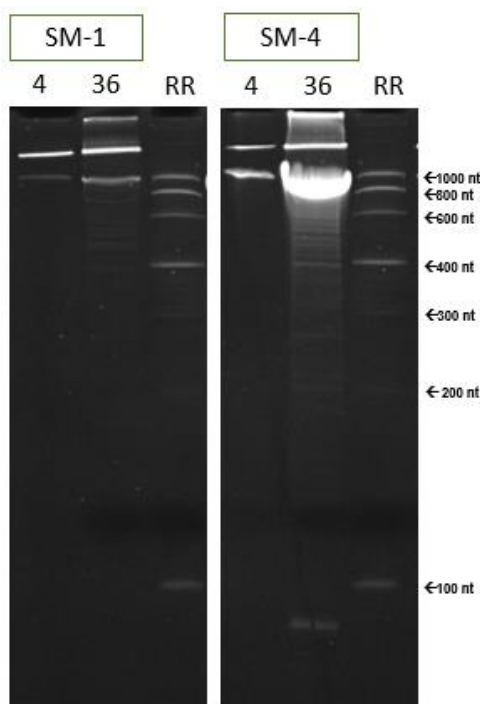


Figura 9. Análisis del autocorte de las construcciones SM-1 y SM-4. La construcción SM-1 corresponde a la secuencia del fragmento 5' clonado a partir del elemento transponible PLE nativo y que contiene la ribozima HHR, mientras que SM-4 es el control negativo conteniendo la secuencia de la ribozima HHR con una mutación puntual que impide su correcto funcionamiento. Para cada muestra, se corrió el gel con dos volúmenes diferentes (4 μ l y 36 μ l). Las bandas de autocorte esperadas en estas construcciones tienen tamaños aproximados de 200 nt y 900 nt, a parte del transcrito primario de 1100 nt.

4.1.3. Obtención de nuevas construcciones truncadas a partir de SM-1

Puesto que la construcción SM-1 no dio los resultados de autocorte esperados, se decidió obtener nuevas construcciones a partir de ese clon con tamaños más reducidos y en los que se eliminó parte de la región 5' que precede a la ribozima HHR. La idea de estas nuevas construcciones era comprobar si dicha región 5' precediendo al motivo ribozimático podría estar interfiriendo con el correcto plegamiento de la ribozima durante su transcripción, e impidiendo su autocorte. En concreto se realizaron 3 construcciones: SM-1A, SM-1B y SM-1C, en las que se delecionaron 806, 828 y 684 pares de bases respectivamente del extremo 5' de la construcción SM-1 (Figura 10). Con estas nuevas construcciones se pretende comprobar si la ribozima incrementa su capacidad de autocorte puesto que ya no habrá secuencias precediendo a la ribozima que pudieran estar afectando al plegamiento y catálisis de la misma.

RESULTADOS

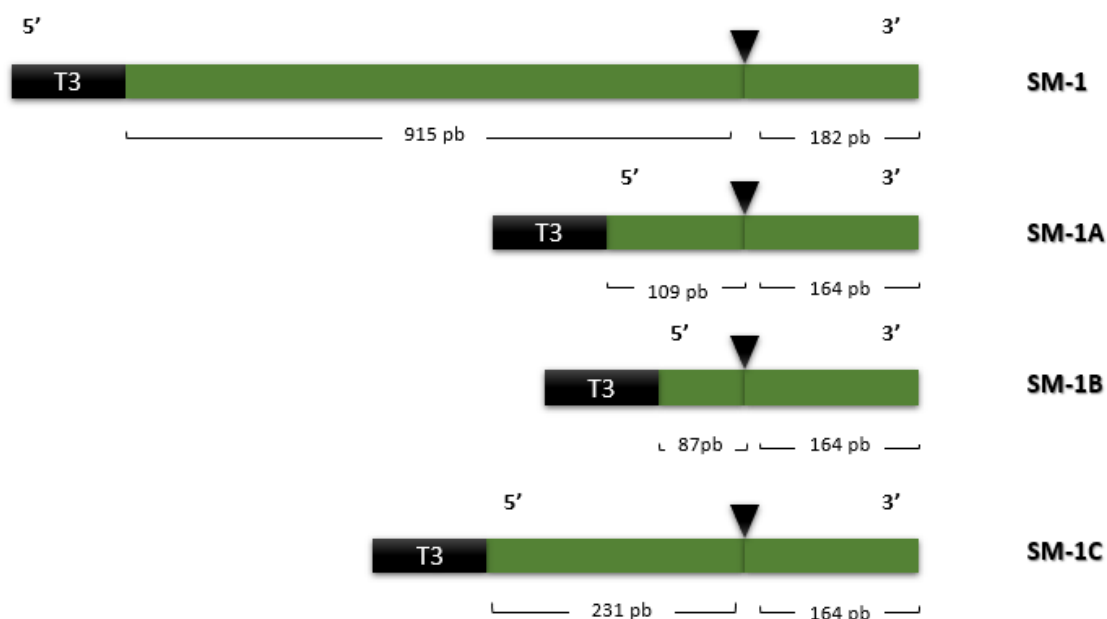


Figura 10. Construcciones truncadas obtenidas a partir de SM-1. Representación esquemática de las nuevas construcciones obtenidas (SM-1A, SM-1B y SM-1C) a partir del plásmido SM-1 mediante la realización de 3 PCRs. Para cada una de las construcciones, un fragmento de diferente tamaño de la región 5' fue eliminado para evitar posibles interferencias en el plegamiento de la ribozima. La flecha de color negro indica el sitio de escisión de la HHR, quedando en la región 3' una cola común de 164 nt en SM-1A, SM-1B y SM-1C y en la región 5' tamaños característicos para cada construcción.

4.1.4. Transcripción *in vitro* de las construcciones SM-1, SM-1A, SM-1B y SM-1C

4.1.4.1. Transcripción con nucleótidos no marcados

Se realizó una segunda transcripción *in vitro* utilizando las construcciones linealizadas SM-1, SM-1A, SM-1B y SM-1C. Los productos resultantes fueron separados por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (Figura 11). En este caso, aunque la expresión de SM-1 fue más intensa, siguió sin apreciarse niveles de autocorte claros. En general, en el resto de las construcciones se observan de nuevo muchas más bandas de las esperadas, fruto de posibles paradas de la transcripción y/o degradación. Las bandas de los tamaños esperados a causa del autocorte de la ribozima no se llegan a apreciar claramente más intensas que el resto de las bandas. Podemos deducir que no se alcanzan las tasas de escisión esperadas para un HHR durante su transcripción *in vitro*, a pesar de las modificaciones en la longitud de la secuencia que precede a la ribozima para que éstas tuviesen menos impedimentos a la hora de adoptar la conformación adecuada.

Añadir, además, que la construcción SM-1B podría haber sufrido algún tipo de artefacto o contaminación de otra construcción, que provocaría la aparición de dos bandas de RNA primario en torno a 300 nt, complicando aún más la interpretación de los resultados de autocorte.

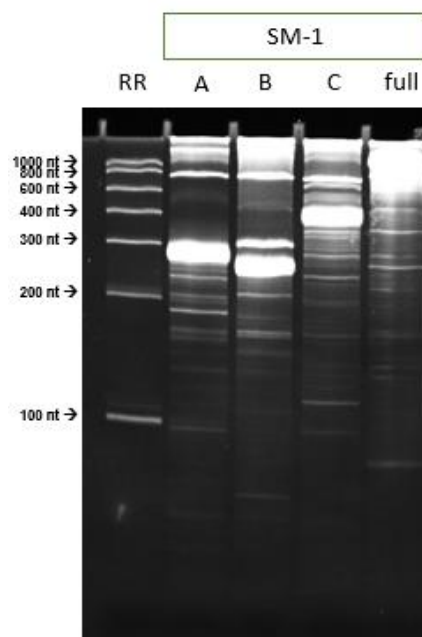


Figura 11. Transcripción *in vitro* de SM-1, SM-1A, SM-1B y SM-1C con nucleótidos no marcados.

4.1.4.2. Transcripción con nucleótidos marcados radiactivamente

Para poder detectar la existencia de bandas específicas de autocorte, se realizaron transcripciones utilizando el ribonucleótido ATP marcado radiactivamente. De esta forma, el experimento de transcripción se puede realizar más rápidamente (tan solo durante unos minutos en lugar de varias horas) minimizando la aparición de bandas de degradación, paradas de transcripción y otros artefactos. Se volvieron a transcribir las construcciones SM-1A, SM-1B y SM-1C, sin incluir esta vez el análisis de autocorte de la construcción SM-1 que ya había dado negativo en varios análisis anteriores. Los productos de las tres transcripciones fueron separados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante. La detección se realizó utilizando placas de Phosphorimager (Fuji Inc.) y escaneando las mismas en un lector Fujifilm Bas 5000.

Los resultados de esta transcripción (Figura 12) sí parecen mostrar una banda común en torno a los 164 nt esperados en las tres muestras. Dicha banda pertenece a la región 3' de las construcciones de SM-1A, SM-1B y SM-1C. En el gel también se muestra la región 5' de la construcción. Esta región es la que sufrió deleciones y, por tanto, los tamaños varían según la construcción (Figura 10). Aunque en la figura aparezcan las bandas correspondientes a las colas de la región 5' y las bandas comunes de la región 3', estas bandas tienen una intensidad similar a bandas inesperadas. No aparecen bandas marcadas con mayor intensidad correspondientes al autocorte y solo se aprecian bandas sutiles.

Se puede concluir que, al menos en transcripción con nucleótidos marcados, sí que se pudo apreciar un cierto autocorte específico de estas construcciones, especialmente en el caso de la construcción SM-1A. La construcción SM-1C se descartó por presentar una

RESULTADOS

secuencia demasiado larga en la región 5' que probablemente impide adoptar una conformación adecuada para que la ribozima sea funcional.

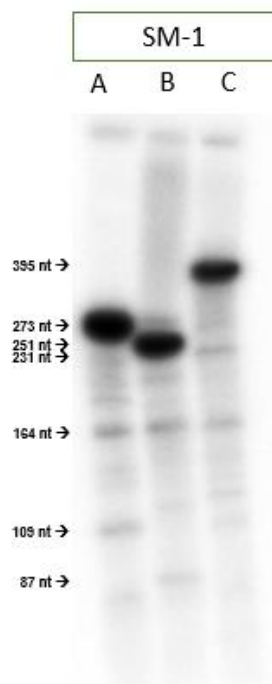


Figura 12. Transcripción in vitro de SM-1, SM-1A, SM-1B y SM-1C con nucleótidos marcados. La construcción SM-1A tiene un tamaño de 273 nt pero al autocortarse se divide en dos secuencias de 164 nt y 109 nt. Por otro lado, la construcción SM-1B es de 251 nt, 22 nt menos que el SM-1A, que al autocortarse se divide en dos secuencias de 164 nt y 87nt. Por último, la construcción SM-1C tiene un tamaño de 395nt, siendo los tamaños de las secuencias de corte de 164nt y 231nt.

4.1.5. Análisis cinético de SM-1A y SM-1B

En vista de los resultados de autocorte observados durante las transcripciones (o también denominado autocorte co-transcripcional) para las distintas construcciones, se decidió realizar un análisis cinético en condiciones post-transcripcionales, a partir de los RNAs primarios previamente purificados de gel tras su transcripción. En este tipo de experimento se permite que el RNA conteniendo la ribozima pueda adoptar el plegamiento óptimo durante periodos de tiempo más largos y en ausencia total de proteínas. En una primera aproximación se realizó el análisis cinético durante 5 horas y una concentración de Mg^{2+} estándar de 10 mM. Los resultados no permitieron apreciar niveles de autocorte de la ribozima (datos no mostrados). En una segunda aproximación, se amplió el tiempo máximo de transcripción a 6 horas y se añadió mayor cantidad de Mg^{2+} (50 mM) que se sabe favorece los niveles de autocorte de la HHR. En esta aproximación, las muestras se dejaron incubando durante 0, 0.5, 1, 4, 6 y 12 horas. Una vez transcurrido el tiempo correspondiente, las muestras fueron fraccionadas de nuevo por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante. En estos geles sí se pudo apreciar la existencia de varias bandas compatibles con transcritos primarios y de autocorte para cada construcción (Figura 13). En ambos casos, la banda de mayor tamaño corresponde al RNA primario

RESULTADOS

completo sin cortar. En el análisis cinético de SM-1A (273 nt), se aprecia una banda intermedia que sería muy probablemente un producto de degradación inespecífica del RNA ocurrido durante su purificación, al ya existir en el tiempo 0 de la cinética, mientras que la siguiente banda que se empieza a apreciar a partir de 1 h de incubación, correspondería a la banda de 164 nt resultante del corte ribozimático. Además, la aparición de la banda de 164 nt viene asociada con la aparición de una banda menor de en torno al centenar de nucleótidos y que debería corresponder al segundo fragmento del autocorte (109 nt). Por otro lado, en el análisis cinético de SM-1B, volvemos a apreciar además del transcrito primario (251 nt), una serie de bandas de degradación, así como una primera banda definida a los 30 minutos de comenzar la cinética que correspondería al autocorte de la HHR (164 nt). Igualmente, se aprecia también a los 30 minutos la aparición de una segunda banda menor de tamaño compatible con los 87 nt.

Ambas cinéticas de las construcciones SM-1A y SM-1B muestran que los niveles de autocorte son muy limitados, quedando la práctica totalidad del transcrito primario (>95%) sin cortar tras más de 12 h de incubación. Por lo tanto, se deduce que el autocorte catalizado por la ribozima es muy limitado, incluso con condiciones favorables (mayor tiempo de reacción y elevada concentración de Mg^{2+}).

Como conclusión, podríamos decir que la HHR tiende a producir algo más de autocorte durante la transcripción. Al desnaturalizar la secuencia y replegar el RNA, la ribozima deja de ser funcional y le cuesta alcanzar la conformación activa de autocorte en las condiciones utilizadas.

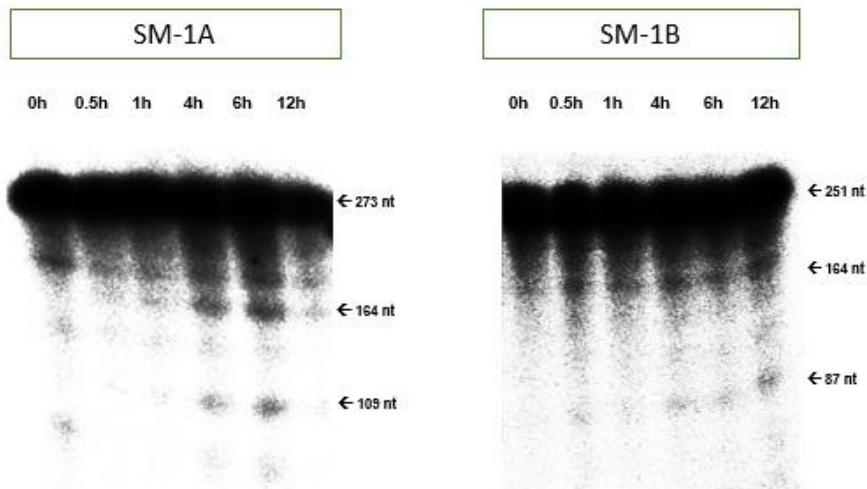


Figura 13. Análisis cinético de las construcciones SM-1A y SM-1B. Gel electroforético con RNAs marcados radiactivamente. Se muestra el supuesto autocorte de la ribozima en diferentes períodos de tiempo. En ambos casos, la banda de mayor tamaño corresponde con el RNA sin cortar.

4.1.6. Futuros experimentos: construcción de los dímeros ribozimáticos

Tal y como indican los resultados, la ribozima HHR asociada a los elementos transponibles tipo PLE no muestran autoescisiones relevantes de manera individual. Es muy probable que, tal y como apuntan otros estudios con HHRs similares (Cervera y De La Peña, 2020), esta ribozima en particular tenga más actividad si funcionara de manera dimérica. El primer paso para la construcción de los dímeros es la amplificación mediante PCR del fragmento correspondiente a la ribozima. Se decide construir dímeros para los clones SM-1A y SM-1C con oligos específicos (Ver materiales y métodos). Los fragmentos esperados son aproximadamente de 270 nt y 400 nt, respectivamente. Una vez realizada la amplificación, el fragmento de interés es seleccionado mediante un gel de poliacrilamida nativo (Figura 14). Las bandas serán cortadas, el DNA purificado e insertado de nuevo en el plásmido para que las ribozimas se posicionen en tándem. El resto del experimento no se pudo realizar por la situación de Estado de Alarma por COVID-19 al que se enfrentaba el país. El diseño del experimento se detalla en Materiales y Métodos.

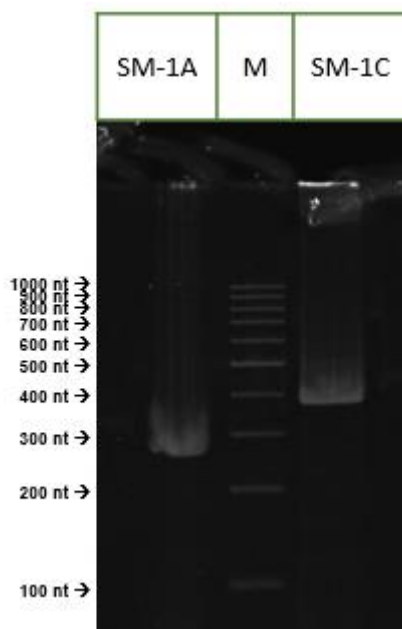


Figura 14. Gel electroforético con el producto de la amplificación para la realización de los dímeros. Las bandas de interés son las de aproximadamente 270 nt (SM-1A) y las de 400 nt (SM-1B). La M representa el marcador de pesos moleculares donde las bandas van desde 100 pb a 1000 pb siendo la banda de 500 pb la más intensa.

4.2. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LOS ELEMENTOS PLE EN *S. moellendorffii*

En *S. moellendorffii* las ribozimas HHR asociadas a elementos transponibles tipo PLE se encuentran en regiones teloméricas. Con el propósito de estudiar el posible papel biológico de esta pequeña ribozima de autocorte se analizó la expresión en la planta de los elementos PLE que las contienen. En primer lugar, se extrajeron dos muestras de RNA de una misma planta (denominados como Sela1 y Sela2) y se purificaron. Para determinar el

RESULTADOS

nivel de impurezas se realizó un gel desnaturalizante PAGE (Figura 15) y se precisó la concentración de RNA con el NanoDrop dando unos resultados de 1,5 µg/µl en Sela1 y 2 µg/µl en Sela2. En la migración de los extractos en un gel de poliacrilamida nativo se aprecian impurezas, fundamentalmente polisacáridos, pero que en principio no deberían interferir en el análisis *Northern* que se realizó posteriormente.

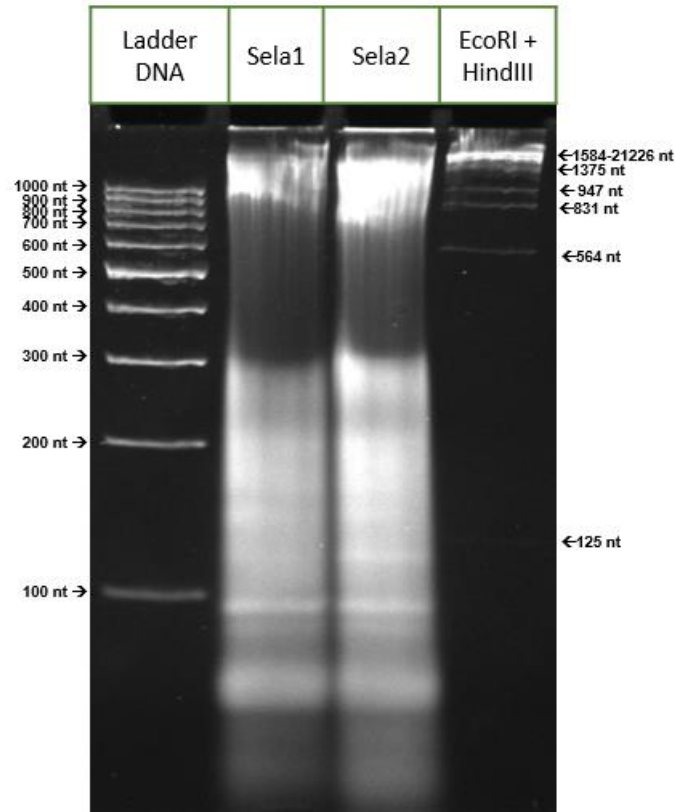


Figura 15. Determinación del nivel de impurezas en preparaciones de RNA de Sela1 y Sela2. Gel electroforético con las muestras de RNA extraído de S. moellendorffii. Se incluyen dos marcadores de peso molecular, a la izquierda, el Ladder 100 pb (Thermo) y a la derecha, el marcador III (se trata del fago λ digerido con EcoRI + HindIII).

4.2.1. Northern blot

A continuación, se realizó un ensayo de hibridación *Northern blot* para detectar en el extracto de RNAs de la planta la presencia del elemento PLE. En primer lugar, se preparó un gel PAGE desnaturalizante (Figura 16A) donde se aplicaron las dos muestras de RNA, el marcador de peso molecular y los controles. En cuanto a los controles utilizados, se emplearon dos diluciones de RNA distintas donde no se esperaba observar ninguna banda. Tras realizar la electroforesis, el RNA fue transferido a una membrana de nylon (Figura 16B). En la membrana se observó en el extracto de una de las dos plantas (Sela2) una banda con un tamaño correspondiente a una molécula de RNA de aproximadamente 5000-6000 nt. Dicho tamaño correspondería con el tamaño de los elementos PLE detectados en el genoma de la planta, por lo que se confirma de esta manera que este transposón se estaría expresando en la planta *S. moellendorffii*. Por lo que respecta a los controles, se puede

RESULTADOS

observar que se detectó 1 ng del RNA de la construcción SM-1A, aunque no se apreció señal para la dilución de 0.01 ng.

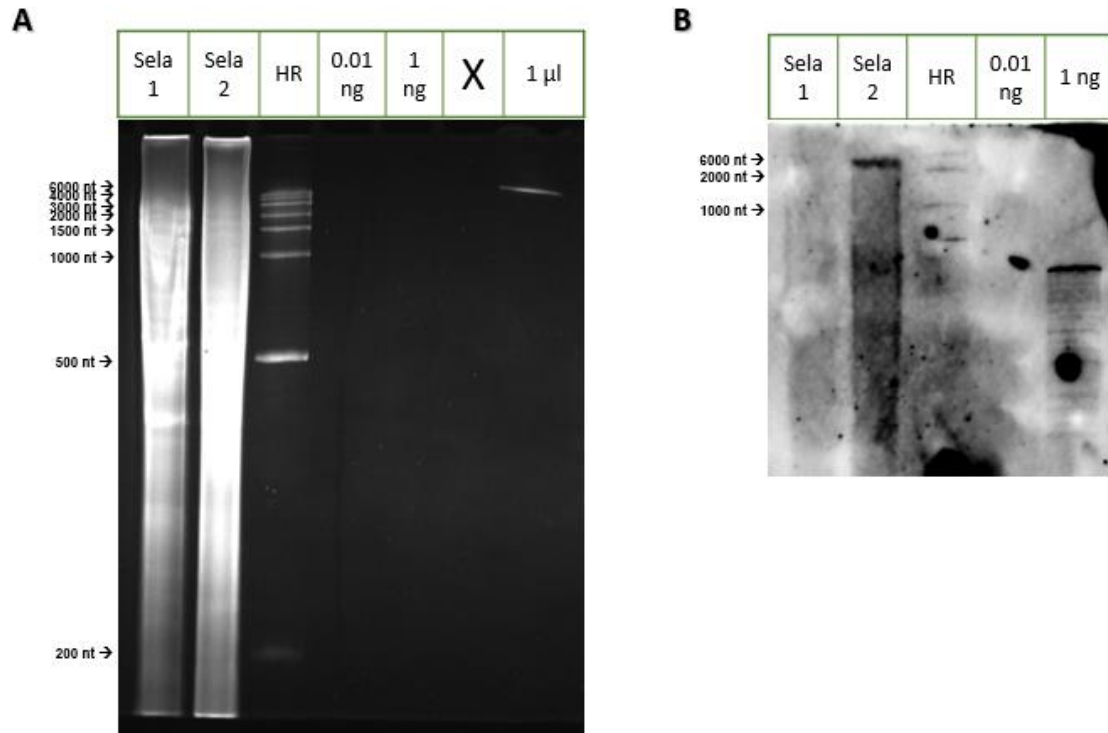


Figura 16. Resultados del análisis Northern blot para detectar la expresión de PLE en *S. moellendorffii*. A. Electroforesis de las muestras de RNA de Sela 1 y Sela 2. Como control negativo se utilizan dos diluciones de RNA (0.01 ng y 1 ng). Además, se corre una banda con 1 μ l como control visual. B. Membrana de nylon revelada con quimioluminiscencia.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el *Northern blot*, el siguiente paso en el análisis sería una amplificación por RT-PCR del fragmento detectado y una futura clonación del mismo. Sin embargo, el proyecto no se pudo completar por las limitaciones que supuso la pandemia COVID-19. El protocolo para realizar estos futuros experimentos está detallado en Materiales y Métodos.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

Desde su descubrimiento (Prody et al., 1986), las ribozimas de cabeza de martillo (HHR) han sido ampliamente estudiadas como RNA catalítico modelo por su pequeño tamaño y su elevada actividad catalítica. A raíz de todas estas investigaciones, el motivo HHR se ha encontrado en numerosos organismos de todos los reinos de la vida (De La Peña y García-Robles, 2010a; Perreault et al., 2011). A lo largo de este trabajo, se ha caracterizado la HHR asociada a elementos PLE en *S. moellendorffii*, organismo cuyas ribozimas no habían sido objeto de estudio hasta el momento.

Los resultados obtenidos muestran cómo el motivo HHR de *S. moellendorffii* tiene bajas tasas de escisión en condiciones *in vitro*. Muy probablemente, las secuencias adyacentes a la ribozima dificultan el plegamiento del motivo, impidiendo que se lleve a cabo el autocorte de manera efectiva. En este sentido, cuando se elimina parte de la región 5' que precede al motivo ribozimático, los niveles de autocorte aumentan sensiblemente. Aun así, las tasas de escisión siguen siendo muy bajas en comparación con otras ribozimas naturales y muchísimo más bajas comparadas con las enzimas proteicas (Tanner, 1999). El bajo rendimiento de las construcciones sugiere que el RNA no adopta eficientemente un estado catalíticamente activo cuando es liberado de la RNA polimerasa.

Con la finalidad de que la ribozima pudiera adoptar un plegamiento óptimo, se realizaron análisis cinéticos donde se dejó el RNA durante largos periodos de tiempo de incubación, en ausencia de proteínas y con Mg^{2+} . Sin embargo, los resultados obtenidos mostraron tasas de escisión aún más bajas que las obtenidas en la co-transcripción. Se infiere, por tanto, que esta HHR junto con las secuencias que la flanquean alcanzan mayores tasas de autocorte durante la co-transcripción, puesto que al dejar el RNA largos periodos de tiempo, la secuencia no parece permitir que la HHR adopte con facilidad su conformación activa, dejando de ser funcional.

Podemos concluir por tanto que, pese a todos los ensayos realizados, la ribozima de cabeza de martillo asociada a elementos PLE de *S. moellendorffii* no muestra una actividad de autoescisión relevante *in vitro*. Tal y como se ha descrito anteriormente en este trabajo, el motivo presente en esta planta primitiva tiene una estructura secundaria de tipo I, además de una hélice III mucho más corta de lo normal. En anteriores investigaciones, motivos HHR presentes en otros organismos y con características similares al motivo presente en esta planta primitiva, también mostraron una baja actividad de autoescisión (Cervera y De La Peña, 2014; Cervera y De La Peña, 2020). Históricamente se viene proponiendo que las ribozimas cabeza de martillo con una hélice III corta, solo mostrarían una actividad relativamente elevada si se producía una dimerización del motivo (Forster et al., 1988). Con esta disposición de copias en tándem, cada domino de HHR supera la carencia de una hélice III larga al formar una subestructura dimérica.

Por las similitudes de las HHR de los estudios antes mencionados con la HHR de *S. moellendorffii*, se considera que está tendría una tasa de escisión mucho mayor si los motivos se situaran en tándem y formasen un dímero (Figura 17). No obstante, es probable que estos RNA dependan además de otros factores como las chaperonas de RNA para

adoptar su conformación activa que aumente la velocidad de escisión *in vivo* (Cervera y De La Peña, 2014).

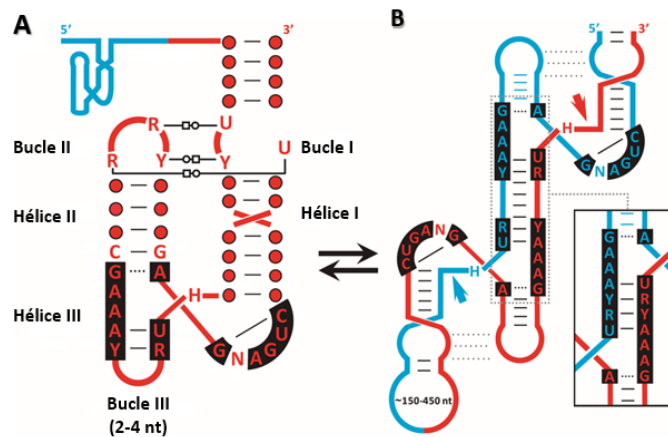


Figura 17. Conformación de ribozima cabeza de martillo (HHR) como monómero vs. dímero **A.** Representación de dos HHR repetidas en tándem. La HHR coloreada de rojo representa un monómero donde se muestran los nucleótidos conservados mediante una caja negra. Se muestran los tres bucles y las tres hélices, siendo la hélice III de tan solo 2-4 nucleótidos. **B.** Representación de la conformación dimérica activa. Se observa cómo la hélice III tiene una secuencia más extendida. Figura modificada de Cervera y De La Peña, 2014.

Por otro lado, las secuencias HHR estudiadas en este trabajo se encuentran asociadas a elementos similares a Penélope (PLE), retrotransposones que se encuentran en los telómeros de la planta *S. moellendorffii* y en muchos otros organismos animales. En el caso de esta planta, los PLE son deficientes en el dominio endonucleasa (EN). Esta falta de actividad EN deja a los elementos con pocas opciones de movilidad, pudiéndose unir solamente al extremo 3'-OH del cromosoma (Gladyshev y Arkhipova, 2007). La función biológica de estos elementos PLE confinados en los extremos cromosómicos no está del todo clara hoy en día. Se puede plantear la hipótesis de que se conservaron evolutivamente como un complemento del sistema basado en la telomerasa, proporcionando protección adicional contra la pérdida terminal de DNA al unirse a los extremos. En este trabajo, se quería estudiar si los PLE situados en los telómeros de la planta primitiva se estaban realmente transcribiendo *in vivo*. Los resultados obtenidos en el análisis *Northern* realizado muestran una banda con un tamaño correspondiente al RNA de PLE, confirmando de esta manera que los elementos similares a Penélope se expresan *in vivo*. A partir de estos resultados, sería muy interesante el estudio de los extremos de la secuencia PLE que se transcribe *in vivo*, puesto que se determinaría si la secuencia contiene o no las HHR y si éstas se han autocortado o no. Además, en futuros experimentos habría que comprobar si la expresión de estos elementos varía según la edad del vegetal, las condiciones ambientales, el momento del ciclo celular y otros factores.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

Debido a la paralización producida por el COVID-19, algunos de los proyectos no se pudieron finalizar. Sin embargo, se ha completado con una revisión bibliográfica sobre la formación de dímeros ribozimáticos que permiten especular sobre su actividad catalítica.

- I. La ribozima cabeza de martillo presenta bajos niveles de autocorte en forma monomérica. Al deleccionar el extremo 5' precediendo a la ribozima, la actividad catalítica aumenta indicando que su plegamiento es óptimo. No obstante, según la bibliografía consultada, la dimerización del motivo supondría un aumento muy notable de la capacidad de autoescisión.
- II. Los elementos tipo Penélope situados en los telómeros de la planta *Selaginella moellendorffii* se expresan *in vivo*.

6.1. PRESPECTIVAS FUTURAS

Gracias a los conocimientos obtenidos en los estudios sobre las pequeñas ribozimas de autocorte en distintos organismos, se han podido diseñar nuevas ribozimas con características concretas (elevadas tasas de escisión, especificidad, regulación genética...). La flexibilidad funcional de las ribozimas y el rango dinámico en las tasas catalíticas hacen que estos RNA sean instrumentos versátiles en la caja de herramientas del biólogo sintético. Muchas de las características que se busca que hagan las ribozimas de diseño quizás sean ya utilizadas en la naturaleza, pero aún no han sido descubiertas. Tal y como se ha realizado en este trabajo, es importante seguir investigando ribozimas con propiedades singulares que puedan en un futuro tener aplicaciones en los campos de biología sintética y medicina molecular.

En relación con la medicina molecular, se han descrito en la introducción de este trabajo algunas de las investigaciones que se están llevando a cabo en los últimos años. Sin embargo, se podrían plantear nuevos proyectos que resuelvan los problemas sanitarios actuales. Por ejemplo, el empleo de ribozimas en terapia génica que bloqueen la replicación del virus COVID-19. En virus similares (genomas en forma de RNA), este bloqueo replicativo ha dado buenos resultados, puesto que la inhibición por parte de las ribozimas resulta más sencilla cuando el material genético se encuentra en forma de RNA, lo que puede aprovecharse para generar interesantes aplicaciones biotecnológicas basadas en las ribozimas.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- AGRESTI, J. J., KELLY, B. T., JÄSCHKE, A., Y GRIFFITHS, A. D. (2005). Selection of ribozymes that multiple-turnover Diels-Alder cycloadditions by using in vitro compartmentalization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(45), 16170–16175.
- ARKHIPOVA, I. R. (2006). Distribution and Phylogeny of Penelope-Like Elements in Eukaryotes. *Systematic Biology*, 55(6), 875–885.
- ARKHIPOVA, I. R., PYATKOV, K. I., MESELSON, M., Y EVGEN'EV, M. B. (2003). Retroelements containing introns in diverse invertebrate taxa. *Nature Genetics*, 33(2), 123–124.
- BALKE, D., WICHERT, C., APPEL, B., Y MÜLLER, S. (2014). Generation and selection of ribozyme variants with potential application in protein engineering and synthetic biology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(8), 3389–3399.
- BARROSO DEL JESUS, A., Y BERZAL HERRANZ, A. (2011). En busca de nuevos agentes antivirales: Ribozimas y estrategias de aplicación. *Instituto de Parasitología y Biomedicina (Granada)*.
- BARTEL, D. P., Y SZOSTAK, J. W. (1993). Isolation of new ribozymes from a large pool of random sequences. *Science*, 261(5127), 1411–1418.
- BIRIKH, K. R., HEATON, P. A., Y ECKSTEIN, F. (1997). The structure, function and application of the hammerhead ribozyme. *European Journal of Biochemistry*, 245(1), 1–16.
- BUTCHER, S. E. (2009). The spliceosome as ribozyme hypothesis takes a second step. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Vol. 106, Issue 30, pp. 12211–12212). National Academy of Sciences.
- CERVERA, A., Y DE LA PEÑA, M. (2014). Eukaryotic penelope-like retroelements encode hammerhead ribozyme motifs. *Molecular Biology and Evolution*, 31(11), 2941–2947.
- CERVERA, A., Y DE LA PEÑA, M. (2020). Small circRNAs with self-cleaving ribozymes are highly expressed in diverse metazoan transcriptomes. *Nucleic Acids Research*, 48(9), 5054–5064.
- CERVERA, A., URBINA, D., Y DE LA PEÑA, M. (2016). Retrozymes are a unique family of non-autonomous retrotransposons with hammerhead ribozymes that propagate in plants through circular RNAs. *Genome Biology*, 17(1), 135.
- DE LA PEÑA, M., Y GARCÍA-ROBLES, I. (2010a). Ubiquitous presence of the hammerhead ribozyme motif along the tree of life. *RNA*, 16(10), 1943–1950.
- DE LA PEÑA, M., GARCÍA-ROBLES, I., Y CERVERA, A. (2017). The hammerhead Ribozyme: A long history for a short RNA. *Molecules*, 22(1).
- DE LA PEÑA, M., Y GARCÍA-ROBLES, I. (2010b). Intronic hammerhead ribozymes are ultraconserved in the human genome. *EMBO Reports*, 11(9), 711–716.
- DOHERTY, E. A., Y DOUDNA, J. A. (2001). Ribozyme Structures and Mechanisms. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 30(1), 457–475.
- EPSTEIN, L. M., Y GALL, J. G. (1987). Self-cleaving transcripts of satellite DNA from the

BIBLIOGRAFÍA

- newt. *Cell*, 48(3), 535–543.
- EVGEN'EV, M. B., Y ARKHIPOVA, I. R. (2005). Penelope-like elements – a new class of retroelements: distribution, function and possible evolutionary significance. *Cytogenetic and Genome Research*, 110(1–4), 510–521.
- FERBEYRE, G., SMITH, J. M., Y CEDERGRÉN, R. (1998). Schistosome Satellite DNA Encodes Active Hammerhead Ribozymes. *Molecular and Cellular Biology*, 18(7), 3880–3888.
- FORSTER, A. C., DAVIES, C., SHELDON, C. C., JEFFRIES, A. C., Y SYMONS, R. H. (1988). Self-cleaving viroid and newt RNAs may only be active as dimers. *Nature*, 334(6179), 265–267.
- GARCÍA-ROBLES, I., SÁNCHEZ-NAVARRO, J., Y PEÑA, M. D. LA. (2012). Intronic hammerhead ribozymes in mRNA biogenesis. *Biological Chemistry*, 393(11), 1317–1326.
- GLADYSHEV, E. A., Y ARKHIPOVA, I. R. (2007). Telomere-associated endonuclease-deficient Penelope-like retroelements in diverse eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(22), 9352–9357.
- GUERRIER-TAKADA, C., GARDINER, K., MARSH, T., PACE, N., Y ALTMAN, S. (1983). The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell*, 35(3 PART 2), 849–857.
- HAMMANN, C., LUPTAK, A., PERREAULT, J., Y DE LA PEÑA, M. (2012). The ubiquitous hammerhead ribozyme. *RNA*, 18(5), 871–885.
- HERNANDEZ, Y. J., WANG, J., KEARNS, W. G., LOILER, S., POIRIER, A., FLOTTE, T. R., Y CENTER, G. T. (1999). Latent Adeno-Associated Virus Infection Elicits Humoral but Not Cell-Mediated Immune Responses in a Nonhuman Primate Model. In *JOURNAL OF VIROLOGY* (Vol. 73, Issue 10).
- JIMENEZ, R. M., POLANCO, J. A., Y LUPTÁK, A. (2015). Chemistry and Biology of Self-Cleaving Ribozymes. *Trends in Biochemical Sciences*, 40(11), 648–661.
- KRUGER, K., GRABOWSKI, P. J., ZAUG, A. J., SANDS, J., GOTTSCHLING, D. E., Y CECH, T. R. (1982). Self-splicing RNA: Autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of tetrahymena. *Cell*, 31(1), 147–157.
- LEWIN, A. S., Y HAUSWIRTH, W. W. (2001). Ribozyme gene therapy: Applications for molecular medicine. *Trends in Molecular Medicine*, 7(5), 221–228.
- LÜNSE, C. E., WEINBERG, Z., Y BREAKER, R. R. (2017). Numerous small hammerhead ribozyme variants associated with Penelope-like retrotransposons cleave RNA as dimers. *RNA Biology*, 14(11), 1499–1507.
- MACKE, T. J. (2001). RNAMotif, an RNA secondary structure definition and search algorithm. *Nucleic Acids Research*, 29(22), 4724–4735.
- MaRTICK, M., HORAN, L. H., NOLLER, H. F., Y SCOTT, W. G. (2008). A discontinuous hammerhead ribozyme embedded in a mammalian messenger RNA. *Nature*, 454(7206), 899–902.
- MAUNG, N. W., Y SMOLKE, C. D. (2007). A modular and extensible RNA-based gene-regulatory platform for engineering cellular function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(36), 14283–14288.

BIBLIOGRAFÍA

- MÜLLER, S., APPEL, B., BALKE, D., HIERONYMUS, R., Y NÜBEL, C. (2016). Thirty-five years of research into ribozymes and nucleic acid catalysis: Where do we stand today? [version 1; referees: 2 approved]. In *F1000Research* (Vol. 5). Faculty of 1000 Ltd.
- MURRAY, J. B., TERWEY, D. P., MALONEY, L., KARPEISKY, A., USMAN, N., BEIGELMAN, L., Y SCOTT, W. G. (1998). The structural basis of hammerhead ribozyme self-cleavage. *Cell*, *92*(5), 665–673.
- NISSEN, P., HANSEN, J., BAN, N., MOORE, P. B., Y STEITZ, T. A. (2000). The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science*, *289*(5481), 920–930.
- PERREAULT, J., WEINBERG, Z., ROTH, A., POPESCU, O., CHARTRAND, P., FERBEYRE, G., Y BREAKER, R. R. (2011). Identification of Hammerhead Ribozymes in All Domains of Life Reveals Novel Structural Variations. *PLoS Computational Biology*, *7*(5).
- PETROV, A., WU, T., PUGLISI, E. V., Y PUGLISI, J. D. (2013). RNA purification by preparative polyacrylamide gel electrophoresis. In *Methods in Enzymology* (Vol. 530, pp. 315–330). Academic Press Inc.
- POREBSKI, S., BAILEY, L. G., Y BAUM, B. R. (1997). Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter*, *15*(1), 8–15.
- PRODY, G. A., BAKOS, J. T., BUZAYAN, J. M., SCHNEIDER, I. R., Y BRUENING, G. (1986). Autolytic processing of dimeric plant virus satellite RNA. *Science*, *231*(4745), 1577–1580.
- ROJAS, A. A., VAZQUEZ-TELLO, A., FERBEYRE, G., VENANZETTI, F., BACHMANN, L., PAQUIN, B., SBORDONI, V., Y CEDERGREN, R. (2000). Hammerhead-mediated processing of satellite pDo500 family transcripts from Dolichopoda cave crickets. *Nucleic Acids Research*, *28*, 4037–4043.
- SCHNABLE, P. S., WARE, D., FULTON, R. S., STEIN, J. C., WEI, F., PASTERNAK, S., LIANG, C., ZHANG, J., FULTON, L., GRAVES, T. A., MINX, P., REILY, A. D., COURTNEY, L., KRUCHOWSKI, S. S., TOMLINSON, C., STRONG, C., DELEHAUNTY, K., FRONICK, C., COURTNEY, B., ... WILSON, R. K. (2009). The B73 maize genome: Complexity, diversity, and dynamics. *Science*, *326*(5956), 1112–1115.
- SCHOSTAK, N., PYATKOV, K., ZELENTOVA, E., ARKHIPOVA, I., SHAGIN, D., SHAGINA, I., MUDRIK, E., BLINTSOV, A., CLARK, I., FINNEGAN, D. J., Y EVGEN'EV, M. (2008). Molecular dissection of Penelope transposable element regulatory machinery. *Nucleic Acids Research*, *36*(8), 2522–2529.
- SEEHAFER, C., KALWEIT, A., STEGER, G., GRÄF, S., Y HAMMANN, C. (2011). From alpaca to zebrafish: Hammerhead ribozymes wherever you look. *RNA*, *17*(1), 21–26.
- SOUKUP, G. A., Y BREAKER, R. R. (1999). Engineering precision RNA molecular switches. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(7), 3584–3589.
- TANNER, N. K. (1999). Ribozymes: the characteristics and properties of catalytic RNAs. *FEMS Microbiology Reviews*, *23*(3), 257–275.

BIBLIOGRAFÍA

- WEINBERG, C. E., WEINBERG, Z., Y HAMMANN, C. (2019). Novel ribozymes: discovery, catalytic mechanisms, and the quest to understand biological function. *Nucleic Acids Research*, 47(18), 9480–9494.
- WEINBERG, M., PASSMAN, M., KEW, M., Y ARBUTHNOT, P. (2000). Hammerhead ribozyme-mediated inhibition of hepatitis B virus X gene expression in cultured cells. *Journal of Hepatology*, 33(1), 142–151.
- WENG, D. E., Y USMAN, N. (2001). Angiozyme: A novel angiogenesis inhibitor. *Current Oncology Reports*, 3(2), 141–146.
- 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., Y SCHULMAN, A. H. (2007). A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nature Reviews Genetics*, 8(12), 973–982.
- YEN, L., SVENDSEN, J., LEE, J. S., GRAY, J. T., MAGNIER, M., BABA, T., D'AMATO, R. J., Y MULLIGAN, R. C. (2004). Exogenous control of mammalian gene expression through modulation of RNA self-cleavage. *Nature*, 431(7007), 471–476.

ANEXOS

ANEXOS

1. Clon SM-1

T3_CACGCGCAGTACCTCACTAA

GGGACAAAAGCTGGGTACCGGGCCCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTG
ATATCGAATTCGATGACTCCCAGGGTCTGGCCGATGGACTTCAGGTATGTCCCAAGTC
ACTCCAGGCCACCCCCCTTCGAGTCAACGCCAGGTCAACGCGGAGTCAACGGTCA
GAACGGAATATTCCCAATATTCCGACTGTATCCCTGTTGACCGAGTCAAACGGCAT
ATACCGTTGGATTCCGCTCTTCCTTCCGATCGTGAATATGTGAGTTTCAACTCTGAACT
CCACACATGACTCGTGGAAAAGCGTGTATTCCGTTAAAACGGTGCCGCTCCCTCGAC
ATCGGCGACACACGCCGACAGCTCGCGGGATGGCTCTCCCCGACACAACCGCTGG
ACTCCGAGTATGTATGAGTGACCTCAGGCCCTCCACCACCACAGTCCACACACGGTC
AACGCGGGGTCAACGGTCAACGACGGAATATTCCGAGAATATTCCCTGCAAAGTGAA
CCACGTTTTTTCGTCGCCGGGTACGTACAAGTGATACAAGCATTGTGGACGTAATGCA
TGCATCATATCATGCCGCGTTCACAAGTTATCTCGCGTCAAAGGTACATCACCCGCCG
GACGAACGCTTACTGTCTTCGGCGATCCGCCGAAGTCATTCTCCGCGACTACCACTG
CTGTGGAGTAACCAACACCAGCTGTGCTACGTTTCGCACCCTTTCGAGCCAACGCTGC
CACGCCACTTCGCATGGCCGCCACACGGACTCGCGCCACGTGACAGAGCCAAAATA
TAAGTAGAGTCGGCACCGACACCGAGCTA**GGGTTAAGGTAGACACTAGATGACTACA**
CCCGGCTGATGAGTCCCAAAAAGGACGAAACCGGTC **T** **CGGGTTGTCTCT** **T** **TGCCTCT**
CCCTCGCTCACGAATGAATGAAAATTCATTCCCTCGCAAATTCATTCCCTCGCATCC
TCTACTTGCTCTCGATCACGCCGTTTCGACAACGGCACACGGAGAAATGTGGATTGC
ACAAAGTGGTGCCGCGATCTCGCTGGATTGGATCCACTAGTTCTAGATCGGGTTGTCT
CTTGTCTCTCCCTC

En negrita → Secuencia del promotor T3

En rojo → Secuencia HHR. El sitio de autocorte está marcado con una línea azul

En fondo amarillo → Mutación inactivadora de HHR (T a G)

Subrayado → Sitio XbaI

2. Clon SM-1A

CGCAATTAACCCTCACTAAAGGGGTAGAGTCGGCACCGAGAGTCGGTAGAGTCGGC
ACCGAGCTAGGGTTAAGGTAGACACTAGATGACTACACCCGGCTGATGAGTCCCAA
AAGGACGAAACCGGTCTCGGGTTGTCTCTTGTCTCTCCCTCGCTCACGAATGAATG
AAAATTCATTCCCTCGCATCCTCTACTTGCTCTCGATCACGCCGTTTCGACAACGGCA
CACGGAGAATGTGGATTGCACAAAGTGGTGCCGCGATCTCGCTGGATTGGATCCACT
AGTTCTAGA

3. Clon SM-1B

CGCAATTAACCCTCACTAAAGGGGTAGAGTCGGCACCCGAGCTAGGGTTAAGGTAGAC
ACTAGATGACTACACCCGGCTGATGAGTCCCAAAAAGGACGAAACCGGTCTCGGGTT
GTCTCTTGTCTCTCCCTCGCTCACGAATGAATGAAAATTCATTCCCTCGCATCCTCTA
CTTGCTCTCGATCACGCCGTTTCGACAACGGCACACGGAGAATGTGGATTGCACAAA
GTGGTGCCGCGATCTCGCTGGATTGGATCCACTAGTTCTAGA

4. Clon SM-1C

CGCAATTAACCCTCACTAAAGGGCCGAAGTCATTCTCCGCGACTACCACTGCTGTGG
AGTAACCAACACCAGCTGTGCTACGTTTCGCACCCTTGCGAGCCAACGCTGCCACGC
CACTTCGCATGGCCGCCACACGGACTCGCGCCACGTGACAGAGCCAAAATATAAGT
AGAGTCGGCACCCGAGCTAGGGTTAAGGTAGACACTAGATGACTACACCCGGCTGATG
AGTCCCAAAAAGGACGAAACCGGTCTCGGGTTGTCTCTTGTCTCTCCCTCGCTCAC
GAATGAATGAAAATTCATTCCCTCGCATCCTCTACTTGCTCTCGATCACGCCGTTTCGA
CAACGGCACACGGAGAATGTGGATTGCACAAAGTGGTGCCGCGATCTCGCTGGATTG
GATCCACTAGTTCTAGA