



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Ribozimas tipo Hairpin en el genoma de arroz revelan una antigua  
integración de un satélite viral de RNA

Adrián Contreras Garrido  
Valencia, Enero 2017

Tutor: Dr. De La Peña Del Rivero, Marcos

Universidad Politécnica de Valencia  
Máster en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas



## RIBOZIMAS TIPO HAIRPIN EN EL GENOMA DE ARROZ REVELAN UNA ANTIGUA INTEGRACIÓN DE UN SATÉLITE VIRAL DE RNA.

Ribozimas, RNAs no codificantes, satélites de RNA, Hairpin.

Los RNAs catalíticos o ribozimas se consideran supervivientes del mundo pre-biótico de RNA que habrían permanecido en los genomas de organismos actuales. La mayoría de los RNAs catalíticos conocidos son pequeños motivos de autocorte, como las ribozimas Hammerhead o Hepatitis- $\delta$ , que frecuentemente se asocian a patógenos circulares de RNA como viroides y satélites de virus. Recientemente hemos encontrado que hay en realidad multitud de estas ribozimas en genomas de DNA, tanto procarióticos como eucarióticos, con funciones biológicas desconocidas. Como caso excepcional, la ribozima tipo Hairpin solo se ha descrito en 3 satélites virales de plantas. Siguiendo aproximaciones bioinformáticas, en este trabajo hemos detectado dos nuevos ejemplos de la ribozima Hairpin; en el genoma de arroz (*Oryza sativa*) y en un RNA circular tipo satélite viral de morera (*Morus australis*). La ribozima Hairpin de arroz se halló en una región repetitiva (monómero de 466 nt) en la que también se detectó una ribozima Hammerhead en la polaridad opuesta. Estos datos, así como su localización genómica, muy cerca de una secuencia de pararetrovirus de arroz, sugieren un antiguo evento de inserción genómica de un satélite de tipo viroidal en el genoma de la planta. Las particularidades bioquímicas, estructurales y evolutivas de estas dos nuevas ribozimas genómicas de arroz se analizaron con detalle.

Ribozymes, non-coding RNAs, RNA satellite, Hairpin.

Catalytic RNAs or ribozymes are considered survivors of an hypothetic pre-biotic RNA world that would have remained conserved in today organisms' genomes. Most of the known catalytic RNA are short self-cleaved motifs like Hammerhead or Hepatitis- $\delta$  ribozymes that frequently are associated to circular RNA pathogens like viroids and virus satellites. Recently we have discovered the widespread existence of this ribozymes on both eukaryotic and prokaryotic DNA genomes with unknown biological roles in them. As an exceptional case, the Hairpin ribozyme has only being described in only three viral plant satellites. Following bioinformatics approaches we have revealed in this work two new examples of hairpin ribozyme, in rice genome (*Oryza sativa*) and in a circular RNA viral satellite of mulberry (*Morus australis*). The rice Hairpin ribozyme was found in a repetitive region (a monomer of 466 nt) that was also found to encode a Hammerhead ribozyme in the opposite polarity. This data, as well as its genomic location, near to a rice pararetrovirus sequence, suggest a genomic insertion event of a satellite virus in the rice genome. Biochemical, structural and evolutionary features of these two new genomic ribozymes in rice were analyzed.

Autor: Adrián Contreras

Tutor: Dr. De La Peña Del Rivero, Marcos

Valencia, Enero 2017

---

# Índice

---

## ÍNDICE GENERAL

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Introducción.....</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1. Catálisis mediada por RNAs.....  | 1         |
| 1.2. Las familias de pequeñas ribozimas de autocorte.....   | 2         |
| 1.2.1. Familia de ribozimas Hammerhead.....   | 2         |
| 1.2.2. Familia de ribozimas Hairpin.....  | 4         |
| 1.2.3. Familia de ribozimas del agente delta de la Hepatitis humana.....  | 6         |
| 1.2.4. Restantes familias de pequeñas ribozimas de autocorte: VS, GImS,<br>Twister, Twister sister, Hatchet y Pistol..... | 7         |
| 1.3. Las ribozimas se encuentran representadas en todos los dominios de la<br>vida.....                                   | 9         |
| 1.4. Viroides y otros pequeños RNAs circulares infecciosos.....   | 10        |
| 1.4.1. Viroides.....  | 10        |
| 1.4.2. Satélites Viroidales.....  | 10        |
| 1.5. Replicación por círculo rodante en satélites. Viroides y retrozimas.....   | 12        |
| <b>2. Objetivos del trabajo.....</b>  | <b>14</b> |
| <b>3. Material y métodos.....</b>   | <b>15</b> |
| 3.1. Extracción de ácidos nucleicos de <i>Oryza sativa</i> .....  | 15        |
| 3.2. Amplificación y clonación de los elementos y ribozimas a analizar.....   | 16        |
| 3.2.1. Amplificación del elemento completo del genoma de <i>Oryza sativa</i> ..   | 16        |
| 3.2.2. RT-PCR.....  | 16        |
| 3.3. Obtención de RNAs de interés por transcripción <i>in vitro</i> .....   | 17        |
| 3.4. Análisis del autocorte de las ribozimas.....   | 17        |
| 3.5. Cinéticas de autocorte de las ribozimas.....   | 17        |
| 3.6. Análisis por hibridación <i>Northern</i> .....   | 17        |
| 3.7. Cinética de autocorte de las ribozimas durante la transcripción <i>in vitro</i> ....                                 | 18        |
| <b>4. Resultados y discusión de los resultados.....</b>   | <b>19</b> |
| 4.1. Búsqueda bioinformática de nuevos motivos hairpin.....   | 19        |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.2.Descripción estructural de las dos nuevas ribozimas HPr encontradas y las HHrs asociadas..... | 20        |
| 4.3.Localización genómica de las ribozimas de Arroz.....  | 22        |
| 4.4.Clonación del elemento Os-466 genómico y las ribozimas Hp y HHr genómicas de arroz.....       | 24        |
| 4.4.1. Amplificación genómica del multímero completo Os-466.....                                  | 25        |
| 4.5.Análisis autocorte ribozimas durante la transcripción de Os-466.....                          | 26        |
| 4.6.Análisis de RNAs de arroz por hibridación Northern.....                                       | 27        |
| 4.6.1. Análisis de RNAs de arroz por RT-PCR.....  | 28        |
| 4.7.Análisis de cinéticas de autocorte de las ribozimas genómicas de arroz....                    | 28        |
| <b>5. Discusión final.....</b>  | <b>30</b> |
| <b>6. Conclusiones.....</b>   | <b>31</b> |
| <b>7. Bibliografía.....</b>   | <b>32</b> |
| <b>8. Anexo I.....</b>  | <b>39</b> |
| <b>9. Anexo II.....</b>   | <b>41</b> |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 Mecanismo general de corte y ligación de las ribozimas conocidas.....   | 2  |
| Figura 2. (A) Representación esquemática de la estructura secundaria clásica de la ribozima de cabeza de martillo HHr. (B) Representación esquemática de la estructura secundaria y terciaria de los tres tipos de ribozimas HHr descritos en la naturaleza..... | 3  |
| Figura 3. Representación de la estructura secundaria de las HPr conocidas.....   | 4  |
| Figura 4. Representaciones esquemáticas de la estructura canónica de las HPr.....  | 5  |
| Figura 5. Representaciones esquemáticas de la estructura canónica de las ribozimas tipo HDV.....   | 7  |
| Figura 6. Representación esquemática de la ribozima glmS.....  | 8  |
| Figura 7. Comparativa de las similitudes estructurales entre una retrozima (A) un viroide (B) y un satélite de RNA (C).....  | 11 |
| Figura 8. Vista de la secuencia primaria y de la estructura secundaria de las HPr nóveles.....   | 19 |
| Figura 9. Comparativa de las HPr nóveles con aquellas disponibles en la literatura.....  | 21 |
| Figura 10. Estructura primaria y secundaria de las ribozimas tipo HHr reveladas en los análisis bioinformáticos.....   | 22 |
| Figura 11. Esquema del dímero parcial encontrado en el cromosoma 8 del genoma de <i>Oryza sativa</i> .....   | 23 |
| Figura 12. Propuesta de la estructura secundaria de mínima energía libre de nuestro hipotético satélite viroidal.....  | 23 |
| Figura 13. Amplificación por PCR de nuestra construcción monomérica.....   | 24 |
| Figura 14. Amplificación por PCR de ambas construcciones de ribozimas mínimas.....   | 25 |
| Figura 15. Análisis del autocorte de las ribozimas HPr y HHr.....  | 26 |
| Figura 16. Resultado de la hibridación tipo Northern de RNA de <i>Oryza sativa</i> .....   | 27 |
| Figura 17. Gel producto de la RT-PCR.....  | 28 |
| Figura 18. Cinéticas de autocorte durante la transcripción de las ribozimas mínimas HPr y HHr de <i>Oryza sativa</i> y de la HH9 humana.....   | 29 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1. Recopilación de RNA circulares conteniendo HHRs y HPs..... | 13 |
|---|----|



---

# 1. Introducción.

---

Los RNAs catalíticos, o también llamados ribozimas, fueron descubiertos hace más de 30 años en los laboratorios de Tom Cech (Kruger *et al.*, 1982) y Sidney Altman (Gerrier-Takada *et al.*, 1983). Desde entonces, se han descrito multitud de ejemplos de ribozimas, tanto naturales como artificiales. Pero probablemente fue la confirmación de que el ribosoma es en realidad una ribozima (“The ribosome is a ribozyme” como dijo Cech, 2000) el descubrimiento que resumiría uno de los cambios de paradigma más profundos en la Biología molecular. El concepto de que solo los polímeros de cadenas peptídicas tenían funciones catalíticas fue definitivamente desterrado al confirmar que en diversos RNAs, incluido el RNA ribosomal, la catálisis química era debida al ácido ribonucleico. Hoy en día, el término ribozima designa a un RNA catalítico de la misma manera como el termino enzima designa una proteína catalítica.

## 1.1 CATÁLISIS MEDIADA POR RNAS

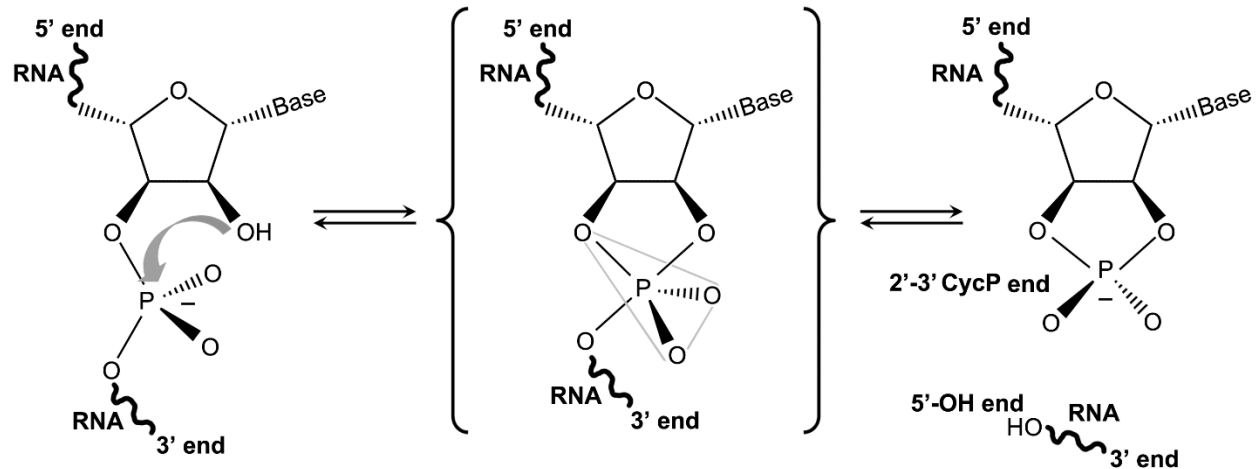
El hecho que el RNA sea capaz de romperse y ligarse a sí mismo, como es el caso de los intrones del Grupo I (Kruger *et al.*, 1982), que la rotura de la cola 5' del tRNA en el procesado del tRNA este mediada por la subunidad de RNA de la RNasa P (Gerrier-Takada *et al.*, 1983), o que el espliceosoma (Valadkhan y Manley, 2001) y el ribosoma (Nissen *et al.*, 2000) sean en efecto ribozimas, demuestran que el papel del RNA en los procesos biológicos es mucho más que el de mero intermediario entre el DNA y las proteínas (Müller *et al.*, 2016). Desde su descubrimiento, el estudio de las ribozimas ha servido como plataforma para la caracterización de nuevas formas de RNAs catalíticos, y junto con ello, nuevos roles que asignar al RNA no codificante (ncRNA). Hasta la fecha se han descubierto e identificado múltiples clases de ribozimas, tanto naturales como artificiales diseñadas en el laboratorio, así como elucidado la mayoría de sus mecanismos de catálisis. A parte del ribosoma, que cataliza la formación del enlace peptídico, la totalidad de las ribozimas descubiertas por el momento en la naturaleza están implicadas en la catálisis de ligación y/o rotura del enlace fosfodiéster del RNA.

La gran mayoría de las ribozimas descritas en sistemas biológicos suelen ser moléculas pequeñas, entre 50 y 150 nucleótidos, que catalizan la rotura o ligación de su propia cadena mediante la transesterificación de un fosfato específico de su secuencia (ver más adelante). El origen evolutivo de estas ribozimas se desconoce, aunque han tenido un papel central para nuestro entendimiento de la estructura, bioquímica y versatilidad biológica del RNA (Ferré-D'Amaré y Scott, 2010). Gracias a todo ello se ha podido construir la hipótesis del mundo prebiótico del RNA (Gilbert, 1986) en el que se postula que los primeros organismos autoreplicantes fueron RNAs que actuaban simultáneamente como material genético y catalizadores de las reacciones bioquímicas necesarias para su replicación.

Las moléculas de RNA autocatalítico utilizan el apareado de bases y las interacciones terciarias para conseguir un ordenamiento específico de determinados nucleótidos en su núcleo activo que permite que la reacción de autocorte se produzca siempre en un lugar específico de la molécula de RNA (Doherty y Doudna, 2001). El mecanismo general de estas ribozimas es similar al de muchas proteínas



ribonucleasas, en la cual el oxígeno 2' de la ribosa ataca el fosfato 3' en una reacción tipo  $S_N2$  que lleva a la formación de un fosforano bpiramidal próximo al estado de transición. Una rotura simultanea del enlace al oxígeno 5' conlleva a la producción de un fosfato cíclico 2'3' y un extremo 5'-OH. Es posible la reacción reversa o de ligación en la que el nucleófilo 5'-OH atacaría el fosfato cíclico para regenerar el enlace fosfodiéster de nuevo (Figura 1) (Timothy *et al.*, 2011).



**Figura 1.** Mecanismo general de corte y ligación de las ribozimas conocidas. La reacción de corte se muestra de izquierda a derecha, mientras que la reacción de ligación, de derecha a izquierda. Modificado de De la Peña *et al.* (2017).

## 1.2 LAS FAMILIAS DE PEQUEÑAS RIBOZIMAS DE AUTOCORTE

El grupo de las pequeñas ribozimas de autocorte está compuesto por diversas clases o familias que se han ido encontrando en la naturaleza a lo largo de los últimos 30 años. En la actualidad se han encontrado hasta 9 familias distintas de estas ribozimas: Hammerhead (HHr), Hairpin (HPr), ribozimas del agente delta de la hepatitis humana (HDV), Satélite Varkud (VS), Ribozima de la Glucosamina-6-fosfato Sintasa (glmS), Twister, Twister Sister, Hatchet y Pistol.

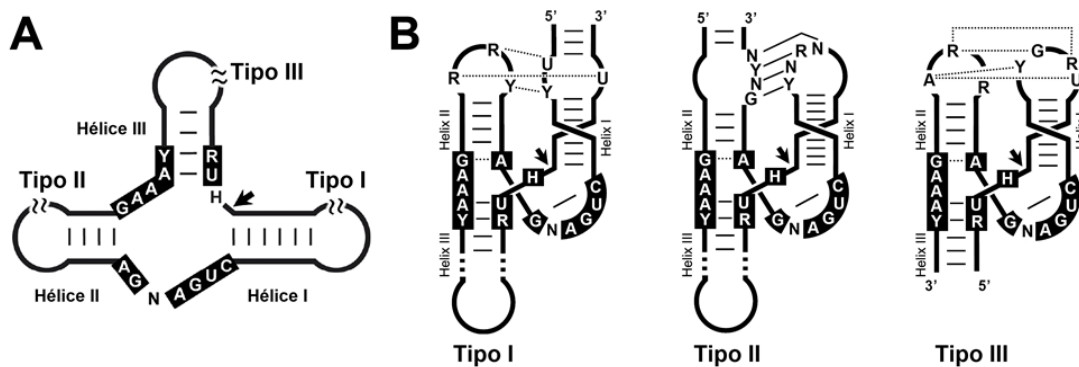
### 1.2.1 FAMILIA DE RIBOZIMAS HAMMERHEAD.

La ribozima de cabeza de martillo o más comúnmente llamada Hammerhead (HHr) fue la primera de las pequeñas ribozimas de autocorte descritas en la literatura. Originalmente la HHr fue descubierta en satélites virales (Prody *et al.*, 1986) y viroides (Hutchins *et al.*, 1986), donde participa en el procesamiento de los transcritos multiméricos producto de la replicación por círculo rodante de estos agentes infecciosos (ver más adelante). Nuevas HHrs fueron posteriormente encontradas en el DNA repetitivo de genomas de animales como tritones (Epstein *et al.*, 1987), tremátodos (Ferbeyre *et al.*, 1998) o grillos (Rojas *et al.*, 2000). Más recientemente, multitud de HHrs han sido encontradas en genomas de organismos de todos los dominios de la vida, desde procariotas a eucariotas (De la Peña y García-Robles, 2010a), incluyendo

humanos (De la Peña y Garcia-Robles, 2010b), y convirtiendo a la HHr en una de las pequeñas ribozimas con mayor presencia en la biosfera.

La función o funciones biológicas de las HHrs genómicas son por el momento un misterio, aunque en eucariotas al menos muchas parecen estar íntimamente ligadas a diversos tipos de elementos transponibles, tanto autónomos, como por ejemplo los elementos Penélope de eucariotas (Cervera y De la Peña, 2014), como no autónomos, como por ejemplo los Retrozimas de plantas (Cervera et al., 2016). Los retrozimas son un nuevo tipo de retroelementos no autónomos con ribozimas que se asemejan a otros tipos de retrotransposones LTR no autónomos pero con ciertas peculiaridades. Las retrozimas codifican motivos autocatalíticos HHR que catalizan el procesado del propio intermediario de RNA del retrotransposón, el cual se acumula in vivo en forma de RNA lineal y circular. Por otro lado, los ejemplos de HHrs encontradas de forma conservada en regiones no codificantes de genes de vertebrados superiores, tanto UTRs (Martick, *et al.*, 2008) como intrones (De la Peña y Garcia-Robles, 2010b), probablemente representan nuevas formas de control genético producto de la domesticación de las ribozimas típicas de retroelementos encontradas en eucariotas inferiores (Hamman *et al.*, 2012).

La estructura secundaria de la HHr consiste en tres hélices (denominadas I, II y III. Figura 2A) que pueden estar cerradas por bucles terminales (denominados 1, 2 y 3), dispuestas alrededor de un centro catalítico compuesto por 15 nucleótidos esenciales para la catálisis. La ribozima existe en tres tipologías distintas llamadas tipo I, II y III dependiendo de que hélice es la que conecta con el resto del transcrito (Figura 2). Una primera estructura cristalina de una HHr artificial mínima (sin bucles 1 y 2) fue resuelta hace más de 20 años (Pley *et al.*, 1994), (Scott *et al.*, 1995), mostrando un centro activo en un estado llamado “precatalítico” que necesitaba una importante reordenación para aproximar los residuos esenciales y poder atacar el residuo diana. En 2003 se describió la presencia de contactos terciarios entre las hélices I y II que permitían estabilizar la conformación del sitio activo, acelerando enormemente el autocorte en condiciones fisiológicas de baja concentración de magnesio (De la Peña *et al.*, 2003), (Khvorova *et al.*, 2003). Una nueva estructura cristalográfica de una ribozima natural conteniendo dichas interacciones distales desveló una reorganización del centro activo inducida por dicha estabilización terciaria (Martick y Scott, 2006). En este caso, la posición óptima de los residuos ya permitía definir un modelo de catálisis tipo ácido-base donde los nucleótidos implicados estaban correctamente alineados.

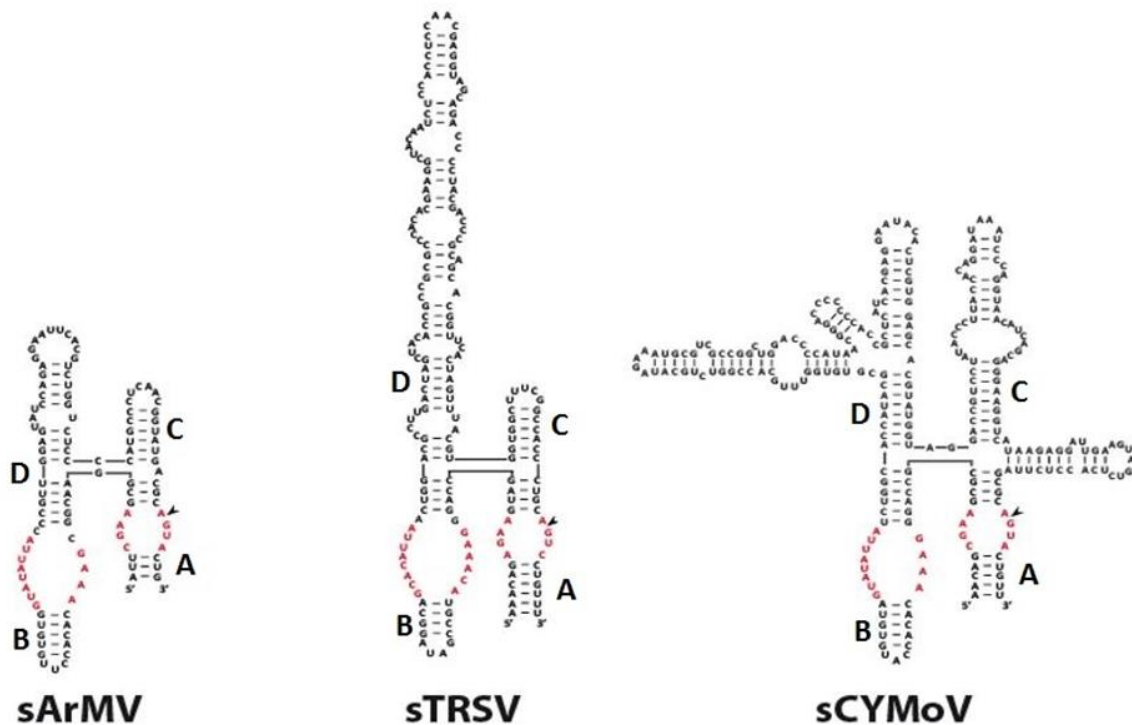


**Figura 2.** (A) Representación esquemática de la estructura secundaria clásica de la ribozima de cabeza de martillo HHr. Las hélices I, II y III rodean a un centro catalítico de 15 nucleótidos, de los que 13 están altamente conservados (en cajas negras) (B) Representación esquemática

de la estructura secundaria y terciaria de los tres tipos de ribozimas HPr descritos en la naturaleza. Las interacciones secundarias y las terciarias habituales entre bucles de hélices I y II están señalados con líneas punteadas (apareamientos no Watson-Crick) o líneas sólidas (apareamientos Watson-Crick). Modificado de De la Peña *et al.*, 2017.

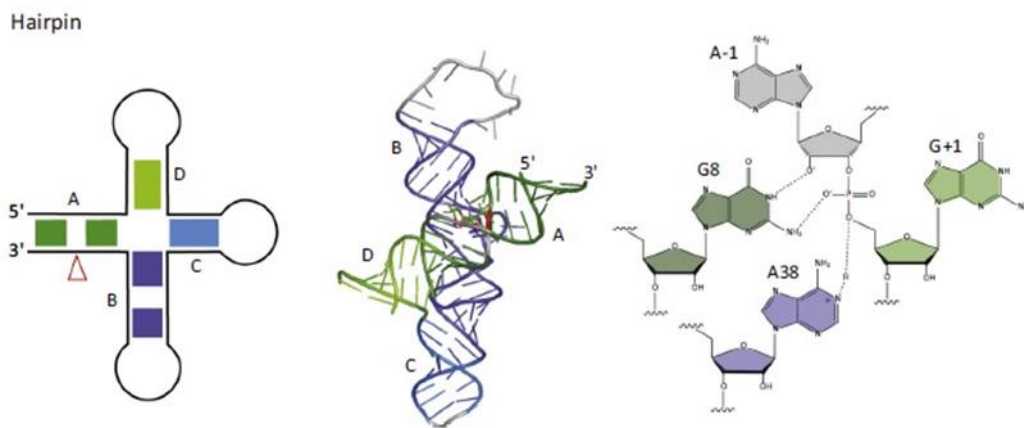
### 1.2.2 FAMILIA DE RIBOZIMAS HAIRPIN.

El motivo catalítico tipo Hairpin (HPr) fue descubierto en la polaridad negativa del RNA satélite viroidal del virus de RNA “Tobacco ringspot” (sTRSV) (Feldstein *et al.*, 1989), (Hampel y Tritz, 1989), donde esta ribozima participaba en reacciones de escisión y ligación en el proceso de replicación del mismo. Hasta la fecha, además de encontrarse en el sTRSV, se han descrito otros dos ejemplos de ribozimas HPr en otros tantos satélites de RNA viroidales de virus como el “Chicory yellow mottle” (sChYMV) y el “Arabis mosaic” (sARmV) (Rubino *et al.*, 1990), (Kaper *et al.*, 1988). Es de destacar que junto a la HPr de estos satélites siempre aparece asociada una HHR en el RNA de la cadena opuesta que se encargaría del procesado de los RNAs multiméricos de la polaridad positiva en el proceso de replicación por círculo rodante simétrico. Aunque ambas ribozimas HPr y HHR participan en procesos de escisión-ligación, la HPr es tanto *in vivo* como *in vitro* una mejor ligasa que nucleasa mientras que la ribozima HHR favorece la escisión sobre la ligación de productos (Fedor, 2000).



**Figura 3.** Representación de la estructura secundaria de las HPr conocidas. De izquierda a derecha, “satellite RNA of arabis mosaic virus” (sARmV), “satellite RNA of tobacco ringspot virus” (sTRSV) y “satellite RNA of chicory yellow mottle virus” (sChYMV). Los brazos de las ribozimas se encuentran numerados (A-D). En rojo se han marcado los nucleótidos necesarios para la actividad catalítica y la flecha indica el fosfodiéster que se escinde en la reacción de autocorte.

La HPr se organiza alrededor de una unión de 4 hélices, cuyos brazos están nombrados de forma secuencial en el sentido de las agujas del reloj: A, B, C y D (Figura 3). En los brazos A y B se encuentran los bucles que contienen todos los nucleótidos conservados esenciales para la actividad catalítica (Jiménez *et al.*, 2015), encontrándose además en el brazo A el sitio de rotura y unión de la ribozima. Las hélices C y D aportan estabilidad y forman parte estructural del conjunto. Esta idea se ha confirmado al cristalografiar la HPr en dos estados distintos, con y sin las hélices C y D (Figura 4). (Grum-Tokars, *et al.*, 2003), (Rupert y Ferré-D'Amare 2001). A pesar de que la forma mínima sin las hélices C y D es activa, su plegamiento parece requerir dos o tres órdenes de magnitud superiores de  $Mg^{2+}$  respecto a la forma completa de la HPr, encontrándose el equilibrio interno entre la escisión y la ligación desplazándolo hacia la ligación (Fedor, 1999).



**Figura 4.** La imagen izquierda representa de forma esquemática la estructura canónica de las HPr. El triángulo rojo indica el lugar de escisión, mientras que las bandas de colores marcan cada hélice. Representación de la HPr mínima cristalizada en la imagen central, los colores indican regiones equivalentes a las marcadas por colores en la imagen de la izquierda, En rojo se indica la región de la escisión. En la derecha se observa un modelo del sitio de autocorte de la HPr donde se resaltan las interacciones de los nucleótidos clave en la reacción. Modificado de Jiménez *et al.*, 2015.

El primer nucleótido funcional identificado en la HPr fue el G8 (Figura 4) localizada en el bucle interno de la hélice A, justo en la hebra contraria a donde se encuentra el fosfato escindible. Fue identificada debido a que su sustitución por otros nucleótidos conllevaba una pérdida de eficacia en el autocorte de una o dos magnitudes tanto en la forma completa (Wilson *et al.*, 2001) como en la mínima (solo presentes los brazos A y B) (Pinard *et al.*, 2001) Además, la escisión de la base nitrogenada en G8 reducía de forma sustancial la actividad de la Hairpin (Kuzmin *et al.*, 2004). Una estructura cristalina de la ribozima en la que se reemplaza el fosfato escindible por vanadato para revelar el estado de transición muestra una proximidad cercana entre G8 y el centro catalítico y, por lo tanto, susceptible de participar en la catálisis (Rupert *et al.*, 2002). La estructura cristalina también reveló la presencia de una segunda base funcional posicionada junto al fosfato escindible, la nucleobase A38 perteneciente al bucle

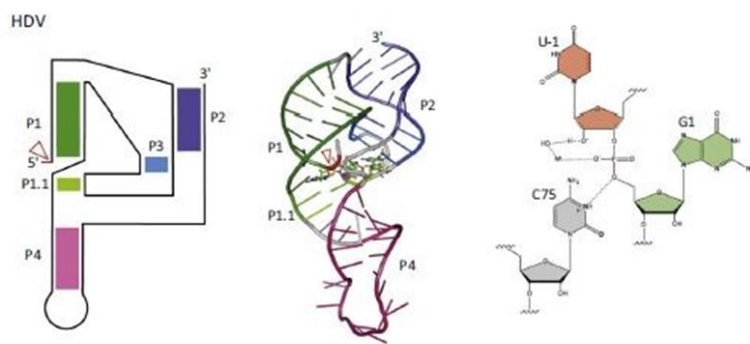
interno de la hélice B. Esta nucleobase forma puentes de hidrógeno entre el 5'-O y OH. La eliminación de esta nucleobase conlleva una pérdida importante de la actividad (Kuzmin *et al.*, 2005).

A diferencia de lo visto para la HPr característica de viroides y RNAs satélite viroidales de plantas (ver más arriba) o para otras ribozimas como la del agente Delta de la Hepatitis y la Twister (ver más abajo) que también se encuentran ampliamente distribuida en genomas de diversos organismos, la HPr parece ser una ribozima exclusiva de satélites virales, ya que únicamente se ha descrito en las cadenas de polaridad negativa de tres RNAs satélites de nepovirus y no hay hasta la fecha ningún ejemplo descrito en genomas, desconociéndose completamente su posible origen.

### 1.2.3 FAMILIA DE RIBOZIMAS DEL AGENTE DELTA DE LA HEPATITIS HUMANA.

El agente delta de la Hepatitis (HDV) es un RNA satélite del virus B de la hepatitis humana (HBV). En pacientes infectados con HBV, la coinfección de HDV aumenta la gravedad de la enfermedad (Lazinski *et al.*, 1995). La cubierta del HDV está compuesta por las proteínas de superficie del HBV, dentro de la partícula viral se encuentra una copia del genoma del HDV y la única proteína que codifica: el antígeno delta. Esta proteína facilita la replicación del genoma del HDV (Chao *et al.*, 1990). El genoma del HDV consiste en un RNA monocatenario circular de unos 1700 nucleótidos. A pesar de ser un patógeno humano, el HDV comparte características con los viroides y satélites virales de plantas, como es su genoma de RNA circular, su pequeño tamaño y la presencia de secuencias de autocorte en el genoma y en el antigenoma (Been y Wickham 1997). Estas ribozimas de HDV asisten en el procesado de las copias multiméricas del genoma viral producto de la replicación por mecanismo de círculo rodante.

En 2006, el grupo de Szostak descubrió experimentalmente la presencia de una ribozima tipo HDV conservada en el intrón del gen CPEB3 de mamíferos (Salehi-Ashtiani *et al.*, 2006) y con función aún desconocida. Existe evidencia sin embargo, de que un SNP localizado en esta región de la proteína en humanos puede mostrar diferencias fenotípicas en el control de la memoria a corto plazo (Vogler, *et al.*, 2009). Más recientemente, a partir de análisis bioinformáticos, se descubrió una gama de ribozimas muy similares a la HDVr en multitud de genomas a lo largo del árbol de la vida (Webb *et al.*, 2009). Las HDVrs genómicas se han encontrado a menudo presentes en las regiones 5' UTR de retrotransposones tipo LINE, sugiriendo un posible rol de las mismas en el procesamiento de estos retrotransposones (Eickbush y Eickbush, 2010). Estudios del procesado de este extremo 5' sugieren un modelo en el cual las ribozimas tipo HDV actúan en distintos niveles durante la retrotransposición (Ruminski *et al.*, 2011) procesando el extremo 5' del transposón de RNA a partir del transcrito parental o actuando como promotores de la traducción del ORF del retroelemento y facilitando la inserción del retrotransposón en un nuevo locus genómico (Bibillo *et al.*, 2004).

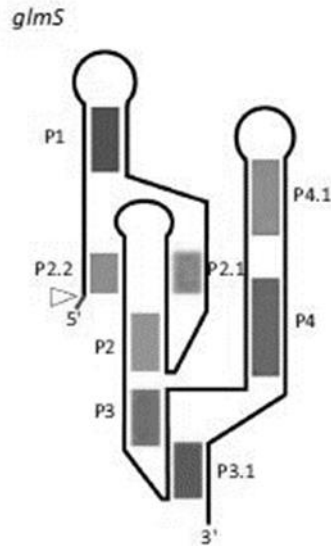


**Figura 5.** La imagen izquierda representa de forma esquemática la estructura canónica de las ribozimas tipo HDV. El triángulo rojo indica el lugar de escisión, mientras que las bandas de colores marcan cada hélice. Representación de la ribozima HDV mínima cristalizada en la imagen central, los colores indican regiones equivalentes a las marcadas por colores en la imagen de la izquierda, En rojo se indica la región de la escisión. En la derecha se observa un modelo del sitio de autocorte de la ribozima HDV donde se resaltan las interacciones de los nucleótidos clave en la reacción. Modificado de Jiménez *et al.*, 2015.

La estructura secundaria de la ribozima tipo HDV comprende 5 regiones tipo hélice (P1.1, P1, P2, P3, y P4). El mecanismo de catálisis propuesto sugiere que las ribozimas tipo HDV utilizan dos estrategias distintas, dependiendo de si hay presencia o no de iones de metal divalentes. En el caso de que los haya estas ribozimas se comportan como metaloenzimas y se produce una catálisis ácido-base. En ausencia de cationes divalentes un cambio en el pKa de la nucleobase C75 puede ser suficiente para estabilizar el nucleófilo cargado negativamente y poderse dar esa catálisis ácido-base sin mediación de un metal divalente. Este mecanismo es único entre las ribozimas, ya que el resto muestra solo el uso de nucleótidos para la catálisis.

#### 1.2.4 RESTANTES FAMILIAS DE PEQUEÑAS RIBOZIMAS DE AUTOCORTE: VS, GLMS, TWISTER, TWISTER SISTER, HATCHET Y PISTOL.

La ribozima del satélite Varkud de *Neurospora* (VS) está implicada en la replicación de un satélite de RNA monocatenario encontrado en algunas cepas de *Neurospora* (Collins, 2002). Estructuralmente, la ribozima se compone de siete hélices distintas tres de las cuales forman una base de la que emerge otra hélice aislada y una agrupación de las tres hélices restantes en forma de "T". Originalmente, se consiguió determinar el lugar donde se encuentra el sitio activo de la misma, una región de la hélice I (Rastogi *et al.*, 1996) y a pesar de que no existe una fuerte evidencia, ciertos trabajos apuntan hacia un mecanismo catalítico similar al descrito para la enzima Hairpin (Wilson *et al.*, 2010). Más recientemente, se ha logrado cristalizar esta ribozima encontrándose que sigue un mecanismo de autocorte dimérico (Suslov *et al.*, 2015)



**Figura 6.** Representación esquemática de la ribozima glmS. Las hélices se muestran numeradas P1-P4, la cabeza de flecha marca el punto de escisión de la ribozima. Modificado de Jiménez *et al.*, 2015.

Las ribozimas tipo glmS (Glucosamine-6-Phosphate Synthase) se descubrieron en el gen bacteriano de la transaminasa que le da nombre (Winkler *et al.*, 2004). Esta ribozima presenta una característica especial, necesita un cofactor, la glucosamina-6-fosfato, para que se produzca la catálisis de la ribozima, por lo cual esta ribozima es considerada un ribointerruptor o “riboswitch” (Winkler *et al.*, 2004). De forma similar a lo descrito para otros riboswitches, el glmS regula la expresión del gen mediante un feedback negativo donde la escisión del mRNA resulta en la degradación del mismo y en una reducción en la síntesis de la enzima. La necesidad de este cofactor se vio confirmada en los estudios de cristalografía realizados con la enzima donde se puede apreciar el sitio de unión del cofactor. Estructuralmente la glmS es un conglomerado de hélices donde P2 y P3 se encuentran en el interior de la estructura formada por los tallos P1 P2.1 y P2.2, dejando P4 en un lateral (Klein y Ferré-D’Amare, 2006) (Figura 6).

En 2014, una nueva familia de ribozimas denominadas twister fueron descubiertas en un análisis bioinformático masivo de secuencias de bacterias y eucariotas. Casi 2700 ribozimas tipo twister fueron identificadas, todas ellas con una estructura secundaria bien definida, consistente en tres tallos denominados P1 P2 y P4 unidos por bucles internos L1, L2 y L4 (Roth *et al.*, 2014). Esta estructura es muy flexible y se le pueden añadir distintos tallos y bucles de forma artificial y seguir siendo activa. Mediante experimentos bioquímicos y cristalográficos se detectaron 10 nucleótidos esenciales para su funcionamiento en el sitio activo, el cual se encuentra en una acanaladura de la hélice P2, la estructura cristalina también indica que la ribozima twister utiliza una estrategia similar a otras pequeñas ribozimas utilizando un estado de transición para estabilizar el paso de la forma activa a la inactiva (Liu *et al.*, 2014).

Mediante análisis bioinformáticos masivos de comparación genómica, el grupo de Ronald Breaker ha identificado recientemente 15 nuevos motivos de RNA conservados, de los cuales 12 no parecieron presentar actividad catalítica de autocorte in vitro. Los tres motivos que si presentaban catálisis fueron llamados Twister sister, por su cierto parecido estructural a la ribozima Twister, así como Pistol y Hatchet. Todas estas nuevas ribozimas presentaban una eficiente reacción de transesterificación entre el grupo 5'-OH y el fosfato cíclico 2' 3' en el lugar de escisión. (Weinberg, *et al.*, 2015).

### 1.3 LAS RIBOZIMAS SE ENCUENTRAN REPRESENTADAS EN TODOS LOS DOMINIOS DE LA VIDA

Como hemos visto, las ribozimas tipo HP y HH fueron originalmente descubiertas en RNAs satélite de "Tobacco ringspot virus" (sTRSV) (Prody *et al.*, 1986) y, posteriormente, en otros viroides y satélites viroidales de plantas. La ribozima HDV fue descubierta en las polaridades positiva y negativa de un satélite del virus de la hepatitis B humana, mientras que la ribozima VS únicamente se ha encontrado en ciertas cepas de *Neurospora* (Collins, 2002). En todos estos casos, las ribozimas se encontraban limitadas a un rol específico en la replicación de RNAs monocatenarios circulares. Sin embargo, mediante aproximaciones bioinformáticas se han detectado en los últimos años ribozimas HHR, HDV o twister en multitud de localizaciones genómicas, con posibles roles en la regulación de la expresión de génica.

Las aproximaciones bioinformáticas se han consolidado como como el método más eficaz para encontrar nuevos representantes de familias de ribozimas e, incluso, nuevas clases de ribozimas. Gracias a este tipo de aproximaciones, se ha descubierto un gran rango de ribozimas tipo HDV tanto en genomas de mamíferos como en genomas de bacterias, hongos, plantas y otros animales como moluscos o insectos. (Riccitellia y Lupták, 2010) además de su presencia original en RNA satélite de HBV. Resultados similares se han descrito para la ribozima HHR, presente en los genomas de bacterias, protistas plantas y metazoos (De la Peña y García-Robles, 2010a) y la twister (Roth *et al.*, 2014). No obstante, tanto para la familia de las ribozimas VS como la familia de las Hairpin esto no parece cumplirse, y solo existe evidencia de su presencia en la replicación de genomas viroidales, aunque quizás su verdadera distribución este aún por descubrir.



## 1. 4 VIROIDES Y OTROS PEQUEÑOS RNAs CIRCULARES INFECCIOSOS

### 1.4.1 VIROIDES

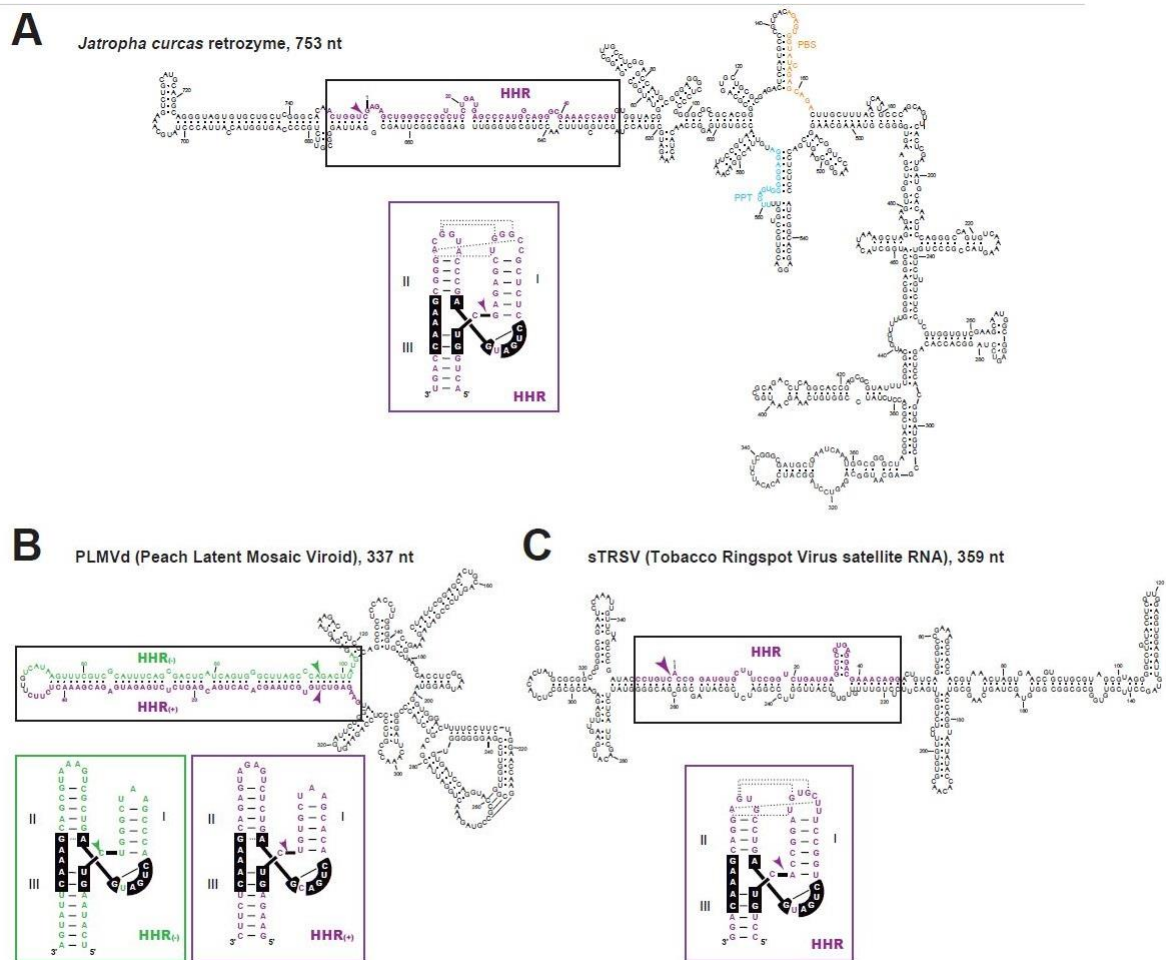
Entre los agentes infecciosos más sencillos que se conocen destaca el grupo formado por los viroides y RNAs satélites de tipo viroidal de virus de plantas (Rao y Kalantidis, 2015). Los viroides son entidades biológicas están constituidas por RNAs no codificantes circulares desnudos de entre 246 a 467 nucleótidos, los cuales infectan y se replican en diversos huéspedes vegetales. Para ello, deben secuestrar enzimas del huésped y/o del virus al que parasitan, ya que a diferencia de los virus, los viroides no codifican ningún tipo de proteína. Los viroides destacan por causar enfermedades asociadas a plantas de importancia económica, de hecho, su identificación en 1971 (Diener, 1971) fue debida a que causaban la enfermedad del tubérculo fusiforme de la patata.

Hasta la fecha se han identificado más de 30 especies de viroides distintas, divididas en dos familias (*Pospiviroidae* y *Avsunviroidae*). (Katsarou *et al.*, 2015). Las dos familias se distinguen en base a sus propiedades estructurales. Los viroides pertenecientes a la familia *Pospiviroidae* tienen como especie modelo el viroide del tubérculo fusiforme de la patata (PSTVd, Potato spindle tuber viroid). Esta familia se caracteriza por la conservación de un motivo de secuencia central conservada denominada CCR (Central Conserved Region) y la carencia de dominios ribozimáticos. La familia *Avsunviroidae* tiene como especie tipo al viroide del manchado solar del aguacate (ASBVd, Avocado sunblotch viroid). Esta segunda familia se caracteriza por poseer dominios ribozimales HHR y carecer de un motivo CCR.

Además de diferencias estructurales, ambas familias poseen diferencias funcionales. Los viroides pertenecientes a la familia *Pospiviroidae* se replican exclusivamente en el núcleo de la célula hospedadora mediante el mecanismo de replicación asimétrico de círculo rodante (Flores *et al.*, 2011). De forma resumida, en la replicación asimétrica por círculo rodante, el RNA circular monomérico del viroide (polaridad positiva) es transcrito a un concatémero de polaridad contraria (polaridad negativa) que se utiliza como molde para la síntesis de RNAs monoméricos de polaridad positiva. Para poder procesar el concatémero en distintos monómeros y ligar estos en moléculas circulares se necesita la participación de proteínas del huésped. (Bojić *et al.*, 2012), (Nohales *et al.*, 2012a). Mientras que los viroides pertenecientes a la familia *Avsunviroidae* se replican en el cloroplasto de su célula hospedadora vía el mecanismo simétrico de círculo rodante procesando los RNAs multiméricos a partir de sus ribozimas HHR (Flores *et al.*, 2000).

### 1.4.2 SATÉLITES VIROIDALES

Los satélites viroidales de RNA (sat-RNAs) comparten similitudes estructurales con los viroides (Rao y Kalantidis, 2015) y las retrozimas recientemente descritas (Cervera *et al.*, 2016), tal y como puede observarse en la figura 7. Estas similitudes comprenden en primer lugar una topología circular y un pequeño tamaño. Por otro lado, y debido a la alta complementariedad de bases, estos RNAs adquieren una elevada estructura secundaria que junto con su naturaleza circular ofrecen alta protección frente a nucleasas (Wang *et al.*, 2004).



**Figura 7.** Comparativa de las similitudes estructurales entre una retrozima (A) un viroide (B) y un satélite de RNA (C).

Como hemos mencionado, los sat-RNA son pequeñas moléculas de RNA no codificante que dependen de la coinfección de la célula huésped por un virus para replicarse (virus helper) ya que los RNAs satélite son incapaces de autoreplicarse y encapsidarse por sí mismos. Es interesante recalcar que los sat-RNAs carecen de similitudes estructurales y de secuencia con sus virus helper y suelen interferir con la replicación de este, por tanto, modifican también los síntomas producidos por el virus helper en el organismo huésped. No obstante, los sat-RNA co-evolucionan con su virus helper, pudiendo cambiar e incluso llegar a desaparecer esta modulación de los síntomas (Wang *et al.*, 2004), (Smith *et al.*, 2011).

Basándose en el tamaño y en otras propiedades, los sat-RNAs se clasifican en tres grupos principales. Grupo 1: consiste en sat-RNAs pequeños (alrededor de 400 nt o menos) y lineares (SL-sat-RNA), el sat-RNA de CMV es el ejemplo clásico de SL-sat-RNA. Grupo 2: largos y lineares (LL-sat-RNA), suelen tener alrededor de 700-1500 nt y codifican al menos una proteína no estructural. Grupo 3: Sat-RNA circulares (CRsat-RNA) estos poseen un tamaño menor a los 400 nt y comparten características con los viroides por

lo que a muchos de estos también se les ha llegado a llamar virusoides (Katsarou *et al.*, 2015). Estos CRsat-RNA se acumulaban en formas multiméricas de polaridades tanto positiva como negativa en el huésped, por lo cual se hipotetizó que también usaban el mecanismo de replicación por círculo rodante para multiplicarse. (Carpenter *et al.*, 1991). Posteriores estudios confirmaron la presencia de HHr en estas moléculas con un papel en la replicación (Bruening *et al.*, 1991). Dentro de este grupo de satélites viroidales se encuentran los satélites de ARmV, de ChYMV y de TRSV, que como hemos visto, aparte de poseer una ribozima tipo HHr también codifican una HPr en la polaridad opuesta.

### 1.5 REPLICACIÓN POR CÍRCULO RODANTE EN SATÉLITES, VIROIDES Y RETROZIMAS

Tanto el subgrupo 3 de satélites viroidales como los viroides pertenecientes a la familia *Avsunviroidae* se caracterizan por usar el mecanismo de replicación por círculo rodante mediante la generación de multímeros de sus propias secuencias que suelen ser procesados a través de ribozimas autocatalíticas tipo HHr o HPr y circularizados. Estudios del procesamiento de los intermediarios multiméricos del RNA que resultan de la acción del mecanismo por círculo rodante revelaron que pueden o no ocurrir en ambas polaridades, resultando en dos variantes del mecanismo de replicación por círculo rodante: variante asimétrica o variante simétrica. En la variante asimétrica se sintetizan oligómeros de polaridad negativa tomando como molde el RNA circular positiva. El oligómero será entonces usado como plantilla para crear un oligómero de polaridad positiva el cual se autoprocresa ribozimáticamente vía la HHr dando monómeros lineales que luego se circularizan y permiten continuar el ciclo replicativo. En la variante simétrica, sin embargo, el oligómero de polaridad negativa creado por el mecanismo si posee ribozimas, bien tipo HHr o bien HPr, que lo procesan en monómeros lineales que se circularizarán y servirán como molde para una segunda replicación por círculo rodante para producir oligómeros de polaridad positiva. Estos oligómeros positivos se autoprocresarán igualmente por sus ribozimas HHr para generar replicones del RNA circular inicial. La Tabla 1 muestra una recopilación de todos ellos. Estos tres satélites con HP en polaridad negativa son los únicos ejemplos de ribozimas tipo HP presentes en la naturaleza.

**Tabla 1.** Recopilación de RNA circulares conteniendo HHRs y HPs.

| circRNAs con HHRs  | Ribozimas           |
|--|---------------------|
| <b>Retrozimas*</b>   |                     |
| <i>Fragaria ananassa</i> retrozimas                            | 1 HHR               |
| <i>Jatropha curcas</i> retrozimas                              | 1 HHR               |
| <i>Eucalyptus camaldulensis</i> retrozimas                     | 1 HHR               |
| <i>Citrus clementina</i> retrozimas                            | 1 HHR               |
| <b>Satélites virales de RNA</b>                                |                     |
| Satélite de <i>Solanum Nodiflorum Mottle Virus</i> (sSNMV)     | 1 HHR               |
| Satélite de <i>Velvet Tobacco Mottle Virus</i> (sVTMoV)        | 1 HHR               |
| Satélite de <i>Subterranean clover mottle virus</i> (sSCMoV)   | 1 HHR               |
| Satélite de <i>Rice Yellow Mottle Virus</i> (sRYMV)            | 1 HHR               |
| Satélite de <i>Lucerne Transient Streak Virus</i> (sLTSV)      | 2 HHRs              |
| Satélite de <i>Cereal Yellow Dwarf Virus</i> (sCYDV-RPV)       | 2 HHRs              |
| <b>Satélite de <i>Tobacco Ringspot Virus</i> (sTRSV)</b>       | <b>1 HHR, 1 HPR</b> |
| <b>Satélite de <i>Arabidopsis Mosaic Virus</i> (sArmV)</b>     | <b>1 HHR, 1 HPR</b> |
| <b>Satélite de <i>Chicory Yellow Mottle Virus</i> (sChYMV)</b> | <b>1 HHR, 1 HPR</b> |
| <b>Viroides</b>  |                     |
| <i>Peach Latent Mosaic Viroid</i> (PLMVd)                      | 2 HHRs              |
| <i>Chrysanthemum Chlorotic Mottle Viroid</i> (CChMVd)          | 2 HHRs              |
| <i>Eggplant Latent Viroid</i> (ELVd)                           | 2 HHRs              |
| <i>Avocado Sunblotch Viroid</i> (ASBVd)                        | 2 HHRs              |
| <b>Otros RNA circuales con HHRs</b>                            |                     |
| <i>Grapevine Hammerhead Viroid-like</i> (GHVd)**               | 2 HHRs              |
| <i>Apple Hammerhead Viroid-like</i> (AHVd)**                   | 2 HHRs              |
| <i>Cherry Small Circular Viroid-like RNA</i> (cscRNA)          | 2 HHRs              |
| <i>Carnation Small Viroid-like RNA/DNA</i> (CarSV RNA/DNA)     | 2 HHRs              |

HHR: ribozima tipo Hammerhead; HPR: ribozima tipo Hairpin.

\* Hasta 25 especies de plantas diferentes se conocen que contengan retrozimas putativas. Solo los cuatro ejemplos donde se ha demostrado experimentalmente la acumulación de circRNAs in vivo se indican (Cervera y De la Peña, 2016).

\*\* Viroides putativos descritos recientemente en trabajos de secuenciación masiva (Wu *et al.*, 2012, Zhang *et al.*, 2014).

---

## 2. Objetivos

---

Las modernas técnicas genómicas y bioquímicas están permitiendo identificar nuevos roles para el RNA que, muchas veces, funciona de forma independiente a las proteínas. Los recientes descubrimientos de nuevas ribozimas y riboswitches indican que estos elementos genómicos son más frecuentes de lo que se pensaba. Por tanto, es interesante identificar y caracterizar más ribozimas candidatos que puedan ampliar la gama de ribozimas conocidas para poder revelar los mecanismos basados en RNA presentes en las células. Sobre este marco general, planteamos una serie de objetivos a realizar en el trabajo:

- Análisis comparativo de las estructuras y secuencias correspondientes a nuevas ribozimas tipo Hairpin detectadas bioinformáticamente en secuencias de arroz (*Oryza sativa*) y morera (*Morus australis*).
- Caracterización genómica de la secuencia asociada a las ribozimas detectadas en el genoma de arroz.
- Clonación y caracterización molecular de las ribozimas encontradas el genoma de arroz.

---

## 3. Material y métodos.

---

### 3.1 EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS DE *ORYZA SATIVA*

Para la extracción de DNAs a partir de hojas de arroz (*Oryza sativa*) se siguió el protocolo cloroformo-CTAB con algunas modificaciones (Dhakshanamoorthy y Selvaraj, 2009). Básicamente, 1g de hojas fueron homogenizadas en 10 mL de tampón de extracción CTAB y 0.7mL 20% SDS con un homogenizador Polytron® e incubadas a 65°C durante 40 minutos. Tras una centrifugación (8000 rpm, 10 minutos) se recogió 10mL de sobrenadante y se le añadió 3mL de KAc a 5M. La nueva mezcla se agitó y se incubó 30 minutos en hielo (invirtiendo la muestra cada 10 minutos). Se recogió 10mL de sobrenadante de la muestra tras una centrifugación (4000 rpm, 10 minutos), a este sobrenadante se le añadió un volumen equivalente de etanol, se agitó durante 1 minuto y se incubó en hielo otros 5. La muestra se volvió a centrifugar (6000 rpm, 10 minutos). Se desechó el sobrenadante y se dejó secar el pellet a 37°C. El pellet fue disuelto en 0.5mL de agua miliQ y se le aplicó un tratamiento con RNAasa A. Tras el tratamiento, se añadió un volumen equivalente de cloroformo-alcohol isoalímico (24:1 v/v) y se centrifugo (4000 rpm, 10 minutos), se recogió la fase superior acuosa y se desechó el resto. A esta fase se le añadió 0.5mL de cloroformo y se mezcló durante 1 minuto. Tras otra centrifugación (4000 rpm, 10 minutos), la fase superior acuosa que conteniente los ácidos nucleicos de arroz fue precipitado en 2.5 volúmenes de etanol y 0.1 volúmenes de acetato de sodio a 3M. Para recoger todo el pellet la muestra se volvió a centrifugar (4000 rpm, 10 minutos) y, tras desechar la fase acuosa y dejar secar el pellet, el DNA fue disuelto en agua. El DNA fue cuantificado con un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

Para las extracciones de RNAs, el método del CTAB-cloroformo también fue usado con algunas modificaciones (Shanga *et al.*, 2010). En este caso, las hojas fueron homogenizadas en un tampón de extracción CTAB con un homogenizador Polytron® e incubadas a 65°C por 30 minutos. Después se mezcló en un volumen equivalente de cloroformo y alcohol isoalímico (24:1 v/v). Tras someter el homogenizado a un centrifugado (8000 rpm, 15 minutos), se recogió el RNA de la fase acuosa y se realizó una purificación con sílica en la que el RNA así recogido se incluía en una solución con el mismo volumen de NaI 6M, 0.5 volúmenes de etanol y 0.175 volúmenes de SiO<sub>2</sub> 100% pH2 como se indica en el protocolo (Boom *et al.*, 1990).

El compuesto acuoso fue incubado 30 minutos a 25°C y lavado cuatro veces con un tampón que contenía 100mM Tris-HCl pH8, 25mM EDTA, 2M cloruro sódico y 2% p/v CTAB. El RNA se precipitó en 2.5 volúmenes de etanol y 0.1 volúmenes de acetato de sodio a 3M, disuelto en Agua MiliQ y cuantificado en un NanoDrop 1000 Espectrofotómetro (thermo Fisher Scientific).

### 3.2 AMPLIFICACIÓN Y CLONACIÓN DE LOS ELEMENTOS Y RIBOZIMAS A ANALIZAR.

Los fragmentos genómicos de interés detectados en el DNA de arroz conteniendo las diversas ribozimas fueron amplificados por PCR. Para ello, 10ng de DNA genómico fueron utilizados como molde para la amplificación usando la enzima polimerasa PrimeSTAR HS (Takara) y los oligos correspondientes según la construcción, previamente fosforilados siguiendo las instrucciones del fabricante. Los diversos productos obtenidos por PCR fueron separados en Geles de poliacrilamida nativos (PAGE) al 5%. Los DNAs fueron extraídos de sus matrices correspondientes mediante homogeneización física y tratamiento con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) (Sambrock y Russell, 2006) y posteriormente, se precipitaron con etanol como se ha descrito anteriormente. Los amplicones purificados se insertaron entre los sitios de restricción XbaI y BamHI del plásmido pBlueScript KS+ y fueron secuenciados (ABI Prism, Perkin-Elmer). Los plásmidos resultantes se utilizaron para el análisis del autocorte de las ribozimas y la síntesis de sondas para la hibridación no radioactiva. Los extractos de DNA se realizaron en geles nativos de poliacrilamida al 5% con TAE 1x, y se cortó una sección de gel del tamaño de la ribozima. El DNA se purificó a partir de cortes de gel mediante extracción con fenol y precipitación con etanol, y se digirió con DPNI.

#### 3.2.1 AMPLIFICACIÓN DEL ELEMENTO COMPLETO DEL GENOMA DE *O. SATIVA*

Para confirmar el tamaño completo del elemento con ribozimas hallado en el genoma de *Oryza sativa*, se realizaron PCRs con oligos que hibridaron parcialmente en los extremos del monómero así como en las secuencias genómicas de *Oryza sativa*. Se esperaban dos posibles tamaños para el elemento encontrado (600pb o 4Kb), por lo que las etapas de extensión de la PCR utilizadas fueron de entre 1 minuto hasta 7. Los productos de PCR fueron comprobados mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8% y tampón TAE 1x.

#### 3.2.2 RT-PCR

Análisis de RT-PCR se llevaron a cabo utilizando RNAs de hoja y flor de dos variedades de *Oryza sativa*, T65 (tipo silvestre) y Slr1 (variedad comercial) extraídas tal y como se describió anteriormente. Dichos RNAs fueron previamente purificados y enriquecidos en los tamaños esperados mediante gel nativo TAE 5%, del que se extrajeron las porciones de gel correspondientes a los tamaños de 400 a 1000nt. Tras la extracción del RNA de las bandas de gel, se trataron con DNAasa. La retrotranscripción del RNA se llevó a cabo con SuperScript II (Invitrogen) y la posterior PCR se llevó a cabo con la polimerasa PrimeStar HS (Takara Inc.), ambas reacciones se realizaron siguiendo las instrucciones de las casas comerciales. Los productos de la PCR fueron separados mediante electroforesis en gel Page nativo 5%.

### 3.3 OBTENCIÓN DE RNAs DE INTERÉS POR TRANSCRIPCIÓN *IN VITRO*

A partir de las construcciones obtenidas, tanto los RNAs completos de Os-466 como las ribozimas mínimas de interés se obtuvieron por transcripción “run-off” de los correspondientes plásmidos pBlueScript linealizados con EcoRI (para transcripciones con polimerasa T7) o XbaI (para transcripciones con polimerasa T3) siguiendo las recomendaciones del fabricante (Takara Inc.). Para la síntesis de ribosondas marcadas con Digoxigenina, estas mismas construcciones se sometieron a idéntico proceso pero reemplazando el nucleótido UTP por digoxigenin-11-UTP (Roche Diagnostics GmbH).

### 3.4 ANÁLISIS DEL AUTOCORTE DE LAS RIBOZIMAS.

Para el análisis de autocorte de las ribozimas, las reacciones de transcripción contenían un tampón de transcripción compuesto por: Tris-HCl 40mM pH8, MgCl<sub>2</sub> 6mM, espermidina 2mM, albúmina de suero bovino 0,5 mg/ml libre de ARNasa, Triton X-100 al 0.1%, ditiotreitól 10mM, 1mM cada uno de UTP, CTP, ATP (o [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] ATP en el caso de transcritos marcados radiactivamente) y GTP, 0.4U/ $\mu$ l de inhibidor de la ribonucleasa hepática porcina (Takara), así como 20ng/ $\mu$ l de DNA plasmídico y 4U/ $\mu$ l de ARN polimerasas de T7 (Takara) o T3 (Roche Diagnostics GmbH). Tras incubación a 37°C durante 1 hora, los productos se fraccionaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) en geles al 5% con urea 8M y se detectaron por tinción con bromuro de etídio. Para el caso de transcripciones en presencia de nucleótidos marcados radiactivamente, estos se detectaron por fotoestimulación del fósforo (FLA-5100 phosphorimager con placas de imagen BAS-MP 2040S, Fujifilm).

### 3.5 CINÉTICAS DE AUTOCORTE DE LAS RIBOZIMAS

Tras el fraccionamiento mediante electroforesis en gel de los transcritos, los fragmentos de un tamaño acorde con la ribozima completa se extrajeron y purificaron a partir de cortes de gel mediante extracción con fenol y precipitación con etanol como se ha descrito anteriormente. Después se sometieron a una desnaturalización a 95°C durante 1 minuto y se dejaron renaturalizar lentamente hasta alcanzar los 25°C. Tras una incubación durante 10 minutos a 25°C, se tomó una alícuota de tiempo 0 y se añadió 1mM Mg<sup>2+</sup> para comenzar la reacción de autocorte. Alícuotas fueron tomadas a intervalos de tiempo determinados. Las reacciones fueron detenidas aplicando un exceso de solución de parada (8M de urea 50% formamida, 50mM EDTA 0.1% cianol de xileno y azul de bromofenol) a 0°C.

### 3.6 ANÁLISIS POR HIBRIDACIÓN *NORTHERN*

Para el análisis de transferencia *Northern*, se examinaron 100 $\mu$ g de RNA purificado de hojas de arroz junto a los correspondientes marcadores en geles de poliacrilamida al 5% desnaturalizante conteniendo urea 8M y TBE 1X (Tris 89mM/ácido bórico 89mM / EDTA 2.5mM, pH8.3). Tras una tinción con bromuro de etídio, los RNAs fueron electrotransferidos a membranas de nylon (Amersham Hybond-N, GE Healthcare) y fijados con un entrecruzador de UV (UVC 500, Hoefer). La prehibridación, hibridación (a 68°C en formamida al 50% durante 16 horas) y lavado (dos veces con 0.1xSSC a 68°C durante 15 minutos) se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (GE Healthcare). Las sondas marcadas con DIG se detectaron con un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (fragmentos Fab anti-digoxigenina AP, dilución 1:104 en solución de bloqueo, Roche Diagnostics GmbH). La quimioluminiscencia producida en presencia del sustrato CDP-Star (dilución 1:200 en Tris-Cl 0.1M, cloruro sódico 0.1M, pH9.5, Roche Diagnostics GmbH). El resultado se visualizó finalmente en un sistema de imágenes LAS-3000 (Fujifilm)



### 3. 7 CINÉTICA DE AUTOCORTE DE LAS RIBOZIMAS DURANTE LA TRANSCRIPCIÓN *IN VITRO*

Para medir la tasa de autocorte de las ribozimas mínimas durante la transcripción, usamos el tampón de reacción para la transcripción con marcaje radiactivo descrito más arriba con algunas modificaciones. Se usaron distintas concentraciones de pH y  $MgCl_2$  como se ha visto anteriormente (Ambrós y Flores, 1998). Las reacciones fueron llevadas a cabo a  $37^\circ C$  durante una hora durante la cual alícuotas de la mezcla de reacción fueron extraídas en intervalos determinados y a estas alícuotas se les detuvo la reacción de forma inmediata aplicando un exceso de solución de parada (8M de urea 50% formamida, 50mM EDTA 0.1% cianol de xileno y azul de bromofenol) a  $0^\circ C$ . Mediante electroforesis en gel desnaturante page 10x el contenido en ácidos nucleicos de las alícuotas fue separado para poder ser analizados cuantitativamente. Para el análisis las bandas de ácidos nucleicos fueron detectadas por fotoestimulación del fosforo (FLA-5100 phosphorimager con placas de imagen BAS-MP 2040S, Fujifilm) (Long y Uhlenbeck, 1994). Se realizó un análisis de imagen mediante el software FUJIFILM Science Lab Image Gauge Ver. 4.0. Los datos así obtenidos fueron sujetos a una ecuación derivada del método de mínimos cuadrados diseñado por Zimmermann:  $F = F_{\infty}(1 - e^{-kt})$  (Stage-Zimmermann y Uhlenbeck, 1998), donde F es la fracción del producto a tiempos distintos,  $F_{\infty}$  es la fracción del producto en el tiempo final de la reacción y K es la constante de primer orden del autocorte (Kcat).

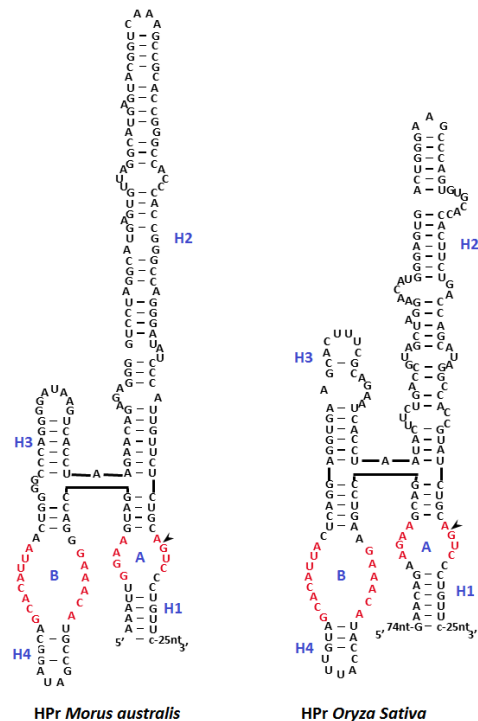
---

## 4. Resultados

---

### 4. 1 BÚSQUEDA BIOINFORMÁTICA DE NUEVOS MOTIVOS HAIRPIN

El objetivo del presente TFM consistió en la caracterización molecular de nuevos ribozimas genómicos de tipo hairpin, para lo que primero fue necesario realizar una búsqueda bioinformática de los mismos. Los detalles de dicho análisis bioinformático previo se describirán con detalle en otra publicación (De la Peña, 2017). Básicamente, se utilizó software de búsqueda de motivos de RNA por estructura secundaria como son RNAmotif (Macke *et al.*, 2001) e InfeRNAI (Nawrocki y Eddy, 2013) y utilizando como semillas de búsqueda las tres únicas secuencias conocidas de la ribozima hairpin encontradas en los correspondientes satélite vitales (ver introducción). Estas búsquedas se realizaron en bases de datos de secuencias de organismos vegetales, hallándose únicamente dos nuevos casos mostrando claras similitudes con las HPrs previamente descritas en la literatura (Figura 3). Como se describe más adelante, ambos ejemplos colocalizaron en la cadena opuesta de sendas secuencias conteniendo HHrs previamente descritas (De la Peña y Garcia-Robles, 2010). Las ribozimas reveladas se muestran en la figura 8.

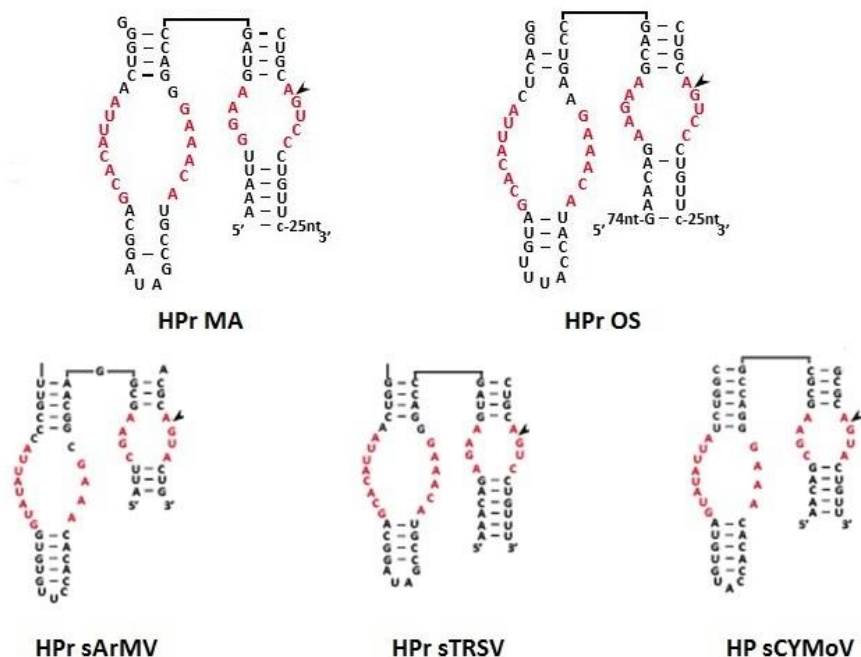


**Figura 8.** Vista de la secuencia primaria y de la estructura secundaria de las HPr nóveles. Se encuentran marcados tanto las hélices de las ribozimas (H1-H4) como los bucles (A, B). La región catalítica se ha señalado en rojo. Una flecha indica el punto de escisión de la molécula.

## 4. 2 DESCRIPCIÓN ESTRUCTURAL DE LAS DOS NUEVAS RIBOZIMAS HPR ENCONTRADAS Y LAS HHRS ASOCIADAS.

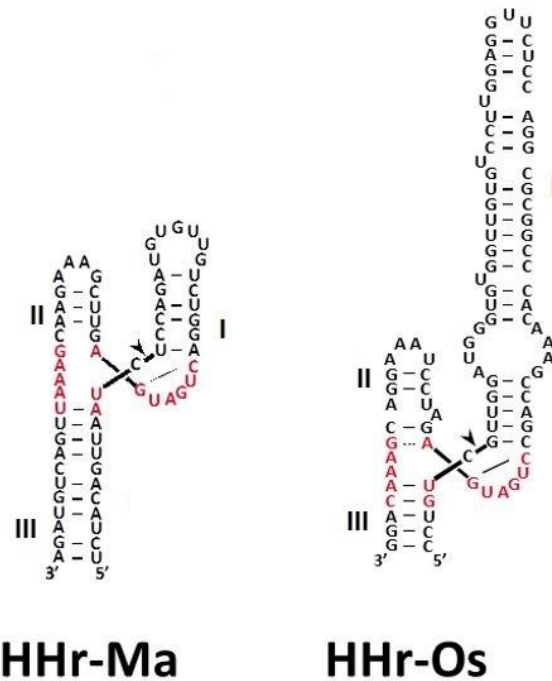
Las dos nuevas HPr detectadas resultaron muy similares a las previamente descritas. La primera HPr que encontramos, de aquí en adelante HPr-Ma, fue hallada en una secuencia de un RNA circular descrito en el árbol de morera *Morus australis*, (Wang *et al.*, 2010) mientras que la segunda HPr, que denominamos HPr-Os, se halló en el genoma de arroz *Oryza sativa*, tanto en su variedad *indica* como *sativa* (Goff *et al.*, 2002). Estructuralmente las HPr contienen ciertos elementos característicos en todas ellas que las definen: cuatro hélices (H1-H4) con apareamientos de bases a lo largo de su extensión más dos bucles con sus bases desapareadas denominados bucles A y B. El fosfodiéster reactivo se encuentra en el bucle A (indicado con una flecha) (Hampei *et al.*, 1990). Tanto HPr-Ma como HPr-Os cumplen esta organización estructural con pequeñas diferencias; la hélice 2 de HPr-Ma es más larga y presenta un apareado de bases más consistente mientras que la hélice 2 de HPr-Os es más corta y contiene más bucles pequeños de nucleótidos desapareados. La hélice 3 de HPr-Ma sin embargo, es mucho más corta que la de HPr-Os, la cual contiene un único bucle de nucleótidos desapareados. Tanto la hélice 4 como los bucles A y B son similares en ambas HPr. En estos bucles se encuentran los nucleótidos clave para la reacción de catálisis que están conservados tanto en estas dos nuevas HPrs como en las anteriormente descritas. Estos nucleótidos se encuentran resaltados en rojo (Figura 8). Mientras que el resto de nucleótidos forman parte de la estructura secundaria y podrían intercambiarse entre sí siempre que se mantenga el suficiente grado de apareamiento entre ellos como para que las hélices se formen. A pesar de la similitud entre ambos bucles, podemos resaltar el intercambio entre las purinas en el bucle A y la inserción de una Adenina en la base de este mismo bucle.

Centrándonos en las horquillas consideradas catalíticas (H1 y H4), si comparamos las dos nuevas HPr con las otras tres ya conocidas, observamos interesantes diferencias entre los nucleótidos catalíticos de los bucles A y B. El bucle A de la HPr-Os y la HPr descrita en el sTRSV es idéntico, difiriendo ambos en el bucle A de HPr-Ma en la posición mencionada más arriba. En cuanto al bucle B, es idéntico tanto en nuestras HPr-Ma y -Os como en HPr sTRSV mientras que es diferente al de las HPr de sChYMV y sARmV, el cual es igual en ambas ribozimas. El bucle B de sChYMV y sARmV presenta dos sustituciones nucleosídicas de Citidina por Uridina así como la carencia de dos nucleósidos catalíticos (Citidina y Adenosina) en la base del bucle (Figura 9).



**Figura 9.** Comparativa de las HPr nóveles con aquellas disponibles en la literatura. Arriba izquierda HPr *Morus australis*, Arriba derecha HPr *Oryza sativa*, debajo izquierda HPr de satellite RNA of arabis mosaic virus” (sArMV), debajo centro HPr de “satellite RNA of tobacco ringspot virus” (sTRSV) y debajo derecha “satellite RNA of chicory yellow mottle virus” (sChYMV). La región catalítica se ha señalado en rojo. Una flecha indica el punto de escisión de la molécula.

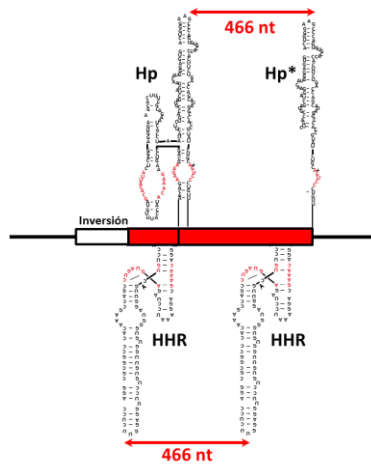
Las ribozimas tipo HHr analizadas en este trabajo, a pesar de haber sido ya presentadas previamente (Hamman *et al.*, 2012) presentan particularidades estructurales que merece la pena resaltar. Como ya se ha mencionado previamente en el trabajo, el motivo mínimo de las HHr consiste en núcleo de nucleótidos catalíticos conservados flaqueado por tres hélices (I, II y III) que son esenciales para la catálisis. (De la Peña *et al.* 2003). Como se puede observar en la figura 10, ambas HHr son bastante dispares, mientras que la HHr-Ma es más canónica y se asemeja a las HHr descritas en previos trabajos (Uhlenbeck, 1987), (Hamman y Lilley 2002). HHr-Os, por el contrario, presenta ciertas particularidades. Su hélice I es anormalmente larga, aunque presenta el bucle final característico de esta hélice a una altura similar al bucle canónico (como el de la HHr-Ma), este se abre y la hélice continúa extendiéndose, presentando además tres inserciones de Uridinas a lo largo de la misma. También presenta una pequeña mutación en la hélice II, una Adenosina cerca del núcleo catalítico que debilita esta hélice.



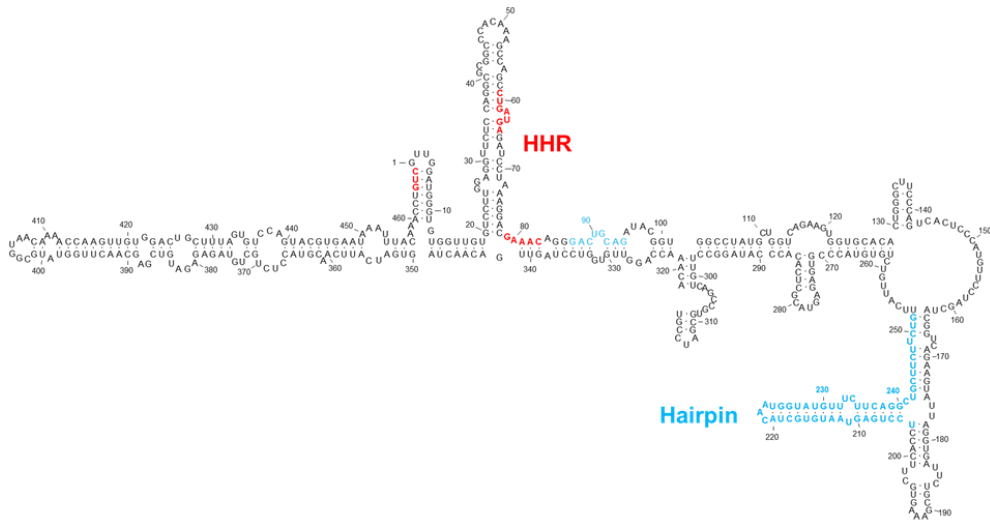
**Figura 10.** Estructura primaria y secundaria de las ribozimas tipo HHr reveladas en los análisis bioinformáticos. Las hélices están numeradas I, II y III. La región catalítica se ha señalado en rojo. Una flecha indica el punto de escisión de la molécula.

#### 4.3 LOCALIZACIÓN GENÓMICA DE LAS RIBOZIMAS DE ARROZ.

El análisis bioinformático de la ribozima HPr-Os encontrada en *Oryza sativa* reveló que esta se hallaba ubicada en el cromosoma 8. Asociada a dicho ribozima, pudimos definir una región parcialmente repetida de 651 pares de bases, comprendida entre las posiciones 4.257.979 a 4.257.329 del cromosoma. Esta región se pudo definir como un dímero parcial, formado principalmente por un elemento monomérico completo de 466 pb comprendido entre dos HHr idénticas en la polaridad contraria a la HPr-Os (anexo I). El monómero se inicia en la posición 4.257.995 del cromosoma y dentro del mismo se halla la HPr-Os. En la región 3' fuera del monómero, en la misma polaridad que la HPr-Os, una segunda copia truncada de este mismo ribozima HP puede reconocerse. Tanto el monómero, la HPr truncada aguas abajo del mismo y un fragmento repetido del monómero de 16pb aguas arriba, definen el dímero parcial detectado. Cabe resaltar la presencia aguas arriba del extremo 5' del dímero parcial, de una repetición parcial invertida del monómero de 95pb (Figura 11). Todos estos datos nos sugieren que este elemento parcialmente dimérico formó parte de un satélite viroidal que ha sido integrado parcialmente en el genoma de *Oryza sativa* (Figura 12).



**Figura 11.** Esquema del dímero parcial encontrado en el cromosoma 8 del genoma de *Oryza sativa*, resaltado en un rectángulo rojo. El rectángulo blanco representa una inversión nucleotídica situada en el extremo 5' del dímero parcial. El esquema muestra como las HHR están situadas en una polaridad y estas delimitan una región de 466 pb que hemos definido como monómero. En la polaridad opuesta se muestra tanto la HPr completa como la troncada, nótese como la distancia entre ambas es también una región de 466 pb.



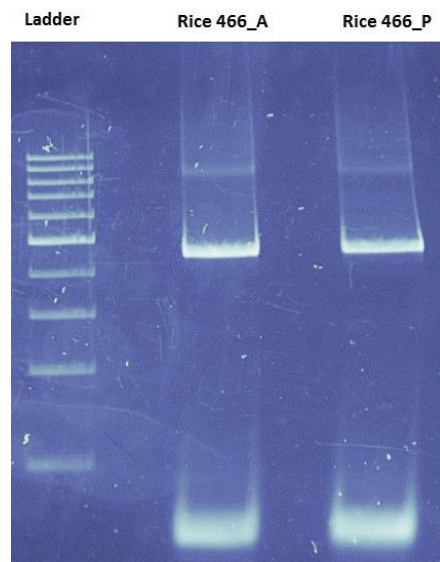
**Figura 12.** Propuesta de la estructura secundaria de mínima energía libre para una polaridad que adoptaría nuestro hipotético satélite viroidal de 466 pb integrado en el genoma de *Oryza sativa*. En rojo se han marcado los nucleótidos pertenecientes a la HHR y en azul a la HPr.

Un análisis bioinformático de las regiones flanqueantes al elemento, que denominaremos elemento Os-466, en arroz nos permitió encontrar que a poco más de 1 kb del mismo (posición 4.256.107 del cromosoma 8) se encuentra integrada una secuencia parcial de ~5 kb correspondiente al pararetrovirus “Rice Tungro Bacilliform” (ERTBV2) (GenBank: AB124592.1) (Kunii *et al.*, 2004).

#### 4.4 CLONACIÓN DEL ELEMENTO Os-466 GENÓMICO Y LAS RIBOZIMAS HP Y HHR GENÓMICAS DE ARROZ.

Para realizar un análisis bioquímico de las ribozimas de *Oryza sativa* detectadas “in silico”, sintetizamos una construcción que contiene dichas ribozimas encontradas en el genoma de *Oryza sativa*. Para realizar construcción del monómero entero, situaremos una pareja de oligos (anexo I) de forma que el fragmento a ampliar contenga una de las dos HHr-Os y la HPr-Os. En cada extremo del fragmento situaremos un promotor distinto de la transcripción. Uno en la polaridad positiva, donde se encuentra la HHr-Os y el otro en la polaridad negativa, donde se encuentra la HPr. Dependiendo de que promotor utilicemos para la transcripción generaremos una secuencia de RNA u otra a las llamaremos HHr466 y HPr466 respectivamente. Además sintetizaremos dos construcciones adicionales cada una con la secuencia ribozímica mínima, tanto para la HPr como para la HHr.

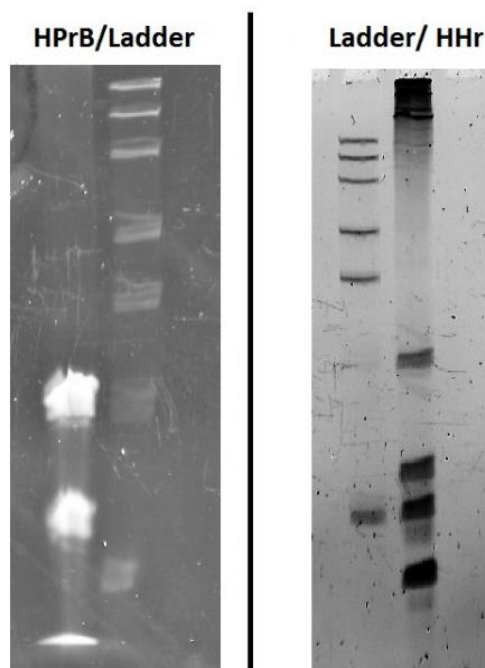
Para sintetizar la construcción monoméricas, amplificamos por PCR DNA de *Oryza sativa* de dos variedades distintas, Puntal y Argila, con dos oligos que definen una región de 466pb desde el nucleótido 149 del fragmento definido más arriba hasta el nucleótido 606 del mismo (Figura 13).



**Figura 13.** Amplificación por PCR de nuestra construcción monomérica. Como molde se usó DNA de *Oryza sativa* de dos variedades distintas, Argila (Rice 466\_A) y Puntal (Rice 466\_P).

Los oligos conteniendo los sitios de restricción BamHI y XbaI permitieron clonar estos fragmento Rice 466\_A y Rice 466\_P en un plásmido pBlueScript que permitirá posteriormente la transcripción del mismo en la polaridad positiva y negativa gracias a los promotores de las RNA polimerasas T3 y T7 respectivamente.

Se utilizó el mismo material para la síntesis de las construcciones de ribozimas mínimas, DNA de *Oryza sativa*. Definimos como HHr mínima a los 96 nucleótidos de la polaridad positiva que se encuentran entre el 473 pb del dímero parcial definido previamente hasta la posición 569 pb del mismo. Definimos como HPr mínima a los 154 nucleótidos de la polaridad negativa comprendidos entre el nucleótido número 272 del dímero parcial hasta el 118. Una segunda construcción de la HPr mínima fue necesaria para la realización de los experimentos, para ello utilizamos como DNA molde el vector pBS que contenía nuestra HPr. Esta nueva HPr mínima B tiene 275 pb de tamaño. Los oligos utilizados se encuentran en el anexo I.



**Figura 14.** Amplificación por PCR de ambas construcciones de ribozimas mínimas usando como molde DNA de *Oryza sativa*.

#### 4.4.1 AMPLIFICACIÓN GENÓMICA DEL MULTÍMERO COMPLETO Os-466

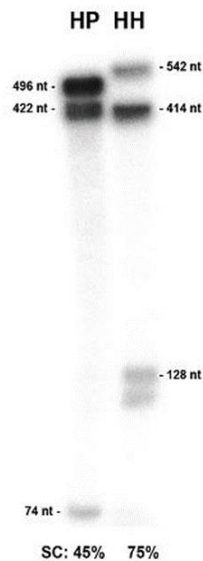
A pesar de que en el genoma de *Oryza sativa* de referencia nuestro monómero aparece como dímero parcial de un tamaño de 651 pb, existe una accesión de *Oryza sativa* (JSUF01012100.1) donde este mismo elemento aparece como 7 copias completas del monómero Os-466 para un tamaño completo de 3,747 pb (Anexo II). Ambas posibilidades serían consistentes con la hipótesis de Os-466 provendría de la inserción por retrotranscripción de un RNA circular, muy probablemente un satélite viroidal, que habría dado lugar a un cDNA multimérico dependiendo del número de vueltas realizado por la enzima retrotranscriptasa. Para confirmar cuál de los dos tamaños genómicos de este elemento depositados en las bases de datos es el real, diseñamos unos oligos que comprendieron parte de la secuencia genómica



de *Oryza sativa* que flanquea el elemento de interés y parte de la secuencia del mismo (anexo II). Usando estos oligos, se intentó amplificar esta región, esperando encontrar un amplicón de un tamaño aproximado, bien de 700 pb o bien de 4000 pb. A pesar de los sucesivos intentos de lograr alguna amplificación a partir de diversos DNAs genómicos de arroz, no logramos obtener en ningún momento amplificado de tamaño alguno (Datos no mostrados).

#### 4.5 ANÁLISIS AUTOCORTE RIBOZIMAS DURANTE LA TRANSCRIPCIÓN DE Os-466

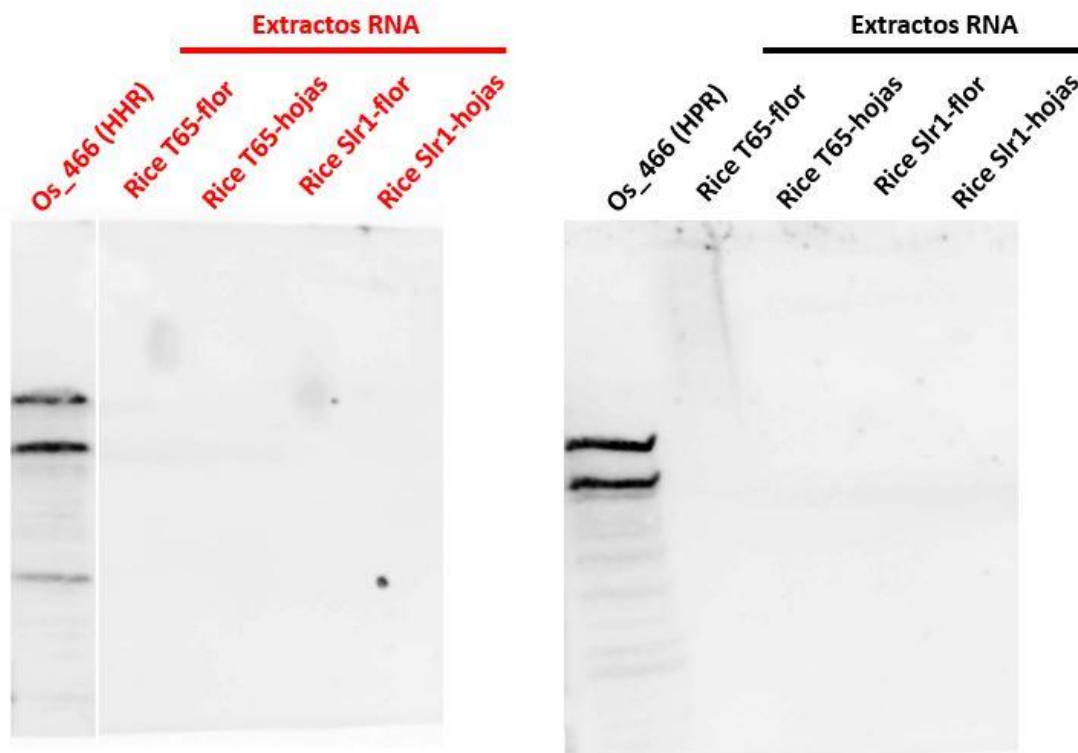
Para comprobar el comportamiento bioquímico de estas nuevas ribozimas en su entorno estructural nativo, realizamos el análisis cinético de ambas ribozimas cuando estas se transcriben junto con el resto del monómero. Para ello, usamos la construcción de Os-466, transcribiendo ambas ribozimas en unas condiciones idénticas (Tris-HCl pH8 40mM y MgCl<sub>2</sub> 8mM resto de componentes como se describe en materiales y métodos). Tras la transcripción, separamos los ácidos nucleicos mediante electroforesis y analizamos el resultado (Figura 15). Se observa que ambas ribozimas presentan autocorte, pero la HHr es más eficiente que la HP en las mismas condiciones. Tampoco se observan diferencias entre las variedades Puntal y Argila.



**Figura 15.** Análisis del autocorte de las ribozimas HPr y HHr. Se encuentra marcado el peso de cada banda generada tras el autocorte. Las bandas 496 nt y 542 nt corresponden, respectivamente, al monómero transcrito por la polaridad negativa y al monómero transcrito por la polaridad positiva que no se ha autocortado. Mientras que el resto de bandas corresponden a ambos fragmentos del monómero generados tras la escisión de cada ribozima. SC “self-cleavage”: indica una estimación del porcentaje de ribozima que se ha autocortado.

#### 4.6 ANÁLISIS DE RNAs DE ARROZ POR HIBRIDACIÓN NORTHERN

Recientemente descritos, los retrozimas son una nueva familia de retrotransposones no autónomos que presentan HHr en ambos extremos del retrotransposón al que pertenecen (Cervera *et al.*, 2016). Los autores describieron como estos nuevos retrozimas eran transcritos activamente y se encontraban presentes tanto en su forma lineal como en la circular en distintos tejidos de la planta y se encontraban elementos transcritos en ambas polaridades lo que sugería que se replicaban mediante el mecanismo del círculo rodante similar a lo visto en los satélites viroidales y viroides. Aunque su presencia dependía del tejido de la planta y del estado en su desarrollo.

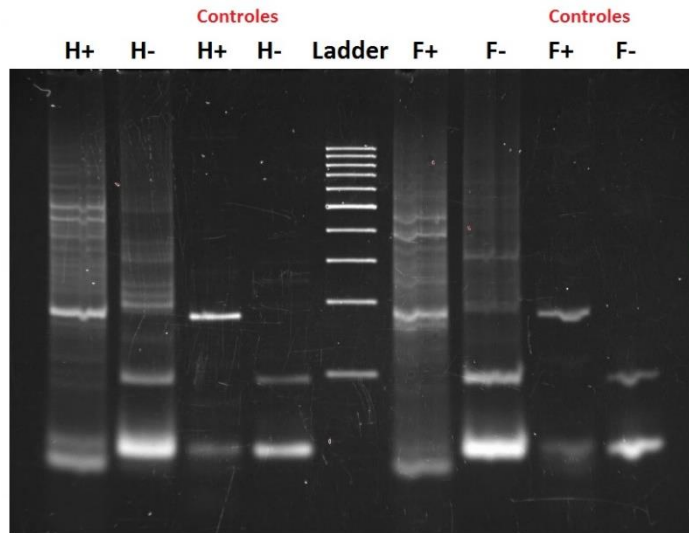


**Figura 16.** Resultado de la hibridación de RNA de *Oryza sativa* de distintos tejidos de *Oryza sativa* (hojas, flores) y de dos mutantes distintos (Slr1, T65). Os\_466(HHR) y Os\_466(HPR) actúan como controles positivos del experimento.

Por tanto, decidimos comprobar si nuestro elemento Os-466, que guarda una similitud estructural con las retrozimas previamente descritas al poseer dos HHr en sus extremos, presentaba transcripción continua y se encontraba presente en el transcriptoma de *Oryza sativa*. Para ello, extrajimos RNA tanto de flores como hojas de *Oryza sativa* de dos variedades distintas, T65 (tipo silvestre) y Slr1 (variedad comercial mutante en DELLA), disponibles y realizamos una hibridación tipo Northern con una sonda de digoxigenina diseñada para hibridar tanto con la polaridad positiva, como con la negativa de nuestro monómero, los resultados pueden verse en la figura 16. Los cuales nos indican que este monómero no se expresa a niveles detectables por la sonda (0.01ng) ni en hojas ni en flores de *Oryza sativa* en condiciones normales.

#### 4.6.1 ANÁLISIS DE RNAs DE ARROZ POR RT-PCR

Debido a que los análisis por hibridación Northern tienen un límite de detección en el rango nanomolar ( $10^{-9}$ M), decidimos confirmar la presencia en el transcriptoma de arroz de posibles RNAs derivados del elemento genómico Os-466 mediante RT-PCR (rango femtomolar o  $10^{-15}$ M). Para confirmar la posibilidad de este fragmento se transcriba en muy baja cantidad, se diseñó un experimento de RT-PCR donde se intentó amplificar el elemento Os-466 a partir de RNAs de la variedad silvestre de *Oryza sativa* a partir de los mismos tipos de tejido utilizados en el experimento de hibridación Northern (Figura 17). Ambos experimentos dieron resultados negativos, detectándose únicamente amplificaciones inespecíficas lejos de los 466pb esperados, lo que confirmaría que ninguna de las dos polaridades de dicho elemento se estarían expresando en *Oryza sativa* en condiciones normales.

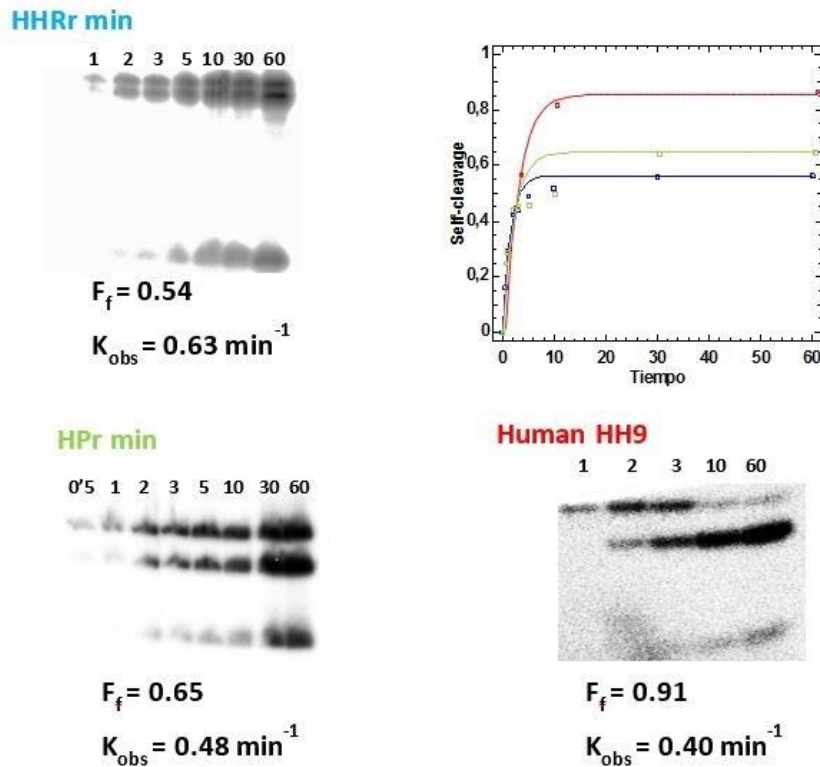


**Figura 17.** Gel producto de la RT-PCR. Las bandas nombradas H+ y H- provienen de hojas de *Oryza sativa* siendo H+ el carril donde se amplifica la versión del elemento Os-466 transcrito en la polaridad positiva mientras que H- marca el carril donde se intentó amplificar la versión de Os-466 de polaridad negativa. Las bandas nombradas F+ y F- provienen de tejidos de las flores de la planta siendo F+ el carril donde se intentó amplificar la versión del elemento Os-466 transcrito en la polaridad positiva mientras que F- marca el carril donde se intentó amplificar la versión de Os-466 de polaridad negativa.

#### 4.7 ANÁLISIS DE CINÉTICAS DE AUTOCORTE DE LAS RIBOZIMAS GENÓMICAS DE ARROZ

Para poder comparar cual es la efectividad en la tasa de autocorte de estas dos nuevas ribozimas respecto a las ya descritas en la literatura, tomamos como referencia a la ribozima tipo HHr humana HH9, (De la Peña y García Robles, 2010b) en su versión mínima y la comparamos con nuestras ribozimas mínimas sintetizadas. Sin embargo, al efectuar cinéticas clásicas con nuestras ribozimas se nos presentan problemas de autocorte a tiempo 0. Por ello, decidimos realizar las cinéticas durante la transcripción como previamente se ha descrito en la literatura (Ambrós y Flores, 1998). Realizamos las

transcripciones con las mismas condiciones en los tres casos y comparamos las tasas de autocorte de las tres ribozimas entre sí. Las transcripciones se realizaron a Tris-HCl, pH8 a 20mM y MgCl<sub>2</sub> 4mM y las alícuotas fueron recogidas en los tiempos que indica la figura 18. Tanto la HHr y HPr propias resultan menos efectivas en general ya que la tasa de autocorte no llega al 60% del total de ribozima en el caso de HHr mínima y a penas lo supera la HPr mientras que la HH9 llega al 80% en el mismo periodo de tiempo. Por el contrario, tanto la HPr como la HHr mínimas son igual de rápidas en llegar a sus respectivos máximos como la HH9. Toda la escisión parece ocurrir en los primeros minutos de la reacción y parece que un mayor tiempo en las condiciones de reacción no corresponde con una mayor tasa de autocorte.



**Figura 18.** Cinéticas de autocorte durante la transcripción de las ribozimas mínimas HPr y HHr de *Oryza sativa* y de la HH9 humana. Las reacciones se han llevado a Tris-HCl, pH8 a 20mM y MgCl<sub>2</sub> 4mM en las tres ribozimas, el tiempo en el que se ha cogido cada alícuota se ha medido en minutos. Las imágenes de los geles muestran distintas bandas en cada carrera que corresponden a: Ribozima no cortada, banda superior; fragmento mayor resultado de la escisión, banda media; fragmento menor resultado de la escisión, banda inferior. Para poder comparar las cinéticas de las distintas ribozimas, la densidad de cada banda fue analizada mediante el Software Imagen gauge y los datos fueron sometidos a un ajuste de mínimos cuadrados:  $F = F_{\infty}(1 - e^{-kt})$  (Stage-Zimmermann y Uhlenbeck, 1998), donde F es la fracción del producto a tiempos distintos,  $F_{\infty}$  es la fracción del producto en el tiempo final de la reacción y K es la constante de primer orden del autocorte. La grafica muestra una comparación de estas distintas cinéticas ajustadas, la línea roja corresponde a la HH9, la línea azul a la HHr mínima y la línea verde a la HP mínima. Se muestra el tiempo en minutos.

---

## 5. Discusión final

---

Tal y como se ha descrito en el presente trabajo (ver Introducción), hasta la fecha se han descrito únicamente tres ejemplos de HPrs distintos en la naturaleza, a los que se añadirían los dos nuevos ejemplos aquí caracterizados. Esta singularidad de la HPr contrasta con la amplia cantidad de ribozimas de otros tipos, tales como la HHr, la HDV o la twister, que recientemente se han descrito en la literatura presentes en los genomas de multitud de organismos, tanto procariotas como eucariotas. Por todo ello, el caso de la HPr se asemejaría más al de otras ribozimas consideradas por el momento como raras, tales como la ribozima VS encontrada exclusivamente en algunas cepas de *Neurospora*. La razón para esta singularidad de estos dos ribozimas sería por el momento un misterio a resolver, aunque nos permite sugerir varias hipótesis. Una primera posibilidad contemplaría que el análisis bioinformático únicamente ha permitido encontrar una variedad específica de la ribozima HPr, y que quizás esta exista en genomas eucarióticos en un formato distinto y algo más complejo, que no es reconocido a través de las búsquedas por estructura secundaria utilizadas. Una segunda posibilidad es que la HPr provenga de RNA endógenos a partir de eventos de complejos eventos de reorganización de los mismos, lo que hace improbable su aparición en RNAs viroidales. A este respecto, se ha propuesto en la bibliografía que uno de los posibles orígenes de la HPr serían el pequeño RNA nucleolar U6 del espliceosoma (Valadkhan, *et al.*, 2007). Así, se han descrito diversas semejanzas de secuencia entre dicho snRNA U6 y el centro catalítico de la HPr que permitirían encontrar una relación evolutiva entre ambos ribozimas, y que, debido a las elevadas diferencias estructurales entre HPr y snRNA U6 permitirían avanzar que su interconversión sería un evento raro.

En conclusión, el éxito evolutivo claramente inferior de la HPr comparado con su contraparte la HHr parece obvio si tenemos en cuenta su sola presencia en tres satélites viroidales de plantas. La comparación de las HPrs de estos satélites y las dos nuevas HPrs descritas en este trabajo indica que estas últimas presentan una mayor similitud con la ribozima de sTRSV, pudiendo existir alguna relación filogenética entre ellas. De hecho la HPr encontrada en el genoma de *Oryza sativa* muy posiblemente se deba a un evento de inserción de un satélite viral. Si aceptamos esta hipótesis de la integración de un antiguo satélite viroidal, sería interesante en el futuro tratar de verificar si la expresión artificial de este satélite provocará síntomas en plantas modelo, así como tratar de co-inocular el RNA viroidal sintetizado *in vitro* en *Oryza sativa* junto con una gama de diversos virus de RNA específicos de arroz para comprobar la posible sintomatología del satélite. Si se comprueba la patogenicidad latente de este satélite viral integrado en el genoma de *Oryza sativa* cabría preguntarse si la planta podría transcribir el mismo durante algún proceso de estrés agravando infecciones virales, en cuyo caso se podría plantear la edición del genoma mediante CRISPR-CAS9 de variedades comerciales de *Oryza sativa* para eliminar la presencia del mismo.

---

## 6. Conclusiones

---

Los análisis bioinformáticos y moleculares realizados en este trabajo con las ribozimas detectadas en secuencias de *Oryza sativa* y *Morus australis* han revelado lo siguiente.

- I) Que tanto en el genoma de *Oryza sativa* (cromosoma 8) como en un RNA circular detectado en *Morus australis* encontramos dos nuevas ribozimas tipo hairpin (HPr). Los centros catalíticos de ambas ribozimas mostraron una mayor similitud con el de sTRSV que con las descritas para sArmV y sCYMoV
- II) Que en la polaridad opuesta de las secuencias asociadas a las ribozimas HPr de *Oryza sativa* y de *Morus australis* encontramos la presencia de ribozimas tipo Hammerhead (HHR), de forma similar a lo descrito en los tres satélites virales con ribozimas HPr descritas hasta la fecha.
- III) Que la secuencia asociada a las ribozimas tipo hairpin y/o hammerhead de *Oryza sativa* constituye un elemento repetitivo en el que se define un posible monómero de 466 nt delimitado por dichas ribozimas. Cerca de dicho elemento repetitivo se encontró la secuencia parcial del pararetrovirus "*Rice Tungro Bacilliform*".
- IV) Que ambas ribozimas, HHR y HPr, encontradas en *Oryza sativa* presentan actividad bioquímica y son funcionales *in vitro* aunque con una actividad limitada, no llegándose a completar sus autocortes en más del 60%.
- V) Que no se ha podido hallar evidencia de que el elemento monomérico conteniendo ribozimas llegue a transcribirse en los tejidos de hoja y flor de *Oryza sativa*, representando muy probablemente un evento de inserción genómica de un antiguo satélite viral.

---

## 7. Bibliografía

---

- Ambrós, S.; Flores R. (1998). In vitro and in vivo self-cleavage of a viroid RNA with a mutation in the hammerhead catalytic pocket. *Nucleic Acids Res.*, 26:1877-1883.
- Barrick, J.E.; Corbino, K.A.; Winkler, W.C.; Nahvi, A.; Mandal, M.; Collins, J.; Lee, M.; Roth, A.; Sudarsan, N.; Jona, I.; Wickiser, J.K.; Breaker, R.R. (2004). New RNA motifs suggest an expanded scope for riboswitches in bacterial genetic control. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 101:6421-6426.
- Been M.D.; Wickham, G. S. (1997). Self-cleaving ribozymes of hepatitis delta virus RNA. *Eur J Biochem.*, 247:741-753.
- Bibillo, A.; Eickbush, T.H. (2004). End-to-end template jumping by the reverse transcriptase encoded by the R2 retrotransposon. *J. Biol. Chem.*, 279:14945–14953.
- Bojić, T.; Beeharry, Y.; Zhang, D.J.; Pelchat, M. (2012). Tomato RNA polymerase II interacts with the rod-like conformation of the left terminal domain of the potato spindle tuber viroid positive RNA genome. *J Gen Virol.*, 93:1591-1600.
- Boom, R.; Sol, C.J.; Salimans, M.M.; Jansen, C.L.; Wertheim-van, P.M.; van der Noordaa, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol.*, 28: 495-503
- Cech, T.R. (2000). Structural biology. The ribosome is a ribozyme. *Science*, 289: 878-879.
- Bruening, G.; Passmore, B.; Van Tol, H.; Buzayaan, J.M.; Feldstein, P. A. (1991). Replication of a plant virus satellite RNA: evidence favors transcription of circular templates of both polarities. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 4: 219-225.
- Carpenter, C.D.; Cascone P.J.; Simon, A.E. (1991). Formation of multimers of linear satellite RNAs. *Virology*, 183: 586-594.
- Cervera, A.; De la Peña, M. (2014). Eukaryotic penelope-like retroelements encode hammerhead ribozyme motifs. *Mol Biol Evol.*, 31: 2941-2947.
- Cervera, A.; Urbina, D.; De la Peña, M. (2016). Retrozymes are a unique family of non-autonomous retrotransposons with hammerhead ribozymes that propagate in plants through circular RNA. *Genome Biol.*, 17:135.
- Chao, M.; Hsieh, S. Y.; Taylor, J. (1990). Role of two forms of hepatitis delta virus antigen: evidence for a mechanism of self-limiting genome replication. *J Virol.*, 64: 5066-5069.
- Collins, R. A. (2002). The Neurospora Varkud satellite ribozyme. *Biochem. Soc. Trans.*, 30: 1122.
- De la Peña, M.; Gago, S.; Flores, R. (2003). Peripheral regions of natural hammerhead ribozymes greatly increase their self-cleavage activity. *EMBO J.*, 22: 5561-5570.

- De la Peña, M.; García-Robles, I. (2010a). Ubiquitous presence of the hammerhead ribozyme motif along the tree of life. *RNA*, 16: 1943-1950.
- De la Peña, M.; García-Robles, I. (2010b). Intronic hammerhead ribozymes are ultraconserved in the human genome. *EMBO Rep.*, 11: 711-716.
- DeYoung, M. B.; Siwkowski, A. M.; Lian, Y.; Hampel, A. (1995). Catalytic Properties of Hairpin Ribozymes Derived from Chicory Yellow Mottle Virus and Arabis Mosaic Virus Satellite RNAs *Biochemistry*, 34: 15785–15791.
- Dhakshanamoorthy, D.; Selvaraj R. (2009). Extraction of genomic DNA from *Jatropha sp.* using modified CTAB method. *Rom J Biol Plant Biol.*, 54:117–125.
- Diener, T.O. (1971). Potato spindle tuber "virus". IV. A replicating, low molecular weight RNA. *Virology*, 45: 411–428.
- Doherty, E.; Doudna, J. (2001). Ribozyme structures and mechanisms. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.*, 30: 457-475.
- Eickbush, D.G.; Eickbush, T.H. (2010). R2 retrotransposons encode a self-cleaving ribozyme for processing from an rRNA cotranscript. *Mol Cell Biol.*, 30:3142-3150.
- Epstein, L.M.; Gall, J.G. (1987). Self-cleaving transcripts of satellite DNA from the newt. *Cell*, 48: 535-543
- Etscheid, M.; Tousignant, M. E. ; Kaper, J. M. (1995). Small satellite of arabis mosaic virus: autolytic processing of in vitro transcripts of (+) and (-) polarity and infectivity of (+) strand transcripts. *J. Gen. Virol.*, 76: 271-282.
- Fedor, M.J. (1999). Tertiary structure stabilization promotes hairpin ribozyme ligation. *Biochemistry*, 34:11040-11050.
- Fedor, M.J. (2000). Structure and function of the hairpin ribozyme. *J Mol Biol.*, 297: 269-291.
- Feldstein, P.A.; Buzayan, J.M.; chng, G. (1989). Two sequences participating in the autolytic processing of satellite tobacco ringspot virus complementary RNA. *Gene*, 82: 53-61.
- Ferbeyre, G.; Smith, J.M.; Cedergren, R. Schistosome satellite DNA encodes active hammerhead ribozymes. (1998). *Mol. Cell. Biol.*, 18: 3880-3888.
- Ferré-D'Amaré, A. R.; Scott, W.G. (2010). Small Self-cleaving Ribozymes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 2: a003574.
- Ferré-D'Amaré, A.R.; Zhou, K.; Doudna, J.A. (1998). Crystal structure of a hepatitis delta virus ribozyme. *Nature*, 395:567-574.
- Feschotte, C.; Jiang, N.; Wessler, S.R. Plant transposable elements: where genetics meets genomics. *Nat. Rev. Genet.*, 3: 329–341.
- Flores, R.; Daròs, J.A.; Hernández, C. (2000). Avsunviroidae family: viroids containing hammerhead ribozymes. *Adv Virus Res.*, 55:271-323.



Flores, R.; Di Serio, F.; Navarro, B.; Duran-Vila, N.; Owens R. A. (2011). Viroids and Viroid Diseases of Plants, en: *Studies in Viral Ecology: Microbial and Botanical Host Systems*. Wiley-Blackwell, Online, 307-342.

Gilbert, W. (1986). Origin of life: The RNA world. *Nature*, 319: 618.

Goff, S.A.; Ricke, D.; Lan, T.; Presting, G.; Wang, R. Dunn, M.; Glazebrook, J.; Sessions, A.; Oeller, P.; Varma, H.; Hadley, D.; Hutchison, D.; Martin, C.; Katagiri, F.; Lange, B.M.; Moughamer, T.; Xia, Y.; Budworth, P.; Zhong, J.; Miguel, T.; Paszkowski, U.; Zhang, S.; Colbert, M.; Sun, W.; Chen, L.; Cooper, B.; Park, S.; Wood, T.C.; Mao, L.; Quail, P.; Wing, R.; Dean, R.; Yu, Y.; Zharkikh, A.; Shen, R.; Sahasrabudhe, S.; Thomas, A. Cannings, R.; Gutin, A.; Pruss, D.; Reid, J.; Tavtigian, S.; Mitchell, J.; Eldredge, G.; Scholl, T.; Miller, R. M.; Bhatnagar, S.; Adey, N.; Rubano, T.; Tusneem, N.; Robinson, R.; Feldhaus, J.; Macalima, T.; Oliphant, A.; Briggs, S. (2002). A Draft Sequence of the Rice Genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). *Science*, 296: 92-100.

Grum-Tokars, V.; Milovanovic, M; Wedekind, J. E. (2003). Crystallization and X-ray diffraction analysis of an all-RNA U39C mutant of the minimal hairpin ribozyme. *Acta Cryst.*, 59: 142–145.

Guerrier-Takada C.; Gardiner K.; Marsh T.; Pace N.; Altman S. (1983). The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell*, 35: 849-857.

Hammann, C.; Lilley, D.M. (2002). Folding and activity of the Hammerhead ribozyme. *ChemBioChem.*, 3: 690–700.

Hammann, C.; Lupták, A.; Perreault, J.; De la Peña, M. (2012). The ubiquitous hammerhead ribozyme *RNA*, 18: 871–885.

Hampel, A.; Tritz, R. (1989). RNA catalytic properties of the minimum (-)STRSV sequence. *Biochemistry*, 28: 4929-33.

Hampel, A.; Tritz, R.; Hicks, M.; Cruz, P. (1990). "Hairpin" catalytic RNA model: evidence for helices and sequence requirement for substrate RNA. *Nucl. Acids Res.* 18: 299-304.

Hisamatsu, S.; Morikawa, Y.; Tomita, R.; Tanaka, T.; Sonoki, S.; Kikuchi, Y. (1997). In vitro activity of the hairpin ribozyme derived from the negative strand of arabis mosaic virus satellite RNA. *J Biochem.*, 122: 352-357.

Hutchins, C.J.; Rathjen, P.D.; Forster, A.C.; Symons, R.H. (1986). Self-cleavage of plus and minus RNA transcripts of avocado sunblotch viroid. *Nucleic Acids Res.*, 14:3627-3240.

Jimenez, R. M.; Polanco, J. A.; Lupták, A. (2015). Chemistry and Biology of Self-Cleaving Ribozymes. *Trends Biochem Sci.*, 40: 648-661.

Kaper, J.M.; Tousignant, M.E.; Steger, G. (1988). Nucleotide sequence predicts circularity and self-cleavage of 300-ribonucleotide satellite of arabis mosaic virus. *Biochem Biophys Res Commun.*, 154: 318-325.

Katsarou, K.; Rao, A. L. N.; Tsagris, M.; Kalantidis, K. (2015). Infectious long non-coding RNAs. *Biochimie*, 117: 37–47.

Khvorova, A.; Lescoute, A.; Westhof, E; Jayasena, S.D. (2003). Sequence elements outside the hammerhead ribozyme catalytic core enable intracellular activity. *Nat Struct Biol.*, 10:708-712.

Klein, D.J.; Ferré-D'Amaré, A.R. (2006). Structural basis of glmS ribozyme activation by glucosamine-6-phosphate. *Science*, 313:1752-1756.

Kruger, K.; Grabowski P.J.; Zaug A.J.; Sands J.; Gottschling D.E.; Cech T.R. (1982). Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. *Cell*, 31: 147-157.

Kunii, M.; Kanda, M.; Nagano, H.; Uyeda, I.; Kishima, Y. (2004). Reconstruction of putative DNA virus from endogenous rice tungro bacilliform virus-like sequences in the rice genome: implications for integration and evolution. *BMC Genomics*, 5:80.

Kuzmin, Y.I.; Da Costa, C.P.; Fedor, M.J. (2004). Role of an active site guanine in hairpin ribozyme catalysis probed by exogenous nucleobase rescue. *J Mol Biol.*, 340: 233-251.

Kuzmin, Y.I.; Da Costa, C.P.; Fedor, M.J. (2005). Role of an active site adenine in hairpin ribozyme catalysis. *J Mol Biol.*, 349: 989-1010.

Lazinski, D. W.; Taylor, J. M. (1995). Intracellular cleavage and ligation of hepatitis delta virus genomic RNA: regulation of ribozyme activity by cis-acting sequences and host factors. *J Virol.*, 69: 1190–1200.

Liu, Y.; Wilson, T.J.; McPhee, S.A.; Lilley, D.M. (2014). Crystal structure and mechanistic investigation of the twister ribozyme. *Nat Chem Biol.*, 10:739-744.

Long, D. M.; Uhlenbeck, O. C. (1994). Kinetic characterization of intramolecular and intermolecular hammerhead RNAs with stem II deletions. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 91: 6977–6981.

Macke, T. J.; Ecker, D. J.; Gutell, R. R.; Gautheret, D.; Case, D. A.; Sampatha, R. (2001). RNAMotif, an RNA secondary structure definition and search algorithm. *Nucleic Acids Res.* 2001 29: 4724–4735.

Martick, M.; Horan, L.H.; Noller, H.F.; Scott, W.G. (2008). A discontinuous hammerhead ribozyme embedded in a mammalian messenger RNA. *Nature*, 454: 899-902.

Martick, M.; Scott, W. G. (2006). Tertiary Contacts Distant from the Active Site Prime a Ribozyme for Catalysis. *Cell*, 126: 309-320.

Müller, S.; Appel, B.; Balke, D.; Hieronymus, R.; Nübel, C. (2016). Thirty-five years of research into ribozymes and nucleic acid catalysis: where do we stand today? *F1000Research* Faculty Rev-1511.

Nawrocki, E.P.; Eddy, S.R. (2013) Infernal 1.1: 100-fold faster RNA homology searches. *Bioinformatics*, 29: 2933-2935.

Nissen, P.; Hansen, J.; Ban, N.; Moore, P.B.; Steitz, T.A. (2000). The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science*, 289: 920-930.

Nohales, M.A.; Flores, R.; Daròs, J.A. (2012a) Viroid RNA redirects host DNA ligase 1 to act as an RNA ligase. *PNAS*, 34: 13805-13810.

Nohales, M. A.; Molina-Serrano, D.; Flores, R.; Daròs, J.A. (2012b). Involvement of the chloroplastic isoform of tRNA ligase in the replication of viroids belonging to the family Avsunviroidae. *J Virol.*, 86:8269-76.

Pinard, R.; Hampel, K. J.; Heckman, J. E.; Lambert, D.; Chan, P. A.; Major, F.; Burke, J. M. (2001). Functional involvement of G8 in the hairpin ribozyme cleavage mechanism. *EMBO J.*, 20: 6434-6442.

Pley, H.W.; Flaherty, K.M.; McKay, D.B. (1994). Three-dimensional structure of a hammerhead ribozyme. *Nature*, 372:68-74.

Prody, G.A.; Bakos, J.T.; Buzayan, J.M.; Schneider, I.R.; Bruening, G. (1986). Autolytic processing of dimeric plant virus satellite RNA. *Science*, 231: 1577-1580.

Rao, A.L.; Kalantidis, K. (2015). Virus-associated small satellite RNAs and viroids display similarities in their replication strategies. *Virology*, 479-480:627-636.

Rastogi, T.; Beattie, T. J.; Olive, J. E.; Collins R. A. (1996). A long-range pseudoknot is required for activity of the Neurospora VS ribozyme. *EMBO J.*, 15: 2820-2825.

Riccitelli, N.J.; Lupták, A. (2010). Computational discovery of folded RNA domains in genomes and in vitro selected libraries. *Methods*, 52:133-140.

Rojas, A. A.; Vazquez-Tello, A.; Ferbeyre, G.; Venanzetti, F.; Bachmann, L.; Paquin, B.; Sbordoni, V.; Cedergren, R. (2000). Hammerhead-mediated processing of satellite pDo500 family transcripts from Dolichopoda cave crickets. *Nucleic Acids Res.*, 28: 4037-4043.

Roth, A.; Weinberg, Z.; Chen, A.G.; Kim, P.B.; Ames, T.D.; Breaker, R.R. (2014). A widespread self-cleaving ribozyme class is revealed by bioinformatics. *Nat Chem Biol.*, 10:56-60.

Rubino, L.; Tousignant, M.E.; Steger, G.; Kaper, J.M. (1990). Nucleotide sequence and structural analysis of two satellite RNAs associated with chicory yellow mottle virus. *J Gen Virol.*, 71: 1897-1903.

Ruminski, D.J.; Webb, C.H.; Riccitelli, N.J.; Lupták, (2011). A Processing and translation initiation of non-long terminal repeat retrotransposons by hepatitis delta virus (HDV)-like self-cleaving ribozymes. *J Biol Chem.*, 286:41286-41295.

Rupert, P.B.; Ferré-D'Amare, A.R. (2001). Crystal structure of a hairpin ribozyme-inhibitor complex with implications for catalysis. *Nature*, 410: 780–786.

Rupert, P.B.; Massey, A.P.; Sigurdsson, S.T.; Ferré-D'Amare, A.R. (2002). Transition state stabilization by a catalytic RNA. *Science*, 298: 1421-1424.

Salehi-Ashtiani, K.; Lupták, A.; Litovchick, A.; Szostak, J.W. (2006). A genomewide search for ribozymes reveals an HDV-like sequence in the human CPEB3 gene. *Science*, 313:1788-1792.

Sambrook, J.; Russell, D.W. (2006). Isolation of DNA fragments from polyacrylamide gels by the crush and soak method. *CSH Protoc.*

Scott, W. G.; Finch, J. T.; Klug, A. (1995). The crystal structure of an AII-RNA hammerhead ribozyme: A proposed mechanism for RNA catalytic cleavage. *Cell*, 81: 991-1002

- Serganov, A.; Patel, D.J. (2016). Ribozymes, riboswitches and beyond: regulation of gene expression without proteins. *Nat. Rev. Genet.*, 8: 776-790
- Shanga, J. S.; Gu, K.; Kaur, J.; Yin, Z. (2010). Short Report An improved method for RNA isolation and cDNA library construction from immature seeds of *Jatropha curcas*. *BMC Res Notes.*, 3:126.
- Smith, N.A.; Eamens, A.L.; Wang, M.B. (2011). Viral small interfering RNAs target host genes to mediate disease symptoms in plants. *PLoS Pathog.*, 7:e1002022.
- Stage-Zimmermann, T.K.; Uhlenbeck, O.C. (1998). Hammerhead ribozyme kinetics. *RNA.*, 4: 875-89.
- Suslov, N.B.; DasGupta, S.; Huang, H.; Fuller, J.R.; Lilley, D.M.; Rice, P.A.; Piccirilli, J.A. (2015). Crystal structure of the Varkud satellite ribozyme. *Nat Chem Biol.*, 11: 840-846.
- Timothy, J. W.; Lilley D.M. (2011). Do the hairpin and VS ribozymes share a common catalytic mechanism based on general acid–base catalysis? A critical assessment of available experimental data. *RNA*, 17: 213–221.
- Uhlenbeck, O.C. (1987). A small catalytic oligoribonucleotide. *Nature*, 328:596-600.
- Valadkhan, S.; Manley, J.L. (2001). Splicing-related catalysis by protein-free snRNAs. *Nature*, 413: 701-707.
- Valadkhan, S.; Mohammadi, A.; Wachtel, C.; Manley, J.L. (2007). Protein-free spliceosomal snRNAs catalyze a reaction that resembles the first step of splicing. *RNA*, 13: 2300-2311.
- Vogler, C.; Spalek, K.; Aerni, A.; Demougin, P.; Müller, A.; Huynh, K.D.; Papassotiropoulos, A.; De Quervain, D.J. (2009). CPEB3 is associated with human episodic memory. *Front Behav Neurosci.*, 4:3-4.
- Wang, M. B.; Bian, X. Y.; Wu, L. M.; Liu, L. X.; Smith, N.; Isenegger, D.; Wu, R. M.; Masuta, C.; Vance, V. B.; Watson, J. M.; Rezaian, A.; Dennis, E. S.; Waterhouse, P. M. (2004). On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 101: 3275–3280.
- Wang, W.B.; Fei, J.M.; Wu, Y.; Bai, X.C.; Yu, F.; Shi, G.F.; Li, Y.F. Kuai, Y.Z. (2010). A new report of a mosaic dwarf viroid-like disease on mulberry trees in China. *Pol J Microbiol.*, 59: 33-36.
- Webb, C.H.; Riccitelli, N.J.; Ruminski, D.J.; Lupták, A. (2009). Widespread occurrence of self-cleaving ribozymes. *Science*, 326:953.
- Weinberg, Z.; Kim, P.B.; Chen, T. H.; Li, S.; Harris, K. H.; Lünse, C. E.; and Breaker R. R. (2015). New classes of self-cleaving ribozymes revealed by comparative genomics analysis *Nat Chem Biol.*, 11: 606-610.
- Wilson, T. J; Li, N.; Lu, J.;Frederiksenb, J. K.; Piccirilib, J. A.; Lilleya, M. J. (2010) Nucleobase-mediated general acid-base catalysis in the Varkud satellite ribozyme. *PNAS*, 26: 11751-11756.
- Wilson, J. T.; Zhao Z.; Maxwell, Z.; Kontogiannis L.; Lilley, M. J. (2001). Importance of specific nucleotides in the folding of the natural form of the hairpin ribozyme. *Biochemistry*, 40: 2291-2302.
- Winkler, W.C.; Nahvi, A.; Roth, A.; Collins, J.A.; Breaker, R.R. (2004). Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme. *Nature*, 428: 281-286.

Wu, Q.; Wang, Y.; Cao, M.; Pantaleo, V.; Burgyan, J.; Li, W.X.; Ding, S.W. (2012). Homology-independent discovery of replicating pathogenic circular RNAs by deep sequencing and a new computational algorithm. *Proc Natl Acad Sci USA*. 109: 3938-3943.

Yarus, M. (2015). Ahead and behind: a small, small RNA world. *RNA*, 21: 769-770.

Zhang, Z.; Qi, S.; Tang, N.; Zhang, X.; Chen, S.; Zhu, P.; Ma, L.; Cheng, J.; Xu, Y.; Lu, M.; Wang, H.; Ding, S. W.; Li, S.; Wu, Q. (2014). Discovery of replicating circular RNAs by RNA-seq and computational algorithms. *PLoS Pathog.*, 10: e1004553.

Zhong, X.; Archual, A. J.; Amin, A. A.; Ding, B. (2008). A genomic map of viroid RNA motifs critical for replication and systemic trafficking. *Plant Cell*, 20: 35-47.

---

# ANEXO I

---

## SECUENCIA DEL DÍMERO PARCIAL

AttcacgtactggacactaaagcagtcacacaacttggtttgtaccgcataccaagttgctcgacatctctctacagcagaggtacgttgaatgAATT  
TACAAA**CCTGTCGTTGGATGGGTGTGGTTGTGCCTTGGAGGTTCTCCAGGCGCGGCCACAAAGCCAGCCTGAT**  
**GAGATCCTAAAGGACGAAACAGG**GACTGCAGATACGGTGGCCTATGCTGGTCAGAAGTGGTGCACACTGGGCTT  
CCCAGTCACTCCCATGTTCTAGCTACGGTCAGAAGTATTAGGTGATTCTGCGAAAGTGCTTACCT**CCTGAGTAAT**  
**GTGCTACAATGGTATGTTTCTTCAGGCTGCTTCTTCTG**TTCATTGTCTGTGTACCCGTGAGAGTACGCTCACACCCA  
TAGGCCTTGTAGCCGTGCGATCCGTACAAACCAGGTTGTGGTCTAGTTGACAAGTGTGATcattcaacgtacctctg  
ctgtagagagatgtcgagcaacttggtatgCGGtaacaaaccaagttgtggactgctttagtgccagtagtgaatAAATTTACAAA**CCTGT**  
**CGTTGGATGGGTGTGGTTGTGCCTTGGAGGTTCTCCAGGCGCGGCCACAAAGCCAGCCTGATGAGATCCTAAA**  
**GGACGAAACAGG**GACTGCAGATACGGTGGCCTATGCTGGTCAGAAGTGGTGCACACTGGGCTTCCCAGTCACTCC  
CATGTTCTAGCTACGGTCAATT

Mostrado el elemento en la dirección 5' -> 3'. En rojo se muestran las secuencias de las HHr mientras que en verde se marca la secuencia de la HPr, los nucleótidos marcados en minúsculas corresponden a la inversión en 5'.

## SECUENCIA DEL MONÓMERO (+) DEFINIDO POR LA HHR

**GTTGGATGGGTGTGGTTGTGCCTTGGAGGTTCTCCAGGCGCGGCCACAAAGCCAGCCTGATGAGATCCTAAAG**  
**GACGAAACAGG**GACTGCAGATACGGTGGCCTATGCTGGTCAGAAGTGGTGCACACTGGGCTTCCCAGTCACTCCC  
ATGTTCTAGCTACGGTCAGAAGTATTAGGTGATTCTGCGAAAGTGCTTACCT**CCTGAGTAATGTGCTACAATGG**  
**TATGTTTCTTCAGGCTGCTTCTTCTG**TTCATTGTCTGTGTACCCGTGAGAGTACGCTCACACCCATAGGCCTTGTGAG  
CCGTGCGATCCGTACAAACCAGGTTGTGGTCTAGTTGACAAGTGTGATCATTCAACGTACCTCTGCTGTAGAGA  
GATGTGAGCAACTTGGTATGCGGTAACAAAACCAAGTTGTGGACTGCTTTAGTGCCAGTACGTGAATAAATTTA  
CAAAC**CCTGTC**

Mostrado el elemento en la dirección 5' -> 3'. En rojo se muestran las secuencias de las HHr mientras que en verde se marca la secuencia conservada de la HPr.

## SECUENCIAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS

### Oligonucleótidos Monómero 466pb

99D\_Rice\_MonoSat (62C-75C)  
ACTGGGATCCCCAGTCACTCCCATGTTCTAG  
99R\_Rice\_MonoSat (64C-75C)  
CCAGTCTAGACCACTTCTGACCAGCATAGGCC

### Satelite genómico y repeticiones

97D\_Rice\_WholeSat (65C)  
GTTTGGGGGAGACTCATTACGTAC  
97R\_Rice\_WholeSat (60C)  
CAACTAAAGTAATTGACCGTAGCTAG

### Oligonucleótidos HPr minima

100D\_HPr-rice  
GGAACAGAAGAAGCAGCCTGAAG  
100R\_HPr-rice  
GGGAACAGGGACTGCAGATACGGTG

### Oligonucleótidos HHr min

101D\_HHr-rice  
GAACCTGTCGTTGGATGGGTGTG  
101R\_HHr-rice  
ACCTGTTTCGTCCTTTAGGATCTC

### Oligonucleótidos Hp2B mini

106D\_Hp2B  
GTATCTGCAGTCCCTGTTCCCGG  
106R\_T7\_pBS  
CCCTATAGTGAGTCGTATTACGCG

## ANEXO II

### SECUENCIA ALTERNATIVA ELEMENTO GENÓMICO COMPLETO CONTENIENDO HASTA SIETE REPETICIONES DEL ELEMENTO Os-466. ACCESIÓN GENBANK: JSUF01012100.1.

Verde: nucleótidos genoma de arroz que no corresponden al elemento Os-466

Amarillo: nucleótidos de Os-466 en sentido reverso

Negro: nucleótidos de Os-466, con nucleótidos conservados de la ribozima HHr en rojo y HPr en azul

```
GGACTTTACATCATCCGAAGCAAGCTTCTGAGGCTGTCTAAATAGGATTTCGCCACCCTGCAAAGATCTAAAGTTAAAATATCTCTCGAAGTGAACA
GTATTGAACAGTAATTTAAACAATAAAGCTGAATAGTGTPTTTGAATAGTAATTAGCCGAATAAACAGTAAACTGAATAGTATTCAGCCGAATAAATA
GTGTTTTGAACAGTGTTTTTTGTCTGAAGCATAAAATCAATCCAAAATGCAAGGACAGTGAATGACATTTGACTGTTAAAAATACTGTGAAGAATA
TTACTTTTCGGCGAAAAGAAAGGCGCAGGTACAAAGGTGTCTCCACCTTGGCCAATTCAGGACAAAGTAAAGCCAAAAGAAGATAAGCATCTCCA
TGGTGCCGAGCCAGCTCGTGAATAACAGTATCTAGAAGATAAGCTTGAAGCAGTCCGAGCCCTCCGAGCTCCTATAAAAGGAGGGGTTTGTCTCAGC
TGAGAAGAACAACAATGAAGACACCATTAGAGCAAAGCTTCCAAGCGCGCTCTCACCTCCATTCCACCGTTCTTAGTAGTAGTGACTTTAGCCTA
CCTTGCATAGTATATTGAAGCAAGGATTTTAAACATAGCCAGTATATACATATATGTATAATAATGACACTTCTGACCAGCCGTAGTCTATGCACT
CTATGTTTGAATTTGATATATAATAGTGTCTATATTCGGAATTTGATATATAATAGTGTCTATATTTCTACTAAGCTCATATTCATTAATTTCTTT
CTTCAGGCTCAAGATTGGGTACTTCTAAGTTGTCGAGTTTGGGGGAGACTATTACAGTACTGGACACTAAAGCAGTCCACAACTTGGTTTTGTAC
CGCATACCCAAGTTGCTCGACATCTCTCTACAGCAGAGGTACGTTGAATGAATTTACAAACCTGTCTGGATGGGTGGTTGTGTCCTTGGAGTT
CTCCAGGCGCGGCCACAAGCCAGCCGTGATGAGATCTAAAGGACGAAACAGGGACTGCAGATACGGTGGCCTATGCTGGTCAGAAGTGGTGCACA
CTGGGCTTCCAGTCACTCCCATGTTCTTAGCTACGGTCAGAAGTATTAGGTGATTCTGCGAAAGTGTTCACCTCCTGAGTAATGTGCTACAATGG
TATGTTTTCTCAGGCTGCTTCTCTGTCATTGCTGTGTACCCGTGAGAGTACGCTCACACCCATAGGCCTTGTGACCCGTGCGATCCGTACAAC
CAGGTTGTGGTCTAGTTGACAACACTAGTATCATTTCAACGTACCTCTGCTGTAGAGAGATGTCGAGCAACTTGGTATCGCGTAACAAAACCAAGTTG
TGGACTGCTTTAGTGTCCAGTACGTGAATAAAATTTACAAACCTGTCTGGATGGGTGGTTGTGTCCTTGGAGTTCTCCAGGCGCGGCCACA
AGCCAGCCGTGATGAGATCTAAAGGACGAAACAGGGACTGCAGATACGGTGGCCTATGCTGGTCAGAAGTGGTGCACACTGGGCTTCCAGTCACT
CCATGTTCTTAGCTACGGTCAGAAGTATTAGGTGATTCTGCGAAAGTGTTCACCTCCTGAGTAATGTGCTACAATGGTATGTTTTCTCAGGCTGCT
TCTTCTGTCATTGCTGTGTACCCGTGAGAGTACGCTCACACCCATAGGCCTTGTGACCCGTGCGATCCGTACAACCCAGGTTGTGGTCCTAGTTG
ACAACACTAGTATCATTTCAACGTACCTCTGCTGTAGAGAGATGTCGAGCAACTTGGTATGCGGTAACAAAACCAAGTTGTGGACTGCTTTAGTGTCCA
GTACGTGAATAAATTTACAAACCTGTCGTTGGATGGGTGTGGTTGTGTCCTTGGAGTTTCTCCAGGCGCGGCCACAAGCCAGCCTGATGAGATCC
TAAAGGACGAAACAGGGACTGCAGATACGGTGGCCTATGCTGGTCAGAAGTGGTGCACACTGGGCTTCCAGTCACTCCCATGTTCTTAGCTACGTT
CAGAAGTATTAGGTGATTCTGCGAAAGTGTTCACCTCCTGAGTAATGTGCTACAATGGTATGTTTTCTCAGGCTGCTTCTCTGTCATTGCTGTG
GTACCCGTGAGAGTACGCTCACACCCATAGGCCTTGTGACCCGTGCGATCCGTACAACCCAGGTTGTGGTCCTAGTTGACAACACTAGTATCATTTCAA
CGTACCTCTGCTGTAGAGAGATGTCGAGCAACTTGGTATGCGGTAACAAAACCAAGTTGTGGACTGCTTTAGTGTCCAGTACGTGAATAAATTTACA
AACCTGTCGTTGGATGGGTGTGGTTGTGTCCTTGGAGTTTCTCCAGGCGCGGCCACAAGCCAGCCTGATGAGATCTAAAGGACGAAACAGGGAC
TGCAGATACGGTGGCCTATGCTGGTCAGAAGTGGTGCACACTGGGCTTCCAGTCACTCCCATGTTCTTAGCTACGGTCAGAAGTATTAGGTGATTCT
TGCGAAAGTGTTCACCTCCTGAGTAATGTGCTACAATGGTATGTTTTCTCAGGCTGCTTCTCTGTCATTGCTGTGATCCCGTACACCCATAGGCCTTGTG
CACACCCATAGGCCTTGTGACCCGTGCGATCCGTACAACCCAGGTTGTGGTCCTAGTTGACAACACTAGTATCATTTCAACGTACCTCTGCTGTAGAGA
GATGTCGAGCAACTTGGTATGCGGTAACAAAACCAAGTTGTGGACTGCTTTAGTGTCCAGTACGTGAATAAATTTACAAACCTGTCGTTGGATGGGT
GTGGTTGTGTCCTTGGAGTTTCTCCAGGCGCGGCCACAAGCCAGCCTGATGAGATCTAAAGGACGAAACAGGGACTGCAGATACGGTGGCCTAT
GCTGGTCAGAAGTGGTGCACACTGGGCTTCCAGTCACTCCCATGTTCTTAGCTACGGTCAGAAGTATTAGGTGATTCTGCGAAAGTGTTCACCTC
CTGAGTAATGTGCTACAATGGTATGTTTTCTCAGGCTGCTTCTCTGTCATTGCTGTGATCCCGTACACCCATAGGCCTTGTGACCCATAGGCCTTGTG
AGCCGTGCGATCCGTACAACCCAGGTTGTGGTCCTAGTTGACAACACTAGTATCATTTCAACGTACCTCTGCTGTAGAGAGATGTCGAGCAACTTGGTA
TGCGGTAACAAAACCAAGTTGTGGACTGCTTTAGTGTCCAGTACGTGAATAAATTTACAAACCTGTCGTTGGATGGGTGTGGTTGTGTCCTTGGAGG
TTCTCCAGGCGCGGCCACAAGCCAGCCTGATGAGATCTAAAGGACGAAACAGGGACTGCAGATACGGTGGCCTATGCTGGTCAGAAGTGGTGCACA
CACTGGGCTTCCAGTCACTCCCATGTTCTTAGCTACGGTCAGAAGTATTAGGTGATTCTGCGAAAGTGTTCACCTCCTGAGTAATGTGCTACAAT
GGTATGTTTTCTCAGGCTGCTTCTCTGTCATTGCTGTGATCCCGTACACCCATAGGCCTTGTGACCCGTGCGATCCGTACAACCCAGGTTGTGGTCC
ACCAGGTTGTGGTCCTAGTTGACAACACTAGTATCATTTCAACGTACCTCTGCTGTAGAGAGATGTCGAGCAACTTGGTATGCGGTAACAAAACCAAGT
GTGGACTGCTTTAGTGTCCAGTACGTGAATAAATTTACAAACCTGTCGTTGGATGGGTGTGGTTGTGTCCTTGGAGTTTCTCCAGGCGCGGCCACA
AAAGCCAGCCTGATGAGATCTAAAGGACGAAACAGGGACTGCAGATACGGTGGCCTATGCTGGTCAGAAGTGGTGCACACTGGGCTTCCAGTCACT
TCCCATGTTCTTAGCTACGGTCAGAAGTATTAGGTGATTCTGCGAAAGTGTTCACCTCCTGAGTAATGTGCTACAATGGTATGTTTTCTCAGGCTG
CTTCTCTGTCATTGCTGTGATCCCGTACACCCATAGGCCTTGTGACCCGTGCGATCCGTACAACCCAGGTTGTGGTCCTAGTTGTCCTTAGT
TGACAACCTAGTATCATTTCAACGTACCTCTGCTGTAGAGAGATGTCGAGCAACTTGGTATGCGGTAACAAAACCAAGTTGTGGACTGCTTTAGTGT
CAGTACGTGAATAAATTTACAAACCTGTCGTTGGATGGGTGTGGTTGTGTCCTTGGAGTTTCTCCAGGCGCGGCCACAAGCCAGCCTGATGAGAT
CCTAAAGGACGAAACAGGGACTGCAGATACGGTGGCCTATGCTGGTCAGAAGTGGTGCACACTGGGCTTCCAGTCACTCCCATGTTCTTAGCTACG
GTCAGAAGTATTAGGTGATTCTGCGAAAGTGTTCACCTCCTGAGTAATGTGCTACAATGGTATGTTTTCTCAGGCTGCTTCTCTGTCATTGCTGT
GTGATCCCGTACAGTACGCTCACACCCATAGGCCTTGTGACCCGTGCGATCCGTACAACCCAGGTTGTGGTCCTAGTTGACAACACTAGTATCATTT
AACGTACCTGCTGTAGAGAGATGTCGAGCAACTTGGTATGCGGTAACAAAACCAAGTTGTGGACTGCTTTAGTGTCCAGTACGTGAATNTTATCA
CATCAATATATATATATACATATGTATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT
TCCTTGCATAGTATATTGAAGCAAGGATTGTGTAATAAAGATGTGTAAGGTAAGAACAGCTTGTCTGTACCTACCTTCCGGTTTCCCGAAAGGGAA
AACCGTATGTAAGCTTATCTGTTAATAATGAAGTAATTTTCTTAAAGTATTCCTNAGGACGAAACAGGGACTGCAGATACGGTGGCCTATGCTGGTC
AGAAGTGGTGCACACTGGGCTTCCAGTCACTCCCATGTTCTTAGCTACGGTCAATTACTTTAAGTTGTCAGTTATATATATATATATATATATATATAT
```



