



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE  
RIBOSWITCHES SINTÉTICOS**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**BIÓLOGA**

PRESENTA:

**ZUEMY RODRÍGUEZ ESCAMILLA**

Dirección de Tesis:

**DR. ENRIQUE MERINO PÉREZ**



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM

**2007**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Agradecimientos

A Enrique, porque soy libre. Creo que en la manera en la que hacemos ciencia, esta la clave para la creatividad, y tu Quique, me haz mantenido en una burbuja que de momentos siento surreal, asi supero la levedad del ser igracias Quique!.

A mis cuates del laboratorio Mario, Christian, Nancy y Kuki porque sin ustedes estaria bien "#\*@"Ω mi estancia en Cuernavaca y a icaray! como me hacen reir. Además del cariño que les tengo. A mis cuates del otro laboratorio, Beto por ser mi teacher y compartir tanto conmigo, a Nash por aguantadora, a Janet porque la espio todo el tiempo, a Renato por la travesia. A mis cuates del IBT porque hemos compartido tanto.

A todos los integrantes del laboratorio Merino-Espín por la convivencia diaria y los consejos.

A Juan Manuel Hurtado por el apoyo computacional. A Eugenio, Santiago y Jorge de la unidad de síntesis por su disposición y rapidez para entregarme los oligos y las secuencias. A Fily por enseñarme varias técnicas de Biología Molecular. A Maria Luisa por el soporte técnico en el laboratorio.

No pueden faltar las Nava: Cecilia, Paulina y mi mejor amiga Claudia. Porque las quiero a montones y porque sin su presencia yo no sería. A Manuel. A Nicolas por todos los debrayes y su compañía. A Marlen. Elaine. A Jaquelina por loca. A Telma por su gran compañía y visión de la vida.

A mis sinodales Rosa María Gutiérrez, Juan Miranda, José Luis Puente y Arturo Becerra por tomarse el tiempo para revisar la tesis y aportar ideas.

Este proyecto se llevo a cabo bajo el financiamiento de CONACyt: 60127 Proyecto Dr. Enrique Merino "Identificación in silico y caracterización molecular, estructural y cinética de elementos de regulación de la expresión genética basada en riboswitches".

A mi familia, en especial a mis padres y abuelos.

Quien ha alcanzado la libertad de la razón, aunque sólo sea en cierta medida, no puede menos que sentirse en la tierra como un caminante, pero un caminante que no se dirige *hacia* un punto de destino pues no lo hay. Mirará, sin embargo, con ojos bien abiertos todo lo que pase realmente en el mundo; así mismo, no deberá atar a nada en particular el corazón con demasiada fuerza: es preciso que tenga también algo del vagabundo al que agrada cambiar de paisaje. Sin duda ese hombre pasará malas noches, en las que, cansado como estará hallará cerrada la puerta de la ciudad que había de darle cobijo: tal vez incluso como en oriente, el desierto llegue hasta esa puerta, los animales de presa dejen oír sus aullidos tan pronto lejos como cerca; se levante un fuerte viento, y unos ladrones le roben su acémilas. Quizá entonces la terrible noche será para él otro desierto cayendo en el desierto y su corazón se sentirá cansado de viajar. Y cuando se eleve el sol de la mañana, ardiente como un airado dios, y se abra la ciudad, puede que vea en los ojos de sus habitantes más desierto, más suciedad, más bellaquería y más inseguridad aún que ante su puerta, por lo que el día será para él casi peor que la noche. Es posible que a veces sea así la suerte de este caminante. Pero pronto llegan, en compensación, las deliciosas mañanas de otras comarcas y de otras jornadas, en las que desde los primeros resplandores del alba, ve pasar entre la niebla de la montaña a los coros de las musas que le rozan al danzar; más tarde sereno, en el equilibrio del alma de la mañana antes del mediodía y mientras se pasee bajo los árboles verá caer a sus pies desde sus copas y desde los verdes escondrijos de sus ramas una lluvia de cosas buenas y claras, como regalo de todos los espíritus libres que frecuentan el monte, el bosque y la soledad, y que son como él, con su forma de ser unas veces gozosa y otra meditabunda, caminantes y filósofos. Nacidos de los misterios de la mañana temprana, piensan que es lo que puede dar al día, entre la décima y la duodécima campanadas del reloj, una faz tan pura, tan llena de luz y de claridad serena y transfiguradora: buscan la filosofía de la mañana.

Nietzsche  
Humano demasiado humano

## Diseño y construcción de riboswitches sintéticos.

### Índice.

<i>Diseño y construcción de riboswitches sintéticos</i> .....	7
<i>Introducción</i> .....	7
REGULACIÓN en cis en bacterias por fRNA. ....	12
Plegamiento del RNA .....	13
SELEX.....	15
RIBOSWITCHES: La convergencia de dos conceptos.....	16
LOS RIBOSWITCHES REGULAN LA TERMINACIÓN TRANSCRIPCIONAL Y TRADUCCIONAL EN BACTERIAS. ....	19
LOS RIBOSWITCHES TAMBIÉN PUEDEN REGULAR LA INICIACIÓN DE LA TRADUCCIÓN DEL RNA EN BACTERIAS.....	20
El riboswitch cuya plataforma de expresión es un ribozima.....	20
Rango de acción de los riboswitches.....	22
<i>Antecedentes</i> .....	25
<i>Hipótesis</i> .....	28
<i>Objetivo General</i> .....	28
<i>Objetivos Particulares</i> .....	28
<i>Metodología</i> .....	29
Diseño teórico del riboswitch sintético. ....	29
Construcción de un riboswitch sintético.....	29
Amplificación de los diseños para la plataforma de expresión. ....	29
Amplificación del vector pUC19.....	30
Protocolo de clonación Rodríguez-Merino. ....	30
Construcción del Riboswitch sintético.....	31
Construcción de la cepa receptora. ....	32
Amplificación y clonación del casete de resistencia a cloranfenicol con oligos extendidos inclusivos de los promotores bidireccionales sobrelapados y la secuencia homóloga al gen lacZ de Escherichia coli K12. ....	32
Amplificación y clonación del casete de resistencia a kanamicina con oligos extendidos inclusivos a la secuencia homóloga al gen <i>lacI</i> de <i>Escherichia coli</i> K12.....	34
Amplificación de la construcción lacZ-promotores bidireccionales sobrelapados-cm- km-lacI.....	36
Recombinación homóloga mediante el método de Datsenko y Wanner de la construcción <i>lacZ-promotores bidireccionales sobrelapados-cm-km-lacI</i> y la construcción <i>lacZ-promotores bidireccionales sobrelapados-cm-lacI</i> en los genes <i>lacZ</i> y <i>lacI</i> de E. coli K12. ....	37
<i>Resultados y discusión</i> .....	38
Diseño del riboswitch.....	38
Selección de la plataforma de expresión: La ribozima hammerhead. ....	38
Selección del aptámero .....	41

Acoplado las estructuras del riboswitch .....	42
<b>Construcción del riboswitch sintético.....</b>	<b>44</b>
<b>Construcción de la cepa receptora .....</b>	<b>48</b>
<i>Conclusiones.</i> .....	<i>50</i>
<i>Perspectivas.....</i>	<i>51</i>
<i>Bibliografía.....</i>	<i>52</i>
<b>APÉNDICE .....</b>	<b>60</b>
<b>Apéndice I .....</b>	<b>60</b>
<b>Apéndice II. Secuencias de las 12 variantes de la ribozima Hammerhead     diseñada para esta tesis. ....</b>	<b>62</b>
<b>Apéndice III. Tabla de análisis de aptámeros candidatos para el riboswitch     sintético.....</b>	<b>63</b>
<b>Apéndice IV. Resultados de el modelado con el programa Kinefold. Se     encuentra en el CD incluido. ....</b>	<b>63</b>

## Diseño y construcción de riboswitches sintéticos.

### Introducción.

Durante el curso de la evolución, la regulación de la expresión genética ha permitido que tanto nuestras células como nosotros evolucionemos y desarrollemos hábitos diferentes. Consideremos por un momento el estrepitoso jaleo que se produciría si de los 30,000 genes humanos no hubiera una gran proporción que estuvieran adecuadamente regulados. No necesitamos usar los 2m completos de DNA dentro de cada una de nuestras células ya que, por ejemplo, no querríamos que las células de nuestro tejido nervioso expresaran proteínas propias del tejido hepático.

Dada la complejidad intrínseca de la naturaleza, para que nosotros podamos elucidar los procesos naturales, se ha tenido que generar una serie de conocimientos y metodologías para entender cada proceso que se estudia. Un parteaguas en Biología Molecular se ubica en 1952, cuando James Watson y Francis Crick publican la resolución de la estructura cristalográfica de la molécula de la herencia, el DNA. A partir de este descubrimiento comienzan a elucidarse muchas características moleculares generales para los organismos, la existencia de un código genético común son algunos de ellos y el flujo que sigue la información génica para poder expresarse (Fig. 1A).

Desde que comenzaron los estudios del código genético y la regulación del operón de lactosa a mediados del siglo pasado (Mattick, 2003a), se creyó que la regulación de la información génica era una tarea exclusiva para las proteínas (Fig.1B). Esta convicción fue generada a partir del dogma central de la Biología, el cual versa en lo siguiente: la información fluye del DNA a las proteínas, a través de un intermediario, el RNA. De aquí es fácil generalizar el siguiente enunciado, un gen equivale a una proteína *ergo* a una función (Michalak, 2006). Este enunciado no es totalmente inclusivo ya que diversos estudios de genomas completos arrojan una serie de datos *a posteriori* que colocan al RNA como una molécula multifuncional (Fig.1C).

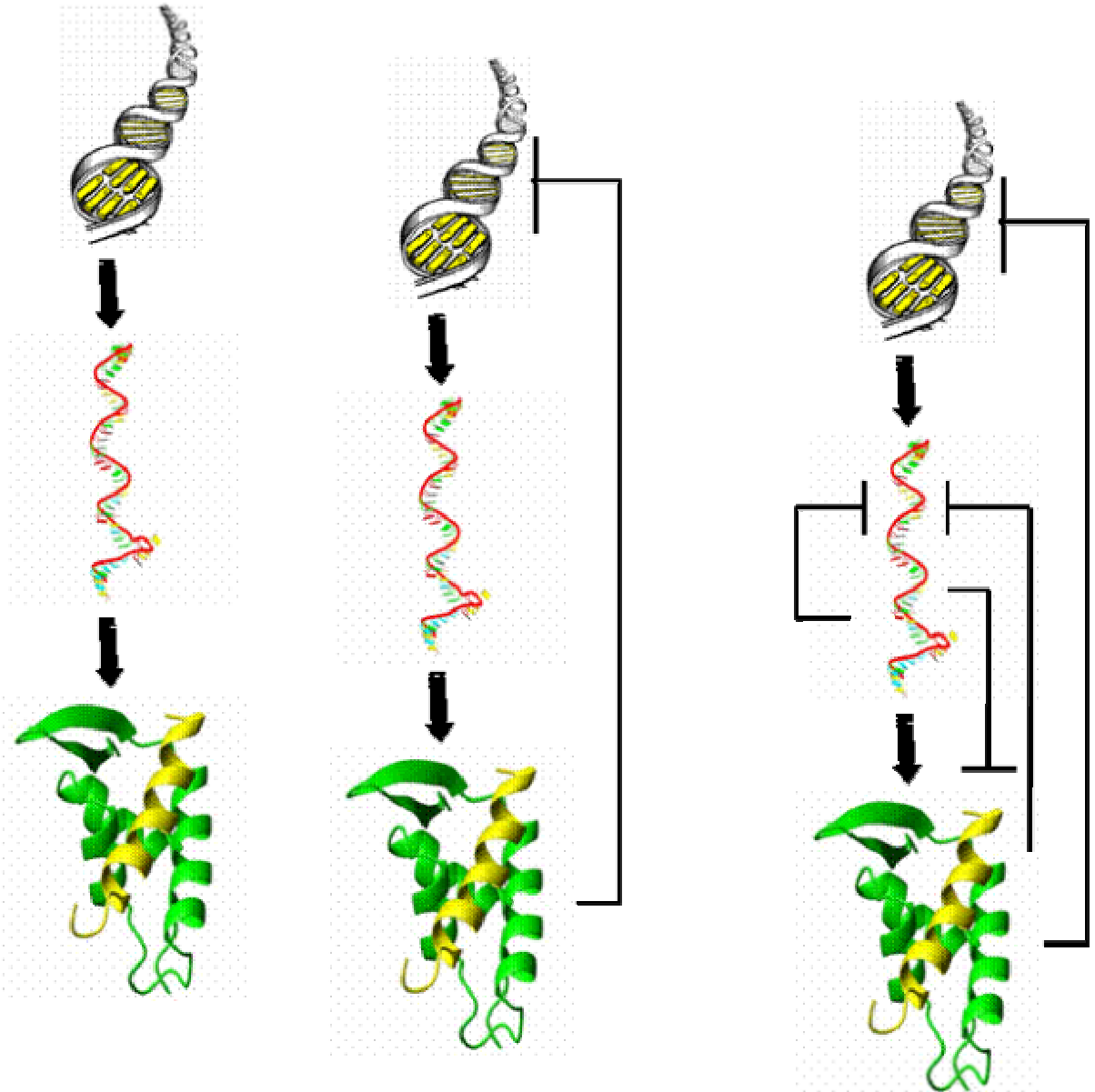
La funcionalidad del RNA ha generado una maravillosa percusión conceptual en las redes de regulación génica, hallándolos regulando diversos procesos celulares (Tabla 1). Se les han asignado una variedad de nombres; el termino RNAs pequeños (en inglés small RNA, sRNA) es empleado de manera predominante en bacterias, mientras que el término RNA no codificante (por sus siglas en inglés non-coding RNA, ncRNA) se ha aplicado mayormente en eucariontes (Storz, 2002a). Esta división no es natural se ha generado por definiciones aisladas de los distintos RNAs funcionales (fRNA).

La funcionalidad que ocupa el RNA como un gen continúa descifrándose, aun así, existen características que los distinguen (Fig. 2). Los primeros estudios de los fRNA se enmarcan a continuación.

*El rol central del RNA en la traducción.* Ya en la década de los 50s era conocido que la molécula que contenía la información genética de las células era el DNA y que éste se localiza en el núcleo eucarionte. Adicionalmente se sabía que la síntesis de las proteínas se realizaba en el citoplasma, con abundante presencia de moléculas de RNA que podían encontrarse en partículas discretas en el citoplasma a los que se les llamó ribosomas (1958). Con esta información, James Watson esboza el "Dogma central de la Biología Molecular" al inicio de 1952. En dicho dogma se establecía que la información genética



codificada en el DNA, era transferida al RNA para que a su vez fuera transmitida a la maquinaria de síntesis de proteínas en el citoplasma (Eddy, 2001e).

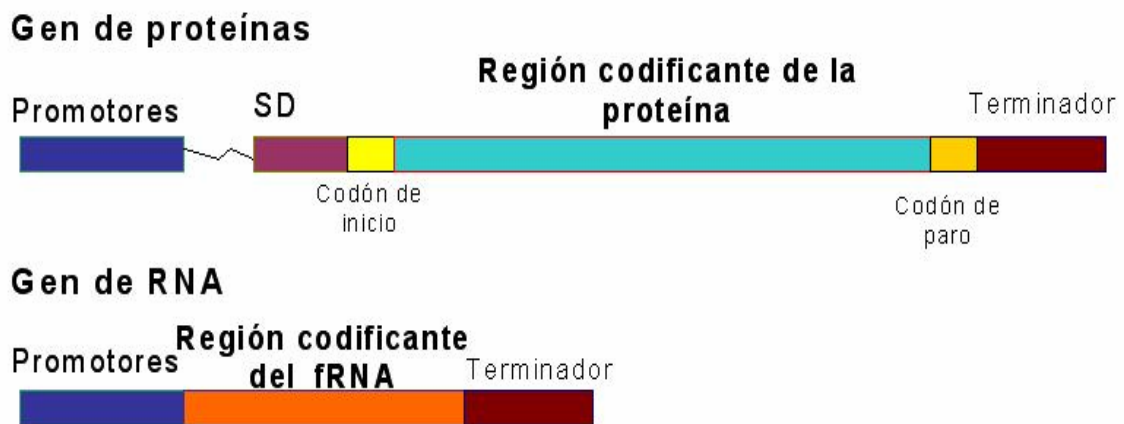


**Fig. 1. Diferentes modelos del flujo de información.** A) El dogma central de la biología, el DNA se transcribe al RNA y éste se traduce a proteínas. B) También la transcripción es regulada por proteínas (Jacob y Monod). C) Las proteínas también regulan al mRNA, y el mRNA se puede autorregular (en cis) y puede regular a otros mRNA, el concepto de fRNA.

La parte que se ha olvidado, ya que era errada, es la hipótesis “un gen, un ribosoma, una proteína”; donde cada gen produce y utiliza un ribosoma especializado (para dicho gen), compuesto por un mRNA específico asociado a proteínas ribosomales generales que catalizan la traducción. Varios resultados que socavan esta hipótesis, incluyen la simple observación donde los genes pueden tener una gran variedad de tamaños y composición de bases, los ribosomas no varían, por lo que no son específicos para cada proteína. Finalmente, los ribosomas se encuentran asociados en maquinarias RNA/proteína, el rRNA (RNA ribosomal) que los conforma se encuentra de manera estable

y programada con varios mRNA inestables que son sólo una pequeña fracción de la población total de RNA (Eddy, 2001d).

La segunda clase de fRNA fue predicha por Francis Crick con la hipótesis del “RNA adaptador” (Eddy, 2001c). Crick predijo la existencia de una molécula intermediaria entre un triplete de bases de DNA y los aminoácidos codificados por el DNA que forman a las proteínas. Crick argumenta que el RNA no es únicamente un adaptador sino una molécula cuya tasa de evolución era superior a la de las proteínas (Eddy, 2001b), (ahora sabemos que esto no es cierto, ej, la tasa de evolución de los tRNA es muy lenta). Esto debido a que el apareamiento que lleva a cabo hace al RNA el apropiado de manera exclusiva para cubrir el papel, por ser pequeño y específico para el reconocimiento mRNA:RNA:aa. El adaptador de Crick, fue de hecho observado bioquímicamente por Mahlon Hoagland y colaboradores en 1958, este RNA es el que ahora llamamos RNA de transferencia o tRNA (Eddy, 2001a).



**Fig. 2. Diferencias y similitudes entre genes que codifican para proteínas y/o para RNAs funcionales.** Todos los genes presentan promotores y terminadores transcripcionales. Los genes de proteínas presentan secuencias de reconocimiento para subunidades ribosomales ej. la secuencia Shine-Dalgarno, un codón de inicio y paro de la traducción y ORFs. Los genes de fRNA presentan una región que codifica para RNAs altamente estructurados cuando éstos son transcritos.

El primer RNA no codificante identificado fue descrito en 1960, en base a su alta expresión (Storz, 2002b). Otros fRNAs fueron obtenidos por mutaciones aleatorias e identificados por fenotipos resultantes de su falta de expresión. El descubrimiento fortuito de muchos de estos RNAs no codificantes fue el primer indicio de su existencia (Storz, 2002c).

Los primeros fRNAs que no pertenecían al grupo de RNA mensajeros, ribosomales o de transferencia que fueron detectados y aislados bioquímicamente, eran ricos en uridinas. Muchos de estos RNAs pequeños están asociados con proteínas para formar complejos de ribonucleoproteínas (RNP). Su caracterización inicia en 1980 con el descubrimiento en ciertos pacientes con enfermedades autoinmunes, como es el lupus sistémico eritematoso, el cual produce anticuerpos anti-RNP, los cuales se utilizaron para inmunoprecipitar pequeñas RNPs (Eddy, 2001g). En muchos de los complejos de RNPs precipitados se aislaron RNAs, los cuales fueron llamados pequeños RNA nucleares (snRNA) U1, U2, U4, U5 y U6 que son componentes del splicesoma relacionado con el proceso de splicing alternativo del mRNA eucarionte. Otros U-RNAs –U4atac, U6atac, U11

y U12- han sido encontrados como componentes de la segunda especie de splicesoma (1996).

Adicionalmente a los RNAs antes mencionados, numerosos RNAs nucleolares o snoRNA (small nucleolar RNA) fueron aislados bioquímicamente en 1999. Otros casos por fracciones bioquímicas que han sorprendido al contener RNAs esenciales incluyen el aislamiento de la ribonucleasa P (1978) y al complejo de ribo-proteico llamado SRP-RNA (Signal Recognition Particle) involucrado en el transporte específico de ciertas proteínas al retículo endoplasmático, y en la membrana plasmática en procariontes (Eddy, 2001f).

En 1984, Coleman *et al* descubren en *Escherichia coli* la presencia de un tipo de RNA al que llamó mic-RNA (mRNA-interfering complementary RNA). Este tipo de RNA presentaba la característica de contener la secuencia complementaria (antisentido) de una región del mRNA al que se unía mediante uniones Watson-Crick, regulando su expresión *in trans* (Coleman et al., 1984).

En base a la caracterización de los diferentes fRNA y a la obtención acelerada de secuencias de genomas completos, comenzaron las búsquedas sistemáticas de RNA no codificante (ncRNA) en bases de datos genómicas, aumentando la búsqueda desde 1998. Los criterios de identificación de los candidatos a ncRNA han sido los siguientes: i) se localizan en regiones intergénicas largas; ii) son precedidos por promotores huérfanos, iii) son precedidos por terminadores transcripcionales Rho independientes (Storz, 2002d).

Un ejemplo ampliamente referido en la literatura en torno a los ncRNA, son los datos obtenidos en el estudio del transcriptoma humano (Mattick, 2003b). En dicho estudio se obtuvo un estimado de alrededor del 97% al 98% de los transcritos pertenecen a fRNA. Este estimado está basado en el siguiente hecho, los intrones corresponden al 95% de transcritos primarios que codifican para las proteínas (pre-mRNA) y, aparte, un rango de observaciones que sugieren que hay una larga lista de transcritos sin marcos de lectura abierta sustancial, los cuales potencialmente pueden codificar para fRNA, representando al menos la mitad de todos los transcritos. Análisis detallados de *loci* particulares de la  $\beta$ -globulina y otros *loci* de mamífero, muestran que al menos en esta región se transcriben fRNA. Muchos de los descubrimientos de los microRNA se derivan de los estudios realizados en regiones intergénicas. Se ha reconocido el inicio de la transcripción de los fRNA y se cree que el descubrimiento de los miRNA representa solamente la punta del iceberg.

El hecho es, el RNA de manera específica controla la actividad de la expresión génica de distintas maneras. Sin estos RNA se perderían las células troncales, el músculo y el cerebro fallaría en su desarrollo, las plantas sucumbieran ante infecciones virales, la forma de las flores no sería funcional para que las abejas pudieran polinizarlas, las células fallarían al dividirse por carecer de la función de los centrómeros, la secreción de la insulina estaría desregulada, varios mecanismos de retroalimentación no existirían por lo que las bacterias gastarían mucha más energía, la respuesta a estrés de las bacterias sería distinta..... y así, se podría seguir enunciando muchos más procesos celulares. Así es, la organización celular en los distintos seres vivos se perdería de la manera en la que la conocemos, la evolución probablemente hubiese tomado otro camino y el mundo sería muy distinto al que es.

<b>Proceso</b>	<b>ejemplo</b>			<b>Función</b>
<b>Transcripción</b>	<i>E. coli</i>	6S	184nt	Modula el uso del promotor transcripcional
	Humano	7SK	331nt	Inhibe al factor de elongación transcripcional P-TEFb
	Humano	SRA	875nt	Coactivador acoplado con receptores a esteroides
<b>Silenciamiento génico</b>	Humano	Xist	16,500nt	Requerido para la inactivación del cromosoma X
	Humano	Air	~100,000nt	Requerido para la expresión autosomal parental.
<b>Replicación</b>	Humano	telomerasa	451nt	Núcleo de la telomerasa y templado del telómero
<b>Procesamiento de RNA</b>	<i>E. coli</i>	10S. RNasa P	377nt	Núcleo catalítico de la RNasa P
	Humano	U2 snRNA	186nt	Núcleo del spliceosoma
<b>Modificaciones del RNA</b>	<i>S. cerevisiae</i>	U18 C/D snoRNA	102nt	Direcciona (señala) la metilación de 2'-O- ribosa del rRNA pre-ribosoma (biogénesis del ribosoma)
	<i>S. cerevisiae</i>	SnR8 H/ACA snoRNA	189nt	Direcciona la pseudouridilación del blanco del rRNA pre-ribosoma (biogénesis del ribosoma)
	<i>T. brucei</i>	gCYb gRNA	68nt	Direcciona la inserción y escisión de uridinas
<b>Estabilidad del RNA</b>	<i>E. coli</i>	RyhB sRNA	80nt	Generar mRNA blanco para la degradación
	Eucariontes	miRNA	?	Generar mRNA blanco para la degradación
<b>Traducción del RNAm</b>	<i>E. coli</i>	Oxy S	109nt	Represión traduccional mediante la oclusión del sitio de unión al ribosoma
	<i>E. coli</i>	DsrA sRNA	87nt	Activación traduccional mediante la prevención de formación de represores traduccionales
	<i>C. elegans</i>	Lin-4 miRNA	22nt	Represión traduccional mediante el apareamiento con el extremo 3' del mRNA blanco
<b>Estabilidad proteica</b>	<i>E. coli</i>	tmRNA	363nt	Adiciona etiquetas a las proteínas para la proteólisis.
<b>Translocación proteica</b>	<i>E. coli</i>	4.5S RNA	114nt	Componente integral de la partícula de reconocimiento implicada en la translocación proteica en las membranas.

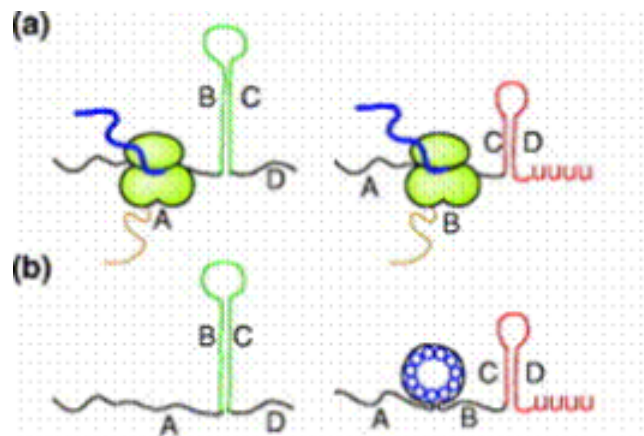
Tabla 1. Categorías generales del RNA hasta 2002. (Storz, 2002e)

## REGULACIÓN en cis en bacterias por fRNA.

Muchas bacterias usan dos diferentes mecanismos para terminar la transcripción de sus distintos tipos de RNAs, designados como intrínsecos cuando la terminación se da sin el auxilio de elementos proteicos, y factor dependiente en caso contrario.

En el primer tipo de terminadores, los terminadores intrínsecos, un segmento de RNA sintetizado por la RNA polimerasa, forma una horquilla estable seguida por una serie de residuos U (Fig. 3A). Esta horquilla inicialmente sirve como una señal para la pausa de la transcripción, después con la adición de residuos U la RNA polimerasa libera del complejo formado junto con el transcrito y el templado de DNA. Este tipo de terminación comúnmente se encuentra al término de las unidades transcripcionales bacterianas para delimitar la longitud del RNA a ser transcrito. La terminación transcripcional intrínseca también se ha encontrado al inicio de unidades transcripcionales. En este caso, existe un mecanismo de regulación, llamado atenuación, que modula la formación del terminador bajo señales intracelulares determinadas. La atenuación transcripcional involucra la formación de estructuras alternas, mutuamente excluyentes, designadas como antiterminador y terminador. El antiterminador, como su nombre lo indica, impide la formación del terminador transcripcional y posee una secuencia que es común con una de las hélices del terminador. La elección entre una estructura secundaria y otra, se da en respuesta a señales intracelulares tales como la deficiencia de algún aminoácido o la concentración de ciertos metabolitos ((Henkin and Yanofsky, 2002); Merino and Yanofsky, 2005).

En la terminación factor dependiente, el mecanismo se ejerce por proteínas, como el llamado factor Rho o TRAP (fig. 3B). Estos factores se unen a secuencias específicas de reconocimiento y a un transcrito desestructurado, progresa en la dirección 3'. Si Rho entra en contacto con la RNA polimerasa en el sitio de pausa de la transcripción, la polimerasa libera el transcrito abortando la transcripción. La terminación Rho-dependiente puede ser modulada de varias maneras; al controlar el acceso de la proteína Rho al transcrito, o por la alteración de la sensibilidad de la RNA polimerasa a las señales de pausa.



**Fig. 3. Atenuación** mediada por terminadores intrínsecos. A) Atenuación dependiente de la velocidad de traducción. B y C apareados forman el antiterminador. C y D apareados seguidos de uridinas forman el terminador traduccional. B) Atenuación mediada por proteínas de unión a RNA. Figura tomada de (Merino and Yanofsky, 2005).

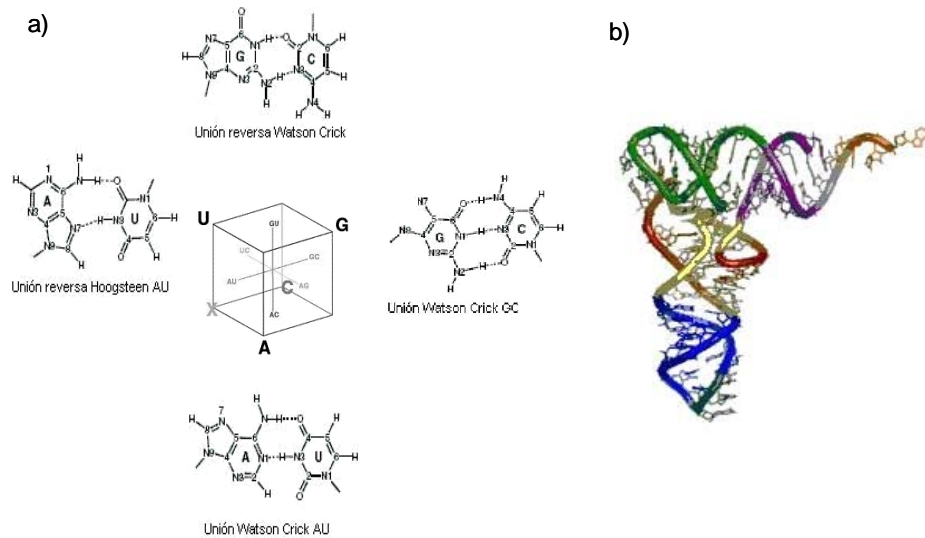
La regulación de la expresión genética que está basada primariamente en el RNA, pudo haber existido y evolucionado desde los principios de la vida misma. Posiblemente, en las primeras etapas del surgimiento de la vida, las moléculas de RNA pudieron haber servido como el principal reservorio del material genético y simultáneamente como elemento de regulación (un ejemplo actual de esto es la ribozima hammerhead en los viroides de plantas). Es claro que dadas las ventajas de estabilidad y fidelidad en el copiado, una molécula basada en una doble cadena de ácido nucleico, como es el DNA, pudo haber desplazado la función de almacenamiento de la información genética originalmente contenida en el RNA.

### **Plegamiento del RNA**

Aun con un alfabeto limitado a 4 letras y fuertes interacciones entre secuencias apareadas (Fig. 4a), el RNA puede adoptar estructuras secundarias y terciarias complejas (Fig. 4b). El plegamiento hace que el RNA adquiera, según la secuencia primaria, funcionalidad catalítica, estructural o de regulación de la expresión génica (Xayaphoummine et al., 2005a). Las posibles interacciones químicas entre bases nucleotídicas del RNA pueden generar distintos apareamientos, incluso diferentes a los canónicos (Watson-Crick), lo que estadísticamente aumenta las posibilidades de interacción entre las bases de la misma cadena y/o con cadenas distintas, generando una gran diversidad estructural.

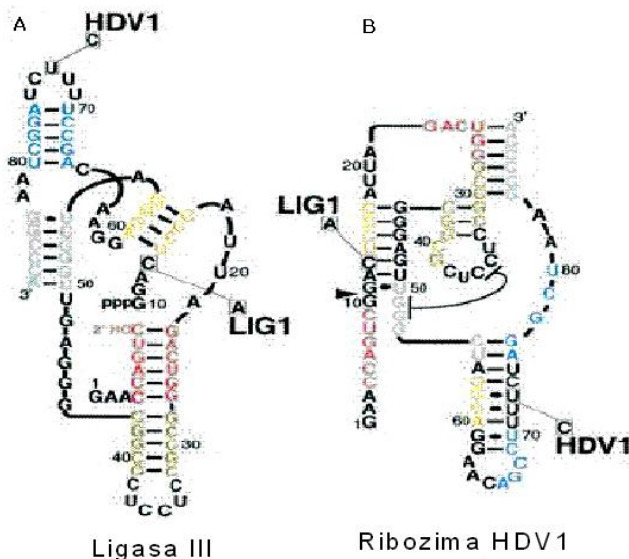
No es claro cómo es que los dominios de plegamiento actúan secuencialmente e independientemente, dando lugar a interacciones complejas entre los dominios y las hélices individuales. Switches transcripcionales de RNA proveen ejemplos de rutas de plegamiento co-transcripcional con competición local entre hélices nuevamente formadas y de estructuras alternas (ej. estructuras de terminadores y antiterminadores fig.3). Estos switches de RNA son naturales, se encuentran típicamente en virus o genomas de plásmidos y en bacterias en el mRNA localizado en la región que no se traduce (UTR) donde regulan la expresión de genes al nivel de regulación de la elongación transcripcional y la iniciación traduccional. Los cambios estructurales controlan la función reguladora que podría corresponder a la alternancia de estructuras o a una ruta de plegamiento co-transcripcional causada por la unión a un efector. Alternativamente, estas estructuras pueden operar a través de espontáneas o asistidas relajaciones de un plegamiento co-transcripcional metaestable (Xayaphoummine et al., 2005b).

La síntesis química de ssDNA usualmente procede del extremo 3' y continua hacia el extremo 5', la transcripción biológica siempre procede del extremo 5' hacia el 3', con tasas típicas de procesamiento que varían de 5 a 500 bases por segundo. El apareamiento helical puede ser formado mucho más rápido que el mismo proceso de síntesis, la cadena comienzan a plegarse mientras que la secuencia río abajo aún se está transcribiendo. En principio, las rutas de plegamiento generan información que se traduce dentro de una sucesión estable de estructuras intermediarias, "conspirando" contra la ruta guía de la cadena dentro de una posibilidad específica de configuración atrapada (Isambert and Siggia, 2000). Dicho de otra manera, el RNA en función a los elementos con los que cuenta se estructura; cuando se incorpora un nuevo elemento a la cadena, se reestructura para dar lugar a un plegamiento, que puede ser distinto o igual al anterior.



**Fig. 4. Interacciones químicas y estructurales entre las bases nucleotídicas que conforman el RNA.** a) Tipos de uniones entre las bases del RNA. b) Estructura terciaria del tRNA.

Evolutivamente se presenta un fenómeno catalítico en proteínas o en secuencias de RNA relacionadas, las cuales potencialmente pueden tener el mismo plegamiento pero llevar a cabo distintas funciones bioquímicas (Schultes and Bartel, 2000b). De manera inversa en el RNA una misma secuencia puede plegarse de manera distinta adquiriendo dos papeles catalíticos potencialmente distintos. Esto se ejemplifica en la Fig. 5, en donde se presentan dos ribozimas con actividades catalíticas distintas. Estas ribozimas comparten la misma secuencia, pero la ruta de plegamiento que toman es diferente cuando varían las condiciones del medio, siendo así un mecanismo de estímulo-respuesta.



**Fig 5. Una secuencia, dos plegamientos.** La misma secuencia de nucleótidos puede tomar diferentes rutas de plegamiento, en una condición puede llevar a cabo la reacción de la ligasa III (A) y en otro momento el de la ribozima HDV1 (B). Figura tomada de (Schultes and Bartel, 2000a).



## SELEX.

El estudio de proteínas que se unen a DNA de manera específica, está relacionado con la colección y comparación de un número de sitios de unión. Gold y Tuerk en 1990 estudiaron en el bacteriofago T4 la interacción que se da entre el mRNA de la T4 DNA polimerasa (gp43) y su propio sitio de unión al ribosoma (Tuerk and Gold, 1990). Esta unión de la proteína gp43 a su propio mRNA en la secuencia Shine-Dalgarno previene la traducción del mensajero, por lo que realiza una regulación autógena. El tamaño mínimo del blanco es de 36 nucleótidos, el cual incluye hélices de 5pb y 8 nucleótidos que forman un asa en el RNA, comúnmente denominada "loop" (cuya traducción del inglés al español significa vuelta). Para elucidar la participación del loop en el reconocimiento molecular, desarrollaron un método de selección rápida utilizando como templado el sitio de unión al ribosoma a partir de una población de secuencias asarosas. A este método lo llamaron SELEX (Systematic Evolution of Ligand by Exponential Enrichment) el cual se ilustra en la Fig. 6.

Este método está relacionado en un mecanismo usualmente adscrito en el proceso de evolución: variación, selección y replicación. Un pool de RNAs con secuencias completamente asarosas en posiciones específicas, son sujetos a selección por la unión a un blanco interactivo (ej, gp43 en filtros de nitrocelulosa interactuando con secuencias de RNA asarosas y variadas). Los RNAs seleccionados son amplificados en dobles cadenas de DNA haciéndolos competentes para una transcripción *in vitro* (los oligos contienen el promotor T7). Los nuevos transcritos de RNA son amplificados a partir de las mejores secuencias unidas al blanco y son sujetos a un nuevo ciclo de manera iterativa. Múltiples ciclos de enriquecimiento resultan en un incremento exponencial de las secuencias con mejor ligamiento con el blanco (Gold *et al.*, 1997). El experimento usualmente se realiza con  $10^{14}$ - $10^{15}$  secuencias únicas de oligonucleótidos como librería inicial.

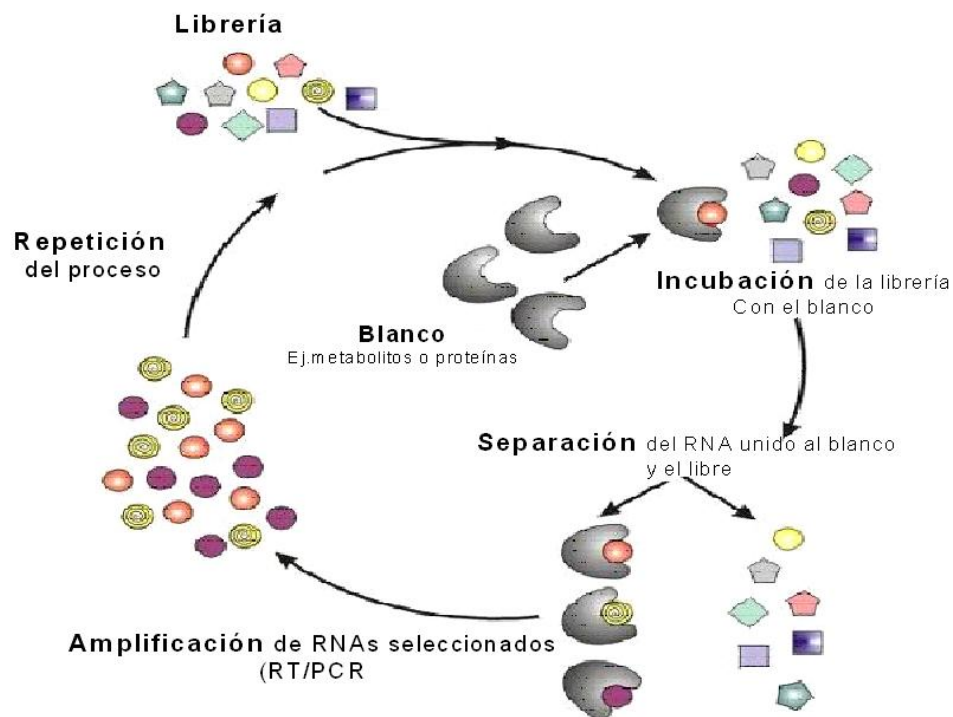


Fig. 6. Metodología SELEX.



De esta manera emerge SELEX, el único método utilizado para la generación de aptámeros sintéticos (secuencias de RNA que realizan interacciones físicamente con un metabolito blanco de manera específica); siendo ampliamente empleado para los estudios de interacción entre moléculas de RNA y proteínas o interacciones RNA con DNA. Los resultados de esta técnica han generado una serie de artículos que aumentan en el tiempo de manera exponencial (Gráfica 1), lo que implica la alta eficiencia de esta metodología basada en los principios de la evolución.



**Gráfica 1. Publicaciones anuales de SELEX a partir de 1990 hasta inicios de 2007.**

### **RIBOSWITCHES: La convergencia de dos conceptos.**

Para el 2001 SELEX ya era una técnica popular, el promedio de publicaciones al año era superior a 20. La secuenciación de los genomas también iba en aumento de manera exponencial. La región de los genes que se traduce como la que no se traduce (UTR) estaba siendo analizada por diversos grupos dadas las características que se expusieron anteriormente de los ncRNA y sitios consenso que se encontraban con estudios bioinformáticos.

En México en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, Juan Miranda y colaboradores descubren un mecanismo de regulación que actúa *en cis* en el mRNA del operón implicado en la síntesis de tiamina en *Rhizobium etli*.

La Tiamina, conocida como vitamina B<sub>1</sub> y el cofactor Tiamina pirofosfato, conocida como cocarboxilasa, son elementos clave para muchas enzimas implicadas en el metabolismo del carbono como son la piruvato deshidrogenasa,  $\alpha$  -cetoglutaratodeshidrogenasa, transcetolasa, piruvato descarboxilasa, y otras enzimas (Miranda-Rios et al., 2001d). El genoma bacteriano comúnmente contiene los genes necesarios involucrados en la síntesis de la tiamina. Esta síntesis se realiza de manera continua si las concentraciones celulares de tiamina se encuentran en condiciones adecuadas, contrariamente si las concentraciones superan el umbral se inhibe la síntesis de este cofactor. Esta inhibición se lleva a cabo por retroalimentación, donde el producto de la ruta reprime la síntesis de las enzimas que lo producen. Aunque comúnmente las bacterias tienen la habilidad de hacer todos los complejos moleculares que necesitan para

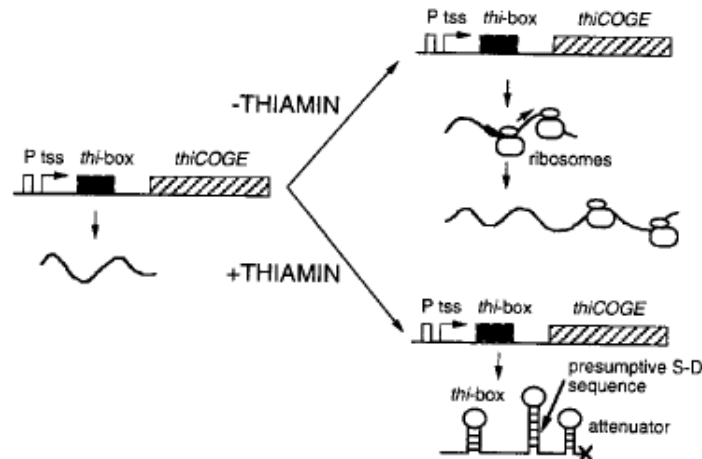
su crecimiento a partir de compuestos simples, éstos pueden ser tomados directamente de su medio ambiente en cuyo caso, la transcripción de los genes involucrados en las vías metabólicas correspondientes deberán de ser reprimidas. Esta respuesta regulada, requiere al menos una manera de sensar las concentraciones del producto y un mecanismo de regulación de la expresión de los genes dependientes de la concentración de su producto.

El mRNA para el operón *thiCOGE* en *Rhizobium etli* contiene en su secuencia líder 211 bases con dos características importantes: La primera, en *thiC* se forma una estructura de tallo y asa situada al lado del extremo 5' del codón de inicio AUG, el tallo se sobrelapa (incluye) con el sitio de unión al ribosoma. Dadas estas características espaciales y estructurales del mRNA se esperaba que este tallo de alguna manera inhibiera el inicio de la traducción. La otra característica es la llamada "caja *thi*", la cual consiste en la conservación de 38 nucleótidos en la región 5' del inicio de muchos genes en muchas especies relacionadas con la biosíntesis de tiamina. La relación de estos nucleótidos se esclarece al obtener su correspondiente estructura secundaria de RNA, ya que se obtiene el mismo plegamiento, contrastante en el sentido estadístico de aparición secuencial nucleotídica en el DNA, los cambios que se encuentran en la secuencia del DNA son compensados para mantener la estructura secundaria del RNA.

Miranda y colaboradores observaron que la eliminación de la caja Thi de la región líder del operón de tiamina provocaba una disminución en la tasa de traducción del primer gen del operón, *thiC* (Miranda-Rios et al., 2001c). Esta inhibición era debida a que en ausencia de esta caja, la región líder se plegaba en una estructura secundaria estable que incluía al sitio de unión al ribosoma de *thiC*. La caja thi de alguna manera libera el efecto inhibitorio intrínseco en presencia de TPP. Esto podría explicar las estructuras alternativas de RNA, en las cuales el switch es modulado por su unión a TPP. La concentración de este metabolito es sensada por una estructura de RNA en la región líder del mRNA que incluye a la caja *thi* y en respuesta a ella puede controlar la tasa de traducción. A bajas concentraciones de tiamina, una estructura alternativa en el sitio de unión al ribosoma se forma, permitiendo que el mRNA se una al ribosoma para su posterior traducción. De estos resultados se pudo concluir que a altas concentraciones de tiamina, la caja *thi* se une a la tiamina favoreciendo la formación de una estructura secundaria que incluye al sitio de unión al ribosoma de *thiC* y en consecuencia, la traducción de *thiC* es inhibida (fig. 7).

En el caso del operón de tiamina, los datos sugerían que la región líder del mRNA del operón de tiamina había evolucionado para actuar como un sensor de las concentraciones del metabolito en cuestión y adicionalmente ser responsable de un mecanismo de regulación en total ausencia de proteínas reguladoras. Esta idea está sustentada en los aptámeros obtenidos por SELEX de manera sintética.

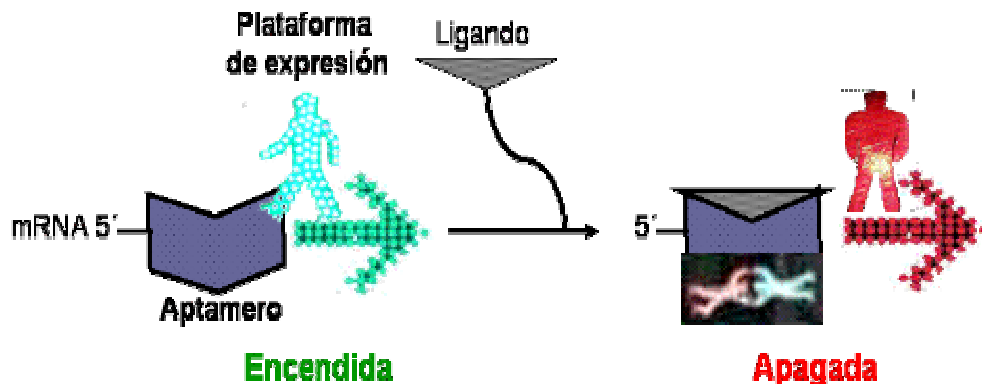
El modelo de estudio en la regulación del operón de tiamina en *Rhizobium etli* fue fundamental para entender nuevos sistemas de regulación génica por retroalimentación basada en sensores de RNA que reconoce a su correspondiente metabolito en total ausencia de proteínas reguladoras. A estos tipos de estructuras de RNA que ejercen el mecanismo de control génico se les denominó **Riboswitches** posteriormente por el grupo de Breaker encontrando el mismo mecanismo en un operón distinto, el relacionado con la cobalamina (Nahvi et al., 2002).



**Fig. 7. Modelo inicial de la regulación del operón de biosíntesis de tiamina por el elemento Thi-box.** Figura tomada de (Miranda-Rios et al., 2001b).

Los riboswitches están compuestos generalmente de dos dominios relacionados pero independientes: un dominio de unión al ligando o aptámero y una plataforma de expresión, la cual tiene una conformación precisa que impacta a la expresión génica (Fig. 8). Los aptámeros ya sean artificiales o naturales, presentan la propiedad de ligamiento adaptativo, en el cual la interacción con el ligando específico genera un rearrreglo estructural. La unión del metabolito al dominio del aptámero altera la conformación de la plataforma de expresión, *ergo*, la expresión génica (Soukup and Soukup, 2004).

La afinidad que exhiben los riboswitches por el metabolito blanco se ha examinado y sus valores han sido reportados en base a la constante de disociación aparente ( $K_D$  aparente) en rangos de  $\sim 5\text{nM}$  para guanina y SAM, y  $\sim 200\mu\text{M}$  para glucosamina-6 fosfato (Wickiser et al., 2005b). Es notable que la cantidad de la  $K_D$  aparente para el dominio del aptámero, no necesariamente corresponda con los valores que se han obtenido *in vitro*. Esto puede suceder por la presencia de estructuras alternativas formadas por el RNA que interfieren con el ligamiento del metabolito, la probabilidad de encuentro en el sistema celular, etcétera.

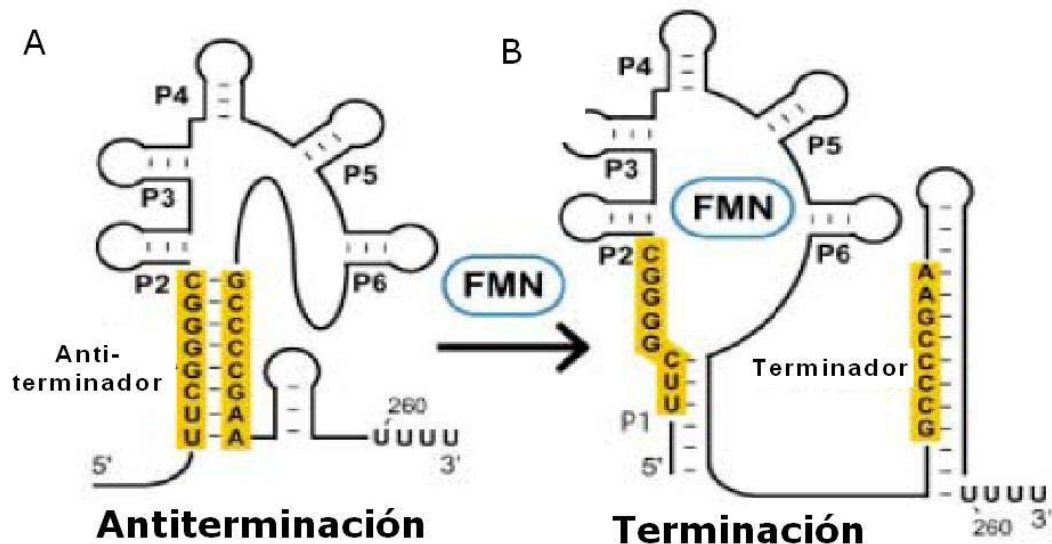


**Fig. 8. Mecanismo general de acción de los riboswitches.** Haciendo una analogía con los semáforos peatonales, cuando el aptámero se encuentra libre del metabolito blanco, se puede continuar transcribiendo o traduciendo el mRNA, pero cuando el metabolito se une con el metabolito (ligando) ocurre un cambio alostérico en la plataforma de expresión que como consecuencia bloqueará la expresión del gen inhibiendo la transcripción o la traducción.

## LOS RIBOSWITCHES REGULAN LA TERMINACIÓN TRANSCRIPCIONAL Y TRADUCCIONAL EN BACTERIAS.

En los genes bacterianos relacionados con la biosíntesis y el transporte de la riboflavina y el Flavin mono nucleótido (FMN), se identificaron en sus regiones líder un dominio de RNA altamente conservado referido como el elemento RFN. Distintos estudios en diferentes organismos han demostrado que este elemento es en realidad un riboswitch que es capaz de sensar las concentraciones intracelulares de la molécula FMN y en consecuencia modular la expresión genética de los genes involucrados en su síntesis o transporte. Tal es el caso del operón *ribDEHT* de *Bacillus subtilis* que posee un típico terminador transcripcional intrínseco justo en la región río arriba de la región codificante. Las transcripción *in vitro* de este operón fue evaluada en diferentes concentraciones de FMN. Se observó que en altas concentraciones de FMN, la transcripción terminaba prematuramente debido a que la unión de FMN con el aptámero favorecía la formación de un terminador transcripcional en la región líder del transcrito (Fig. 9) (Winkler and Breaker, 2003d).

El análisis de la estructura secundaria del riboswitch FMN muestra dos rutas de plegamiento distintas. La primera ruta incluye una estructura secundaria que constituye un antiterminador, llamado así porque comparte algunos de los nucleótidos que se requieren para la formación del terminador transcripcional intrínseco (Fig. 9A), por consiguiente, si el antiterminador es formado el terminador no se formará porque ambas estructuras son estructuras mutuamente excluyentes. Cuando FMN y el aptámero realizan el ligamiento adaptativo, *a posteriori* propicia estructuralmente la formación del terminador transcripcional (Fig. 9B) (Winkler and Breaker, 2003a).

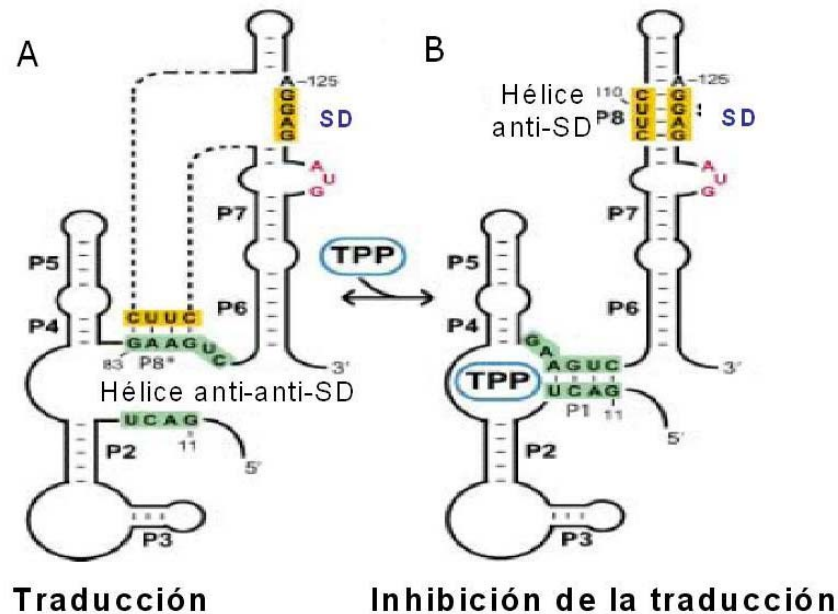


**Fig 9. Riboswitch FMN.** A) Estructura secundaria del riboswitch alternativa con la formación de un antiterminador transcripcional, las bases coloreadas en amarillo forman el antiterminador. B) Estructura secundaria del riboswitch FMN unida a su metabolito blanco, favoreciendo la formación de un terminador transcripcional, los nucleótidos amarillos en la estructura del terminador, son aquellos que se requieren para la formación del antiterminador. Figura tomada de (Winkler and Breaker, 2003c).

## LOS RIBOSWITCHES TAMBIÉN PUEDEN REGULAR LA INICIACIÓN DE LA TRADUCCIÓN DEL RNA EN BACTERIAS.

Un mecanismo alternativo para el control genético por riboswitches es la modulación del inicio de la traducción. Para ilustrar este tipo de regulación se citará el mecanismo de acción del riboswitch TPP (tiamina pirofosfato) de *Escherichia coli*.

El aptámero TPP realiza el ligamiento adaptativo con TPP en la región líder de *thiMD*, *thiBPO* y *thiCESGE*. A bajas concentraciones de TPP la secuencia SD se encuentra libre y accesible para la subunidad 16S del ribosoma (Fig. 10 A), existe una secuencia anti-SD la cual se encuentra apareada con una secuencia alterna llamada anti-anti-SD localizada dentro de la región del aptámero bajo esta condición. En contraste, durante las condiciones de exceso de TPP, el aptámero realiza el ligamiento adaptativo incluyendo en este la secuencia anti-anti-SD, quedando una sola oportunidad de apareamiento a la secuencia anti-SD, por lo que la secuencia anti-SD enmascara al SD al aparearse con él (Fig. 10 B), inhibiendo al inicio de la traducción, quitando la accesibilidad de la secuencia SD con la subunidad ribosomal 16S.



**Fig. 10. Mecanismo de regulación del riboswitch TPP mediante la inhibición del inicio de la traducción.** A) Estructura secundaria del riboswitch TPP en ausencia del metabolito blanco la hélice anti-anti-SD cuyos nucleótidos están enmarcados en color verde se encuentran desapareados, y una parte de la hélice se aparea con la secuencia anti-SD de amarillo; la secuencia SD se observa libre por lo que se puede traducir el mRNA. B) La hélice anti-anti-SD se observa formada por los apareamientos que se realizan posteriormente del evento de ligación adaptativa por el aptámero TPP. Se forma la hélice anti-SD cuyos nucleótidos se encuentran enmarcados de amarillo. La secuencia SD se encuentra enmascarada e inaccesible para el inicio de la traducción. Figura tomada de (Winkler and Breaker, 2003b).

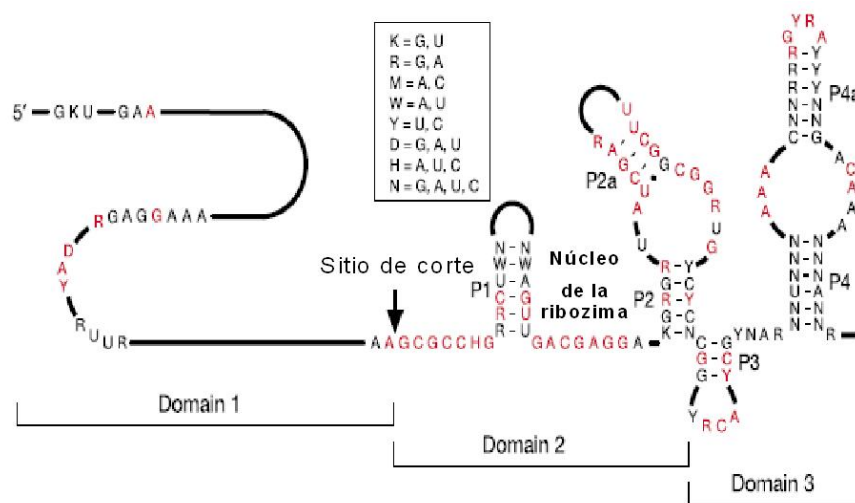
### El riboswitch cuya plataforma de expresión es un ribozima.

En la vasta mayoría de los riboswitches se ha descrito el control de la expresión génica mediante la terminación de la transcripción o por la inhibición de la traducción. El

gen *glmS* que codifica para la proteína L-glutamina:fructuosa 6-fosfato amidotransferasa, es una enzima que produce GlcN6P, este gen ha sido enfocado por estudios bioinformáticos y bioquímicos debido a que se descubrió la presencia de una ribozima *glmS* de *B. subtilis* y *B. cereus* codifica en el extremo 5' UTR. (Link et al., 2006b).

Esta tercer plataforma de expresión rompe el molde de los típicos riboswitches en el modo en el que la plataforma de expresión es una ribozima verdadera (Fig. 11), el RNA realiza un autocorte *per se* (Cech, 2004). El aptámero exhibe una excelente especificidad con sus análogos incluyendo glucosa 6-fosfato y glucosamida, pero estos análogos no estimulan la aceleración del corte. Aunque, la ribozima dependiente de GlcN6P representa una forma natural, posteriormente puede ser desarrollo por la ingeniería de ribozimas alostéricas e insertarse en otros genes para su regulación (Soukup, 2006).

Las características de la ribozima GlcN6P son: i) para que se realice el autocorte la ribozima aumenta su plegamiento aproximadamente a 1000 veces en presencia de 200µM del efector GlcN6P; ii) el efector está codificado en el gen *glmS* de *B. subtilis*; iii) el ligamiento no solo induce un cambio conformacional en la región líder de *glmS* en el mRNA, sino que activa una ribozima alósterica la cual corta río arriba del elemento de la ribozima. El corte ocurre 225 nucleótidos río arriba del codón de inicio AUG y conduce a la reducción de la expresión génica. El corte del RNA comparado con la falta de catálisis es acelerado  $10^7$  veces y múltiples iones de magnesio se unen para aumentar la tasa máxima de cambio, la cual es aproximadamente de  $3 \text{ min}^{-1}$  en presencia de GlcN6P y magnesio. El producto termina en el fosfato cíclico 2'3', indicando que la reacción de transesterificación inicia por un ataque nucleofílico en el oxígeno 2'. Esto datos sugieren que la reacción ocurre en la familia de ribozimas bajo el mismo principio en integrantes como las ribozimas cabeza de martillo, harpin, *Neurospora Vs* (Varkud satélite) y el virus Delta de la hepatitis (HDV) (Brantl, 2004b; Soukup, 2006).



**Fig. 11 Estructura secundaria del riboswitch GlcN6P.** El único riboswitch descubierto a la fecha que puede realizar el autocorte. Figura tomada de (Winkler et al., 2004b).

A partir de este descubrimiento se comenzaron a buscar secuencias consenso de dicho riboswitch para poder desarrollar técnicas en base a esta característica. En 2004, Brantl y colaboradores con 18 representantes de la plataforma de expresión semejante a la de GlcN6P, buscó la secuencia consenso y la estructura secundaria del motivo *glmS*. El resultado de este análisis reveló que el núcleo de la ribozima está constituido por menos

de 75 nucleótidos de la secuencia del mRNA que la contiene y que presenta dos estructuras en forma de loops que pueden ser predecibles. En total, toda la ribozima comprende 160 nucleótidos. Adicionalmente a lo anterior, Brantl y colaboradores demostraron que este riboswitch es modular y puede regular cualquier otro gen (Brantl, 2004a).

### **Rango de acción de los riboswitches.**

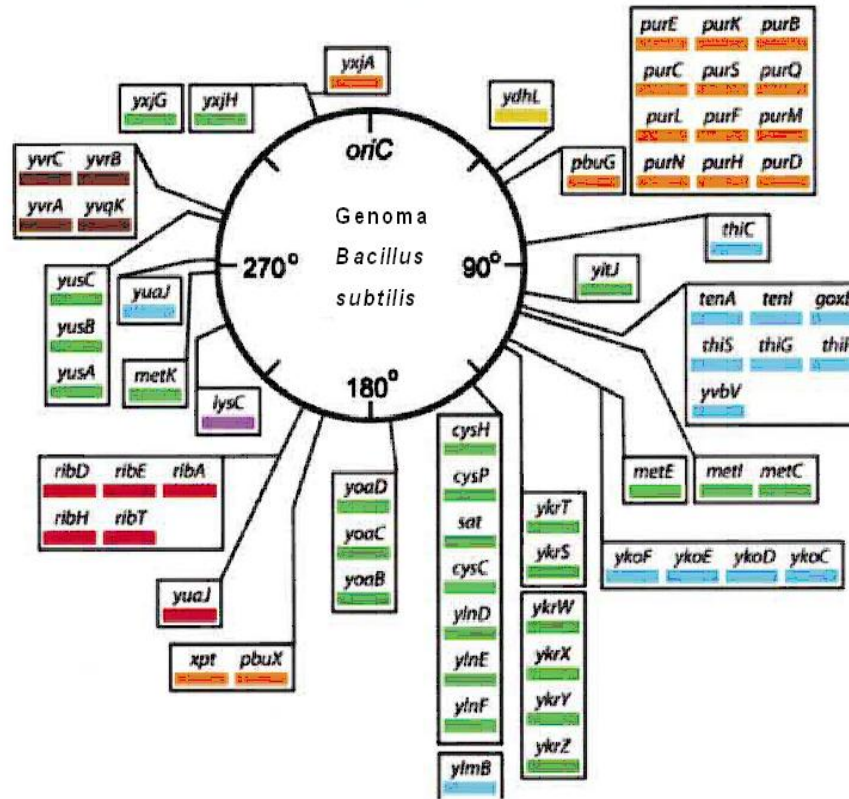
Los riboswitches están ampliamente distribuidos en bacterias, se han reportado diez clases (Fig. 12 y 14), algunas de las cuales previamente habían sido descritos como elementos reguladores conservados. Estudios bioinformáticos indican que un 3% de los genes en el genoma de *B. subtilis* son regulados mediante riboswitches (Mandal et al., 2003c)

Los riboswitches en eucariontes tienen un origen común con los procariontes unidos por el último ancestro común. Sudarsan y colaboradores investigando mediante técnicas de genómica computacional en eucariontes el dominio de la clase de riboswitches específicos para TPP, encontraron que éstos presentan una secuencia con una estructura consenso, por lo que en eucariontes los dominios de los riboswitches también se encuentran conservados (Sudarsan et al., 2003c). Genes putativos de la síntesis de tiamina en *Arabidopsis thaliana* acarrean elementos de RNA que conforman el aptámero TPP y la plataforma de expresión, en el extremo 3' UTR, elementos similares de RNA se encuentran en el arroz (*Oryza sativa*) y en el pato (*Poa secunda*). También se presenta en hongos como *Neurospora crassa* y *Fusarium oxysporum* (Sudarsan et al., 2003b). En plantas los genes homólogos presentes en hongos están localizados en genes que están implicados en la biosíntesis de tiamina, en cada caso tiene un papel en los niveles requeridos de la coenzima que modulan la expresión de los genes asociados. Comparando las funciones de las secuencias consenso en bacterias Gram positivas y Gram negativas, presentan una  $K_D \sim 50\text{nM}$ .

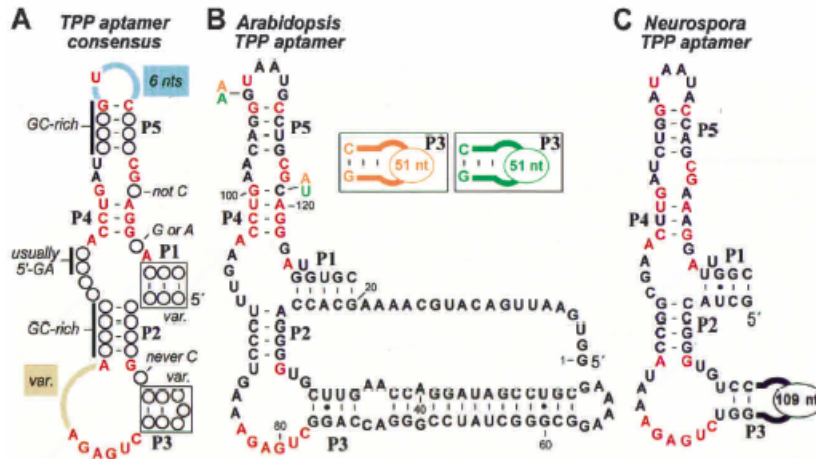
El aptámero TPP en plantas está localizado río arriba de manera inmediata del cuerpo de poli A. Es posible que el ligamiento del aptámero pueda regular los procesos y estabilidad del mRNA. Alternativamente la secuencia consenso del aptámero TPP (Fig. 13), identificado en el hongo *N. crassa*, los residuos se encuentran en los intrones (Sudarsan et al., 2003a), experimentalmente se ha comprobado que el splicing estar regulado por la unión del aptámero al metabolito en el preRNAm (Cheah et al., 2007).

La historia de los riboswitches aún no ha sido descrita. Aun no se han inventado o implementado métodos para estudiar la evolución precisa de éstos, sin embargo, la importancia y complejidad contextual es evidente, solo vasta observar la compilación de los mismos mostrada en la figura 14.



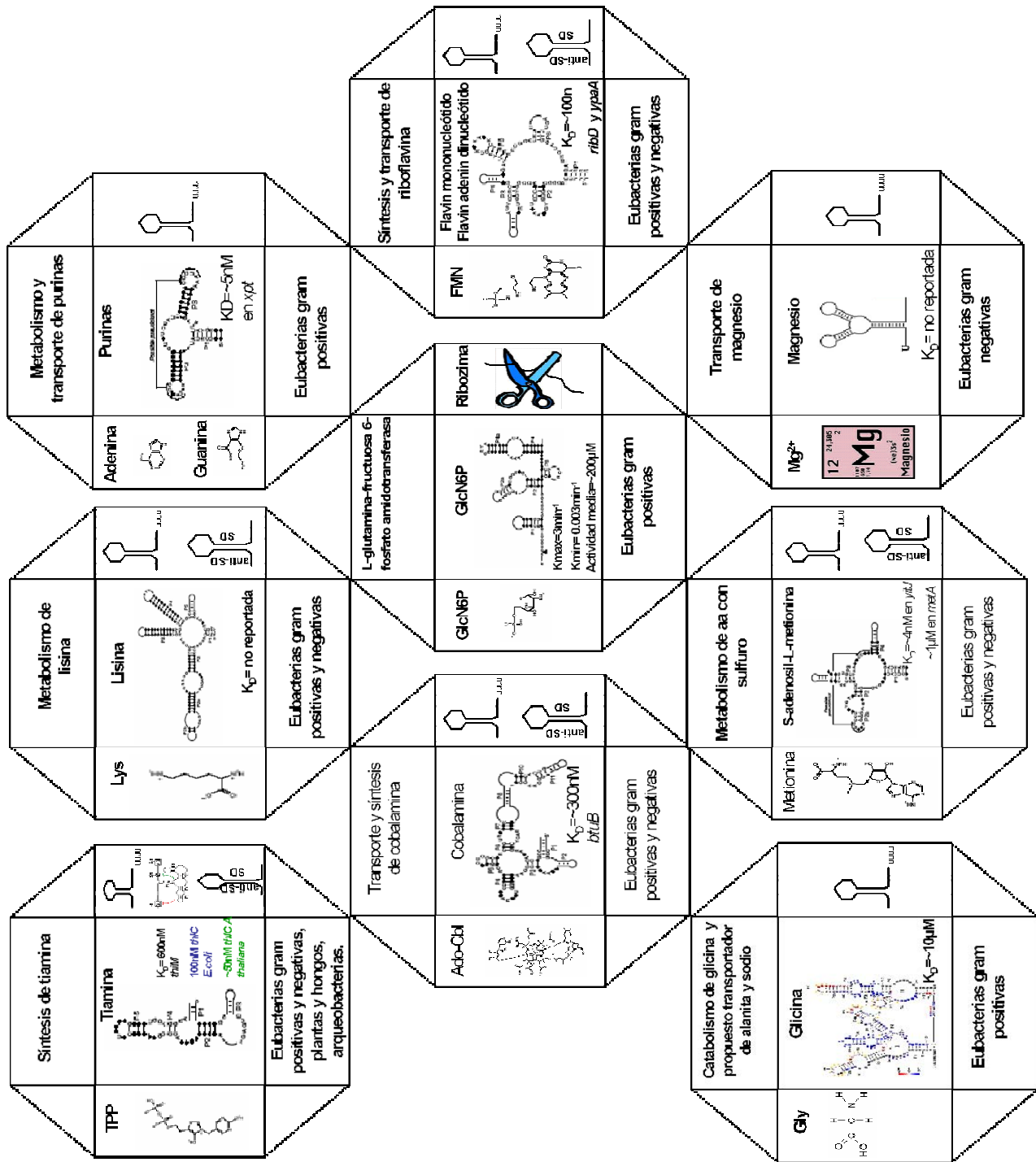


**Fig. 12.** Los riboswitches participan en el control de varias rutas metabólicas. Representación gráfica del genoma de *B. subtilis*, donde se posicionan las distintas clases de riboswitches. Figura tomada de (Mandal et al., 2003b).



**FIG.13** Riboswitch putativo de eucariotes. A) Estructura consenso del aptámero TPP, basado en la comparación de secuencia de 100 RNAs de bacterias y arqueas. Nucleótidos en rojo son los más conservados (>90%). Círculos abiertos representan la posición de los nucleótidos y dominios que varían en secuencia y largo de esta. B) El dominio del aptámero TPP de *A. thaliana*. Variación en *O. sativa* (naranja) y *P. secunda* (verde) se muestran. C) Aptámero putativo en intrones de *N. crassa*. Figura tomada de (Sudarsan et al., 2003d)

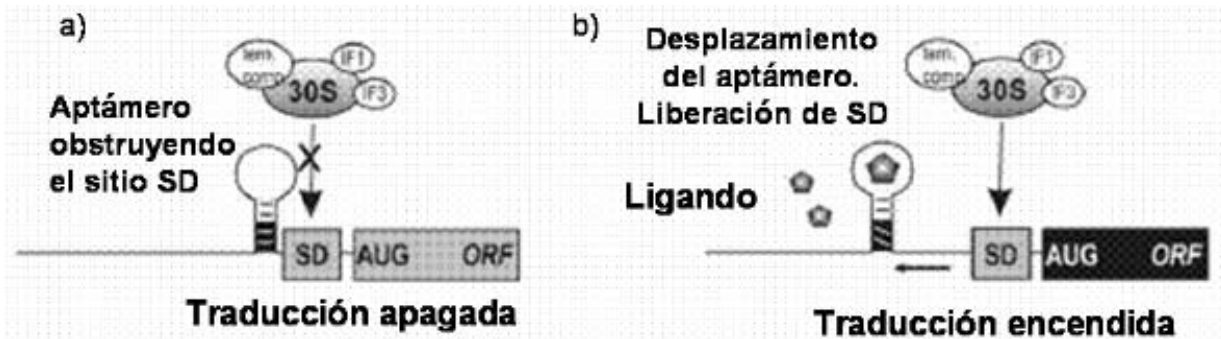




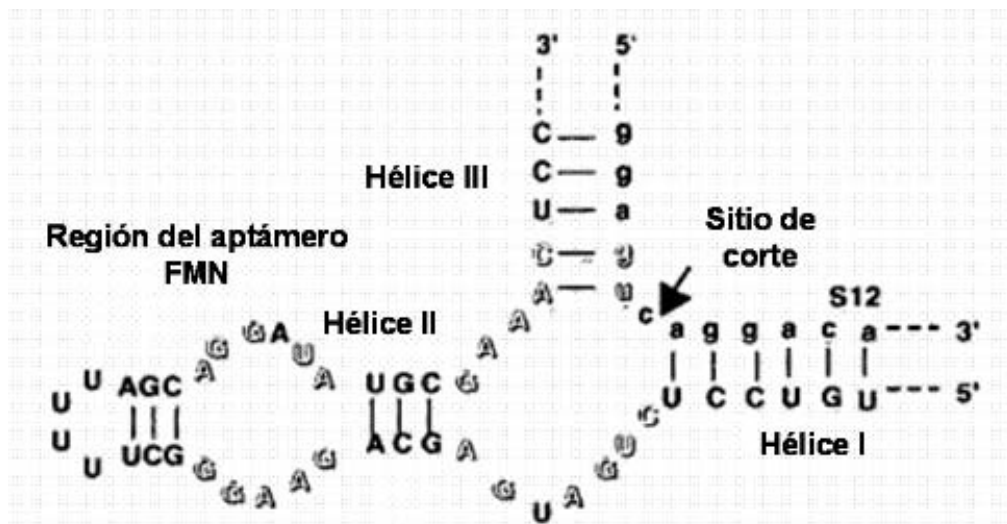
**Fig 14. Riboswitches, parte de la diversidad intrafuncional de la secuencia líder.** En la figura se resume gráficamente la información sobre los riboswitches conocidos a la fecha y publicados en los siguientes artículos científicos: (Barrick et al., 2004b; Batey et al., 2004; Borovok et al., 2006; Cromie et al., 2006; Edwards and Ferre-D'Amare, 2006; Hampel and Tinsley, 2006; Kim et al., 2005b; Klein and Ferre-D'Amare, 2006; Lemay et al., 2006; Lescoute and Westhof, 2005; Link et al., 2006a; Loenen, 2006; Mandal et al., 2004; Miranda-Rios et al., 2001a; Montange and Batey, 2006; Nudler and Mironov, 2004; Santillan and Mackey, 2005; Serganov et al., 2004; Soukup, 2006; Sudarsan et al., 2003f; Sudarsan et al., 2003e; Wickiser et al., 2005a; Winkler et al., 2003; Winkler et al., 2004a).

## Antecedentes

A la fecha se conocen dos clases de riboswitches sintéticos: aquellos cuya función regulatoria sólo requiere del posicionamiento preciso de un aptámero o una Ribozima Hammerhead en la región de reconocimiento entre el mRNA y la subunidad ribosomal (Fig. 15) (Bauer and Suess, 2006; Brackett and Dieckmann, 2006a; Breaker, 2002; Desai and Gallivan, 2004; Hanson et al., 2003; Hanson et al., 2005a; Kim et al., 2005a; Mandal et al., 2003a; Suess et al., 2004; Suess, 2005a; Werstuck and Green, 1998; Yen et al., 2004d) y los que están compuestos por un aptámero acoplado y estructuralmente con una ribozima (aptazimas o ribozimas alostéricas, fig. 16), la cual fungirá como la plataforma de expresión. Cabe resaltar que de esta segunda clase sólo se conocen ejemplos sintetizados cuya función se realiza en *trans* (Araki et al., 2001b) o en el extremo 3' (Win and Smolke, 2007).

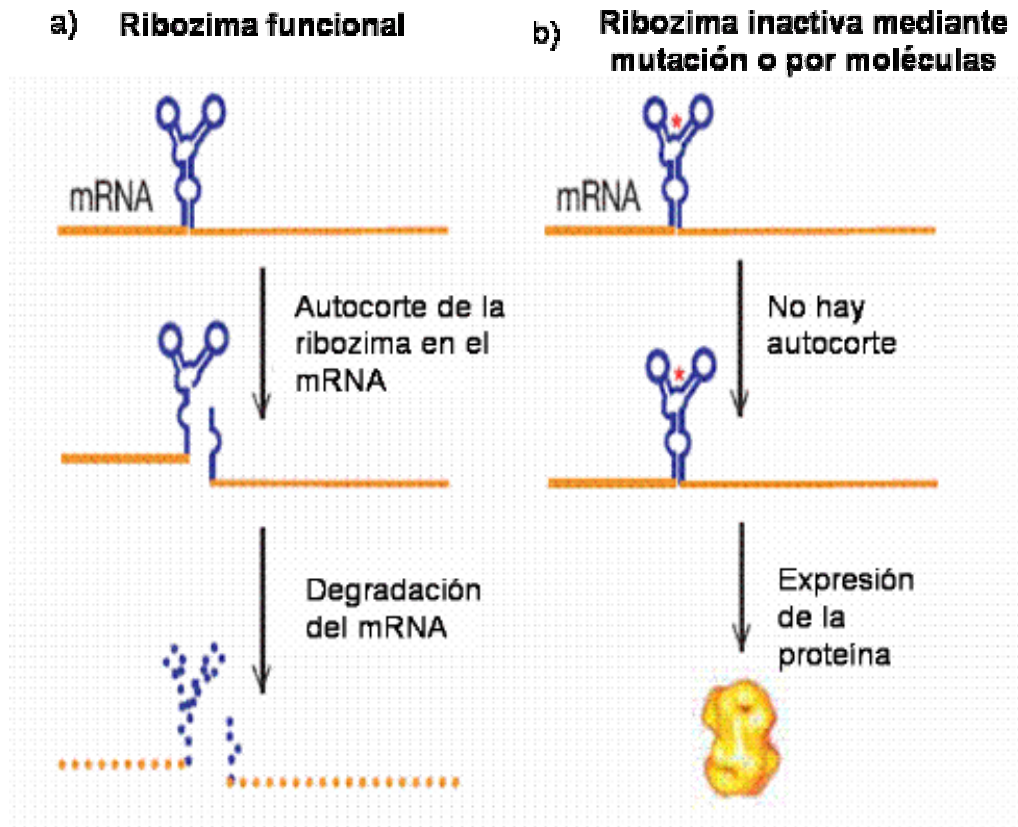


**Fig. 15. Aptámeros que funcionan como riboswitch.** a) El aptámero se encuentra posicionado 5 pb río arriba del SD lo que genera una obstrucción entre el SD y las subunidades ribosomales. b) Cuando el metabolito está disponible en el medio se une al aptámero generando un desplazamiento de la estructura, por consecuencia el sitio SD es liberado, por lo que es permitido el reconocimiento de la subunidad 30S y el SD. Figura tomada de (Suess, 2005b).



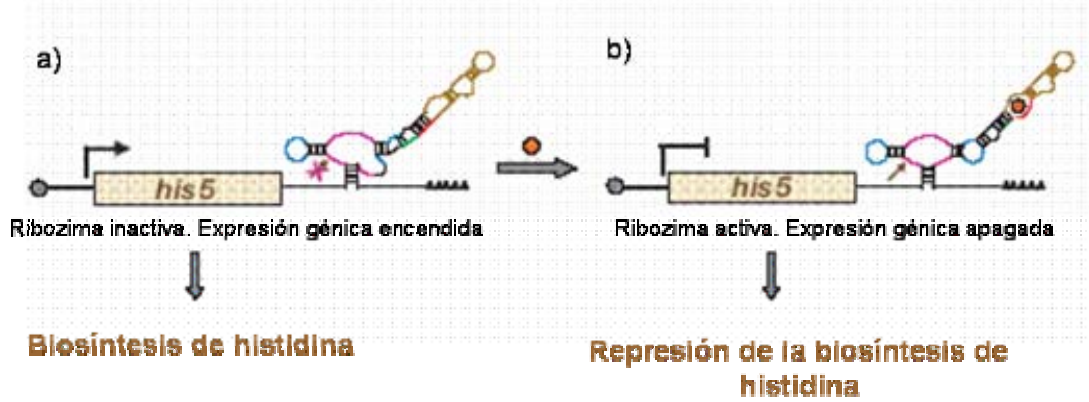
**Fig. 16. Estructura secundaria de una ribozima alostérica.** La modulación de la expresión de la ribozima está condicionada por la unión del metabolito con el aptámero. Cuando el aptámero se encuentra en su estado basal, el corte de la ribozima no se puede realizar y cuando el aptámero está unido al metabolito, la ribozima puede realizar el corte. Figura tomada de (Araki et al., 2001a) .

El caso más exitoso, ya que se aplicó en mamíferos y tuvo resultados impactantes. En esta ribozimas Hammerhead posicionadas en el sitio CAP (Yen, *et. al.*, 2004). Estas ribozimas fueron controladas por los inhibidores de la funcionalidad del corte de la Hammerhead como la toyokamicina o utilizando morfolinós (Fig. 17). Sólo se han descrito riboswitches sintéticos regulando negativamente de manera constitutiva y cuando éste encuentra al ligando permite la expresión del gen regulado.

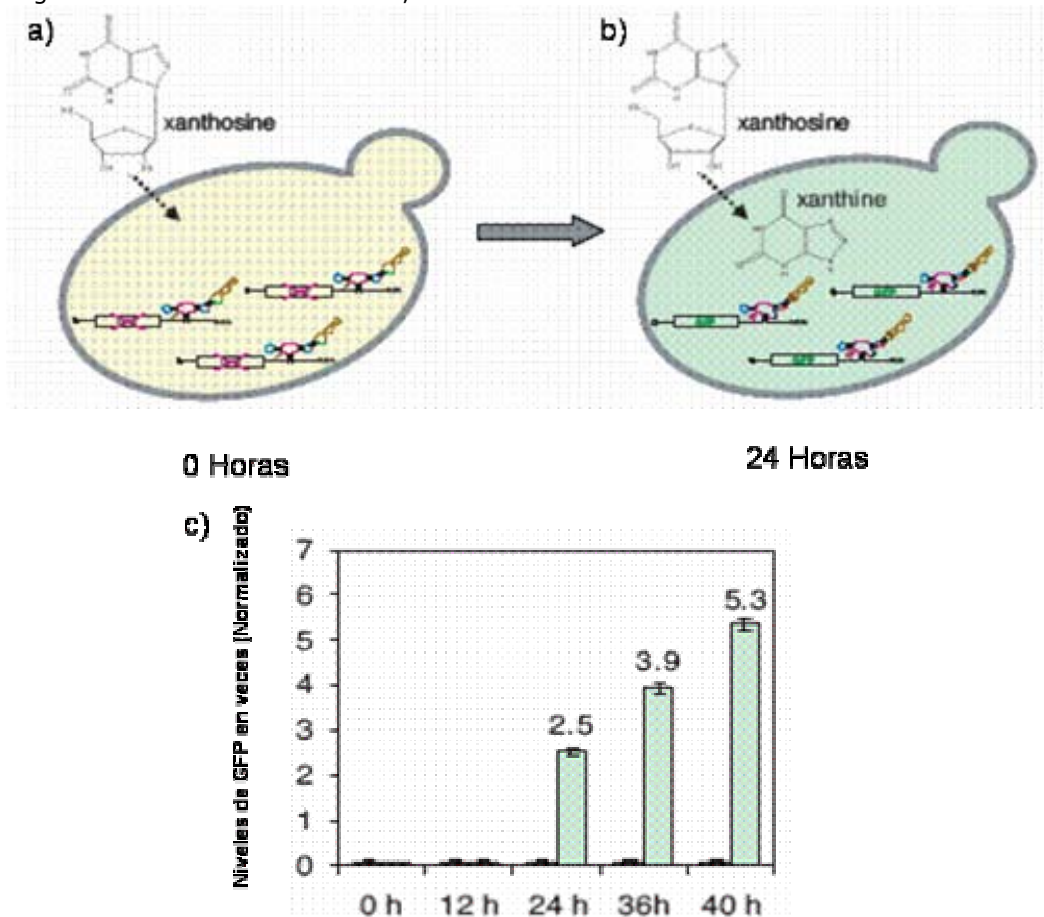


**Fig. 17. Mecanismo de acción de la ribozima Hammerhead en mamíferos.** a) La ribozima normalmente realiza el autocorte, b) pero cuando en el medio se encuentran moléculas que inhiben el autocorte ej. Toyokamicina o morfolinós, el autocorte se inhibe. Figura tomada de (Yen et al., 2004c).

Los riboswitches sintéticos son una herramienta dinámica para el estudio de las redes de regulación genómica, aunado a las posibilidades de SELEX los posiciona como una herramienta poderosa para el advenimiento de estudios de redes de regulación sintética, Genómica, Biología Molecular, Biomedicina, entre otros. Como lo demuestran muy recientemente *Smolke et. al.* al implementar la tecnología de riboswitches como reporteros de la condición de un metabolito en el sistema celular (Fig.18) y como antibióticos (Fig.19).



**Fig.18.** Los riboswitches pueden bloquear la expresión de genes esenciales para que la célula que los contiene muera. A) El riboswitch sintético de teofilina cuando el ligando no está en el medio permite la biosíntesis de histidina. B) Cuando la teofilina está en el medio y se une con el riboswitch se activa la expresión de la ribozima hammerhead, liberándose el sitio de poliadenilación, bloqueando la biosíntesis de histidina. Cuando no se sintetiza la histidina la célula muere. Figura tomada de *Smolke et. al., 2007*.



**Fig.19.** Los riboswitches sintéticos pueden reportar la condición celular de un metabolito. A) Condición celular de xantina a las 0 horas, el riboswitch bloquea la expresión de la proteína GFP al no estar disponible en el medio la xantina. B) A las 24 horas la xantina está presente, se une al aptámero y se impide el corte de la plataforma de expresión compuesta por una hammerhead. C) Gráfica de niveles de expresión de GFP. Figura tomada de *Smolke, et. al., 2007*.

En resumen, los riboswitches son elementos de regulación que existen de forma natural en la región 5' no traducida de genes principalmente bacterianos y tienen la capacidad de regular la expresión genética mediante el reconocimiento, con gran afinidad y gran especificidad, de metabolitos como aminoácidos, nucleótidos, vitaminas y sus precursores. La unión del metabolito origina un cambio conformacional en el mRNA que puede favorecer el término de la transcripción, la inhibición de la traducción o bien el corte endonucleolítico del mRNA. Mediante experimentos de SELEX, se han podido sintetizar y seleccionar pequeños RNAs, llamados aptámeros, que reconocen específicamente ciertos tipos de moléculas. Dichos aptámeros han sido la base para el diseño de riboswitches sintéticos que regulan artificialmente la expresión genética. En todos los casos hasta ahora reportados los riboswitches sintéticos que utilizan ribozimas acopladas a aptámeros (aptazimas), su efecto de regulación se efectúa *in trans*.

## **Hipótesis**

La capacidad endonucleolítica de las ribozimas en combinación con aptámeros artificiales seleccionados por SELEX, puede ser utilizada para el diseño y la construcción de nuevos tipos de riboswitches sintéticos que actúen *en cis* y cuya conformación basal permita la expresión de los genes que regula y de inhibición a la expresión genética una vez que sea unido el metabolito.

## **Objetivo General**

Diseñar un nuevo riboswitch sintético eficiente en términos de su capacidad para regular la expresión genética en el organismo modelo *Escherichia coli*, con potencial uso en otras bacterias y organismos eucariotes.

## **Objetivos Particulares.**

- Analizar y seleccionar posibles aptámeros para la creación del riboswitch sintético en términos de: a) tamaño; b) afinidad por su ligando; c) efecto del ligando en el metabolismo celular.

- Analizar y seleccionar posibles plataformas de expresión basadas en ribozimas.

- Diseñar, en base al análisis de estructuras secundarias en el RNA y sus cinéticas de plegamiento, el riboswitch sintético que permita el acoplar el aptámero seleccionado con la ribozima seleccionada de tal forma que: a) dicho acoplamiento no afecte la capacidad de reconocimiento del aptámero por su metabolito; b) el reconocimiento del aptámero por su metabolito genere *ipso facto* un cambio alostérico en la plataforma de expresión que favorezca la inhibición de la expresión génica del gen a regular.

- Sintetizar el riboswitch utilizando un vector de expresión para evaluar de manera rápida el éxito del diseño.

- Construir una cepa receptora en donde se pueda realizar la integración cromosomal del riboswitch de manera eficiente y verificable.

- Evaluar la expresión de un gen reportero cromosomal bajo la regulación del riboswitch.

## Metodología

### Diseño teórico del riboswitch sintético.

Se realizó un análisis en torno a la literatura relacionada con riboswitches y RNA catalítico para la elección de la plataforma de expresión y el aptámero y la manera en la que pueden ser acopladas funcional y estructuralmente las dos partes que integran al riboswitch. En el caso particular de aptámeros reportados, se consultó la base de datos de Ellington (Lee et al., 2004)(<http://aptamer.icmb.utexas.edu>). Dicha base de datos cuenta con 315 publicaciones de aptámeros. En el apéndice II se analizan algunos ejemplos de dichos aptámeros. Posteriormente se prosiguió al modelado y valoración de las estructuras mediante el programa Kinefold que permite simular la dinámica de plegamiento de moléculas de RNA conforme éstas son sintetizadas (Apéndice4) (Xayaphoummine et al., 2005c).

### Construcción de un riboswitch sintético.

Los protocolos experimentales que se utilizaron en esta tesis se encuentran en el apéndice #1.

Posteriormente al diseño racional del riboswitch sintético, objetivo de esta tesis, se prosiguió al armado de las partes bajo una nueva técnica de clonación Rodríguez-Merino. En breve, esta técnica consiste en amplificar mediante la reacción de polimerización en cadena (PCR), tanto al inserto como al vector que se desean ligar. Previo a la ligación, solamente el producto de PCR correspondiente al inserto es quinado. Dado que comúnmente los oligonucleótidos con los que se amplifican los fragmentos de PCR carecen de grupos fosfato en sus extremos 5', el vector jamás podrá recircularizarse a menos que éste se encuentre ligado al inserto que ha sido fosforilado. Como resultado de dicho proceso, la eficiencia de las clonas obtenidas potencialmente contienen el inserto deseado. La anterior metodología equivaldría a haber realizado una de-fosforilación 100% eficaz del vector, cosa que en la práctica nunca sucede.

### Amplificación de los diseños para la plataforma de expresión.

Se realizaron las amplificaciones de los diseños de la Hammerhead con el oligo HH-Temp como templado y los diferentes oligos presentados en la tabla #1 bajo el protocolo de amplificación usado en todo el proceso (protocolo 1).

Tabla 1.

Combinación	Oligo # vs oligo
Hammerhead 1	BI 9 vs B2 8
Hammerhead 2	BI 9 vs B2 9
Hammerhead 3	BI 9 vs B2 10
Hammerhead 4	BI 10 vs B2 8
Hammerhead 5	BI 10 vs B2 9
Hammerhead 6	BI 10vs B2 10
Hammerhead 7	BI 11 vs B2 8
Hammerhead 8	BI 11 vs B2 9
Hammerhead 9	BI 11 vs B2 10
Hammerhead 10	BI 12 vs B2 8
Hammerhead 11	BI 12 vs B2 9

Las distintas combinaciones se sometieron al siguiente ciclado  
Tabla 2.

5 ciclos	Hibridación	55°C 30´
	Extensión	68°C 30´
20 ciclos	Desnaturalización	94°C 15´
	Hibridación	55°C 30´
	Extensión	68°C 30´

Estos PCR no se verificaron mediante electroforesis por la complejidad conllevada en los métodos de purificación y visualización de cadenas de DNA menores a 50 nt, fue más fácil la clonación directa.

### Amplificación del vector pUC19.

Para la linearización del vector de expresión se realizó un PCR, se utilizó como templado al vector pUC19 y los oligos pUC19SD y pUC19SDR, bajo el ciclado mostrado en la tabla 3:

Tabla 3.

# de Ciclos	°C	Tiempo
1 Ciclo de desnaturalización	94°C	2 min
25 Ciclos de Amplificación	94°C	30 seg
	58°C	45 seg
	68°C	2:30 min
1 Ciclo de Extensión final	68°C	10min

Posteriormente se realizó la electroforesis del amplificado y la purificación de éste.

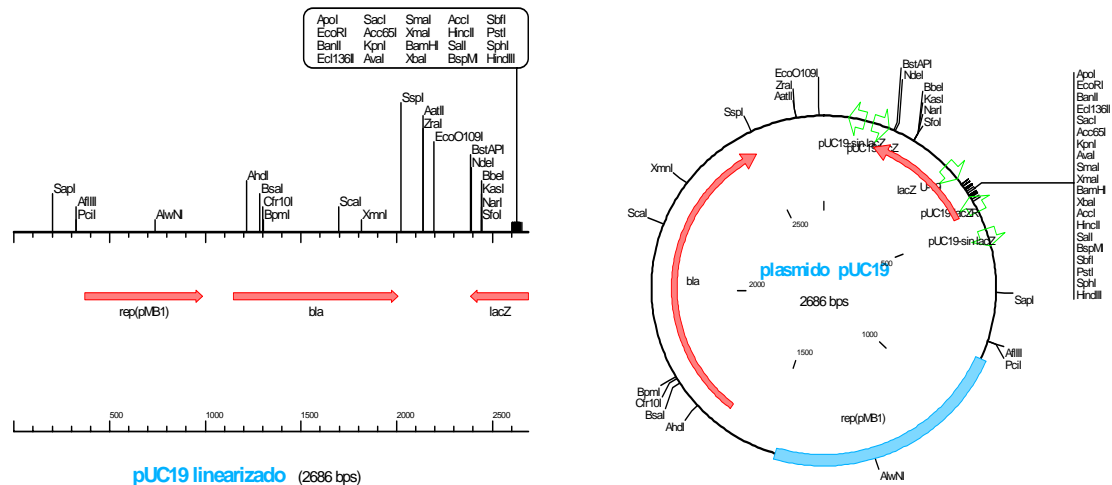


Fig. 20. pUC19

### Protocolo de clonación Rodríguez-Merino.

Se llevó a cabo la reacción de kinación bajo las siguientes condiciones de cada producto de PCR implicado en la clonación deseada.

H <sub>2</sub> O	3.5 µl
Buffer 10X T4 DNA ligasa Biolabs	2.5 µl
BSA Biolabs	1 µl
DNA (70ng/µl)	15 µl
Enzima T4 DNA Kinasa 10 unidades/ml	<u>3 µl</u>
	25 µl

Se mezcló la reacción sin enzima y se incubó a 70°C durante 5 min, posteriormente se enfrió a 4°C durante 1:30 min y se le adicionó la enzima para que comenzara la reacción, se incubó la muestra durante 1 hr. La resultante o los resultantes posteriormente se unen o circularizan mediante la reacción de ligación por la T4 DNA ligasa de la compañía biolabs mediante el siguiente protocolo.

H <sub>2</sub> O	10.5µl
Buffer 10X T4 DNA ligasa Biolabs	2.5 µl
Vector	10 µl
Reacción de kinación	25 µl
Enzima T4 DNA ligasa Biolabs 20,000U	2 µl

Se incuba la reacción de ligación durante 2 hrs a 25°C, posteriormente se purificó mediante el protocolo de purificación de productos de PCR, se transformó en la cepa *E. coli* DH5a y se recuperó en 1ml de medio SOC durante una hora a 37°C en agitación constante.

Después de recuperada, se plataron 100 µl en agar sólido de LB con ampicilina y x-gal y se incubaron las muestras durante 12 horas a 37°C. Se seleccionaron 10 colonias, se purificó el DNA plasmídico, mismo que se mandó a secuenciar en la unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología-UNAM.

### Construcción del Riboswitch sintético.

Ya que se había seleccionado el plásmido con la plataforma de expresión se utilizó a éste como templado para, mediante oligos, sintetizar el riboswitch diseñado. Se realizó un PCR con 2 oligos extensivos (aptámero\_M y aptámero\_MR) (Merino *et al.*, 1992) que contienen en su extremo 3' 20 bases que hibridan con el templado y en su extremo 5' más de 20 bases con la secuencia del aptámero y la secuencia conector, bajo el ciclado de la tabla 4.

Tabla 4.

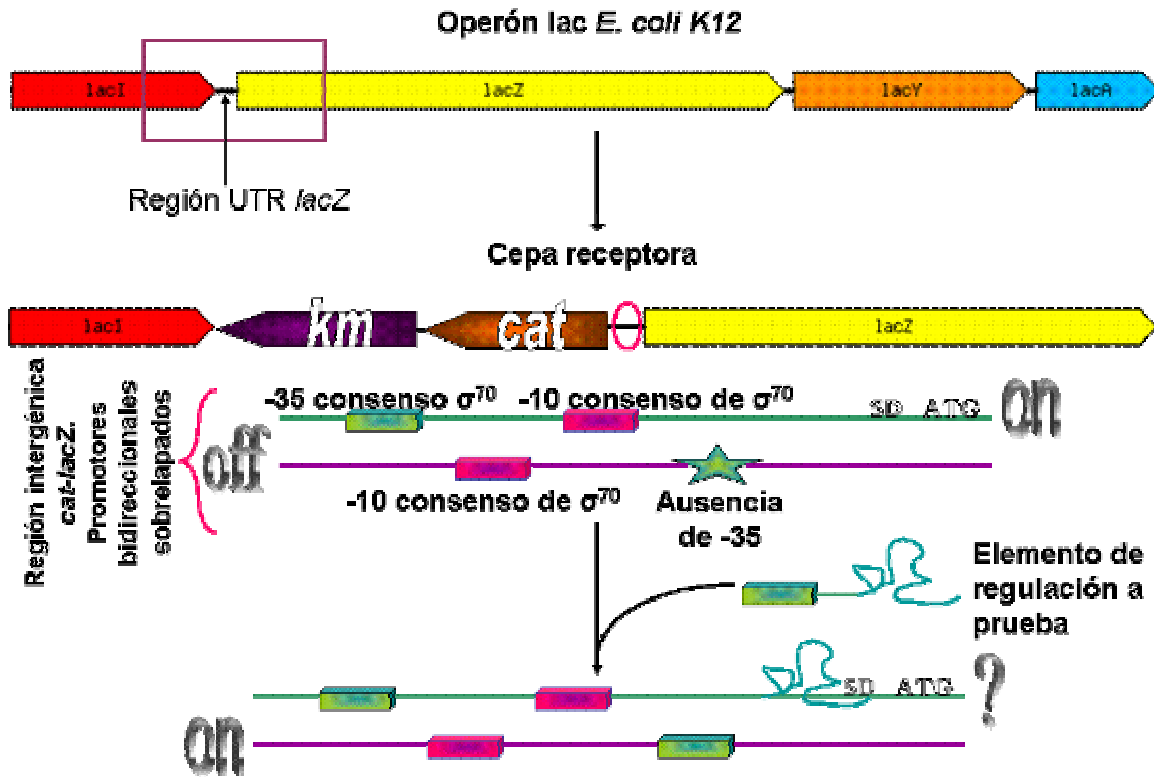
# de Ciclos	T°	tiempo
1 Ciclo de desnaturalización	94°C	2 min
25 Ciclos de Amplificación	94°C	30 seg
	63°C	45 seg
	68°C	2:30min
1 Ciclo de Extensión final	68°C	10min



Se verificó el resultado del PCR mediante electroforesis y se purificó la banda de aproximadamente 2900 pb. Posteriormente se siguió el protocolo de clonación Rodríguez-Merino, se plateó en agar sólido de LB y ampicilina, se dejó incubar por 12 horas a 37°C.

### Construcción de la cepa receptora.

El objetivo de construir una cepa receptora es para poder monitorear de manera sencilla y económica la inserción al cromosoma de elementos de regulación ubicados en el extremo 5' UTR del gen reportero *lacZ*. La estrategia se muestra en el siguiente diagrama de flujo:



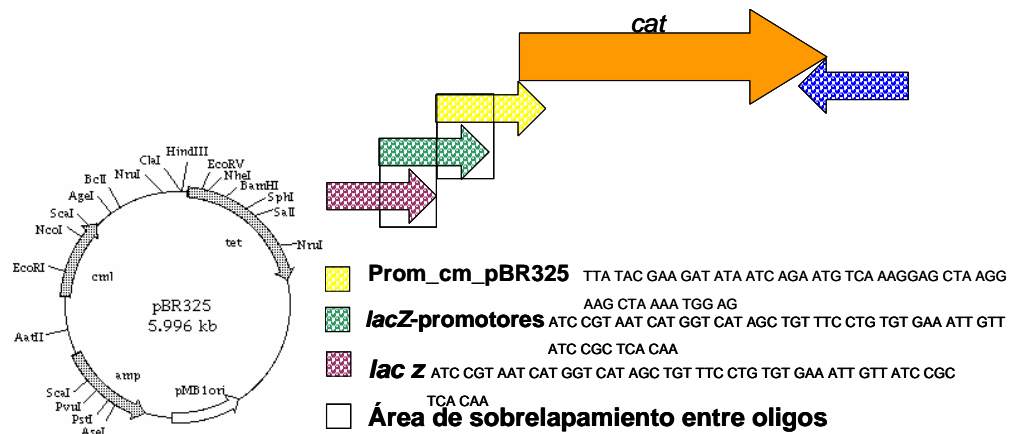
### Amplificación y clonación del casete de resistencia a cloranfenicol con oligos extendidos inclusivos de los promotores bidireccionales superpuestos y la secuencia homóloga al gen *lacZ* de Escherichia coli K12.

Se llevó a cabo la reacción de polimerización en cadena (PCR) para la amplificación exponencial del casete de resistencia a cloranfenicol proveniente del plásmido pBR325 con los oligos cm y Prom\_cm\_pBR325, con las condiciones expresadas en el protocolo 1. El ciclo del PCR fue el siguiente:

Tabla 5.

# de Ciclos	T°	tiempo
1 Ciclo de desnaturalización	94°C	2 min
25 Ciclos de Amplificación	94°C	20seg
	68°C	1 min
1 Ciclo de Extensión final	68°C	10min

Mediante electroforesis se visualizó el resultado y se purificó directamente mediante el kit de purificación de Roche para que fuera utilizado en un PCR consecutivo.

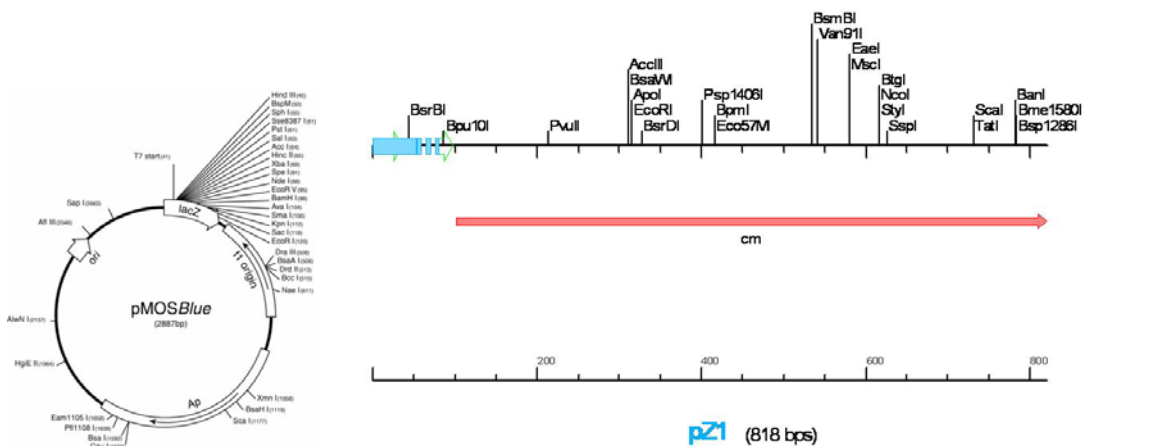


**Fig. 21 . Estrategia y diseño para construir *lacZ*-promotores sobrelapados-*cm*.**

Se realizó el siguiente PCR con el templado constituido por los promotores bidireccionales sobrelapados y el gen de resistencia a cloranfenicol, para la reacción se utilizaron los oligos *lacZ*-promotores y *cm*; los ciclos fueron los mismos que se utilizaron para el templado y las condiciones de reacción las enmarcadas en el protocolo 1. Mediante electroforesis se visualizó el resultado y se purificó directamente mediante el kit de purificación de Roche para que fuera utilizado en un PCR consecutivo.

El tercer PCR se realizó bajo las mismas condiciones de reacción y ciclado que los dos anteriores cambiando el templado y los oligos. Se utilizó como templado el producto del PCR *lacZ*-promotores-*cm* y los oligos *lacZ* y *cm*. Mediante electroforesis se visualizó el resultado y se purificó directamente mediante el kit de purificación de Roche para ser posteriormente clonado en el vector de expresión pMOS*Blue*.

**Clonación en vector de expresión pMOS*Blue*.**



**Fig 22. pZ1.** Vector constituido por la construcción *lacZ*-promotores bidireccionales sobrelapados- *cm* clonada en el vector de clonación pMOS *Blue*.

Para la clonación se utilizó el kit pMOS*Blue* blunt ended cloning de Amersham pharmacia biotech. Este kit tiene la posibilidad de utilizar insertos purificados y sin

purificar, aunque la eficiencia es mayor cuando se purifica el inserto. Posteriormente el inserto será kinado mediante el cóctel de enzimas (esencialmente compuesto por una kinasa, ATP y una enzima secreta que corta las adeninas que deja la enzima Taq en las amplificaciones por lo que se debe de manejar con cuidado) que se le agrega en la reacción de pK para que posteriormente el vector y el inserto sean ligados mediante la ligación. El sitio de inserción se localiza en *EcoRV* de *lacZ* por lo que una clonación exitosa daría clonas blancas en un medio que contiene x-gal. El vector del kit se encuentra linearizado y solamente la secuencia del polilinker se encuentra disponible.

#### Reacción de pK

Buffer 10X pk	3µl
DTT 100mM (agente reductor)	1µl
Mix de enzimas pk	1µl
Producto	20µl
Agua	5µl

La reacción de pk fue incubada durante 40 min a 22°C, posteriormente se centrifugó a 13 000 rpm durante 10seg para colectar el contenido evaporado. Se inactivó la reacción mediante calor por 10 min a 75°C y se enfrió en hielo por dos minutos para centrifugarse posteriormente a 13 000 rpm durante 10seg para colectar los 10 µl de la reacción.

Inmediatamente después de haber terminado la reacción de pK se procedió a la ligación bajo las siguientes condiciones

Reacción de pk	30µl
Vector pMOS <i>blue</i>	1µl
T4 DNA ligasa	1µl
Agua	18µl

Se incubó la reacción de ligación a 22°C por 2 horas, posteriormente se purificó mediante el kit de Roche para realizar la transformación. Se transformó la clonación en células electrocompetentes de la cepa *Escherichia coli* K12 realizadas con el protocolo 4, se recuperó la reacción en 1ml de LB a 37°C por 1 hr. Finalmente se platearon las células en medio LB sólido con cloranfenicol a una concentración de 25µg/ml y x-gal. Fueron seleccionadas las colonias blancas y para revisar la condición en la que se encontraba el inserto se mandaron a secuenciar en la Unidad de Secuenciación del IBt los plásmidos obtenidos de 10 colonias blancas; se utilizó el oligo universal T7.

Posteriormente de la verificación se seleccionó el vector pZ1.

#### **Amplificación y clonación del casete de resistencia a kanamicina con oligos extendidos inclusivos a la secuencia homóloga al gen *lacI* de *Escherichia coli* K12.**

Se utilizó como templado para la amplificación del casete de resistencia el plásmido pKD4 purificado mediante miniprep del protocolo 5. Los oligos km-*lacI* y Km fueron utilizados.

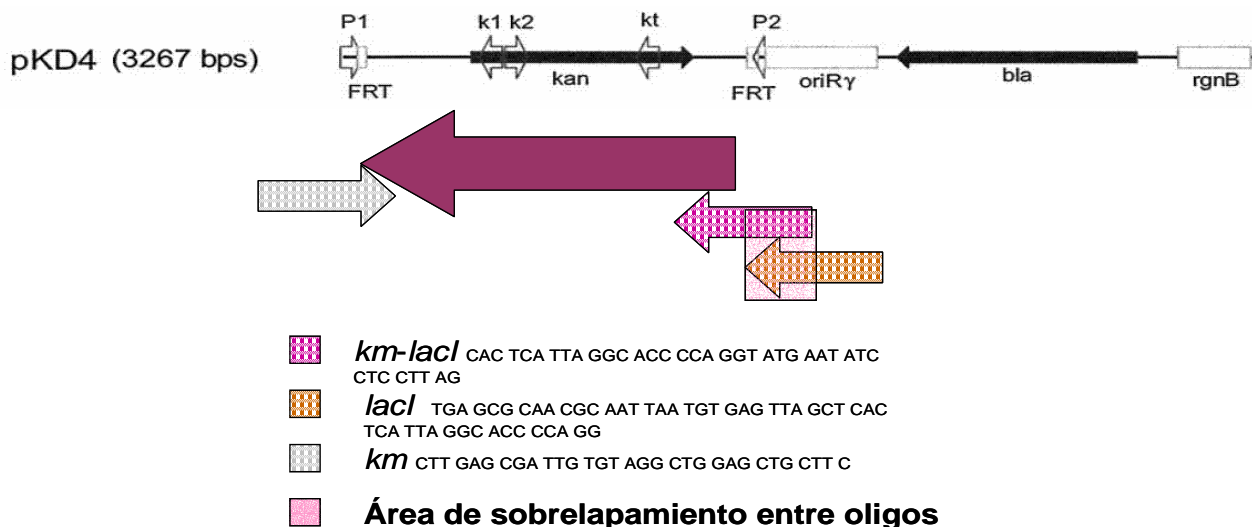


Fig. 23. Estrategia para construir *km-lacI* de la cepa receptora.

La reacción de PCR se realizó bajo las condiciones del protocolo 1 con el siguiente ciclado.

Tabla 6.

# de Ciclos	T°	tiempo
1 Ciclo de desnaturalización	94°C	2 min
25 Ciclos de Amplificación	94°C	20seg
	68°C	1:30 min
1 Ciclo de Extensión final	68°C	10min

Mediante electroforesis se visualizó el resultado y se purificó directamente mediante el kit de purificación de Roche para ser utilizado como templado en un PCR consecutivo con los oligos *km* y *lacI*. El ciclado del segundo PCR fue el mismo que el requerido para el templado. Se visualizó el resultado del PCR mediante electroforesis y se purificó para ser clonado en el vector pZ1.

#### Clonación del inserto *km-lacI* en el vector pZ1.

Se digirió el vector pZ1 con la enzima de restricción *SmaI* proveniente de *Biolabs* (la cual deja extremos romos y el sitio de restricción se localiza en el polilinker a unas cuantas bases del sitio *EcoRV*) bajo las siguientes condiciones:

Reacción de digestión con *SmaI* del vector pZ1.

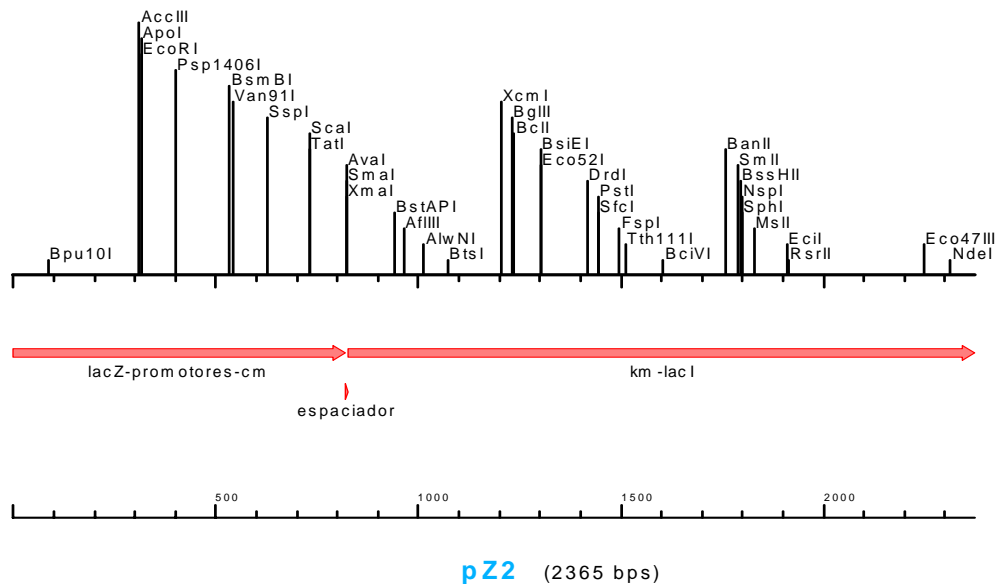
NeBuffer 4 10X	2.5µl
pZ1	20 µl
<i>SmaI</i> (2,000 unidades)	2.5µl

La reacción de digestión con *SmaI* del vector pZ1 se incubó durante una hora a 25°C, inmediatamente después de terminado el tiempo de incubación se procedió a la reacción de ligación con el inserto *km-lacI*.

Reacción de ligación del inserto *km-lacI* con el vector linealizado pZ1.

Buffer T4 DNA ligasa biolabs 10X	5µl
Inserto <i>km-lacI</i>	15µl
Reacción de digestión con <i>SmaI</i> del vector pZ1	25µl
T4 DNA ligasa (20,000 unidades;biolabs)	3µl
Agua destilada estéril.	2µl

La reacción de ligación se incubó durante 2 horas a 25°C. Terminado el tiempo de incubación se purificó la muestra con el kit de Roche y posteriormente se transformó en células electrocompetentes de la cepa *E. coli K12* preparadas el mismo día bajo el protocolo 4. La recuperación de la transformación se realizó con 1ml de medio SOC durante 1hr a 37°C. Finalmente se plataron 100µl en cada caja petri con medio LB con cloranfenicol a una concentración de 25µg/ml y kanamicina a una concentración 50µg/ml; se incubaron las muestras durante 12 hrs a 37°C, y después de incubadas se seleccionaron 10 clonas resistentes a Km y se mandaron a secuenciar los plásmidos obtenidos a la Unidad de Secuenciación del IBT. El vector seleccionado con la orientación del vector correcta tomó el nombre pZ2.



**Fig. 24. pZ2.** Construcción completa para la cepa receptora.

#### **Amplificación de la construcción lacZ-promotores bidireccionales sobrelapados-cm-km-lacI.**

La reacción de PCR utilizó como templado el vector pZ2 y los oligos lacZ 22 y U-19 bajo las condiciones del protocolo 1, con el siguiente ciclado

Tabla 7.

# de Ciclos	Tº	tiempo	
1 Ciclo de desnaturalización	94°C	2 min	
Amplificación	10 ciclos	94°C	15 seg
		58°C	30 seg
		68°C	2:30 min
	20 ciclos	94°C	30 seg
		68°C	2:30 min
		68°C	10min
1 Ciclo de Extensión final	68°C	10min	

Mediante electroforesis se visualizó el resultado y se purificó mediante un gel de agarosa preparativo y el kit de purificación de Roche.

**Recombinación homóloga mediante el método de Datsenko y Wanner de la construcción *lacZ-promotores bidireccionales sobrelapados-cm-km-lacI* y la construcción *lacZ-promotores bidireccionales sobrelapados-cm-lacI* en los genes *lacZ* y *lacI* de *E. coli* K12.**

Se transformó la cepa *E. coli* K12 con el plásmido pKD46 (Datsenko and Wanner, 2000), recuperándolo en 1ml de medio LB a 37°C por una hora, se platearon 100 µl en el medio de selección compuesto por LB y ampicilina a una concentración de 200 µg/ml, incubándose a 30°C ON. Se inóculo el ON mediante cuatro asadas en 50ml de medio SOC con 5ml de arabinosa 1M y ampicilina 200 µg/ml ; se creció el inóculo a 30°C hasta una OD de 0.6 y se prosiguió de igual manera para hacerlas electrocompetentes como el protocolo 4 antes expuesto . Al término del protocolo 4, una alícuotas se transformó con 5 µl del producto de PCR de la construcción *lacZ-promotores bidireccionales sobrelapados-cloranfenicol-kanamicina-lacI*. Como control se utilizó un PCR previamente utilizado en el laboratorio por Norma, el cual contenía el casete de resistencia a Km y se recombinaba en el gen de Fis, este control se recombinaba de manera exitosa por este método. Para que se pudiera llevar a cabo la recombinación se recuperaron las células en 1ml de medio SOC a 30°C por hora y media, posteriormente se dio un choque calórico al incubar las muestras a 42°C por 20min. Se platearon 100 µl en medio de selección LB-Km-X-gal y se incubaron a 37°C ON.

Se seleccionaron 99 colonias azules resistentes a kanamicina y se sembraron en un segundo medio de selección a cloranfenicol para probar la activación o inactivación del promotor bidireccional sobrelapado al ser cepas resistentes a cloranfenicol. Posteriormente se purificó el DNA cromosomal mediante el protocolo #6 (ver apéndice) y se mandaron a secuenciar los plásmidos obtenidos de 10 colonias para verificar si estaba presente la secuencia deseada y en que estado se encontraba.

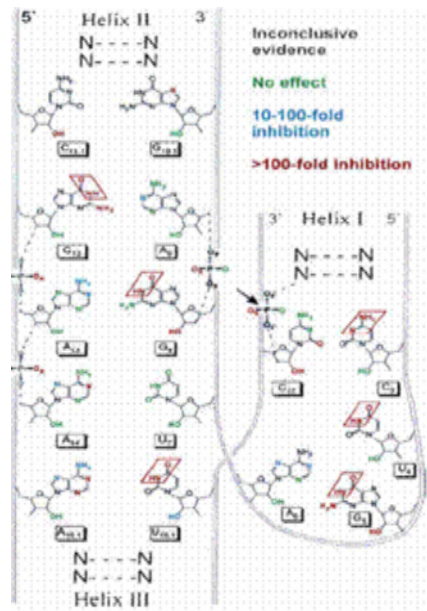
Al comprobar la activación del promotor bidireccional sobrelapado, se realizó una segunda recombinación homóloga con la siguiente construcción *lacZ-promotores-cm-lacI* y bajo las mismas condiciones de amplificación de la construcción *lacZ-promotores-cm*, se utilizó para la amplificación el oligo *cm-lacI* y el oligo *lacZ* como templado fungió el pZ1. Se siguió el mismo protocolo para la recombinación *lacZ-promotores bidireccionales sobrelapados-cloranfenicol-kanamicina-lacI*. La selección de las colonias recombinadas se hizo en agar sólido de LB con el antibiótico cloranfenicol a una concentración 25 µg/ml. Posteriormente se purificó el DNA cromosomal de 10 colonias cuyo fenotipo era *lacZ cmf* mediante el protocolo 6 y se mandaron a secuenciar los DNA cromosomales de dichas colonias.

## Resultados y discusión.

### Diseño del riboswitch

#### Selección de la plataforma de expresión: La ribozima hammerhead.

Considerando el interés del proyecto para que el riboswitch sintético a desarrollar fuera funcional en *Escherichia coli*, pero con potencial capacidad para ser utilizado también en organismos superiores, la plataforma de expresión seleccionada es la ribozima cabeza de martillo o "hammerhead" probada su funcionalidad no importando el fondo genético, sea virus, procarionte o eucarionte (Blount and Uhlenbeck, 2005; Brackett and Dieckmann, 2006b; Kuwabara et al., 1996a; Yen et al., 2004b) e incluso más allá, presentes en viroides. Esta ribozima consta de pequeños motivos de RNA catalíticos encontrados en virus de RNA en plantas, RNA satélite, viroides, y DNA satélite repetidos. Están compuestos de 250-450 nucleótidos en una sola cadena de RNA circular con un alto contenido de estructuras secundarias y sin ninguna capacidad de codificar proteína alguna (Flores *et al.*, 2001). La estructura de hammerhead es la ribozima más ampliamente distribuida en estos pequeños RNAs de plantas. Estas ribozimas catalizan el corte y la ligación del RNA durante el ciclo replicativo. Están bien caracterizados los motivos catalíticos mínimos consistentes en tres hélices unidas, 11 nucleótidos conservados en el núcleo, el cual corta en un enlace fosfodiéster específico en una reacción dependiente de  $Mg^{2+}$ . La estructura tridimensional de la hammerhead mínima (Fig. 25) muestra una conformación en forma de Y. Existen discrepancias entre los datos estructurales y bioquímicos que sugieren que el núcleo no tiene una conformación catalíticamente competente para realizar la catálisis. Aunado a lo anterior, existen evidencias muy claras que implican la proximidad de las hélices I y II para la reacción de ligación y corte (Canny *et al.*, 2004).



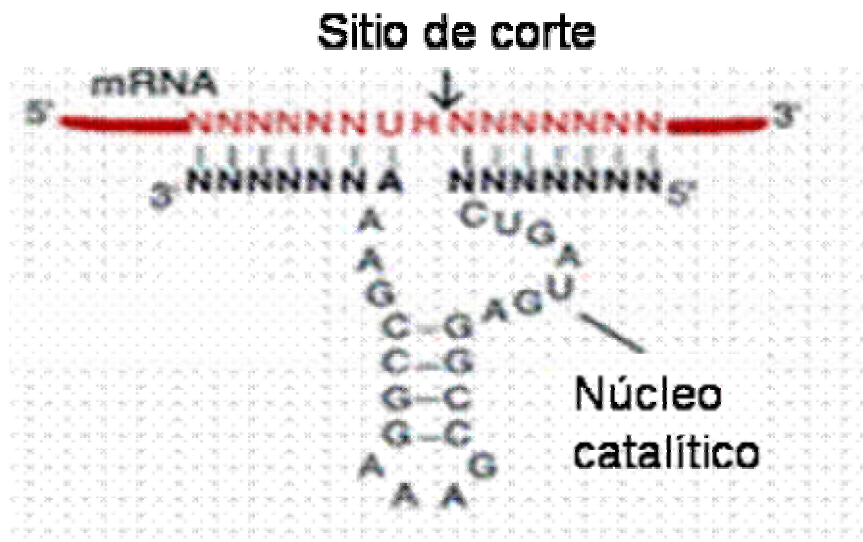
**Fig. 25. La ribozima hammerhead.** Figura tomada de (Blount and Uhlenbeck, 2005)

Estudios estructurales en solución o en cristal (Blount and Uhlenbeck, 2005) revelan muchas características que pudiesen ser importantes para el mecanismo catalítico; 1) en cristal, el núcleo se resuelve en dos dominios estructuralmente distintos. El dominio

1 incluye el sitio de corte en la vuelta CUGA; el dominio 2 está compuesto por 4 apareamientos adyacentes no canónicos. En ambos, solución y cristal, las tres hélices radiadas del núcleo en presencia de metales divalentes presentan una forma estructural en Y, con las hélices I y II próximas una de la otra y las hélices II y III de manera coaxial. Finalmente, la importancia de metales divalentes en el plegamiento de la ribozima se insinúa al observarse cuatro metales divalentes coordinados en sitios en la estructura cristalina proximal y distal del sitio de corte y por la dependencia de  $Mg^{2+}$  en el plegamiento estructural en solución.

Ribozimas Hammerhead que pueden cortar RNA mediante el reconocimiento de secuencias de 9-15 bases han sido descritas. Los sustratos en el sitio de corte deben contener UX (X=U, C o A), esto se establece mediante mutaciones puntuales en una hamerhead de 72 bases. En estudios de la reacción de autocorte mediante la síntesis química de RNA de 21 bases (conteniendo el dominio de corte de RNA satellite) se estableció que para el diseño de ribozimas es necesaria la presencia de N3:N4= AU en el dominio consenso, ya que sin éste, no se da el corte (Koizumi et al., 1989b).

La ribozima hammerhead binaria (Fig. 26) consiste en dos oligoribonucleótidos (19mer y 15mer, respectivamente), ha mostrado que el corte del 11mero catalítico se realiza con  $K_m$  y  $K_{cat}$  de  $0.53 \mu M$  y  $0.03 \text{ min}^{-1}$ , respectivamente. Dos oligoribonucleótidos (19mer, 12mer) pueden ser utilizados como ribozimas de restricción, las cuales reconocen secuencias,  $(N)_nUX(N)_n$  (X=A, C o U) (Koizumi et al., 1989a).



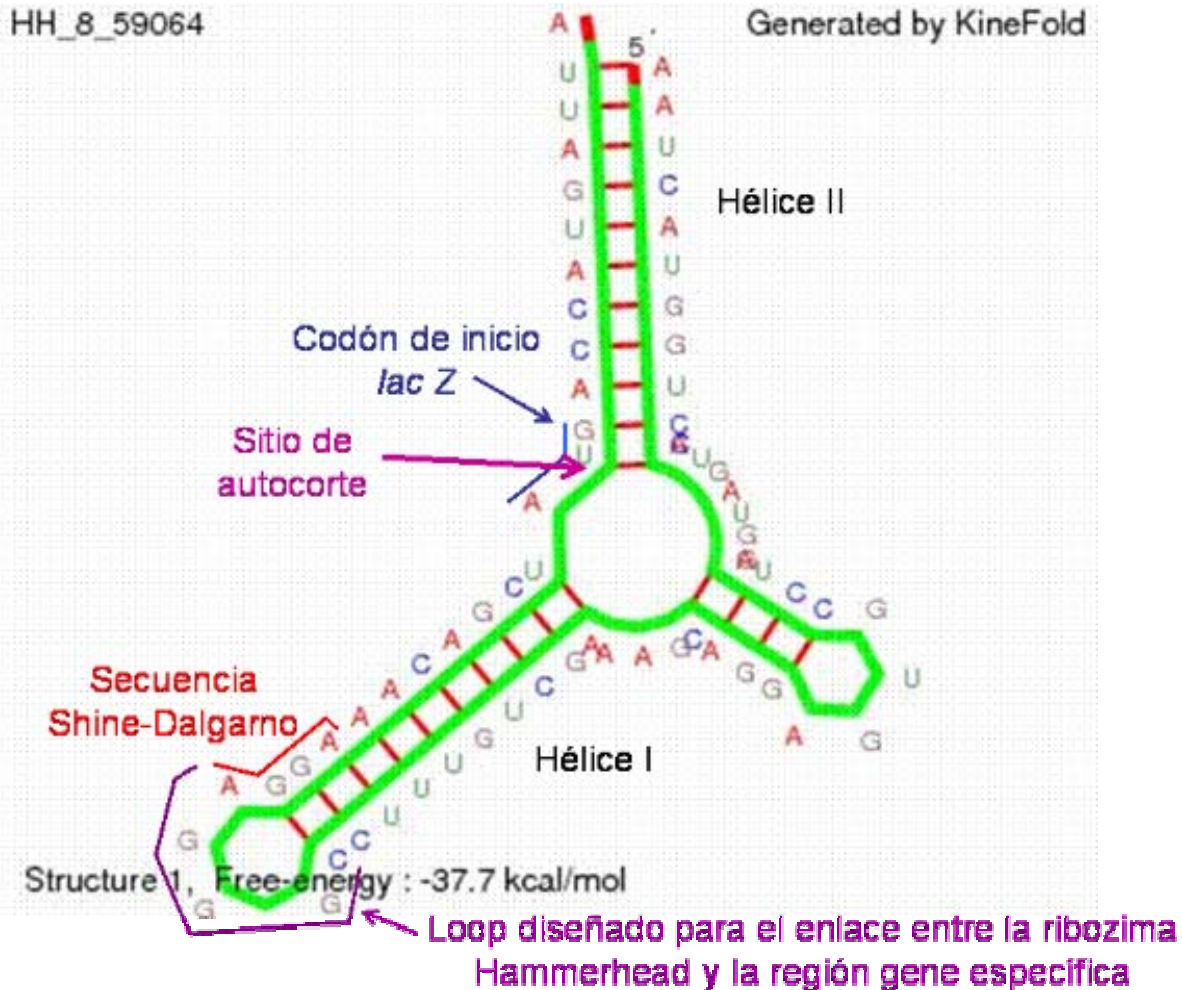
**Fig. 26. La ribozima Hammerhead binaria.**

En base a todas las características antes expuestas, se seleccionó a la ribozima hammerhead binaria para que ésta fungiera como plataforma de expresión. Se ingenió de tal manera que realizara el corte en el codón de inicio del gen *lacZ* del vector pUC19. Tradicionalmente se utiliza a esta ribozima para que actúe *in trans*, sin embargo, no hay ninguna restricción para que esta pueda actuar *en cis*. Para solucionar este problema diseñamos un loop (Fig. 27) para que el mRNA en el 5' que contiene a la Hammerhead binaria se plegara de tal manera que se pudieran llevar a cabo el apareamiento entre las bases del Shine-Dalgarno de *lacZ* y el corte se realizará en el codón de inicio.



HH\_8\_59064

Generated by KineFold



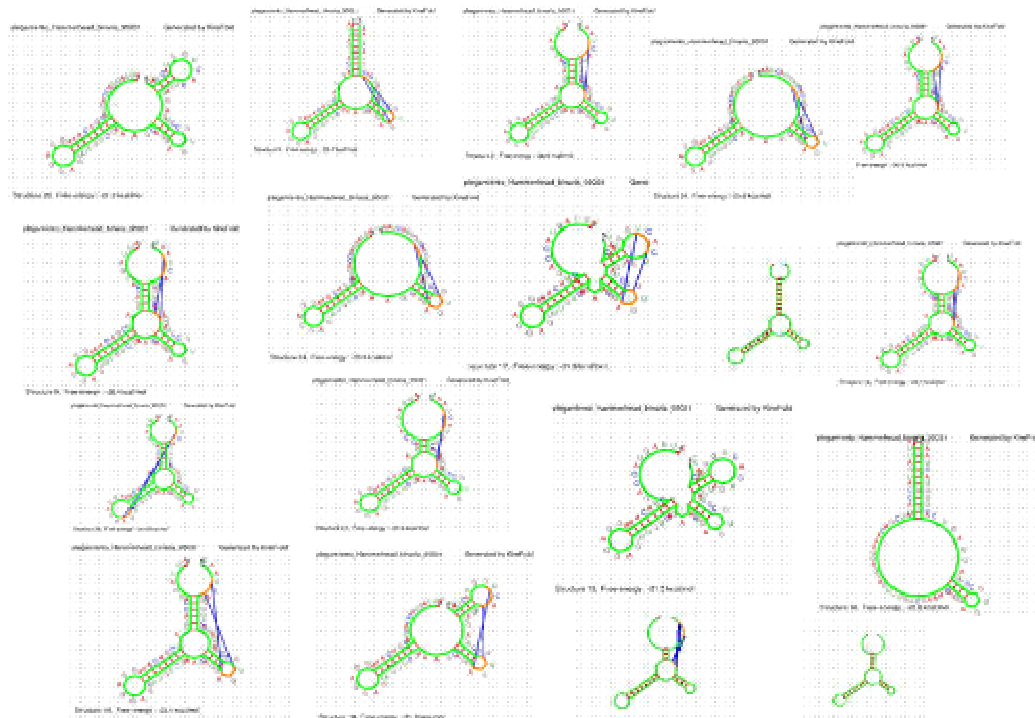
**Fig. 27. Diseño básico de la plataforma de expresión.** Ribozima Hammerhead con sitio de corte en el residuo U del codón de inicio del *lacZ* del pUC19. Para que la secuencia de las hélices I y II hibride se aumentó un loop al extremo de la hélice I, y se tomó ventaja de este loop para liberar el SD del gen y no impedir de esta manera el reconocimiento de los ribosomas con el mRNA.

Se diseñaron 12 combinaciones posibles (ver apéndice II), las cuales exploran el espacio de secuencia (la longitud) de la Hammerhead actuando *en cis*, en base a las publicaciones de (Kuznetsova et al., 2004; Sioud, 1997; Vorobjeva et al., 2005) la simple suma o resta de nucleótidos incluidos en las hélices II y III hace que varíe la eficiencia con la que la ribozima realiza el corte. Las secuencias se exponen en el apéndice. Para realizar esta exploración se mantuvo fija la posición en la cual se encontraba el sitio de corte (codón de inicio), posteriormente en base a la secuencia se estableció como máximo para la hélice II 12 nucleótidos para el apareamiento, y para la hélice I se establecieron 10 nucleótidos, ya que se presentaba la primera restricción: el SD debería de estar total o parcialmente libre, mínimo uno de sus nucleótidos para que de manera basal la plataforma de expresión posteriormente a acoplar con el aptámero pueda permitir que se realice la traducción (hasta que esté completamente armado el riboswitch, sin el aptámero la plataforma de expresión realiza el corte de manera basal).

A pesar de que nuestro diseño dirige el mecanismo por el cual se dará el corte, siempre hay más opciones. El RNA puede adoptar otra ruta de plegamiento. Nosotros

planeamos la mejor resultante de la ruta de plegamiento, pero si cambian las condiciones del medio, por ejemplo, aumentan o disminuyen las relaciones celulares de cationes divalentes, la hammerhead puede encausarse hacia una resultante no benéfica para la función que seleccionamos, el análisis lo exponemos en la fig. 28, en el cual se puede observar toda una colección de estructuras, las cuales están imposibilitadas para alinearse y realizar el corte. Es por ello que tuvimos presente esta característica del RNA para los posteriores resultados experimentales.

### Plegamientos alternos Hammerhead binaria menos viables



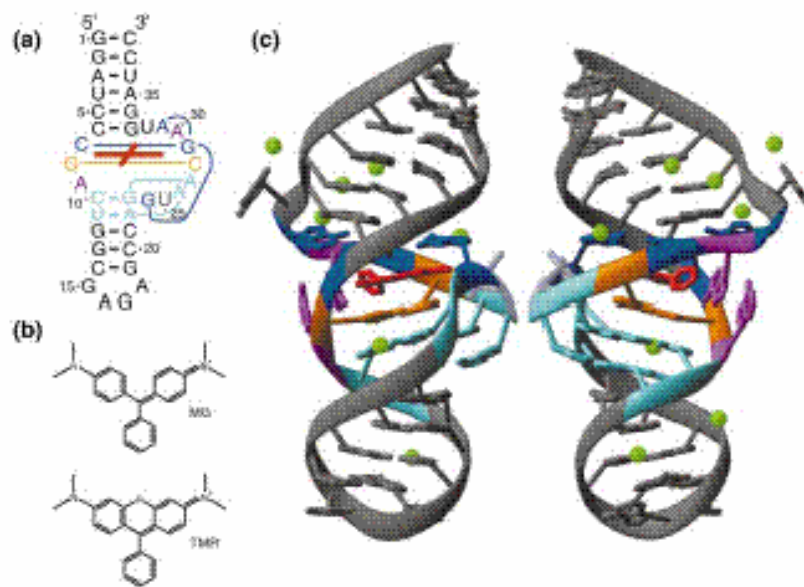
**Fig. 28. Plegamientos alternos menos viables de la secuencia secundaria de la hammerhead.** Estas estructuras secundarias más entrópicas resultarían en una pérdida de función, ya que en muchas la secuencia CUGA que es la secuencia involucrada en el corte, se encuentra comprometida o no alineada, por lo que no puede realizar el corte.

### Selección del aptámero

Los elementos que consideramos para la selección del aptámero fueron los siguientes: i) el metabolito que regularía a nuestro sistema no debería de alterar el metabolismo celular de procariontes o eucariontes; ii) no debería de ser un antibiótico el ligando, ya que en el grupo de la Dra. Mary G. Wallis encontraron que los antibióticos con blanco en los ribosomas interfieren con otras funciones de los RNAs, entre ellos se encuentra el grupo de auto splicing del intrón I, la ribozima hammerhead aislada del viroide del aguacate y la ribozima del virus de la hepatitis delta de los humanos (Wallis and Schroeder, 1997). Estos ensayos se han realizado *in vitro* e *in vivo* (Yen et al., 2004a), por lo que se consideró esta característica para la selección del aptámero a acoplarse.

Se exploró la base de datos <http://aptamer.icmb.utexas.edu> en donde se deposita la información en torno a los aptámeros generados por SELEX. La base de datos

comprende 315 artículos científicos a la actualidad y genera un resumen de cada uno, incluyendo las condiciones experimentales y la secuencia del aptámero. Seleccionamos el aptámero de malaquita verde (fig. 29), ya que puede unirse al trifenilmetano, el cual es la base para la síntesis de distintos colorantes, entre ellos, la malaquita verde, con la diferencia que el trifenilmetano no realiza reacciones de óxido reducción a diferencia de la malaquita verde y se conoce la ruta de degradación en la que está implicado (Azmi et al., 1998). Por otra parte, el aptámero de la malaquita verde es uno de los aptámeros más estudiados y se conocen sus propiedades al emitir fluorescencia (Babendure et al., 2003; Kolpashchikov, 2005; Nutiu and Li, 2005) , e incluso, se tiene la resolución de la estructura cristalina de este aptámero (Baugh et al., 2000) . Sabemos que existen aptámeros más eficientes que el seleccionado, como el aptámero de teofilina, sin embargo, la teofilina se ha encontrado implicada en la inhibición de la traducción en bacterias al unirse a alguna de las subunidades ribosomales (Hanson et al., 2005b).

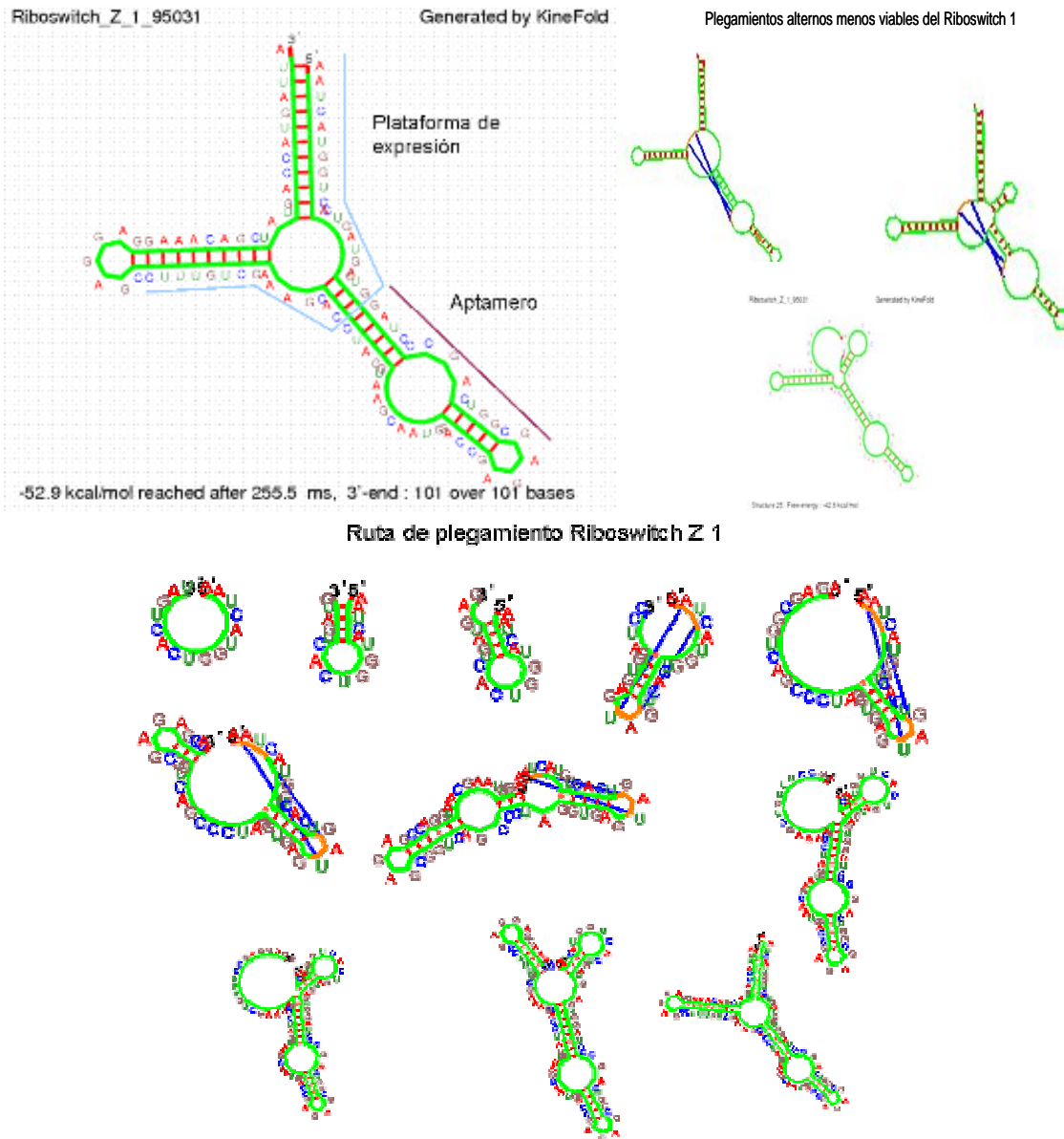


**Fig. 29. El aptámero de malaquita.** a) estructura secundaria del aptámero de malaquita verde, señalando la interacción entre las bases, b) Metabolitos que interaccionan con el aptámero de malaquita verde ,c) estructura terciaria del aptámero de malaquita verde con su ligando. Figura tomada de Baug *et al* 2000.

### Acoplando las estructuras del riboswitch

La plataforma de expresión puede llevar a cabo el siguiente paso permisivo, se puede sustituir en su totalidad la hélice I (Kuwabara et al., 1996b), por lo que aprovechando esta característica podemos condicionar su expresión a partir de el posicionamiento del aptámero de malaquita en la hélice I sustituyéndola parcial o totalmente. Nuestro diseño considera que el aptámero generará en la hammerhead un impedimento estérico, *ergo* no podrá realizar el corte cuando el aptámero se encuentre sin el metabolito. Cuando el aptámero esté unido a su metabolito *ipso facto* el impedimento estérico se eliminará (dentro del esquema del diseño, en la síntesis, en el momento en el cual la RNA polimerasa está sintetizándolo o transcribiendo el mensajero y este transcrito comienza a traducirse, en ese tiempo, el impedimento estérico nunca existió), por lo que los componentes de la ribozima estarán en un alineamiento permisivo para el corte.

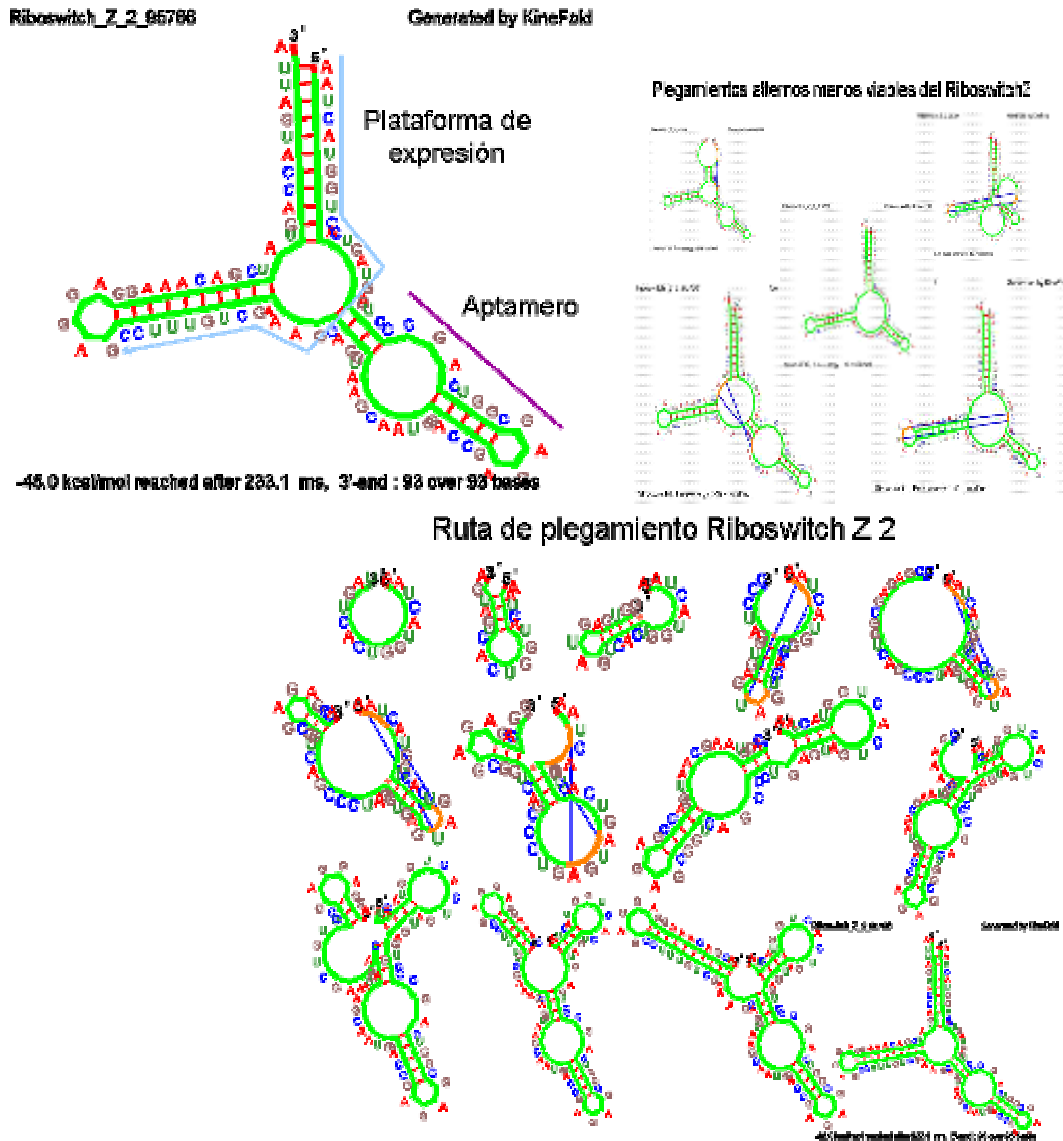
Se diseñaron y analizaron dos riboswitches; el primero presenta una mayor extensión en la secuencia conectora (fig. 30) y el segundo con una menor extensión (Fig.31) (Apéndice 4). Lo anteriores diseños tiene el objetivo de estudiar el espacio de secuencia óptimo para la función del Riboswitch.



**Fig. 30 Riboswitch Z1.** a) Estructura secundaria del riboswitch Z1 señalizada por su plataforma de expresión y el aptámero. B) Plegamientos alternos del riboswitch Z1 menos viables, el plegamiento final de estas estructuras resultaría en una pérdida de función del riboswitch Z1 o en una actividad no diseñada. C) Ruta de plegamiento más viable del riboswitch Z1.

El segundo riboswitch (fig. 31) fue diseñado con una secuencia conectora corta, con la intención de condicionar mayormente la unión del loop catalítico de la hammerhead,

disminuyendo las posibilidades de hibridación entre la secuencia conectora y la proximidad del loop catalítico. Por otra parte, al analizar los posibles plegamientos alternos menos viables, se encontraron menos estructuras en comparación del riboswitch Z1 (Apéndice 4).



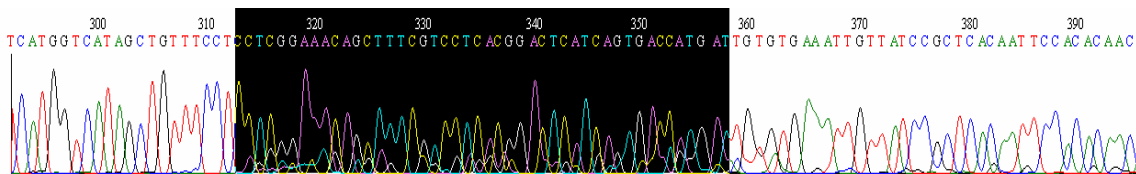
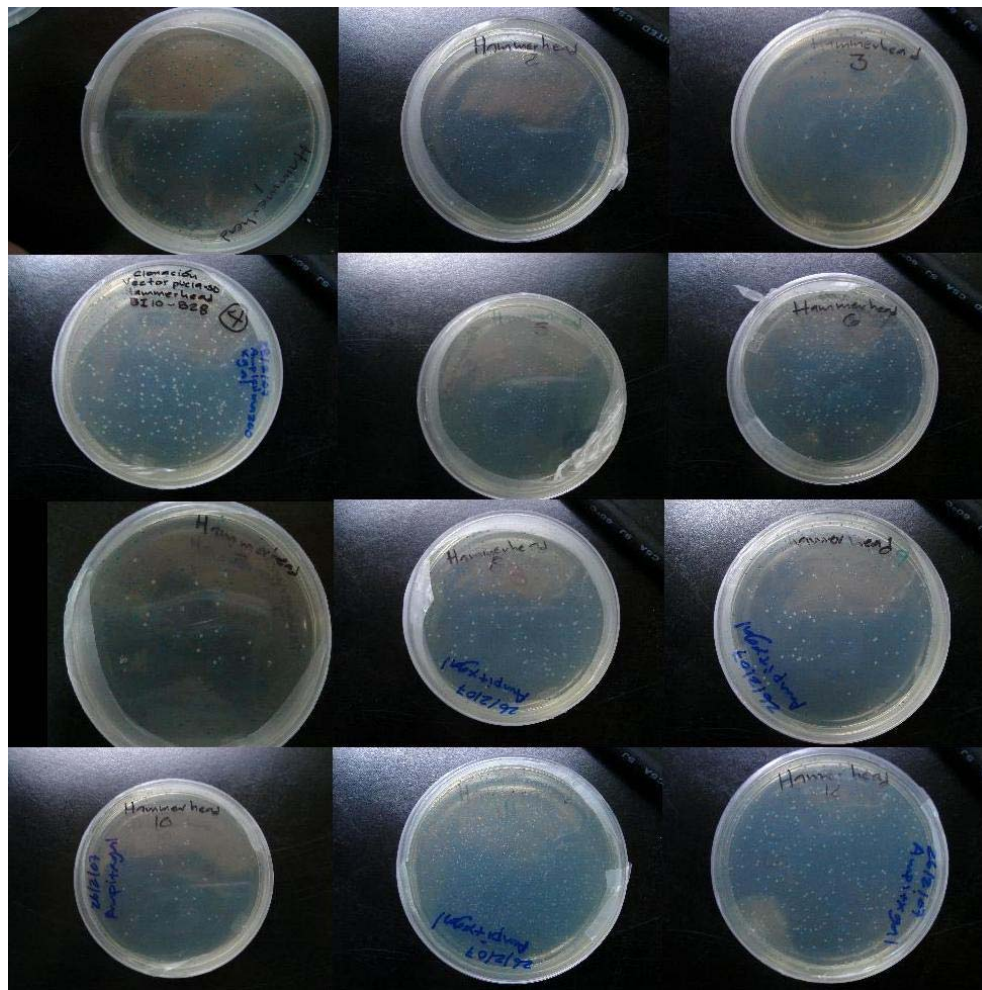
**Fig. 31 Riboswitch Z2.** a) Estructura secundaria del riboswitch Z2 señalizada por su plataforma de expresión y el aptámero. B) Plegamientos alternos del riboswitch Z2 menos viables, el plegamiento final de estas estructuras resultaría en una pérdida de función del riboswitch Z2 o en una actividad no diseñada. C) Ruta de plegamiento más viable del riboswitch Z2.

**Construcción del riboswitch sintético.**



A partir de los diseños teóricos antes expuestos, proseguimos a la fase experimental, la cual se realizó en dos fases. La primer fase consistía en sintetizar y probar los 12 diseños de la plataforma de expresión Hammerhead. La segunda fase consiste en el acoplamiento y prueba *in vivo* del riboswitch basado en los resultados *in silico*.

Se obtuvieron 12 bancos de las ribozimas Hammerhead diseñadas, uno de cada uno como se presenta en la fig. 32. Las secuencias obtenidas y analizadas eran realmente distintas a las esperadas, ya que no se lograron PCR específicos del vector de expresión, por lo que generamos un banco de vectores de expresión de distintos sitios de hibridación de los oligos y el vector. Obtuvimos falsas positivas en el momento de la elección de las colonias y posteriormente de los plásmidos, ya que se elegía el fenotipo blanco de las colonias debido a que la hammerhead impediría la traducción de *lacZ*. A pesar de la falta de precisión en la amplificación del vector, en nuestra selección de plásmidos logramos encontrar una Hammerhead del diseño 8, se secuencia se muestra en la fig. 32.

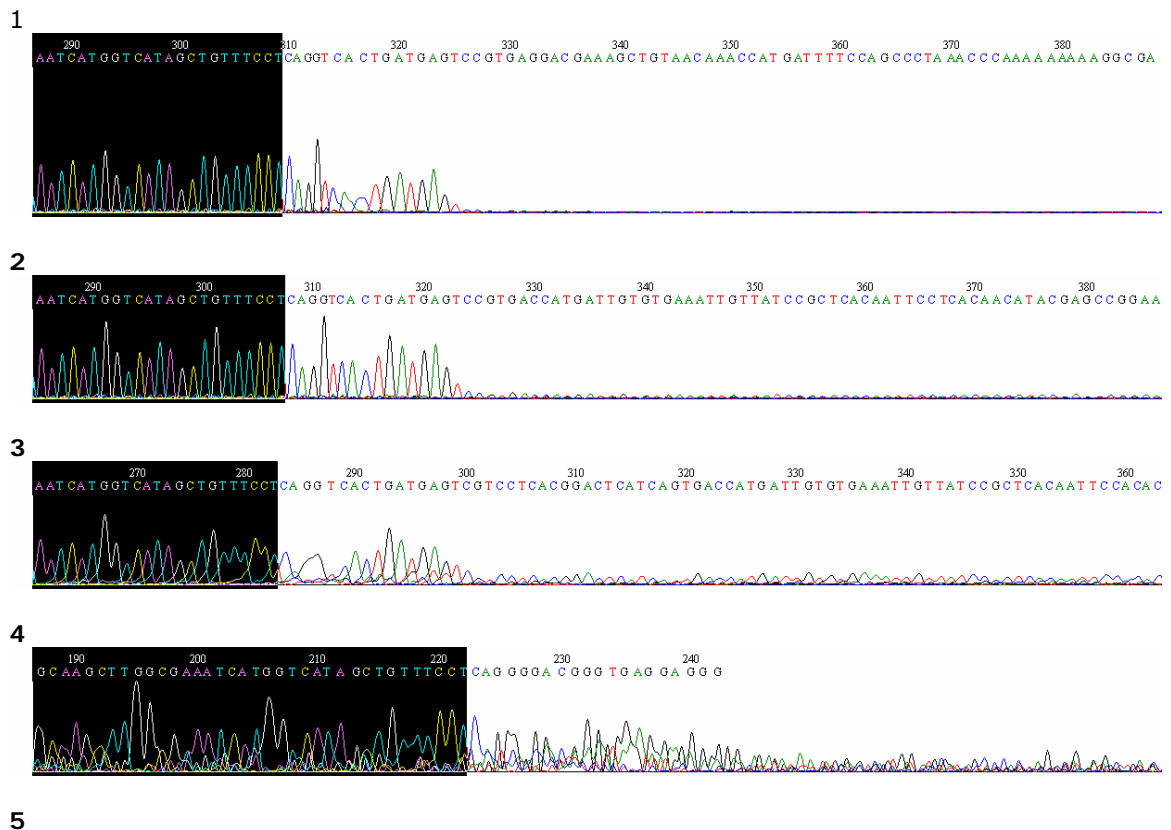


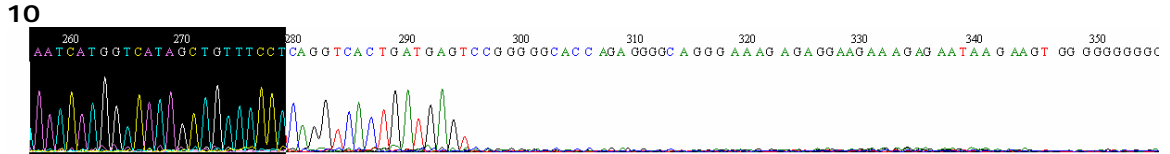
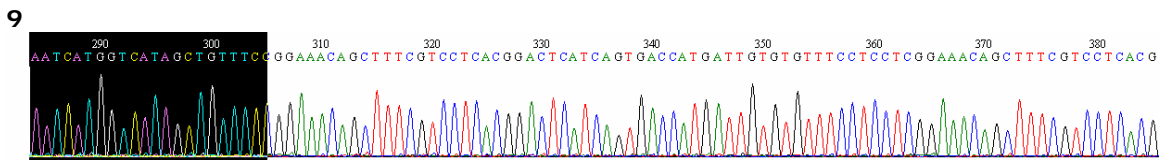
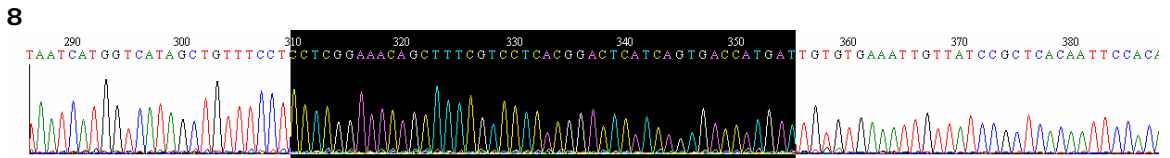
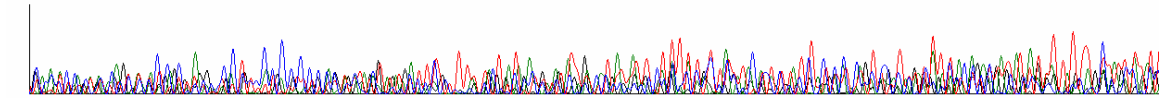
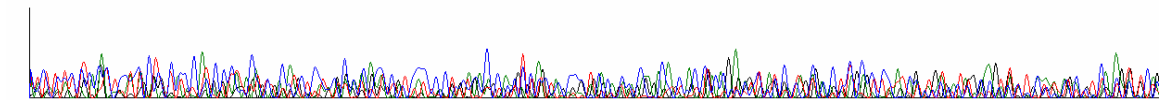
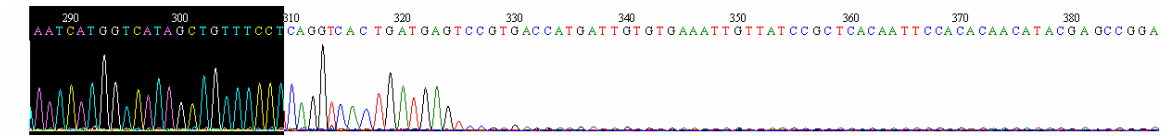
**Fig. 32. Bancos de la ribozima Hammerhead *lacZ* actuando *en cis*.**

De la cepa 8 donde se encontró la ribozima hammerhead *lacZ*, se probó la habilidad de la hammerhead a realizar el corte, se probó al eliminar la secuencia CUGA que es el sitio donde se realiza esta catálisis (fig. 26, núcleo catalítico). Se recuperó el fenotipo azul, por lo que la hammerhead no realizaba la catálisis permitiendo la expresión de *lacZ*. La hammerhead diseñada en la presente tesis es funcional y actúa *en cis*.

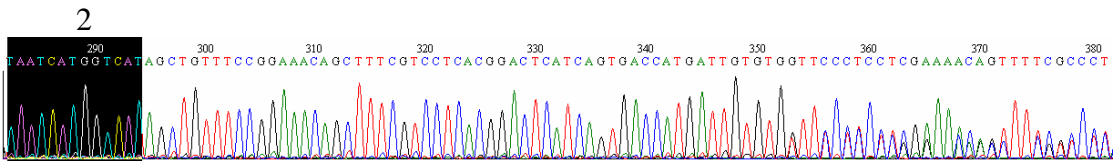
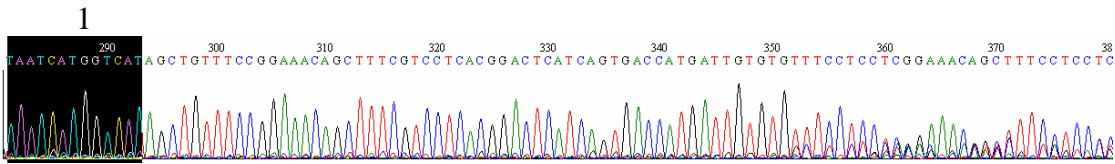
Los resultados de los bancos de ribozimas hammerhead, nos llevaron a una nueva estrategia para continuar con el ensamblaje del riboswitch. Ahora la amplificación de nuestro segundo componente del riboswitch no sería amplificado por separado, por lo que aplicamos la técnica de oligos extensivos en combinatoria con el protocolo de clonación Rodríguez- Merino para ensamblar de esta manera al riboswitch. El experimento se realizó dos veces. El primer experimento derivó de un PCR inespecífico y encontramos como en los bancos de las ribozimas, una gran diversidad en las secuencias y de 10 cepas tomadas al azar, 8 con fenotipos azules, ya que estos suponían presencia y ensamblaje del aptámero con la plataforma de expresión y 2 cepas con fenotipo blanco ya que eran representantes de ribozimas sin aptámero o de amplificaciones inespecíficas. Dado que el experimento anterior había tenido una mala amplificación por PCR, se alteraron las condiciones del PCR hasta que resultara en una amplificación de una sola banda al examinarlo por electroforesis. Ya que obtuvimos un producto de PCR específico, realizamos su clonación, sin embargo el resultado obtenido no fue el esperado. Todas las colonias presentaban un fenotipo azul y la secuencia de los plásmidos era la misma, los oligos habían hibridado exactamente en el sitio para el cual fueron diseñados, pero la secuencia del aptámero estaba en todos incompleta de la misma manera, aun así presente.

#### Cepas primer experimento



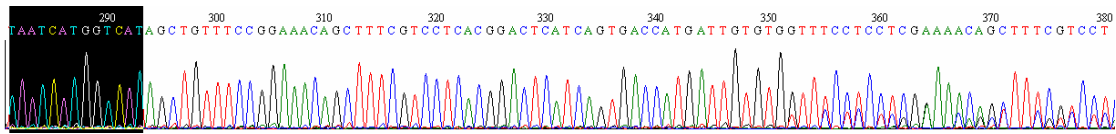


**EXPERIMENTO 2**

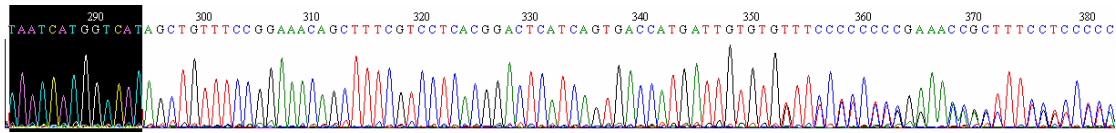


3

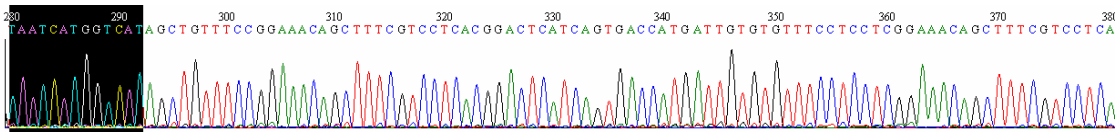




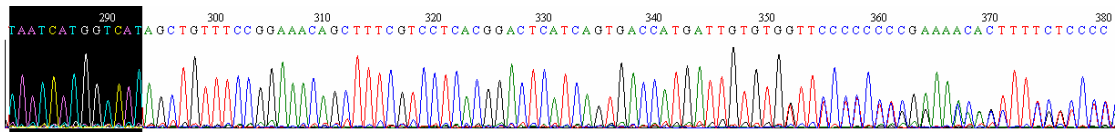
4



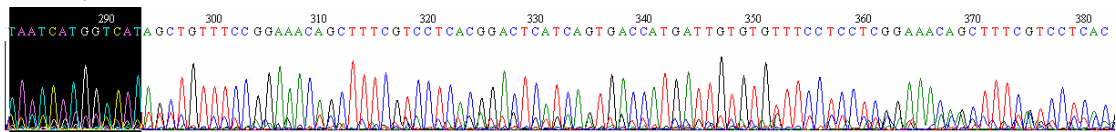
5



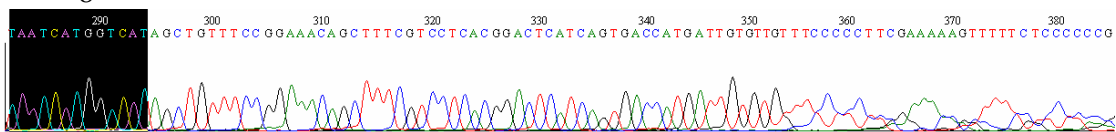
6



7



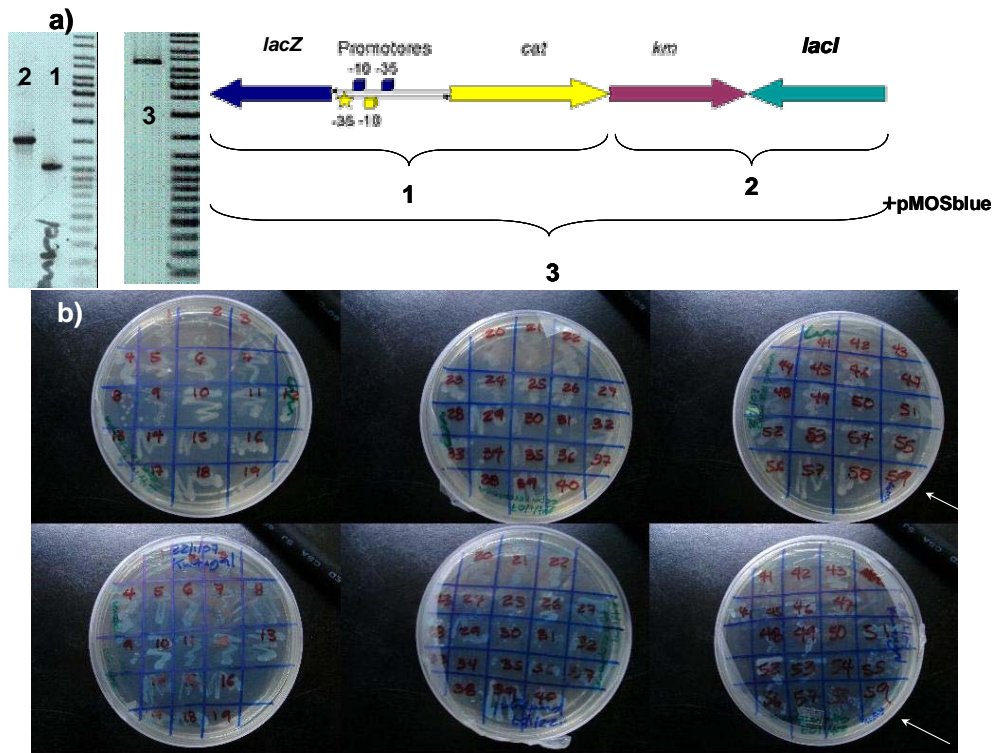
8



### Construcción de la cepa receptora

El objetivo de crear nuestra cepa receptora consiste en poder generar variantes del riboswitch sintético mediante su amplificación por PCR e inmediatamente ser integrados en el cromosoma como producto uni-copia dirigiendo la expresión de un gen reportero sin necesidad de realizar el paso intermedio de clonación en plásmido. El diseño de nuestra cepa receptora está basado en que los productos de PCR a ser integrados, deberán de activar la transcripción de dos genes orientados en direcciones divergentes, uno de ellos corresponde a un gen de resistencia (en nuestro estudio, cloranfenicol acetil transferasa, *cat*) y otro un gen reportero (en nuestro caso, beta-galactosidasa, *lacZ*). Considerando que las regiones de regulación de los genes divergentes se sintetizarían en reacciones de PCR utilizando oligos sobrelapados nuestro diseño tuvo la intención que las regiones de regulación divergentes fueran lo más pequeñas posibles para utilizar el menor número de oligos. Por lo anteriormente expuesto: los promotores bi-direccionales sobrelapados tendrían dos condiciones 1) los promotores para *lacZ* fueron diseñados para que su expresión fuera constitutiva y 2) La expresión del gen *cat* debería de ser inactiva en

ausencia del producto de PCR a integrar y se activaría con la inserción del producto de PCR. Con tal fin, la región de regulación del gen *cat* que fue insertada en la cepa receptora solamente contenía la caja -10 (TATAAT) y carecía de la caja -35 (TTGACA) que sería incluida en los fragmentos de PCR posteriores a insertar. Pese a que en teoría, ninguna cepa receptora debería de ser resistente al antibiótico cloranfenicol por no contar con la caja -35 de su región promotora, un resultado inesperado se obtuvo al encontrar que las cepas construidas presentaban resistencia a cloranfenicol a pesar que sus cepas parentales que utilizamos como control negativo, no lo eran.



**Fig. 33. Resultados de la cepa receptora.** A) resumen de la clonación de los productos de PCR necesarios para la cepa receptora, donde se señalan con número los correspondientes, se esquematizan y presentan los diferentes componentes de la cepa receptora. B) Se presenta a la cepa receptora, en las cajas de petri superiores contienen 59 colonias de la cepa receptora resistentes a cloranfenicol, la colonia 59 era el control de la integración cromosomal explicada en la metodología, en este control se insertaba en el cromosoma el gen *Km*, esta colonia no presentó resistencia a cloranfenicol; en las cajas inferiores se observa la copia de cada colonia de la cepa receptora en el medio de selección a kanamicina y X-gal, se obtuvieron todas las cepas con fenotipo azul y resistentes a kanamicina.

Por otra parte, para la integración cromosomal utilizábamos como reportero de dicho evento al gen *Km*, por lo que solamente aquellas cepas que realizaran el proceso de integración cromosomal serían resistentes al antibiótico kanamicina, y así fue. Todas las cepas que se secuenciaron a partir del DNA cromosomal contenían la secuencia esperada contenida en la región intergénica de los genes *lacZ* y *lacI*.

## Conclusiones.

La creciente tendencia de la identificación de nuevas funciones donde se implica a las moléculas de RNA, ha favorecido la creación de una nueva área de la Biología Molecular llamada RNómica. En dicha área ampliamente se observa la gran plasticidad que tiene el RNA para adquirir papeles esenciales en la regulación de la expresión génica y otros procesos celulares. Adicionalmente al aspecto básico, existe una clara tendencia a la aplicación de RNA sintéticos en diferentes proyectos de Biología Molecular y con potencial impacto en Biomedicina. Un ejemplo de ello lo constituye la obtención de RNAs sintéticos con capacidades de reconocimiento molecular diferencial, llamados aptámeros que han permitido el desarrollo de metodologías exitosas. Así lo demuestra la tendencia en el número de citas en artículos científicos indexados. El primer artículo en donde se reporta el primer aptámero data del año 1990, mientras que en el primer trimestre del 2007 fueron publicados más de 70 artículos. A partir de lo sintético se puede conocer lo natural. Un claro ejemplo de ello son los microRNA y sRNA los cuales se conocieron a partir de nuevas aplicaciones experimentales que involucran RNAs sintéticos como los iRNA en organismos eucariontes o los mic-RNA en procariontes. Ambas aplicaciones de RNA sintético actúan regulando la expresión génica en *trans*.

Como a partir de lo sintético se puede conocer lo natural, de lo natural se puede extrapolar a lo sintético. El concepto de un RNA con actividad catalítica, el cual podemos hacer funcional para regular la expresión génica, puede verse condicionado de manera racional para aumentar las posibles aplicaciones en la nueva era de la RNómica, con diseños singulares. La racionalidad que nos lleva a modelos absolutos de plegamiento funcional no existe, no obstante se conocen secuencias primarias con plegamientos secundarios establecidos, los cuales se pueden aplicar para generar modelos de acción del RNA.

Los riboswitches son estructuras de RNA funcionales con dos dominios de plegamiento que alternan su estructura dependiendo de su interacción del metabolito blanco. Esta característica fue aprovechada en nuestro estudio para generar un diseño racional de estructuras secundarias de RNA en donde la ribozima Hammerhead binaria fungió como plataforma de expresión, pese a que las más comunes en la naturaleza son los atenuadores transcripcionales y los atenuadores traduccionales. En base a un plegamiento secundario conocido de una ribozima que actúa *in trans* fuimos capaces de proponer una plataforma de expresión en donde la ribozima Hammerhead binaria actuará *en cis* para modular la expresión génica.

Nuestro proyecto propone una nueva manera de modelar a la ribozima Hammerhead binaria, en un contexto totalmente nuevo para su aplicación: i) se localiza en el extremo 5' de la región líder del mRNA, ii) se evalúan los posibles sitios de corte dentro de la región 5' en base a la dinámica de síntesis del mRNA y los plegamientos que se van adquiriendo, iii) puede ser modelada para cortar cualquier elemento reconocimiento del mRNA con los ribosomas (Secuencia Shine-Dalgarno en procariontes o CAP en eucariontes). Por lo anterior, esta nueva manera de modelar a la Hammerhead binaria puede ser aplicable para cualquier organismo, es decir, es de aplicación universal.

La potencialidad de la aplicación de nuestro modelado de la plataformas de expresión con el acoplamiento de aptámeros puede generar múltiples variantes de riboswitches sintéticos. En el caso particular de esta tesis se utilizó el aptámero de malaquita verde, pero puede ser sustituido por cualquier otro, con la excepción de aptámero que reconocen a aminoglicósidos.

## Perspectivas

Pese a que existen evidencias *in vivo* de que nuestra plataforma de expresión realiza la actividad endonucleolítica esperada, es conveniente realizar estudios más precisos, como los experimentos del tipo "in line probing" (Barrick et al., 2004a), para verificar el sitio de corte.

Acoplar a la plataforma de expresión el aptámero de malaquita verde y analizar el efecto dinámica de plegamiento *in vivo* a través de la expresión del gen reportero *lacZ*.

Integrar a cromosoma las contrucciones del riboswitch en la cepa receptora que hemos construido.

Extrapolar los resultados obtenidos en *Escherichia coli* K12 a otro tipo de organismos tanto bacterianos (*Bacillus subtilis*) como eucariontes (*Saccharomyces cerevisiae*). Mejorando la técnica de clonación Rodríguez-Merino.

## Bibliografía

1. Araki,M., Hashima,M., Okuno,Y., and Sugiura,Y. (2001a). Coupling between substrate binding and allosteric regulation in ribozyme catalysis. *Bioorg. Med. Chem.* *9*, 1155-1163.
2. Araki,M., Hashima,M., Okuno,Y., and Sugiura,Y. (2001b). Coupling between substrate binding and allosteric regulation in ribozyme catalysis. *Bioorg. Med. Chem.* *9*, 1155-1163.
3. Azmi,W., Sani,R.K., and Banerjee,U.C. (1998). Biodegradation of triphenylmethane dyes. *Enzyme Microb. Technol.* *22*, 185-191.
4. Babendure,J.R., Adams,S.R., and Tsien,R.Y. (2003). Aptamers switch on fluorescence of triphenylmethane dyes. *J. Am. Chem. Soc.* *125*, 14716-14717.
5. 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., and Breaker,R.R. (2004a). New RNA motifs suggest an expanded scope for riboswitches in bacterial genetic control. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *101*, 6421-6426.
6. 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., and Breaker,R.R. (2004b). New RNA motifs suggest an expanded scope for riboswitches in bacterial genetic control. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *101*, 6421-6426.
7. Batey,R.T., Gilbert,S.D., and Montange,R.K. (2004). Structure of a natural guanine-responsive riboswitch complexed with the metabolite hypoxanthine. *Nature* *432*, 411-415.
8. Bauer,G. and Suess,B. (2006). Engineered riboswitches as novel tools in molecular biology. *J. Biotechnol.* *124*, 4-11.
9. Baugh,C., Grate,D., and Wilson,C. (2000). 2.8 Å crystal structure of the malachite green aptamer. *J. Mol. Biol.* *301*, 117-128.
10. Blount,K.F. and Uhlenbeck,O.C. (2005). The structure-function dilemma of the hammerhead ribozyme. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* *34*, 415-440.
11. Borovok,I., Gorovitz,B., Schreiber,R., Aharonowitz,Y., and Cohen,G. (2006). Coenzyme B12 controls transcription of the *Streptomyces* class Ia ribonucleotide reductase *nrdABS* operon via a riboswitch mechanism. *J. Bacteriol.* *188*, 2512-2520.
12. Brackett,D.M. and Dieckmann,T. (2006b). Aptamer to ribozyme: the intrinsic catalytic potential of a small RNA. *Chembiochem.* *7*, 839-843.
13. Brackett,D.M. and Dieckmann,T. (2006a). Aptamer to ribozyme: the intrinsic catalytic potential of a small RNA. *Chembiochem.* *7*, 839-843.
14. Brantl,S. (2004a). Bacterial gene regulation: from transcription attenuation to riboswitches and ribozymes. *Trends Microbiol.* *12*, 473-475.

15. Brantl,S. (2004b). Bacterial gene regulation: from transcription attenuation to riboswitches and ribozymes. *Trends Microbiol.* *12*, 473-475.
16. Breaker,R.R. (2002). Engineered allosteric ribozymes as biosensor components. *Curr. Opin. Biotechnol.* *13*, 31-39.
17. Canny,M.D., Jucker,F.M., Kellogg,E., Khvorova,A., Jayasena,S.D., and Pardi,A. (2004). Fast cleavage kinetics of a natural hammerhead ribozyme. *J. Am. Chem. Soc.* *126*, 10848-10849.
18. Cech,T.R. (2004). RNA finds a simpler way. *Nature* *428*, 263-264.
19. Cheah,M.T., Wachter,A., Sudarsan,N., and Breaker,R.R. (2007). Control of alternative RNA splicing and gene expression by eukaryotic riboswitches. *Nature* *447*, 497-500.
20. Coleman,J., Green,P.J., and Inouye,M. (1984). The use of RNAs complementary to specific mRNAs to regulate the expression of individual bacterial genes. *Cell* *37*, 429-436.
21. Cromie,M.J., Shi,Y., Latifi,T., and Groisman,E.A. (2006). An RNA sensor for intracellular Mg(2+). *Cell* *125*, 71-84.
22. Datsenko,K.A. and Wanner,B.L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *97*, 6640-6645.
23. Desai,S.K. and Gallivan,J.P. (2004). Genetic screens and selections for small molecules based on a synthetic riboswitch that activates protein translation. *J. Am. Chem. Soc.* *126*, 13247-13254.
24. Eddy,S.R. (2001a). Non-coding RNA genes and the modern RNA world. *Nat. Rev. Genet.* *2*, 919-929.
25. Eddy,S.R. (2001b). Non-coding RNA genes and the modern RNA world. *Nat. Rev. Genet.* *2*, 919-929.
26. Eddy,S.R. (2001c). Non-coding RNA genes and the modern RNA world. *Nat. Rev. Genet.* *2*, 919-929.
27. Eddy,S.R. (2001d). Non-coding RNA genes and the modern RNA world. *Nat. Rev. Genet.* *2*, 919-929.
28. Eddy,S.R. (2001e). Non-coding RNA genes and the modern RNA world. *Nat. Rev. Genet.* *2*, 919-929.
29. Eddy,S.R. (2001f). Non-coding RNA genes and the modern RNA world. *Nat. Rev. Genet.* *2*, 919-929.
30. Eddy,S.R. (2001g). Non-coding RNA genes and the modern RNA world. *Nat. Rev. Genet.* *2*, 919-929.

31. Edwards,T.E. and Ferre-D'Amare,A.R. (2006). Crystal structures of the thi-box riboswitch bound to thiamine pyrophosphate analogs reveal adaptive RNA-small molecule recognition. *Structure*. *14*, 1459-1468.
32. Flores,R., Hernandez,C., de la,P.M., Vera,A., and Daros,J.A. (2001). Hammerhead ribozyme structure and function in plant RNA replication. *Methods Enzymol.* *341*, 540-552.
33. Gold,L., Brown,D., He,Y., Shtatland,T., Singer,B.S., and Wu,Y. (1997). From oligonucleotide shapes to genomic SELEX: novel biological regulatory loops. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *94*, 59-64.
34. Hampel,K.J. and Tinsley,M.M. (2006). Evidence for preorganization of the glmS ribozyme ligand binding pocket. *Biochemistry* *45*, 7861-7871.
35. Hanson,S., Bauer,G., Fink,B., and Suess,B. (2005a). Molecular analysis of a synthetic tetracycline-binding riboswitch. *RNA*. *11*, 503-511.
36. Hanson,S., Bauer,G., Fink,B., and Suess,B. (2005b). Molecular analysis of a synthetic tetracycline-binding riboswitch. *RNA*. *11*, 503-511.
37. Hanson,S., Berthelot,K., Fink,B., McCarthy,J.E., and Suess,B. (2003). Tetracycline-aptamer-mediated translational regulation in yeast. *Mol. Microbiol.* *49*, 1627-1637.
38. Henkin,T.M. and Yanofsky,C. (2002). Regulation by transcription attenuation in bacteria: how RNA provides instructions for transcription termination/antitermination decisions. *Bioessays* *24*, 700-707.
39. Isambert,H. and Siggia,E.D. (2000). Modeling RNA folding paths with pseudoknots: application to hepatitis delta virus ribozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *97*, 6515-6520.
40. Kim,D.S., Gusti,V., Pillai,S.G., and Gaur,R.K. (2005a). An artificial riboswitch for controlling pre-mRNA splicing. *RNA*. *11*, 1667-1677.
41. Kim,D.S., Gusti,V., Pillai,S.G., and Gaur,R.K. (2005b). An artificial riboswitch for controlling pre-mRNA splicing. *RNA*. *11*, 1667-1677.
42. Klein,D.J. and Ferre-D'Amare,A.R. (2006). Structural basis of glmS ribozyme activation by glucosamine-6-phosphate. *Science* *313*, 1752-1756.
43. Koizumi,M., Hayase,Y., Iwai,S., Kamiya,H., Inoue,H., and Ohtsuka,E. (1989a). Design of RNA enzymes distinguishing a single base mutation in RNA. *Nucleic Acids Res.* *17*, 7059-7071.
44. Koizumi,M., Hayase,Y., Iwai,S., Kamiya,H., Inoue,H., and Ohtsuka,E. (1989b). Design of RNA enzymes distinguishing a single base mutation in RNA. *Nucleic Acids Res.* *17*, 7059-7071.
45. Kolpashchikov,D.M. (2005). Binary malachite green aptamer for fluorescent detection of nucleic acids. *J. Am. Chem. Soc.* *127*, 12442-12443.

46. Kuwabara,T., Amontov,S.V., Warashina,M., Ohkawa,J., and Taira,K. (1996a). Characterization of several kinds of dimer minizyme: simultaneous cleavage at two sites in HIV-1 tat mRNA by dimer minizymes. *Nucleic Acids Res.* *24*, 2302-2310.
47. Kuwabara,T., Amontov,S.V., Warashina,M., Ohkawa,J., and Taira,K. (1996b). Characterization of several kinds of dimer minizyme: simultaneous cleavage at two sites in HIV-1 tat mRNA by dimer minizymes. *Nucleic Acids Res.* *24*, 2302-2310.
48. Kuznetsova,M., Novopashina,D., Repkova,M., Venyaminova,A., and Vlassov,V. (2004). Binary hammerhead ribozymes with high cleavage activity. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* *23*, 1037-1042.
49. Lee,J.F., Hesselberth,J.R., Meyers,L.A., and Ellington,A.D. (2004). Aptamer database. *Nucleic Acids Res.* *32*, D95-100.
50. Lemay,J.F., Penedo,J.C., Tremblay,R., Lilley,D.M., and Lafontaine,D.A. (2006). Folding of the adenine riboswitch. *Chem. Biol.* *13*, 857-868.
51. Lescoute,A. and Westhof,E. (2005). Riboswitch structures: purine ligands replace tertiary contacts. *Chem. Biol.* *12*, 10-13.
52. Link,K.H., Guo,L., and Breaker,R.R. (2006b). Examination of the structural and functional versatility of glmS ribozymes by using in vitro selection. *Nucleic Acids Res.* *34*, 4968-4975.
53. Link,K.H., Guo,L., and Breaker,R.R. (2006a). Examination of the structural and functional versatility of glmS ribozymes by using in vitro selection. *Nucleic Acids Res.* *34*, 4968-4975.
54. Loenen,W.A. (2006). S-adenosylmethionine: jack of all trades and master of everything? *Biochem. Soc. Trans.* *34*, 330-333.
55. Mandal,M., Boese,B., Barrick,J.E., Winkler,W.C., and Breaker,R.R. (2003a). Riboswitches control fundamental biochemical pathways in *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Cell* *113*, 577-586.
56. Mandal,M., Boese,B., Barrick,J.E., Winkler,W.C., and Breaker,R.R. (2003b). Riboswitches control fundamental biochemical pathways in *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Cell* *113*, 577-586.
57. Mandal,M., Boese,B., Barrick,J.E., Winkler,W.C., and Breaker,R.R. (2003c). Riboswitches control fundamental biochemical pathways in *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Cell* *113*, 577-586.
58. Mandal,M., Lee,M., Barrick,J.E., Weinberg,Z., Emilsson,G.M., Ruzzo,W.L., and Breaker,R.R. (2004). A glycine-dependent riboswitch that uses cooperative binding to control gene expression. *Science* *306*, 275-279.
59. Mattick,J.S. (2003b). Challenging the dogma: the hidden layer of non-protein-coding RNAs in complex organisms. *Bioessays* *25*, 930-939.
60. Mattick,J.S. (2003a). Challenging the dogma: the hidden layer of non-protein-coding RNAs in complex organisms. *Bioessays* *25*, 930-939.



61. Merino,E., Osuna,J., Bolivar,F., and Soberon,X. (1992). A general, PCR-based method for single or combinatorial oligonucleotide-directed mutagenesis on pUC/M13 vectors. *Biotechniques* 12, 508-510.
62. Merino,E. and Yanofsky,C. (2005). Transcription attenuation: a highly conserved regulatory strategy used by bacteria. *Trends Genet.* 21, 260-264.
63. Michalak,P. (2006). RNA world - the dark matter of evolutionary genomics. *J. Evol. Biol.* 19, 1768-1774.
64. Miranda-Rios,J., Navarro,M., and Soberon,M. (2001a). A conserved RNA structure (thi box) is involved in regulation of thiamin biosynthetic gene expression in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 9736-9741.
65. Miranda-Rios,J., Navarro,M., and Soberon,M. (2001b). A conserved RNA structure (thi box) is involved in regulation of thiamin biosynthetic gene expression in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 9736-9741.
66. Miranda-Rios,J., Navarro,M., and Soberon,M. (2001c). A conserved RNA structure (thi box) is involved in regulation of thiamin biosynthetic gene expression in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 9736-9741.
67. Miranda-Rios,J., Navarro,M., and Soberon,M. (2001d). A conserved RNA structure (thi box) is involved in regulation of thiamin biosynthetic gene expression in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 9736-9741.
68. Montange,R.K. and Batey,R.T. (2006). Structure of the S-adenosylmethionine riboswitch regulatory mRNA element. *Nature* 441, 1172-1175.
69. Nahvi,A., Sudarsan,N., Ebert,M.S., Zou,X., Brown,K.L., and Breaker,R.R. (2002). Genetic control by a metabolite binding mRNA. *Chem. Biol.* 9, 1043.
70. Nudler,E. and Mironov,A.S. (2004). The riboswitch control of bacterial metabolism. *Trends Biochem. Sci.* 29, 11-17.
71. Nutiu,R. and Li,Y. (2005). Aptamers with fluorescence-signaling properties. *Methods* 37, 16-25.
72. Santillan,M. and Mackey,M.C. (2005). Dynamic behaviour of the B12 riboswitch. *Phys. Biol.* 2, 29-35.
73. Schultes,E.A. and Bartel,D.P. (2000a). One sequence, two ribozymes: implications for the emergence of new ribozyme folds. *Science* 289, 448-452.
74. Schultes,E.A. and Bartel,D.P. (2000b). One sequence, two ribozymes: implications for the emergence of new ribozyme folds. *Science* 289, 448-452.
75. Serganov,A., Yuan,Y.R., Pikovskaya,O., Polonskaia,A., Malinina,L., Phan,A.T., Hobartner,C., Micura,R., Breaker,R.R., and Patel,D.J. (2004). Structural basis for discriminative regulation of gene expression by adenine- and guanine-sensing mRNAs. *Chem. Biol.* 11, 1729-1741.

76. Sioud, M. (1997). Effects of variations in length of hammerhead ribozyme antisense arms upon the cleavage of longer RNA substrates. *Nucleic Acids Res.* *25*, 333-338.
77. Soukup, G.A. (2006). Core requirements for glmS ribozyme self-cleavage reveal a putative pseudoknot structure. *Nucleic Acids Res.* *34*, 968-975.
78. Soukup, J.K. and Soukup, G.A. (2004). Riboswitches exert genetic control through metabolite-induced conformational change. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *14*, 344-349.
79. Storz, G. (2002a). An expanding universe of noncoding RNAs. *Science* *296*, 1260-1263.
80. Storz, G. (2002d). An expanding universe of noncoding RNAs. *Science* *296*, 1260-1263.
81. Storz, G. (2002b). An expanding universe of noncoding RNAs. *Science* *296*, 1260-1263.
82. Storz, G. (2002c). An expanding universe of noncoding RNAs. *Science* *296*, 1260-1263.
83. Storz, G. (2002e). An expanding universe of noncoding RNAs. *Science* *296*, 1260-1263.
84. Sudarsan, N., Barrick, J.E., and Breaker, R.R. (2003e). Metabolite-binding RNA domains are present in the genes of eukaryotes. *RNA*. *9*, 644-647.
85. Sudarsan, N., Barrick, J.E., and Breaker, R.R. (2003a). Metabolite-binding RNA domains are present in the genes of eukaryotes. *RNA*. *9*, 644-647.
86. Sudarsan, N., Barrick, J.E., and Breaker, R.R. (2003b). Metabolite-binding RNA domains are present in the genes of eukaryotes. *RNA*. *9*, 644-647.
87. Sudarsan, N., Barrick, J.E., and Breaker, R.R. (2003c). Metabolite-binding RNA domains are present in the genes of eukaryotes. *RNA*. *9*, 644-647.
88. Sudarsan, N., Barrick, J.E., and Breaker, R.R. (2003d). Metabolite-binding RNA domains are present in the genes of eukaryotes. *RNA*. *9*, 644-647.
89. Sudarsan, N., Wickiser, J.K., Nakamura, S., Ebert, M.S., and Breaker, R.R. (2003f). An mRNA structure in bacteria that controls gene expression by binding lysine. *Genes Dev.* *17*, 2688-2697.
90. Suess, B. (2005b). Engineered riboswitches control gene expression by small molecules. *Biochem. Soc. Trans.* *33*, 474-476.
91. Suess, B. (2005a). Engineered riboswitches control gene expression by small molecules. *Biochem. Soc. Trans.* *33*, 474-476.
92. Suess, B., Fink, B., Berens, C., Stentz, R., and Hillen, W. (2004). A theophylline responsive riboswitch based on helix slipping controls gene expression in vivo. *Nucleic Acids Res.* *32*, 1610-1614.

93. Tuerk,C. and Gold,L. (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* *249*, 505-510.
94. Vorobjeva,M., Gusseva,E., Repkova,M., Kovalev,N., Zenkova,M., Venyaminova,A., and Vlassov,V. (2005). Modified binary hammerhead ribozymes with high catalytic activity. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* *24*, 1105-1109.
95. Wallis,M.G. and Schroeder,R. (1997). The binding of antibiotics to RNA. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* *67*, 141-154.
96. Werstuck,G. and Green,M.R. (1998). Controlling gene expression in living cells through small molecule-RNA interactions. *Science* *282*, 296-298.
97. Wickiser,J.K., Winkler,W.C., Breaker,R.R., and Crothers,D.M. (2005a). The speed of RNA transcription and metabolite binding kinetics operate an FMN riboswitch. *Mol. Cell* *18*, 49-60.
98. Wickiser,J.K., Winkler,W.C., Breaker,R.R., and Crothers,D.M. (2005b). The speed of RNA transcription and metabolite binding kinetics operate an FMN riboswitch. *Mol. Cell* *18*, 49-60.
99. Win,M.N. and Smolke,C.D. (2007). A modular and extensible RNA-based gene-regulatory platform for engineering cellular function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *104*, 14283-14288.
100. Winkler,W.C. and Breaker,R.R. (2003b). Genetic control by metabolite-binding riboswitches. *Chembiochem.* *4*, 1024-1032.
101. Winkler,W.C. and Breaker,R.R. (2003c). Genetic control by metabolite-binding riboswitches. *Chembiochem.* *4*, 1024-1032.
102. Winkler,W.C. and Breaker,R.R. (2003a). Genetic control by metabolite-binding riboswitches. *Chembiochem.* *4*, 1024-1032.
103. Winkler,W.C. and Breaker,R.R. (2003d). Genetic control by metabolite-binding riboswitches. *Chembiochem.* *4*, 1024-1032.
104. Winkler,W.C., Nahvi,A., Roth,A., Collins,J.A., and Breaker,R.R. (2004b). Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme. *Nature* *428*, 281-286.
105. Winkler,W.C., Nahvi,A., Roth,A., Collins,J.A., and Breaker,R.R. (2004a). Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme. *Nature* *428*, 281-286.
106. Winkler,W.C., Nahvi,A., Sudarsan,N., Barrick,J.E., and Breaker,R.R. (2003). An mRNA structure that controls gene expression by binding S-adenosylmethionine. *Nat. Struct. Biol.* *10*, 701-707.
107. Xayaphoummine,A., Bucher,T., and Isambert,H. (2005c). Kinefold web server for RNA/DNA folding path and structure prediction including pseudoknots and knots. *Nucleic Acids Res.* *33*, W605-W610.

108. Xayaphoummine,A., Bucher,T., and Isambert,H. (2005b). Kinifold web server for RNA/DNA folding path and structure prediction including pseudoknots and knots. *Nucleic Acids Res.* 33, W605-W610.
109. Xayaphoummine,A., Bucher,T., and Isambert,H. (2005a). Kinifold web server for RNA/DNA folding path and structure prediction including pseudoknots and knots. *Nucleic Acids Res.* 33, W605-W610.
110. Yen,L., Svendsen,J., Lee,J.S., Gray,J.T., Magnier,M., Baba,T., D'Amato,R.J., and Mulligan,R.C. (2004a). Exogenous control of mammalian gene expression through modulation of RNA self-cleavage. *Nature* 431, 471-476.
111. Yen,L., Svendsen,J., Lee,J.S., Gray,J.T., Magnier,M., Baba,T., D'Amato,R.J., and Mulligan,R.C. (2004b). Exogenous control of mammalian gene expression through modulation of RNA self-cleavage. *Nature* 431, 471-476.
112. Yen,L., Svendsen,J., Lee,J.S., Gray,J.T., Magnier,M., Baba,T., D'Amato,R.J., and Mulligan,R.C. (2004c). Exogenous control of mammalian gene expression through modulation of RNA self-cleavage. *Nature* 431, 471-476.
113. Yen,L., Svendsen,J., Lee,J.S., Gray,J.T., Magnier,M., Baba,T., D'Amato,R.J., and Mulligan,R.C. (2004d). Exogenous control of mammalian gene expression through modulation of RNA self-cleavage. *Nature* 431, 471-476.

## APÉNDICE

### Apéndice I

#### 1. Protocolo de PCR con la DNA polimerasa AccuPrime™ *Pfx*.

Todas las amplificaciones de esta tesis se llevaron a cabo bajo las condiciones y los componentes que a continuación se mencionan.

Componentes:

- Agua destilada estéril.
- Mix de reacción AccuPrime™ *Pfx* 10X(incluye dNTPs).
- MgSO<sub>4</sub> 50 mM
- Templado a una concentración de 10 pg- 200 ng.
- Oligos a una concentración de 20 pmol/ µl cada uno.
- Enzima AccuPrime 1.25 unidades.

El ciclado de cada PCR varió, ya que variaban las TM de los oligos y el tiempo de extensión está supeditada a la longitud de la cadena a amplificarse. Cabe señalar que la enzima AccuPrime™ *Pfx* realiza la extensión a 68°C a diferencia de la Taq polimerasa que lo realiza comúnmente a 72°C. Otra de las cualidades de dicha enzima es que posee la misma fidelidad que la enzima *Pfu* y tiene una rápida tasa de extensión, por lo que fue seleccionada para realizar las reacciones de PCR ya que requeríamos de la precisa amplificación de nuestros diseños a amplificar (sin adeninas adicionales en los extremos).

#### 2. Protocolo de electroforesis.

La concentración del gel de agarosa depende del tamaño de los fragmentos de ADN a separar, siendo la concentración mínima el 0.7% (fragmentos grandes de varias Kpb) y la máxima el 4% (fragmentos de 50-150 pb).

Se pesó 1gr de agarosa y se disolvió en 100ml de buffer TAE (Tris-acetatos; Tris-Acetato 0.04M, EDTA 0.001M) para que quedara a una concentración del 1%. Para disolver la agarosa se calentó la solución en el horno de microondas, posteriormente se dejó enfriar y se prosedió al preteñido del gel con bromuro de etidio (5 mg/ml) agregando 0.5µl por 25ml de agarosa. Se transfiere la agarosa teñida a una cubeta de electroforesis previamente preparada con el tamaño del peine requerido para la cantidad de solución objetivo y se deja enfriar. Posteriormente cuando la agarosa ha gelificado, el peine se desprende del gel y se transfirió a la cámara de electroforesis. Se llenó la cámara de electroforésis con buffer TAE a que cubra el gel y se cargaron las muestras previamente mezcladas con Azul de bromofenol 0.25%. La electroforesis se efectuó a 100 volts y se visualizó con la transferencia de rayos UV (365nm) en el transiluminador.

#### 3. Protocolo de purificación de los productos de PCR

Todos los productos de PCR se purificaron mediante el Kit High Pure PCR Product Purification de la compañía Roche Applied Science, bajo el siguiente protocolo.

A los PCR cuyo producto se visualizaba por electroforesis en un gel de agarosa al 1% como banda única se les consideró PCR específicos por lo que no tuvo que pasar por

un gel preparativo para su purificación y se realizó la purificación de la siguiente manera: a cada 100µl de la reacción de PCR se le agregaron 500 µl de buffer de unión a DNA, posteriormente el líquido se pasó a la columna que contiene el filtro del Kit previamente conectado con el tubo colector, se centrifugó la muestra durante un minuto a 13,000 rpm. Se desechó el líquido del tubo colector y a la columna se le agregaron 500 µl del buffer de lavado. La muestra se centrifugó durante un minuto a 13,000 rpm y se desechó el líquido. Se repitió este paso nuevamente cambiando el volumen del buffer de lavado a 250 µl. Finalmente se cambió el tubo colector por un tubo estéril eppendorf sin tapa, se le agregaron 100 µl de agua estéril a la columna y se centrifugó durante un minuto a 13,000 rpm.

Sin embargo no todos los PCR se lograron obtener específicos, por lo que el tamaño de la banda que correspondía a la amplificación de DNA esperada fue extraído mediante el corte directo de la banda contenida en un gel preparativo de agarosa al 1%. El protocolo que se aplicó fue prácticamente el mismo, a diferencia de lo siguiente. La banda de agarosa escindida fue pesada con un tubo eppendorf (previamente pesado) en una balanza analítica, por cada 100mg del gel de agarosa se le añadieron 300 µl del Buffer de unión y se siguieron los mismos pasos del Protocolo de purificación de productos de PCR antes expuestos.

#### **4. Protocolo de preparación de células electrocompetentes.**

Medio YENB (bacto yeast extract 0.75%, bacto nutrient Broth 0.85)

Se inoculó la cepa *Escherichia coli* DH5α (o la de interés) mediante una asada en 5ml de medio líquido YENB, y se incubó la muestra a 37°C en agitación constante por 12 horas. Posteriormente, a cada uno de 4 matraces erlenmeyer de 250 ml se añadieron 50 ml de medio líquido YENB y 500µl del cultivo de *Escherichia coli* DH5α crecido durante toda la noche (ON). Este inóculo se dejó crecer a 37°C en agitación constante; a la hora y media se comenzaron las mediciones en el espectrofotómetro con una longitud de onda de 600nm cada 15 min para determinar la densidad óptica a la que se encontraba el cultivo, al llegar a la OD de 0.6 se transfirió cada cultivo a un tubo falcón de 50ml y se dejó enfriar en hielo durante 10 min. Al pasar el tiempo de enfriamiento se centrifugó por 10min/5,000 rpm a 4°C, se resuspendió la pastilla en 1 ml de agua fría a una temperatura ambiente de 4°C. Ya que se había resuspendido la pastilla se le agregaron 49ml de agua fría y se centrifugo por 10min/5,000 rpm a 4°C, se repitió el paso anterior pero solamente se le añadió la mitad del volumen de agua fría. A cada pastilla resultante del paso anterior se resuspendió con 1ml de glicerol al 10% frío y se centrifugó de igual manera, repitiendo dos veces. Finalmente la pastilla se resuspendió en 150µl de glicerol al 10% y se hicieron alícuotas de 40 µl en tubos eppendorf cuales fueron guardadas a -70°C.

#### **5. Purificación de DNA plasmídico (Minipreps)**

Se llevó a cabo la extracción del DNA plasmídico mediante el kit Wizard® Plus SV de Promega. Se creció un inóculo en 5ml de medio LB durante 12h a 37°C con agitación constante, posteriormente se centrifugó el cultivo a 13,000 rpm durante un minuto, se decantó el medio LB y se resuspendió la pastilla con 250µl de la solución de resuspensión del kit mediante el vortex, se lisaron las células mediante la adición al medio de 250 µl de la solución de lisis invirtiendo el tubo eppendorf cuatro veces y agregándole 10 µl de la solución de proteasa alcalina invirtiendo cuatro veces el tubo eppendorf para mezclar las soluciones, se incubó la muestra durante 5min a temperatura ambiente y posteriormente

se le agregaron 350 µl de la solución de neutralización invirtiendo el tubo eppendorf cuatro veces para mezclar y se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min. Del resultado de los pasos anteriores se decantó el sobrenadante transparente y se transfirió a la columna que incluye el kit previamente conectada con el tubo colector, se centrifugó durante un minuto a 13 000 rpm y se decantó el líquido contenido en el tubo conector, se procedió a limpiar la muestra mediante la adición de 750 µl de la solución de lavado del kit y se centrifugó durante un minuto a 13,000 rpm decantando el líquido que pasó por la columna, se repitió el paso anterior con la reducción a 250 µl de la solución de lavado, se secó la columna decantando el líquido mediante centrifugación a 13,000 rpm durante dos minutos. Finalmente se obtuvo el DNA al añadir 100 µl de agua libre de nucleasas a la columna. Para verificar la presencia y concentración de DNA se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 1%.

## 6. Protocolo de purificación de DNA cromosomal mediante lisis alcalina.

Se inoculó mediante asada 5ml de medio LB de la cepa de interés, se creció a 37°C en agitación constante por 12 horas. Se centrifugó en un tubo eppendorf el cultivo a 13,000 rpm durante 2 min, se decantó el supernadante y nos quedamos con el pellet. El pellet se resuspendió pipeteando en 567 µl de buffer TE (10 mM de Tris-HCl pH 7.5, 1mM de EDTA pH 8), se le adicionaron 30 µl de SDS al 10% y 3 µl de proteinasa K a un concentración 20 mg/ml (concentración final de 100 µg/ml de proteinasa K en 0.5% de SDS), se mezcló mediante la agitación del Vortex y se incubó durante una hora a 37°C. Después de la incubación, se le adicionaron 100 µl de NaCl 5M y se mezcló con el vortex, se le agregaron 80 µl de la solución CTAB/NaCl mezclándose al agitarse en el vortex para posteriormente ser incubado por 10 min a 65°C. Posteriormente se le adicionó un volumen equivalente (0.7 a 0.8 ml) de 24:1 cloroformo/ isoamil alcohol, se mezcló y se centrifugó durante 5 min a 13,000 rpm y se removió la fase acuosa para transferirse a un tubo eppendorf estéril el supernadante viscoso. Se le adicionó un volumen equivalente de 25:24:1 fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, se mezcló y se centrifugó durante 5 min a 13,000 rpm. El supernadante se transfirió a un tubo eppendorf estéril y se le adicionaron 0.6 del volumen de isopropanol para precipitar los ácidos nucleicos. Se centrifugó durante 5 min a 13,000 rpm, se desechó el supernadante y se le agregó 1 ml de etanol al 70%. Se centrifugó 1 min a 13,000 rpm, se desechó el líquido y se secó la muestra para finalmente resuspenderlo en 100 µl de agua.

## Apéndice II. Secuencias de las 12 variantes de la ribozima Hammerhead diseñada para esta tesis.

Secuencia de la hammerhead diseñada. La secuencia con letras rojas indica la región del loop. Con amarillo se resalta la secuencia fija a lo largo de las 12 combinaciones. Con azul se resaltan los nucleótidos variantes en las diferentes combinaciones.

TAATCATGGTCACTGATGAGTCCGTGAGGACGAAAGCTGTTT CCT GAGG  
AGGAAACAGCTATGACCATGATTA

TAATCATGGTCACTGATGAGTCCGTGAGGACGAAAGCTGTTT CCT GAGG

Variantes a realizar de la hammerhead.

TAATCATGGTCACTGATGAGTCCGTGAGGACGAAAGCTGTTTCCT GAGG  
 TAATCATGGTCACTGATGAGTCCGTGAGGACGAAAGCTGTTTCC GAGG  
 TAATCATGGTCACTGATGAGTCCGTGAGGACGAAAGCTGTTTC GAGG

AATCATGGTCACTGATGAGTCCGTGAGGACGAAAGCTGTTTCCT GAGG  
 AATCATGGTCACTGATGAGTCCGTGAGGACGAAAGCTGTTTCC GAGG  
 AATCATGGTCACTGATGAGTCCGTGAGGACGAAAGCTGTTTC GAGG

ATCATGGTCACTGATGAGTCCGTGAGGACGAAAGCTGTTTCCT GAGG  
 ATCATGGTCACTGATGAGTCCGTGAGGACGAAAGCTGTTTCC GAGG  
 ATCATGGTCACTGATGAGTCCGTGAGGACGAAAGCTGTTTC GAGG

TCATGGTCACTGATGAGTCCGTGAGGACGAAAGCTGTTTCCT GAGG  
 TCATGGTCACTGATGAGTCCGTGAGGACGAAAGCTGTTTCC GAGG  
 TCATGGTCACTGATGAGTCCGTGAGGACGAAAGCTGTTTC GAGG

**Apéndice III. Tabla de análisis de aptámeros candidatos para el riboswitch sintético.** Datos tomados de <http://aptamer.icmb.utexas.edu>

Nombre del blanco	Tipo de blanco	Es un aminoglicosido?*	Participa en el metabolismo celular naturalmente?
Isoleucina	Péptido	No	Sí
Kanamicina y lividomicin	Aminoglicosidos	Si	No
ATP	Nucleico	No	Si
Neuropéptido Y	Péptido	No	Si
FAD	Nucleico	No	Si
Coenzima A	Orgánico	No	Si
S-adenosilmetionina	Orgánico	No	Si
L-arginina	Orgánico	No	Si
Estreptavidin	Carbohidrato	No	Si
Ácido Colic	Orgánico	No	Si
Vitamina B12	Inorgánico	No	Sí
Malaquita verde	Inorgánico	No	¿?
Epítopes	Péptidos	No	No
Zinc 2+	Inorgánico	No	Si
Teofilina	Inorgánico	No	No

\* Ya que las ribozimas son inhibidas por aminoglicosidos, los blancos de esta naturaleza no podrán ser utilizados en el diseño del riboswitch sintético.

**Apéndice IV. Resultados de el modelado con el programa Kinefold. Se encuentra en el CD incluido.**