



**Universidad
Europea VALENCIA**

UNIVERSIDAD EUROPEA DE VALENCIA

Facultad de Ciencias de la Salud

Grado en Biotecnología

Trabajo Fin de Grado

Curso 2024-2025

**Redescubriendo las ribozimas *Hammerhead*: estudio de
nuevas variantes encontradas en obeliscos**

Autor

Barber Sánchez, María

Tutor

Interno: Dr. Mercado, Borja

Externo: Dr. De la Peña, Marcos y Rueda, Olga

Valencia, 2025

**Redescubriendo las ribozimas *Hammerhead*: estudio de
nuevas variantes encontradas en obeliscos**

Trabajo Final de Grado, presentado por:

Barber Sánchez, Maria

Tutorizado por:

Interno: Dr. Mercado, Borja

Externo: Dr. De la Peña, Marcos y Rueda, Olga

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

UNIVERSIDAD EUROPEA DE VALENCIA

VALENCIA

CURSO 2024-2025

Agradecimientos o dedicatorias

Me gustaría agradecer en primer lugar a mis padres, a mi abuela, a mis tíos y primos y al resto de mi familia por ser un apoyo fundamental durante toda la carrera, por creer en mí y animarme, por escucharme siempre y darme consejos, pero sobre todo a mis padres por el esfuerzo que han hecho para darme lo mejor siempre y por su cariño incondicional, gracias por ser mis pilares y por guiarme en la vida.

En segundo lugar, me gustaría agradecer a mi tutor externo, Marcos de la Peña, por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y aprender de un experto. También me gustaría agradecer a Olga que ha sido la que más me ha ayudado en el laboratorio, teniéndome paciencia y enseñándome cómo mejorar mis habilidades, estoy segura de que sin ella no lo habría conseguido.

En tercer lugar, me gustaría agradecer a mi tutor interno, Borja Mercado, por su paciencia y dedicación a guiarme en la aventura que es realizar un TFG.

Me gustaría agradecer a la Universidad Europea de Valencia por brindarme la oportunidad de estudiar la carrera de mis sueños, por la oportunidad de realizar prácticas extracurriculares y el TFG experimental. Agradecer a mis profesores por su labor y sus ganas de enseñarnos de formas más innovadoras y didácticas, sobre todo a Cristina García, nuestra coordinadora y profesora de ingeniería genética que gracias a ella hemos podido realizar todas las visitas y actividades de nuestro interés. Gracias a todos ellos por formarnos y alentarnos a ser mejores profesionales y personas.

Por último, agradecer a mis amigos, especialmente a los que he hecho durante la carrera, a Rubén, a Blanca y a Carla, gracias por ser mis amigos, por las tardes en Gilet, las conversaciones y paniquear juntos por casi todo, por los cotilleos compartidos y por ser un soporte en un sitio donde estoy lejos de mi familia, espero que nuestra amistad dure muchos años más.

Resumen

Los obeliscos han irrumpido en el mundo científico generando más preguntas que respuestas en lo que se ha convertido como uno de los organismos infecciosos más pequeños existentes. Los obeliscos son entidades de ARN circular que infectan bacterias y se clasifican en dos familias, según tengan o no ribozimas de autocorte de tipo cabeza de martillo o *Hammerhead*. En este trabajo hemos querido caracterizar algo mejor estos novedosos agentes infecciosos estudiando las ribozimas *Hammerhead* presentes en algunos obeliscos. Las *Hammerhead* son un tipo de ribozimas que se caracterizan por su pequeño tamaño y su potencial para usarse en edición genética gracias a su velocidad de autocorte catalítico del ARN. En concreto, las *Hammerhead* de algunos obeliscos tienen una mutación, una adenina extra en el núcleo catalítico conservado, así como uracilos extra en una de sus hélices, que las hace únicas y muy interesantes. Su estudio permitirá determinar la velocidad de catálisis de ARN además de comprobar si son funcionales gracias al análisis mediante cinéticas de autocorte co-transcripcionales. Para ello se estudiará una de las variantes *Hammerhead* detectada, llamada HHR1, tanto es su versión salvaje como mutada en su adenina extra bien con la delección de la misma o cambiada por citosina, guanina o uracilo. Para las mutaciones se diseñaron primers que hibridaron con el plásmido que contenía la secuencia de HHR1 y se confirmó por secuenciación la presencia de las mutaciones deseadas. Por último, se realizaron las cinéticas de autocorte de cada construcción, encontrando que la HHR1 salvaje es funcional, alcanzando niveles de autocorte similares a la versión sin la adenina extra y la que contenía la mutación de A→U. Las mutaciones A→C y A→G, sin embargo, dieron lugar a ribozimas inactivas para el autocorte.

Palabras clave: ribozima *Hammerhead*, autocorte, velocidad catalítica, centro catalítico, obeliscos, tallo, hélice

Abstract

Obelisks have recently caught the attention of the scientific community, sparking more questions than answers about what is now considered one of the smallest known infectious agents. These circular RNA elements infect bacteria and are grouped into two families, depending on whether they carry hammerhead-type self-cleaving ribozymes or not. In this study, we aimed to gain a deeper understanding of these novel infectious agents by examining the hammerhead ribozymes found in some obelisks. Hammerhead ribozymes are small catalytic RNAs known for their ability to self-cleave efficiently, which also makes them promising tools for genetic editing. Specifically, the hammerhead ribozymes in some obelisks show a unique mutation, an extra adenine in the conserved catalytic core, as well as additional uracils in one of their helices. These unusual features make them particularly interesting to study. Our goal was to evaluate their RNA cleavage activity and determine whether they are functional, using co-transcriptional self-cleavage kinetic assays. We focused on one particular variant, named HHR1, and analysed both its wild-type form and several mutants in which the extra adenine was either deleted or substituted with cytosine, guanine, or uracil. To generate the mutations, we designed specific primers that hybridized to the plasmid containing the HHR1 sequence, and we confirmed the presence of the intended mutations through sequencing. Finally, we performed self-cleavage assays on each construct. The results showed that the wild-type HHR1 is active, with self-cleavage levels similar to the version without the extra adenine and the A→U mutant. In contrast, the A→C and A→G mutations produced inactive ribozymes.

Keywords: *Hammerhead* ribozyme, self-cleaving, catalytic rate, catalytic core, obelisks, stem, helices

1.Introducción

Hasta hace un año se pensaba que los agentes infecciosos más simples eran únicamente los virus y viroides. Sin embargo, la creación de un software llamado Viroid Nominator (VNom) especializado en identificar elementos similares a viroides en conjuntos de datos de secuenciación de ARN y el uso de bases de datos del Proyecto Integrador del Microbioma Humano (iHMP), juntamente con el uso de las bases de datos en NCBI propiciaron el descubrimiento de los obeliscos. Los obeliscos son un grupo de estructuras secundarias de RNA con forma de bastón de unos 1000 nt aproximadamente. Estos fueron encontrados inicialmente en el intestino de los seres humanos. Todos codifican al menos para una familia de proteínas llamada oblin1, y en algunos casos cuentan con ribozimas de autocorte de tipo cabeza de martillo o *Hammerhead*. Por ello clasificamos los obeliscos en dos grupos, los que no cuentan con ribozimas *Hammerhead* y los que si cuentan con ellas. El descubrimiento reciente de dichos agentes replicantes hace que aún queden muchas preguntas por resolver, como cuál es su función biológica y como se replican (Zheludev et al., 2024).

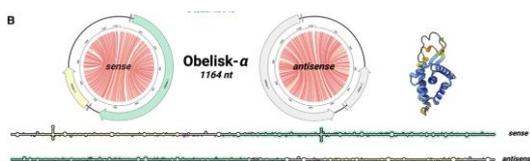


Figura 1. Representación de un obelisco con sus cadenas sentido y anti-sentido y la proteína que codifica perteneciente a la familia de las oblinas (Zheludev et al., 2024).

El estudio de las ribozimas de los obeliscos es crucial para averiguar su función. Las ribozimas son ARNs catalíticos de diferentes tipos, destacando entre todas ellas las ribozimas autocatalíticas pequeñas. Dentro de éstas están las ribozimas *Hammerhead*, las *Hairpin* las del virus de la hepatitis Delta, la ribozima del satélite Varkud, Hatchet, Twister, Twister

sister, Pistol, Hovlinc y la ribozima glmS (por glucosamine-6-phosphate synthase) (Wong et al., 2023). La primera ribozima identificada fue sin embargo una de mayor tamaño, el Intrón del grupo I, con alrededor de 413 nucleótidos, del ARN nuclear del protozoo *Tetrahymena thermophila*. En 1983 se describió una segunda ribozima con actividad catalítica en trans, la RNasa P (común en todos los organismos), de unos 400 nucleótidos perteneciente a las bacterias *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* (Guerrier-Takada et al., 1963; Symons, 1992).

Los ARN catalíticos se clasifican en 4 grupos: grupo I de los intrones, grupo II de intrones, grupo de la RNasa P y grupo de las *Hammerhead*, siendo las *Hammerhead* las pertenecientes al cuarto grupo (Saville & Collins, 1990). Las ribozimas *Hammerhead* son muy peculiares debido a su pequeño tamaño de alrededor de 30-50nt y se organizan en tres grupos, de tipo I, de tipo II o tipo III en función de la hélice que queda abierta (De La Peña et al., 2017). Las hélices I, II y III son las que conforman la ribozima *Hammerhead* junto con el núcleo catalítico al que rodean (figura 2). El núcleo catalítico es una secuencia altamente conservada de alrededor de 13 nucleótidos que junto con la estructura global confieren la posibilidad de que las ribozimas se autocorten en un punto específico (Symons, 1992). El tallo consiste en una secuencia de nucleótidos no conservada pero que le confiere cierta estabilidad al núcleo catalítico debido a que se trata de la secuencia que sigue a este. El tallo II se trata de una secuencia de nucleótidos de los cuales 2 son conservados en todas las ribozimas, siendo una región clave para la función de las *Hammerhead* debido a que determina que tan rápido corta, cuanto más corta sea esta región más lento catalizará el material genético. El tallo III se trata del triplete de escisión o lo que es lo mismo, de la zona encargada de hacer el corte por parte de la ribozima al ARN. Normalmente,

se trata de un conjunto de tres nucleótidos específicos pero que se ha visto que en la naturaleza permiten cierta variabilidad, aun siendo predominante la secuencia GUC también se puede encontrar la GUA y la AUA, el único nucleótido conservado de esta región es por tanto el uracilo (Birikh et al., 1997; De La Peña et al., 2017; Hammann et al., 2012) (figura 2).

Las ribozimas *Hammerhead*, se descubrieron en un grupo de ARNs subvirales de plantas, más concretamente en un viroide y el ARN satélite del virus del anillo del tabaco en la planta del tabaco (Brill et al., 2024). Posteriormente se encontraron codificados en genomas de diversos organismos como tremátodos, insectos o en tritones (De La Peña et al., 2017; Pabon-Pena et al., 1991) por lo que hay 2 hipótesis principales sobre su origen. Por una parte, está la hipótesis llamada herencia ancestral, plantea que se hayan heredado de un ancestro común hace muchos años, cuando evolucionaron estas. Por otra parte, se plantea la hipótesis denominada de evolución independiente, que se fundamenta en la posibilidad de que este tipo de ribozimas haya surgido varias veces de forma aleatoria entre los diferentes organismos que las tienen. Sin embargo, no se han resuelto todavía ninguna de las dos, pero se sabe que estas estructuras de las ribozimas *Hammerhead* son fáciles de formar y además son altamente eficientes en el auto corte de ARN. La función de auto-corte que ocurre al romperse un enlace fosfodiéster específico para generar un grupo fosfato cíclico 2',3' y un grupo hidroxilo 5'. La forma de esta ribozima en 3D es de Y, estando formada gracias a puentes de hidrogeno. Esto se descubrió gracias a técnicas como la difracción de rayos X (DRX, de sus siglas en inglés) (Heinz W. Pley et al., 1994), transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET, de sus siglas en inglés), movilidad electroforética y birrefringencia eléctrica en los años noventa. (Brill et al., 2024; Naghdi et al., 2020)

Actualmente, se han encontrado ribozimas *Hammerhead* codificadas en bacterias, arqueas, hongos incluso en humanos. En el caso de los humanos, se hallaron conservadas en intrones donde aún se desconoce qué papel juegan (De La Peña et al., 2017; Perreault et al., 2011).

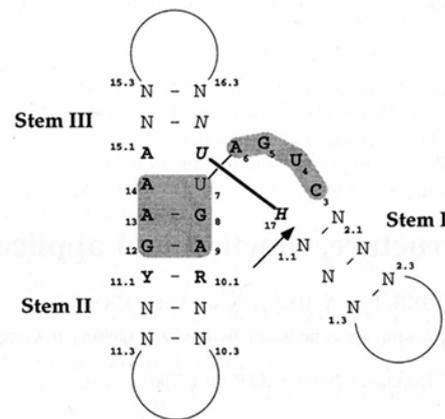


Figura 2. Esquema de la estructura 2D de las ribozimas *Hammerhead* por cristalografía de rayos-x (Birikh et al., 1997). El tallo I y II forman las partes superiores de la Y, mientras que el stem III forma la parte inferior de la Y.

El mecanismo de acción de estas ribozimas consiste en que el sustrato se une a la ribozima, formando el complejo enzima sustrato, si hay iones metálicos como el Mg^{2+} en el medio. Entonces, la enzima cataliza la escisión del ARN, dando lugar a los productos. La velocidad de catalización de este proceso puede verse afectada por diversos factores, entre los cuales destacan el pH y la temperatura. A un pH más alcalino más rápido ocurrirá la reacción y a mayor temperatura más rápida será la reacción siguiendo un comportamiento lineal de un gráfico de Arrhenius. La concentración de los iones metálicos divalentes presentes en el lugar de reacción influye en la estabilización de la estructura y facilitar que se dé la reacción. En el caso de que no se encuentren en la concentración adecuada la reacción se producirá más lenta o no se producirá, un claro ejemplo es el Mg^{2+} cuya concentración ideal esta entre 0,1 y 0,5M (Blount & Uhlenbeck, 2005; Canny et al., 2004).

Se intuye que este tipo de ribozimas pueden tener un papel muy importante en cuanto a la inactivación génica de ARN y por ende pueden ser útiles para terapia génica (Enjoji et al., 2000; Nischal et al., 2013), modificando la configuración del tallo III, lo que permitiría a la ribozima realizar su actividad catalítica en cualquier molécula (Birikh et al., 1997). Al contrario que los RNA de interferencia que solo son aplicables en eucariotas, estas ribozimas, no solo pueden usarse con eucariotas, sino que también con procariotas. La combinación de ambos ofrecería ventajas ya que los RNA de interferencia ejercen el *Knockout* de genes mucho mejor que las ribozimas (Shao et al., 2007).

La tasa de corte de las *Hammerhead* naturales está entre 0.4 a 2.5 min⁻¹ a una concentración estándar 1mM de MgCl₂, con un pH de 7.5 a 25°C. Al contrario que otras ribozimas, las *Hammerhead* debido a su tamaño, son más rápidas realizando el corte. Por ejemplo, las ribozimas de intrones del grupo II, que son más grandes, también son más lentas. Por el contrario, las *Hairpin* pueden llegar a ser más rápidas que las *Hammerhead*, pero al tener una elevada constante de auto ligación, los niveles de autocorte en el equilibrio mucho menores (Stage-Zimmermann & Uhlenbeck, 1998). Otros factores clave para la reacción son los grupos 2-hidroxilo y desoxirribonucleótidos (dNTPs). Al usar desoxirribonucleótidos la actividad de las enzimas disminuye hasta 10 veces siendo esencial el grupo 2-hidroxilo para que se dé la catálisis (Symons, 1992). Por lo que se ha descubierto, la estructura de las *Hammerhead* es muy fácil de manipular utilizando pinzas magnéticas (Lu et al., 2025).

Entre todas las ribozimas *Hammerhead* descritas, las halladas en algunos obeliscos presentan unas peculiaridades que las hacen especiales y sumamente interesantes de estudiar. Se encuentran 2 tipos muy similares, llamadas como HHR1 (por rare1) y la HHR2 (por rare2).

Dichas ribozimas contienen en su núcleo catalítico conservado CUGAnGA un nucleótido extra, dando lugar a la secuencia CUGAAAnGA (figura 3), lo que es algo nunca observado en ninguna otra *Hammerhead* natural. En el caso de la HHR1, cuenta además un uracilo extra en el tallo II, mientras que la HHR2, cuenta además de con una adenina extra en el núcleo catalítico, con dos uracilos extra en el tallo II. Aunque se creía que en la naturaleza el centro catalítico es prácticamente invariable, se han encontrado *Hammerhead* que si tienen mutaciones en los residuos de este (Perreault et al., 2011), por lo que se plantean varias hipótesis relacionadas con su función, creyendo que son capaces de regular actividades celulares dependiendo de cambios en el microambiente. Un claro ejemplo sería la variante A6C del bacteriófago Bcep176 con una mutación en su núcleo que hace que en presencia de manganeso experimente autocorte. Por ello, se cree que puede funcionar como un sensor de cationes divalentes y ejercer un papel importante en la homeostasis celular (Brill et al., 2024; Naghdi et al., 2020). Por todo lo mencionado anteriormente, el objetivo principal de este artículo es determinar si las ribozimas HHR1 y HHR2 pertenecientes a los obeliscos son capaces de cortar eficientemente el ARN o no y si lo son, que pasaría si se mutaran bien eliminando la adenina extra, o bien cambiandola por citosina, uracilo o guanina. También se observará cuánto tiempo tarda en realizar su función y cuáles son las condiciones óptimas de reacción. Esto tiene un papel destacado en cuanto al objetivo de desarrollo sostenible número 9: Industria, innovación e infraestructura, más concretamente en el 9.5 debido a que amplía el conocimiento de esta materia aún más ofreciendo colaboraciones internacionales y mejorando la investigación del país de origen al igual gracias a las posibles aplicaciones biotecnológicas de dichas ribozimas.

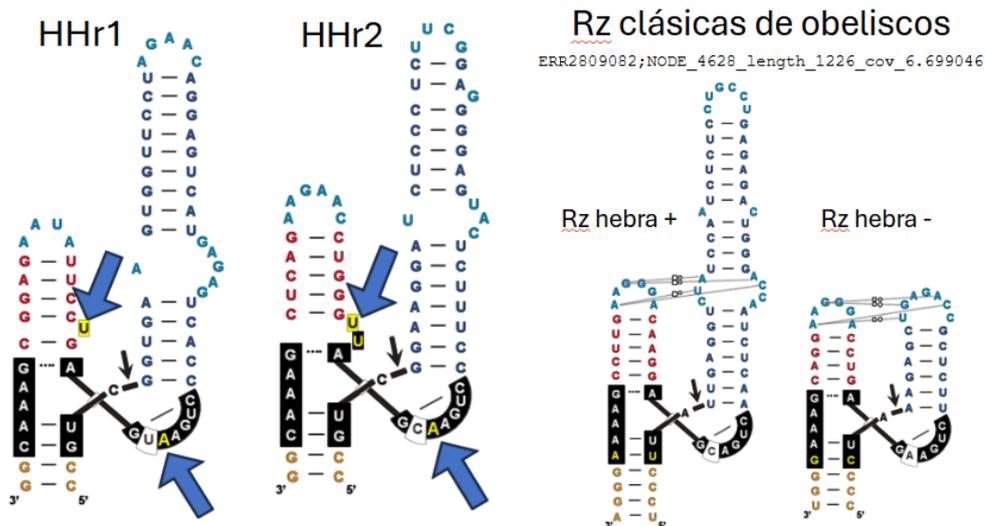


Figura 3. Esquema de la estructura 2D de la HHr1, la HHr2 y una *Hammerhead* clásica de obeliscos.

2. Materiales y métodos

2.1. Diseño primers y PCR

Para la elaboración de la PCR de mutagénesis de la HHr1, se diseñaron *primers* D y R solapantes según Sanjuán & Daròs (2007) usando la secuencia reversa complementaria a la de la ribozima Rare 1 que se tenía previamente clonada en el plásmido pUC18. Estos *primers* fueron encargados Integrated DNA Technologies (IDT). Se pidieron 8 *primers*, dos de ellos para eliminar la adenina extra en el núcleo catalítico y los otros corresponden a los *primers* directo y reverso con los nucleótidos de guanina, timina y citosina.

Tabla 1. *Primers* usados

HHr1_Del D	5'-GAG AGT CAC CCT GAT GAG TCC TTA TAA GAG-3'
HHr1_Del R	5'-CTC TTA GGA CTC ATC AGG GTG ACT CTC-3'
HHr1_mutC D	5'-GAG AGT CAC CCT GAC TGA GTC CTT ATA AGA-3'
HHr1_mutC R	5'-CTC TTA TAA GGA CTC AGT CAG GGT GAC TCT-3'
HHr1_mutG D	5'-GAG AGT CAC CCT GAG TGA GTC CTT ATA AGA-3'
HHr1_mutG R	5'-CTC TTA TAA GGA CTC ACT CAG GGT GAC TCT-3'
HHr1_mutT D	5'-GAG AGT CAC CCT GAT TGA GTC CTT ATA AGA-3'
HHr1_mutT R	5'-CTC TTA TAA GGA CTC AAT CAG GGT GAC TCT-3'

Las PCR se realizaron cada una con unos *primers*, el reverso y complementario de cada uno para poder obtener las mutaciones deseadas. La PCR duró 15 ciclos, usando el termociclador de Life ECO. Las condiciones de las diversas PCR se adaptaron según la técnica *One-step site-directed mutagenesis of viroid dimeric cDNA* con las de la propia casa comercial de la polimerasa, efectuando la desnaturalización a 98°C, el alineamiento en función de la temperatura de *melting* (TM) de cada primer fue a 57°C o 59°C, y la extensión a 72°C por 2 minutos y 48 segundos.

Tabla 2. Cantidad en ug de *primers* y muestra usados en la PCR

Muestra	1ug
HHr1_del D	0,69ug
HHr1_del R	0,68ug
HHr1_mut D	0,71ug
HHr1_mut R	0,70ug

Posteriormente se digirió cada reacción de PCR con la enzima DPNI a 37°C por 45 minutos, con el fin de eliminar el ADN metilado que se ha utilizado como molde antes de transformar las células.

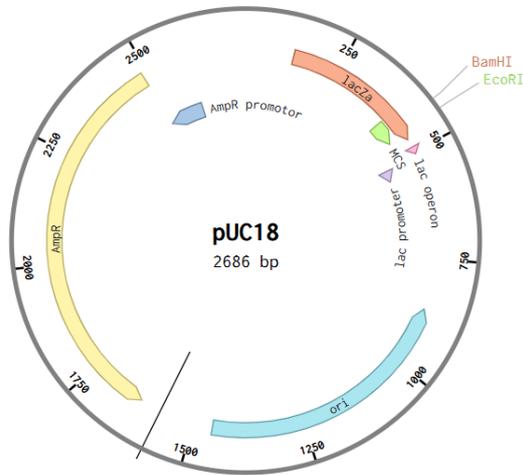


Figura 4. Plásmido pUC18 estructura

2.2. Purificación PCR

Una vez terminada la PCR se ha de purificar para solamente obtener las secuencias que se desean, la secuencia de la HHR1_mutC, HHR1_mutG, HHR1_mutT y HHR1_Del. La purificación se realizó según las instrucciones del kit comercial mi-PCR de Metabion®.

2.3. Transformación y cultivo bacterias

La transformación se llevó a cabo usando células *E.coli* de la cepa DH5α preparadas químicamente y siguiendo el protocolo del artículo (Green & Rogers, 2013). Se realizaron minipreps o cultivos líquidos de 5ml de medio LB y 5uL de carbenicilina 100mg/mL y *Escherichia coli* con el plásmido pUC 18, resistente a la ampicilina, con HHR1. En cada mini se puso una colonia individual de la placa de LB y antibiotico. Se dejaron incubar *overnight* a 37°C y agitación.

2.4. Extracción de ADN de minis y gel de agarosa

La extracción se llevó a cabo usando el kit Plasmid DNA Midi de OMEGA.

A continuación, se corrieron geles de agarosa 1% (p/v) en tampón TBE 1x, durante 46 minutos a voltaje constante (85V). Se usó GeneRuler 1kb DNA Plus (Thermo Scientific™) como marcador de tamaño molecular y 200ng de clon original como control de tamaño. Los geles se tiñeron usando 10uL de bromuro de etidio y agua destilada por 10 minutos, para luego revelarlos en el transiluminador de labnet ENDURO GDS TOUCH.

Las bandas que se parecían más a las del marcador fueron las pertenecientes a las colonias mandadas a secuenciar (figura 5)

2.5. Midiprep de las muestras originales

Con la finalidad de tener un *stock* suficiente para los posteriores ensayos, se realizaron midipreps tanto de HHR1 *wildtype* como de las mutantes obtenidas. Para ello, se prepararon cultivos líquidos de 200mL de LB y 200uL de Carbenicilina (100mg/ml), y se inocularon con células DH5α transformadas con cada construcción. Estos cultivos se *overnight* a 37°C con agitación en el incubador GFL 3031.

Pasado el tiempo de crecimiento, se realizó la extracción del DNA usando el kit genopure plasmid midi kit de ROCHE® y la centrifuga de la Beckman®.

2.6. Digestión con EcoRI y purificación

Con el objetivo de linealizar el plásmido para su posterior transcripción *in vitro*, se realizó una digestión *overnight* de las muestras con la enzima EcoRI de Takara, siguiendo el protocolo establecido por la casa comercial para 10ug de ADN. Se usaron 10ug de las muestras purificadas de las midis, 3uL de tampón EcoRI (k) 10x y 2uL de la enzima EcoRI para un volumen total de reacción de 30ul, y se dejó *overnight* a 37°C en la estufa. Posteriormente se llevó a cabo la purificación de los ácidos nucleicos mediante una extracción con cloroformo en una proporción 1:1 (v/v), seguida de centrifugación a 20000 rpm durante 5 minutos a 4°C con la centrífuga Hermile de Labortenk GmbH. Finalmente, tras lograr la separación de fases, se precipitó el ADN contenido en la fase acuosa con una mezcla de acetato sódico 3M (1:10, v/v) y etanol absoluto (2.5:1, v/v) frío, y se centrifugó a 20000 rpm a 4°C por 20 minutos., El precipitado se dejó secar durante unos 10 minutos y se resuspendió en 20uL de H₂O. La cuantificación del DNA total digerido se obtuvo de la medición con el nanodrop ND-1000 Spectrophotometer.

Este proceso se realizó para todas las muestras, para la muestra de HHR1 *wildtype*, la muestra de HHR1 con el nucleótido de interés eliminado, la muestra de HHR1 con la mutación de A→C, la muestra de HHR1 con la mutación de A→G y la muestra de HHR1 con la mutación de A→T.

2.7. Cinéticas co-transcripcionales

Se analizó la actividad catalítica de la HHR1 y sus mutaciones mediante cinéticas co-transcripcionales usando la RNA-polimerasa T3 de Roche y a condiciones estándar de 37°C y a diversas concentraciones de NTPs y MgCl₂, con el fin de averiguar las mejores condiciones de autocorte de la HHR1. Las cinéticas que se

realizaron fueron: HHR1 a 2, 7, 20, 60 y 120 minutos; HHR1 y HHR1_Del a 30 segundos, 1,2 y 10 minutos; HHR1 a 1mM, 0,5mM y 0,25mM de NTPs a tiempos de 30 segundos, 1 y 5 minutos; HHR1 a buffer 2x con 1mM NTPs y 1mM MgCl₂ y a 3mM de NTPs a tiempos de 1, 2 y 10 minutos. Las mutaciones se evaluaron por cinéticas de HHR1_mutG y HHR1_mutC a 0,5mM NTPs a 37 y a tiempos de 1, 10, 30 60 y 120 minutos y HHR1_mutG y HHR1_mutT a tiempos de 1, 2, 10, 30 y 60 minutos. Por último, la última cinética fue una comparativa entre HHR1 y HHR2 a 0,5mM de NTPs a tiempos de 15 y 30 segundos, 1, 2 y 10 minutos. Todas las cinéticas se realizaron usando el termociclador Mini Cycler MJ Research®.

2.8. Geles desnaturalizantes al 5% de acrilamida y urea al 8M

Para evaluar las cinéticas, se hicieron geles PAGE de acrilamida y urea. Los geles se prepararon usando 19gr de Urea de Thermo Scientific®, 18ml de H₂O miliq, 4mL de TBE 10x, 5ml de acrilamida al 40% de Panreac®, 30uL de TEMED de Panreac® y 500uL de PSA de Acros organics, teniendo un volumen total de 40ml cada gel. Se realizó la electroforesis durante 1 hora y 4 minutos a 220V con el voltaje constante. Los geles se tiñeron con SYBER GOLD y agua destilada durante 7 minutos para luego lavarlos con agua destilada y revelarlos con el transiluminador de labnet® ENDURO GDS TOUCH. Los geles realizados corresponden a las cinéticas realizadas, por lo que se agruparon en un mismo gel las cinéticas que se hicieron al mismo tiempo para mejorar su comparación y poder analizarlas correctamente.

2.9. Análisis bioinformático

Para el análisis de los geles y de las cinéticas realizadas se usó el programa GIMP para transformar las imágenes en unos archivos con extensión BMP

compatibles con el programa Image Gauge, para cuantificar el porcentaje de corte de las ribozimas *Hammerhead*. Los datos obtenidos en Image Gauge se exportaron en formato TEXT para luego analizarlos usando EXCEL, donde se obtuvieron los datos tratados. Por último, se usó el programa Startgraphics® para crear las gráficas de regresión no lineal de los porcentajes de corte respecto al tiempo de las *Hammerhead*.

Para estudiar la posible estructura 3D de las HHR1 *wildtype* y la HHR1_Del se introdujeron sus secuencias en el predictor AlfaFold3 de forma individual. Finalmente, ambos modelos fueron tratados con la herramienta PyMOL Molecular Graphics System.

3. Resultados

3.1. Evaluación de las mutaciones

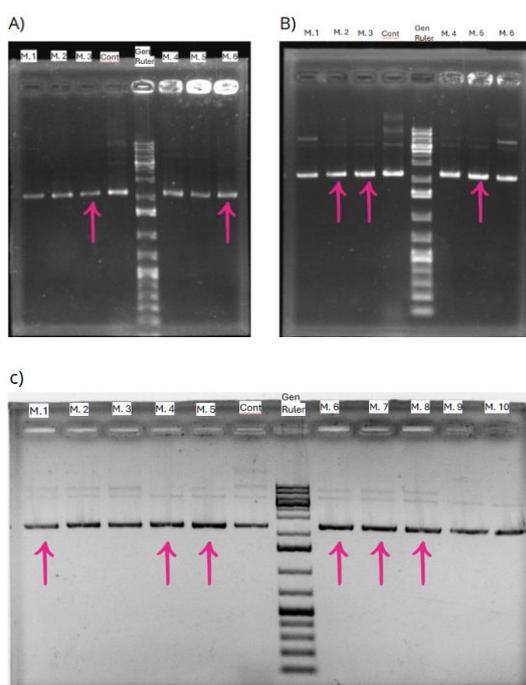


Figura 5. Imágenes de los geles de agarosa y TBE 1x, las colonias mandadas a secuenciar están señaladas con una flecha rosa. A) Gel de agarosa y TBE 1x con las colonias de la PCR para deleccionar la A. B) Gel de agarosa y TBE 1x con las colonias de la PCR de mutagénesis. C) Gel de agarosa y TBE 1x con las colonias de la PCR de mutagénesis.

De la placa 1, las colonias 3 y 6 mandadas a secuenciar mostraron que ambas estaban mutadas haciendo que la A extra del núcleo catalítico de la *Hammerhead* este deleccionada por lo que se consiguió una de las mutaciones objetivo.

De la placa 2, las colonias 3 y 5, presentaban la mutación de A→G, mientras que la colonia 2 presentaba la mutación A→C en el núcleo catalítico de la *Hammerhead*. De la placa 3, las colonias 1 y 5, presentaban la mutación A→C, mientras que la colonia 6 presentaba la mutación A→G, la única colonia secuenciada en obtener la mutación A→T fue la 7. Las colonias 4 y 8 estaban incorrectas.

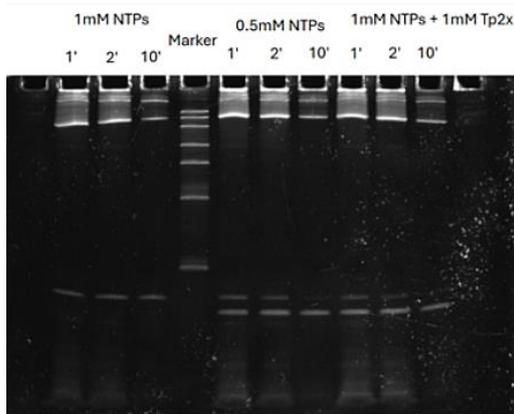
3.2. Geles y cinéticas

El gel realizado con las cinéticas de la HHR1 a 1mM de NTPs y 1mM NTPs, pero con tampón al 2x y una última cinética a 0,5mM de NTPs a tiempos de 1, 2 y 10 minutos, mostro que a 1mM de NTPs no se formaban bandas de corte, en cambio tanto a 0,5mM como a 1mM de NTPs, pero con de tampón 2x si se formaban bandas de corte de ARN, siendo la única variable los NTPs en las tres cinéticas esto ayuda a determinar las condiciones óptimas del funcionamiento de la *Hammerhead* (figura 6A). En cambio, el gel realizado con las 3 cinéticas de HHR1 a mismos tiempos pero cada una a diferentes concentraciones de NTPs, 1mM, 0,5mM y 0,25mM, a tiempos de 30 segundos, 1 y 5 minutos mostraron que esta vez también no aparecían bandas de corte a 1mM de NTPs a los 30 segundos ni al minuto pero a los 5 minutos se puede apreciar una sutil banda pero que a 0,5 de NTPs se podían observar perfectamente las bandas de corte desde los 30 segundos de forma intensa, hasta los 5 minutos donde se puede observar que la banda superior perteneciente al ARN propio de la ribozima se desvanece pero queda el de la banda de abajo perteneciente a la del corte del ARN. En cuanto a la cinética de HHR1 a 0,25 de NTPs, también se observan bandas de corte, pero solo a tiempos de 30 segundos y

1 minutos, a los 5 minutos no aparece ninguna banda, al minuto solo se observa la

banda inferior perteneciente al corte, pero más débil que a los 30 segundos (figura 6B).

A)



B)

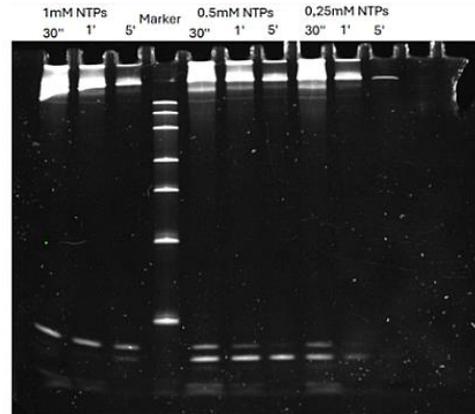


Figura 6. A) Gel con las cinéticas de la HHR1 a diferentes concentraciones de NTPs, a 1mM, a 0,5mM y a 1mM, pero con tampón al 2x, con marcador RiboRuler Low Range RNA Ladder de Thermofisher®. B) Gel con las cinéticas de la HHR1 a diferentes concentraciones de NTPs, a 1mM, a 0,5mM y a 0,25mM, con marcador RiboRuler Low Range RNA Ladder de Thermofisher®.

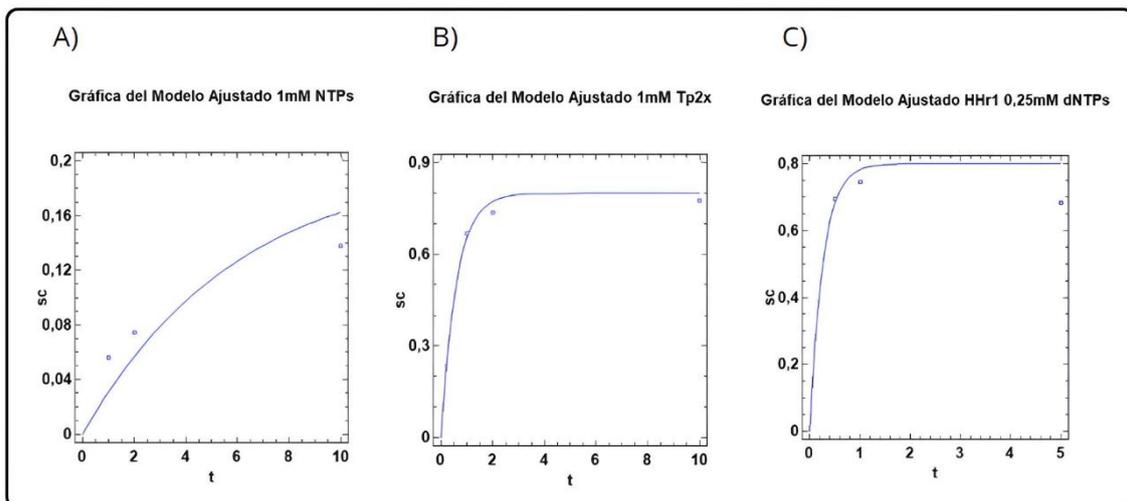


Figura 7. A) Gráfica de los porcentajes de corte de la cinética de la HHR1 a 1mM de NTPs a tiempos de 1, 2 y 10 minutos. B) Gráfica de los porcentajes de corte de la cinética de la HHR1 a 1mM de NTPs tampón 2x a tiempos de 1, 2 y 10 minutos. C) Gráfica de los porcentajes de corte de la cinética de la HHR1 a 0,5mM de NTPs a tiempos de 30 segundos, 1 y 5 minuto.

La cinética de la HHR1 a 1mM de NTPs a tiempos de 1, 2 y 10 minutos, mostro una $K= 0,16 \text{ min}^{-1}$. Al minuto el porcentaje de corte era de 5,63%, a los dos minutos era de 7,44% y a los 10 minutos era de 13,75% con una $R^2= 56,60\%$ por lo que la gráfica no se ajustaba mucho a los datos de los porcentajes de corte (figura 7A). La cinética de la HHR1 a 1mM de NTPs, pero con 1mM de tampón a 2x a tiempos de 1, 2 y 10 minutos, mostro una $K= 1,70 \text{ min}^{-1}$. Al minuto, el porcentaje de corte era de

66,76%, a los dos minutos era de 73,61% y a los 10 minutos era de 77,71%, con una $R^2= 65,67\%$, indicando que la gráfica se ajusta parcialmente a los porcentajes de corte de la ribozima (figura 7B). La cinética de la HHR1 a 0,25mM de NTPs a tiempos de 30 segundos, 1 y 5 minutos, mostro una $K= 3,84 \text{ min}^{-1}$. A los 30 segundos el porcentaje de corte era de 69,41%, al minuto era de 74,40% y a los 5 era de 68,23%, con una $R^2= 0\%$, la gráfica no se ajusta a los datos (figura 7C).

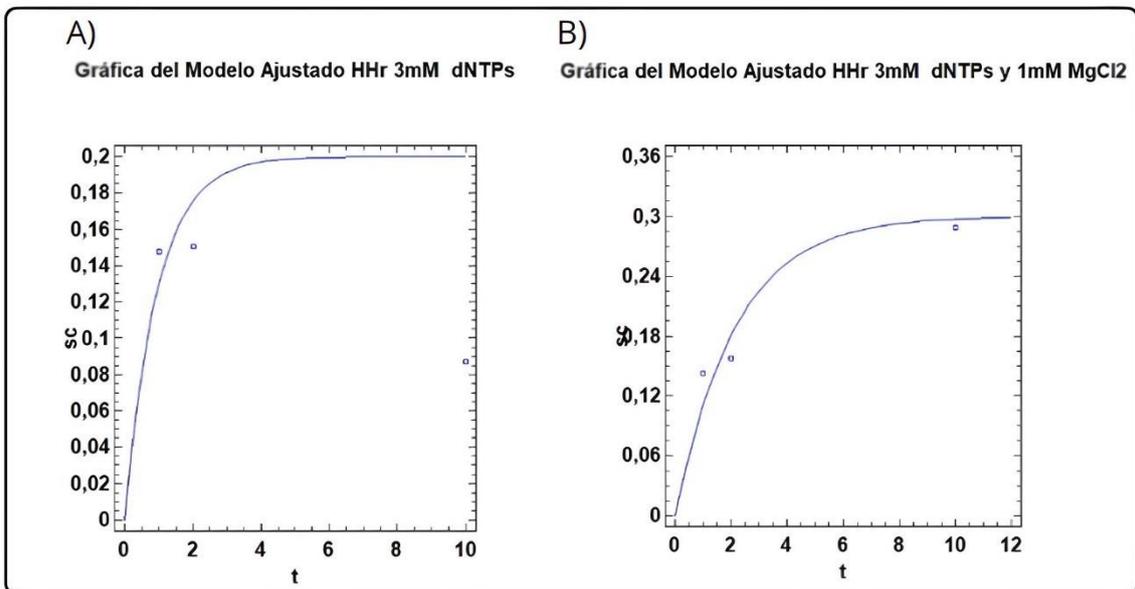


Figura 8. A) Gráfica de los porcentajes de corte de la cinética de HHR1 a 3mM de NTPs a tiempos de 1, 2 y 10 minutos. B) Gráfica de los porcentajes de corte de la cinética de la HHR1 a 3mM de NTPs y 1mM de MgCl₂ a tiempos de 1, 2 y 10 minutos.

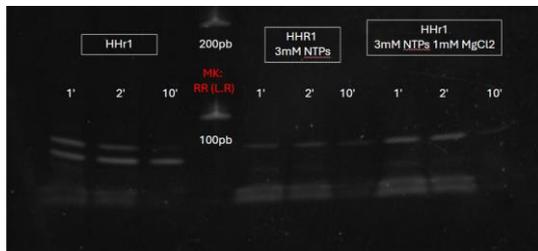


Figura 9. Gel de las cinéticas de la ribozima HHR1 a concentraciones de NTPs de 0,5mM, 3mM y 3mM con 1mM de MgCl₂ con marcador RiboRuler Low Range RNA Ladder de Thermofisher®

El gel realizado con las cinéticas de la HHR1 *wildtype* a 3mM de NTPs y 3mM de NTPs, pero con MgCl₂ 1mM, mostro que apenas había bandas de corte a 1, 2 y 10 minutos, en cambio la cinética de la HHR1 a concentraciones de NTPs de 0,5mM realizada en el mismo gel que las otras dos si muestran bandas de cortes de ARN. La cinética de la HHR1 a 3mM de NTPs a tiempos de 1, 2 y 10 minutos, mostraron una $K = 1,05 \text{ min}^{-1}$. Al minuto el porcentaje de corte era del 14,79%, a los 2 minutos era de 15,05% y a los 10 minutos era de 8,71% pero con una R^2 del 0% por lo que la gráfica no está ajustada con los datos (figura 9A). La cinética de la HHR1 a 3mM de NTPs y 1mM de MgCl₂ a tiempos de 1, 2 y 10 minutos, mostro una $K = 0,45 \text{ min}^{-1}$. Al minuto el porcentaje de corte era de 14,26%, a los 2 minutos era de 15,76% y a los 10 minutos era de 28,90% con una $R^2 = 87,62\%$ por lo que la gráfica se ajusta a los datos (figura 9B).

El gel realizado con la cinética de la HHR1 *wildtype* y HHR1_Del mostro que tanto la HHR1 *wildtype* como la HHR1_Del son capaces de escindir el ARN a tiempos de 30 segundos, 1, 2 y 10 minutos, habiendo terminado a los 10 minutos de escindir el ARN, por lo que podemos decir que no solo es funcional, sino que es más rápida que la HHR1 (figura 9).

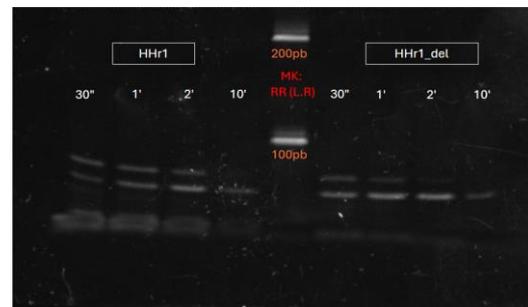


Figura 10. Gel de las cinéticas de la ribozima HHR1 y HHR1_Del y marcador de pesos moleculares RiboRuler Low Range RNA Ladder de Thermofisher®, a 0,5mM de NTPs.

La cinética de la HHR1_Del a 0,5mM de NTPs a tiempos de 30 segundos, 1 y 2 minutos, mostraron una $K = 2,32 \text{ min}^{-1}$. A los 30 segundos el porcentaje de corte era del 63,42%, al minuto era de 79,19% y a los 2 minutos era de 86,52%, con una $R^2 = 95,22\%$ (figura 10).

Gráfica del Modelo Ajustado HHR1 del

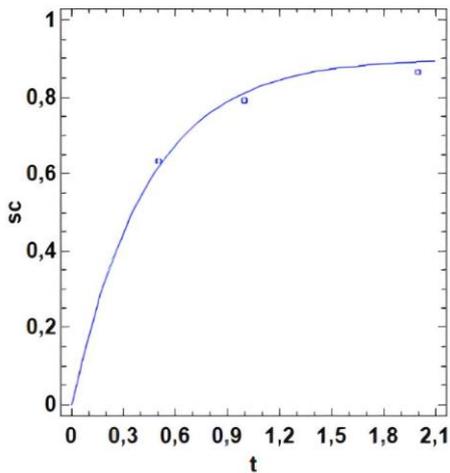


Figura 11. Gráfica de los porcentajes de corte de la cinética de la HHR1_Del a tiempos de 30 segundos, 1 y 2 minutos a 0,5mM de NTPs.

El gel realizado con las cinéticas de la HHR1 y la HHR2 a tiempos de 15 y 30 segundos, 1, 2 y 10 minutos con una concentración de NTPs de 0,5mM para la HHR1 y tiempos de 1, 2, 5, 7 y 10 minutos para la HHR2, mostró que ambas cinéticas presentaban bandas inferiores de corte. En el caso de la HHR1, a los 15 segundos, la banda de corte es sutil, en cambio, a los 30 segundos la banda inferior y la superior

están en equilibrio de intensidad, al minuto, ya se puede ver como la banda de corte se hace más intensa hasta que a los 10 minutos, la banda superior es muy sutil, mostrando que se ha terminado la catálisis del ARN. En el caso de la HHR2, al minuto la banda de corte es muy sutil pero la superior que representa al ARN de la ribozima es intensa, a los 2 minutos ambas bandas están igualadas, en cambio a partir de los 5 minutos, la banda superior va disminuyendo en intensidad y la inferior por el contrario aumenta en intensidad (figura 12).

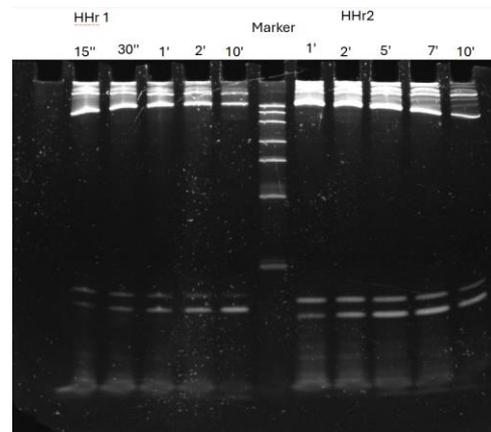


Figura 12. Gel con las cinéticas de la HHR1 y la HHR2 a 0,5mM de NTPs y marcador RiboRuler Low Range RNA Ladder de Thermofisher®.

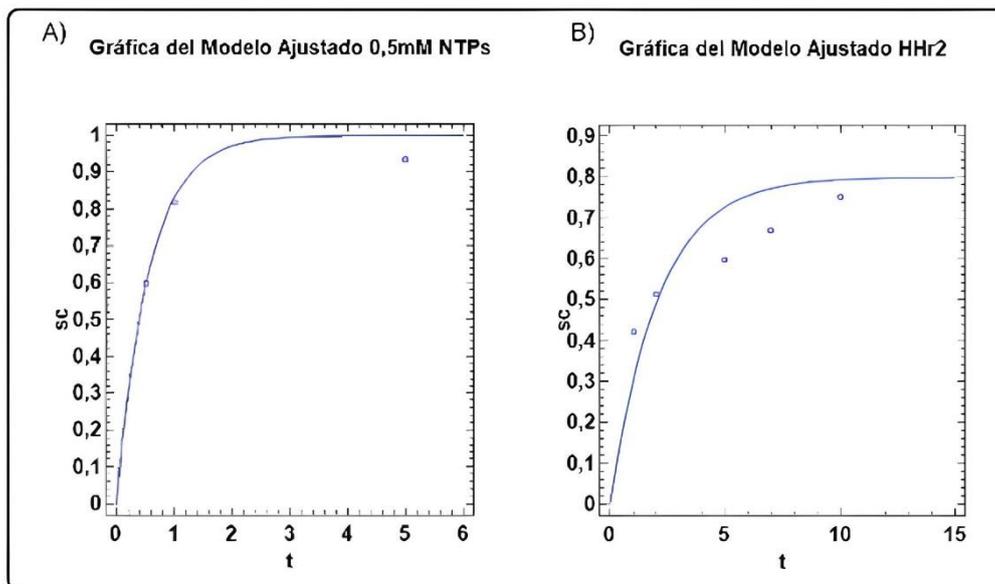


Figura 13. A) Gráfica de los porcentajes de corte de la cinética de la HHR1 *wildtype* a tiempos de 30 segundos, 1 y 5 minutos, con una concentración de NTPs del 0,5mM. B) Gráfica de los porcentajes de corte de la cinética de la HHR2 a tiempos de 1, 2, 5, 7 y 10 minutos a 0,5mM de NTPs.

La cinética de la HHR1 *wildtype* a concentraciones de 0,5mM de NTPs dio unos porcentajes de corte de 59,71% a los 30 segundos, 81,79% al minuto y 93,55% a los 5 minutos, con una $K= 1,75 \text{ min}^{-1}$. La gráfica contaba con una R^2 de 92,59% por lo que es bastante ajustada a los datos (figura13A). En cambio, la cinética de la HHR2 a 0,5mM de NTPs y tiempos de 1, 2, 5, 7 y 10 minutos dio una $K= 0,48 \text{ min}^{-1}$. Al minuto el porcentaje de corte era de 42,1%, a los 2 minutos de 51,42%, a los 5 minutos de 59,67%, a los 7 minutos de 67% y a los 10 minutos de 75,11% (figura 13B).

El gel realizado de las cinéticas de la HHR1_mutC y la HHR1_mutG a tiempos de 1, 10, 30, 60 y 120 minutos, mostró que no aparecen bandas de corte a ningún tiempo, aunque hay sombras arriba y debajo de la banda perteneciente al ARN de la ribozima. En la cinética de la HHR1_mutG hay unas sombras más pronunciadas arriba de la banda del ARN perteneciente al de la ribozima, pudiendo ser de la tinción. Estas ribozimas no son funcionales debido a no presentar bandas de corte (figura 14).

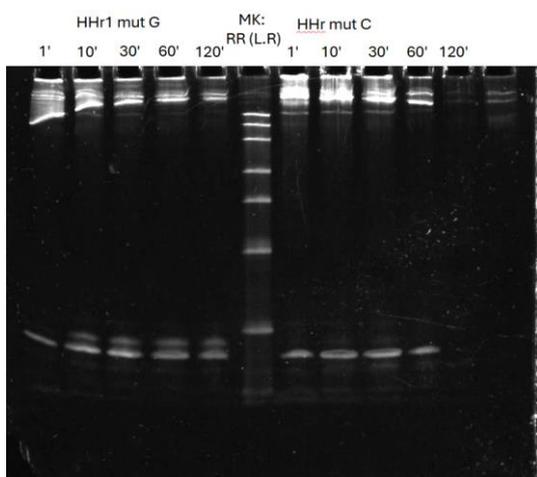


Figura 14. Gel con las cinéticas de la HHR1_mutG y la HHR1_mutC, a 0,5mM de NTPs y marcador RiboRuler Low Range RNA Ladder de ThermoFisher®.

El gel realizado con las cinéticas correspondientes a la HHR1_mutT y la HHR1_mutG mostraron que solo la

HHR1_mutT presentaba bandas de corte a tiempos de 1, 2, 10, 30 y 60 minutos a una concentración de NTPs de 0,5mM, por el contrario, la HHR1_mutG no presenta ninguna banda de corte, presenta una especie de bandas arriba de la banda normal del ARN de la propia ribozima, pudiendo ser unas manchas del marcador, descartando que sea funcional (figura 15).

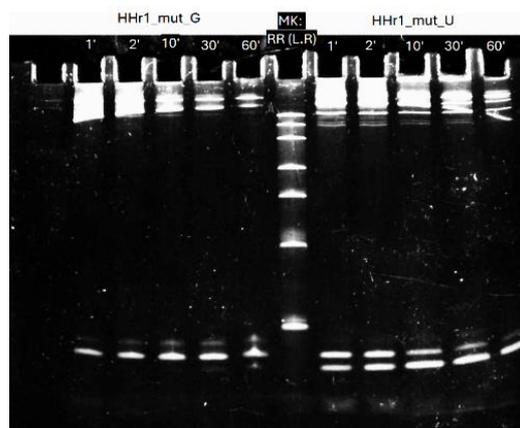


Figura 15. Gel de acrilamida y urea 8M de las cinéticas de la HHR1_mutG y la HHR1_mutT a concentraciones de 0,5mM de NTPs, con marcador RiboRuler Low Range RNA Ladder de ThermoFisher®.

La cinética de la HHR1_mutT a 0,5mM de NTPs a tiempos de 1, 2, 10, 30 y 60 minutos, mostro una $K=0,44 \text{ min}^{-1}$. Al minuto el porcentaje de corte era de 43,54%, a los 2 minutos era de 47,94%, a los 10 era de 64,52%, a los 30 era de 65,86%, a los 60 era de 87,94% (figura 17A). La cinética de la HHR1_mutG a 0,5mM de NTPs a tiempos de 1, 10, 30, 60 y 120 minutos, mostro una $K= 0,079 \text{ min}^{-1}$. Al minuto el porcentaje de corte era de 0%, a los 10 minutos era de 6,68%, a los 30 era de 7,54%, a los 60 era de 8,79% y a los 120 era de 8,29%, con una $R^2= 83,34\%$, por lo que el grafico se ajustó bastante a los datos (figura 17B). La cinética de la HHR1_mutC a 0,5mM de NTPs a tiempos de 1, 10, 30 y 60 minutos, mostro una $K= 0,97 \text{ min}^{-1}$. Al minuto el porcentaje de corte era de 12,45%, a los 10 era de 14,62%, a los 30 era de 18,56% y a los 60 era de 14,80%, con una $R^2= 0\%$, por lo que el grafico no estaba ajustado a los datos (figura 17C).

El último gel realizado fue con el objetivo de comparar las cinéticas de la HHR1 *wildtype*, la HHR1_ y la HHR1_mutT a tiempos de 30 segundos, 1, 2 y 10 minutos, excepto en la cinética de la HHR1 con la A extra eliminada que los tiempos fueron de 30 segundos, 1 y 2 minutos. En el caso de la HHR1 *wildtype* se observan bandas de corte que aparecen ya a los 30 segundos, aunque la banda de arriba perteneciente al ARN de la ribozima es mucho más intensa, al minuto, crece un poco más en intensidad la banda de corte, pero aún es más intensa la banda del ARN de la ribozima, en cambio, a los 2 minutos, ambas bandas están igualadas, por último, a los 10 minutos, la banda de corte supera en intensidad a la banda superior. En cuanto a la HHR1_Del, a

los 30 segundos se visualiza que ambas bandas ya son iguales mostrando que la mitad del material genético a cortar estaba en ambas bandas a ese tiempo, al minuto ya se observa como la banda de corte es ligeramente superior a la banda del ARN de la ribozima y a los 2 minutos la banda de corte tiene mucha más intensidad que la banda superior. Por último, la cinética de la HHR1_mutT, se observan unas ligeras bandas con muy poca intensidad a los tiempos, variando la banda superior a los 2 minutos, haciéndose menos intensa y desapareciendo ambas bandas a los 10 minutos, adicionalmente se pueden observar unas bandas abajo del gel que pueden ser restos de la tinción (figura 16).

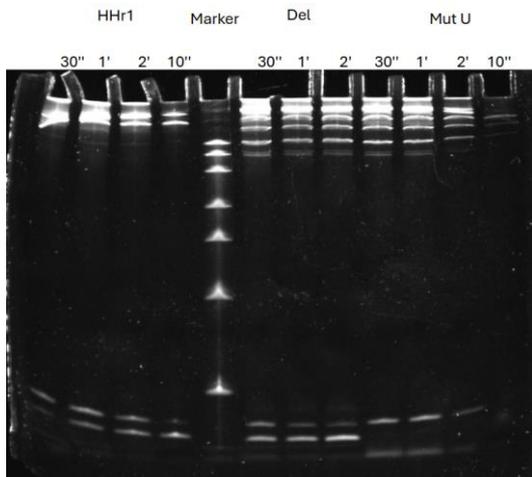


Figura 16. Gel con las cinéticas de la HHR1 *wildtype*, la HHR1_Del y la HHR1_mutT, a 0,5mM de NTPs y marcador RiboRuler Low Range RNA Ladder de Thermofisher®.

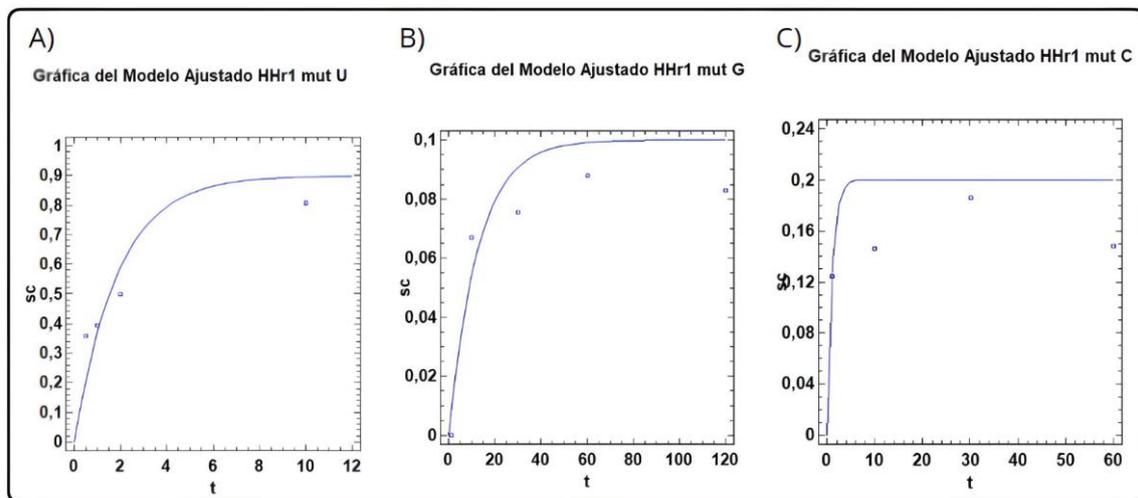


Figura 17. A) Gráfica de los porcentajes de corte de la cinética de la HHR1_mutT a 0,5mM de NTPs a tiempos de 1, 2, 10, 30 y 60 minutos. B) Gráfica de los porcentajes de corte de la cinética de la HHR1_mutG a 0,5mM de NTPs a tiempos

de 1, 10, 30, 60 y 120 minutos. C) Gráfica de los porcentajes de corte de la cinética de la HHR1_mutC a 0,5mM de NTPs a tiempos de 1, 10, 30 y 60 minutos.

3.4. Predicción estructura 3D

La estructura predicha para la HHR1 muestra que el núcleo catalítico quedaría desplazado unas bases respecto a la estructura 3D estándar de las *Hammerhead*. El bucle del centro catalítico es más amplio y se observa que en el bucle donde se encuentra el uracilo extra, hay otro uracilo que sobresale hacia fuera de la estructura de la *Hammerhead* (figura 18A).

En el caso de la HHR1_Del, el bucle del núcleo catalítico que forma este ARN es más estrecho. Continúa apareciendo el uracilo sobresaliendo de la estructura de la *Hammerhead* (figura 18B).

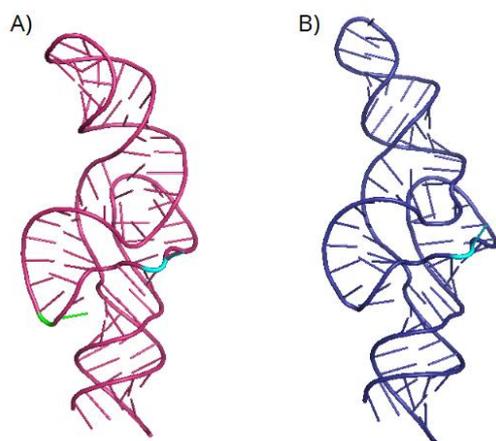


Figura 18. A) Predicción de la estructura 3D de la HHR1 con la adenina extra del núcleo catalítico en verde y el uracilo extra del stem II en azul cian hecha con AlphaFold3. B) Predicción de la estructura 3D de la HHR1_Del con el uracilo extra del stem III en azul cian hecha con AlphaFold3.

4. Discusión

Nuestros análisis muestran que la ribozima HHR1 es funcional y relativamente rápida a pesar de contener una inesperada inserción de una adenina en su centro catalítico conservado. Además, esta ribozima posee una ligera flexibilidad de secuencia que permite la incorporación en

su núcleo catalítico de 2 nucleótidos diferentes. también es funcionales y significativamente más rápida de lo esperado. Estos resultados refuerzan nuestra hipótesis de que los obeliscos contienen ribozimas *Hammerhead* que pese a contar con mutaciones atípicas en su centro catalítico conservado, éstas son totalmente funcionales *in vitro* y con una capacidad catalítica equivalente a las de las *Hammerhead* estándar.

La velocidad de catálisis normal de las ribozimas *Hammerhead* de estructura mínima en condiciones estándar y bajo magnesio (1 mM) es de $\sim 0.01 \text{ min}^{-1}$, en cambio la velocidad de catálisis normal en ribozimas *Hammerhead* con la estructura completa es de entre $1-10 \text{ min}^{-1}$ (Martick & Scott, 2006), en cambio la HHR1 tiene una velocidad de catálisis ligeramente inferior de $1,75 \text{ min}^{-1}$ (figura 13A) lo que indica que las mutaciones que tiene esta ribozima respecto a las encontradas anteriormente afecta a su velocidad de catálisis pero sin comprometer la función de catálisis, simplemente tarda mucho más tiempo en poder catalizar el ARN (Scott et al., 2013).

En cuanto a la HHR2, tiene una velocidad de catálisis menor a la de la HHR1, siendo de $0,48 \text{ min}^{-1}$, indicando que pese a los nucleótidos extra es una ribozima totalmente funcional. Estos nucleótidos extra parecen retrasar la velocidad de la HHR2 respecto a la HHR1 y a una *Hammerhead* estándar. Esta *Hammerhead* es menos rápida que otras ribozimas encontradas en la naturaleza como la ASBV (-) que tiene una velocidad de $0,63 \text{ min}^{-1}$, bastante buena para un sistema minimalista de 19nt no proteico (Symons, 1992). Por el contrario, la HHR2 también tiene una secuencia de nucleótidos relativamente corta de solo 74 pero es más lenta que la ribozima ASBV (-).

Por otro lado, se sabe que la concentración de magnesio libre es clave para determinar la rapidez de estas ribozimas ya que son extremadamente sensibles a ella (Lee et al., 2008). Los resultados de nuestro estudio no solo han confirmado estos hallazgos, sino que a su vez han mostrado una sensibilidad de la HHR1 a la concentración de NTPs a nivel co-transcripcionales. Concretamente se ha observado que la K disminuye a medida que la concentración de NTPs aumenta (figura 6A y 8A) debido a que estos en vez de ayudar a estabilizar su secuencia para aumentar la catálisis, se unen a sitios del ARN perturbando la estructura e interfiriendo en ella. Esta situación se revierte parcialmente gracias a añadir más concentración de $MgCl_2$ libre o tampón 2x gracias justamente al magnesio libre que tienen, llegando a que la K sea de 0,45 o $1,70 \text{ min}^{-1}$ respectivamente. Sin embargo, la cinética sigue siendo significativamente más lenta respecto a la mostrada en condiciones de 0,5mM NTPs. Este fenómeno se podría explicar debido a que los NTPs tienden a tener mayor afinidad por el Mg^{+2} que, por la secuencia, por lo que cuando hay magnesio de más, los NTPs quedan parcialmente inhibidos por este, además de que el Mg^{+2} también se une a la secuencia de ARN ayudando a darle más estabilidad y aumentando la velocidad de catálisis (Lee et al., 2008), con el tampón pasa algo similar. Al añadir 1mM de NTPs y Tp 2x, el efecto negativo de los NTPs se contrarresta casi completamente, pero en el caso de la cinética a 3mM de NTPs, al solo añadir 1mM de $MgCl_2$, el efecto negativo no se termina de revertir, aunque la hace funcional.

En contraste, la velocidad de catálisis de la ribozima con una caja catalítica estándar es de $2,32 \text{ min}^{-1}$, el doble de rápida que la de la ribozima HHR1, aunque no tan rápida como la ribozima *Hammerhead* típica natural como la de *Schistosoma mansoni*, cuya velocidad es de entre $1-10 \text{ min}^{-1}$, siendo en general muy parecidas ambas (Martick & Scott, 2006). El hecho de que la velocidad de catálisis no sea igual a la de

una ribozima con una secuencia modelo seguramente se deba al uracilo extra del tallo II, que, posiblemente modifique o estabilice la secuencia para hacerla funcional aun con una modificación en el núcleo. El aumento de la velocidad es claramente debido a la eliminación de la adenina, aunque esta sea una mutación aceptada por el núcleo catalítico, sigue siendo más lenta que una *Hammerhead* normal. Para futuras investigaciones, sería interesante estudiar el efecto de la delección del uracilo extra del tallo II tanto en la HHR1 *wildtype* y en la HHR1_Del, para así comprobar si tras la eliminación de este, la ribozima sigue siendo funcional o, por el contrario, es incapaz de escindir el ARN, además de si en el caso de la HHR1 de la cual se ha eliminado no solo la adenina extra, sino también el uracilo extra se comporta igual que una ribozima *Hammerhead* estándar.

Por el contrario, la velocidad de catálisis de las ribozimas con las mutaciones inducidas de guanina y citosina, no mostraron ser capaces de catalizar reacciones reforzando la idea de que la secuencia del núcleo catalítico está altamente conservada y no permite apenas cambios. Esto contrastaba con la estructura del núcleo de nuestra ribozima por lo que se podría decir que, si bien se trata de una secuencia relativamente cerrada, acepta ciertas mutaciones siempre y cuando se estabilice la secuencia con otro nucleótido como es el caso del uracilo extra en el tallo II. Este hecho sugiere que, si bien el uracilo extra del tallo II estabiliza la secuencia, la forma de hacerlo seguramente sea por fuerzas intermoleculares tales como los puentes de hidrógeno, como el uracilo es una pirimidina y la citosina también, esto hace que no se puedan producir los puentes de hidrógeno por lo que, al no haber interacción, las interacciones no se mantienen impidiendo el correcto funcionamiento de la *Hammerhead*. En cuanto al porqué no funciona la HHR1_mutG, pese a que nuestras hipótesis iniciales decían que, si funcionaría esta mutación

justamente porque la guanina es una purina al igual que la adenina extra, y por ende debería interactuar formando los puentes de hidrógeno gracias a que el uracilo es una pirimidina, esto no fue así tal como podemos ver en el gel de su cinética (figura 13). Esto podría ser debido a que, si bien estos dos nucleótidos pueden interactuar de forma no canónica, no son energética y geoméricamente compatibles, esto desmonta una de nuestras hipótesis iniciales de que se trataba de una ribozima que contaba con una interacción de puentes de hidrógeno y ese era por qué la HHR1 era capaz de funcionar pese a la adenina extra en el núcleo catalítico debido a que debería haber sido funcional con la mutación de la adenina por la guanina.

No obstante, la ribozima mutada con uracilo sustituyendo la adenina extra, es capaz de escindir el ARN a una velocidad mucho menor a la que lo hace la HHR1 *wildtype* tal como se puede observar en el gel (figura 7), siendo de $0,44 \text{ min}^{-1}$. El hecho de que esta ribozima sea funcional indica que existe algún tipo de interacción entre la timina y el uracilo que hacen que la secuencia se estabilice la suficiente como para poder realizar la función catalítica de la *Hammerhead*, esto desmonta la teoría de los puentes de hidrogeno entre la adenina extra con el uracilo del tallo II debido a que la interacción entre la timina mutada con el uracilo debería ser mínima pero aun así es capaz de dar lugar a una ribozima capaz de escindir el ARN. Esta ribozima mutada no es la única que se ha descubierto que haya sido funcional, la *Hammerhead* Bcep176 con la mutación A6C es funcional pese a tener una mutación, además de tener una velocidad de $0,31 \text{ min}^{-1}$, esta *Hammerhead* funciona solamente con manganeso (Naghdi et al., 2020). Existen otras *Hammerhead* como las encontradas en algunas secuencias del SARS-CoV-2, CoV-HHRz-27665 mutante 2, también es funcional y cuenta como nuestras ribozimas, con una mutación en el núcleo catalítico que la hace no funcional con magnesio, pero funcional con manganeso, pero mucho más

lenta que la HHR1 mutada con timina, con una velocidad de $0,025 \text{ h}^{-1}$ tal como se descubrió en el artículo de (Liu et al., 2024). En cambio, al mutar dicha ribozima encontrada en el SARS-CoV-2, con un apareamiento competitivo los tres stems y sustituir el tallo II por el de la ribozima SM-HHRz que es mucho más activa que las *Hammerhead* convencionales, consiguieron una ribozima con una velocidad de catálisis en condiciones ideales de 1204 min^{-1} , superando por 1000 a la ribozima HHR1 mutada con uracilo (Perreault et al., 2011), por lo que si bien podemos decir que esta mutante es funcional y más rápida que otras mutantes como la Bcep176, no estaría entre las más rápidas pero si tiene una característica que la distingue de las anteriores, es activa en presencia de magnesio y no manganeso por lo que la haría útil en contexto donde se usen el magnesio.

La predicción de la estructura de las *Hammerhead* HHR1 y HHR1_Del muestra cómo se estructura la secuencia con la adenina extra. En el caso de la HHR1, el núcleo catalítico sube un par de bases para que sea estable haciendo que el bucle del núcleo sea más grande que el de la HHR1. La HHR1 es en tamaño, menor a la HHR1_Del y más ancha, esto podría deberse a una interacción mejor entre los nucleótidos de la secuencia que hacen que esté más compacta que en la HHR1_Del. En cuanto al uracilo que sobresale de la secuencia, podría deberse justamente a los nucleótidos extra con los que cuenta la secuencia, para que la estructura sea funcional, este uracilo no debería interactuar con otro nucleótido y por ello está fuera de la secuencia consiguiendo que estas ribozimas *Hammerhead* puedan ser funcionales.

El hecho de que esta ribozima no solo sea funcional, sino que relativamente rápida además de aceptar mutaciones específicas en su centro catalítico hace sospechar que no se trate de una ribozima que cuente con

una mutación, sino que se trate de una nueva ribozima con sus propias interacciones entre componentes de su estructura, velocidad de catálisis y estructura específica a la cual le afecta mucho más los NTPs. Esta teoría se vería reforzada por la predicción de la estructura de la HHR1 hecha con AlphaFold3.

Si bien, cabe destacar que el análisis estadístico y las gráficas realizadas cuentan con pocos datos por lo que no se tiene la certeza de que las ribozimas HHR1 y HHR2 junto con sus variantes tengan la K descrita anteriormente, junto con que, limita las comparaciones eficientes entre ellas.

Para validar la teoría propuesta, se debería seguir estudiando esta ribozima mediante la mutación del uracilo extra del stem II, cinéticas co-transcripcionales y si es posible realizar cristalografía de rayos X para poder estudiar y determinar con exactitud su estructura 3D y validar la predicción de AlphaFold3. De igual manera, se deberían realizar más estudios estadísticos y cinéticas a tiempos mas variados y numerosos.

Conclusión

El estudio de la HHR1 y la HHR2 ha mostrado que algunos obeliscos cuentan con ribozimas *Hammerhead* activas, con una velocidad de escisión de $1,75 \text{ min}^{-1}$ por lo que se puede decir que el uracilo extra del tallo II mueve el centro catalítico unas pares de bases abriendo el bucle para aportar estabilidad a la secuencia y hacerla funcional con la adenina extra. El hecho que la HHR1_Del recupera algo más de velocidad respecto a la HHR1, pero sin llegar a ser igual de rápida que una *Hammerhead* convencional indica que la adenina extra del núcleo tiene un efecto en la velocidad de catálisis, sin llegar a inhabilitar su función. Esto muestra que el centro catalítico de la *Hammerhead* acepta variaciones, entre

ellos la adenina, siendo una de las dos únicas bases aceptadas junto con la timina que también permite el corte, aunque con dificultad. Otro factor que afecta a la velocidad de catálisis son los NTPs, la *Hammerhead* de algunos obeliscos es altamente sensible a estos, pudiendo determinar si realizan la escisión o no.

Gracias a que la HHR1_mutT es funcional, se puede determinar que esta *Hammerhead* no es una que cuenta con una mutación, sino que la HHR1 es una nueva *Hammerhead* que acepta varias variaciones en su núcleo catalítico. Es por todo esto que se requeriría seguir con su estudio y realizar mejores estadísticas para comparar mejor las velocidades de escisión de las variaciones de la HHR1 y un estudio más exhaustivo para la HHR2. asimismo, que más pruebas con el uracilo extra del tallo II para determinar en qué grado afecta a la HHR1 y a la HHR2.

Bibliografía

- Birikh, K. R., Heaton, P. A., & Eckstein, F. (1997). The structure, function and application of the hammerhead ribozyme. *European journal of biochemistry*, 245(1), 1–16. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.t01-3-00001.x>
- Blount, Kenneth & Uhlenbeck, Olke. (2005). The Structure-Function Dilemma of the Hammerhead Ribozyme. Annual review of biophysics and biomolecular structure. 34. 415-40. <http://doi.org/10.1146/annurev.biophys.s.34.122004.184428>
- Brill, J., Nurmi, C., & Li, Y. (2024). Elucidating Evolutionary Mechanisms and Variants of the Hammerhead Ribozyme Using In Vitro Selection.

- Chembiochem : a European journal of chemical biology*, 25(21), e202400432.
<https://doi.org/10.1002/cbic.202400432>
- Canny, M. D., Jucker, F. M., Kellogg, E., Khvorova, A., Jayasena, S. D., & Pardi, A. (2004). Fast cleavage kinetics of a natural hammerhead ribozyme. *Journal of the American Chemical Society*, 126(35), 10848–10849.
<https://doi.org/10.1021/ja046848v>
- Chi Wong, B., Shahid, U., & Siew Tan, H. (2023). Ribozymes as Therapeutic Agents against Infectious Diseases. IntechOpen.
<https://doi.org/10.5772/intechopen.107141>
- Christoffersen, R. E., & Marr, J. J. (1995). Ribozymes as human therapeutic agents. *Journal of medicinal chemistry*, 38(12), 2023–2037.
<https://doi.org/10.1021/jm00012a001>
- de la Peña, M., Ceprián, R., & Cervera, A. (2020). A Singular and Widespread Group of Mobile Genetic Elements: RNA Circles with Autocatalytic Ribozymes. *Cells*, 9(12), 2555.
<https://doi.org/10.3390/cells9122555>
- de la Peña, M., García-Robles, I., & Cervera, A. (2017). The hammerhead ribozyme: A long history for a short RNA. *Molecules*, 22(1), 78.
<https://doi.org/10.3390/molecules22010078>
- Enjoji, M., Wang, F., Nakamuta, M., Chan, L., & Teng, B. B. (2000). Hammerhead ribozyme as a therapeutic agent for hyperlipidemia: production of truncated apolipoprotein B and hypolipidemic effects in a dyslipidemia murine model. *Human gene therapy*, 11(17), 2415–2430.
<https://doi.org/10.1089/104303400750038516>
- Liu, G., Jiang, H., Chen, D., & Murchie, A. I. H. (2024). Identification of Hammerhead-variant ribozyme sequences in SARS-CoV-2. *Nucleic Acids Research*, 52(6), 3262–3277.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkae037>
- Green, R., & Rogers, E. J. (2013). Transformation of chemically competent *E. coli*. *Methods in enzymology*, 529, 329–336.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00028-8>
- Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N., & Altman, S. (1983). The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell*, 35(3 Pt 2), 849–857.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90117-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90117-4)
- Nischal, H., Sun, H., Wang, Y., Ford, D. A., Cao, Y., Wei, P., & Teng, B. (2013). Long-term Expression of Apolipoprotein B mRNA-specific Hammerhead Ribozyme via scAAV8.2 Vector Inhibits Atherosclerosis in Mice. *Molecular Therapy — Nucleic Acids*, 2, e125.
<https://doi.org/10.1038/mtna.2013.53>
- Lee, T. S., Silva López, C., Giambasu, G. M., Martick, M., Scott, W. G., & York, D.

- M. (2008). Role of Mg²⁺ in hammerhead ribozyme catalysis from molecular simulation. *Journal of the American Chemical Society*, 130(10), 3053–3064.
<https://doi.org/10.1021/ja076529e>
- Lu, M., Cao, Z., Xiong, L. *et al.* (2025). A hammerhead ribozyme selects mechanically stable conformations for catalysis against viral RNA. *Commun Biol* **8**, 165.
<https://doi.org/10.1038/s42003-025-07600-3>
- Martick, M., & Scott, W. G. (2006). Tertiary contacts distant from the active site prime a ribozyme for catalysis. *Cell*, 126(2), 309–320.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.036>
- Naghdi, M. R., Boutet, E., Mucha, C., Ouellet, J., & Perreault, J. (2020). Single Mutation in Hammerhead Ribozyme Favors Cleavage Activity with Manganese over Magnesium. *Non-coding RNA*, 6(1), 14.
<https://doi.org/10.3390/ncrna6010014>
- Pabón-Peña, L. M., Zhang, Y., & Epstein, L. M. (1991). Newt satellite 2 transcripts self-cleave by using an extended hammerhead structure. *Molecular and cellular biology*, 11(12), 6109–6115.
<https://doi.org/10.1128/mcb.11.12.6109-6115.1991>
- Perreault, J., Weinberg, Z., Roth, A., Popescu, O., Chartrand, P., Ferbeyre, G., & Breaker, R. R. (2011). Identification of hammerhead ribozymes in all domains of life reveals novel structural variations. *PLoS computational biology*, 7(5), e1002031.
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002031>
- Salehi-Ashtiani, K., Szostak, J. (2001). *In vitro* evolution suggests multiple origins for the hammerhead ribozyme. *Nature* **414**, 82–84.
<https://doi.org/10.1038/35102081>
- Sanjuán, R., & Daròs, J. A. (2007). One-step site-directed mutagenesis of viroid dimeric cDNA. *Journal of virological methods*, 145(1), 71–75.
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.05.027>
- Saville, B. J., & Collins, R. A. (1990). A site-specific self-cleavage reaction performed by a novel RNA in *Neurospora* mitochondria. *Cell*, 61(4), 685–696.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90480-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90480-3)
- Scott, W. G., Horan, L. H., & Martick, M. (2013). The hammerhead ribozyme: structure, catalysis, and gene regulation. *Progress in molecular biology and translational science*, 120, 1–23.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381286-5.00001-9>
- Shao, Y., Wu, S., Chan, C.Y. *et al.* (2007). A structural analysis of *in vitro* catalytic activities of hammerhead ribozymes. *BMC Bioinformatics* **8**, 469.
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-469>
- Stage-Zimmermann, T. K., & Uhlenbeck, O. C. (1998). Hammerhead ribozyme

kinetics. *RNA (New York, N. Y.)*, 4(8),
875–
889.[https://doi.org/10.1017/s1355838
298980876](https://doi.org/10.1017/s1355838298980876)

Symons R. H. (1992). Small catalytic RNAs.
Annual review of biochemistry, 61,
641–671.
[https://doi.org/10.1146/annurev.bi.61.
070192.003233](https://doi.org/10.1146/annurev.bi.61.070192.003233)

Webb, C. H., Riccitelli, N. J., Ruminski, D. J.,
& Lupták, A. (2009). Widespread
occurrence of self-cleaving
ribozymes. *Science (New York, N. Y.)*,
326(5955), 953.
[https://doi.org/10.1126/science.1178
084](https://doi.org/10.1126/science.1178084)

Zheludev, I. N., Edgar, R. C., Lopez-Galiano,
M. J., de la Peña, M., Babaian, A.,
Bhatt, A. S., & Fire, A. Z. (2024).
Viroid-like colonists of human
microbiomes. *bioRxiv : the preprint
server for biology*,
2024.01.20.576352.
[https://doi.org/10.1101/2024.01.20.57
6352](https://doi.org/10.1101/2024.01.20.576352)