

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Biología Molecular

*“Semejanzas estructurales entre el mRNA del interferón
alfa 5 y el virus de la hepatitis C”*

Memoria presentada por la Licenciada Rosa M^a Díaz Toledano
para optar al grado de Doctor.

Vº. Bº. del Director:

Doctorando:

Fdo.: Jordi Gómez Castilla

Fdo.: Rosa M^a Díaz Toledano

Investigador Científico (CSIC)

Esta Tesis ha sido realizada en el Centro de Parasitología y Biomedicina López Neyra (CSIC) en Granada bajo la dirección del Dr. Jordi Gómez Castilla.

SUMMARY

RNase III and RNase P are structurally dependent endoribonucleases which recognize dsRNA and precursor tRNA substrates, respectively. Using both enzymes as molecular tools, we have been able to detect the presence of mimetic motifs inside mRNA of viral and cellular origin. These structural RNA motifs may represent signals within the cellular context in which they are found.

It has been proposed that the hepatitis C virus internal ribosome entry site resides in a locked conformation due to annealing of its immediate flanking sequences (Beguiristain et al, 2005). In the first part of the results, structure probing using *Escherichia coli* dsRNA-specific RNase III and other classical tools shows that this region switches to an open conformation triggered by a liver-specific microRNA (miR-122). This structural transition, which is observed *in vitro*, may be important for essential functions involving stem loop VI and may also suggest a role for liver-specific miR-122 in HCV infection. In addition, induced RNA switching at the 5' untranslated region could ultimately represent a new mechanism of action of micro-RNAs.

In the second part of the results we explore whether liver mRNA species have structural features which, in common with HCV mRNA, can specify the RNase P cleavage reaction *in vitro*. We observed that human liver mRNA competes with pre-tRNA^{Tyr} cleavage in a human RNase P competition essay, and subsequently identified a set of mRNA species that could, at least in part, be responsible for human RNase P competition. The presence of tRNA mimics in three mRNA transcripts (coding for the ribosomal protein *RPS9*, the histone variant *H2AFJ.2* and the interferon *IFNA5*) was confirmed individually by RNase P cleavage and competition essays, and one of these, namely *IFNA5* mRNA, was further evaluated to obtain rigorous proof of its specificity. One of the cleavage sites in this mRNA, and its minimal substrate length, lie within the reported *IFNA1* cytoplasmic accumulation region signal (Lei et al, 2011).

Finally, *in silico* predictions have allowed us to find a target for miR-122 within the 3' UTR of *IFNA5*. As a result, in the third part of the results we analyse the RNA structure in this region using a number of RNases. miR-122 induces changes in the digestion pattern of various of these RNases close to their hybridisation region. These modifications affect the structure of the codon that denotes the end of the translation and the possible appearance of a pseudoknot. The conformational change resulting upon hybridisation of miR-122 generates a tRNA-mimic structure that can be recognised by human RNase P *in vitro*.

ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos.
Antagomir	Oligonucleótido sintético antisentido de simple cadena análogo a RNA conjugado con colesterol, con objeto de secuestrar un miRNA para inutilizar su acción.
ARE	<i>AU rich element</i> . Elemento de secuencia rico en A-U.
ARFPs	<i>Alternate reading frame proteins</i> . Proteínas alternativas por cambio en el marco abierto de lectura.
BMV	<i>Brome Mosaic Virus</i> . Virus del mosaico del bromo.
BVDV	<i>Bovine Viral Diarrhea Virus</i> . Virus de la diarrea viral bovina.
Cap	Modificación en 5' de los mRNA eucariotas que consiste en una guanosina invertida y metilada en posición N7 unida al primer nucleótido transcrito.
CAR	<i>Cytoplasmic accumulation region</i> . Región de acumulación citoplásmica.
cDNA	<i>DNA</i> copia.
CrPV	<i>Cricket paralysis virus</i> . Virus de la parálisis del grillo.
CSFV	<i>Classical Swine Fever Virus</i> . Virus de la peste porcina clásica.
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> . Acido desoxirribonucleico (ADN).
dsRNA	<i>double stranded RNA</i> . RNA de doble cadena perfecta.
dsRNA L-A	<i>double stranded RNA L-A</i> . RNA de doble cadena del virus de levadura L-A.
FMDV	<i>Foot and Mouth Disease Virus</i> . Virus de la fiebre aftosa.
HBV	<i>Hepatitis B virus</i> . Virus de la hepatitis B.
HCV	<i>Hepatitis C virus</i> . Virus de la hepatitis C.
hnRNA	<i>Heterogeneous nuclear RNA</i> . RNA heterogéneo nuclear.
IC₅₀	Concentración de competidor al alcanzar el 50% de inhibición en la reacción.
IRES	<i>Internal Ribosome Entry Site</i> . Entrada interna de unión al ribosoma.
Leader	Guía.
LRA	<i>Long Range Annealing</i> . Hibridación RNA:RNA a larga distancia.
Microarrays	Chips de ADN o micromatrices de ADN.
min	Minutos.
miRISC	<i>miRNA-induced silencing complex</i> . Complejo de silenciamiento inducido por miRNA.
miRNA	micro RNA.
mRNA	<i>messenger RNA</i> . RNA mensajero.
ncRNA	<i>Non coding RNA</i> . RNA no codificante.
Nested-PCR	<i>PCR</i> anidada.
nt	Nucleótido.
ODN	Oligodesoxinucleótido.
ORF	<i>Open Reading Frame</i> . Marco abierto de lectura.
pb	Pares de bases.
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> . Reacción en cadena de la polimerasa.
PNK	T4 Polinucleótido Quinasa.
Poli-r(A)	Polímero de riboadenosina.
pre-tRNA^{Tyr}	precursor del tRNA tirosina.
pri-miRNA	<i>primary miRNA transcript</i> . Transcrito primario de RNA.
PTB	<i>Polypyrimidine tract-binding protein</i> . Proteína de unión a tramos de polipirimidina.

<i>Riboswitch</i>	Estructura reguladora en el mRNA que sufre un cambio conformacional inducido por la unión de un metabolito.
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i> . Complejo de silenciamiento inducido por RNA.
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> . Ácido ribonucleico (ARN).
RNasa	Ribonucleasa.
RNasa H	Ribonucleasa H.
RNasa III	Ribonucleasa III.
RNasa P	Ribonucleasa P.
RPR	<i>RNase P RNA</i> . Subunidad RNA de la RNasa P.
RRL	<i>Rabbit Reticulocyte Lysate</i> . Lisado de reticulocitos de conejo.
rRNA	<i>ribosomal RNA</i> . RNA ribosómico.
RT	<i>Reverse transcriptase</i> . Transcriptasa reversa, también llamada retrotranscriptasa.
Secuencia seed	Secuencia semilla: referida a los microRNAs, secuencia de 7 nucleótidos en la región 5' responsable del reconocimiento de su mRNA diana. La secuencia semilla está especialmente conservada y permite el agrupamiento de los micro RNAs en familias.
SGE	Secuencia guía externa.
siRNA	<i>short interfering RNA</i> . Pequeños RNAs interferentes.
snRNA	<i>small nuclear RNA</i> . RNA pequeño nuclear.
Splicing	En las células eucariotas proceso postranscripcional, autocatalítico, de corte y empalme de RNA para eliminar intrones.
SRP	<i>Signal Recognition Particle</i> . Partícula de reconocimiento señal.
Switch	Cambio, intercambio estructural.
T7 R1.1 RNA	RNA mensajero policistrónico temprano del bacteriófago T7; sustrato natural de la RNasa III.
tmRNA	<i>transfer-messenger RNA</i> . RNA transferente-mensajero.
tRNA	<i>transfer RNA</i> . RNA transferente.
TYMV	<i>Turnip Yellow Mosaic Virus</i> . Virus del mosaico amarillo del nabo.
UTR	<i>Untranslated region</i> . Región no traducida.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

El virus de la hepatitis C

Generalidades	3
El genoma	3
Elementos del RNA que controlan la traducción y la replicación	4
Tropismo tisular: el miR122 como factor del hospedador implicado en la replicación del virus	5

Los micro RNAs

Generalidades	6
El microRNA miR-122	7

RNasa III de Escherichia coli

Generalidades	8
Reconocimiento de sustratos	9

La RNasa P

Generalidades	10
Composición y localización: RNasa P bacteriana y RNasa P eucariota	12
La endoribonucelasa MRP	15
Reconocimiento de sustratos	15

Mimetismo: estructuras tipo tRNA 17

Interferones

Historia	19
El sistema del interferón: naturaleza y tipos	19
Estructura del mRNA de los interferones.	21

OBJETIVOS 25

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Tampones y soluciones generales.	29
Tampones de electroforesis.	29
Tampones de carga en gel.	30
Tampones y soluciones para la purificación de la actividad RNasa P humana.	30
Tampones y soluciones de reacción.	32
Material de vidrio libre de RNasas.	33
Agua.	33
Suspensión de celulosa fosfato CF-11.	33
Medios de cultivo para E.coli.	33
Cepas bacterianas	34
Patrones de peso molecular para electroforesis.	34
Isótopos radiactivos.	34
Tinta radiactiva.	35

Oligonucleótidos empleados.	35
Construcciones de DNA empleadas para las reacciones de transcripción.	38
RNAs comerciales.	40
Extracto con actividad RNasa P humana.	40
Métodos	
Cultivo de bacterias.	41
Criopreservación de bacterias.	41
Preparación de células electrocompetentes.	41
Transformación de <i>E. coli</i> con plásmidos recombinantes.	41
Extracción de DNA plasmídico.	42
Secuenciación de DNA.	43
Análisis en microarrays.	43
Electroforesis de ácidos nucleicos.	43
Purificación de ácidos nucleicos.	44
Transcripciones in vitro.	44
Purificación de los productos de transcripción.	45
Marcaje radiactivo del RNA.	47
Cuantificación de ácidos nucleicos.	49
Digestión de ácidos nucleicos : DNA	49
Digestión de ácidos nucleicos: RNA	50
Otras reacciones.	53
Purificación parcial de RNasa P humana.	57
Análisis bioinformático.	63
RESULTADOS 1	67
“Caracterización <i>in vitro</i> de un cambio conformacional en el que intervienen elementos estructurales de doble cadena, en la región 5’ del RNA del HCV, sensible al miR-122”	
RESULTADOS 2	81
“Identificación y caracterización de elementos de estructura tipo tRNA dentro de la población de mRNAs hepáticos humanos: ejemplo del mRNA <i>IFNA5</i> ”	
RESULTADOS 3	93
“Identificación <i>in vitro</i> de un cambio estructural en la región 3’ UTR del mRNA <i>IFNA5</i> inducido por el miR-122”	
DISCUSIÓN	
DISCUSIÓN 1	109
“Caracterización <i>in vitro</i> de un cambio conformacional en el que intervienen elementos estructurales de doble cadena, en la región 5’ del RNA del HCV, sensible al miR-122”	
DISCUSIÓN 2	115
“Identificación y caracterización de elementos de estructura tipo tRNA dentro de la población de mRNAs hepáticos humanos: ejemplo del mRNA <i>IFNA5</i> ”.	

DISCUSIÓN 3	123
“Identificación <i>in vitro</i> de un cambio estructural en la región 3’ UTR del mRNA <i>IFNA5</i> inducido por el miR-122”	
CONCLUSIONES	133
APÉNDICES	
APÉNDICES RESULTADOS 1	137
APÉNDICES RESULTADOS 2	155
APÉNDICES RESULTADOS 3	165
BIBLIOGRAFÍA	171



INTRODUCCIÓN



EL VIRUS DE LA HEPATITIS C

Generalidades

El virus de la hepatitis C (HCV) es un virus hepatotrópico perteneciente al género *Hepacivirus*, dentro de la familia *Flaviviridae*. Es un importante patógeno humano que infecta a 150 millones de personas en todo el mundo (según cifras de la OMS para el año 2012), lo que supone un 2.1% de la población mundial, ocasionando una infección crónica que suele devenir en cirrosis y carcinoma hepatocelular. Se transmite principalmente a través de la exposición percutánea directa y repetida de sangre infectada; típicamente por transfusión sanguínea, trasplante de donantes infectados, o jeringuillas contaminadas entre individuos drogodependientes. También hay riesgo de transferencia vertical para el caso de mujeres con altos niveles de carga viral durante el embarazo. No existe vacuna protectora contra la hepatitis C. El tratamiento actual de la enfermedad consiste en la terapia combinada con ribavirina e interferón alfa-2 pegilado, sin embargo la medicación cuenta con una eficacia limitada a la hora de eliminar la infección (respuesta virológica sustancial sólo en el 50% de los pacientes) y a largo plazo resulta tóxica provocando efectos secundarios (Lemon et al, 2007).

Los aislados de HCV se clasifican en genotipos y subtipos. Existen 6 genotipos principales, que difieren en su secuencia nucleotídica en un 31-34%. Dentro de cada genotipo, los subtipos se distinguen a su vez por variaciones de secuencia en torno al 20-25% (Simmonds et al, 2005). La infección por HCV es un proceso muy dinámico. El virus posee una vida media de pocas horas, con una producción y liberación estimada de 10^{12} partículas virales por día y persona (Neumann et al, 1998). Esta alta actividad replicativa, junto con la ausencia de función correctora de errores de la RNA polimerasa viral, genera una gran variabilidad genética a nivel de paciente; de tal forma que el virus circula en los individuos infectados como una población diversa de variantes estrechamente relacionadas entre sí, denominada cuasiespecie. El término cuasiespecie se refiere a la alta heterogeneidad genética de la población de genomas, en este caso de HCV, que coexisten en un individuo infectado (Martell et al, 1992).

El genoma

El genoma del HCV consiste en un RNA de simple cadena de un tamaño aproximado de 9.600 nt. Contiene un único marco abierto de lectura (ORF) que codifica para una poliproteína de aproximadamente 3.010 aminoácidos, flanqueado por dos regiones no traducidas (UTRs). El genoma de RNA es de polaridad positiva, lo que significa que puede ser directamente empleado como molde para la traducción de la poliproteína viral, del mismo modo que los mRNAs celulares. La poliproteína es procesada co- y post-transcripcionalmente por proteasas virales y celulares dando lugar a proteínas estructurales y no estructurales (**Figura 1**). El segmento amino terminal da lugar a la proteína *Core* de la nucleocápsida, dos glicoproteínas de la envuelta (E1 y E2), y una pequeña proteína transmembrana que podría actuar como canal iónico (p7). Las proteínas de la nucleocápsida y de la envuelta son los principales componentes estructurales del virión. A continuación se encuentra la proteasa NS2, y un conjunto de proteínas cuyo ensamblaje conforma el complejo macromolecular de la replicasa: NS3 (serín-proteasa y RNA helicasa), NS4A, NS4B, NS5A y NS5B (RNA polimerasa dependiente de RNA) (Lemon et al, 2007). El complejo de la replicasa se asocia a balsas lipídicas dentro de la membrana del retículo endoplásmico, donde la proteína NS4B juega un importante papel de anclaje (Egger et al, 2002; Gao et al, 2004; Gosert et al, 2003). Como consecuencia de esta localización, la replicación del virus origina una alteración conocida como red membranosa a nivel del retículo endoplásmico.

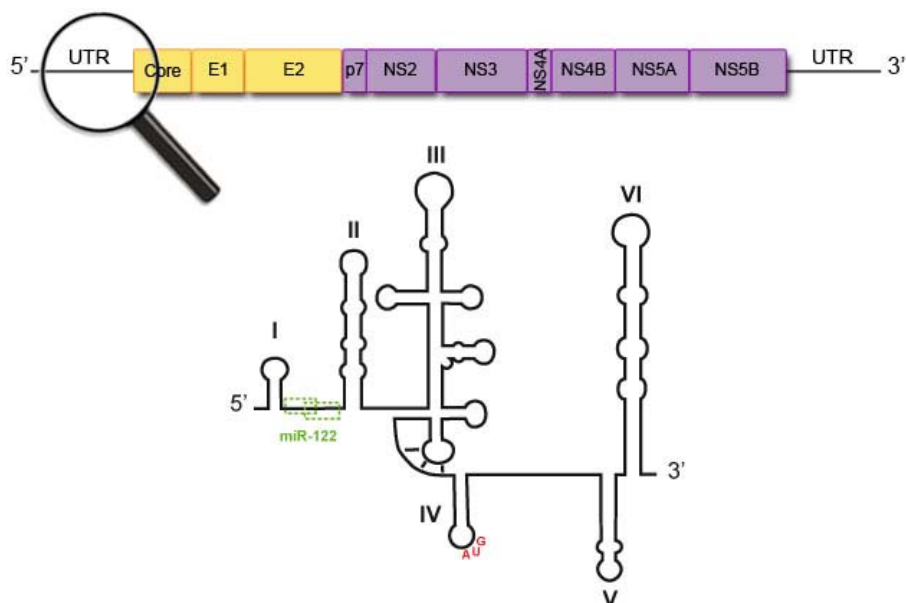


Figura 1: Representación esquemática del genoma de RNA del HCV con los extremos 5' y 3' no traducidos (UTRs) flanqueando el marco abierto de lectura que codifica para las proteínas víricas. En color amarillo se destacan las proteínas estructurales (*Core*, E1 y E2), mientras que las no estructurales se marcan en color morado (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B). La ampliación muestra la estructura secundaria simplificada de los primeros 570 nt, que comprenden el 5'UTR y parte de la región codificante para la proteína *core*. En condiciones iónicas fisiológicas en 5'UTR se pliega en una serie de dominios estructurales funcionalmente muy conservados; los dominios I y II son esenciales para la replicación viral, los dominios II-IV conforman el IRES, los dominios V y VI son funcionalmente relevantes para la viabilidad viral por medio de un mecanismo dependiente de estructura desconocido (Honda et al, 1999; Kim et al, 2003; McMullan et al, 2007; Vassilaki et al, 2008). El codón de inicio de la traducción (en rojo) se localiza en el lazo apical del dominio IV. Actuando a modo de bisagra entre los dominios III y IV se encuentra un pseudonudo. Su presencia es clave para que se produzca el inicio de la traducción en ausencia de la mayor parte de los factores de iniciación. Entre los dominios I y II están descritas dos zonas de interacción para el microRNA hepático miR-122 (en verde).

Elementos del RNA que controlan la traducción y la replicación

Las principales señales en *cis* del genoma viral que controlan la traducción y replicación del RNA se encuentran en las regiones 5' y 3' UTR.

La región 5'UTR es uno de los segmentos del genoma más conservados (Choo et al, 1991; Okamoto et al, 1992). Es una zona muy estructurada, con una fuerte dependencia funcional de la concentración iónica del medio, siendo el óptimo fisiológico el adecuado para el correcto plegamiento terciario de la molécula (Kieft et al, 1999). Cuenta con una serie de dominios designados por convención mediante numeración romana. Los dominios tallo-lazo I y II son críticos para la replicación del virus (Friebe et al, 2001). Solapando parcialmente, los dominios II-IV actúan como un punto de entrada interna para el ribosoma (IRES), situándose el codón de inicio de la traducción en la posición 342, por lo que comprende parte de la secuencia codificante para la proteína *core* (**Figura 1**). El IRES es capaz de unirse directamente con la subunidad 40S del ribosoma en ausencia de la mayor parte de los factores de inicio de la traducción, y gobierna la traducción del RNA viral de forma independiente de *cap* (Lancaster et al, 2006; Pestova et al, 1998; Spahn et al, 2001). La interacción del IRES con la subunidad ribosomal 40S posiciona de forma adecuada el codón de inicio en el sitio 'P' ribosomal. Esto es debido a la estructura terciaria que adopta el RNA, en particular a la presencia de un pseudonudo en la base del dominio III (Berry et al, 2010; Boehringer et al, 2005; Kieft et al, 2001; Wang et al, 1995). Las variaciones genotípicas que afectan a la región IRES mantienen la estructura secundaria, pues se asocian con fenómenos de covariación (Saiz et al, 1999). Existen evidencias de que secuencias situadas el 3'

con respecto al AUG afectan negativamente los niveles de traducción (Rijnbrand et al, 2001). Están documentadas estructuras secundarias conservadas dentro de la región codificante para la proteína *Core*; al menos 5 tallos-lazo de función desconocida dentro de los primeros 500 nts de secuencia (Tuplin et al, 2004). Estas estructuras son innecesarias desde el punto de vista replicativo, puesto que los replicones subgenómicos empleados para el estudio en cultivo celular no los portan. No obstante los dominios V y VI (que corresponden a dos de estos tallos-lazo en secuencia codificante *core*) se encuentran implicados en interacciones de RNA-RNA a larga distancia. Concretamente la secuencia comprendida entre los nucleótidos 428-442 interacciona con los nucleótidos 24-38 en el 5'UTR (Beguiristain et al, 2005; Honda et al, 1999). Esta interacción a larga distancia es responsable de la inhibición en la eficiencia de traducción del IRES de HCV por lo que se le presupone una función reguladora (Kim et al, 2003; Wang et al, 2000).

El extremo 3'UTR oscila entre 200 y 235 nt de longitud y está formado por 3 dominios: una pequeña región variable, un tramo de poli(U/UC) de 80 nt de longitud media y una región invariable de 98 nt denominada cola X. La cola X se estructura en 3 tallos-lazo altamente conservados entre los diferentes genotipos, por esta razón se piensa que el genoma de HCV termina muy probablemente con una estructura en doble cadena (Kolykhalov et al, 1996; Tanaka et al, 1996). Los elementos conservados del 3'UTR son esenciales para la replicación tanto *in vitro* como *in vivo* (Friebe & Bartenschlager, 2002; Kolykhalov et al, 2000; Yi & Lemon, 2003). Además se ha comprobado que potencian la traducción dependiente de IRES (Bradrick et al, 2006; Ito et al, 1998; McCaffrey et al, 2002; Song et al, 2006).

Ambos extremos 5'UTR y 3'UTR están pues implicados en la regulación de los procesos replicativos y traduccionales, existiendo además un solapamiento significativo dentro de cada uno de los UTRs con respecto a las estructuras que afectan a ambos fenómenos. El incremento en la traducción dependiente de IRES puede estar mediado por proteínas como la PTB (proteína de unión a tramos de polipirimidina), capaz de unirse a ambos extremos del genoma. Se ha sugerido que la función de la región X en el 3'UTR es semejante a la que ejerce la cola de poli(A) en la traducción de los mRNAs eucariotas, permitiendo la circularización del genoma viral (Shi & Lai, 2006), de hecho se encuentra descrita la interacción directa RNA-RNA entre dominios funcionales específicos correspondientes a los extremos 5' y 3'UTR (Romero-Lopez & Berzal-Herranz, 2009). La interacción entre ambos extremos serviría como un método de control que permitiría la traducción y replicación eficiente únicamente de los genomas completos no afectados por el ataque de las nucleasas celulares. La transición entre replicación y traducción requiere de factores virales que actúan tanto en *cis* como en *trans* de forma secuencial (Lourenco et al, 2008), auxiliados por moléculas del hospedador copartícipes (Scheller et al, 2009). Por todo ello, la determinación de los elementos responsables de la coordinación entre los procesos de replicación y traducción, y su relación con las modificaciones estructurales del genoma siguen siendo motivo de estudio.

Tropismo tisular: el miR122 como factor del hospedador implicado en la replicación del virus

El HCV sólo infecta a seres humanos y a chimpancés. Replica preferentemente en el hígado, lo que sugiere que su ciclo vital depende de factores de la célula hospedadora expresados principalmente en este tipo celular. Además de expresar los receptores de superficie celular adecuados (Poumbourios & Drummer, 2007), las células hepáticas expresan abundantemente el

microRNA 122 (Lagos-Quintana et al, 2002). Dentro de los UTRs de HCV existen 3 secuencias diana para el miR-122; una de ella se encuentra en la región variable del 3' UTR, las otras dos secuencias son adyacentes y están localizadas entre los tallos lazo I y II, corriente arriba del IRES en el 5'UTR. Se ha demostrado experimentalmente que debido a la interacción en estos puntos del genoma, el miR-122 contribuye a la regulación de los procesos replicativos y traduccionales del virus, facilitando su reproducción a nivel hepático (Henke et al, 2008; Jopling et al, 2005).

LOS MICRO RNAS

Generalidades

Los microRNAs (miRNA) son pequeñas moléculas de RNA no codificantes reguladoras de la expresión génica. Se encuentran codificados en el genoma, ya sea individualmente o como parte de un grupo, a menudo con genes relacionados. Son transcritos generalmente por la RNA polimerasa II, más raramente por la RNA polimerasa III (Borchert et al, 2006), en forma de largas horquillas denominadas pri-miRNAs (transcritos primarios de miRNA). Los pri-miRNAs sufren un procesamiento secuencial, primero nuclear y después citoplásmico, por enzimas de la familia RNasa III; DROSHA y DICER respectivamente. El resultado es un miRNA maduro de simple cadena con una longitud de entre 21-23 nucleótidos, que para llevar a cabo sus funciones reguladoras ha de ensamblarse junto a proteínas de la familia Argonauta para posteriormente ser incorporado en un complejo proteico activo denominado miRISC (complejo de silenciamiento inducido por miRNA). Este complejo muestra gran similitud con el complejo RISC responsable del fenómeno de silenciamiento de RNA a través de los siRNA (*short interfering RNA*). El rasgo primordial que determina que un miRNA interactúe con su mRNA diana se encuentra en un segmento de 7 nucleótidos comprendido entre las bases 2-8 de la molécula. Este segmento de secuencia se conoce en jerga anglosajona como *seed sequence* (secuencia semilla, denominada secuencia de reconocimiento en lo sucesivo), que ha de complementar por enlaces Watson-Crick con el mRNA diana. Recientemente, un grupo de investigadores ha descrito las bases estructurales que explicarían esta observación empírica. Proponen que las interacciones entre las proteínas Argonauta del complejo miRISC y el microRNA, específicamente en la región de reconocimiento, preparan y optimizan la conformación de esas bases para el apareamiento con la secuencia diana del mRNA; demostrando que la secuencia de reconocimiento en presencia de las proteínas asociadas queda constreñida de forma rígida, mientras el resto de la estructura del microRNA permanece en una conformación flexible (Lambert et al, 2011). La secuencia de reconocimiento está especialmente conservada entre los miRNAs relacionados en su origen genómico y permite su clasificación en familias (Lim et al, 2003a; Lim et al, 2003b).

En los animales, por regla general, los miRNAs regulan la expresión de genes uniéndose específicamente por complementariedad imperfecta a las secuencias diana que se encuentran en el 3'UTR de los mRNAs. Cada miRNA cuenta con múltiples mRNAs como diana; al mismo tiempo cada mRNA posee secuencias de reconocimiento para varios miRNAs. El resultado de la unión del miRNA a su diana causa represión en la síntesis proteica, o la degradación del mRNA en función del grado de complementariedad entre las secuencia diana y el miRNA. El mecanismo subyacente en células animales es controvertido, coexistiendo cuatro modelos propuestos, cada uno de ellos cimentado sobre observaciones experimentales. En el primer modelo se produciría la degradación de la proteína co-traduccionalmente. En el segundo la inhibición de la traducción ocurriría en la fase de elongación; la terminación prematura de síntesis proteica sería debida a la disociación de los ribosomas. En tercer lugar la inhibición de la traducción se ha detectado en fase de iniciación. En este modelo se apunta a procesos de desadenilación y *decapping* o a la

inhibición de la circularización del mRNA como responsables. En cuarto y último lugar se ha descrito la capacidad de los miRNAs de secuestrar los mRNAs celulares en emplazamientos citoplásmicos concretos (cuerpos P), que excluyen la maquinaria traduccional (Eulalio et al, 2008). Además se han descrito excepciones; Steitz *et al.* demuestran que un microRNA también puede activar la traducción aunque interactúe en la región 3'UTR (Vasudevan et al, 2007). Existen autores que apuestan incluso por la teoría de que los fenómenos de degradación mediados por miRNAs en células animales, constituyan parte integral de los procesos de biogénesis de pequeños fragmentos de RNA no codificantes (Brodersen & Voinnet, 2009).

Entre las funciones biológicas más relevantes de los microRNAs se encuentran la regulación de procesos de resistencia a estrés, metabólicos, de defensa contra infección por patógenos, coordinación de la proliferación celular, muerte celular y la génesis de tumores (Carthew & Sontheimer, 2009; Fabian et al, 2010).

El microRNA miR-122

Muchos microRNAs muestran patrones de expresión específicos de tejido o estadio del desarrollo como ocurre con el miR-122. El miR-122 representa el 72% de la población total de microRNAs clonados a partir de tejido hepático de ratón, no siendo detectado en otros tejidos sujetos a análisis (Lagos-Quintana et al, 2002). Sus niveles aumentan durante la embriogénesis alcanzando las 66.000 copias por célula en el hígado de ratones adultos, y 135.000 copias por célula en hepatocitos humanos de cultivo primario (Chang et al, 2004). La transcripción de los precursores inmaduros del miR-122 obedece a ritmos circadianos, lo que suele asociarse con órganos con una tasa metabólica particularmente elevada, como es el caso del hígado (Gatfield et al, 2009). Su secuencia se encuentra muy conservada entre múltiples especies; desde *Homo sapiens* hasta *Danio rerio* (pez cebra) (Girard et al, 2008). Experimentos de hibridación *in situ* indican que el patrón de expresión hepática a lo largo del desarrollo en el pez cebra es comparable a los observados en el hígado de ratón y hepatocitos humanos (Wienholds et al, 2005). Por otra parte, el miR-122 se encuentra entre los pocos ejemplos de microRNAs celulares que sufren modificaciones tras alcanzar su forma madura. La enzima GLD-2-poli(A) polimerasa añade una adenina en 3' de su secuencia; como consecuencia se produce un incremento en la estabilidad citoplásmica de la molécula, ya que supuestamente esta adición dificulta los procesos de degradación que dependen del extremo 3' (Kato et al, 2009).

La primera diana celular hepática identificada para el miR-122 fue un transportador catiónico de amino ácidos llamado *CAT-1*. La expresión de la proteína CAT-1 es reprimida por acción directa del miR-122 en su extremo 3'UTR (Chang et al, 2004). El análisis de la expresión genética en ratones empleando *microarrays*, tras la inhibición de miR-122 utilizando *antagomirs*, reveló un descenso en la síntesis de ácidos grasos y colesterol. Simultáneamente se observó una reducción de los niveles de colesterol en plasma y un incremento en la oxidación de ácidos grasos. En este trabajo se validaron experimentalmente de forma individual cinco mRNAs que contaban con dianas de interacción predichas en sus 3' UTR. Dos de ellos mostraron una clara represión en presencia del miR-122: Aldo-A y Ndr3 (Esau et al, 2006; Krutzfeldt et al, 2005). Parece ser que el miR-122 juega un papel destacado en el mantenimiento del fenotipo hepático adulto (Girard et al, 2008).

El microRNA 122 también se encuentra asociado con enfermedades como la infección por HCV y el desarrollo de hepatocarcinoma. Se ha sugerido que el miR-122 actúa como supresor de tumores en el hígado puesto que sus niveles se encuentran severamente mermados en el

carcinoma hepatocelular humano y en todos los tipos celulares derivados de él (Coulouarn et al, 2009; Gramantieri et al, 2007). Al mismo tiempo su inhibición en células Huh-7 provoca la aparición de características tumorales (Bai et al, 2009). Se ha demostrado que al ser reintroducido en las líneas celulares derivadas de hepatocarcinoma es capaz de revertir las propiedades cancerosas de estas células reduciendo la angiogénesis y metástasis intrahepática *in vivo* (Tsai et al, 2009). Algunos de los genes diana implicados en este comportamiento han sido identificados y confirmados experimentalmente. Entre ellos se encuentra la ciclina G1 (Gramantieri et al, 2007) y una metaloproteasa/disintegrina denominada ADAM17 (Tsai et al, 2009).

Como ya se ha mencionado el HCV también exhibe dependencia del miR-122. Su presencia favorece la replicación y traducción viral en células de hepatoma Huh-7 (Henke et al, 2008; Jopling et al, 2008). Este efecto positivo se ha relacionado recientemente con las fases del ciclo de las células hepáticas (Fehr et al, 2012). El miR-122 es reclutado directamente en dos secuencias adyacentes dentro de la región 5' UTR del RNA viral, aunque también se han encontrado dianas en la región 3' UTR y codificante del genoma. Todas estas dianas de interacción se encuentran conservadas entre los genotipos virales. Una publicación que analizó la accesibilidad para las diferentes dianas dentro del genoma en replicones subgenómicos ha demostrado que los diferentes lugares de interacción compiten entre sí, estimulando o inhibiendo los procesos de replicación y traducción. Esto contribuiría a mantener los niveles óptimos de carga viral durante la infección (Nasheri et al, 2011). Debido a la frecuente ineficacia de los tratamientos actuales contra la infección por este virus, las nuevas aproximaciones terapéuticas basadas en oligonucleótidos modificados químicamente para secuestrar específicamente las moléculas de microRNA-122, no se han hecho esperar. Los resultados obtenidos por el grupo del Dr. Lanford y colaboradores parecen prometedores ya que conducen a una supresión de la viremia duradera, sin evidencias de aparición de resistencias entre la población de cuasiespecies, y lo más asombroso, sin efectos secundarios en los chimpancés tratados. Por lo que parece que, a pesar de la enorme influencia que ejerce el miR-122 sobre la fisiología hepática, su inactivación no fue perjudicial para la función del hígado durante el periodo de estudio (Krutzfeldt et al, 2005; Lanford et al, 2010).

RNasa III DE ESCHERICHIA COLI

Generalidades

La RNasa III de *E.coli* fue descubierta en el año 1967 como una actividad degradativa para el RNA de doble cadena (dsRNA) (Robertson, 1967). Pertenece a la familia de enzimas RNasa III, constituida por endoribonucleasas de naturaleza proteica capaces de cortar de forma específica el RNA de doble cadena (dsRNA). La RNasa III se encuentra ampliamente distribuida en eubacterias, no presenta ortólogos en los genomas de arqueobacterias (Conrad & Rauhut, 2002), y cuenta con destacados representantes dentro de los organismos eucariotas; Drosha y Dicer son enzimas muy conocidas por su importante papel en los procesos de maduración de microRNAs y silenciamiento genético (Court, 1993; Nicholson, 2003).

La RNasa III de *E.coli* se clasifica dentro de la clase I, cuyos miembros son los más pequeños y simples dentro de la familia de enzimas RNasa III. Está formada por un dominio catalítico con actividad ribonucleasa (RND) en el extremo N-terminal, y un dominio de unión al dsRNA (dsRBD) en el extremo C-terminal. La proteína funciona en forma de homodímero, y cuenta con un único centro activo, formado por la interacción cooperativa de ambos monómeros

(Zhang et al, 2004) (**Figura 2**). Posee actividad fosfodiesterasa y requiere cationes metálicos divalentes, preferentemente magnesio, para ser reactiva (Dunn, 1976; Robertson et al, 1968). Los productos de corte tienen un tamaño que oscila entre 11-15 pares de bases y estructura tipo horquilla con dos bases protuberantes en su extremo 3' (Court, 1993; Nicholson, 2003; Robertson, 1982). La reacción de hidrólisis emplea una molécula de agua como nucleófilo, y genera productos de corte con extremos 5'-P y 3'-OH (Nicholson, 2003; Robertson, 1982).

La RNasa III es un enzima no esencial en *E.coli*, aunque en su ausencia las bacterias muestran deficiencias de crecimiento (Babitzke et al, 1993; Kindler et al, 1973). La principal función de la RNasa III de *E.coli* consiste en procesar los precursores de rRNA (Bram et al, 1980; King et al, 1984; Nikolaev et al, 1973; Westphal & Crouch, 1975; Young & Steitz, 1978). También participa en varios aspectos del ciclo vital de diferentes bacteriófagos, e.g. en la maduración de los mRNAs tempranos del bacteriófago T7 (Dunn & Studier, 1973; Dunn & Studier, 1983), en el procesamiento de tRNAs en el caso del bacteriófago T4 (Pragai & Apirion, 1981), ejerce un papel regulador durante el ciclo lisis-lisogenia en el bacteriófago λ (Guarneros et al, 1982; Oppenheim et al, 1993), etc. En ocasiones regula la expresión genética controlando la eficiencia traduccional y la estabilidad del RNA (Aristarkhov et al, 1996; Beran & Simons, 2001; Gatewood et al, 2012; Koraimann et al, 1993; Lim et al, 2012; Portier et al, 1987; Regnier & Grunberg-Manago, 1989). El corte dentro de regiones 5' no traducidas puede desencadenar la degradación del RNA (Grunberg-Manago, 1999; Regnier & Grunberg-Manago, 1990; Steege, 2000). La RNasa III regula su propia expresión de este modo, facilitando la digestión de su mRNA por parte de la RNasa E (Bardwell et al, 1989; Matsunaga et al, 1996).

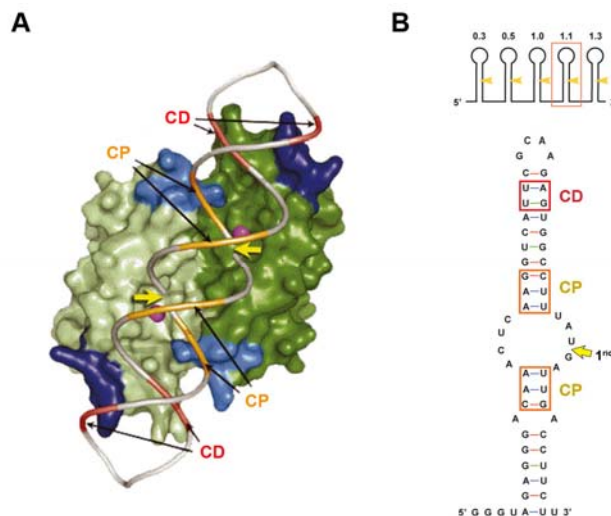


Figura 2: Reconocimiento de sustrato en la RNasa III.

A: Imagen de superficie para la estructura cristalina de un representante bacteriano de RNasa III clase I (*Aquifex aeolicus*) unido al RNA sustrato. Cada monómero se encuentra coloreado en verde con diferente intensidad. Los dominios de unión a dsRNA (dsRBD) se resaltan en tonos azules. Adaptado de MacRae & Doudna, 2007. **B:** Puntos de corte de la RNasa III de *E.coli* en las regiones intergénicas del mRNA precursor del bacteriófago T7 (~7100 nt). En la parte inferior se detalla la estructura correspondiente al fragmento R1.1 y el punto de corte en condiciones primarias. Las cajas proximal (CP) y distal (CD) se muestran en naranja y rojo respectivamente. Las flechas amarillas indican los puntos de corte. Adaptado de Nicholson, 2003.

Reconocimiento de sustratos

Elementos específicos de secuencia y estructura del RNA determinan los puntos de corte para la RNasa III de *E.coli*. La longitud de la doble cadena, típicamente dos vueltas de hélice para la forma A de RNA bicatenario (~20-22 pares de bases), representa el principal epítipo reactivo (Nicholson, 2003; Robertson, 1982). Esta es la longitud mínima de dsRNA reconocida por la RNasa III. También es capaz de reconocer el apilamiento coaxial de hélices cortas que supongan la presencia de una hélice cuasicontinua de longitud suficiente (Franch et al, 1999). Aunque la reacción estándar de corte implica la digestión de las dos cadenas que conforman la doble hélice de RNA, la presencia de un lazo interno o protuberancias, promueve el corte de una sola hebra de

la doble cadena (Chelladurai et al, 1993; Robertson, 1982). Este comportamiento favorece la formación de horquillas en los extremos 3' del RNA, lo que otorga una mayor resistencia contra la acción de exonucleasas 3'-5'. En el caso del bacteriófago T7, tales cortes contribuyen a la alta estabilidad de las especies maduras de mRNA (Dunn & Studier, 1983).

Aunque no se ha podido establecer una secuencia consenso que actúe como determinante positivo para el procesamiento, si se conocen rasgos de secuencia que operan como determinantes y antideterminantes para la reacción de corte (Pertzev & Nicholson, 2006; Zhang & Nicholson, 1997). En base al procesamiento de un pequeño sustrato natural procedente de un transcrito temprano del bacteriófago T7, el RNA R1.1, se ha establecido que los diez pares de bases que se extienden a partir del punto de corte de la RNasa III, afectan a la reactividad del enzima; las primeras cuatro bases, que configuran la denominada caja proximal, y las dos últimas, designadas como caja distal, son las más relevantes (Pertzev & Nicholson, 2006; Zhang & Nicholson, 1997) (**Figura 2B**). Nicholson *et al.* proponen que la RNasa III de *E.coli* reconoce la estructura del esqueleto de azúcares y fosfatos del RNA en las cajas proximal y distal, mientras que los antideterminantes protegen aquellos dsRNAs vitales del procesamiento no deseado (Pertzev & Nicholson, 2006; Zhang & Nicholson, 1997).

Es importante señalar que la RNasa III de *E.coli* muestra diferencias de especificidad en función de las condiciones salinas de reacción. Los lugares de corte primario son los observados *in vivo*, en condiciones de fuerza iónica fisiológica, y los puntos de corte preferentes en las reacciones *in vitro* a una concentración de iones monovalentes relativamente alta (150-300 mM). En situación de baja fuerza iónica, o un exceso de enzima, *i.e* condiciones de corte secundario, la RNasa III corta en puntos adicionales no observados *in vivo*. A una baja concentración de iones monovalentes la RNasa III detecta puntos de corte primario y secundario (Dunn, 1976; Gross & Dunn, 1987).

LA RNASA P

Generalidades

La ribonucleasa P (RNasa P) es un enzima esencial, muy conservado, encontrado en todos los reinos de la vida: Bacteria, Archaea y Eukarya (Walker & Engelke, 2006). Es la endonucleasa que cataliza la maduración del extremo 5' en los tRNAs (**Figura 3**), con pocas excepciones (Gupta, 1984; Lee et al, 1987; Randau et al, 2008). Se ha propuesto como una de las actividades enzimáticas más antiguas (Maizels & Weiner, 1994).

La primera RNasa P descrita fue la de *Escherichia coli* en el año 1972 (Robertson et al, 1972). La mayoría de RNasas P consisten en una subunidad de RNA (RPR) y un número variable de subunidades proteicas (RPPs): una en Bacteria, cuatro o cinco en Archaea, y nueve o diez en Eukarya (Evans et al, 2006; Hall & Brown, 2002; Jarrous, 2002). Existen algunas excepciones referidas a los cloroplastos de plantas superiores, donde la actividad RNasa P no copurifica con RNA y sigue un mecanismo de corte diferente (Thomas et al, 2000; Wang et al, 1988), y la RNasa P humana mitocondrial, compuesta por tres proteínas (Holzmann et al, 2008), aunque en este caso la situación es controvertida (Puranam & Attardi, 2001). A pesar de estas salvedades, la RNasa P entra dentro de la categoría de ribozimas, puesto que independientemente de su origen, es el componente de RNA el responsable de la catálisis del fragmento 5' del pre-tRNA en ausencia de subunidades proteicas (Guerrier-Takada et al, 1983; Kikovska et al, 2007; Pannucci et al, 1999).

No obstante, tanto el RNA como las proteínas son imprescindibles para el procesamiento *in vivo* (Apirion, 1980; Chamberlain et al, 1998; Schedl & Primakoff, 1973; Waugh & Pace, 1990). Al igual que otras ribozimas de gran tamaño, *e.g.* intrones tipo I y tipo II, su actividad depende de la presencia de iones metálicos divalentes como cofactores, preferentemente iones de magnesio (Lilley, 2011; Smith et al, 1992; Smith & Pace, 1993). El mecanismo de catálisis se ha estudiado en bacterias, arqueobacterias y eucariotas. En términos generales la reacción química se diferencia de la de otros ribozimas por tres características principales: i) actúa vía intermolecular, ii) no genera intermediarios unidos de forma covalente, y iii) corta el sustrato mediante hidrólisis en lugar de trans-esterificación (Kirsebom & Trobro, 2009; Persson et al, 2003). Los productos resultantes poseen extremos 5'-P y 3'-OH (Robertson et al, 1972); característica empleada para confirmar su identidad ante un producto de digestión. Este rasgo peculiar lo comparte con otras pocas RNAsas de naturaleza proteica *e.g.* la RNasa III y la RNasa H (Robertson, 1990).

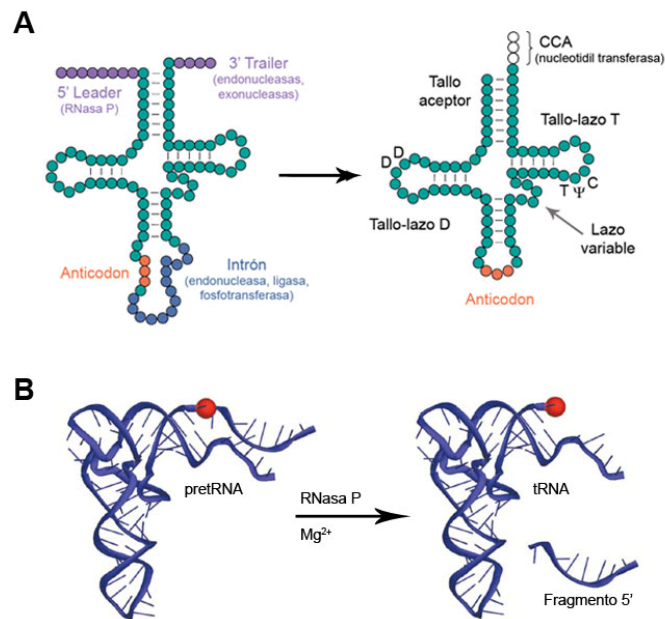


Figura 3: **A:** Los tRNAs se transcriben en forma de precursores (pre-tRNA) inactivos. Han de someterse a extensas modificaciones postranscripcionales antes de incorporarse al metabolismo celular. Este proceso de maduración incluye la eliminación de la secuencia 5' *leader* (RNasa P) y del fragmento en 3' (RNasa Z), el *splicing* de intrones (en algunos tRNAs), la incorporación del CCA (en el caso de organismos eucariotas) y la modificación de múltiples nucleótidos (~20%). Cada nucleótido se representa con un círculo coloreado. Parte de la secuencia sin modificar se muestra en verde, las secuencias *leader* y tráiler en morado, en azul se destaca el intrón y en color naranja el anticodón (Hopper & Phizicky, 2003). En el panel de la derecha se resaltan las características estructurales del tRNA, conservadas en todas las formas de vida. El tallo aceptor con el trinucleótido CCA en 3', es el lugar de aminoacilación, donde se produce la reacción de trans-peptidación durante el proceso de síntesis proteica. El tallo lazo T, denominado así por la presencia conservada del triplete TΨC, y el tallo del anticodón, responsable del reconocimiento de los tripletes del mRNA. Entre ambos el lazo variable. El tallo lazo D, llamado así por la presencia en el lazo apical de dos nucleótidos modificados en dihidrouridina. **B:** La RNasa P cataliza la hidrólisis del enlace fosfodiéster del pre-tRNA para eliminar un fragmento de secuencia en 5' en presencia de Mg^{2+} . La esfera roja representa el grupo fosfato (Kazantsev & Pace, 2006).

Además de procesar todos los precursores del tRNA, la RNasa P bacteriana reconoce y corta un grupo heterogéneo de RNAs. Entre ellos se encuentran el RNA precursor 4.5S de la SRP (Bothwell et al, 1976a; Peck-Miller & Altman, 1991), un RNA inducido por el bacteriofago $\phi 80$ (Bothwell et al, 1976b), el tmRNA (Komine et al, 1994), mRNAs de operones policistrónicos (Alifano et al, 1994; Li & Altman, 2003), el precursor de RNA C4, represor de los bacteriófagos P1 y P7 (Hartmann et al, 1995), algunos *riboswitches* (Altman et al, 2005), y un pequeño RNA no

codificante (ncRNA) en una bacteria extremófila (Ko & Altman, 2007). En el caso de la RNasa P eucariota el repertorio de RNAs reconocidos y cortados se encuentra limitado a ncRNAs (Coughlin et al, 2008; Samanta et al, 2006; Sunwoo et al, 2009; Wilusz et al, 2008; Yang & Altman, 2007). A su vez se ha descrito que la RNasa P eucariota es necesaria para la transcripción de tRNAs y otros ncRNAs por parte de la RNA polimerasa III, y de genes codificantes para rRNAs por la RNA polimerasa I (Jarrous & Reiner, 2007; Reiner et al, 2006; Reiner et al, 2008). La RNasa P humana desempeña este papel asociándose a la cromatina transcripcionalmente activa para genes 5S rRNA y tRNA de manera dependiente del ciclo celular, lo que sugiere que los procesos de transcripción y procesamiento de estos RNAs se encuentran acoplados. Todas estas observaciones comprometen a la RNasa P eucariota en una intrincada red, en la que no sólo se incluye el procesamiento del RNA en la célula, sino además las maquinarias requeridas para la expresión genética (Jarrous & Gopalan, 2010).

Composición y localización: RNasa P bacteriana y RNasa P eucariota

Subunidad RNA (RPR)

En bacterias, la RPR posee un tamaño de 350-400 nt de longitud. Inicialmente el análisis comparativo de secuencias de RNA con distinto origen permitió definir dos modelos de estructura secundaria para la RPR bacteriana: el tipo A (ancestral), cuyo principal representante es la RPR de *Escherichia coli* (M1), y el tipo B, basado en el ejemplo de *Bacillus subtilis* (Haas & Brown, 1998; Pace & Brown, 1995) (**Figura 4A-B**). A pesar de la divergencia en las secuencias, todas las RPRs bacterianas comparten un conjunto de elementos helicoidales conservados, que constituyen el núcleo estructural y funcional del ribozima (Chen & Pace, 1997). Especialmente importante dentro del núcleo conservado es la hélice P4, conservada universalmente. Experimentos bioquímicos indican que P4 contiene los nucleótidos del sitio activo del ribozima (Kirsebom, 2007; Vioque & Altman, 2001). En la mayoría de los casos la RPR eucariota es de menor longitud, más rudimentaria que la bacteriana, esto se traduce en la ausencia de elementos estructurales periféricos que contribuyen a la estabilidad global de la molécula (Kazantsev & Pace, 2006) (**Figura 4C-D**).

Atendiendo a los resultados de cristalografía de rayos X, las RPRs bacterianas cuentan con un plegamiento terciario similar. De hecho, estudios de complementación *in vivo* demuestran que la RPR tipo A y tipo B son intercambiables (Wegscheid et al, 2006). Dentro de la RPR se distinguen dos módulos: el dominio catalítico, y el dominio de la especificidad. Los módulos se pliegan de modo independiente, pudiendo combinarse en forma de complejo bimolecular catalíticamente activo (Loria & Pan, 1996; Pan et al, 1995). La estructura de tres RPRs bacterianas en solución se ha determinado recientemente en las mismas condiciones de fuerza iónica requeridas para que estos ribozimas sean catalíticamente activos *in vitro* (Kazantsev et al, 2011). Sin embargo no contamos con una información tan detallada para el caso eucariota.

Es importante señalar que para que la RPR se catalíticamente activa *in vitro*, no solo requiere iones Mg^{2+} , también una elevada fuerza iónica en el medio (Brannvall & Kirsebom, 2001; Gardiner et al, 1985; Kazakov & Altman, 1991; Smith et al, 1992). Se considera que los cationes metálicos en solución apantallan las fuerzas electrostáticas de repulsión establecidas entre moléculas de RNA (Draper & Misra, 1998; Misra & Draper, 1998). Además, facilitan el plegamiento adecuado de la RPR en ausencia del soporte proteico; las fuerzas de repulsión

electrostática dentro del RNA pueden imponer barreras termodinámicas a los diferentes conformeros posibles en una solución (Tinoco & Bustamante, 1999).

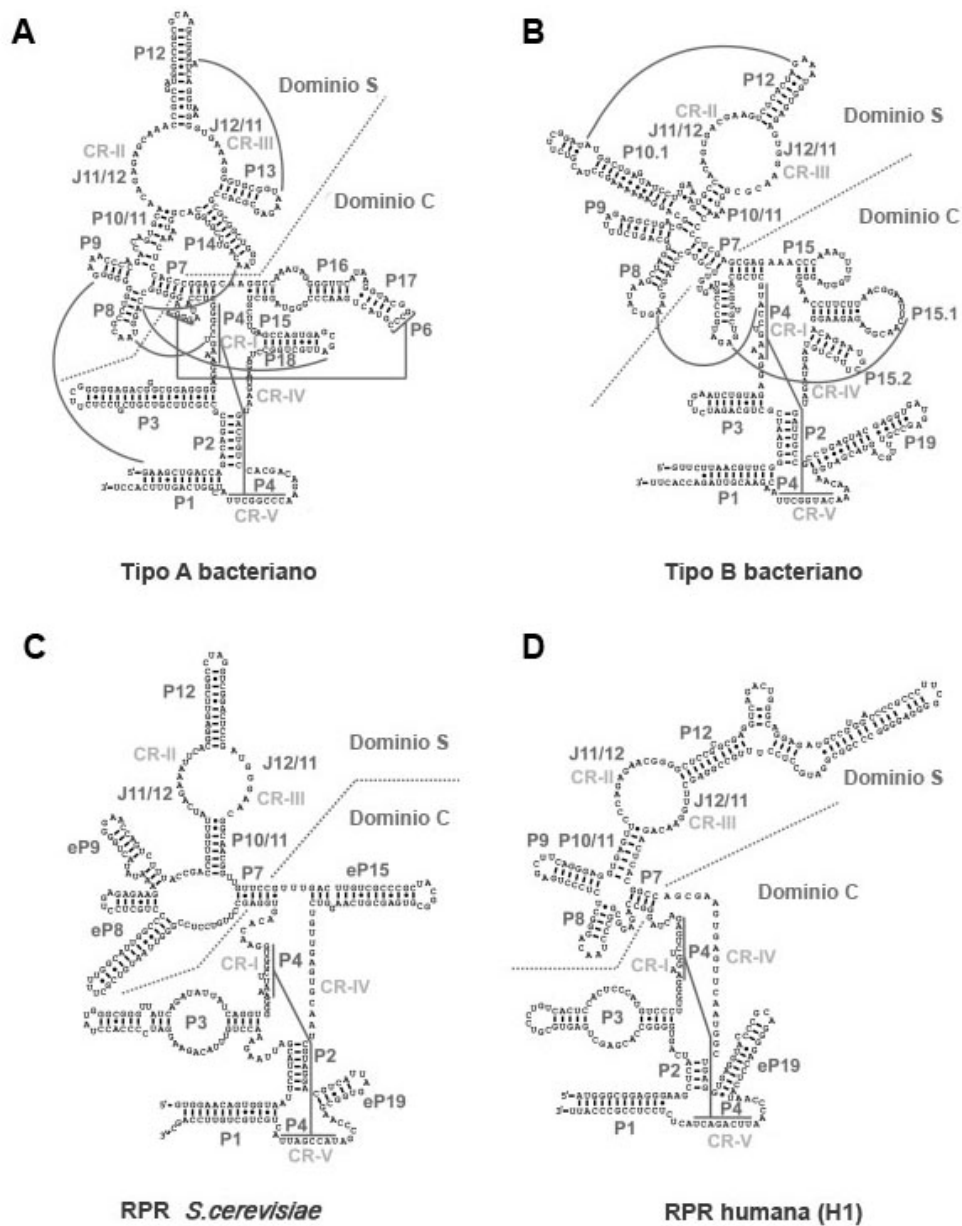


Figura 4: Ejemplos de estructura secundaria para la RPR bacteriana y eucariota (~280-360 nt) (Collins et al, 2000). **A:** Tipo A bacteriano, representado por la M1 de *E.coli*. **B:** Tipo B bacteriano, representado por la RPR de *B.subtilis*. **C:** RPR de la levadura *S.cerevisiae*. **D:** RPR humana (H1) de 340 nt de longitud. Con algunas variaciones referidas a longitud, las hélices P1-P4 y P7-P11 se encuentran en las mismas posiciones relativas en todas las RPRs. Destaca la presencia de cinco regiones universalmente conservadas (CRI-CRV) emplazadas en posiciones comparables dentro de la estructura secundaria. Parte de la región conservada I (CRI) y la V (CRV) aparecen formando la hélice P4. Las regiones CRII y CRIII se localizan dentro de un gran lazo entre las hélices P10 ó P11 y P12. Estos elementos estructurales conservados constituyen el núcleo estructural de la RPR (Evans et al, 2006). Algunas diferencias relevantes observadas para las RPRs eucariotas: i) presencia de un gran lazo interno en la hélice P3 (Lindahl et al, 2000; Piccinelli et al, 2005), con capacidad de unir subunidades proteicas propias del holoenzima (Perederina et al, 2010; Pluk et al, 1999; Ziehler et al, 2001) ii) ausencia de hélices P15, P16 y P17 en H1 al comparar con M1. Estas hélices desempeñan un papel importante en la unión y procesamiento del sustrato en *E.coli* (Brannvall et al, 2004; Busch et al, 2000; Kirsebom & Svard, 1994). Las líneas de puntos separan el dominio de la especificidad (S), del dominio catalítico (C). Las líneas continuas representan interacciones terciarias de largo alcance.

Subunidades proteicas (RPPs)

Las bacterias cuentan con una única RPP, de entre 12-14 kDa y alrededor de 120 aminoácidos, que representa un 10% de la masa total del holoenzima (Frank & Pace, 1998; Pace & Brown, 1995). Es posible reconstituir una holoenzima funcional empleando subunidades proteicas de distintas especies bacterianas (Guerrier-Takada et al, 1983; Morse & Schmidt, 1992; Pascual & Vioque, 1996). La RPP bacteriana desempeña múltiples funciones: i) facilita la interacción directa con el fragmento 5' *leader* en simple cadena del pre-tRNA, incrementando la afinidad para el sustrato sobre el producto (tRNA), y acelerando la liberación del tRNA, ii) potencia la eficacia del corte con respecto a la RPR de forma aislada, iii) permite a la RPR funcionar a concentraciones de magnesio fisiológicas, rebajando la fuerza iónica del medio requerida por el ribozima para la reacción, iv) estabiliza el plegamiento del ribozima (compensando defectos que reducen su capacidad catalítica), y v) permite el reconocimiento de sustratos distintos al tRNA (Buck et al, 2005a; Buck et al, 2005b; Crary et al, 1998; Guerrier-Takada & Altman, 1984; Kurz & Fierke, 2002; Kurz et al, 1998; Liu & Altman, 1994; Lumelsky & Altman, 1988; Niranjanakumari et al, 1998; Park et al, 2000; Peck-Miller & Altman, 1991; Reich et al, 1988; Sun et al, 2006; Sun & Harris, 2007; Tallsjo & Kirsebom, 1993). La RPP bacteriana compensa las diferencias estructurales de los pre-tRNAs de modo que la unión y la catálisis sean uniformes. Para ello altera la contribución energética de la unión del 5' *leader* a la proteína, acomodando la tasa de corte (Sun et al, 2006).

El conocimiento actual de la función de las RPPs en arqueas y eucariotas es mucho más limitado. La RNasa P humana nuclear consta al menos de 10 subunidades proteicas: Rpp14, Rpp20, Rpp21, Rpp25, Rpp29, Rpp30, Rpp38, Rpp40, hPop1 y hPop5 (Eder et al, 1997; Jarrous et al, 1998; Jarrous et al, 1999a; Jarrous et al, 2001; Lygerou et al, 1996b; van Eenennaam et al, 2001a). El papel concreto de cada una de las subunidades proteicas en la reacción de hidrólisis y en el reconocimiento de sustrato es desconocido. Desde un punto de vista evolutivo, el incremento en masa del contenido proteico del holoenzima desde bacterias (~10%), hasta eucariotas (~70%), puede ampliar el rango de sustratos reconocidos y procesados por la RNasa P; del mismo modo que puede involucrar al complejo en procesos biológicos diferentes a los descritos hasta la fecha (Jarrous & Gopalan, 2010). Es posible que determinadas RPPs jueguen un papel clave para el correcto procesamiento de la RNasa P eucariota, como ocurre con Rpp21 y Rpp29 (Mann et al, 2003), estabilizando la RPR. Existe la posibilidad de que las subunidades proteicas jueguen un papel destacado en la regulación espacio-temporal del holoenzima, inmerso en un medio celular mucho más complejo que el procariota (*vide infra*) (Lai et al, 2010).

Localización celular de la RNasa P humana

Estudios en biología celular han revelado que tanto el RNA H1, como las subunidades proteicas de la RNasa P humana se encuentran desigualmente concentrados en los diferentes compartimentos intracelulares: el nucléolo, el nucleoplasma, los cuerpos de Cajal, el espacio perinucleolar y el citoplasma (Hua & Zhou, 2004; Jacobson et al, 1997; Jarrous et al, 2001; Jarrous et al, 1999b; Lee et al, 1996; Matera et al, 1995; van Eenennaam et al, 2001b; Welting et al, 2006). El grueso del RNA H1 en células HeLa se ha detectado en el citoplasma (Lee et al, 1996). A este respecto los resultados son contradictorios si lo comparamos con *Saccharomyces cerevisiae* (Wolin & Matera, 1999). Las proteínas Rpp21 y Rpp29, se localizan principalmente en el nucleoplasma y nucléolo; aunque Rpp29 puede moverse rápidamente entre ambos lugares (Chen & Huang, 2001). La ausencia de un emplazamiento concreto para los componentes de la

RNasa P humana, unida a la distinta distribución de algunas de las subunidades proteicas en los compartimentos intranucleares, sugiere que el ensamblaje de la RNasa P se produce de forma dinámica, y está ligado a procesos de transcripción en compartimentos nucleares diferenciados funcionalmente (Jarrous, 2002). Si H1 se asocia con las proteínas que constituyen el holoenzima a nivel citoplasmático, para formar un complejo ribonucleoproteico antes de ser transportado al núcleo, sigue siendo un enigma. Además las implicaciones funcionales de la presencia de H1 en el citoplasma son desconocidas.

La endoribonucleasa MRP

La RNasa MRP (*Mitochondrial Ribosomal Processing*) se describió inicialmente como la endoribonucleasa responsable de la digestión de los cebadores de RNA para el inicio de la síntesis en la replicación del DNA mitocondrial (Chang & Clayton, 1987a; Chang & Clayton, 1987b; Chang et al, 1985; Stohl & Clayton, 1992). Posteriormente se ha demostrado que la forma nuclear, más abundante, se encuentra implicada en la maduración del rRNA (Chu et al, 1994; Lindahl et al, 2009; Lygerou et al, 1996a; Schmitt & Clayton, 1993). También se le atribuye un papel en la degradación de un mRNA específico implicado en la regulación del ciclo celular (Cai et al, 2002; Gill et al, 2004).

Al igual que la RNasa P, la MRP consta de una subunidad de RNA y varias subunidades proteicas, y es un enzima esencial para la viabilidad celular (Schmitt & Clayton, 1992), sin embargo parece estar confinada al reino eucariota (Chu et al, 1994; Piccinelli et al, 2005; Rosenblad et al, 2006). A pesar de su nombre, el grueso de RNasa MRP se localiza en el nucléolo (Kiss & Filipowicz, 1992; Reimer et al, 1988; Topper & Clayton, 1990) y transitoriamente en el citoplasma (Gill et al, 2006). En el caso humano, la MRP cuenta con un RNA de 267 nt de longitud y comparte todas sus subunidades proteicas con la RNasa P (Pluk et al, 1999; Welting et al, 2006; Welting et al, 2004). El componente de RNA de la MRP se encuentra muy relacionado estructuralmente con la RPR (Forster & Altman, 1990b); en particular el dominio al que se atribuye la actividad catalítica, donde se encuentran varios nucleótidos filogenéticamente muy conservados (Davila Lopez et al, 2009). Este alto grado de similitud sugiere que ambas enzimas usan el mismo mecanismo de catálisis, aunque la actividad ribozímica de la subunidad RNA de la RNasa MRP aun no ha sido confirmada experimentalmente. La mayor divergencia entre la RNasa P y la MRP se encuentra en el dominio que determina la especificidad por el sustrato; en consecuencia la RNasa P y la MRP cuentan con especificidades diferentes. Mientras que la RNasa P reconoce características estructurales concretas en su sustrato, el reconocimiento de sustrato de la RNasa MRP parece depender de características de secuencia (Esakova et al, 2011; Karwan et al, 1991). Los resultados de Olga Esakova *et al.* empleando ensayos de selección *in vitro* indican que la MRP digiere RNA de simple cadena, precisa una citosina en posición +4 relativa al punto de corte, y es sensible a las secuencias circundantes (Esakova et al, 2011).

Reconocimiento de sustratos

Hasta la fecha se encuentra generalmente aceptado por la comunidad científica que el reconocimiento de sustratos por parte de la RNasa P no depende de características de secuencia; en su lugar la RNasa P reconoce la estructura global del sustrato a través de múltiples contactos. De este modo es capaz de reconocer y procesar todos los precursores del tRNA, pues todos ellos comparten ya en su estadio inmaduro la estructura terciaria común entre los tRNAs en forma de “L” (Chang & Smith, 1973; Lee & Knapp, 1985; Swerdlow & Guthrie, 1984) (**Figura 5A**). El

reconocimiento parece ser jerárquico, de modo que elementos de estructura apropiados en una región del sustrato, pueden compensar una estructura subóptima localizada en una región próxima (Kirsebom, 2007).

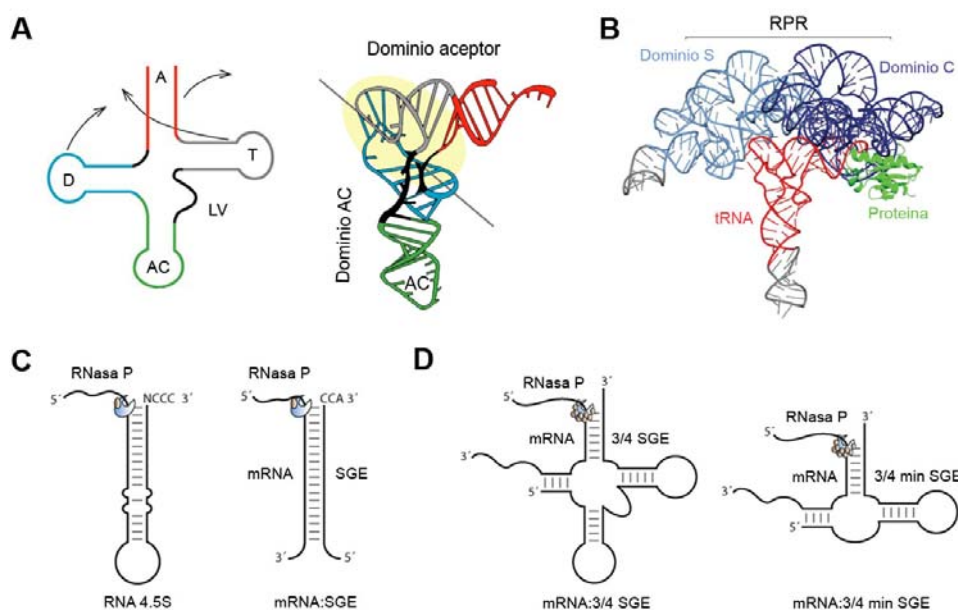


Figura 5: Reconocimiento de sustrato por la RNasa P. **A:** A la izquierda diagrama general de la estructura secundaria en forma de hoja de trébol de un tRNA con el esquema de plegamiento que conduce a la característica estructura tridimensional en forma de L común a todos los tRNA (panel derecho) (Kim et al, 1974; Robertus et al, 1974; Steinberg et al, 1997). En rojo el tallo aceptor (A), tallo-lazo T en gris (T), lazo variable en negro (LV), tallo-lazo del anticodón (AC) en verde, y en azul el tallo-lazo D (D). El tRNA consta de dos dominios funcionales plegados en ángulo recto: dominio aceptor para el aminoácido (tallo aceptor y tallo lazo T apilados en un mismo eje debido a la presencia de un pseudonudo), y dominio del anticodón que reconoce los tripletes del mRNA (tallo lazo AC y tallo lazo D). **B:** Estructura cristalina del holoenzima *T. maritima* (RPR 380nt ~110kDa, RPP 117aa ~14'3kDa) unido al tRNA (76nt ~26kDa). En la RPR bacteriana los nucleótidos que directamente interactúan con el lazo TΨC del pre-tRNA se ubican en el dominio de la especificidad (azul claro), mientras que el dominio catalítico (azul oscuro) interacciona directamente con la secuencia *leader* en 5', el tallo aceptor y la secuencia 3'-CCA del tRNA (en rojo), catalizando la reacción de digestión. La proteína (en verde) se une a la región del 5' *leader* y facilita la liberación del producto. Las regiones en gris corresponden a nucleótidos adicionales en el RNA necesarios para la cristalización. Adaptado de Reiter et al, 2010. **C:** Sustratos reconocidos por la RNasa P procariota: el RNA 4.5S y un sustrato modelo construido por hibridación de una SGE sobre un mRNA. **D:** Sustratos modelo reconocidos por la RNasa P eucariota por hibridación con SGE. Las bolitas azules simbolizan la RPR y las marrones las RPPs.

Reconocimiento en procariotas.

La RPR bacteriana corta eficazmente una horquilla de RNA que represente el apilamiento coaxial del tallo aceptor y el tallo lazo T del tRNA, con o sin subunidad proteica (Holm & Krupp, 1992; Kirsebom & Svard, 1992; McClain et al, 1987; Schlegl et al, 1992; Svard & Kirsebom, 1992; Svard & Kirsebom, 1993) (**Figura 5C**). La reducción de estas características en el sustrato provoca una disminución en la eficacia de corte. Se ha sugerido que la interacción productiva de estos elementos estructurales resulta en un cambio conformacional de la ribozima que en última instancia afecta a la catálisis, *i.e.* un mecanismo de corte inducido por ajuste de sustrato (Brannvall et al, 2007). Generalmente el motivo GGU localizado en la hélice P15 aparece mediante enlaces Watson-Crick con el motivo 3' NCCA en el sustrato, actuando a modo de anclaje (Kirsebom & Svard, 1994; Kufel & Kirsebom, 1996; LaGrandeur et al, 1994; Oh & Pace, 1994; Wegscheid & Hartmann, 2006). Esto facilita la desnaturalización parcial del tallo aceptor del pre-tRNA, lo que transforma el punto de corte en un lugar más accesible para el sitio activo de la

RPR. Los sustratos sin 3'-CCA se procesan correctamente, aunque con menor eficacia. Esta interacción carece de relevancia en muchas cianobacterias, donde la RPR cuenta con una estructura diferente para la hélice P15 (Pascual & Vioque, 1999; Vioque, 1997). En algunas cianobacterias (*e.g. Synechocystis sp.*), al igual que ocurre en humanos, la secuencia 3'-CCA no está codificada en los genes y es añadida post-transcripcionalmente mediante nucleotidil-transferasas durante el proceso de maduración de los tRNAs. Esto indica que existen interacciones adicionales que ayudan al acoplamiento enzima-sustrato y facilitan la localización del punto de corte.

En procariotas los nucleótidos en posición -1 y -2 con respecto al punto de corte influyen en la eficiencia y precisión del procesamiento (Kleineidam et al, 1993; Kufel & Kirsebom, 1996), aunque varían ligeramente en función del tipo bacteriano estudiado (Brannvall et al, 1998). Para la M1 de *E.coli* se consideran determinantes positivos para el procesamiento de un RNA la presencia de una pirimidina en 5' respecto al punto de corte (preferentemente uracilo), una guanina en 3' y hélices ricas en GC (Kirsebom, 2007; Liu & Altman, 1996).

Reconocimiento en eucariotas: RNasa P humana

La RNasa P humana se encuentra bien caracterizada a este respecto debido a su potencial terapéutico al emplearse en combinación con secuencias guía externas (SGE) con la finalidad de inactivar mRNAs mediante digestión dirigida (Lundblad & Altman, 2010). Las SGE son pequeños oligonucleótidos de RNA que al hibridar sobre un RNA diana generan un sustrato funcional que reproduce los suficientes elementos de estructura para ser reconocido y procesado por la RNasa P (Forster & Altman, 1990a). Gracias a estudios con SGE y experimentos sistemáticos de delección y mutagénesis, se ha determinado que el sustrato mínimo reconocido por la RNasa P humana debe contar con el equivalente al tallo aceptor y al dominio T del tRNA, precisa al menos un nucleótido protuberante (adenina o citosina) en el punto de unión entre ambas hélices, y requiere de una secuencia de enlace en simple cadena en aquel espacio que debieran ocupar los dominios del anticodón y el tallo lazo D (Carrara et al, 1995; Yuan & Altman, 1995) (**Figura 5D**). Los estudios de selección molecular *in vitro* indican que el corte está mucho más favorecido cuando la unión de una SGE genera una estructura semejante al lazo variable y al tallo D, y se prescinde del dominio del anticodón; es decir la estructura se asemeja al tRNA en las tres cuartas partes de su conformación (Yuan & Altman, 1994). Se ha propuesto que la RNasa P humana localiza el punto de corte sobre el sustrato “midiendo” la longitud de la hélice formada por el apilamiento coaxial del tallo aceptor y el tallo-lazo T, tanto en moléculas modelo como en sustratos naturales (Yuan & Altman, 1995).

MIMETISMO: ESTRUCTURAS TIPO TRNA

El mimetismo [*mīm(ē)*-μῖμος gr. 'imitación' + *-t(ēs)* gr. 'dedicado a', 'propio de' + *-ismos* gr. 'proceso', 'estado'] (Salamanca, 2007-2011) en biología es una sofisticada estrategia vital que consiste en que un organismo imita a otro de tal forma que adquiere alguna ventaja funcional, induciendo una determinada conducta en aquel que lo percibe, por consiguiente entraña la interacción de tres actores: el imitador (mimo), el modelo a imitar y el operador (intérprete). En la naturaleza, el mimetismo no se limita a la percepción visual; puede ocurrir a través de canales auditivos, químicos o táctiles. Por tanto es un fenómeno relacionado con la comunicación entre los sistemas vivos (Maran; Van-Wright, 1980).

La cripsis (camuflaje) y la mimesis son fenómenos muy relacionados, aunque usualmente confundidos; de hecho muchos zoólogos los consideran fenómenos distintos. Desde un punto de vista operativo, la principal diferencia estriba en la percepción del sistema que interpreta las señales (operador) emitidas por el imitador. Mientras que un organismo críptico se especializa en enviar ninguna, poca, ó información del tipo “no interesante” para el operador, los organismos miméticos arrojan información (señales) del tipo que interesa al operador, consiguiendo conducirlo a engaño (Maran; Van-Wright, 1980).

La noción de mimetismo molecular se ha empleado especialmente en las áreas de inmunología y parasitología, en referencia al parecido estructural entre proteínas, o entre proteínas y ácidos nucleicos (Nissen et al, 2000; Oldstone, 2005; Tsonis & Dwivedi, 2008). Referido al RNA, el mimetismo está relacionado con la estructura terciaria que adopta la molécula en el espacio, pues es la conformación tridimensional del RNA la que determina muchas de sus funciones biológicas. En particular, se aplica el concepto de mimetismo a aquellos elementos de RNA cuya estructura ha evolucionado para interactuar con una proteína o un complejo macromolecular que normalmente se une a un RNA distinto. Empleando el mismo lugar de unión, el RNA mimético involucra a la proteína o complejo en un proceso biológico diferente al usual (Springer et al, 1998).

Uno de los ejemplos mejor descritos de mimetismo para el RNA es el relacionado con el tRNA (Giege et al, 1998). Las estructuras de RNA semejantes al tRNA se denominan estructuras tipo tRNA. Tradicionalmente se han definido como aquellas estructuras con capacidad para reaccionar de forma específica con una o varias de las enzimas específicas del metabolismo del tRNA (Giege et al, 1998; Mans et al, 1991). Es precisamente haciendo uso de esta propiedad como se han identificado y caracterizado históricamente los elementos tipo tRNA: mediante aminoacilación por aminoacil tRNA sintetasas, incorporación de la secuencia CCA en 3' por nucleotidil transferasas, procesamiento con RNasa P, RNasa Z, etc... (Joshi et al, 1982; Joshi et al, 1978; Komine et al, 1994; Litvak et al, 1973; Wilusz et al, 2008). Establecido según este criterio, se describió hace más de 40 años el parecido estructural entre el tRNA celular y la región 3' de los virus de plantas (Felden et al, 1994; Felden et al, 1996; Litvak et al, 1973; Rietveld et al, 1982; Yot et al, 1970). El mimetismo para el tRNA se asociado normalmente con la presencia de pseudonudos (Brierley et al, 2007; Giege, 1996; Mans et al, 1991). Los pseudonudos son elementos de estructura formados por el apareamiento de bases en regiones de simple cadena emplazadas en un lazo o protuberancia del RNA, con un tramo de nucleótidos complementarios en cualquier otro lugar de la cadena (Pleij & Bosch, 1989).

En este sentido, la RNasa P ha contribuido en la detección y caracterización *in vitro* de estructuras tipo tRNA en el extremo 3' del genoma de RNA del virus del mosaico amarillo del nabo (TYMV) (Guerrier-Takada et al, 1988; Prochiantz & Haenni, 1973), en el tmRNA bacteriano (Komine et al, 1994), y en las regiones 5' UTR del genoma de RNA para los virus de la hepatitis C (HCV) (Nadal et al, 2002), peste porcina clásica (CSFV), diarrea viral bovina (BVDV), el virus de la parálisis del grillo (CrPV) (Lyons & Robertson, 2003), y el virus de la fiebre aftosa (FMDV) (Serrano et al, 2007). Muchos de estos lugares de reconocimiento han sido visualizados posteriormente mediante técnicas biofísicas de mayor resolución, que han confirmado la semejanza estructural y/o funcional con el tRNA (Bessho et al, 2007; Boehringer et al, 2005; Costantino et al, 2008; Hammond et al, 2009). Es importante destacar, que para que exista una relación mimética no es necesario llegar a un nivel de parecido estructural a escala atómica, *e.g.* el extremo 3' del genoma del virus del mosaico del bromo (BMV) es capaz de

aminoacilarse *in vivo* (Loesch-Fries & Hall, 1982), aunque no muestra la estructura en “L” típica del tRNA (Felden et al, 1994; Felden et al, 1996; Hammond et al, 2009; Rietveld et al, 1983). Únicamente es necesario confundir al componente proteico adecuado en base a sus características concretas de reconocimiento.

El papel biológico de las estructuras tipo tRNA no se ha esclarecido totalmente. A pesar de ello, y debido al distinguido papel del tRNA en la síntesis proteica (proceso durante el cual interacciona con múltiples moléculas), suele asociarse con la regulación de la traducción. Los resultados experimentales indican una función variable, dependiente del RNA portador y su localización dentro de la molécula. En el extremo 3' del genoma de los virus de plantas, las estructuras tipo tRNA se relacionan con la infectividad del virus, la regulación de los procesos de replicación-traducción, la encapsidación, e incluso con un mecanismo análogo a la acción de la telomerasa por adición de la secuencia CCA en el extremo 3' (Dreher, 2009). En el caso de los extremos 5' UTR de los virus de RNA, la mimesis parece subyacer en la estrategia estructural adoptada por los virus para interactuar con los ribosomas y traducir sus propias proteínas mediante un mecanismo dependiente de IRES (Costantino et al, 2008; Jan et al, 2003; Lyons & Robertson, 2003). Es obvia la relación funcional para el caso del tmRNA, molécula quimérica natural entre el mRNA y el tRNA, responsable del reciclaje de los ribosomas que quedan atrapados durante la traducción de mRNAs defectuosos en las bacterias (Moore & Sauer, 2007).

INTERFERONES

Historia

El interferón se descubrió a finales de los años cincuenta del pasado siglo cuando se estudiaba la replicación del virus de la influenza en membranas corioalantoideas de huevos embrionados de pollo. Se observó que las células de pollo en contacto con el virus inactivado sintetizaban y secretaban al medio de cultivo una sustancia, que en contacto con otras células era capaz de interferir con la replicación viral (Isaacs & Lindenmann, 1957; Isaacs et al, 1957). Esta molécula se denominó interferón (IFN) y pronto se comprobó que era producida en cantidades extraordinariamente pequeñas, a pesar de su alta actividad biológica. Este fue durante mucho tiempo el principal inconveniente a la hora de su caracterización molecular en los laboratorios. Posteriormente se evidenció que poseía un efecto antiviral de amplio espectro; a comienzos de los años setenta se describió su capacidad antiproliferativa y por tanto su posible acción anticancerígena. La posibilidad de disponer de una molécula con estas características y sintetizada por las propias células del organismo, abrió numerosas expectativas entre la comunidad científica que depositó sus esperanzas en la nueva panacea tras la revolución médica que supuso el descubrimiento de los antibióticos. Empleando como fuente de obtención linfocitos de donantes de sangre o líneas celulares en cultivo estimuladas, se determinó su naturaleza proteica. Pero las investigaciones cambiaron cualitativamente a comienzos de los años ochenta cuando con las técnicas de ingeniería genética, las primeras compañías biotecnológicas se lanzaron a la producción de la proteína recombinante humana (Billiau, 2006).

El sistema del interferón: naturaleza y tipos

Los interferones son un grupo inducible de citoquinas secretadas por determinados tipos celulares. Constituyen parte integral del sistema inmunológico innato de los vertebrados contra infecciones virales y parasitarias, pero también afectan a la proliferación y diferenciación celular

y son capaces de modular el sistema inmunitario. En respuesta al agente inductor adecuado, las células sintetizan una mezcla compleja de IFNs y a veces otras citoquinas. El interferón sintetizado es liberado al medio extracelular, actuando en otras células tras la unión a su receptor específico. Dicha unión activa la ruta de transducción de señales JAK-STAT, que en última instancia dispara la transcripción de una pléthora de genes conocidos de forma abreviada como ISG (acrónimo de *interferon stimulated genes*), cuyos productos proteicos ejercerán los efectos biológicos. Entre los ISGs mejor caracterizados se incluyen la proteína quinasa R (PKR), la 2'-5' oligoadenilato sintetasa (2'5'OAS) y la proteína Mx. Por tanto se considera que el interferón no es un agente antiviral *per se*, sino más bien una proteína que actúa como “señal de alerta” pues su actividad depende de la expresión de un conjunto de genes quiescentes, responsables en último término del establecimiento del estado antiviral; evitando la replicación de los virus y restringiendo su dispersión entre las células vecinas (Carrasco & Feduchi, 2006).

Los interferones están presentes en todos los vertebrados analizados, siendo específicos de especie. Se pueden detectar bajos niveles de mRNA IFN en los tejidos humanos en ausencia de agente inductor específico (≤ 0.03 copias/célula para el IFN- $\alpha 1$ e IFN- $\alpha 2$), por lo que aunque a niveles mínimos, el interferón es expresado constitutivamente *in vivo* (Taniguchi & Takaoka, 2001; Tovey et al, 1987). Se agrupan en 3 clases mayoritarias, conocidas como interferones de tipo I, II y III, conforme su secuencia aminoacídica, localización cromosómica y especificidad de receptores (Pestka et al, 2004). La unión de los interferones, inclusive del mismo tipo, *e.g.* IFN- α e IFN- β , a sus receptores, provoca una serie de fenómenos de señalización intracelular parecidos aunque no idénticos (Jaks et al, 2007). Cada tipo de interferón es importante para la defensa antiviral, por tanto ninguno de ellos es funcionalmente redundante (Muller et al, 1994). De hecho los virus han desarrollado potentes estrategias de evasión contra interferones específicos; las consecuencias de esta interacción a múltiples niveles difieren ampliamente (Finlay & McFadden, 2006; Randall & Goodbourn, 2008).

La expresión de los interferones de tipo I es inducida por virus y por RNA de doble cadena. Sus representantes más conocidos son el interferón α , producido mayoritaria, aunque no exclusivamente, por leucocitos y células dendríticas plasmacitoidales, y el interferón β , o fibroblástico, expresado por una gran variedad de tipos celulares. Los IFN- α y β presentan un 40% de similitud de secuencia, sin embargo se estima que poseen una estructura conservada pues emplean el mismo receptor celular para desencadenar su respuesta. Son proteínas de pequeño tamaño molecular; con unos 186-190 aminoácidos aproximadamente, incluyendo un péptido señal de entre 21-23 aminoácidos de longitud (Bluyssen, 1998). El IFN- α no está glicosilado, sin embargo el IFN- β suele estar N-glicosilado. Ninguno de los genes del IFN tipo I contiene intrones y todos se sitúan en el brazo corto del cromosoma 9. Excluyendo los pseudogenes, existen 13 genes de IFN- α humano, mientras que sólo hay un gen para el IFN- β . La expresión de los distintos genes de IFN- α origina diferentes subtipos de interferón: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, etc., que comparten más de un 80% de identidad de secuencia. El porqué esta familia multigénica se encuentra tan conservada a lo largo de la evolución de los vertebrados sigue siendo un misterio (Billiau, 2006). Se piensa que la razón de que existan tantos subtipos de IFN- α es que cada uno desempeña funciones específicas en aquel tejido donde es expresado, incluso en ausencia de agente inductor (Finter, 1991; Foster & Finter, 1998).

El IFN- γ es el único representante dentro de los interferones de tipo II, mostrando una escasa homología con la familia tipo I. Es inducido por estimulación antigénica o mitogénica de linfocitos T o células naturales asesinas. La proteína madura cuenta con 146 aminoácidos, y está

codificado por un gen que posee 3 intrones, ubicado en el brazo largo del cromosoma 12 humano. El IFN- γ está glicosilado y actúa uniéndose a un receptor diferente al empleado por los IFNs tipo I.

En el año 2003 dos trabajos independientes describieron 2 nuevas citoquinas humanas con acción antiviral denominadas IFN- λ 1 e IFN- λ 2 por un grupo, e interleuquinas 28 y 29 por otro (Kotenko et al, 2003; Sheppard et al, 2003). Estos interferones son genética y estructuralmente diferentes de la clase I y II, son sintetizados por células de origen epitelial y actúan a través de la interacción con un receptor diferente. Por todo ello se clasificaron dentro de una nueva clase; los IFN tipo III. No obstante inducen la expresión de un grupo de genes similares al tipo I, por lo que inducen un estado antiviral semejante (Ank et al, 2006). Esta es la razón por la que son referidos en algunos textos como “parecidos a tipo I”. Muy probablemente cuentan con roles concretos en la determinación del tropismo viral a nivel celular y tisular (Sommerey et al, 2008).

Estructura del mRNA de los interferones.

Una de las consecuencias del apresurado trabajo científico desarrollado durante los años ochenta, dirigido a la producción y comercialización del interferón como fármaco, y por tanto centrado casi exclusivamente en estudios bioquímicos, inmunológicos y terapéuticos a nivel proteico, ha sido el escaso número de estudios detallados sobre la regulación post-transcripcional y la estructura de los mRNAs correspondientes. Lo poco que se conoce se refiere al IFN- β y al IFN- γ , en concreto a aspectos relacionados con la inestabilidad del mRNA. Al igual que otras citoquinas de corta vida media, los mRNAs codificantes para el interferón cuentan con elementos de secuencia ricos en AU (ARES) en su extremo 3' (Caput et al, 1986). En células de mamífero los elementos ARES determinan de forma usual la estabilidad del mRNA (Chen & Shyu, 1995). Se sabe que el 3' UTR para el caso concreto del IFN- β humano y murino es responsable de la inhibición a nivel traduccional de la expresión del mensajero (Kruys et al, 1987; van Heuvel et al, 1986). Los estudios apuntan a la interacción de elementos ARE con la cola de poli(A) en el 3'UTR como responsables de este efecto (Grafi et al, 1993). Sin embargo también se ha identificado una región en el 5'UTR implicada en la desestabilización del mRNA (Whittemore & Maniatis, 1990), y una secuencia adicional en la región codificante vinculada con la degradación del mRNA por desadenilación (Paste et al, 2003). El IFN- γ no es una excepción y cuenta con motivos ARE en la región 3'UTR muy conservados evolutivamente, vinculados del mismo modo con la inestabilidad de su mRNA (Khabar & Young, 2007). Sin embargo en lo referente a la estructura del mRNA del IFN- γ en su extremo 5'UTR, la literatura es más prolija. Aunque el 5' UTR no muestra conservación evolutiva a nivel de secuencia, si se encuentra conservado a nivel de estructura secundaria. El grupo del Dr. R. Kaempfer ha demostrado que el mRNA del IFN- γ regula su propia traducción a través de la activación local de la PKR. Para ello emplea un pseudonudo filogenéticamente conservado en el 5'UTR (Ben-Asouli et al, 2002). El plegamiento dinámico del mRNA en sus 203 primeros nucleótidos, lo que incluye el pseudonudo y parte de la región codificante, permite la adopción de dos conformaciones alternativas. Este cambio estructural es necesario para que el mRNA actúe como molde para traducción, o alternativamente como activador de la PKR, evitando su sobre-expresión (Cohen-Chalamish et al, 2009).



OBJETIVOS



OBJETIVOS

Trabajos previos en nuestro laboratorio establecen la presencia de estructuras semejantes al tRNA y dsRNA en el RNA correspondiente a la región 1-570 del genoma de HCV. Esta región es la más conservada del genoma viral y comprende la región 5' no traducida y el primer tercio de la región codificante para la proteína del *Core*. Contamos con la observación de que el miR-122 (microRNA específico hepático) cuenta con dos dianas dentro de la región del genoma de HCV sometida a estudio (Jopling et al, 2005). Teniendo en cuenta estos antecedentes los objetivos concretos de este trabajo fueron los siguientes:

1. Examinar si la presencia del miR-122 produce una modificación en el patrón estructural descrito para los motivos de dsRNA en el RNA 1-570 de HCV.
2. Averiguar si algunos RNAs mensajeros hepáticos presentan, en común con el RNA 1-570 de HCV, motivos estructurales capaces de ser reconocidos por la RNasa P, a los cuales denominaremos motivos miméticos al tRNA.
3. Investigar si el mRNA del interferón alfa subtipo 5 identificado en el apartado de objetivos n° 2 interacciona con el miR-122, y si en consecuencia se producen cambios en los motivos de estructura tipo tRNA y dsRNA caracterizados *in vitro*.



MATERIALES Y MÉTODOS



MATERIALES**Tampones y soluciones generales.**

Tampón TSE-10X:

Tris-HCl pH 7.5 0.5 M

NaCl 1 M

EDTA pH 7.5 10 mM

Tampón de elución T1-10X:

Tris-HCl pH 7.5 100 mM

EDTA pH 7.5 10 mM

Solución de acetato de sodio glicógeno:

AcNa pH 5.2 3 M

Glicógeno 0.2 µg/µl

Solución de silicona al 4%

Dimetil-diclorosilano 4% (vol/vol)

Cloroformo 99%

Tampones de electroforesis.

Tampón de electroforesis Tris-Borato (TBE-10X):

Paquetes de Ambion disueltos en 1 litro de agua. Composición 1X:

Tris-Borato 89 mM

Na₂EDTA 2 mM

Tampón de electroforesis Tris-Acetato (TAE-25X):

Paquetes Ambion disueltos en 1 litro de agua. Composición 1X:

Tris-Acetato 40 mM

Na₂EDTA 1 mM

Tampón nativo 10X:

Tris-Acetato 500 mM

Ac₂Mg..... 100 mM

TMN 5X

Tris-Acetato pH 7.6..... 100 mM

Ac₂Mg..... 50 mM

NaCl..... 500 mM

Tampones de carga en gel.

Tampón desnaturizante para carga en geles de poliacrilamida 1.5X:

Formamida desionizada..... 97.5% (v/v)

EDTA pH 7.5..... 10 mM

Azul de bromofenol..... 0.03% (p/v)

Xilencianol 0.03% (p/v)

Tampón no desnaturizante para carga en geles de poliacrilamida nativos 1.5X:

Glicerol..... 30% (v/v)

TMN 5X 20% (v/v)

tRNA levadura..... 4% (p/v)

Azul de bromofenol..... 0.03% (p/v)

Xilencianol 0.03% (p/v)

Tampón no desnaturizante para carga en geles de agarosa 6X:

Sacarosa..... 20% (p/v)

EDTA 10 mM

Tris-HCl pH 8..... 50 mM

Azul de bromofenol..... 0.03% (p/v)

Xilencianol 0.03% (p/v)

Tampones y soluciones para la purificación de la actividad RNasa P humana.

Tampón Fosfato Salino:

1 tableta de PBS (Sigma) por cada 200 ml de agua bidestilada.

Composición:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 7.4 . 10 mM

KCl 2.7 mM

NaCl 137 mM

Tampón Purificación P humana NH_4Cl 10X:

Tris-HCl pH 7..... 100 mM

MgCl_2 150 mM

NH_4Cl 500 mM

Tampón TKM:

Tris-HCl pH 7..... 10 mM

KCl 10 mM

MgCl_2 0.15 mM

Glicerol..... 10 %

Tampón Purificación P humana NH_4Cl 50 mM:

Tris-HCl pH 7..... 20 mM

MgCl_2 15 mM

NH_4Cl 50 mM

Glicerol..... 10 %

Tampón para gradiente NH_4Cl 100 mM:

Tris-HCl pH 7..... 20 mM

MgCl_2 15 mM

NH_4Cl 100 mM

Glicerol..... 10 %

Tampón para gradiente NH_4Cl 350mM:

Tris-HCl pH 7..... 20 mM

MgCl_2 15 mM

NH₄Cl..... 350 mM

Glicerol 10 %

Tampón para gradiente de glicerol 15%:

Tris-HCl pH 8 50 mM

MgCl₂..... 10 mM

KCl..... 100 mM

Glicerol 15%

Tampón para gradiente de glicerol 25%:

Tris-HCl pH 8 50 mM

MgCl₂..... 10 mM

KCl..... 100 mM

Glicerol 25%

Tampones y soluciones de reacción.

Tampón P humana 5X:

HEPES-KOH pH 7.5..... 50 mM

Ac₂Mg 50 mM

AcNH₄..... 500 mM

Tampón RZ Cianobacteria 5X:

Tris-HCl pH 7.5 250 mM

MgCl₂..... 500 mM

Tampón para degradación con RNasa T1 en condiciones desnaturalizantes 2X:

Citrato sódico pH 4.5 20 mM

EDTA..... 1 mM

Urea..... 7 M

Azul de bromofenol 0.03% (p/v)

Xilencianol..... 0.03% (p/v)

Solución para hidrólisis alcalina de RNA 10X:

Carbonato sódico 100 mM

Bicarbonato sódico 100 mM

pH 9.5

Material de vidrio libre de RNasas.

Todo el material de vidrio utilizado durante el desarrollo del trabajo experimental fue horneado a 200°C durante 6 horas. Se reservó un especial tratamiento a los tubos de reacción (2ml) y a las pipetas Pasteur (ambos productos de vidrio), que fueron siliconizados empleando una solución de silicona (BioChemica-AppliChem) en cloroformo al 4%, lavados varias veces con agua destilada y horneados a 200°C durante 6 horas.

Agua.

Para la fabricación de los tampones y soluciones en contacto con el RNA se empleó agua estéril para inyectables adquirido por vía comercial a través de la compañía Braun Medical.

Suspensión de celulosa fosfato CF-11.

La resina CF-11 es un tipo de celulosa de fibra corta derivada del algodón empleada en la purificación de RNA (eliminación de rNTPs no incorporados, sales y DNA). Al mismo tiempo posee la capacidad de separar RNA de simple y doble cadena en función de las condiciones de elución.

Tratamiento de la resina CF-11:

1. Se pesaron 130 gr de resina CF-11 (Whatman). Fue lavada durante 30 min en agitación empleando un litro de solución 0.1 M NaOH. Se dejó reposar 30 minutos. Transcurrido este tiempo se retiró el sobrenadante.
2. Se realizaron 10 lavados consecutivos empleando un 1 litro de agua bidestilada. Cada lavado constó de 30 minutos de agitación, y 30 minutos de reposo, tiempo tras el cual se retiró el sobrenadante. En los últimos lavados el sobrenadante debe ser transparente.
3. La suspensión fue conservada en 1 litro de EDTA 2 mM pH 8 a 4°C hasta su utilización.

Medios de cultivo para E.coli.

Medio líquido LB (Luria-Bertani):

NaCl 10 gr/l

Triptona 10 gr/l

Extracto de levadura..... 5 gr/l

Medio sólido LA (LB-Agar):

Agar bacteriológico..... 15 gr/l de LB

Placas LA-Amp-IPTG-Xgal

Ampicilina..... 100 µg/ml

IPTG..... 150 µg/ml

Xgal..... 40 µg/ml

Cepas bacterianas

Todas las construcciones plasmídicas empleadas en este trabajo fueron introducidas por electroporación en la cepa bacteriana *Escherichia coli* DH5 α , con genotipo: ϕ 80dlacZ Δ M15, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17* (r_k^- , m_k^+), *supE44*, *relA1*, *deoR*, Δ (*lacZYA-argF*) U169, *phoA*.

Patrones de peso molecular para electroforesis.

1. ***RNA CenturyTM Marker-Plus*** (*Ambion*): patrón de peso molecular para RNA preparado según indicaciones del fabricante. Su transcripción en presencia de GTP[α -³²P] origina siete transcritos marcados radiactivamente de 100, 200, 300, 400, 500, 750 y 1000 nucleótidos de longitud.
2. ***DecadeTM Marker System*** (*Ambion*): patrón de peso molecular para RNA preparado según indicaciones del fabricante. El tratamiento con T4 polinucleótido quinasa (PNK) en presencia de ATP[γ -³²P] da lugar a fragmentos de RNA marcados radiactivamente de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 y 150 nucleótidos de longitud.
3. ***2-Log DNA Ladder*** (*NEB*): patrón de peso molecular para electroforesis en gel de agarosa que incluye fragmentos de DNA comprendidos entre 100-10000 pares de bases.

Isótopos radiactivos.

Los isótopos radiactivos empleados para el marcaje de los RNAs fueron suministrados por la compañía Perkin Elmer.

1. **GTP[α -³²P]**: con una actividad específica de 3000Ci/mmol, 250µCi a una concentración de 10mCi/ml.
2. **pCp[5'-³²P]**: con una actividad específica de 3000Ci/mmol, 250µCi a una concentración de 10mCi/ml.
3. **GTP[γ -³²P]**: con una actividad específica de 6000Ci/mmol, 250µCi a una concentración de 10mCi/ml.

4. **ATP[γ - 32 P]**: con una actividad específica de 6000Ci/mmol, 250 μ Ci a una concentración de 10mCi/ml.

Tinta radiactiva.

La tinta radiactiva se preparó mezclando pequeñas cantidades de 32 P con tinta china (Parker). Se elaboró en dos grados: muy caliente (>2000 CPS), y templada (~500 CPS) según mediciones en contador Geiger-Müller. Para su aplicación sobre pegatinas de papel se empleó una plumilla.

Oligonucleótidos empleados.

Los oligodesoxirribonucleótidos sintéticos (ODNs) utilizados en este trabajo fueron sintetizados por regla general en el servicio de síntesis de oligonucleótidos del Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra" de Granada. La síntesis se llevó a cabo en el sintetizador *3400 DNA Synthesizer (Applied Biosystems)*, siendo purificados posteriormente por HPLC.

Nombre ODN	Secuencia 5' → 3'
H1 213-226 (+)	CCC GGC GGA TGC CT
H1 274-255 (-)	TTG AAC TCA CTT CGC TGG CC
Sonda Taqman H1-228	FAM-TGA GTC TGT TCC AAG CTC CGG CAA AG-TAMRA
T7 HCV 1-22 (+)	CGC GGA TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GCC GCC CCG ATT GGG GGC GA
HCV 466-447 (-)	GGG CCC CTG CGC GGC AAC AG
HCV 41-22 (-)	AGT GAT CTA TGG TGG AGT GT
HCV 350-331 (-)	CGT GCT CAT GGT GCA CGG TC
HCV 358-339 (-)	TTA GGA TTC GTG CTC ATG GT
HCV 370-351 (-)	TTT CTT TGA GGT TTA GGA TT
HCV 390-371 (-)	GGT TTG TGT TAC GTT TGG TT
HCV 425-406 (-)	ACC GCC GCC CGG GAA CTT GA
HCV 444-425 (-)	AAA CTC CAC CAA CGA TCT GA
HCV 464-445 (-)	GCC CCT GCG CGG CAA CAG GT
HCV 492-473 (-)	TCC TGA TCG CGC GCA CAC CC
HCV 512-492 (-)	TGC GAC CGC TCG GAA GTC TT

HCV 396-415 (+)	CCA CAG GAC GTC AAG TTG GC
HCV 207-188 (-)	GTT GAT CCA AGA AAG GAC CC
dT-Pst	CTG CAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT
dA-Pst	CTG CAG AAA AAA AAA AAA AAA AAA
H2A 7-26 (+)	GTA AAG AGT TTG TAG AGG CA
H2A 658-639 (-)	TCA CCA ACT TTA TTG GCT CC
H2A Eco 1-22 (+)	CAT GAA TTC GCG GCC GTA AAG AGT TTG TAG A
H2A Hind 658-638 (-)	AGT AAG CTT TCA CCA ACT TTA TTG GCT CC
S9 1-20 (+)	CTC TTT CTC AGT GAC CGG GT
S9 714-693 (-)	TTT GTA AAG CGC TGA TCC TGT T
S9 Eco 1-15 (+)	CAT GAA TTC CTC TTT CTC AGT GAC
S9 Hind 714-700 (-)	AGT AAG CTT TTT GTA AAG CGC TGA
IFNA5 Eco 1-15 (+)	CAT GAA TTC GCC CAA GGT TCA GGG
IFNA5 Hind 700-686 (-)	AGT AAG CTT TGA AAC GGC AGA ACT
IFNA5 57-78 (+)	ATG GCC TTG CCC TTT GTT TTA
IFNA5 627-608 (-)	TCA TTC CTT CCT CCT TAA TC
IFNA5 Eco 57-72 (+)	CAT GAA TTC ATG GCC TTG CCC TTT
IFNA5 Hind 627-513 (-)	AGT AAG CTT TCA TTC CTT CCT CCT
IFNA5 Eco 560-572 (+)	CAT GAA TTC GAG CAG AAA TCA
IFNA5 Eco 577-591 (+)	CAT GAA TTC TCC TTC TCT TTA TC
IFNA5 Eco 600-613 (+)	CAT GAA TTC GCA AGA AAG ATT A
IFNA5 487-467 (-)	TCA CAG TCA GGA TAG AGT CC
IFNA5 376-358 (-)	TGT CTA GAA GTG TCT CAT C
IFNA5 641-620 (-)	TGT TGA ACC AGT TTT CAT TCC
IFNA5 578-556 (-)	GAT CTC ATG ATT TCT GCT CTG A
IFNA5 376-358 (-)	GTG CAT GGG AGG TTG TCA GA

IFNA5 594-573 (-)	TGC TGA TAA AGA GAA GGA TCT C
IFNA5 651-671 (+)	TTC TCA TTG ACT AGT ACA CCA
IFNA5 530-511 (-)	TTC TTC TCT GTC AGA TAG AG
IFNA5 599-619 (+)	TGC AAG AAA GAT TAA GGA GGA
IFNA5 471-490 (+)	CTC TAT CCT GAC TGT GAG AA
IFNA5 678-657 (-)	TGT GAA ATG GTG TAC TAG TCA A
IFNA5 551-571 (+)	AGG TTG TCA GAG CAG AAA TCA
IFNA5 699-679 (-)	GAA ACG GCA GAA CTC AAG AAG
IFNA5 631-651 (+)	CTG GTT CAA CAT CGA AAT GAT
IFNA5 656-637 (-)	TGA GAA TCA TTT CGA TGT TG
miR-122	TGG AGT GTG ACA ATG GTG TTT GT
IFNA5 Eco-T7 197-215 (+)	CAT GAA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGT CTC TCC TTT CTC CTG CCT
IFNA5 Hind 446-427 (-)	AGT AAG CTT TCC ACT CCA ACC TCC TGC AT
IFNA5 Eco-T7 215-233 (+)	CAT GAA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGT GAA GGA CAG ACA TGA CTT
IFNA5 Hind 427-407 (-)	AGT AAG CTT TCA TAC AGG CTT CCA GGT CAT
IFNA5 Eco-T7 329-347 (+)	CAT GAA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGT CAG CAC AAA GGA CTC ATC
miR-122 Seed seq.	TGG AGT GTG A
T7-miR122 wt	ACA AAC ACC ATT GTC ACA CTC CAC TAT AGT GAG TCG TAT TA
T7-miR122 (Mut 1)	ACA AAC ACC ATT GTC ACA TAC CAC TAT AGT GAG TCG TAT TA
T7-miR122 (Mut 2)	ACA AAC ACC ATT GTC ACA TAT TAC TAT AGT GAG TCG TAT TA
T7-miR122 (Mut 3)	ACA AAC ACC ATT GTC TAT TAT TAC TAT AGT GAG TCG TAT TA

PUC/M13 forward	CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC
PUC/M13 reverse	TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA C
Promotor T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
asT7R1.1	AAG AAG GTC AAT CAT AAA GGC CAC TCT TGC GAA TGA CCT TGA GTT TGT CCC TCT ACC CTA TAG TGA GTC GTA TTA

Los oligorribonucleótidos sintéticos siguientes fueron sintetizados por la compañía IDT (*Integrated DNA Technologies*) y purificados por HPLC.

Nombre	Secuencia 5' → 3'
miR-122	UGG AGU GUG ACA AUG GUG UUU GU
miR-122Δ1	UGG AGU GUG A
miR-122Δ2	AUG GUG UUU G

Construcciones de DNA empleadas para las reacciones de transcripción.

1. ***pN(1-4728) Bluescript***: contiene los 4728 primeros nucleótidos del virus de la hepatitis C (HCV) genotipo 1b tras el promotor de la T7 RNA polimerasa (clon cedido por el Dr. Stanley M. Lemon). Tras digerir con el enzima de restricción Bln I proporciona un molde para la transcripción de un fragmento de RNA correspondiente a los 570 primeros nucleótidos del genoma viral. En caso de ser digerido con el enzima Aat II, el producto de transcripción resultante cuenta con los primeros 402 nucleótidos. Empleando el plásmido como molde y los oligonucleótidos T7 HCV 1-22 (+) y HCV 466-447 (-), se obtiene un producto de PCR que permite la transcripción del fragmento de RNA correspondiente a los 466 primeros nucleótidos del genoma viral.
2. ***pUC19Tyr***: contiene clonado bajo el promotor de la T7 RNA polimerasa el precursor tRNA para la tirosina de *E.coli* (sustrato natural de la RNasa P de *E.coli*). Tras digestión con el enzima de restricción Fok I proporciona un molde para la transcripción de un RNA de 131 nucleótidos de longitud (Altman & Smith, 1971).
3. ***pMC006***: contiene clonado dentro del vector pUC19, bajo el promotor de la T7 RNA polimerasa, el tRNA precursor para la glutamina de *Synechocystis sp.* (sustrato natural de la RNasa P de *Synechocystis sp.*). Tras digestión con el enzima de restricción Fok I proporciona un molde para la transcripción de un RNA de 82 nucleótidos de longitud (Pascual & Vioque, 1996).
4. ***pGEMHBV***: contiene clonado bajo el promotor de la T7 RNA polimerasa un fragmento del DNA (nucleótidos 1400-1800) que corresponde a un gen que codifica para un antígeno de superficie del virus de la hepatitis B subtipo *adr* (Ono et al, 1983). Tras

digestión con el enzima de restricción Fsp I proporciona un molde para la transcripción de un RNA de 400nt.

5. ***pGEM3Z-H2AFJ*** y ***pGEM3Z-RPS9***: los mRNAs seleccionados según el estudio de cribado diferencial en chips de DNA fueron clonados dentro del vector pGEM[®]-3Zf(-) (Promega) entre las dianas de restricción EcoR I y Hind III. Los insertos de DNA correspondientes a *H2AFJ* y *RPS9* fueron obtenidos por PCR a partir de una genoteca de cDNA hepático fetal humano (Clontech), empleando los oligonucleótidos H2A 7-26 (+) y H2A 658-639 (-) en el caso de *H2AFJ*; y S9 1-20 (+) con S9 714-693 (-) en el caso de *RPS9*. Las dianas de restricción EcoR I y Hind III fueron añadidas posteriormente mediante PCR empleando la pareja de oligonucleótidos H2A Eco 1-22 (+) y H2A Hind 658-638 (-) en el caso de *H2AFJ*; y S9 Eco 1-15 (+) junto a S9 Hind 714-700 (-) para el caso de *RPS9*. Ambos vectores se digieren con el enzima de restricción Hind III, proporcionando un molde para la transcripción bajo el control de la T7 RNA polimerasa. Los transcritos generados corresponden a los RNAs *H2AFJ* 1-658nt y *RPS9* 1-714nt respectivamente. Las secuencias nucleotídicas correspondientes a los mRNAs *H2AFJ* y *RPS9* empleadas para el diseño de los oligonucleótidos se encuentran disponibles en la base de datos de *GenBank* bajo los siguientes números de acceso: NM_177925.1 (*H2AFJ*) y NM_001013 (*RPS9*).
6. ***pGEM3Z-IFNA5(1-700)***: el clon de longitud completa para el mRNA del *IFNA5* humano (MHS1010-98052299, código de acceso en *GenBank* BC093757), fue adquirido a través de la compañía *Open Biosystems*. Dicho vector se empleo como molde de PCR para obtener un inserto flanqueado por las dianas de restricción EcoR I y Hind III, utilizando la pareja de oligonucleótidos *IFNA5* Eco 1-15 (+), e *IFNA5* Hind 700-686 (-). El producto resultante fue clonado dentro del vector pGEM[®]-3Zf(-) (Promega) entre las dianas de restricción EcoR I y Hind III. El plásmido obtenido se digiere con el enzima de restricción Hind III, proporcionando un molde para la transcripción bajo el control de la T7 RNA polimerasa que corresponde al RNA *IFNA5(1-700)*, de 700nt de longitud. La secuencia nucleotídica correspondiente al mRNAs *IFNA5* empleada para el diseño de los oligonucleótidos se encuentra disponible en la base de datos de *GenBank* con el siguiente número de acceso: NM_002169.
7. ***pGEM3Z-IFNA5(58-627)***: contiene la secuencia codificante para la proteína del *IFNA5* (comprendida entre los nucleótidos 58-627 de la secuencia completa según la base de datos de *GenBank* n° acceso NM_002169), clonada dentro del vector pGEM[®]-3Zf(-) (Promega) entre las dianas de restricción EcoR I y Hind III. El inserto se obtuvo por PCR empleando como molde el plásmido pGEM3Z-*IFNA5(1-700)* y los oligonucleótidos *IFNA5* Eco 57-72 (+), e *IFNA5* Hind 627-513 (-) que introducen las dianas de restricción EcoR I y Hind III a ambos lados del amplicón. El plásmido obtenido se lineariza con el enzima de restricción Hind III, proporcionando un molde para la transcripción bajo el control de la T7 RNA polimerasa que corresponde al RNA *IFNA5(58-627)*, de 570nt de longitud.
8. ***pGEM3Z-IFNA5(560-700)***, ***pGEM3Z-IFNA5(577-700)***, y ***pGEM3Z-IFNA5(600-700)***: estos tres plásmidos contienen la secuencia de DNA correspondiente a los fragmentos de *IFNA5* (560-700), *IFNA5* (577-700) e *IFNA5* (600-700) respectivamente, clonados dentro del vector pGEM[®]-3Zf(-) (Promega) entre las dianas de restricción EcoR I y Hind

III. Los insertos fueron obtenidos por PCR empleando como molde el plásmido pGEM3Z-IFNA5(1-700), el oligonucleótido IFNA5 Hind 700-686 (-) y según corresponde a cada caso el oligonucleótido IFNA5 Eco 560-572 (+), ó IFNA5 Eco 577-591 (+), ó IFNA5 Eco 600-613 (+). Tras digestión con el enzima de restricción Hind III, y posterior transcripción con T7 RNA polimerasa, se obtienen los RNAs IFNA5(560-700), IFNA5(577-700), ó IFNA5(600-700); de 155, 138, y 115 nucleótidos de longitud respectivamente. Estos RNAs cuentan con los 140, 123, y 100 últimos nucleótidos de la secuencia del mRNA *IFNA5* más 15nt adicionales derivados de la transcripción de las dianas de restricción empleadas para el subclonaje.

9. ***T7-IFNA5(197-446)*, *T7-IFNA5(215-427)*, *T7-IFNA5(329-427)***: estos tres productos de PCR contienen el promotor de la T7-RNA polimerasa seguido se la secuencia de DNA correspondiente a los fragmentos de IFNA5 (197-446), IFNA5 (215-427) e IFNA5 (329-427) respectivamente. La reacción de amplificación se realizó utilizando como molde el plásmido pGEM3Z-IFNA5(1-700) y los siguientes ODNs: IFNA5 Eco-T7 197-215 (+) e IFNA5 Hind 446-427 (-) para el fragmento IFNA5 (197-446); IFNA5 Eco-T7 215-233 (+) e IFNA5 Hind 427-407 (-) para el fragmento IFNA5 (215-427); y IFNA5 Eco-T7 329-347 (+) e IFNA5 Hind 427-407 (-) para el fragmento IFNA5 (329-427). Los transcritos resultantes cuentan con 259, 222, y 108 nucleótidos de longitud respectivamente.
10. ***pT76803***: contiene el gen de la subunidad RNA de la RNasa P perteneciente a la cianobacteria *Synechocystis sp.* PPC 6803 bajo el promotor de la T7 RNA polimerasa clonado dentro del vector pUC19 (Pascual & Vioque, 1996; Vioque, 1992). Tras digestión con el enzima de restricción Dra I proporciona un molde para la transcripción del RNA catalítico RZ6803 que cuenta con 437nt de longitud.

RNAs comerciales.

1. ***RNA poli(A) de hígado humano (Ambion)***: procedente del hígado de un varón de 69 años con serología negativa para HIV I, HIV II, HBV y HCV. A una concentración de 0.5 mg/ml en tampón citrato de sodio 1mM, pH 6.4. Aislado a partir de una muestra de RNA total, tratado con DNasa libre de actividad RNasa, purificado por dos pases a través de columnas basadas en la unión a un oligo-dT. Pureza e integridad verificada por electroforesis capilar (*Agilent 2100 Bioanalyzer*).
2. ***Poli-r(A) sintético (Roche)***: con una longitud promedio de 3000nt y un peso molecular comprendido entre los 100-500KDa.

Extracto con actividad RNasa P humana.

La actividad RNasa P humana fue purificada a partir de 30g de células HeLa según el protocolo descrito por Bartkiewicz *et al.* (Bartkiewicz *et al.*, 1989) modificado por Nadal *et al.* (Nadal *et al.*, 2002). Para más detalle consultar el apartado metodológico ‘Purificación parcial de RNasa P humana’ (página 57).

MÉTODOS

Cultivo de bacterias.

Las cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo se cultivaron en medio líquido y en medio sólido. Los cultivos en medio líquido se realizaron en LB suplementado con el antibiótico adecuado en función de las características de la cepa en cuestión, mayoritariamente ampicilina a una concentración final de 100µg/ml. Los inóculos se incubaron a 37°C en agitación a 200 rpm durante un tiempo aproximado comprendido entre las 12 y 16 horas. Los cultivos en medio sólido se realizaron en placas Petri de LB-agar suplementadas con el antibiótico correspondiente, principalmente ampicilina a una concentración 100µg/ml. Una vez sembradas las bacterias se incubaron durante 12-16 horas en cámara termostaticada a 37°C.

Criopreservación de bacterias.

Tras un crecimiento aproximado de 12-16 horas en medio LB, el cultivo de bacterias fue congelado a -80°C en crioviales de 2 ml con glicerol al 30%.

Preparación de células electrocompetentes.

1. A partir de una colonia de *E. coli* cepa DH5 α , aislada mediante la técnica de agotamiento en placa, se inocularon 25 ml de LB, que crecieron en agitación a 37°C durante 12-16 horas.
2. Se inocularon 20 ml de este cultivo iniciador en 1 litro de LB y se dejó crecer a 37°C en agitación hasta que el cultivo alcanzó un valor de densidad óptica medido a 600 nm de 0.6 unidades (tiempo aproximado de 3 horas). Una vez alcanzado este valor las bacterias fueron colocadas en hielo durante 15-25 min.
3. El cultivo se repartió en botellas de polipropileno para centrifuga de 250 ml de capacidad atemperadas en hielo. Después, fue centrifugado a 4000g durante 10 minutos a 4 °C.
4. Tras descartar el sobrenadante, se resuspendió y lavó el pellet con 250 ml de agua a 4°C. Se centrifugó a 4000g durante 10 minutos a 4°C.
5. Tras descartar el sobrenadante, se realizó un segundo lavado con 250 ml agua a 4°C. Posteriormente se centrifugó a 4000g durante 10 minutos a 4°C.
6. El pellet fue resuspendido y lavado con 250 ml glicerol al 10% a 4°C. Se centrifugó a 4000g durante 10 minutos a 4°C.
7. Finalmente, tras eliminar el sobrenadante, se resuspendió el pellet de bacterias en 1 ml de agua con glicerol al 10% y se hicieron alícuotas de 45µl, que fueron congeladas inmediatamente en un baño de nieve carbónica con etanol. Se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

Transformación de *E. coli* con plásmidos recombinantes.

La incorporación de plásmidos recombinantes en la cepa bacteriana *E. coli* DH5 α se efectuó mediante la técnica de electroporación. Para ello, en primer lugar se realizó una

microdiálisis de 10-20 μ l de la solución plasmídica empleando discos de membrana de 0.025 μ m (VSWP-Millipore) sobre agua destilada durante 30 minutos. De este modo se eliminan las sales de la solución antes de aplicar el pulso de corriente eléctrica.

Electroporación:

1. Fueron añadidos 5 μ l del producto de ligación plasmídico dializado sobre 45 μ l de bacterias electrocompetentes previamente descongeladas en hielo. Se mezcló bien por pipeteo evitando la formación de burbujas.
2. La muestra fue transferida a una cubeta de electroporación *Gene Pulser*[®] *Cuvette* de 0.2cm (Bio-Rad) atemperada en hielo. Inmediatamente, se aplicó un pulso eléctrico sencillo de una duración de 5-6 milisegundos a 2.5KV y 129 ohmios de resistencia en el dispositivo *BTX Electro Cell Manipulator*[®] 600. Las células fueron recuperadas rápidamente lavando la cubeta con 1 ml de medio LB previamente atemperado a 37°C. Se pasó la muestra a un tubo de cultivo.
3. Se incubó en agitación (200 rpm) a 37°C durante una hora. Este tiempo es necesario para que las bacterias expresen el gen de resistencia al antibiótico codificado por el plásmido. Un volumen comprendido entre 10-100 μ l del cultivo bacteriano fue sembrado en césped en placa Petri con medio selectivo (LA-Amp-IPTG-Xgal). Se incubó a 37°C durante unas 16 horas, período de tiempo tras el cual se observó la aparición de colonias blancas y azuladas.

Selección de colonias recombinantes de *E.coli*:

Las bacterias transformadas fueron seleccionadas debido a la resistencia al antibiótico conferida por el plásmido. Las colonias recombinantes se identificaron en función de su coloración, lo cual depende de la expresión diferencial del gen de la β -galactosidasa. La cepa bacteriana DH5 α es defectiva para la síntesis de β -galactosidasa, debido a la delección del gen que codifica para uno de sus péptidos (el péptido α). Los plásmidos que portan este gen restauran la expresión en las células transformadas mediante un fenómeno de complementación genética. Así, en presencia del sustrato cromogénico X-gal y del IPTG como agente inductor del operón lactosa, las células transformadas expresan β -galactosidasa y procesan el X-gal, generando un compuesto insoluble de color azul. El sitio de clonación múltiple en este tipo de plásmidos se sitúa dentro del marco abierto de lectura del gen del péptido α , por lo que en los plásmidos recombinantes que contienen un inserto, la pauta de lectura del gen *lacZ* se encuentra alterada; no se produce alfa complementación, no se expresa β -galactosidasa y, por tanto, las colonias crecen con su habitual color blanco.

Para este tipo de selección, las células transformadas se sembraron en medio LA conteniendo ampicilina 100 μ g/ml, X-gal 40 μ g/ml e IPTG 150 μ g/ml.

Extracción de DNA plasmídico.

Los plásmidos empleados durante el desarrollo del trabajo experimental fueron extraídos de la cepa bacteriana correspondiente mediante minipreparación utilizando el kit *Wizard*[®] *Plus SV Minipreps Purification System* (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Secuenciación de DNA.

La secuenciación de las muestras de DNA fue realizada por el servicio de secuenciación del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” de Granada. Se realizó mediante el procedimiento de secuenciación cíclica utilizando la química *BigDye Terminator v3.1* y electroforesis en sistema de capilar múltiple automático. El equipo utilizado fue el secuenciador *3130XL-Genetic Analyzer* de *Applied Biosystems*.

Análisis en microarrays.

El servicio de *microarrays* del Centro de Regulación Genómica de Barcelona fue el responsable del proceso de amplificación, marcaje de los RNAs digeridos, e hibridación utilizando el kit comercial *Amino Allyl MessageAmpTMII aRNA Amplification* (Ambion), así como del posterior análisis estadístico de los datos. Los chips empleados para el estudio fueron P08-MI-066R0-*Human genome* formato 22K (v2) (Agilent G4110B).

Electroforesis de ácidos nucleicos.

En geles de agarosa.

Los geles de agarosa se prepararon al 0.8-2% (p/v) (Promega) en tampón TAE 1X. Las muestras se cargaron en presencia de tampón de carga no desnaturizante 1X para geles de agarosa. La electroforesis se desarrolló en tampón TAE 1X a un voltaje comprendido entre 80-100 V. Los geles fueron teñidos una vez finalizada la electroforesis con una solución de bromuro de etidio en agua a una concentración de 0.5µg/ml, desteñidos y visualizados en un transiluminador convencional con luz ultravioleta.

En geles de poliacrilamida desnaturizantes:

Para su elaboración se utilizó una solución de poliacrilamida al 40% compuesta por acrilamida:bisacrilamida en una proporción 19:1 (Sigma/National Diagnostics). Los geles se prepararon entre el 4-10% de poliacrilamida (p/v), en TBE 1X ó 0.5X y 7M de urea. El porcentaje de entramado del gel fue determinado en función del tamaño del fragmento sujeto a estudio. Como iniciadores de la reacción de polimerización se emplearon una solución de persulfato de amonio al 0.08% (p/v) (Sigma) y TEMED al 0.08% (v/v) (Sigma). Las muestras se prepararon en tampón de carga desnaturizante 1X. La electroforesis se desarrolló en tampón TBE 1X, ó 0.5X a 25-35mA aproximadamente, durante un tiempo variable en función de la longitud del RNA analizado y la capacidad resolutive del gel.

En geles de poliacrilamida nativos:

Para la elaboración de los geles de acrilamida nativos se empleó la misma solución de acrilamida:bisacrilamida que para las condiciones desnaturizantes, aunque disuelta en tampón nativo 1X. No se añadió urea. El porcentaje de acrilamida empleado estuvo comprendido entre el 4-10% (p/v). Como catalizadores de la reacción de polimerización se utilizaron persulfato de amonio y TEMED, tal y como se describe en el apartado anterior. Tras la reacción de asociación las muestras se prepararon en tampón de carga no desnaturizante 1X, y fueron conservadas en hielo hasta su posterior carga en gel. Antes de cargar las muestras se realizó una pre-electroforesis de 30min con una intensidad de corriente de 8-12mA. La electroforesis se desarrolló en tampón

nativo 1X, a 4°C en cámara termostatzada, manteniendo un amperaje constante comprendido entre 8-12mA. El tiempo de carrera osciló entre 10-15 horas.

Autorradiografía:

El resultado de los experimentos que finalizan con electroforesis el gel de poliacrilamida, para el caso de moléculas marcadas con P³², fue visualizado por autorradiografía. Los geles de acrilamida se expusieron dentro de un casete BioMax (Kodak) con pantalla intensificadora BioMax MS (Kodak) en presencia de una película de doble emulsión Super-RX (FUJIFILM). Los casetes se almacenaron a -80°C el tiempo necesario para la observación de los resultados. Las películas de radiografía fueron reveladas en un revelador Curix 60 (Agfa). Los geles fueron secados sobre papel Whatman a 80°C en condiciones de vacío cuando fue necesaria la cuantificación de los resultados. En estos casos, los geles secos se expusieron en un casete *Storage Phosphor Screen* (GE Healthcare) y se visualizaron usando el escáner *Typhoon 9400* (Amersham Biosciences).

Purificación de ácidos nucleicos.

La extracción fenólica y precipitación con etanol son técnicas ampliamente utilizadas para la eliminación de proteínas presentes en las mezclas de reacción, y para cambio de tampón.

Extracción fenólica.

La muestra se llevó a un volumen final de 50-100µl con agua estéril (Braun Medical). Se agregó un volumen igual de fenol saturado en cloroformo y alcohol isoamílico (Invitrogen), en el caso de tratarse de moléculas de DNA, o fenol saturado en agua (Invitrogen), para el caso de moléculas de RNA. Las dos fases se mezclaron vigorosamente mediante agitación con *vortex* durante 1min, y fueron nuevamente separadas por centrifugación a 12000rpm, durante 4 min a temperatura ambiente. Se rescató la fase acuosa y se pasó a un tubo limpio. Seguidamente se realizó un lavado de la fase orgánica con otros 50-100µl de agua estéril, repitiendo el proceso descrito.

Precipitación con etanol.

La fase acuosa resultante fue precipitada añadiendo en este orden: 10% de acetato sódico 3M pH 5.2 con 0.2µg/µl de glicógeno, y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío (Merck). La mezcla se mantuvo durante 30-60min a -20°C, en algunas ocasiones 1hora a -80°C. Transcurrido este tiempo se centrifugó a 12000rcf durante 1hora. Se retiró el sobrenadante y el precipitado se secó por centrifugación a vacío durante 5min. El sedimento fue resuspendido en un volumen apropiado de agua estéril.

Transcripciones in vitro.

Transcripción estándar.

La reacción estándar de transcripción se llevó a cabo en un volumen final de 25µl. La mezcla de reacción incluye 1-2µg de DNA molde, 1.4U/µl de T7 RNA polimerasa (Promega) en el tampón de reacción suministrado por la casa comercial 1X (40mM Tris-HCl pH 7.9, 6mM MgCl₂, 2mM espermidina, 10mM NaCl), 0.4mM de cada uno de los rNTPs

(Promega), 4mM DTT (Promega), y 20U de RNasin®Plus (Promega). La reacción fue incubada durante un tiempo comprendido entre 1-4 horas a una temperatura de 37°C. Transcurrido este tiempo el DNA molde fue eliminado incubando la reacción de transcripción durante 15 minutos a 37°C en presencia de DNasa RQ1 (Promega). Se empleó 1U de DNasa por cada microgramo de DNA molde utilizado en la reacción de transcripción.

Transcripción a partir de oligonucleótidos de DNA:

En el caso particular de las transcripciones para los RNAs R1.1, miR-122 fenotipo salvaje, y las moléculas de miR-122 mutantes, se emplearon oligonucleótidos de DNA hibridados como molde para la reacción de transcripción. En estos casos las reacciones se realizaron en un volumen final de 50µl. Se partió de 2µg del oligonucleótido molde correspondiente portador del promotor para la T7 RNA polimerasa: asT7R1.1, T7-miR122 *wt*, T7-miR122 (Mut 1), T7-miR122 (Mut 2), T7-miR122 (Mut 3) respectivamente. La cantidad del oligonucleótido promotor T7 complementario se ajustó de modo que ambos oligonucleótidos se encontrasen en cantidades equimoleculares. Cada pareja de oligonucleótidos fue calentada durante 2 minutos a 95°C de forma paralela al tampón de transcripción. Se agregó el tampón caliente sobre la mezcla de oligonucleótidos, y se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo se incorporaron el resto de componentes para una reacción de transcripción estándar.

Transcripción con kit comercial.

En los casos concretos en los que se precisó la síntesis de cantidades elevadas de RNA se hizo uso del kit MEGAscript®T7 (Ambion). La reacción se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante.

Purificación de los productos de transcripción.

Salvo en las ocasiones en las que se empleó el kit comercial MEGAscript®T7 (Ambion), el cuyo caso la purificación se efectuó usando las columnas comerciales MEGAclear (Ambion), el resto de productos de transcripción fue purificado siguiendo el protocolo que se detalla a continuación:

1. *Extracción fenólica:* tras la reacción de digestión con RQ1-DNasa se añadieron 975 µl de TSE 1X y 500 µl de fenol saturado en agua (Invitrogen) en tubos *ependorfs* siliconizados de 2 ml. Se agitó en *vortex* durante 1 min y posteriormente se centrifugó a 11000 rpm a temperatura ambiente durante 4 minutos. Se incorporó 1 volumen de etanol frío (~1ml) a la fase acuosa recogida.
2. *Fraccionamiento en columnas de CF-11:* La purificación a través de columnas de celulosa fosfato CF-11 (Whatman) permite eliminar sales, nucleótidos no incorporados en la reacción y seleccionar para su elución exclusivamente el RNA de simple cadena.
 - 2.1. *Preparación y equilibrado de las columnas:* Fueron introducidas 2 capas de lana de vidrio siliconizada y horneada dentro de una jeringa de vidrio de 1 ml (RUTHE-Normax). Tras fijar la jeringa sobre un soporte, se añadió la resina CF-11 (Whatman), convenientemente preparada, hasta alcanzar un lecho de fase estacionaria de unos 0.2 ml. Se dejó compactar por decantación durante 15 min

evitando que la resina se seque. Transcurrido este tiempo la columna fue equilibrada dejando pasar en este orden: 1ml de TSE 1X, 1ml de agua, y 3ml de TSE-1X:EtOH (vol/vol), previamente desgasificados a vacío durante 20 min.

2.2. *Elución del RNA y precipitación:*

- a) Se pasaron los 2 ml de muestra de uno en uno y se fueron recogiendo fracciones de 1 ml en *ependorfs* normales.
- b) Después de lavó la columna con 3 ml de TSE-1X:EtOH. Los 3 ml fueron recogidos en otros 3 tubos eppendorf normales.
- c) Se eluyó el transcrito con 2 ml de agua en dos tubos *ependorfs* de plástico siliconizado. Cuando se hubieron recogido las 7 fracciones de la columna, para el caso de las moléculas de RNA marcadas radiactivamente con ^{32}P , se chequearon los tubos con un contador Geiger-Müller. Una elución correcta implica el siguiente orden de recuperación del material radiactivo medido en cuentas por segundo (CPS): la obtención de la mayor cantidad de CPS en los dos primeros mililitros de elución (lo que corresponde a nucleótidos radiactivos no incorporados), un descenso acusado durante los lavados, con un mínimo de CPS en el quinto mililitro de elución. Finalmente el número de CPS debe ascender de forma acusada en el sexto y séptimo tubo, lo cual corresponde a la molécula de RNA marcada eluída en agua.
- d) Los dos últimos mililitros (sexto y séptimo tubo), que corresponden al RNA eluído en agua fueron transferidos a un tubo COREX siliconizado (3%) donde se precipitó el RNA añadiendo un 10% de su volumen de acetato sódico 3 M pH 5.2 con glicógeno a 0.2 $\mu\text{gr}/\mu\text{l}$, y 2.5 volúmenes de etanol frío. Tras mezclar y dejar 1 noche a -20°C ó 1 hora a -80°C se centrifugó a 4°C durante 90 min a una velocidad de 10000 rcf. Se eliminó el sobrenadante y secó el precipitado de RNA en un frasco secador conectado a vacío durante 5-10 minutos. El precipitado fue resuspendido en 10 μl de agua y 20 μl de tampón desnaturante de carga en geles de acrilamida, mediante agitación en *vortex* durante 10 minutos.

3. Purificación en gel de poliacrilamida desnaturante:

La muestra de transcripción resuspendida en agua y tampón de carga desnaturante se cargó en un gel acrilamida 7 M urea de 0.4 mm de grosor. La mayoría de fragmentos de RNA purificados fueron marcados radiactivamente, sin embargo para aquellos casos en los cuales se purificó RNA frío, se empleó como guía el mismo fragmento de RNA marcado radiactivamente. Las bandas se visualizaron por autorradiografía y se excindieron del gel siguiendo el protocolo detallado a continuación:

- a. Una vez terminada la electroforesis se desmontó el gel retirando una sola placa de vidrio. La superficie del gel fue cubierta con film transparente fijando los bordes con cinta adhesiva. Se hicieron unas etiquetas con tinta radiactiva que fueron repartidas por los márgenes del gel, junto con las flechas que indicaban el fondo de los pocillos y la migración de los colorantes.

- b. El gel fue expuesto con 2 películas de doble emulsión Super RX (FUJIFILM) superpuestas dentro de un casete durante el tiempo necesario para su observación (5-10 minutos). Se revelaron las películas de autorradiografía.
- c. En una de las dos películas se enmarcaron con rotulador las bandas de interés. Se recortó el trozo de película para dejar una ventana. La película se solapó con el gel original haciendo uso de las etiquetas radiactivas. Las bandas de acrilamida fueron recortadas usando un bisturí estéril; después se sumergieron en 2 ml de tampón T1-1X en un tubo COREX (para depositarlas dentro del líquido se emplearon espátulas horneadas). Los tubos se dejaron en agitación toda una noche a temperatura ambiente.
- d. Se sacaron los 2 ml de tampón T1-1X, que contenían el RNA eluído de las bandas de acrilamida, utilizando una pipeta Pasteur de vidrio estirada y siliconizada. Se precipitó en tubo COREX añadiendo un 10% de su volumen de AcNa 3M pH 5 con glicógeno a 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, y 2.5 volúmenes de EtOH frío. Se dejó durante 1 noche a -20°C ó 1 hora a -80°C . Después de centrifugar a 4°C durante 90 min a una velocidad de 10000 rcf, se eliminó el sobrenadante y secó el precipitado de RNA en un frasco secador conectado a vacío durante 5-10 minutos. El precipitado fue resuspendido en 20 μl de agua; el RNA fue conservado a -20°C hasta su posterior utilización.

Marcaje radiactivo del RNA.

Marcaje interno.

El marcaje a lo largo de la cadena de RNA se realizó mediante la incorporación de 40 μCi (4 μl) del isótopo radiactivo GTP[α - ^{32}P], a la mezcla de reacción para la transcripción estándar. El producto de transcripción se purifica según se detalla en el apartado anterior.

Transcripción preparativa marcada internamente con baja actividad específica.

En algunas ocasiones fue necesaria la síntesis a mayor escala de transcritos marcados internamente con una baja actividad específica. En estos casos la reacción se escaló 40 veces con respecto a la transcripción estándar, excepto en lo que se refiere a la cantidad de isótopo radiactivo añadido en la reacción. Es decir, la transcripción se realizó en un volumen final de 1ml, compuesto por 40 μg de DNA molde, 1.4U/ μl de T7 RNA polimerasa (Promega) en el tampón de reacción suministrado por la casa comercial 1X (40mM Tris-HCl pH 7.9, 6mM MgCl₂, 2mM espermidina, 10mM NaCl), 0.4mM de cada uno de los rNTPs (Promega), 4mM DTT (Promega), 0.8U/ μl de RNasin[®]Plus (Promega), y 100 μCi (10 μl) de GTP[α - ^{32}P]. La reacción fue incubada durante un tiempo comprendido entre 1-4 horas a una temperatura de 37°C . Transcurrido este tiempo el DNA molde fue eliminado incubando la reacción de transcripción durante 15 minutos a 37°C en presencia de DNasa RQ1 (Promega). Se empleó 1U de DNasa por cada microgramo de DNA molde utilizado en la reacción de transcripción.

La purificación se realizó escalando el protocolo detallado previamente; se emplearon jeringas de plástico estériles de 5ml, el número de fracciones recogidas durante la elución en columnas de CF-11 fue mayor, etc.

Marcaje en el extremo 5'.

a. *Marcaje en 5' de RNAs largos durante la transcripción.*

El marcaje de RNAs largos en su extremo 5' se realizó mediante la incorporación de 90 μ Ci (9 μ l) del isótopo radiactivo GTP[γ -³²P] a la mezcla de reacción de transcripción estándar, acompañado de una disminución en la concentración de rGTP (0.1mM) dentro de la mezcla de rNTPs. El producto de transcripción se purifica siguiendo el protocolo detallado en la página 45.

b. *Marcaje en 5' de oligonucleótidos de DNA o RNA.*

Los oligonucleótidos de DNA ó RNA procedentes de síntesis automática no contienen fosfato en 5' por lo que es innecesaria su desfosforilación previa. La reacción de fosforilación se realizó en un volumen final de 10 μ l, conteniendo entre 10-50pmoles de oligonucleótido a marcar, 1U/ μ l de T4 polinucleótido quinasa (NEB) en el tampón suministrado por la casa comercial 1X (70mM Tris-HCl pH 7.6, 10mM MgCl₂, y 5mM DTT), y 20 μ Ci (2 μ l) del isótopo ATP[γ -³²P]. La reacción se incubó durante 1hora a 37°C, tiempo tras el cual se inactivó el enzima por calor tratando la mezcla 20min a 65°C. La purificación de las moléculas marcadas se realizó siguiendo el protocolo de purificación descrito previamente (página 45), o bien mediante una extracción con fenol seguida de una precipitación con etanol, en el caso de que la finalidad fuese conservar la mayor cantidad posible de molécula marcada.

c. *Marcaje en 5' de productos de digestión de RNA: desfosforilación/fosforilación.*

Las reacciones de desfosforilación se llevan a cabo en un volumen final de 10 μ l. La mezcla de reacción incluye una fracción del producto de digestión de RNA disponible, 0.1U/ μ l de fofstafasa alcalina de gamba (USB), y el tampón de reacción suministrado por la casa comercial 1X (20mM Tris-HCl pH 8, 10mM MgCl₂). La reacción fue incubada 30 minutos a 37°C y posteriormente inactivada por tratamiento a 65°C durante 15 minutos. El producto de reacción fue precipitado y resuspendido en 10 μ l de agua antes de realizar la fosforilación del RNA.

La reacción de fosforilación se efectuó en un volumen final de 10 μ l. La mezcla de reacción consta de 5 μ l de la reacción de desfosforilación anterior, 1U/ μ l de T4 polinucleótido quinasa (NEB) en el tampón suministrado por la casa comercial a concentración 1X (70mM Tris-HCl pH 7.6, 10mM MgCl₂, y 5mM DTT), y 15 μ Ci (1.5 μ l) de ATP[γ -³²P]. La reacción fue incubada durante 7 minutos a 37 °C. Se inactivó el enzima calentando a 65°C durante 20min. El producto de reacción fue precipitado y resuspendido en 10 μ l de agua.

Marcaje en el extremo 3'.

La reacción de marcaje del RNA en su extremo 3' se realizó en un volumen final de 10 μ l, mediante incorporación de 20-30 μ Ci (2-3 μ l) del isótopo radiactivo pCp[5'-³²P] en una mezcla de reacción que incluye 2-3 μ g de RNA (MEGAscript[®]T7), 2U/ μ l de T4 RNA

ligasa (Promega) en el tampón de reacción suministrado por la casa comercial 1X (50mM Tris-HCl pH 7.8, 10mM MgCl₂, 5mM DTT, y 1mM ATP), 2U/μl de RNasin®Plus (Promega), 0.01% BSA, y 1% PEG. La reacción se mantuvo durante 4 días a 4°C, periodo de tiempo tras el cual se sometió a tratamiento con proteinasa K y posterior precipitación con etanol. Después se llevó a un volumen final de 100μl con agua, se añadieron 900μl de TSE 1X y 1000μl de etanol y se sometió al mismo protocolo de purificación empleado para una transcripción estándar.

Cuantificación de ácidos nucleicos.

Cuantificación mediante espectrofotometría.

La concentración de los ácidos nucleicos en solución fue determinada utilizando el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (Nucliber).

Cuantificación del RNA marcado internamente con GTP[α-³²P] en solución.

La concentración de los transcritos radiactivos marcados internamente con GTP[α-³²P] fue determinada calculando la cantidad de isótopo radiactivo incorporado en la reacción, en base a las medidas en CPM (cuentas por minuto) obtenidas en el contador de radioisótopos *Quick Count 2000* (Bioscan). Para ello se aplicó la siguiente fórmula matemática:

$$\frac{\mu\text{gr } rNTPs}{\frac{CPM}{\mu\text{l}} \text{ GTP } [\alpha -^{32} P] \times \mu\text{l GTP}[\alpha -^{32} P]} = \frac{\mu\text{gr transcrito}}{\frac{CPM}{\mu\text{l}} \text{ transcrito}}$$

dónde la primera parte de la ecuación corresponde a la cantidad en microgramos de ribonucleótidos no radiactivos agregados a la reacción de transcripción, y el valor en CPM/μl del GTP[α-³²P] incorporado en la reacción de transcripción. La segunda parte de la ecuación corresponde a los datos del transcrito sintetizado *in vitro*: el valor en microgramos del transcrito sintetizado (incógnita a despejar), y el valor en CPM/μl obtenido para dicho transcrito.

Digestión de ácidos nucleicos : DNA

Digestión de DNA con enzimas de restricción.

En el caso de digestiones con finalidad puramente analítica se utilizó una cantidad de DNA sustrato aproximada de 300ng. Para las digestiones con finalidad preparativa, *e.g.* moldes para transcripción *in vitro*, se emplearon 10μg de DNA aproximadamente. Por regla general se usaron 3U de enzima por microgramo de DNA a digerir, teniendo en cuenta que el volumen de enzima no excediese el 10% del volumen total de la reacción. El tampón de reacción fue el suministrado por la casa comercial (NEB, Fermentas y ROCHE), a concentración 1X. Se tuvo en cuenta la compatibilidad entre ellos en el caso de digestión doble. La incubación se realizó en estufa a 37°C durante un tiempo aproximado de 3horas, aunque en ocasiones transcurrieron durante toda una noche. Los enzimas fueron inactivados por tratamiento con calor según las indicaciones del fabricante. Se efectuó una electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio (página 4343) de una

alícuota de la reacción para visualizar los productos antes de proceder a su purificación. La purificación se realizó mediante extracción fenólica y precipitación con etanol.

Digestión con DNasa RQ1.

La enzima DNasa RQ1 procedente de páncreas bovino, y libre de RNasas contaminantes (Promega), se usó 1) para destruir el DNA molde empleado en las reacciones de transcripción, y 2) para eliminar ODN en algunos experimentos de anillamiento sobre moléculas de RNA. En el primer caso se incorporó 1U de RQ1 DNasa por microgramo de DNA molde y se incubó durante 15min a 37°C. En el segundo caso, se añadió 1U de RQ1 DNasa a las reacciones de hibridación, sin embargo se extendió en tiempo de incubación durante 1 hora.

Digestión de ácidos nucleicos: RNA

Reacciones con RNasa III de *E. coli*.

Las condiciones salinas del tampón empleado en todas las reacciones de digestión con RNasa III de *E.coli* corresponden a condiciones de corte secundario (ver introducción página 9). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10µl, e incluyó 0.6 nM del RNA sustrato en tampón P humana 1X, 20U de RNasin®Plus (Promega), 2µg de tRNA de levadura (Ambion), y el enzima RNasa III (Ambion). La RNasa III se utilizó a una concentración variable, determinada según experimentos de calibración sobre el RNA sustrato correspondiente. El RNA sustrato y el tampón de reacción fueron precalentados durante 1min a 90°C de forma paralela antes de ser puestos en contacto. Tras su unión, se dejó renaturalizar la mezcla a temperatura ambiente durante 15min. Transcurrido este tiempo se incorporaron el resto de componentes. Después de un periodo de incubación de 1 hora a 37°C se detuvo la reacción añadiendo tampón de carga para geles de poliacrilamida desnaturalizantes. Los productos fueron desnaturalizados antes de ser resueltos por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes. Los resultados se visualizaron por autorradiografía.

Reacciones con RZ6803.

La ribozima de la cianobacteria *Synechocystis sp.* (RZ6803) se obtuvo por transcripción *in vitro* a partir del DNA plasmídico pT76803-Dra I empleando el kit comercial MEGAscript®T7 (Ambion).

La reacción se realizó en un volumen final de 10µl compuesto por tampón RZ Cianobacteria 1X, 20U de RNasin®Plus (Promega), un 4% de PEG, 1M KCl, el RNA sustrato a una concentración de 1.8nM final y la ribozima a concentración variable en función del experimento. El óptimo fue calibrado sobre sustrato natural y corresponde a 67.5nM final. El protocolo precisa de una preincubación del ribozima (15 min a 37°C), en el medio de reacción sin sustrato, para su correcto plegamiento. Transcurrido este tiempo se incorpora el RNA sustrato y se incuba a 37°C durante 1 hora. Las reacciones se detuvieron en hielo con tampón de carga para geles de poliacrilamida desnaturalizantes. Para este caso concreto, y debido a la gran cantidad de sales del medio reactivo, no se realizó desnaturalización previa carga en gel.

Reacciones con RNasa P humana.

Cada reacción se realizó en un volumen final de 10µl, conteniendo 0.9 nM del RNA sustrato en tampón P humana 1X, 20U de RNasin®Plus (Promega), un 4% de PEG, y 0.5 µl del extracto purificado con actividad RNasa P humana. El RNA sustrato y el tampón de reacción fueron precalentados durante 1min a 90°C de forma paralela antes de ser puestos en contacto. Tras su unión, la mezcla se dejó renaturalizar a temperatura ambiente durante 15min. Transcurrido este tiempo se incorporaron el resto de componentes de reacción. Después de un periodo de incubación de 30min a 30°C, las muestras fueron sometidas a un tratamiento con proteinasa K y SDS a 62°C (ver página 54). Posteriormente se realizó una precipitación con etanol y acetato de sodio con glicógeno. Los productos se resuspendieron en agua y tampón de carga, y desnaturalizados antes de ser resueltos por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes. Los resultados se visualizaron por autorradiografía.

Reacciones con RNasa H.

La ribonucleasa H (RNasa H) degrada específicamente el RNA en los híbridos DNA/RNA con una extensión mínima de 4 pares de bases, produciendo extremos 5'-P y 3'-OH (Donis-Keller, 1979; Eun, 1996).

Los ensayos de accesibilidad en paralelo a las digestiones con RNasa III de *E.coli*, se realizaron con ODNs de 20 nucleótidos de longitud complementarios a las regiones sujetas a estudio. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10µl que incluía 0.6nM del RNA sustrato en tampón P humana 1X, 20U de RNasin®Plus (Promega), 2µg de tRNA de levadura (Ambion), 0.5U/µl de RNasa H de *E.coli* (Ambion), y el ODN en cuestión a tres concentraciones: 15nM, 150nM y 1500nM. El pretratamiento del RNA sustrato y el tampón de reacción fue el mismo descrito para las reacciones con RNasa III de *E.coli*.

Para el caso de los experimentos de accesibilidad de los ODN miR-122 y ODN miR-122 *seed seq.* en paralelo a las digestiones con RNasa P humana, las reacciones se realizaron en un volumen final de 10µl, cuya composición fue 0.9nM del RNA sustrato en tampón P humana 1X, 20U de RNasin®Plus (Promega), un 4% de PEG, 0.5U/µl de RNasa H (Ambion), y los ODN a tres concentraciones: 15nM, 150nM y 1500nM. El pretratamiento del RNA sustrato y el tampón de reacción fue el mismo descrito para las reacciones con RNasa III y RNasa P.

Tras un periodo de incubación de 1hora a 37°C, se detuvo la reacción añadiendo tampón de carga para geles de poliacrilamida desnaturalizantes. Los productos fueron desnaturalizados y resueltos por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes. Los resultados se visualizaron por autorradiografía.

Ensayos de estructura por sensibilidad al tratamiento con RNasas de simple y doble cadena.

Para determinar la estructura del RNA se emplearon las siguientes endonucleasas:

- a) *RNasa T1*: procedente de *Aspergillus oryzae*. Cataliza la hidrólisis en 3' del enlace fosfodiéster de las guaninas desapareadas, generando extremos 5'-OH y 3'-P, a través de intermediarios 2'-3'-P cíclico (Ehresmann et al, 1987; Eun, 1996).
- b) *RNasa VI*: procedente de veneno de cobra (*Naja oxiana*). Es una endonucleasa que procesa regiones de RNA apareadas con un tamaño mínimo aproximado de 4-5 pares de bases, sin preferencia de secuencia. También reconoce ribonucleótidos desapareados en conformación apilada (Ehresmann et al, 1987; Knapp, 1989). Los productos de corte cuentan con extremos 5'-P y 3'-OH (Ehresmann et al, 1987; Lowman & Draper, 1986).
- c) *RNasa A*: procedente de páncreas bovino. Cataliza la hidrólisis en 3' del enlace fosfodiéster de las bases pirimidínicas (C y U) que se encuentran desapareadas. Los productos de corte generados son 5'-OH y 3'-P a través de intermediarios 2'-3'-P cíclico (Eun, 1996).

Además de las reacciones de digestión parcial con estas RNasas se realizaron digestiones con la finalidad de obtener los marcadores moleculares necesarios para la identificación de las bases de la cadena nucleotídica sujeta a estudio. Estas reacciones fueron: a) hidrólisis del RNA en condiciones alcalinas (escalera OH), y b) digestión con RNasa T1 en condiciones desnaturalizantes (escalera T1).

Para este tipo de ensayos se emplearon transcritos *in vitro* marcados radiactivamente en uno de sus extremos. La concentración concreta de cada enzima, necesaria para la digestión parcial del RNA sustrato, se determinó mediante ensayos de calibración previa. Los productos de degradación se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (6% y 10%) de 0.2mm de grosor, manteniendo una potencia constante de 25W durante la carrera. Antes de cargar la muestra en cada pocillo (15µl volumen) se realizó una pre-electroforesis de 20min de duración. Se utilizaron placas de aluminio disipadoras de calor para evitar la rotura de los vidrios de electroforesis por un exceso de voltaje. Los geles se secaron a vacío y se visualizaron por autorradiografía.

RNasa T1.

La reacción de digestión parcial en condiciones nativas se llevó a cabo en un volumen final de 10µl, e incluyó 300CPM del RNA sustrato en tampón P humana 1X, 2µg de tRNA de levadura (Ambion), y 0.001µg/µl de RNasa T1 (Calbiochem). El RNA sustrato y el tampón de reacción fueron precalentados durante 1min a 90°C de forma paralela antes de ser puestos en contacto. Tras su unión, se dejó renaturalizar la mezcla a temperatura ambiente durante 15 min. Transcurrido este tiempo se incorporaron el resto de componentes. La reacción se incubó a 37°C durante 20min, y se detuvo inmediatamente en un baño de nieve carbónica en etanol después de añadir tampón de carga para geles de poliacrilamida desnaturalizantes.

Las reacciones de degradación parcial con RNasa T1 en condiciones desnaturalizantes (escalera de T1) se realizaron en un volumen final de 10µl, compuesto por 600 CPM de RNA sustrato, 1µg de tRNA de levadura (Ambion), 6µl de tampón para degradación con RNasa T1 en condiciones desnaturalizantes (ver materiales página 32), y 0.01µg/µl de RNasa T1. La reacción fue incubada a

55°C durante 5min, e inmediatamente después precipitada agregando 90µl de agua, dos volúmenes y medio de etanol y un 10% de acetato de sodio con glicógeno. Después de 60min a -20°C, la muestra fue centrifugada a 4°C durante 60min a 13200rcf. Los precipitados se resuspendieron en tampón de carga para geles de poliacrilamida desnaturalizantes.

RNasa VI.

La reacción de digestión parcial en condiciones nativas se llevó a cabo en un volumen final de 10µl, e incluyó 300CPM del RNA sustrato en tampón P humana 1X, 2µg de tRNA de levadura (Ambion), y 0.0001U/µl de RNasa VI (Ambion). El RNA sustrato y el tampón de reacción fueron precalentados durante 1min a 90°C de forma paralela antes de ser puestos en contacto. Tras su unión, se dejó renaturalizar la mezcla a temperatura ambiente durante 15min. Transcurrido este tiempo se incorporaron el resto de componentes. La reacción se incubó a 37°C durante 30min, y se detuvo inmediatamente en un baño de nieve carbónica en etanol después de añadir tampón de carga para geles de poliacrilamida desnaturalizantes.

RNasa A.

La reacción de digestión parcial en condiciones nativas se llevó a cabo en un volumen final de 10µl, e incluyó 300CPM del RNA sustrato en tampón P humana 1X, 2µg de tRNA de levadura (Ambion), y 0.0005ng/µl de RNasa A (Ambion). El RNA sustrato y el tampón de reacción fueron precalentados durante 1min a 90°C de forma paralela antes de ser puestos en contacto. Tras su unión, se dejó renaturalizar la mezcla a temperatura ambiente durante 15min. Transcurrido este tiempo se incorporaron el resto de componentes. La reacción se incubó a 37°C durante 2min, y se detuvo inmediatamente en un baño de nieve carbónica en etanol después de añadir tampón de carga para geles de poliacrilamida desnaturalizantes.

Hidrólisis alcalina del RNA

La reacción de hidrólisis alcalina sobre el RNA se realizó en un volumen final de 10µl que incluyó 600CPM del RNA sustrato marcado en uno de sus extremos, 1µg de tRNA de levadura (Ambion), y 1µl de una solución de carbonato-bicarbonato sódico 100 mM a pH 9.5 (ver materiales página 33), siendo este reactivo el último en incorporarse a la mezcla. La reacción se incubó a 95°C durante 90seg y se detuvo inmediatamente en un baño de nieve carbónica en etanol tras añadir tampón de carga para geles de poliacrilamida desnaturalizantes.

Otras reacciones.

Ligación de insertos de DNA en plásmidos bacterianos.

Para realizar ligaciones de insertos dentro de vectores plasmídicos se utilizó la enzima T4 DNA ligasa, que cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre los extremos 5'-P y 3'-OH de moléculas de DNA de doble cadena. Tanto el DNA inserto como el vector fueron digeridos con las mismas enzimas de restricción, y purificados por extracción con fenol cloroformo y precipitación con etanol. La reacción de ligación se realizó en un

volumen de 10µl compuesto por; 50ng de DNA vector (usualmente pGEM[®]-3Zf(-)) en tampón de ligación rápida 1X (30mM Tris-HCl pH 7.8, 10mM MgCl₂, 10mM DTT, 1mM ATP, y un 5% de PEG), y 3U de T4 DNA ligasa (Promega). La reacción se incubó durante toda la noche a 4°C.

Para la ligación en el vector pGEM[®]-T Easy (Promega), el DNA procedente de las reacciones de PCR fue purificado utilizando el kit *High Pure PCR* (Roche-Applied Science). La reacción de ligación se llevó a cabo en un volumen de 10µl, siguiendo las instrucciones del fabricante: 50ng de pGEM[®]-T Easy vector en tampón de ligación rápida 1X (30mM Tris-HCl pH 7.8, 10mM MgCl₂, 10mM DTT, 1mM ATP, y un 5% de PEG), y 3U de T4 DNA ligasa (Promega). La relación molar entre inserto vector fue 3:1, aunque en ocasiones se empleó un exceso molar de inserto de 6 veces. La incubación se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente, ó durante una noche a 4°C.

En ambos casos, antes de proceder a la transformación de bacterias se inactivó el enzima T4 DNA ligasa mediante tratamiento por calor a 65°C durante 15min.

Tratamiento con proteinasa K y SDS.

La proteinasa K es una serín proteasa de amplio espectro, mientras que el dodecilsulfato sódico (SDS) es un surfactante empleado como detergente. El tratamiento combinado con ambos reactivos permitió eliminar proteínas capaces de interferir en la visualización de los resultados por electroforesis en gel de acrilamida, y garantizar el cese en la actividad de diferentes enzimas. Se incubó una dilución de proteinasa K (Ambion) en agua a concentración 1µg/µl durante 5min a 63°C (preactivación por calor). Por cada 10µl de reacción a tratar con proteinasa se añadieron: 5µg de tRNA de levadura (Ambion), 0.7µl de SDS al 10%, 0.7µl de EDTA 100mM pH 8 y 0.6µl de proteinasa K (1µg/µl) previamente activada. Tras un tiempo de incubación de 12 minutos a 63°C, la mezcla fue precipitada con etanol y resuspendida en 10µl de agua.

Circularización de moléculas de RNA con extremos 5'-P y 3'-OH.

La circularización de fragmentos de RNA con extremos 5'-P y 3'-OH se realizó empleando la enzima T4 RNA ligasa. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10µl que incluyó una fracción del fragmento de RNA disponible, 0.01% de BSA, 1% de PEG, 20U de RNasin[®]Plus (Promega) y 2U/µl de T4 RNA ligasa (Promega) en el tampón suministrado por la casa comercial 1X (50mM Tris pH 7.8, 10mM MgCl₂, 5mM DTT, y 1mM ATP). Después de un periodo de incubación de 4 días a 4°C, se realizó un tratamiento con proteinasa K y SDS (ver procedimiento anterior).

Ensayos de asociación en geles nativos.

La caracterización del cambio conformacional experimentado por algunas moléculas de RNA se realizó mediante ensayos de anillamiento con diferentes oligonucleótidos. La molécula portadora de señal radiactiva fue el RNA HCV 1-570 marcado internamente con GTP[α-³²P]. La reacción de hibridación se llevó a cabo en un volumen de 10µl compuesto por 0.6nM del RNA sujeto a estudio (HCV 1-570) en tampón P humana 1X, 20U de RNasin[®]Plus (Promega), 2µg de tRNA de levadura (Ambion), y el oligonucleótido

indicado a concentración variable. El proceso se detuvo por adición en frío de tampón de carga no desnaturante para geles de poli(acrilamida). El cambio conformacional se apreció como un retraso en la movilidad electroforética de las moléculas marcadas en geles de poli(acrilamida) nativos. El RNA sustrato fue desnaturado y renaturalizado en el tampón de reacción del mismo modo descrito en los protocolos de reacción para RNasa III y RNasa P humana.

Reacción de poliadenilación del RNA.

La enzima Poli(A) polimerasa de *E.coli* cataliza la incorporación independiente de molde de AMP, a partir de ATP, en el extremo 3' de un RNA. En el presente trabajo se empleó como técnica para la identificación de los puntos de corte exactos producidos por la digestión con endonucleasas específicas.

La reacción se llevo a cabo en un volumen final de 20µl, que incluyó: una fracción del fragmento de RNA sujeto a análisis, 1mM ATP, y 5U de Poli(A) polimerasa (NEB) en el tampón de reacción suministrado por el fabricante 1X (50mM Tris-HCl pH 7.9, 250mM NaCl, 10mM MgCl₂). Tras 10min de incubación a 37°C se añadieron 200µl de agua estéril, y se realizó una extracción fenólica y precipitación con etanol. El precipitado fue resuspendido en 10µl de agua, de los cuales 5µl se destinaron a reacciones de retrotranscripción y posterior PCR.

Reacción de poliuridinación del RNA.

La enzima Poli(U) polimerasa cataliza la adición independiente de molde de UMP, a partir de UTP, al extremo 3' de un RNA. En este caso el enzima recombinante en *E.coli* procede de *Schizosaccharomyces pombe*. En el presente trabajo se empleó como técnica para la identificación de los puntos de corte exactos producidos por la digestión con endonucleasas específicas.

La reacción se llevo a cabo en un volumen final de 25µl, compuestos por: una fracción del fragmento de RNA sujeto a análisis, 0.5mM UTP, 20U de RNasin[®] Plus (Promega), y 2U de Poli(U) polimerasa (NEB) en el tampón de reacción suministrado por el fabricante 1X (10mM Tris-HCl pH 7.9, 50mM NaCl, 10mM MgCl₂, y 1mM DTT). Tras 10min de incubación a 37°C se añadieron 200µl de agua estéril, y se realizó una extracción fenólica y precipitación con etanol. El precipitado fue resuspendido en 10µl de agua, de los cuales 5µl se destinaron a reacciones de retrotranscripción y posterior PCR.

Reacciones de retrotranscripción (RT).

La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo en un volumen final de 20µl compuesto por: una fracción del RNA disponible, el ODN correspondiente a concentración 1µM, 20U de RNasin[®] Plus (Promega), mezcla de dNTPs a 1mM (Roche), 10ng/µl del RNA MS2 (Roche), y 10U de retrotranscriptasa (Roche) en el tampón suministrado por la casa comercial 1X (50mM Tris-HCl pH 8.5, 8mM MgCl₂, y 30mM KCl). El RNA que actúa como molde y el ODN cebador deben desnaturizarse y renaturalizarse juntos antes de montar la reacción. Por esta razón se calentaron a 90°C durante 1min y, después de incorporar el tampón de reacción, se mantuvieron a temperatura ambiente 15min. La

incubación se desarrolló a 55°C durante 30min, tras lo cual se inactivó el enzima calentando 5min a 85°C.

En los casos en los que la temperatura de anillamiento del ODN cebador fue demasiado baja con respecto a la temperatura de incubación de la RT de Roche, se empleó la transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV). Este fue el caso concreto de los productos de las reacciones de poliadenilación y poliuridilación, que emplearon los ODN dT-Pst y dA-Pst para la síntesis del cDNA correspondiente. En estas ocasiones las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 20µl con la siguiente composición: 5µl de producto de la reacción de poliadenilación ó poliuridilación, el ODN adecuado a concentración 1µM, 20U de RNasin®Plus (Promega), mezcla de dNTPs a 1mM (Roche), y 15U de enzima AMV RT (USB) en el tampón proporcionado por el fabricante 1X (50mM Tris-HCl pH 8.3, 8mM MgCl₂, 50mM NaCl, 1mM DTT). La incubación se realizó a 37°C durante 30min.

En ambos casos se empleó un volumen comprendido entre 2-3µl del cDNA generado para las reacciones posteriores de PCR.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de amplificación de DNA mediante PCR se llevaron a cabo generalmente en un volumen de reacción de 50µl. En la mezcla de reacción se incluyó 10-50ng de DNA molde, 1.5U de la enzima DNA polimerasa AmpliTaq®Gold (*Applied Biosystems*) en el tampón de reacción suministrado por la casa comercial *PCR Buffer II 1X* (10mM Tris-HCl pH 8.3, 50mM KCl), 1.5mM de MgCl₂ (Roche), 0.2mM de cada uno de los dNTPs (mezcla de Roche), y 20pmoles de cada uno de los oligonucleótidos que actúan como cebadores en la reacción. Se utilizó el termociclador iCycler (Bio-Rad).

El protocolo estándar de amplificación empleado fue el siguiente:

Ciclos	Temperatura-Etapa	Tiempo
1 ciclo	95° C - Comienzo en caliente	10 min
25-30 ciclos	94° C - Desnaturalización	15-20 seg
	60° C - Anillamiento	20 seg
	72° C - Extensión	30 seg
1 ciclo	72° C - Extensión final	4 min
1 ciclo	4° C	∞

El número de ciclos de desnaturalización, anillamiento y extensión, la temperatura de hibridación de los cebadores y los tiempos de anillamiento y extensión, fueron optimizados según las condiciones concretas para cada reacción en base al resultado empírico obtenido.

Tras la comprobación visual del resultado de la reacción de PCR en gel de agarosa TAE 1X teñido con bromuro de etidio, los productos fueron purificados utilizando el kit *High Pure PCR (Roche-Applied Science)*, siguiendo el protocolo indicado por el fabricante.

Purificación parcial de RNasa P humana.

La actividad RNasa P humana fue purificada a partir de 30 g de células HeLa según el protocolo de Bartkiewicz *et al.* (Bartkiewicz et al, 1989) con algunas modificaciones referidas al método de seguimiento de la ribonucleoproteína y a la obtención del homogeneizado celular.

1. Preparación de la fracción subcelular S20:

La compañía belga Cilbiotech suministró un volumen comprendido entre 3-4 litros de medio de cultivo líquido (10^6 células/ml) con el equivalente a 30 gr en peso de células HeLa frescas. En el momento de su recepción, al inicio del proceso de purificación, la viabilidad celular debía ser del 95% aproximadamente; razón por la cual se realizó una comprobación mediante tinción con un colorante vital (azul de tripán al 0.4%) y recuento en cámara de Neubauer. Durante todo el proceso de manipulación las células fueron mantenidas a 4°C.

- a. Se dividió el volumen de cultivo de células recibido (3-4 litros) en botellas de polipropileno para centrifuga de 250 ml de capacidad atemperadas en hielo. Se centrifugaron a 1200 rpm y 4°C durante 6 minutos. El medio de cultivo fue retirado por decantación.
- b. Los precipitados de células fueron resuspendidos en 10 ml de PBS frío y unidos de forma que quedasen dos botellas de células con 40-50 ml de PBS cada una. Se centrifugó a 1200 rpm y 4°C durante 6 minutos. Se retiró el sobrenadante. Esto constituyó el primero lavado en PBS.
- c. Los precipitados de células fueron resuspendidos en 30 ml de PBS frío y transferidos a dos tubos tipo falcon de 50 ml atemperados en hielo. Se realizaron dos lavados adicionales en PBS centrifugando a 1200 rpm y 4°C durante 6 minutos.
- d. Tras el tercer lavado con PBS se retiró el sobrenadante y se añadieron 30 ml de TKM frío a cada uno de los falcons. Se realizó una centrifugación a 1200 rpm 4°C, durante 6 minutos y después se retiró el sobrenadante. Este fue el primer lavado con TKM. Fue realizado un segundo lavado con TKM en las mismas condiciones. El TKM es un medio con baja sal que hace que las células capten agua por osmosis.
- e. Tras el segundo lavado con TKM, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el precipitado llevando la muestra a un volumen final de 100 ml empleando TKM frío. Fueron añadidas 2 pastillas de Cocktail Complete EDTA free (ROCHE) disueltas en 2 ml de TKM. Este reactivo contiene una mezcla de inhibidores de proteasas. También se incorporaron 100µl de DTT 1M.
- f. La muestra pasó entonces por la prensa francesa (Thermo Electron Corporation) utilizando el émbolo “Manual Fill 40K cell” con capacidad para 35 ml. Se aplicó una presión de 2000 psi, realizando dos pases por cada 35 ml de muestra para garantizar la ruptura homogénea del preparado celular. La presión aplicada se estableció tras un proceso de optimización a partir de mini-preparaciones de extracto crudo con actividad RNasa P.

- g. El homogeneizado celular obtenido en la prensa francesa se llevó a un volumen final de 120 ml con TKM frío. La muestra fue dividida en 6 tubos de policarbonato transparentes con pared gruesa para ultracentrífuga (Beckman Coulter 082-355631). Se centrifugaron a 20000 g y 4°C durante 30 min en el rotor 70-Ti (Beckman Coulter). La fracción S20 (citoplasma soluble) fue retirada empleando pipetas Pasteur horneadas y siliconizadas; esta fracción es la fase intermedia transparente localizada entre la grasa superficial y los restos de membranas y núcleos depositados en el fondo del tubo.
- h. La fracción S20 se ajustó a un volumen final de 150 ml a concentración 20 mM Tris-HCl pH 7, 15mM MgCl₂, y 50mM NH₄Cl utilizando el tampón “Purificación P humana 10X NH₄Cl”.

2. Preparación de la columna y desarrollo de la cromatografía de intercambio aniónico.

La RNasa P posee una carga mayoritariamente negativa debido a su componente de RNA, es por ello que se realiza una cromatografía de intercambio aniónico. La resina empleada es una combinación de sefarosa y agarosa sobre la cual los grupos químicos dimetil-aminoetil (DEAE) crean la carga positiva.

2.1 *Preparación y empaquetamiento de la resina.*

La columna fue preparada con antelación, de tal modo que se encontraba lista para ser cargada el mismo día en el cuál se recibieron las células. Antes de empaquetar la resina dentro de la columna se lavó el dispositivo y las conducciones con una solución de NaOH 1N durante unos 30 minutos aproximadamente. Se aclaró con abundante agua bidestilada.

2.1.1 Tratamiento de la resina:

La resina se encuentra disuelta en etanol al 20% para evitar contaminaciones microbianas por lo que precisa de una serie de lavados previos al empaquetamiento. Con tal fin, se mezclaron 250 ml de DEAE-Sefarosa (Sigma) con 200 ml de tampón “Purificación P humana NH₄Cl 50mM”. Tras agitar suavemente en una probeta, se dejó en decantación el tiempo necesario. Después, se retiró el sobrenadante y se realizaron 4-5 lavados adicionales siguiendo el mismo procedimiento. Los lavados llevan mucho tiempo ya que las bolitas de resina en buen estado tardan muchas horas en depositarse en el fondo del recipiente. Se aconseja dejar sedimentar la resina durante las noches y comenzar con los lavados 3-4 días antes de la recepción de las células. En todo momento la resina fue conservada a una temperatura de 4°C.

2.1.2 Empaquetado de la resina:

La resina fue empaquetada dentro de una columna de cromatografía XK26 (GEH-Amersham) que cuenta con un sistema de doble cilindro. El cilindro externo que actúa de camisa de refrigeración fue conectado a un baño refrigerado que mantuvo la temperatura de la camisa a 4°C (Julabo F12ED).

El volumen de cilindro interno era de 200 ml. Por otro lado la columna se conectó a una bomba peristáltica (Pharmacia Biotech Pump-P1).

- a) Para empaquetar la resina se agitó suavemente en el tampón del último lavado y fue vertida con ayuda de una pipeta serológica de forma continua y suave contra la pared del reservorio de empaquetamiento. Se evitó la formación de burbujas durante el proceso. La resina permaneció una noche a 4°C sedimentando.
- b) La columna fue equilibrada pasando un volumen (~160 ml) de tampón “Purificación P humana NH₄Cl 50 mM” desgasificado. El flujo de la columna fue regulado a una velocidad de 1.7ml/min. En este punto, la columna queda a la espera de ser cargada.

2.2 Desarrollo de la cromatografía: fraccionamiento en gradiente de NH₄Cl.

- a. Se cargó la fracción S20 en la columna (150 ml).
- b. Cuando la muestra terminó de entrar, la columna se lavó empleando 8 volúmenes de tampón “Purificación P humana NH₄Cl 50 mM” (1200 ml). Esto llevó toda una noche. El flujo de la columna durante esta etapa se reduce de forma normal a valores próximos a 0.8ml/min.
- c. Se inició un gradiente lineal de NH₄Cl comprendido entre 100-350 mM, del cual se pasaron a través de la columna 500 ml. El gradiente se consiguió conectando la columna a un formador de gradientes (Gradient Mixer GM-1 Pharmacia) que consiste en un sistema de vasos comunicantes con agitación.
- d. Se recogieron fracciones de 10 ml cada una usando un colector de fracciones (Pharmacia LKB-RediFrac). Las fracciones del gradiente fueron conservadas a 4°C, a medida que se iban recogiendo, para su posterior análisis. Se hizo un seguimiento de la concentración de proteínas mediante un espectrofotómetro de lectura continua acoplado al sistema (UVis-920 GE Healthcare con filtro de 280nm) y un registrador de datos (CR112-Millipore).

3. Determinación de las fracciones positivas procedentes del gradiente de NH₄Cl.

De aproximadamente 50 fracciones recolectadas, se escogió una de cada tres para realizar dos tipos de ensayos en paralelo: 1) un ensayo de actividad sobre un sustrato natural y 2) una cuantificación relativa del componente de RNA (RPR H1). Con este doble seguimiento se pretendía detectar la presencia de RNasa P activa y minimizar el número de alícuotas significativas para evitar otras actividades paralelas que copurifican con la RNasa P.

3.1. Ensayo de actividad sobre un sustrato natural.

Se empleó como sustrato el pre-tRNA^{Tyr} de *E.coli* (131nt) marcado internamente con GTP[α -³²P]; transcrito a partir del DNA plasmídico pUC19Tyr-

Fok I con antelación. La reacción se llevó a cabo según el protocolo de digestión estándar con RNasa P humana (ver página 51) con las siguientes modificaciones: i) se ensayaron 2µl de cada fracción cruda procedente del gradiente de cloruro de amonio; ii) la concentración del sustrato (pre-tRNA^{Tyr} de *E.coli*), fue de 1nM; iii) transcurrido el tiempo de reacción se añadió 1µl de fenol saturado en agua (Invitrogen) y se realizó una fenolización de los productos mediante pipeteo; iv) antes de desnaturalizar y cargar en gel de poliacrilamida desnaturalizante fue incorporado 1µl de tRNA a 5µg/µl en cada tubo de reacción.

3.2. RT-PCR semicuantitativa para la RPR H1.

3.2.1 Preparación del sustrato para la reacción.

- a. Se tomaron muestras de 100µl de cada una de las fracciones crudas del gradiente de cloruro de amonio que se pretendía analizar. Después de incorporar 100µl de agua a cada una de las muestras, se precipitó añadiendo un 10% de su volumen de acetato de sodio 3M pH 5 con glicógeno a 0.2 µgr/µl, y 2.5 volúmenes de etanol frío. Se mantuvo 30 minutos a -20°C.
- b. Las muestras fueron centrifugadas a 4°C durante 20 minutos a 13200 rcf. Se retiró el sobrenadante y resuspendió el precipitado en 10µl de agua. Se utilizaron 2µl para cada reacción de retrotranscripción (RT).

3.2.2 Transcripción reversa (RT).

Para la obtención del cDNA se empleó el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Como paso previo antes de incorporar la mayoría de componentes de reacción, la muestra preparada según el paso anterior se desnaturalizó en presencia de una mezcla aleatoria de hexámeros. Para ello se empleó un volumen de 10µl que contenía 2 µl del extracto precipitado procedente del gradiente de cloruro de amonio y 2 µl de mezcla comercial de hexámeros 10X. Se calentó durante 2 min a 95°C y se dejó enfriar a temperatura ambiente. La reacción de retrotranscripción se realizó en un volumen final de 20µl incluyendo los 10 µl ya mencionados, el tampón suministrado por la casa comercial 1X, 4 mM de cada uno de los dNTPs (mezcla del fabricante), 20U de RNasin[®]Plus (Promega), y 50U del enzima retrotranscriptasa MultiScribe (Applied Biosystems). Se incubó durante 30 min a 16°C y durante otros 30 min a 42°C. Finalmente se inactivó el enzima calentando 5 minutos a 85°C.

3.2.3 PCR semicuantitativa.

Para hacer la PCR a tiempo real se utilizó el kit *SsoFast Probes Supermix* (BIORAD). La reacción de PCR se realizó en un volumen de 15µl. En la mezcla de reacción se incluyó 1µl del cDNA molde obtenido en la reacción anterior, 40nM de cada uno de los cebadores específicos para la RPR H1 (H1 213-226 (+), y H1 274-255 (-)), 3 pmoles de la sonda tipo *Taqman* H1-228, y 7.5µl de la mezcla comercial *SSoFast Probes* 1X (BIORAD). Se empleó el

termociclador *CFX96 Real Time System* (BIORAD). El programa de amplificación fue el siguiente:

Ciclos	Temperatura-Etapa	Tiempo
1 ciclo	98° C - Comienzo en caliente	10 seg
60 ciclos	98° C - Desnaturalización	5 seg
	52° C - Anillamiento	10 seg
	60° C - Extensión	10 seg

4. Fraccionamiento en gradiente de glicerol.

En esta etapa del proceso de purificación se realiza un fraccionamiento por centrifugación en gradiente de glicerol. El glicerol posee la ventaja de contribuir a mantener la estructura de las proteínas evitando su desnaturalización.

4.1 Preparación de los gradientes de glicerol.

Se prepararon seis tubos para ultracentrifuga Ultraclear-14ml (Beckman Coulter) con un gradiente lineal de glicerol comprendido entre 15-25%. Para ello se emplearon los tampones de glicerol al 15% y al 25%, un gradientómetro SG (Amersham Biosciences), un pequeño agitador magnético, y una placa agitadora. Con la ayuda de una bomba peristáltica (Pharmacia Biotech Pump-P1) se depositó gota a gota de forma suave y ascendente la mezcla del gradiente hasta completar un volumen de 11 ml por tubo. Los gradientes deben hacerse con 24 horas de antelación y conservarse a 4°C.

4.2 Concentración de las fracciones positivas procedentes del gradiente de NH_4Cl .

Las fracciones positivas se unieron de forma consecutiva según los resultados obtenidos en los ensayos de actividad sobre sustrato natural y RT-PCR semicuantitativa. Para concentrar las muestras fueron empleadas columnas de filtración Amicon Ultra-15 (Millipore) con un volumen de exclusión de 50K. Se centrifugó a 4°C siguiendo las indicaciones del fabricante de forma tal que el volumen final del concentrado fue de 6 ml aproximadamente.

4.3 Ultracentrifugación en gradientes de glicerol y fraccionamiento.

- Se cargó, con sumo cuidado, 1 ml de muestra concentrada en la parte superior de cada uno de los gradientes de glicerol. Los tubos de la ultracentrifuga fueron equilibrados con muestra (rotor Beckman Coulter SW-40) y se centrifugaron a 35000 rpm y 4°C durante 23 horas. Entre tanto se prepararon 30-40 tubos de vidrio numerados.
- Las fracciones del gradiente de glicerol fueron recogidas pinchando cada tubo en la base con una jeringa acoplada a un sistema de recolección de

fracciones (Beckman coulter Ref. 343890) acoplado a una bomba peristáltica (Pharmacia Biotech Pump-P1). Se recogieron 8 gotas por cada tubo de vidrio horneado y siliconizado de forma consecutiva.

- c. Se repitió la misma operación para cada uno de los gradientes de forma que se recogieron sobre los mismos tubos las mismas fracciones. Se obtuvieron entre 30-40 fracciones de 1.5-2 ml cada una.

5. Determinación de las fracciones positivas procedentes del gradiente de glicerol.

Para determinar las fracciones que contenían actividad RNasa P se realizó en paralelo: 1) ensayos de actividad sobre pre-tRNA^{Tyr} y RNA 1-570 de HCV y, 2) cuantificación relativa por RT-PCR del componente de RNA (RPR H1). Las fracciones a analizar en esta ocasión corresponden a la mezcla de alícuotas de 1µl procedentes de 4 fracciones consecutivas del gradiente de glicerol.

5.1 *Ensayos de actividad:*

Además del pre-tRNA^{Tyr} de *E.coli*, se ensayó la actividad RNasa P sobre el fragmento de RNA 1-570 de HCV marcado internamente con GTP[α -³²P]. El pre-tRNA es más resistente al posible efecto de las RNasas contaminantes del extracto que el IRES de HCV, asimismo su patrón de corte se encuentra bien caracterizado. Las reacciones se llevaron a cabo según el protocolo de digestión estándar con RNasa P humana con las siguientes modificaciones:

- Se ensayó 1µl del sumatorio de alícuotas procedentes de 4 fracciones consecutivas del gradiente de glicerol.
- La concentración del sustrato, pre-tRNA^{Tyr} de *E.coli* y HCV 1-570, fue de 1nM.
- Transcurrido el tiempo de reacción se añadió 1µl de fenol saturado en agua (Invitrogen) y se realizó una fenolización de los productos mediante pipeteo. Antes de desnaturalizar y cargar en gel de poliacrilamida desnaturalizante se añadió 1µl de tRNA a 5µg/µl en cada tubo de reacción.

5.2 *RT-PCR semicuantitativa para la RPR H1.*

Se procedió según el protocolo detallado anteriormente. Como sustrato para la reacción de retrotranscripción se emplearon 2µl del sumatorio de alícuotas procedentes de 4 fracciones consecutivas del gradiente de glicerol.

6. Concentración y conservación.

- a. Las fracciones positivas, según los resultados de los ensayos anteriores, fueron concentradas empleando columnas de filtración Amicon Ultra-4ml Ultracel (Millipore) con un volumen de exclusión de 50K. Se centrifugaron a 4°C siguiendo las indicaciones del fabricante de forma tal que el volumen final del concentrado fue de 100 µl aproximadamente.

- b. Se hicieron alícuotas de 10 μ l en *eppendorfs* siliconizados convenientemente rotulados, que finalmente, fueron conservadas a -80°C .

Con posterioridad se realizaron ensayos de actividad sobre pre-tRNA^{Tyr} de *E.coli* y HCV 1-570 individuales para cada serie de fracciones del extracto enriquecido en actividad RNasa P. En esta ocasión los productos de digestión se sometieron a tratamiento con proteinasa K antes de su carga en gel de poliacrilamida desnaturalizante, como es habitual en la reacción de digestión con RNasa P humana.

Análisis bioinformático.

Cuantificación y representación gráfica de los datos obtenidos en experimentos de digestión e inhibición competitiva.

Las imágenes necesarias para la cuantificación en los ensayos de digestión con RNasas se obtuvieron usando el escáner *Typhoon 9400* (Amersham Biosciences). La cuantificación se efectuó empleando el *software ImageQuant 5.2* (Molecular Dynamics). El porcentaje de corte fue calculado como el cociente:

$$\left(\frac{\text{productos de corte}}{\text{material de partida} + \text{productos de corte}} \right) \times 100$$

En caso de referirse a una banda producto particular:

$$\left(\frac{\text{banda producto Y}}{\text{material de partida} + \text{resto de bandas producto}} \right) \times 100$$

En los ensayos de inhibición competitiva, los valores normalizados del porcentaje de corte se ajustaron a la siguiente ecuación:

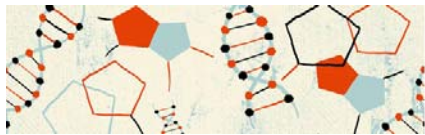
$$\% C = \frac{m1}{\left(1 + \frac{[I]}{[Ki]} \right) + m3}$$

Dónde: m1 corresponde al porcentaje de corte en ausencia de inhibidor; [I] corresponde a la concentración del inhibidor; [Ki] a la concentración de inhibidor cuando se alcanza el 50% de inhibición y m3 a la actividad extrapolada en condiciones saturantes de inhibidor (Ziehler et al, 2000).

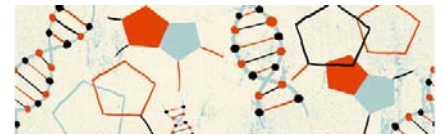
La normalización de los datos y la representación gráfica se realizó con ayuda del *software GraphPad 5.01* (Prism) y *SigmaPlot 10* (Systat).

Predicciones de estructura secundaria y terciaria.

Las predicciones de estructura secundaria del RNA se llevaron a cado empleando el servidor web *Mfold* (Zuker, 2003). Para la predicción de pseudonudos se recurrió al algoritmo *ProbKnot* (Bellaousov & Mathews, 2010) dentro del programa informático *RNA Structure 5.2*.



RESULTADOS



RESULTADOS 1

“Caracterización *in vitro* de un cambio conformacional en el que intervienen elementos estructurales de doble cadena, en la región 5' del RNA del HCV, sensible al miR-122”

La aparición de un nuevo producto de corte para la RNasa III de *E.coli* dentro de la región 1-570 del RNA de HCV, sugiere la presencia de una estructura de RNA alternativa.

Experimentos previos de corte con RNasa III sobre el fragmento de RNA 1-570 de HCV permitieron la caracterización de sus principales productos de corte. La **figura 1A** muestra un dibujo esquemático en el que se representan los productos finales de la digestión (P1, P2 y P3) ubicados dentro de la región 5' del genoma de HCV. En la autorradiografía de la **figura 2** (carril 2) se observan los productos de digestión parcial (P2P3 y P1P2) junto a los de digestión total (P1, P2 y P3). Nuestro grupo había demostrado que estos cortes eran posibles debido al anillamiento a larga distancia entre secuencias que flanqueaban el IRES de HCV (Beguiristain et al, 2005). Durante el transcurso del citado trabajo se observó la aparición de una banda minoritaria que parecía ser dependiente del tiempo de reacción. Dicha banda no fue estudiada al detalle en ese momento, pero contaba con una movilidad electroforética intermedia entre dos de los productos de digestión parcial (P2P3 y P1P2), y se intensificaba al emplear concentraciones de enzima elevadas. La aparición de esta banda, denominada X, y de su compañera Y (ambas sumaban el

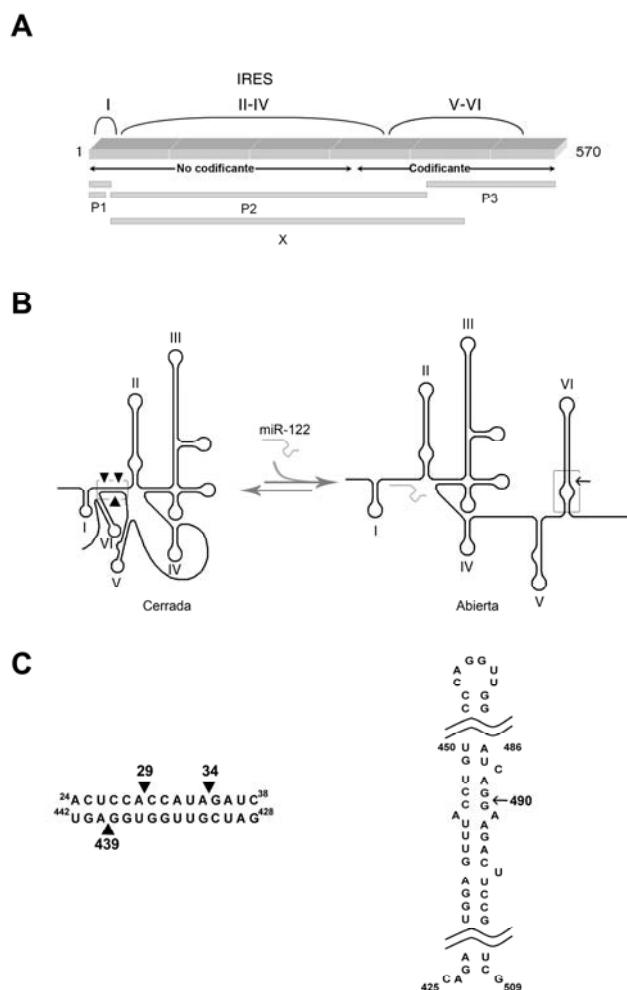


Figura 1: Representación esquemática del RNA de HCV 1-570nt. **A:** Estructura primaria. Se muestra la localización de la banda X junto a los principales productos de digestión de la RNasa III de *E.coli* descritos previamente para la conformación cerrada del RNA. **B:** Estructuras secundarias propuestas. Izquierda: conformación cerrada ('C'). Los triángulos señalan los cortes de RNasa III sobre el anillamiento a larga distancia (LRA). Derecha: conformación abierta. El nuevo corte en el tallo lazo VI se indica con una flecha. **C:** Detalle de las secuencias de doble cadena reconocidas por la RNasa III.

tamaño total del transcrito de 570nt) podía percibirse únicamente cuando el sustrato de longitud completa se había procesado totalmente y la banda P2P3 se convertía en el producto mayoritario. Se propusieron dos explicaciones posibles: i) la banda X podría corresponder a una estructura menos sensible al corte por RNasa III, o ii) la banda X podría ser el resultado de un corte adicional de P2P3 por parte de la RNasa III, que no ocurre en el RNA 1-570nt. Esta opción implicaría la existencia de estructuras alternativas dentro de la región 1-570 del RNA de HCV.

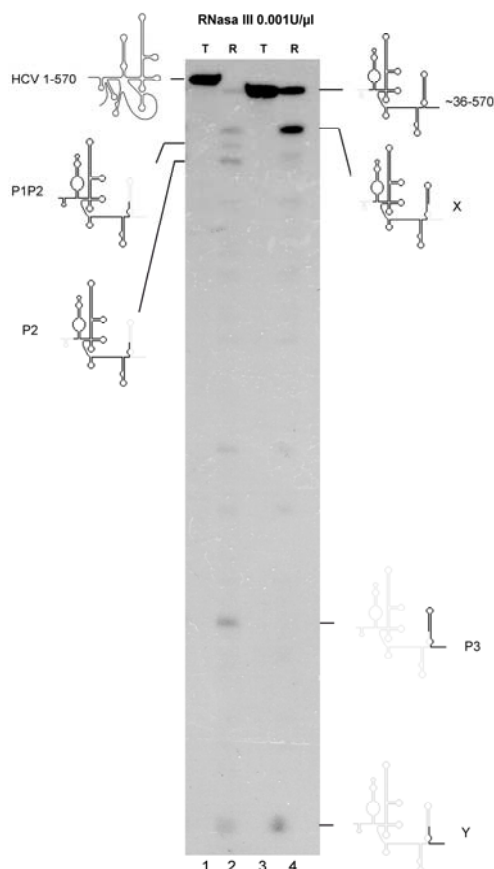


Figura 2: La aparición de la nueva banda de corte para la RNasa III de *E.coli*, designada como X, se encuentra favorecida en un transcrito truncado en su extremo 5'. Carriles 1 y 3, RNA 1-570nt y RNA ~36-570 nt de HCV respectivamente incubados en tampón de reacción. Carriles 2 y 4 los mismos transcritos pero incubados con RNasa III a una concentración de 0.001U/μl.

Para investigar la hipótesis de la transición estructural se realizó un ensayo de reacciones enzimáticas en paralelo con el RNA 1-570nt de HCV y un transcrito truncado en su extremo 5' (~36-570), prácticamente idéntico a P2P3. La banda X fue el principal producto de reacción cuando se empleaba el sustrato truncado, en el cual el anillamiento a larga distancia estaba impedido (**Figura 2**). Este resultado indica que la banda X no es un producto directo de digestión del fragmento 1-570, sino que es un producto de corte derivado de P2P3. Suponen pruebas adicionales a esta observación los experimentos de calibración con RNasa III para los RNAs 1-570 y P2P3. Estos fragmentos se incubaron con concentraciones crecientes de RNasa III y los productos resultantes se analizaron por electroforesis (**Figura 3**). Como se observa en la **figura 3A** (carriles 3-6) el RNA 1-570nt es mejor sustrato para la RNasa III, pues es procesado a una concentración 10 veces inferior a la necesaria para el procesamiento del sustrato P2P3 (carriles 9-12). Sin embargo la banda P2P3 formada a partir del RNA 1-570nt aparece a una concentración similar a la concentración necesaria para generar X a partir del sustrato P2P3 (ya sea de formación endógena en la reacción o recortado de gel). Además, se detectó una correlación entre la desaparición de la banda P2P3 y la formación de la banda X. Esto demuestra que tanto el motivo

LRA como su conformación alternativa, forman hélices estables igualmente sensibles a la RNasa III y refuerza la idea de que X es un producto derivado de P2P3.

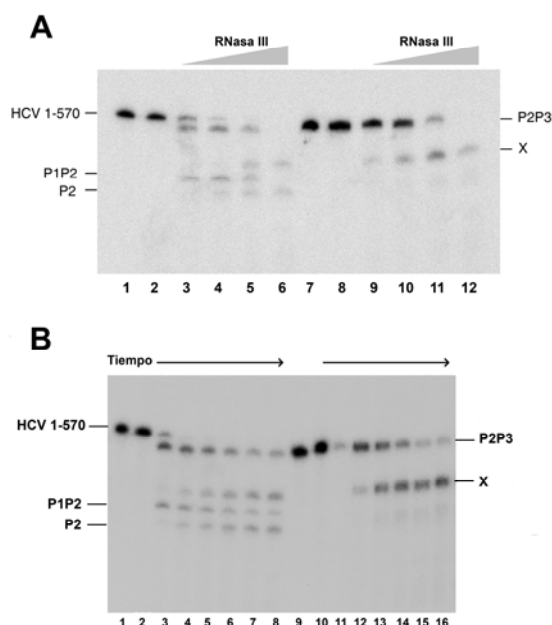


Figura 3: A: El nuevo corte detectado por la RNasa III de *E. coli* sobre el sustrato de RNA 1-570nt de HCV (carriles 1-6) se ve potenciado cuando se emplea como sustrato de reacción el producto de mayor tamaño P2P3 (carriles 7-12). Se muestran las calibraciones de ambos RNAs a 4 concentraciones diferentes de RNasa III: 0.0001 U/ μ l (carriles 3 y 9), 0.0005 U/ μ l (carriles 4 y 10), 0.001 U/ μ l (carriles 5 y 11) y 0.005 U/ μ l (carriles 6 y 12). Carriles 1 y 7 RNA incubado en hielo. Carriles 2 y 8 RNA incubado en tampón de reacción. La nueva banda se designa como X. **B:** Análisis cinético en paralelo de la RNasa III de *E. coli* sobre los sustratos de RNA 1-570nt de HCV (carriles 1-8) y P2P3 (carriles 9-16). Carriles 1 y 9 RNA incubado en hielo. Carriles 2-8 incubación secuencial de 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos a una concentración de RNasa III de 0.0005 U/ μ l. Carriles 10-16 muestran los mismos tiempos de reacción, a la misma concentración de enzima para el RNA P2P3.

El nuevo corte de la RNasa III es específico.

Debido a que el RNA de HCV no es un sustrato canónico para la RNasa III, debe demostrarse que la banda X es un producto específico de dicha RNasa y no de cualquier otra RNasa contaminante. Por esta razón se comprobó la naturaleza química de los extremos, que debía ser la propia para la RNasa III (5'P y 3'OH), mediante experimentos de tipo enzimático: tratamiento con RNA ligasa, fosfatasa y quinasa (Figura suplementaria 1).

Determinación de la secuencia correspondiente a la banda X.

La determinación de la secuencia exacta de los extremos 5' y 3' del producto X se realizó por circularización del RNA, seguida de retrotranscripción, PCR y posterior subclonaje. Los nuevos cortes se localizaron en 5'A₂₉/A₃₄ y en 3'G₄₉₀.

La posición A₂₉/A₃₄ corresponde a la región de RNA de doble cadena formada por el anillamiento a larga distancia descrito previamente y detectado a baja concentración de RNasa III. El nuevo punto de corte entre la G₄₈₉ y la G₄₉₀ se sitúa, dentro de la estructura secundaria, prácticamente frente a la posición 428-442 del dominio VI (**Figura 1C**). Esto sugiere que el tallo lazo VI es una conformación alternativa al LRA.

Factores implicados en el cambio conformacional.

Los resultados descritos sugieren que la secuencia 428-442 puede hibridar con una secuencia de RNA de cadena sencilla dentro del dominio I (formando el LRA) o puede interactuar con la base del tallo lazo VI (permitiendo la aparición de la banda X al digerir con RNasa III). Con objeto de profundizar en el mecanismo que conduce la transformación

estructural, se abordó la influencia de secuencias en *cis* o en *trans* sobre el cambio conformacional.

Elementos actuando en cis.

Para definir los elementos de secuencia participantes en el *switch* se llevaron a cabo reacciones enzimáticas con RNasa H y RNasa III empleando oligodesoxinucleótidos (ODN) como moléculas ‘bloqueantes’ y experimentos con transcritos truncados como sustratos de reacción.

Se estudió el patrón de corte de la RNasa III sobre el RNA 1-570 de HCV en presencia del ODN 22(-) y una batería de ODN de 20nt de longitud, complementarios a distintas regiones

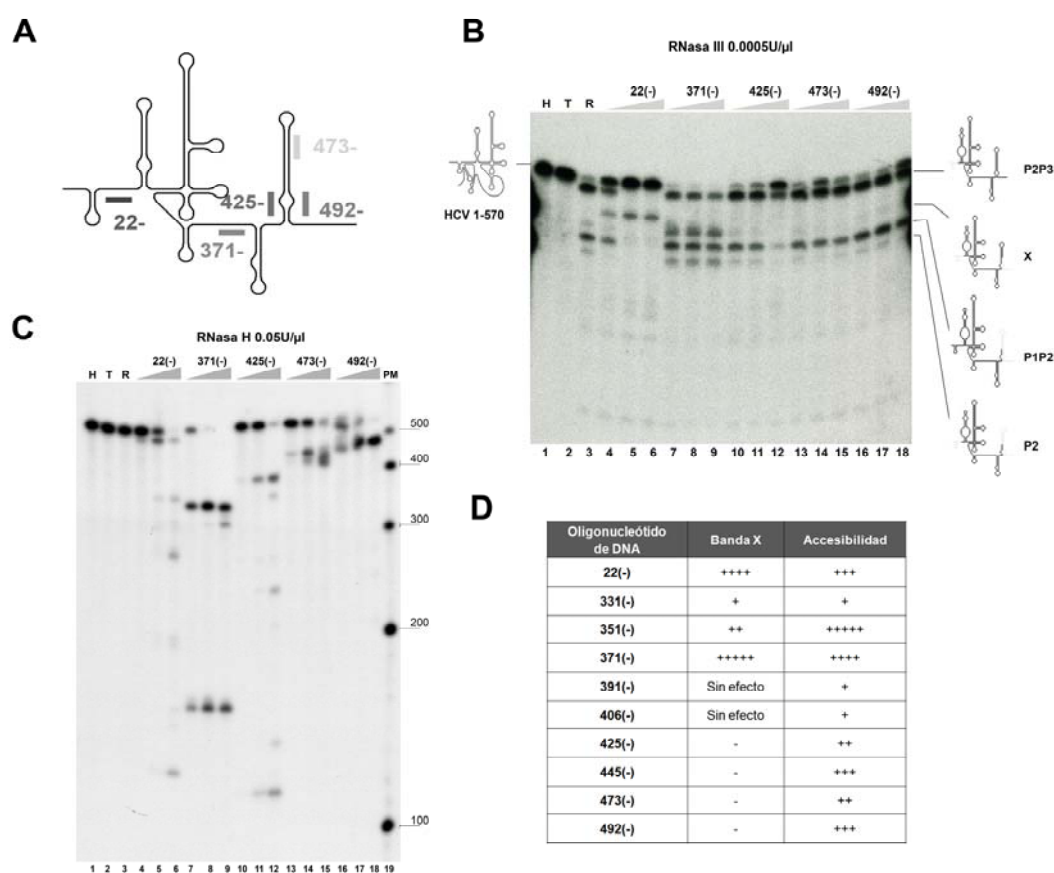


Figura 4: **A:** Diagrama esquemático de la estructura del RNA 1-570 de HCV sobre el que se resalta una batería de oligonucleótidos de DNA (ODN) complementarios a diferentes regiones. Cada oligonucleótido tiene una longitud de 20-mer y comienza en la base indicada numéricamente que lo nombra. El signo negativo designa secuencia complementaria. **B:** Reacción de corte de la RNasa III de *E.coli* a 0.0005 U/μl sobre el RNA 1-570nt de HCV en presencia de una serie de ODN complementarios a las regiones del genoma: 22(-), 371(-), 425(-), 473(-) y 492(-). Carriles 1 y 2 RNA incubado en hielo o en tampón de reacción respectivamente. Carril 3 reacción control sin ODN. Carriles 4-6: reacciones en presencia de cantidades crecientes del ODN 22(-). Carril 4 a 15nM, carril 5 a 150nM y carril 6 a 1500nM. Lo mismo para los carriles 7-9, 10-12, 13-15 y 16-18 con los ODN 371(-), 425(-), 473(-) y 492(-) respectivamente. **C:** Análisis de los productos de corte de RNasa H de *E.coli* al hibridar ODN complementarios con el RNA 1-570nt de HCV. Carril 1 RNA incubado en hielo, carril 2 incubado en tampón de reacción, carril 3 incubado en tampón con 0.5U/μl de RNasa H. Carriles 4-18 reacciones de anillamiento con una serie de ODN complementarios (indicados en la parte superior de la autorradiografía) a concentraciones crecientes de 15nM, 150nM y 1500nM. Carril 19 pesos moleculares. **D:** tabla resumen de los cambios de reactividad del RNA 1-570 de HCV con la RNasa III, en presencia de los diferentes ODN. La columna “X” refleja la activación relativa del corte de la RNasa III en el punto X (incluye los fragmentos X y P1X). La columna “accesibilidad” indica la sensibilidad relativa del RNA 1-570nt a cortarse con RNasa H en presencia del ODN complementario.

comprendidas entre los dominios IV y VI. Los resultados se muestran en la **figura 4B**. El ODN 22 (-) imposibilita la formación del LRA, promoviendo el corte en la posición X y generando la banda P1X, de migración retardada respecto a X (ver sección de resultados '*Elementos actuando en trans*'). Los ODNs 473(-) y 492(-) inhiben en baja proporción el corte en el punto X a una concentración de RNasa III de 0.0005 U/ μ l, sin producir efectos colaterales. En principio no se esperaba que estos oligonucleótidos originaran ninguna alteración. Cuando el experimento fue repetido a mayor concentración enzimática (0.001 U/ μ l de RNasa III) y, por tanto, en condiciones favorables para la conformación abierta, la mezcla de ODNs 473(-) y 492(-) fue capaz de impedir la formación de la banda X (Figura suplementaria 2). El resultado más relevante lo proporcionó el ODN 425(-); el más eficaz inhibiendo todos los productos de digestión de la RNasa III. Dado que la secuencia 428-442 está implicada teóricamente en la formación de ambas estructuras, no sorprende que el ODN 425(-) inhiba las bandas características del patrón propio tanto de la conformación cerrada como de la conformación abierta. Resultó inesperado el fomento en la reacción de corte al emplear el ODN 371(-) en las dos regiones (LRA y punto X). Sin embargo predicciones de estructura secundaria para el RNA 1-570 de HCV empleando el programa *Mfold*, advertían la posible interacción entre parte de la secuencia bloqueada por el ODN 371(-) y la secuencia 428-442. Concretamente la secuencia $_{372}$ ACCAAACG $_{379}$, que se expande entre los dominios IV y V (habitualmente representada como RNA de cadena simple), podría hibridar con la secuencia $_{431}$ CGUUGGU $_{437}$ localizada en la base de la hebra izquierda del tallo lazo VI. Si esta interacción ocurriese, el tallo lazo VI se vería alterado y en consecuencia la formación de la banda X estaría obstaculizada; o también podría dificultarse la formación del LRA, impidiendo la aparición de la estructura abierta. Por esta razón el bloqueo de la región 371-390 ayudaría al plegamiento adecuado tanto de la conformación cerrada como de la abierta y en consecuencia la RNasa III podría cortar en una y otra estructura. Por ello concluimos que la secuencia $_{372}$ A-G $_{379}$ es un elemento adicional a tener en cuenta en el fenómeno de *switch*. Los ODN complementarios a los dominios IV y V no tuvieron efecto sobre el patrón de RNasa III (**Figura 4D**). Para descartar que la ausencia de efecto de un ODN en particular sobre el patrón de la RNasa III fuese debida a la insuficiente hibridación del ODN con el sustrato, se efectuó un análisis de accesibilidad mediante digestión con RNasa H. Los resultados obtenidos en presencia de la batería de ODN comentados (**Figura 4C**) indican que, al menos a la concentración más alta, los oligonucleótidos eran capaces de hibridar a saturación con el RNA 1-570 de HCV. Si bien para el caso de los ODN 371(-), 391(-) y 473(-) anillaban con un 80% del material de partida (datos no mostrados).

De forma paralela se realizaron ensayos con el RNA 1-570 de HCV y transcritos truncados consecutivamente en el extremo 3' (RNA 1-466 y RNA 1-402 de HCV). Los transcritos fueron digeridos con RNasa III o con RNasa H en presencia del ODN 22(-). La **figura 5A** muestra como el fragmento de 466nt es procesado hasta la totalidad a mayor velocidad que el fragmento de 570nt. Este resultado apunta a la idea de que secuencias en el extremo 3' participan en la desestabilización de la conformación cerrada. Atendiendo a los resultados de digestión con RNasa H, el RNA 1-466 es ahora menos accesible al ODN 22(-) que el fragmento de 570nt o el de 402nt (que carece de los dominios V y VI). Debido a que el RNA 1-570 es cortado a mayor velocidad queda descartado el impedimento estérico como razón para explicar las diferencias de velocidad en el procesamiento observadas en la **figura 5A**. Se atribuyó este comportamiento al efecto competitivo que ejerce la secuencia 428-442 sobre la zona de interacción del ODN 22(-). En el caso del RNA 1-570 el efecto competitivo se encuentra mermado por la posible formación del dominio VI, que liberaría la secuencia diana para el ODN 22(-) (**Figura 5B**). Por tanto los datos de RNasa H confirman los obtenidos utilizando RNasa III, e indican que las secuencias implicadas en la formación del tallo del dominio VI comprometen seriamente la estabilidad del

anillamiento a larga distancia. Recapitulando, los resultados experimentales indican una interacción competitiva entre las regiones de secuencia 22-40nt y la secuencia localizada en la base del tallo lazo VI (486-501) por unirse a la zona comprendida entre los nucleótidos 428-442.

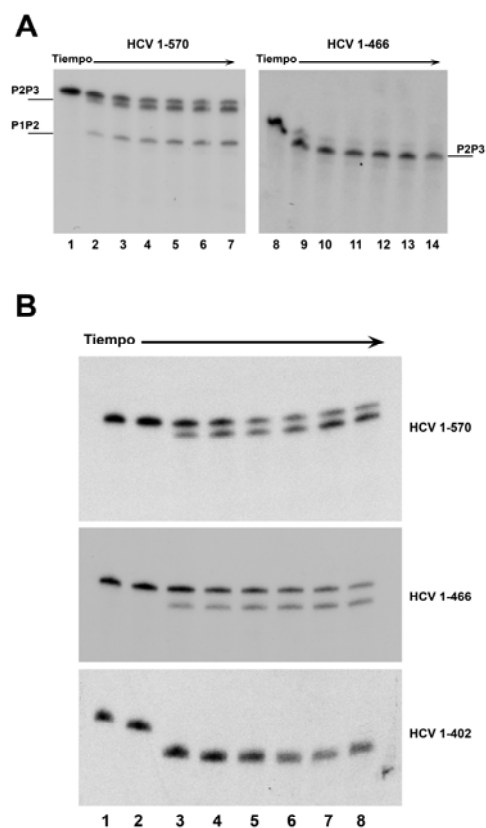


Figura 5: Efecto de las secuencias en el extremo 3' sobre la estabilidad de la conformación cerrada del fragmento 1-570 de HCV empleando transcritos truncados. **A:** Cinéticas de procesamiento de la RNasa III de *E.coli* a 0.0005 U/ μ l sobre dos transcritos: RNA 1-570 de HCV que cuenta con el dominio VI (carriles 1-7), y el RNA 1-466 de HCV que carece de la hebra derecha del dominio VI complementaria a la región 428-442 (carriles 8-14). Carriles 1 y 8 reacción a tiempo cero. Carriles 2-7 y 9-14 corresponden a diferentes tiempos de incubación: 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos. **B:** Cinéticas del procesamiento de la RNasa H de *E.coli* a 0.5 U/ μ l en presencia del ODN 22(-) a 15nM, empleando 3 transcritos: RNA 1-570, 1-466 y 1-402 de HCV. Carril 1 RNAs incubados en hielo, carril 2 reacción a tiempo 0, carriles 3-8 alícuotas extraídas de la reacción cada 10 minutos hasta un tiempo máximo de 1 hora.

Elementos actuando en trans: miR-122.

Como se ha comentado anteriormente, los productos de digestión con RNasa III de *E.coli* nos permitieron distinguir dos conformaciones mutuamente excluyentes dentro de la región 1-570 del genoma de HCV. Debido a que el micro RNA hepático humano miR-122 posee dianas de interacción descritas dentro de la región implicada en el anillamiento a larga distancia (Jopling et al, 2005), se consideró esta molécula como un candidato idóneo capaz de favorecer el tránsito entre ambas conformaciones. Tras examinar los productos de digestión con RNasa III después de forzar la aparición de la conformación abierta empleando el ODN 22 (-) o el miR-122, se observó un patrón de bandas semejante al obtenido en la reacción control. Esto indicó que las posiciones de corte se encontraban en lugares similares (**Figura 6** carriles 4-6) salvo para el caso particular de la banda denominada P1X, cuya migración electroforética era más lenta que la mostrada por X. Se propone el siguiente razonamiento para explicar la aparición de la banda P1X: tanto el ODN 22(-) como el miR-122 portan secuencias complementarias a la secuencia 20-40 del RNA 1-570 de HCV e hibridando con él causan la aparición de la conformación abierta y en consecuencia el corte en el punto X. Simultáneamente el apareamiento del ODN 22(-) genera un dúplex DNA/RNA, y del miR-122 un dúplex RNA/RNA, que no representan sustratos válidos para la RNasa III, imposibilitando parcialmente el corte dentro de la región 20-40. Esta es la razón de que en presencia de cada una de las sondas aparezca un nuevo fragmento, que comienza en el nucleótido 1 (P1X) en lugar de 27/34 (X), y se extiende hasta el nucleótido 490. La

autorradiografía de la figura 6 demostró que el nuevo producto de corte de la RNasa III (P1X) observado en el transcrito marcado internamente con GTP[α - 32 P], contiene el grupo 5' trifosfato, pues aparece claramente en el transcrito marcado en 5' con GTP[γ - 32 P] (**Figura 6** carriles 10 y 11). Asimismo, el marcaje en 3' con pCp[5'- 32 P] evidenció en primer lugar que el extremo 3' de las nuevas bandas coincidía con las previamente caracterizadas, y además que la banda denominada Y (compañera de X, con la cual suma la longitud completa de 570nt), incrementa su intensidad cuando la digestión se realiza en presencia del ODN 22(-) o del miR-122. Conjuntamente los resultados del experimento mostrado en la figura 6 demuestran que la nueva banda obtenida al digerir con RNasa III en presencia del ODN 22(-) o del miR-122 contiene el nucleótido 1 y el extremo 3' de la banda X, por lo que podemos afirmar que es P1X.

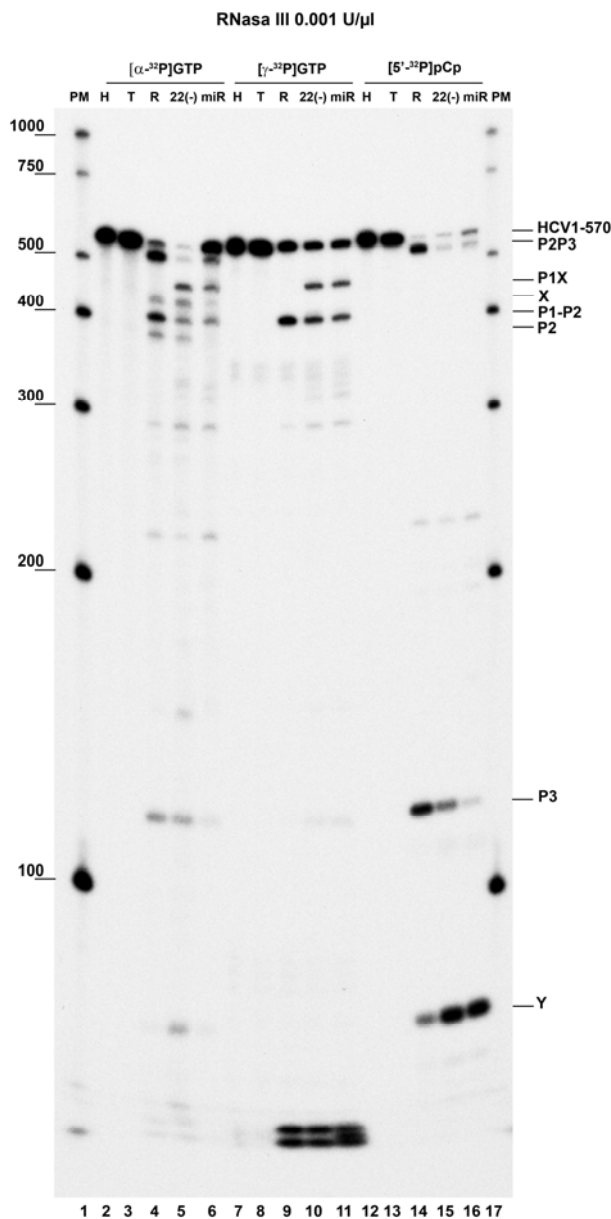


Figura 6: Localización del nuevo producto de corte de la RNasa III de *E.coli* inducido por la presencia del ODN 22(-) y del miR-122. Se emplean diferentes marcajes del RNA 1-570 de HCV: internamente (carriles 2-6), marcado en el extremo 5' (carriles 7-11) y marcado en el extremo 3' (carriles 12-16). Carriles 2, 7 y 12 RNA incubado en hielo. Carriles 3, 8 y 13 RNA incubado en tampón de reacción. Carriles 4, 9 y 14 reacciones con RNasa III a 0.001U/μl. Carriles 5, 10 y 15 la misma reacción en presencia de ODN 22(-) a 150nM. Carriles 6, 11 y 16 la misma reacción en presencia del miR-122 a 15nM. Los productos de corte previamente caracterizados se indican en el margen derecho. Carriles 1 y 17 pesos moleculares

Análisis cinético del corte de la RNasa III de *E.coli* sobre el fragmento de RNA 1-570 de HCV en presencia o ausencia del miR-122.

Por todo lo anteriormente expuesto, queda establecido que los productos P2P3 y P2 son representativos de la conformación cerrada, mientras que X y P1X son característicos de la conformación abierta. Para estudiar la secuencia de acontecimientos y la eficiencia de corte durante el cambio estructural, se realizó un abordaje cinético.

Se llevaron a cabo tres modalidades de experimentos con el RNA 1-570nt como sustrato a dos concentraciones de enzima (0.0005 U/μl y 0.001 U/μl): i) en ausencia de miR-122, ii) en presencia de miR-122 a distintas concentraciones (1.5nM, 15nM y 150nm) sin incubación previa a la adición del enzima, iii) en reacciones preincubadas en presencia de miR-122 a las mismas concentraciones descritas en ii. El patrón de corte para una pareja de estos ensayos cinéticos con RNasa III se muestra en la **figura 7A** y **7B**. Los resultados de un conjunto de experimentos cinéticos se resumen en la **figura 7C**, en la cual se comparó gráficamente la formación de los

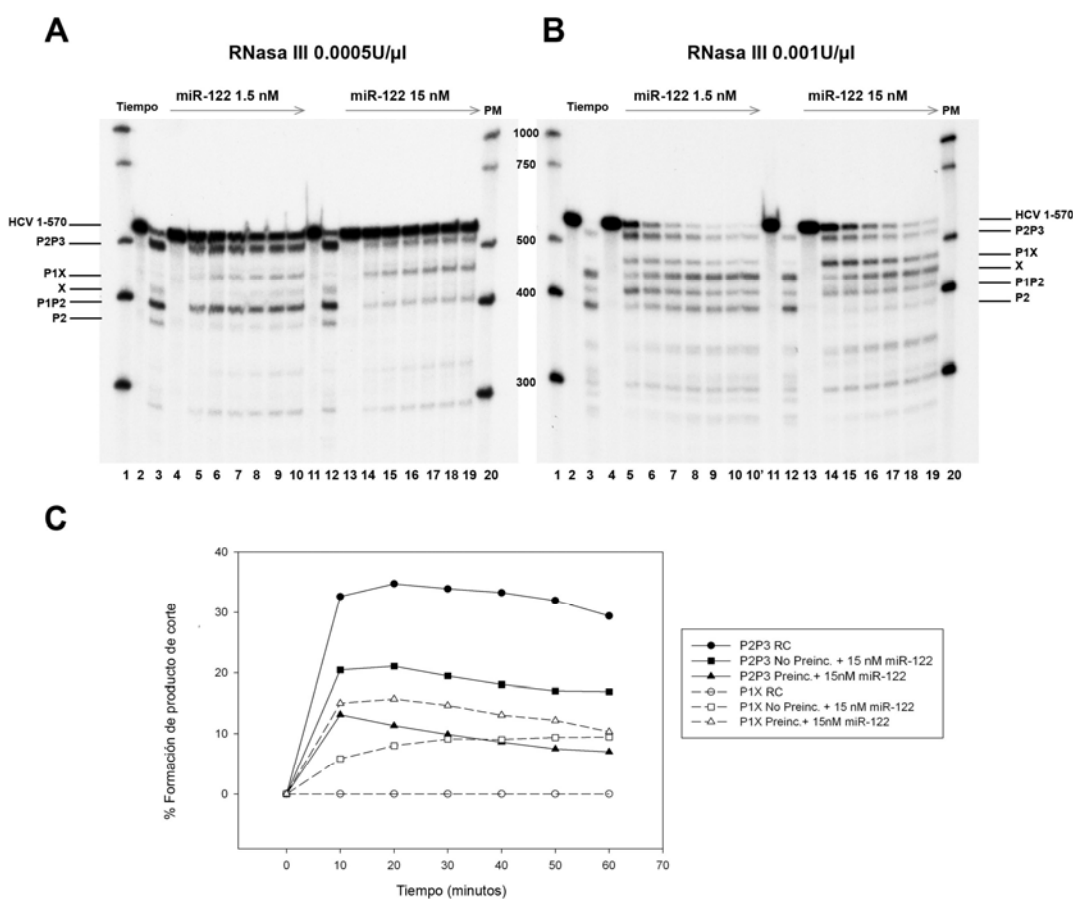


Figura 7: **A:** Cinética de la reacción de corte del RNA 1-570 de HCV con RNasa III de *E.coli* a 0.0005U/μl en presencia del miR-122 a 1.5nM (carriles 4-10) y 15nM (carriles 13-19). Dentro de cada perfil de reacción (carriles 4-10 y 13-19), de izquierda a derecha, cada carril corresponde a un tiempo de incubación: 0, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos. Carriles 2 y 11 RNA incubado en hielo. Carriles 3 y 12 reacciones control en ausencia de miR-122. Carriles 1 y 20 pesos moleculares. **B:** lo mismo que “A” pero a una concentración de RNasa III de 0.001 U/μl. Se indican las bandas producto a ambos márgenes de las autorradiografías. **C:** Representación gráfica de los productos de corte P2P3 y P1X en la reacción con RNasa III a 0.001 U/μl en distintas condiciones: reacción control (RC), en presencia de miR-122 pero sin preincubar, o preincubadas a 15nM miR-122.

productos P2P3 y P1X a lo largo del tiempo en ausencia o presencia del miR-122 a una concentración de 15nM y 0.001 U/ μ l de RNasa III. En ausencia de miR-122 la formación de P2P3 es muy rápida, cerca del valor máximo transcurridos 10 minutos de reacción. La presencia del miR-122 disminuye significativamente la aparición de P2P3, lo cual demuestra que el micro RNA compite activamente en la formación del anillamiento a larga distancia. El producto P1X sólo puede ser cuantificado en presencia del miR-122, siendo su producción mayor en reacciones que cuentan con preincubación. El análisis cinético indica pues que el miR-122 fuerza la aparición de la conformación abierta partiendo de la cerrada.

Confirmación en geles nativos del cambio estructural inducido por el miR-122.

Se realizaron ensayos de asociación en geles nativos en presencia de diferentes oligonucleótidos con objeto de evidenciar el cambio estructural entre las conformaciones abierta y cerrada del fragmento de RNA 1-570nt de HCV. Se emplearon como posibles inductores del *switch* los siguientes oligonucleótidos: i) el ODN 22(-), ii) el miR-122, iii) el oligoribonucleótido miR-122 Δ 1, que corresponde a la mitad de la secuencia del miR-122 que cuenta con la región de reconocimiento, y iv) a modo de control la mitad restante de secuencia del miR-122, carente de secuencia de reconocimiento (miR-122 Δ 2). Los resultados se muestran en la **figura 8**. En primer lugar se aprecia que la banda radiactiva de RNA en presencia del tampón de reacción pasa de ser difusa a concentrarse en una banda más definida: esto confirma los estudios previos que establecen la importancia del magnesio para un adecuado plegamiento de la región 5' del RNA de HCV (Kieft et al, 1999). Tras incubar el RNA con concentraciones crecientes de ODN 22(-) se observó la aparición brusca de una banda de retardo en el gel entre las concentraciones 15nM y 150nM de oligonucleótido (**Figura 8A**, carriles 3-5). Los resultados obtenidos a concentraciones crecientes de miR-122 son semejantes salvo para una banda de retardo excesivo presente a la concentración de micro RNA más alta (**Figura 8B**, carril 5). El efecto fue imperceptible cuando se empleó únicamente la secuencia de reconocimiento (Figura 8B, carriles 8-10) y nulo con la secuencia *seed* deletada (Figura 8A, carriles 8-10). Se realizó un experimento control para descartar que el efecto de retardo observado en gel no fuese debido al incremento de peso molecular del complejo RNA sustrato-oligonucleótido, aunque la unión de la sonda representase

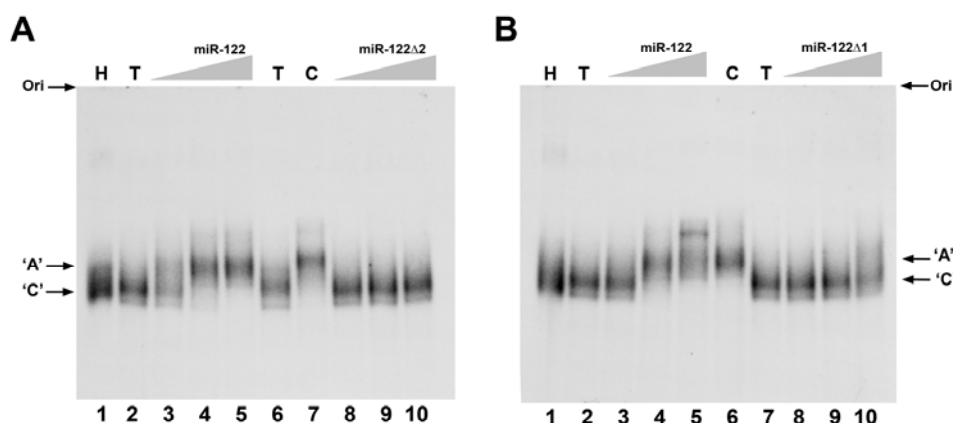


Figura 8: Estudio en geles nativos del cambio conformacional producido en el RNA 1-570 de HCV. **A:** se muestra el RNA a 0.6nM incubado en hielo (carril 1), en tampón de reacción (carriles 2 y 6), en presencia de ODN 22(-) a 15nM, 150nM y 1500nM (carriles 3-5) o en presencia del oligonucleótido de RNA miR-122 Δ 2, que carece de la secuencia consenso de reconocimiento, a 1.5nM, 15nM y 150nM (carriles 8-10). Carril 7 control de movilidad con ODN 22(-) a 1500nM. **B:** carril 1 el mismo RNA incubado en hielo. Carriles 2 y 7 RNA incubado en tampón de reacción. Carriles 3-5 RNA incubado en presencia del miR-122 a 1.5nM, 15nM y 150nM. Carril 6 control con ODN 22(-) a 1500nM. Carriles 8-10 RNA incubado en presencia del oligonucleótido de RNA miR-122 Δ 1, que incluye la secuencia de reconocimiento del miR-122 (5'U GGAGUGU GA3'), a 1.5nM, 15nM y 150nM. Las flechas indican la conformación abierta ('A') o cerrada ('C'). Ori designa el origen de electroforesis.

un 3.5% en peso y carga. El ODN 188(-) de 20-mer, complementario a la región apical del tallo lazo III del RNA 1-570, no produjo ningún cambio en movilidad electroforética (Figura suplementaria 3).

En otro experimento se modificaron las condiciones de hibridación con las sondas y el RNA 1-570nt. Se averiguó que precalentando a 90°C en agua y enfriando lentamente en tampón de reacción en presencia del miR-122 a 1.5nM el micro RNA hepático era capaz de causar un retraso en movilidad de todas las cuentas radiactivas (datos no mostrados). Previamente se había demostrado que la hibridación del ODN 22(-) sobre su diana estaba favorecida en estas condiciones (Lyons et al, 2001). Unidos ambos resultados confirman que el factor limitante a la hora de promover el *switch* estructural es la capacidad de las sondas para acceder a sus regiones de RNA diana.

Finalmente, se exploró el efecto de una serie de mutantes dentro de la secuencia de reconocimiento del miR-122, sobre el cambio conformacional. Los resultados muestran que tan solo son necesarias dos mutaciones localizadas en medio de la secuencia de reconocimiento para impedir la aparición de la banda de retardo en gel, indicativa de la conformación abierta (**Figura 9B**, carriles 7-9). Esto demuestra que la inducción del *switch* es el resultado de la interacción específica del miR-122 con el RNA 1-570 HCV.

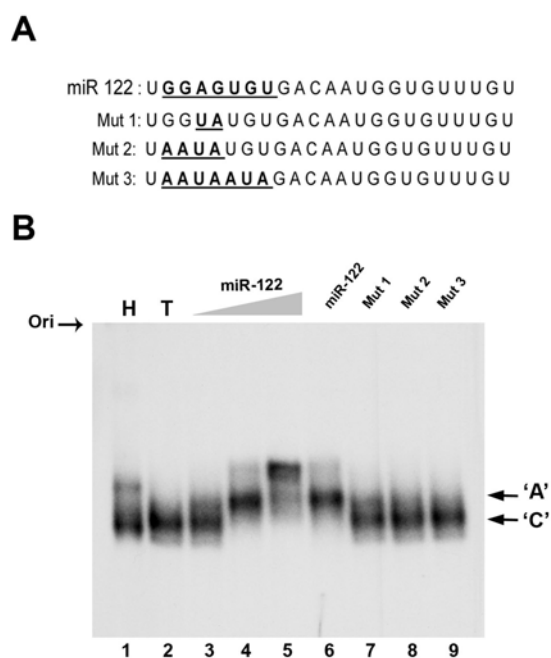


Figura 9: Efecto de las mutaciones en la secuencia de reconocimiento del miR-122 sobre la conformación del RNA 1-570 de HCV. **A:** Secuencia del miR-122 y 3 mutantes. Las mutaciones dentro de la secuencia consenso se destacan subrayadas y en negrita. **B:** Ensayo en gel nativo para el RNA 1-570 de HCV a 0.6nM. Carril 1 RNA incubado en hielo. Carril 2 incubado en tampón de reacción. Carriles 3-5 RNA incubado en presencia del miR-122 a 1.5nM, 15nM y 150nM. Carriles 6-8 incubado con miR-122 y sus respectivos mutantes a una concentración de 15nM. Las flechas indican la conformación abierta ('A') o cerrada ('C'). Ori designa el origen de electroforesis.

Efecto del lisado de reticulocitos de conejo (RRL) sobre la reacción de switch inducida por el miR-122 en el RNA 1-570 de HCV.

Para averiguar si la conformación abierta podía ser inducida y mantenida en un contexto biológico de mayor relevancia, se realizaron digestiones en presencia de un lisado de reticulocitos de conejo al 5%, 10%, 20% y 40% vol/vol. Estos porcentajes se corresponden con una concentración proteica dentro del rango 1-8 µg/µl. La **figura 10** muestra los cambios del patrón característico de la RNasa III sobre el RNA 1-570 de HCV a dos concentraciones de RRL (5% y 10%). El RNA resistió durante una hora de incubación sin sufrir degradación, lo cual constituía el

requisito mínimo para la ejecución del ensayo. Sin embargo, esta condición no fue superada al intentar replicar el experimento en la fracción S20 extraída de la línea celular humana Hek-293 (resultados no mostrados). No obstante dos razones impidieron la obtención de resultados concluyentes a partir de estos experimentos. La primera es la aparición de dos nuevas bandas de corte muy cercanas a los productos informativos, que se observan con claridad en los carriles 5 y 10 (controles en ausencia de RNasa III). Una de estas bandas casi solapa con P1X. La segunda razón es consecuencia del efecto inhibitorio sobre la reacción de digestión con RNasa III al incrementar la concentración proteica del lisado. La inhibición es parcial al 5% y al 10%. Las bandas P2P3 y P2 eran prácticamente indetectables a una concentración de lisado del 20%. Al 40% la reacción de la RNasa III era totalmente inhibida. A pesar de estas dos restricciones pudimos deducir que el miR-122 era capaz de impedir la formación de las bandas típicas de la conformación cerrada (P2P3 y P2) a las concentraciones de RRL mostradas (5% y 10%), incrementando visiblemente la aparición de la banda P1X. Aunque esta banda puede formarse debido al cambio conformacional del RNA, o a la actividad nucleasa propia del lisado.

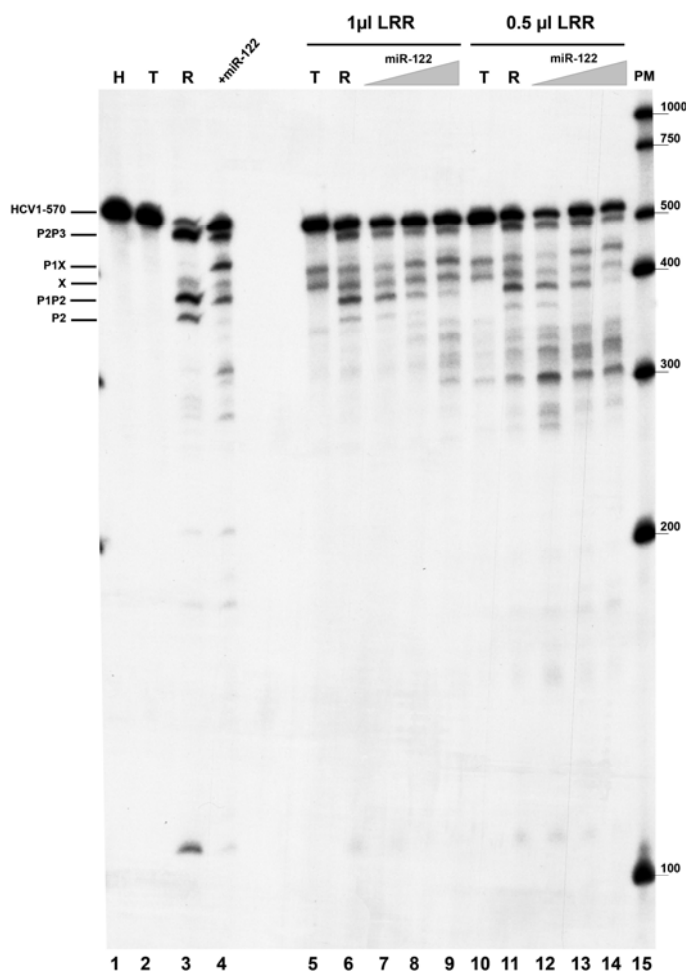


Figura 10: Efecto del lisado de reticulocitos de conejo (RRL) sobre la reacción de *switch* inducida por el miR-122 en el RNA 1-570 de HCV, detectada mediante digestión con RNasa III de *E.coli*. Reacciones estándar con RNasa III a 0.001 U/μl en ausencia (carriles 3 y 4) o en presencia de 1 o 0.5 μl de lisado de reticulocitos de conejo (carriles 5-9 y 10-14 respectivamente). Carriles 2, 5 y 10 RNA controles en ausencia de enzima. Carriles 3, 6 y 11 reacciones con RNasa III. Carriles 7-9 y 12-14 cantidades crecientes de miR-122 (1.5nM, 15nM y 150nM). Carril 4 reacción control en presencia de miR-122 a 15nM. Carril 1 RNA incubado en hielo. Carril 15 pesos moleculares.

Reversibilidad del switch.

Para investigar la posible reversibilidad del cambio conformacional se forzó la apertura de la estructura cerrada empleando el ODN 22(-). Se preincubó el RNA 1-570 de HCV durante una hora con el ODN 22(-) a una concentración de 1.5 μM . Posteriormente, el oligonucleótido fue eliminado mediante tratamiento con DNasa RQ1, lo que debería permitir la reversión a la estructura original. Se extrajeron alícuotas cada 10 minutos que fueron sometidas inmediatamente a una digestión con RNasa III de *E.coli* a 0.001U/ μL . Como se observa en la **figura 11**, la conformación cerrada no se recupera puesto que no hay bandas producto características de la formación del anillamiento a larga distancia. Se observa claramente la aparición de la banda X, indicativa de la presencia del tallo lazo VI, junto a un incremento de la cantidad de sustrato no reactivo. Esto parece indicar la aparición de una tercera conformación ‘resistente’ al procesamiento de la RNasa III. Se realizó el mismo experimento con el fragmento P2P3 siendo el resultado semejante. Estas observaciones apoyarían la hipótesis de una tercera estructura, que podría ser aquella conformación estabilizada por la secuencia comprendida entre los nucleótidos 371-390 por complementariedad con la hebra izquierda del tallo lazo VI, comentada anteriormente (ver efecto del ODN 371 (-) en *Factores implicados en el cambio conformacional actuando en cis*).

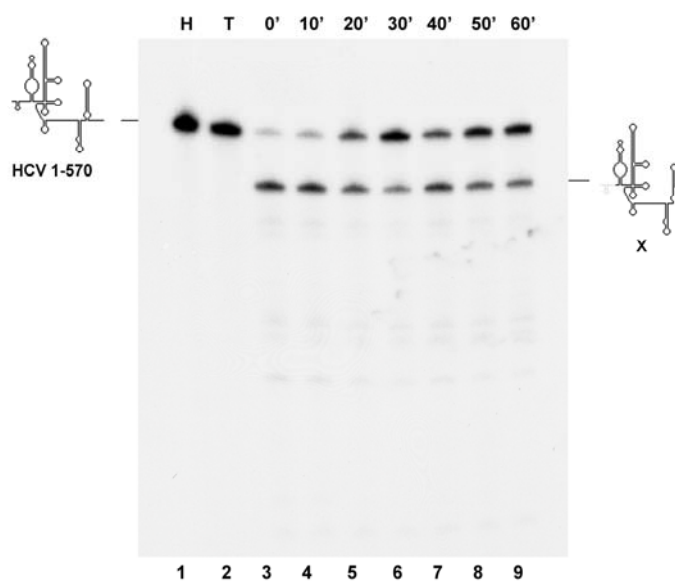


Figura 11: Reversibilidad del cambio conformacional. Se preincubó el RNA 1-570 de HCV durante una hora con el ODN 22(-) a una concentración de 1.5 μM para forzar la formación de la estructura abierta. Posteriormente fue eliminado mediante tratamiento con DNasa RQ1, y se permitió la restructuración en el tampón de reacción. Se extrajeron alícuotas cada 10 minutos que fueron sometidas a inmediata digestión con RNasa III de *E.coli* a 0.001U/ μL . Carril 1 RNA incubado en hielo, carril 2 incubado en tampón de reacción. Carriles 3-9 RNAs incubados de 10 a 60 minutos con DNasa previo procesamiento con RNasa III.

RESULTADOS 2

“Identificación y caracterización de elementos de estructura tipo tRNA dentro de la población de mRNAs hepáticos humanos: ejemplo del mRNA *IFNA5*”

Calibración de las dos actividades RNasa P empleadas para la detección de señales tipo tRNA.

El trabajo experimental se efectuó empleando dos actividades RNasa P de distinto origen: 1) la RPR procedente de la cianobacteria *Synechocystis sp.*, capaz de reconocer y procesar precursores del tRNA que carecen de la secuencia CCA en su extremo 3' terminal (Pascual & Vioque, 1999), y 2) un extracto purificado a partir de células HeLa enriquecido en actividad RNasa P. Ambas actividades fueron calibradas inicialmente en reacciones de procesamiento sobre el pre-tRNA^{Tyr} de *E.coli* como sustrato estándar, y sobre el RNA 1-570 de HCV como sustrato portador de una estructura tipo tRNA.

En el caso de la RNasa P humana (referido en lo sucesivo al extracto enriquecido procedente de células HeLa), se emplearon cantidades desiguales de extracto en las reacciones de digestión en función del grado de procesamiento requerido para el experimento; condiciones saturadas ó no saturadas. La reacción según protocolo estándar se ensayó empleando 0.5µl de extracto en 10µl de volumen de reacción, lo que implicaba reacciones de procesamiento muy distantes a la saturación para sustratos diferentes al pre-tRNA^{Tyr} (e.g. RNA HCV en torno al 15%). Sin embargo para la reacción de digestión del pre-tRNA^{Tyr} de *E.coli* estas condiciones suponían un 90% en la tasa de corte. Debido a este comportamiento, en el caso de los experimentos de inhibición competitiva sobre el procesamiento del pre-tRNA^{Tyr} fue necesario diluir 4 veces la actividad empleada en la reacción estándar para obtener reacciones con un porcentaje de corte comprendido entre el 40-60%.

Análisis por competición enzimática de la presencia de estructuras tipo tRNA dentro de la población de mRNAs hepáticos humanos.

Con el objeto de desvelar la posible presencia de motivos estructurales semejantes al tRNA en la población de mRNAs hepáticos humanos se realizaron ensayos de inhibición competitiva. Se empleó el pre-tRNA^{Tyr} de *E.coli* marcado internamente con GTP[α -³²P] como molécula sustrato en la reacción y el extracto con actividad RNasa P humana como actividad procesadora. La concentración de sustrato utilizada fue de 0.9 nM, valor inferior a la constante de afinidad observada previamente empleando el mismo procedimiento ($K_m=10$ nM) (Yuan & Altman, 1995). Se probaron cantidades crecientes de mRNA hepático humano como competidor (**Figura 1A**), y los resultados fueron comparados con los obtenidos en competiciones con cantidades crecientes de pre-tRNA^{Tyr} frío (**Figura 1B**), y poli-r(A) (**Figura 1C**). El poli-r(A) es un homopolímero sintético que no es sustrato para la RNasa P (Kole & Altman, 1981); su comportamiento nos permitió evaluar el efecto de competición no específico producido por el incremento en masa del RNA incluido en las mezclas de reacción. Para establecer una relación molar entre los competidores de RNA se asumió un tamaño promedio de 2250nt para los mRNAs hepáticos y de 3000nt para el poli-r(A), según la información proporcionada por la casa comercial.

En base a los resultados obtenidos en las competiciones en fase lineal, se requiere una concentración de 4.36 ± 1.6 nM de pre-tRNA^{Tyr} frío, y de 0.63 ± 0.17 nM para el caso de los mRNAs hepáticos para alcanzar un 50% de inhibición en la reacción de procesamiento de la RNasa P humana sobre el pre-tRNA^{Tyr} de *E.coli* (**Figura 1D**). Esto indicó un efecto inhibitor más potente para el caso de la población de RNAs mensajeros hepáticos. Cuando la actividad inhibitora de estas moléculas se analizó desde la perspectiva de la masa de RNA añadida a la reacción (**Figura 1E**), se observó que era necesario una masa 2.5 veces superior de mRNAs

hepáticos que de pre-tRNA^{Tyr} para alcanzar el valor del 50% de inhibición en la reacción de procesamiento. El análisis de inhibición competitiva a mayor concentración de enzima (condiciones saturantes de reacción) reveló un incremento en la concentración tanto de pre-tRNA^{Tyr} frío, como de mRNAs hepáticos para inhibir la reacción. Ambos competidores mostraron curvas de inhibición muy similares bajo estas condiciones (Figura suplementaria 1).

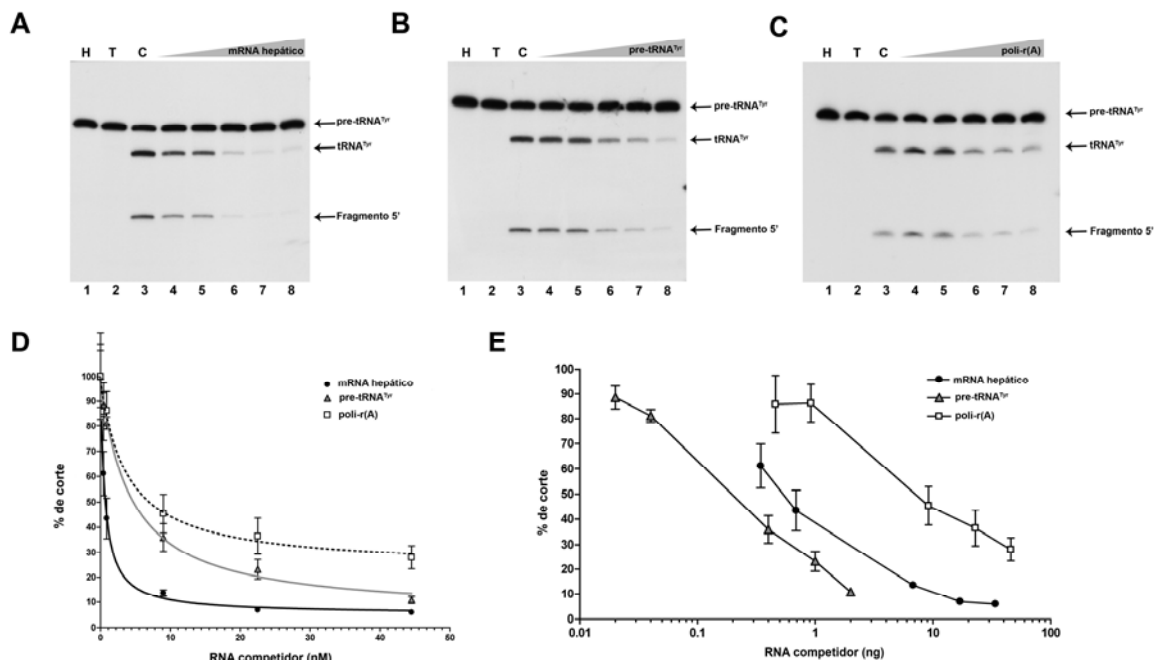


Figura 1: Ensayos de inhibición competitiva sobre la reacción de procesamiento del precursor tRNA^{Tyr} por RNasa P humana. El pre-tRNA^{Tyr} de *E. coli* (131nt) marcado internamente fue sujeto a digestión con RNasa P humana en presencia de cantidades crecientes de diferentes moléculas de RNA actuando como competidores en la reacción. Para todos los paneles el carril 1 corresponde al RNA sustrato incubado en hielo (H), el carril 2 al RNA incubado en tampón de reacción (T), y el carril 3 a la reacción control con RNasa P humana en ausencia de competidor (R). Carriles 4-8 reacción de corte competida con cantidades crecientes de mRNA hepático humano (panel A), pre-tRNA^{Tyr} frío (panel B), y poli-r(A) (panel C) en relación molar 1:0.5, 1:1, 1:10, 1:25, y 1:50 respectivamente. Las flechas indican los productos principales del procesamiento: tRNA^{Tyr} (88nt) y el fragmento pequeño en 5' (43nt). Las autorradiografías corresponden a geles de acrilamida desnaturalizantes al 10%. **D:** Representación gráfica del porcentaje de corte del pre-tRNA^{Tyr} en función de la concentración de RNA competidor: mRNA hepático humano (círculos negros), pre-tRNA^{Tyr} frío (triángulos grises), y poli-r(A) (cuadrados blancos). Los datos corresponden a la media para la cuantificación de tres experimentos independientes. Las barras de error representan la desviación estándar. Las medidas fueron normalizadas asumiendo el 100% de actividad de corte para la reacción control y se ajustaron a la ecuación detallada en la sección 'Material y Métodos' página 63 (líneas continuas). En el caso del poli-r(A) los datos no se ajustaban a la ecuación de la recta descrita. **E:** Representación gráfica del porcentaje de corte del pre-tRNA^{Tyr} en función de la masa de RNA competidor añadida a la reacción: mRNA hepático humano (círculos negros), pre-tRNA^{Tyr} frío (triángulos grises), y poli-r(A) (cuadrados blancos).

En conjunto los resultados muestran que la inhibición en la reacción de procesamiento del pre-tRNA^{Tyr} por parte de la RNasa P humana en presencia de la población de mRNAs hepáticos es al menos parcialmente específica, y por tanto especies moleculares concretas dentro de la población pueden contener elementos estructurales que imitan al tRNA en una proporción significativa.

Detección de mRNAs portadores de estructuras tipo tRNA mediante tecnología de microarrays.

En primer lugar se evaluó de forma directa la sensibilidad de la población de mRNAs hepáticos al procesamiento producido por ambas actividades RNasa P. Los productos generados a diferentes tiempos de reacción fueron visualizados mediante la técnica de electroforesis capilar en el equipo ExperionTM (BIO-RAD). La distribución de los productos de corte tras digestión con

RNasa P humana no mostró diferencias significativas con respecto al control (Figura suplementaria 2A). En el caso del ensayo con la ribozima de *Synechocystis sp.* se observó una notable disminución de los principales picos de mensajeros, sin embargo se apreció el mismo efecto en el perfil obtenido en la reacción control sin ribozima cianobacteriano, lo que apunta a un fenómeno asociado al tampón de reacción empleado (Figura suplementaria 2B).

Con la finalidad de identificar los mRNAs concretos portadores potenciales de estructuras tipo tRNA dentro de la población hepática se realizó un cribado empleando *microarrays* de expresión (Agilent). Los chips se hibridaron con el RNA amplificado tras reacción de 500 ng de mRNA hepático, control ó tratada, con la RPR de la cianobacteria *Synechocystis sp.* a una concentración de 67.5nM, ó con el extracto enriquecido en actividad RNasa P humana en una reacción estándar. Una alícuota de cada digestión se incubó en paralelo en presencia de dos sustratos marcados radiactivamente (pre-tRNA^{Tyr} y RNA 1-570 de HCV), lo cual permitió asegurar que la reacción de corte era efectiva. El servicio de *microarrays* del Centro de Regulación Genómica en Barcelona fue el responsable del proceso de amplificación, marcaje de los RNAs digeridos, hibridación (Kit *Amino Allyl MessageAmpTM II aRNA Amplification* de Ambion), así como del posterior análisis estadístico de los datos para 4 chips: 2 controles y 2 digestiones para cada actividad. El criterio para catalogar genes cortados o no cortados se detalla en la figura suplementaria 3.

En el caso del tratamiento con el ribozima de *Synechocystis sp.* 47 genes mostraron diferencias de abundancia significativas: 36 genes con un nivel de sobre-representación superior a 1.5 veces y 11 genes infra-representados con un nivel menor de -1.5 veces respecto al control. El número de genes identificados fue más reducido para el ensayo con RNasa P humana, 17 genes en total, 7 de ellos sobre-representados y 10 infra-representados con valores mayores a 1.2 ó menores a -1.2 veces respecto al control. El listado de genes y sus características se encuentra en las tablas suplementarias 1-4. No se encontró ningún gen coincidente entre los listados de ambos tratamientos. Tras realizar una clasificación de los genes según los procesos biológicos en los cuales estaban implicados empleando la aplicación *Panther* (Applied) se observó que la mayoría se encuadraban dentro del área de metabolismo primario para los dos tratamientos (23 genes correspondientes al tratamiento con el ribozima de *Synechocystis sp.* y 11 genes para el tratamiento con el extracto enriquecido en RNasa P humana). En segundo lugar los genes implicados en procesos de desarrollo, transporte, y metabolismo de ácidos nucleicos para la RPR de la cianobacteria; y los procesos relacionados con comunicación celular y transducción de señales para el caso de la RNasa P humana, fueron los más representados (**Figura 2**).

Aislamiento de tres genes candidatos y evaluación directa del procesamiento de los transcritos *in vitro* por la RNasa P.

Para verificar que los mRNAs identificados son efectivamente portadores de señales tipo tRNA se procedió a clonar un pequeño grupo de estos genes, y posteriormente se comprobó *in vitro* la presencia de señales para la RNasa P en sus respectivos transcritos. Dado que no se halló ninguna coincidencia en los ensayos de cribado por chips de DNA empleando las diferentes actividades RNasa P, se decidió tomar genes procedentes de los listados obtenidos con la digestión del ribozima de *Synechocystis sp.* El principio de longitud fue el escogido para elegir tres RNAs cuya caracterización fuese factible mediante análisis en geles de poliacrilamida, *i.e.* alrededor de 700 nt. Dos de ellos, el gen *RPS9* (714 nt) que codifica para la proteína ribosomal S9, y el gen *H2AFJ* (658 nt) que corresponde a la variante 2 de la familia de histonas H2A,

contaban con valores de sobre-representación de 1.51 veces respecto al control en los chips del ribozima de *Synechocystis sp.* El tercer candidato fue el gen *IFNA5* (700 nt) que codifica para el interferón alfa subtipo 5. Aunque esta variante de interferón alfa no apareció en nuestros listados, en su lugar encontramos el gen *IFNA2* (1145nt), con un valor de infra-representación de -1.22 veces con respecto al control. De acuerdo con la literatura el subtipo alfa 5 es característico del hígado (Castelruiz et al, 1999) y posee una gran homología de secuencia (89%) dentro de la región codificante al compararlo con la secuencia de *IFNA2*, por lo cual se decidió testar la variante hepática.

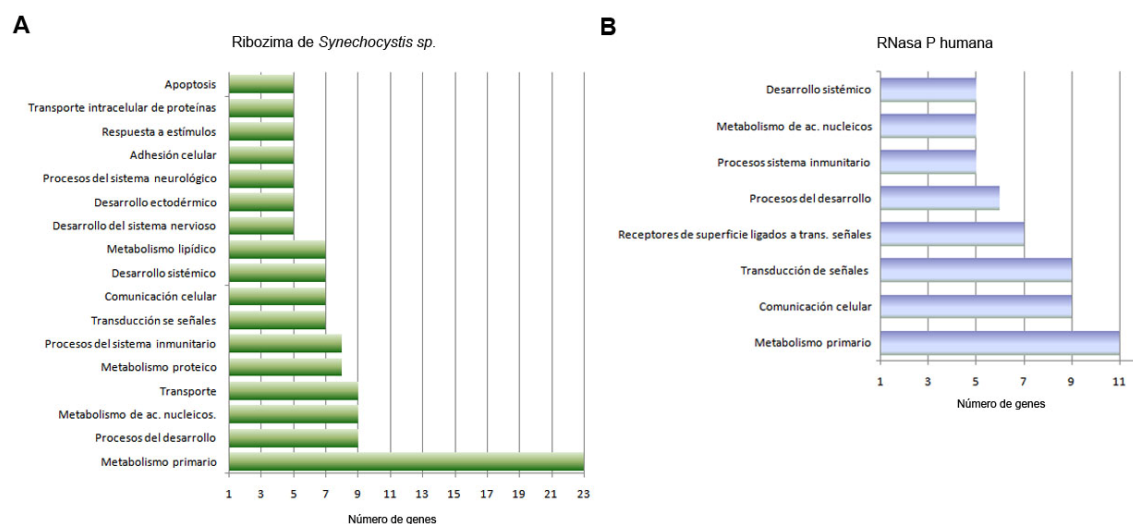


Figura 2: Histograma de clasificación por procesos biológicos para el listado de genes identificados mediante *microarrays* tras digestión *in vitro* con el ribozima de *Synechocystis sp.* (A) y RNasa P humana (B). Los términos empleados para designar los procesos biológicos se basan en el criterio del Consorcio *Gene Ontology* (<http://www.geneontology.org/>). La clasificación se realizó con el *software Panther* (*Applied-Biosystems*). Solo se representan las categorías de procesos biológicos que contaban con 5 o más representantes.

Para los tres mRNAs seleccionados se efectuaron experimentos de dosis respuesta con el ribozima de *Synechocystis sp.* y se comprobó su respuesta positiva al corte con el incremento de dosis (Figura suplementaria 4). Los resultados de digestión con el extracto enriquecido en RNasa P humana para cada uno de los transcritos *in vitro* se presentan en la **figura 3**. La especificidad de la reacción se demostró por inhibición competitiva, ya que el pre-tRNA^{Tyr} y no otro RNA indiferente, era capaz de inhibir la aparición de los productos de corte en una relación molar de 10:1 (carriles 7 y 8 de cada panel en la figura 3). En vista del perfil electroforético y la intensidad de los productos de corte generados, se estimó la presencia de dos puntos de corte principales en el caso del RNA *IFNA5* (1-700), y un solo corte en el caso de RNA *RPS9* (1-714) y el RNA *H2AFJ* (1-658). El porcentaje de corte promedio de los mRNAs tras cuantificación de réplicas osciló entre el 4% y el 15%.

Los resultados evidenciaron que la RNasa P era capaz de procesar *in vitro* especies concretas de mRNA, lo que sugiere una relación estructural mimética de estos sustratos con el tRNA. Se procedió a verificar de forma individual la relación mimética entre los mRNAs seleccionados mediante experimentos de inhibición competitiva en los cuales se emplearon los transcritos *IFNA5* (1-700), *RPS9* (1-714) y *H2AFJ* (1-658) como inhibidores en la reacción de procesamiento del pre-tRNA^{Tyr} de *E.coli* por la RNasa P humana (**Figura 4**). El estudio demostró que estos RNAs eran capaces de inhibir la reacción de digestión a una relación molar comprendida entre 1:1 y 1:10. En el caso concreto del RNA *IFNA5* (1-700) se realizó el ensayo

por triplicado para facilitar la comparación con los resultados previos empleando la población de mRNAs hepáticos y el pre-tRNA^{Tyr} como competidores (Figura suplementaria 5). La curva de inhibición se ajustó a la misma ecuación, estableciéndose un valor de IC₅₀ de 1.14±0.36 nM.

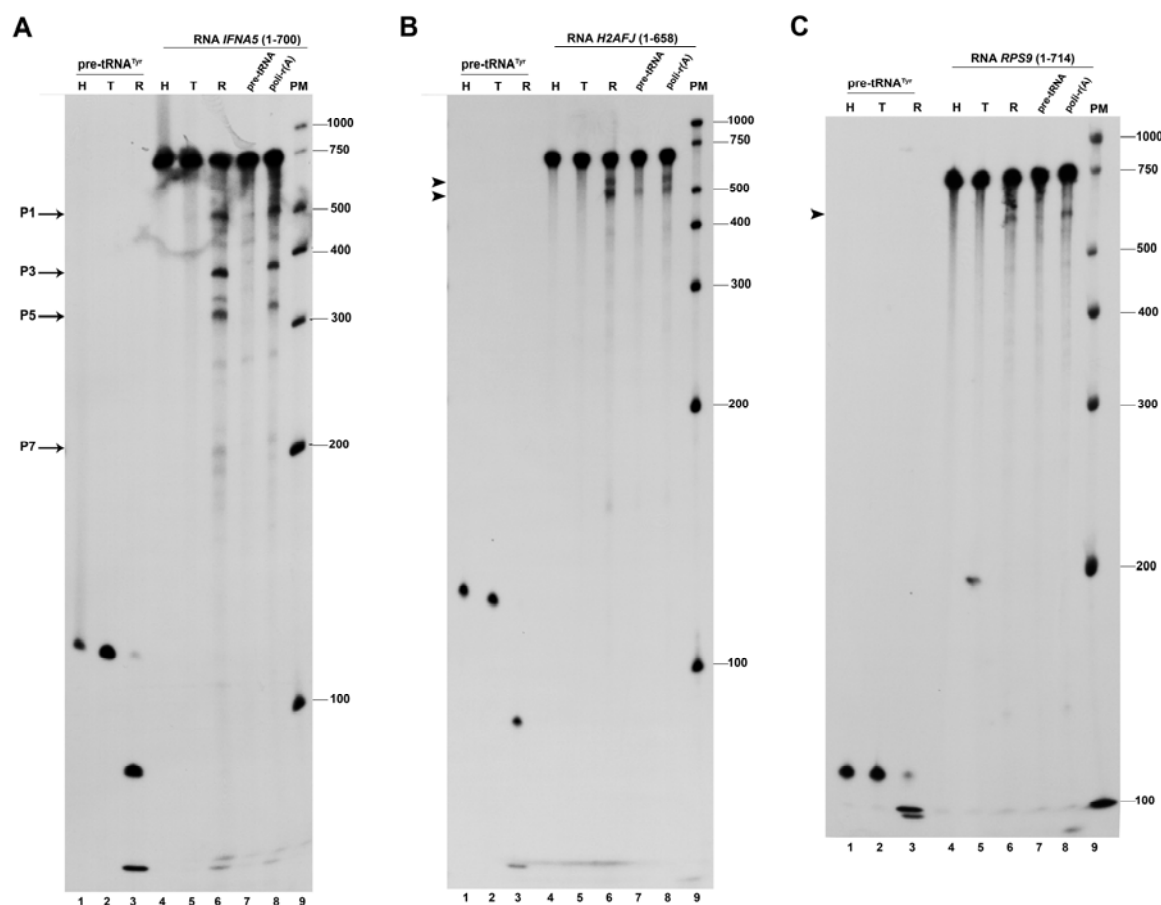


Figura 3: Corte específico de los transcritos *IFNA5*, *H2AFJ* y *RPS9* por la RNasa P humana. Todos los transcritos fueron marcados internamente con GTP[α -³²P]. El RNA sustrato en los carriles 1-3 corresponde al pre-tRNA^{Tyr} de *E.coli* (131nt). Los carriles 4-9 corresponden a: RNA *IFNA5* (1-700) en el panel **A**, RNA *H2AFJ* (1-658) en el panel **B**, y RNA *RPS9* (1-714) en el panel **C**. En todos los casos: carriles 1 y 4 corresponden al RNA incubado en hielo; carriles 2 y 5 en presencia del tampón de reacción; carriles 3 y 6 reacción con RNasa P humana. Carril 7 reacción competida con pre-tRNA^{Tyr} frío en un exceso molar de 10 veces. Carril 8 reacción competida con 400pg de poli-r(A), actuando como competidor inespecífico. Esta cantidad corresponde a la masa de pre-tRNA^{Tyr} frío añadida en el carril 7. Carril 9: marcadores de peso molecular. Los principales productos de digestión se marcan en el margen izquierdo de cada imagen. Las autorradiografías corresponden a geles de acrilamida desnaturalizantes al 4%.

El ejemplo del mRNA IFNA5: orientación, especificidad e identificación de los principales productos de digestión producidos por la actividad RNasa P humana.

Dado que el RNA del interferón α subtipo 5 no es un sustrato canónico para la RNasa P humana, es obligado comprobar la especificidad de los productos de digestión; de este modo podemos descartar la posible degradación inespecífica ocasionada por cualquier otra RNasa contaminante presente en nuestro extracto enriquecido, o derivada de la manipulación de las muestras.

Con objeto de determinar la naturaleza química de los nuevos extremos generados tras la reacción de procesamiento, fue necesario en primer lugar, establecer la orientación de los principales productos de digestión. Para ello se realizó en paralelo un experimento de digestión con transcritos diferencialmente marcados: internamente con GTP[α -³²P], en 5' con GTP[γ -³²P], o en 3' con pCp[5'-³²P] (**Figura 5**). La autorradiografía correspondiente a las reacciones con el

extracto enriquecido con RNasa P humana se muestra en la **figura 5A** y la obtenida con la RPR de *Synechocystis sp.* en la **figura 5C**. El examen de la migración electroforética de las bandas producto reveló que los puntos de corte mayoritarios se localizaban dentro de la región codificante de la secuencia (comprendida entre los nucleótidos 58-627), y que los productos denominados P1 y P3 para la actividad humana, y P1' para el ribozima, debían contar con extremos 5'-PPP y el nuevo 3'-OH originado tras el corte; mientras que los productos P5 y P7 para la actividad humana, y P7' para el ribozima, serían bandas con el nuevo extremo 5'-P y el 3'-OH original presente en el RNA sustrato (**Figura 5B**).

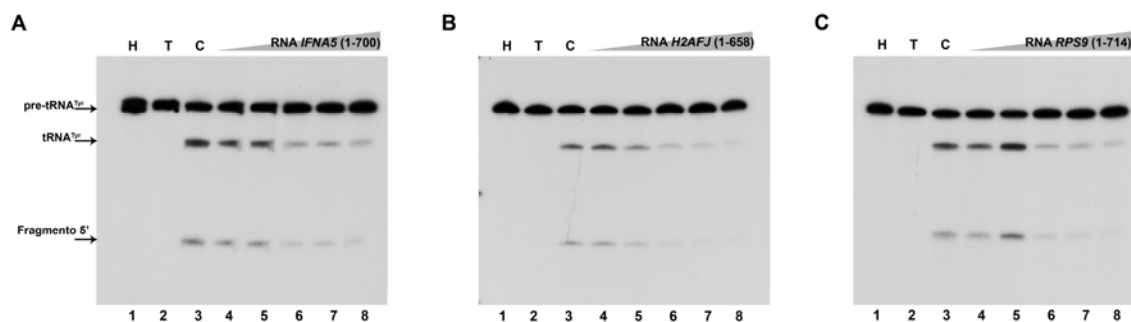


Figura 4: Ensayos de inhibición competitiva sobre la reacción de procesamiento del precursor tRNA^{Tyr} por RNasa P humana empleando especies concretas de mRNA. Los mRNAs empleados como competidores fueron: el RNA *IFNA5* (1-700) (panel **A**), RNA *H2AFJ* (1-658) (panel **B**), y RNA *RPS9* (1-714) (panel **C**). En todos los casos carril 1 RNA incubado en hielo, carril 2 RNA en presencia del tampón de reacción, carril 3 reacción control con RNasa P humana. Carriles 4-8 relación molar entre pre-tRNA^{Tyr}:mRNA específico de 1:0.5, 1:1, 1:10, 1:25, y 1:50 respectivamente. Las autorradiografías corresponden a geles de acrilamida desnaturalizantes al 10%. Las flechas indican los productos principales del procesamiento: tRNA^{Tyr} (88nt) y fragmento pequeño en 5' (43nt).

En segundo lugar, se analizó la química de los extremos de las bandas P1, P3, P5 y P7 purificadas por gel de reacciones preparativas con sustratos marcados con una baja actividad específica (10^5 DPM/ μ l), esto permite trazar su movilidad electroforética y percibir los incrementos de radiactividad derivados de las reacciones de marcaje posteriores (**Figura 6**). Se hicieron tres tipos de experimentos enzimáticos con RNA ligasa, fosfatasa y quinasa. La enzima T4 RNA ligasa es capaz de circularizar fragmentos de RNA con extremos 5'-P y 3'-OH, además es apta en la incorporación de pCp[5'-³²P] en el extremo 3'-OH de un RNA (England & Uhlenbeck, 1978; Silber et al, 1972). En la **figura 6A** carriles 4 y 6 se diferencia con claridad la aparición de bandas de movilidad electroforética retardada correspondientes a los círculos de las bandas P5 y P7 respectivamente, lo que corroboró la presencia de extremos 5'-P y 3'-OH. Por otro lado se detectó un incremento en la incorporación de marca radiactiva para las bandas producto P1 y P3 tras el tratamiento con pCp[5'-³²P] y T4 RNA ligasa al comparar con las bandas control no tratadas con enzima (**Figura 6B** carriles 2 y 4). Finalmente, se demostró la presencia de un grupo 5'-P en los productos P5 y P7 puesto que se evidenció un incremento en la incorporación de ATP[γ -³²P] cuando las bandas de RNA habían sido fosforiladas con T4 polinucleótido quinasa previo tratamiento con fosfatasa alcalina (**Figura 6C** carriles 4 y 7).

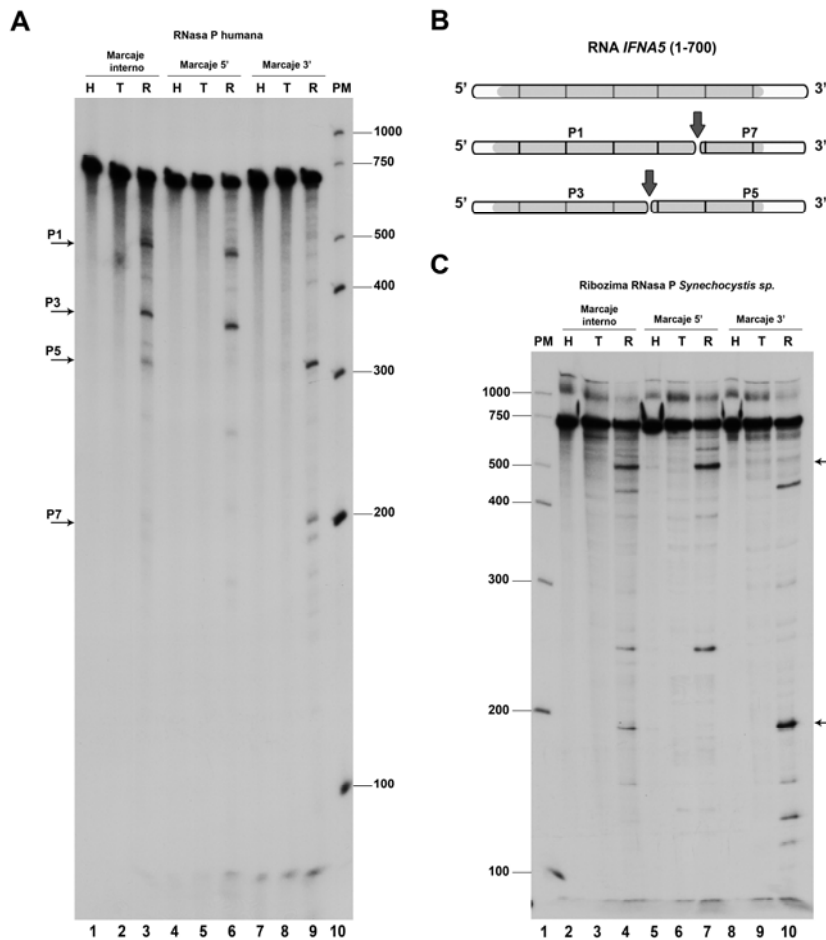


Figura 5: Localización de los cortes de la RNasa P sobre el RNA *IFNA5* (1-700). **A:** Procesamiento por la RNasa P humana de transcritos marcados internamente (carriles 1-3), en el extremo 5' (carriles 4-6), o en el extremo 3' (carriles 7-9). Carriles 1, 4 y 7 RNA incubado en hielo, carriles 2, 5 y 8 RNA incubado en tampón de reacción, carriles 3, 6 y 9 reacciones con RNasa P humana. Carril 10 marcadores de peso molecular. Las flechas indican los principales productos de digestión designados como P1, P3, P5 y P7. **B:** Diagrama lineal del transcrito *IFNA5* (1-700) y polaridad de los productos de corte mayoritarios. El color gris delimita la secuencia codificante para la proteína. En blanco las regiones no traducidas. Las flechas señalan la posición relativa de los dos principales puntos de corte para la RNasa P humana. **C:** Digestión con el ribozima RNasa P de la cianobacteria *Synechocystis sp.* en transcritos marcados internamente (carriles 2-4), en el extremo 5' (carriles 5-7), o en el extremo 3' (carriles 8-10). Carril 1: pesos moleculares, carriles 2, 5 y 8 RNA incubado en hielo, carriles 3, 6 y 9 RNA incubado en tampón de reacción, carriles 4, 7 y 10 reacciones con el ribozima de *Synechocystis sp.* En el margen derecho se destacan las bandas producto con migración electroforética similar a las observadas en el caso de la digestión con RNasa P humana (P1' y P7').

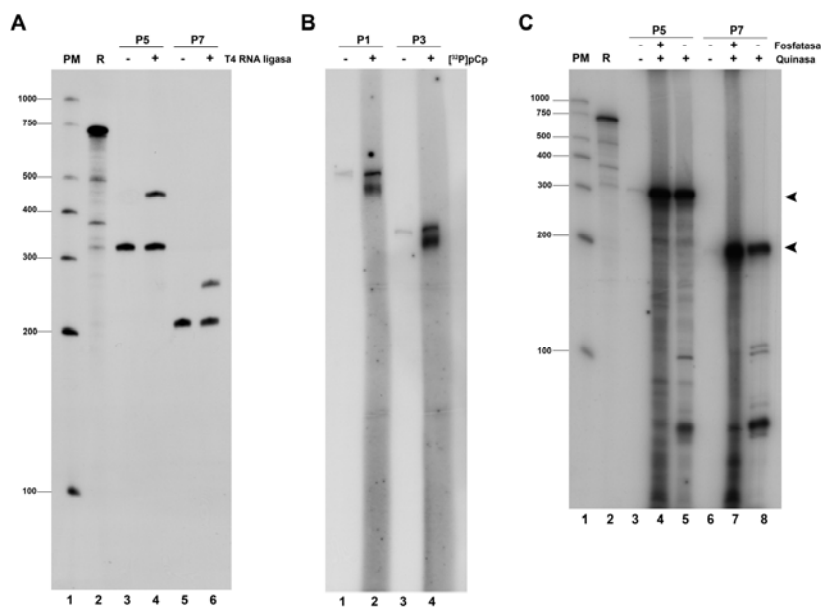


Figura 6: Caracterización bioquímica de los extremos químicos en los principales productos de digestión de la RNasa P humana sobre el RNA *IFNA5* (1-700). El transcrito fue marcado durante la transcripción de forma que constase con baja actividad específica (10^5 dpm/ μ g). Los productos de reacción se purificaron por gel para analizar la química de los extremos mediante reacciones enzimáticas específicas. **A:** Circularización de P5 y P7 con T4 RNA ligasa (carriles 4 y 6 respectivamente). Carril 1 pesos moleculares, carril 2 reacción control, carriles 3 y 5 bandas P5 y P7 incubadas en hielo. Las bandas circularizadas se observan con movilidad electroforética retardada por encima del material de partida. **B:** Determinación enzimática del extremo 3'. Carriles 1 y 3 bandas P1 y P3 incubadas en hielo. Carriles 2 y 4, P1 y P3 marcadas con pCp[5'- 32 P] y T4 RNA ligasa. **C:** Determinación del extremo 5' mediante tratamiento diferencial con fosfatasa/quinasa y ATP[γ - 32 P]. Carril 1 pesos moleculares, carril 2 reacción control, carriles 3 y 6 bandas P5 y P7 incubadas en hielo. Carriles 4 y 7 bandas P5 y P7 marcadas con T4 polinucleótido quinasa y ATP[γ - 32 P] previo tratamiento con fosfatasa alcalina. Carriles 5 y 8 tratados del mismo modo pero sin la incubación inicial con fosfatasa alcalina.

La secuencia exacta de los productos P5 y P7 se averiguó mediante circularización del RNA con T4 RNA ligasa, seguida de retrotranscripción, PCR y posterior subclonaje. Para el caso de las bandas P1 y P3 la identificación de la secuencia se realizó por adición de colas de poli(A) y poli (U) en el extremo 3', lo cual permite generar un molde para cebar la síntesis de cDNA por retrotranscripción, PCR y posterior subclonaje. Para cada una de los fragmentos fueron secuenciados entre 8 y 12 clones. Los puntos de corte resultaron ser dispersos aunque muy próximos entre sí, aglutinándose entorno a una posición mayoritaria (**Figura 7A**). Los principales puntos de corte se encontraron en las posiciones A₃₇₆ para P3, A₃₇₈ para P5, A₄₈₉ para P7, y A₄₉₁ para P1. Estos puntos se localizan muy próximos entre sí, dentro de regiones con capacidad de formar dominios estructurales diferenciados razonablemente estables según predicciones del algoritmo *Mfold* (**Figura 7B**). En lo sucesivo nos referiremos a estos motivos estructurales como motivo tipo tRNA I y motivo tipo tRNA II. El porcentaje de corte calculado en base a la cuantificación de tres experimentos independientes fue de 10.1 ± 2.9 para el motivo tipo tRNA I (P1+P7), y del 14.4 ± 4.8 para el motivo tipo tRNA II (P3+P5).

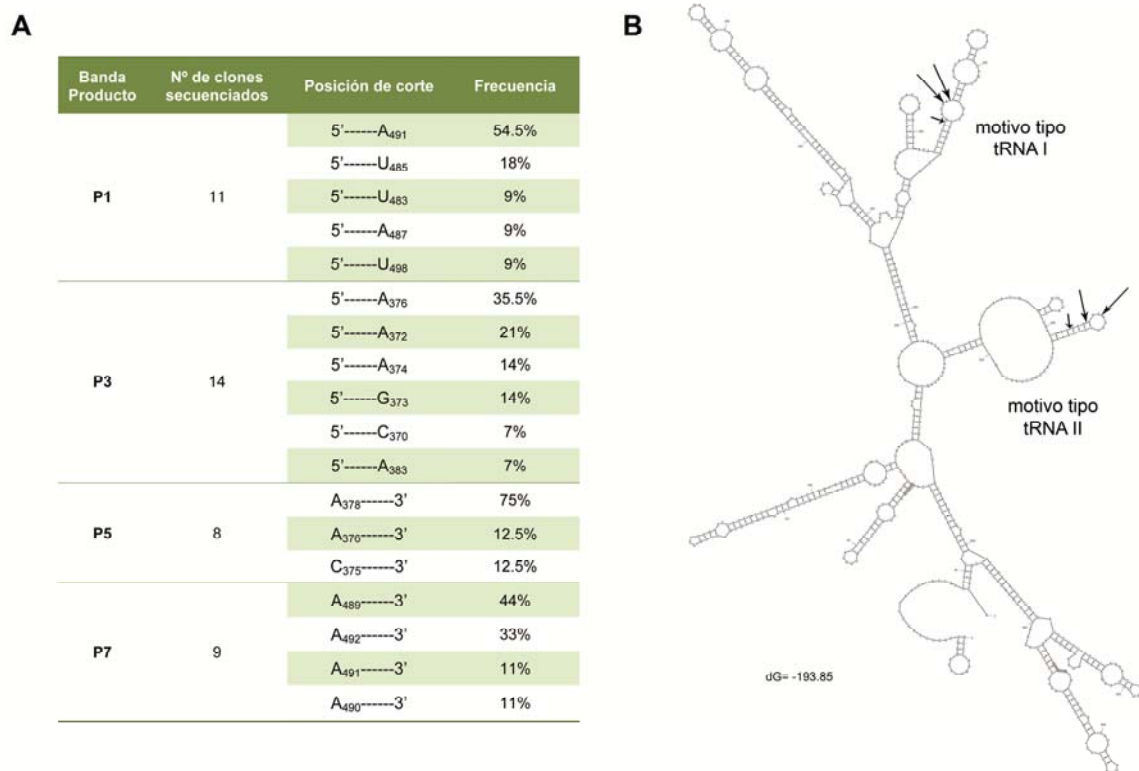


Figura 7: A: Tabla resumen de los resultados de subclonaje y secuenciación de las bandas P1, P3, P5 y P7 para determinar las posiciones exactas de corte de la RNasa P humana sobre el RNA IFNA5 (1-700). B: Ubicación de los dos principales puntos de corte de la RNasa P humana sobre una predicción de estructura secundaria para el RNA del IFNA5 (1-700) empleando el programa *Mfold*. La longitud de las flechas es proporcional a la tasa de corte observada. Los puntos de corte de pueden encuadrar dentro de dos motivos estructurales más amplios que denominamos como tipo-tRNA 1 y 2 respectivamente.

Fragmento mínimo reconocido por la RNasa P dentro del motivo tipo tRNA I en el mRNA IFNA5. Coincidencia con la señal CAR descrita para el mRNA IFNA1.

El procesamiento *in vitro* en las posiciones A₃₇₆ y A₃₇₈ dentro del motivo tipo tRNA I, mapea dentro de una región documentada en la literatura como señal para el transporte núcleo-citoplasma en el caso del mRNA del *IFNA1* (Kimura et al, 2010; Lei et al, 2011). Dado que existe

una gran homología de secuencia entre los diferentes subtipos de interferón alfa, adquirió especial interés explorar la presencia de una estructura semejante al tRNA con función celular definida, capaz de ser detectada empleando la RNasa P como agente estereoespecífico. Para acotar el fragmento mínimo reconocido por la actividad RNasa P dentro del motivo tipo tRNA I del *IFNA5*, se emplearon tres fragmentos de RNA delecionados consecutivamente (**Figura 8**). El fragmento de RNA de mayor tamaño, RNA *IFNA5* (197-446), solapa con la región de acumulación citoplásmica (CAR) definida para el *IFNA1* (Kimura et al, 2010; Lei et al, 2011). El fragmento de RNA *IFNA5* (215-427) carece del tallo basal; el RNA *IFNA5* (215-427), además

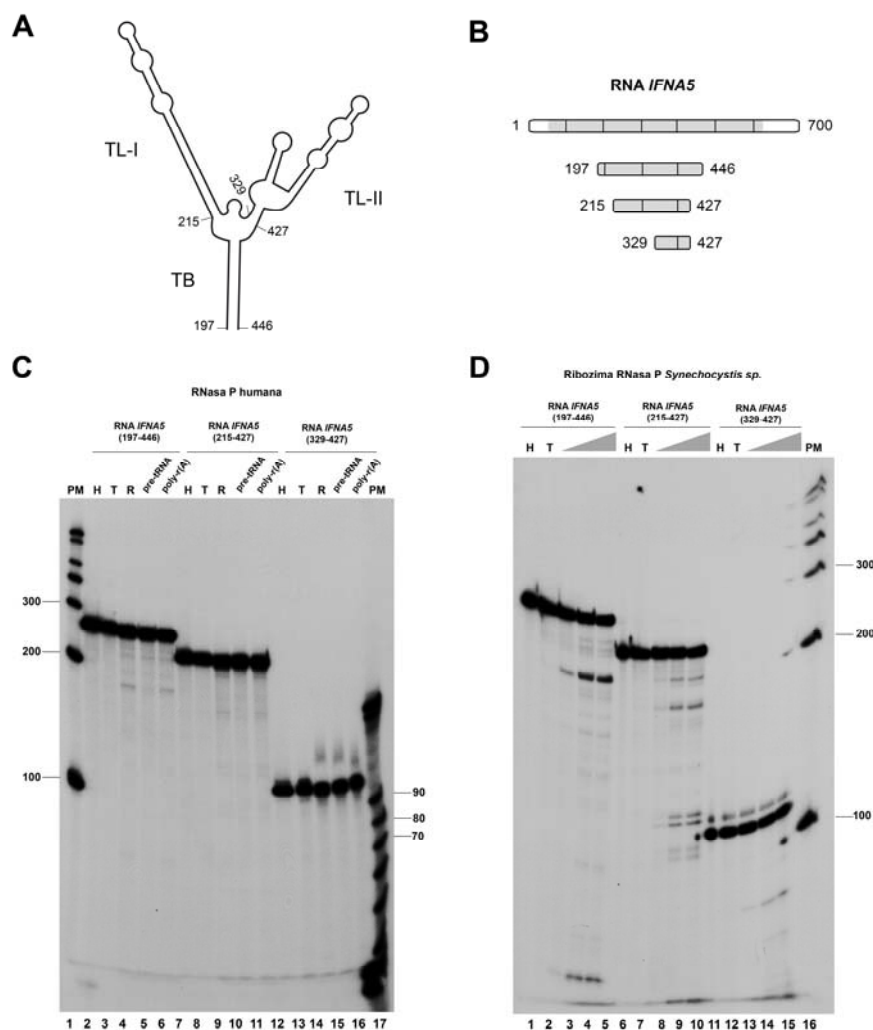


Figura 8: Determinación del fragmento mínimo reconocido por la RNasa P dentro del motivo tipo-tRNA I en el mRNA *IFNA5*(1-700). **A:** Representación esquemática de la estructura secundaria del motivo tipo-tRNA I, basada en la predicción del software *Mfold*. Se detallan las posiciones nucleotídicas que delimitan los 3 fragmentos de RNA sujetos a estudio. Tallo basal (TB), tallo lazo I (TL-I), y tallo lazo II (TL-II). **B:** Diagrama lineal del transcrito *IFNA5* (1-700nt) segmentado cada 100nt y de los transcritos empleados para acotar el sustrato mínimo reconocido por la RNasa P: RNA *IFNA5*(197-446), RNA *IFNA5*(215-427), y RNA *IFNA5*(329-427). El área gris marca la secuencia codificante para la proteína, en blanco las regiones no traducidas. **C:** Ensayo de digestión con RNasa P humana. RNA *IFNA5*(197-446) en carriles 2-6; RNA *IFNA5*(215-427) en carriles 7-11; RNA *IFNA5*(329-427) en carriles 12-16. Carriles 2, 7 y 12 RNA incubado en hielo, carriles 3, 8 y 13 RNA incubado en tampón de reacción, carriles 4, 9 y 14 reacciones con RNasa P humana. Se añadió un exceso molar de 10 veces de pre-tRNA frío (carriles 5, 10, y 15), o el equivalente en masa de poli-r(A) (carriles 6, 11 y 16), para demostrar la especificidad del procesamiento. Carriles 1 y 17 marcadores de peso molecular. **D:** Experimento dosis-respuesta con el ribozima RNasa P de *Synechocystis sp.* Los tres transcritos fueron incubados en hielo (carriles 1, 6 y 11), en tampón de reacción (carriles 2, 7 y 12), o con el ribozima bacteriano a una concentración de 67.5nM (carriles 3, 8 y 13), 337.5nM (4, 9 y 14), y 675nM (carriles 5, 10 y 15) respectivamente. Carril 16 marcadores de peso molecular.

prescinde del tallo lazo I (**Figura 8A y B**). Se hicieron ensayos con el extracto enriquecido en RNasa P humana (**Figura 8C**) y con la RPR de *Synechocystis sp.* (**Figura 8D**). El fragmento mínimo procesado por ambas actividades fue el RNA de 212 nt comprendido entre los nucleótidos 215 y 427. La digestión de los RNAs *IFNA5* (197-446) e *IFNA5* (215-427) originó un producto con una longitud estimada (~180nt y ~160nt respectivamente) equivalente a la esperada para el producto en 5'-P3. La especificidad de los productos mencionados se verificó mediante inhibición competitiva con pre-tRNA^{Tyr} en un exceso molar de 10 veces, en el caso del ensayo con RNasa P humana, y a través de un ensayo de dosis respuesta para el ribozima de *Synechocystis sp.*

RESULTADOS 3

“Identificación *in vitro* de un cambio estructural en la región 3' UTR del mRNA *IFNA5* inducido por el miR-122”

El RNA del IFNA5 cuenta con zonas de interacción para el miR-122.

El hecho de que el interferón alfa 5 sea un subtipo abundante en hígado (Castelruiz et al, 1999), unido a la especificidad hepática del miR-122 (Jopling et al, 2005), alentó la idea de que el RNA mensajero del *IFNA5* pudiera contener dianas de interacción para este microRNA. Para averiguarlo se realizaron predicciones *in silico* empleando diferentes algoritmos informáticos (*RNAhybrid*, *RNAfold* y *RNAup*). Todos estos programas arrojaron el mismo resultado positivo en interacción dentro de la región 3' UTR del mRNA, que implicaba la hibridación completa de la secuencia de reconocimiento del miR-122 (5' GGAGUGU 3') en la posición comprendida entre los nucleótidos 675-682 del RNA *IFNA5*. La información de secuencia empleada junto con los resultados obtenidos con el *software RNAhybrid* se muestra en la **figura 1A** y **1B**. Esta observación fue testada experimentalmente mediante digestión con RNasa H en un ensayo con el RNA *IFNA5* diferencialmente marcado, en presencia del miR-122 en forma de oligonucleótido de DNA a concentraciones crecientes (**Figura 1C**). Con este primer abordaje experimental se pudo establecer: i) que existe un punto de corte principal para el miR-122 próximo al extremo 3' del transcrito, pues los productos de digestión mayoritarios consistían en un fragmento de longitud cercana a los 700nt que contaba con el extremo 5' (carriles 5-6 y 11-12), y un fragmento muy pequeño en el extremo 3' (carriles 17-18), y ii) existe un segundo punto de corte dentro de la

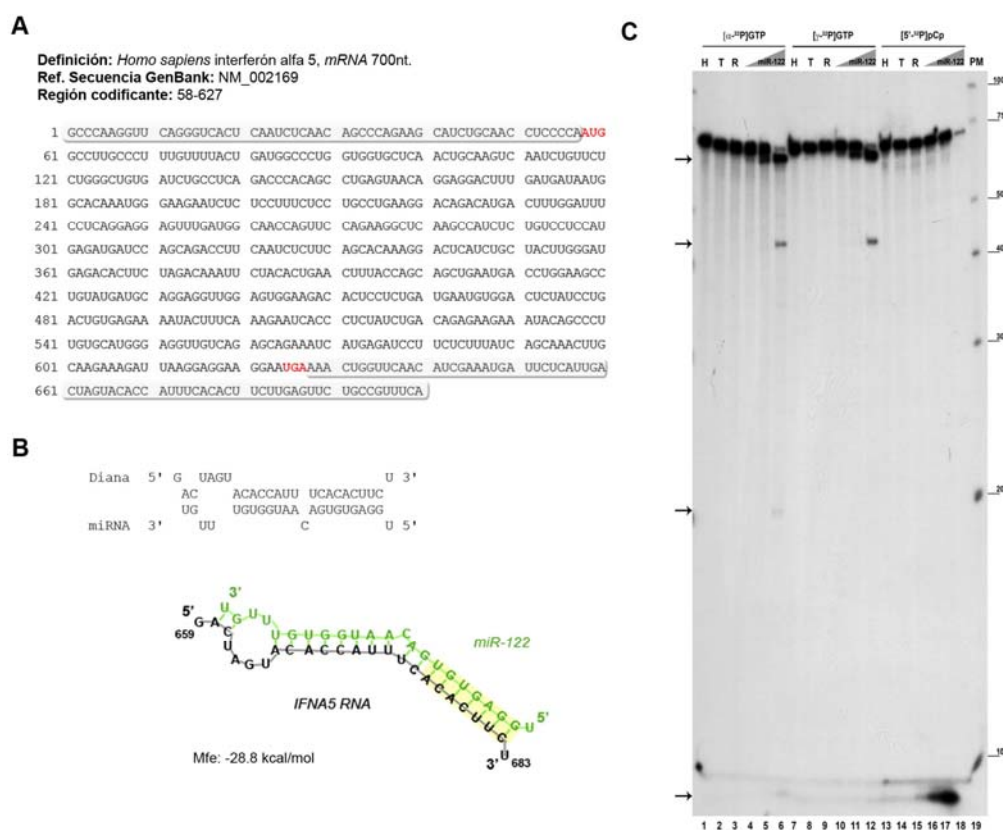


Figura 1: **A:** Información de secuencia para el mRNA del *IFNA5* que cuenta con 700nt de longitud (ref. sec. NM_002169 en la base de datos de *GenBank*). Enmarcadas en color gris se encuentran las regiones de secuencia no traducidas en los extremos 5' y 3'. Los codones de inicio y fin de traducción se realizan en color rojo. **B:** Predicción del *software RNAhybrid* para la interacción entre el RNA *IFNA5* y el *miR-122*. La zona de interacción que implica a la secuencia de reconocimiento del miR-122 se destaca en amarillo. **C:** Interacción del ODN correspondiente al miR-122 con el RNA *IFNA5* 700nt mediante el análisis de los productos de corte de la RNasa H de *E.coli*. Para localizar los puntos de interacción se emplearon diferentes marcajes: internamente con GTP[α - 32 P] (carriles 1-6), marcaje en el extremo 5' con GTP[γ - 32 P] (carriles 7-12) y marcaje en el extremo 3' con pCp[32 P] (carriles 13-18). Carriles 1, 7 y 13 RNA incubado en hielo. Carriles 2, 8 y 14 RNA incubado en tampón de reacción. Carriles 3, 9 y 15 reacciones con 0.5U/ μ l de RNasa H en ausencia del ODN miR-122. Carriles 4-6, 10-12 y 16-18 la misma reacción en presencia del ODN miR-122 a concentraciones crecientes: 15nM, 150nM y 1500nM respectivamente. Carril 19 pesos moleculares. Las flechas en el margen izquierdo señalan los principales productos de digestión

región codificante del transcrito, que según el tamaño aproximado de los productos observados en los carriles 6 y 12 de la figura 1C, se ubicaría en torno a la posición 480. Estos resultados indican que el miR-122 está interaccionando *in vitro* con el 3'UTR del RNA *IFNA5*.

El miR-122 produce cambios estructurales en el extremo 3' del RNA IFNA5.

Mediante experimentos de sensibilidad diferencial con varias RNasas dependientes de estructura se obtuvo información directa del efecto estructural ocasionado por la interacción del miR-122. Estas RNasas fueron: la RNasa T1 que reconoce guaninas desapareadas; la RNasa V1 que procesa nucleótidos apareados y la RNasa A que es capaz de digerir de forma controlada las adeninas y citosinas que se encuentran en hebra sencilla (Knapp, 1989). El resultado de estos experimentos se muestra en la **figura 2A** y **2B**. En base a las predicciones del programa *Mfold* y los resultados experimentales obtenidos se propone que el motivo estructural comprendido entre los nucleótidos 570-685 se encuentra organizado en forma de una gran tallo ramificado en dos horquillas con lazos internos y alguna protuberancia. Podemos decir que aunque los cambios observados no suponen alteraciones drásticas a nivel global en la región 3' sí afectan a zonas clave. Una de estas zonas es la relativa al codón que marca el final de traducción UGA. A este respecto se manifiesta un aumento de sensibilidad para la RNasa T1 en la posición G-626 y para la RNasa A en la posición U-625 cuando el miR-122 se encuentra a una concentración de 150nM. Esta perturbación parece alterar el emplazamiento del codón UGA; que pasaría de encontrarse incluido en una estructura tallo lazo aledaña a un lazo interno, a quedar más expuesto en una zona entre horquillas (**Figura 2C**). En segundo lugar el apareamiento del microRNA causa la ruptura de una serie de nucleótidos apareados entre las posiciones 670-675 y un ligero aumento en la sensibilidad para la RNasa V1 entre los nucleótidos 675-680. Justamente esta zona de secuencia corresponde al punto de hibridación de la región de reconocimiento del miR-122. Como consecuencia del secuestro de hebra en la base del tallo lazo 2 se produce una apertura en la base que une ambas horquillas y un acortamiento en la longitud del tallo lazo 2. Por último, es interesante destacar un sutil incremento en la sensibilidad para la RNasa V1 entre los nucleótidos 654-657 que podría ser indicativo de un pseudonudo, pues es una región que muestra sensibilidad conjunta para RNasa A y se encuentra en un lazo apical (Knapp, 1989; Lowman & Draper, 1986; Puglisi et al, 1988).

El miR-122 produce cambios en el patrón de corte característico de la RNasa P humana y RNasa III de E.coli sobre el RNA IFNA5.

Dado que el miR-122 en forma de DNA es capaz de hibridar con el RNA *IFNA5* en nuestras condiciones de reacción estándar, se examinó si en forma de oligonucleótido de RNA era capaz de alterar el patrón de corte propio de la RNasa P humana y la RNasa III de *E.coli*. Se comprobó mediante experimentos de digestión *in vitro* que la presencia del miR-122 inducía la aparición de una nueva banda de corte en relación al patrón previamente descrito (ver página 87 figura 5), designada como Z, en el caso del tratamiento con RNasa P humana (**Figura 3A**). La presencia de la banda Z requería la secuencia completa del miR-122, y parecía ir acompañada de la desaparición de la banda P1 a la concentración más alta empleada en el ensayo (carriles 5 y 6). Aunque un oligonucleótido de RNA de 10nt de longitud, que incluía la secuencia de reconocimiento del miR-122, también era capaz de inducir la presencia de la banda Z a concentración 150nM (figura 2A, carril 9).

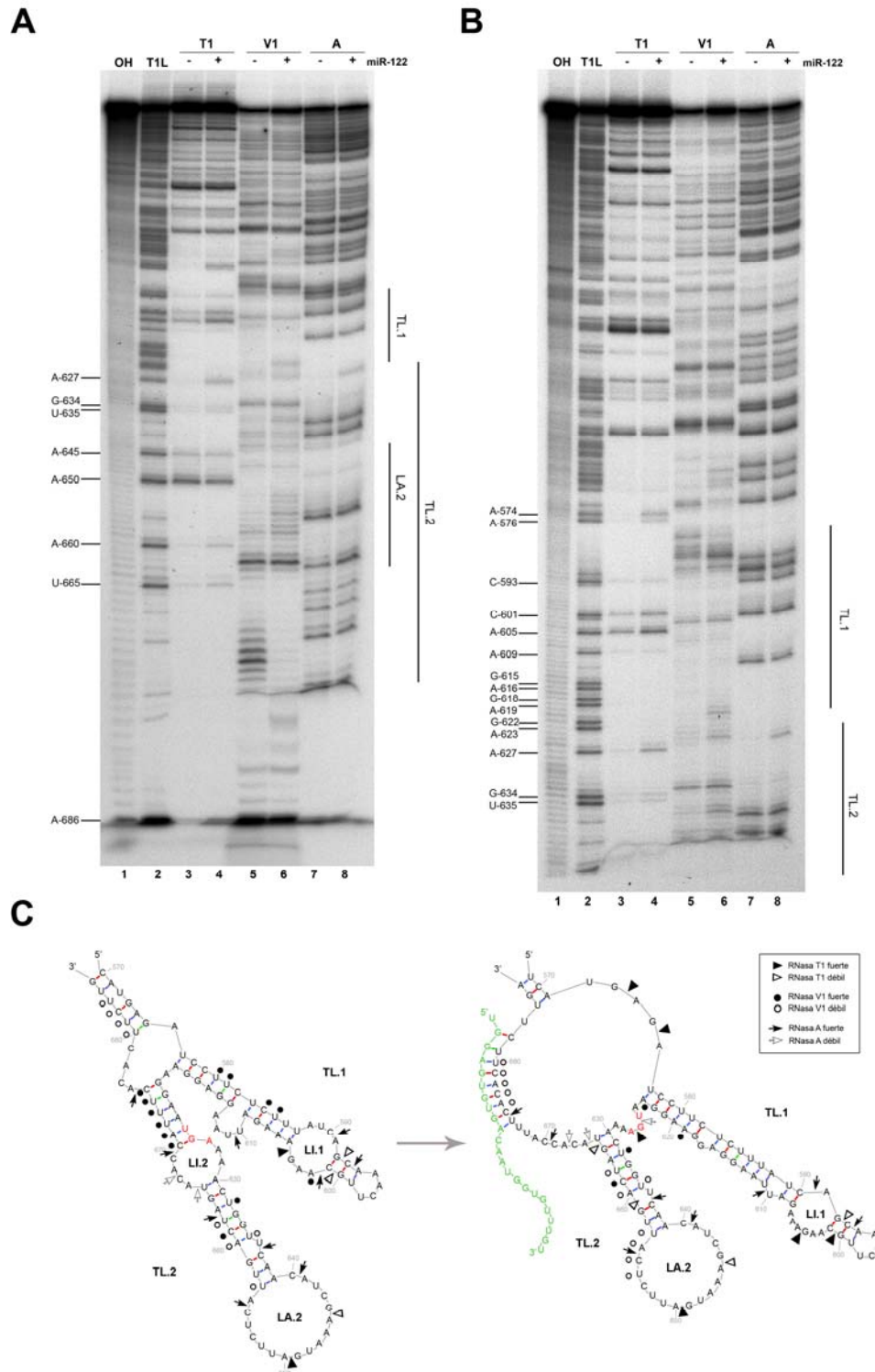


Figura 2: Análisis estructural de los cambios producidos en el extremo 3' del RNA del *IFN45* como consecuencia de la interacción con el miR-122. **A** y **B** Geles de sensibilidad para diferentes RNasas dependientes de estructura sobre el transcrito *IFN45*(1-700) marcado en 3' con pCp[5'-³²P]. El transcrito fue sometido a digestión parcial con RNasa T1 (carriles 3 y 4), RNasa V1 (carriles 5 y 6) y RNasa A (carriles 7 y 8) en ausencia (carriles 3, 5 y 7) o presencia de miR-122 a una concentración de 150nM (carriles 4, 6 y 8). Carril 1 escalera OH. Carril 2 escalera con T1 en condiciones desnaturalizantes. **A:** gel acrilamida desnaturalizante al 10%. **B:** gel acrilamida desnaturalizante al 6%. Se destacan en el margen izquierdo los residuos correspondientes a la escalera de T1 y en el margen derecho la secuencia nucleotídica correspondiente a las principales estructuras secundarias; tallo lazo (TL), lazo interno (LI), lazo apical (LA). **C:** Estructuras secundarias predichas por el software *RNAfold* en base a los resultados obtenidos en los experimentos de estructura. Los triángulos indican los puntos de corte para la RNasa T1; se emplean círculos para los nucleótidos sensibles a la RNasa V1 y flechas para la RNasa A. Los nucleótidos con un corte más fuerte se destacan con el símbolo correspondiente en negro. Los cortes débiles se representan el blanco. El codón de fin de traducción AUG se resalta en color rojo, mientras que el miR-122 se muestra en verde

En el caso de la RNasa III también se manifestó una alteración del patrón de corte característico del RNA *IFNA5* en presencia de miR-122. Aparecieron 3 nuevas bandas que denominamos IM.1, IM.2 e IM.3; las cuales requerían la secuencia completa del miR-122 para ser evidentes (**Figura 3B** carriles 6 y 7).

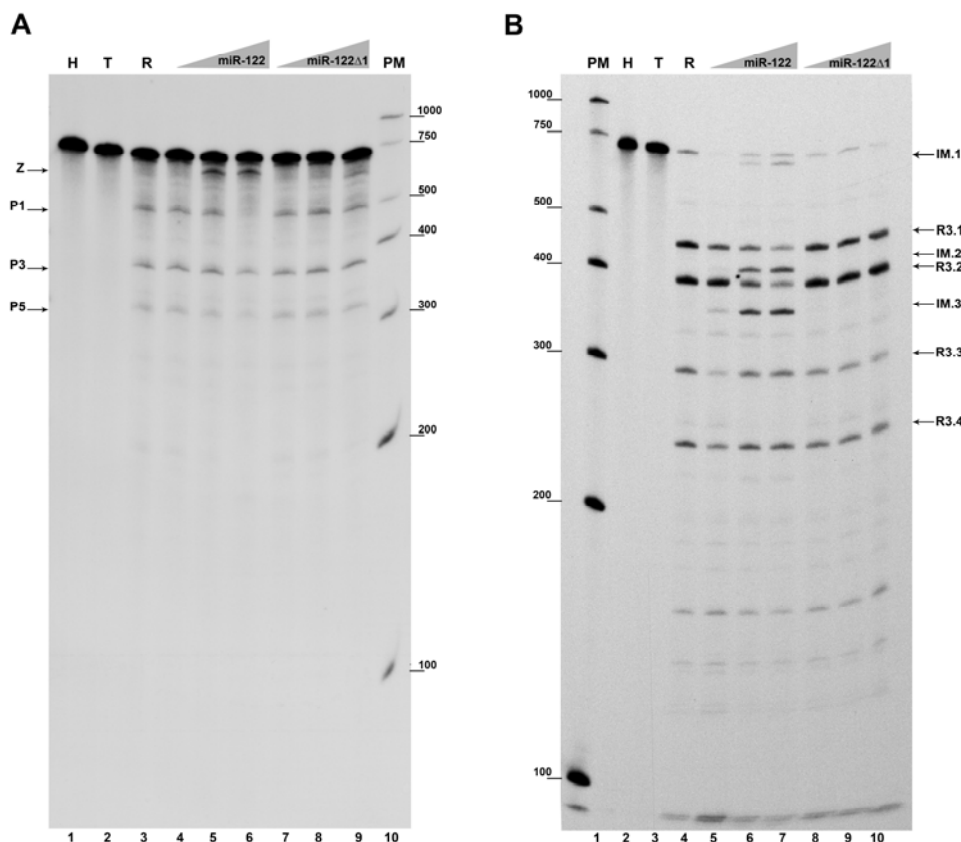


Figura 3: El micro RNA 122 produce cambios en el patrón de corte característico de la RNasa P humana y la RNasa III de *E.coli* sobre el RNA *IFNA5* (1-700nt). **A:** Ensayo de digestión con RNasa P humana. Carril 1 RNA incubado en hielo. Carril 2 RNA incubado en tampón de reacción. Carril 3 digestión con RNasa P humana control. Carriles 4-6 reacciones en presencia del oligonucleótido de RNA miR-122 a 1.5nM, 15nM y 150nM respectivamente. Carriles 7-9 reacciones en presencia del oligonucleótido de RNA miR-122Δ1 (5'U GGAGUGU GA3') a 1.5nM, 15nM y 150nM. Carril 10 pesos moleculares. Las flechas en el margen izquierdo indican los principales productos de digestión: P1, P3 y P5. La nueva banda observada en presencia del miR-122 se marca con la letra Z. **B:** Ensayo de digestión con RNasa III de *E.coli*. Carril 1 pesos moleculares. Carril 2 RNA incubado en hielo. Carril 3 RNA incubado en tampón de reacción. Carril 4 reacción de digestión con RNasa III de *E.coli* a 0.0005U/μl. Carriles 5-7 misma reacción en presencia del oligonucleótido de RNA miR-122 a 1.5nM, 15nM y 150nM respectivamente. Carriles 8-10 reacciones en presencia del oligonucleótido de RNA miR-122Δ1 (que contiene la región de reconocimiento) a 1.5nM, 15nM y 150nM. Las flechas en el margen derecho indican los principales productos de digestión designados como R3.1, R3.2, R3.3 y R3.4. Las nuevas bandas observadas en presencia del miR-122 se marcan como IM.1, IM.2 e IM.3

Caracterización estructural del RNA *IFNA5* empleando RNasa III de *E.coli*. Cambios ocasionados por la presencia del miR-122.

Para el caso de la RNasa III de *E.coli*, endonucleasa no estudiada en conjunción con el transcrito *IFNA5* hasta este momento, se hizo necesario un análisis en profundidad de los motivos de doble cadena contenidos en el RNA de este mensajero antiviral y de los cambios ocasionados por la presencia del miR-122 en dicha organización estructural.

En primer lugar se determinó la orientación de los principales productos de corte de la RNasa III de *E.coli* dentro de la secuencia de 700nt del RNA de *IFNA5* mediante digestión de

transcritos diferencialmente marcados. Los resultados obtenidos para la digestión del transcrito marcado internamente (**Figura 3B**), sumados a los resultados para los transcritos marcados en 3' con pCp[5'-³²P] (**Figura 4A**) y 5' con GTP[γ-³²P] (**Figura 4B**), permitieron establecer que de los 4 productos mayoritarios (R3.1, R3.2, R3.3 y R3.4), las bandas R3.1 y R3.2 contenían el extremo 5' trifosfato originado en la transcripción, mientras que las bandas R3.3 y R3.4 correspondían a fragmentos en 3' del RNA. La especificidad de estas 4 bandas se demostró mediante ensayos de inhibición competitiva con RNA de doble cadena procedente del virus LA y el RNA del bacteriófago T7 R1.1 (Figura suplementaria 1). Al mismo tiempo, de las 3 nuevas bandas evidenciadas en presencia del miR-122, únicamente IM.1 era visible mediante el marcaje en 5' con GTP[γ-³²P] (**Figura 4B** carriles 5 y 6).

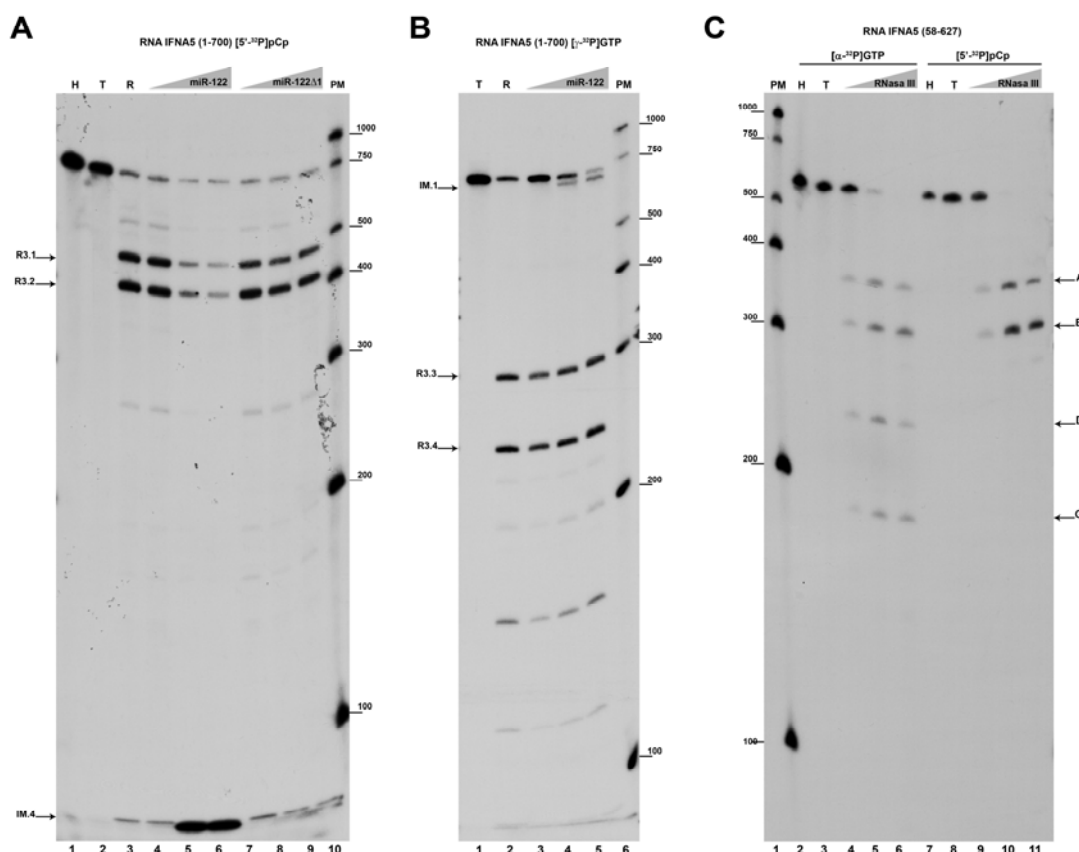


Figura 4: Orientación de los productos de digestión de la RNasa III de *E.coli* en los transcritos *IFNA5* de longitud completa (1-700nt; paneles A y B), e *IFNA5* región codificante (58-627nt; panel C) empleando diferentes marcajes. **A:** RNA *IFNA5* (1-700) marcado en su extremo 3' con pCp[5'-³²P]. Carril 1 RNA incubado en hielo. Carril 2 RNA incubado en tampón de reacción. Carril 3 reacción de digestión control con RNasa III de *E.coli* a 0.0005U/μl en ausencia de miR-122. Carriles 4-6 misma reacción en presencia del oligonucleótido de RNA miR-122 a 1.5nM, 15nM y 150nM respectivamente. Carriles 7-9 *idem* para el oligonucleótido de RNA miR-122Δ1. Carril 10 pesos moleculares. **B:** RNA *IFNA5*(1-700) marcado en su extremo 5' con GTP[γ-³²P]. Carril 1 RNA incubado en tampón de reacción. Carril 2 reacción de digestión control con RNasa III de *E.coli* a 0.0005U/μl en ausencia de miR-122. Carriles 3-5 misma reacción en presencia del oligonucleótido de RNA miR-122 a 1.5nM, 15nM y 150nM respectivamente. Carril 6 pesos moleculares. **C:** Calibración de la actividad RNasa III sobre los RNAs: *IFNA5*(58-627) marcado internamente (carriles 2-6), o marcado en su extremo 3' con pCp[5'-³²P] (carriles 7-11). Carril 1 pesos moleculares. Carriles 2 y 7 RNAs incubados en hielo. Carriles 3 y 8 RNAs incubados en tampón de reacción. Carriles 4-7 y 9-11 digestiones con RNasa III a 0.0001U/μl, 0.0005U/μl, 0.001U/μl respectivamente.

Para averiguar si las señales de doble cadena reconocidas por la RNasa III se veían afectadas por las regiones de secuencia no traducidas que flanquean la zona codificante del mensajero, se realizaron experimentos de digestión para el transcrito correspondiente a la zona

codificante del mRNA, comprendida entre los nucleótidos 58-627. El resultado de este ensayo se muestra en la **figura 4C**. Los cuatro productos principales denominados A, B, D y G no solo se mantenían, sino que además coincidían en la orientación de sus extremos con los encontrados para el fragmento de 700nt. Los productos indicados como A y B parecían corresponder con las bandas R3.1 y R3.2 en el RNA de longitud completa. Cabe destacar que no se apreció ningún efecto del miR-122 sobre el patrón de digestión de la RNasa III de *E.coli* cuando se utilizó como sustrato el transcrito *IFNA5* (58-627) (resultados no mostrados).

La determinación de la secuencia exacta de los productos R3.1, R3.2, IM.2, IM.3, A y B se realizó mediante circularización del RNA con T4 RNA ligasa, seguida de retrotranscripción, PCR y posterior subclonaje. En la figura suplementaria 2 se visualiza la formación de los círculos que demuestran la presencia de un nuevo extremo 5' fosfato generado tras el corte de la RNasa III. En el caso de las bandas R3.3, R3.4, IM.1, D y G la identificación de secuencia se realizó tanto por adición de colas de poli(A), como de colas poli(U) en el extremo 3', lo cual permite generar un molde para cebar la síntesis de cDNA por retrotranscripción, PCR y posterior subclonaje. El análisis de secuencias presentado en la **figura 5A** confirmó la hipótesis inicial de que los productos A, B, D y G, observados para el transcrito correspondiente a la región codificante, coincidían con los productos R3.1, R3.2, R3.3 y R3.4 generados en la digestión del RNA *IFNA5*(1-700). Estos cortes se concentran en una estructura tallo lazo de gran longitud dentro de la región codificante según predicciones del software *Mfold* (**Figura 5B**). Las secuencias también revelaron que el punto de corte para la banda IM.1, ya fuese en el nucleótido 674 con mayor frecuencia, o en el nucleótido 670 en menor proporción, se hallaba dentro de la zona de interacción del miR-122. En lo referente a las bandas IM.2 e IM.3, el hecho de que los

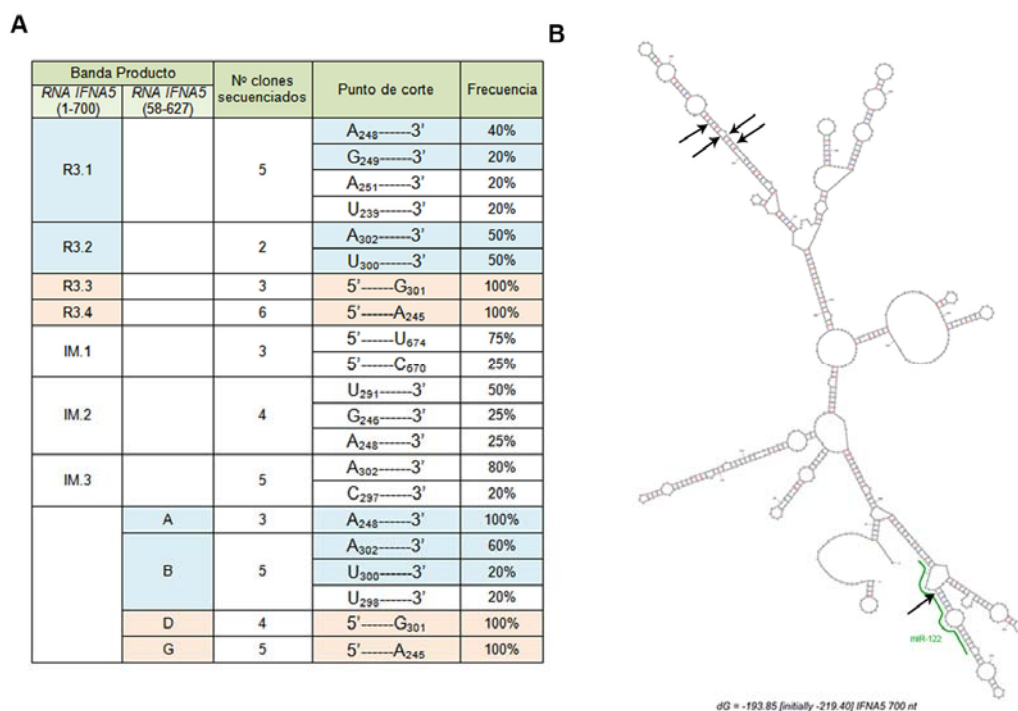


Figura 5: A: Tabla resumen de los resultados de subclonaje y secuenciación de las bandas producto características de la digestión del RNA *IFNA5* (1-700nt) y del RNA *IFNA5* (58-627nt) con RNasa III de *E.coli* en ausencia de miR-122. Dichas bandas son: R3.1, R3.2, R3.3 y R3.4 para el mRNA de longitud completa; A, B, D y G para el fragmento que corresponde a la región codificante. También se muestran las posiciones exactas de corte de los productos inducidos en presencia del miR-122 para el fragmento de RNA *IFNA5* (1-700nt): IM.1, IM.2 e IM.3. El código de color azul y rosa destacado en la tabla indica la identidad de puntos de corte entre las bandas producto del fragmento de RNA 58-627nt y el fragmento de RNA 1-700nt. **B:** Ubicación de los puntos de corte más frecuentes de la RNasa III de *E.coli* sobre una predicción de estructura secundaria para el RNA del *IFNA5* (1-700) empleando *RNAfold*. La línea verde marca la zona de interacción del miR-122 predicha *in silico*.

puntos de corte coincidan con los propios de las bandas R3.1 y R3.2 apunta a que se trate de las mismas bandas con un tamaño ligeramente inferior. Este déficit de aproximadamente 30 nucleótidos sería consecuencia del corte de la RNasa III en la posición 674/670 al reconocer el dúplex RNA-microRNA, y explicaría la ausencia de las bandas IM.2 e IM.3 en las autorradiografías mostradas en la **figura 4A** y **4B**. Ambos productos carecen de los extremos 5' y 3' marcados radiactivamente.

La especificidad del dúplex RNA:RNA entre el transcrito *IFNA5* y el miR-122, causante de la aparición de la banda IM.1 y el desplazamiento de R3.1 y R3.2 (para dar IM.2 e IM.3), fue corroborada experimentalmente en reacciones de digestión con RNasa III usando diferentes mutantes para la molécula del micro RNA. Como se advierte en la **figura 6**, cualquier mutación que afecte a la secuencia de reconocimiento del miR-122 anula la capacidad para generar una diana apta para la RNasa III, promoviendo la desaparición de las bandas IM.1, IM.2 e IM.3.

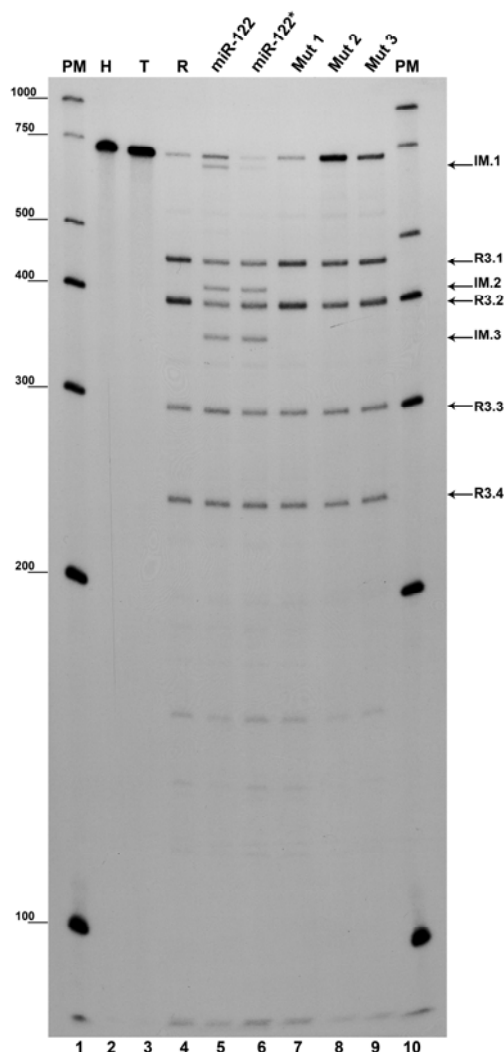


Figura 6: Efecto de las mutaciones en la secuencia de reconocimiento del miR-122 sobre el patrón de digestión del RNA 1-700nt de *IFNA5* con RNasa III de *E.coli*. Carriles 1 y 10 pesos moleculares. Carril 2 RNA incubado en hielo. Carril 3 RNA incubado en tampón de reacción. Carril 4 reacción de digestión con RNasa III de *E.coli* a 0.0005U/ μ l. Carriles 5-9 en presencia de una concentración 15nM de los siguientes oligonucleótidos de RNA: carril 5 miR-122 sintético; carril 6 miR-122 transcrito *in vitro*; carriles 7-9 mutantes 1, 2 y 3. NOTA: la secuencia de cada uno de los mutantes se detalla en la figura 9A del bloque de resultados 1 (página 78).

La presencia del miR-122 origina una nueva diana para la RNasa P humana.

Como ya se comprobó en la **figura 3A**, la presencia del miR-122 ocasiona la aparición de un nuevo producto de digestión denominado Z. La presencia de la banda Z parece asociarse con la desaparición del producto P1. Obrando de un modo análogo al empleado para la RNasa III se procedió a verificar la especificidad de la banda Z y a identificar su secuencia.

El ensayo de inhibición competitiva con un sustrato natural (pre-tRNA^{Tyr}) se muestra en la **figura 7**. Se percibe como el producto Z, junto al resto de productos ya caracterizados, es inhibido a una relación sustrato/competidor de 1:10.

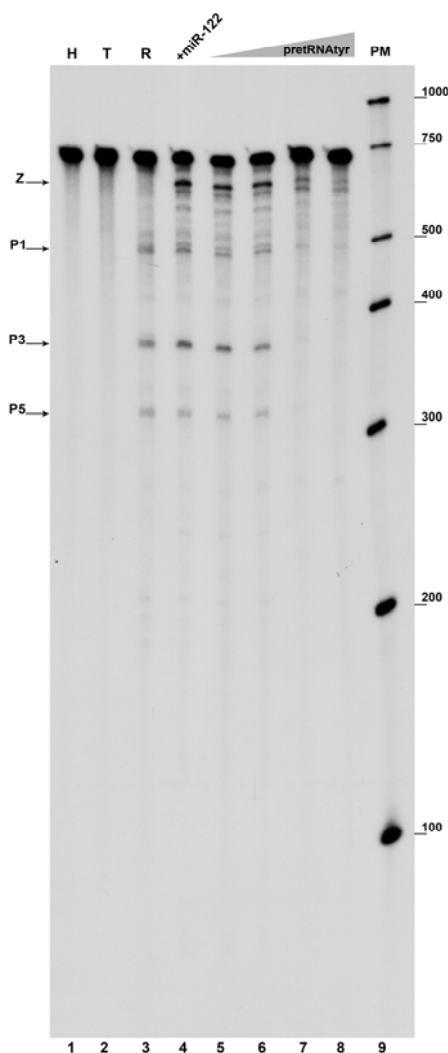


Figura 7: Inhibición competitiva de la nueva banda Z, producto de digestión específico de la RNasa P humana. Como sustrato de reacción se empleó el RNA *IFNA5* 1-700nt marcado internamente con GTP [α -³²P]. Carril 1 RNA incubado en hielo; carril 2 en presencia de tampón de reacción; carril 3 reacción control con RNasa P humana; carril 4 reacción con RNasa P humana en presencia de miR-122 a 15nM. Carriles 5-8 reacción en presencia de miR-122 a 15nM competida con pre-tRNA^{Tyr} frío en una relación molar de 1:0.5, 1:1, 1:10, 1:100 (RNA *IFNA5* 1-700: pre-tRNA^{Tyr}). Carril 9 pesos moleculares. Los productos de corte previamente caracterizados se indican en el margen izquierdo junto a la banda de nueva aparición Z.

Para orientar el punto de corte Z dentro del transcrito completo de 700nt se compararon los patrones de digestión de transcritos diferencialmente marcados. Los resultados ofrecidos en la **figura 8** permiten concluir que la banda Z cuenta con un extremo 5' trifosfato, generado durante el proceso de transcripción. Asimismo la banda compañera, un fragmento de 60nt aproximadamente en 3' del RNA que se ha denominado W, es visible sólo en las reacciones en las que el RNA *IFNA5*(1-700) se encuentra marcado con pCp[5'-³²P]. Al contar con un extremo 5' trifosfato la banda Z se secuenció mediante el método de adicción de colas poli(U) y poli(A) en 3' previamente descrito. En la **figura 9** se resume el resultado para el análisis de 28 clones. Aunque se encontró una variedad de puntos de corte, todos se podían agrupar alrededor de dos posiciones concretas: la adenina 607 o la adenina 630. Ambas posiciones se encuentran entre 40 y 60 nucleótidos corriente arriba con respecto a la zona de interacción del miR-122. Este hallazgo implica que la unión del miR-122 al extremo 3' no traducido del RNA *IFNA5* es capaz de desencadenar un cambio estructural que conduciría a la aparición de una nueva estructura semejante al tRNA, reconocida por la RNasa P humana.

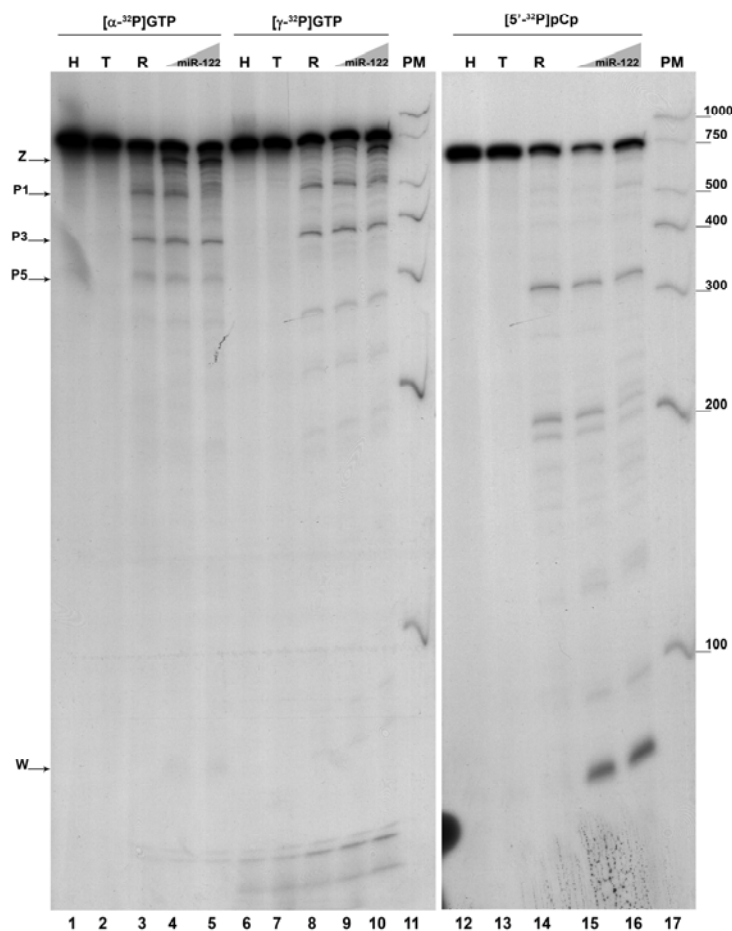


Figura 8: Localización del nuevo producto de corte de la RNasa P humana inducido por el miR-122. Se emplean diferentes marcajes del RNA *IFNA5* 1-700nt: internamente (carriles 1-5), marcado en el extremo 5' (carriles 6-10) y marcado en el extremo 3' (carriles 12-16). Carriles 1, 6 y 12 RNA incubado en hielo. Carriles 2, 7 y 13 RNA incubado en tampón de reacción. Carriles 3, 8 y 14 reacciones con RNasa P humana. Carriles 4-5, 9-10 y 15-16 la misma reacción en presencia de miR-122 a 15nM y 150nM respectivamente. Carriles 11 y 17 pesos moleculares. Los productos de corte previamente caracterizados se indican en el margen izquierdo junto a las bandas de nueva aparición Z y W.

A

Banda Producto	Nº clones secuenciados	Punto de corte	Frecuencia
Z	28	5'-----A ₆₀₅	3.5%
		5'-----A ₆₀₆	3.5%
		5'-----A ₆₀₇	21%
		5'-----A ₆₀₉	3.5%
		5'-----A ₆₁₂	7%
		5'-----A ₆₁₃	7%
		5'-----A ₆₂₈	3.5%
		5'-----A ₆₂₉	7%
		5'-----A ₆₃₀	28.5%

B

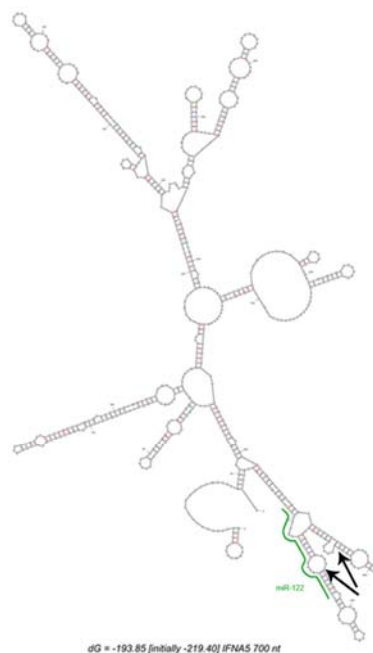


Figura 9: **A:** Tabla resumen de los resultados de subclonaje y secuenciación del producto de digestión Z. La banda Z aparece como producto de digestión específico del RNA 1-700nt de *IFNA5* con la RNasa P humana en presencia del miR-122. En color rosa se destacan los puntos de corte mayoritarios en torno a los cuales se agrupa el resto de puntos de corte observados. **B:** Ubicación de los principales puntos de corte de la RNasa P humana sobre una predicción de estructura secundaria para el RNA del *IFNA5* (1-700) empleando *RNAfold*. La línea verde marca la zona de interacción del miR-122 predicha *in silico*.

Se investigó el efecto de una serie de mutantes dentro de la secuencia de reconocimiento del miR-122 sobre la reacción de digestión *in vitro* con RNasa P humana. Los resultados muestran que tan solo 2 mutaciones localizadas en medio de la secuencia de reconocimiento son capaces de impedir la aparición de la banda Z, a una concentración 15nM de miR-122 (**Figura 10**). El efecto de las mutaciones empleando 3 concentraciones para cada uno de los microRNAs mutantes se muestra en la figura suplementaria 3. Estos resultados demuestran que la inducción del cambio conformacional es consecuencia de la interacción específica del miR-122 con el RNA *IFNA5*.

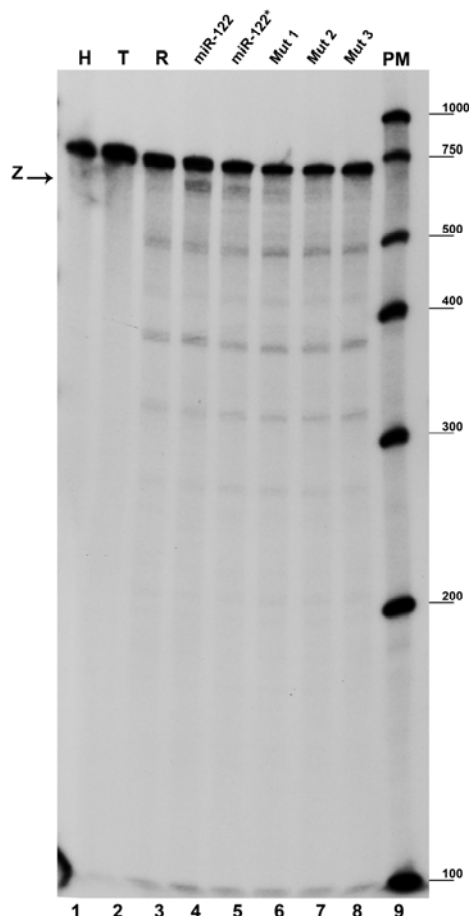


Figura 10: Efecto de las mutaciones en la secuencia de reconocimiento del miR-122 sobre el patrón de digestión del RNA 1-700nt de *IFNA5* con RNasa P humana. Carril 1 RNA incubado en hielo. Carril 2 RNA incubado en tampón de reacción. Carril 3 reacción de digestión con RNasa P humana. Carriles 4-8 digestión en presencia de una concentración 15nM de los siguientes oligonucleótidos de RNA: carril 4 miR-122 comercial; carril 5 miR-122 transcrito *in vitro*; carriles 6-8 mutantes 1, 2 y 3. Carril 10 pesos moleculares.

Determinación del fragmento mínimo de RNA *IFNA5* asociado al miR-122 reconocido por la RNasa P humana.

Con objeto de acotar la región de secuencia involucrada en el cambio conformacional causado por la interacción del miR-122, se realizaron una serie de subclonajes bajo el promotor de la T7 RNA polimerasa con la finalidad de transcribir los fragmentos de RNA *IFNA5* 560-700nt, 577-700nt y 600-700nt. Gracias a los experimentos de digestión con estos transcritos, presentados en la **figura 11A** y **11B**, se estableció que el segmento mínimo capaz de ser reconocido por la RNasa P humana en presencia del miR-122 era el comprendido entre los nucleótidos 577-700. Sin embargo la RNasa III seguía reconociendo el dímero RNA *IFNA5*:microRNA para un tamaño inferior (transcrito 600-700nt), lo que no es extraño, pues el sustrato mínimo reconocido por la RNasa III es de 22 pares de bases (Pertzev & Nicholson, 2006). Para confirmar que los puntos de corte se mantenían entre el fragmento mínimo de *IFNA5*(577-700nt) y el RNA *IFNA5*(1-700nt) se realizó una reacción de secuencia en gel desnaturizante (**Figura 11C**). El producto mayoritario

se concentra en una banda difusa alrededor de los nucleótidos 629-630, lo que está en concordancia con el punto de corte más frecuente para el fragmento de 700nt. Se advierte otra banda definida en la posición 648, no observada previamente en los geles en los cuales el transcrito *IFNA5*(577-700nt) había sido marcado internamente con GTP[α - 32 P] (e.g. carril 9 figura 11A), por lo que no se tomó en consideración.

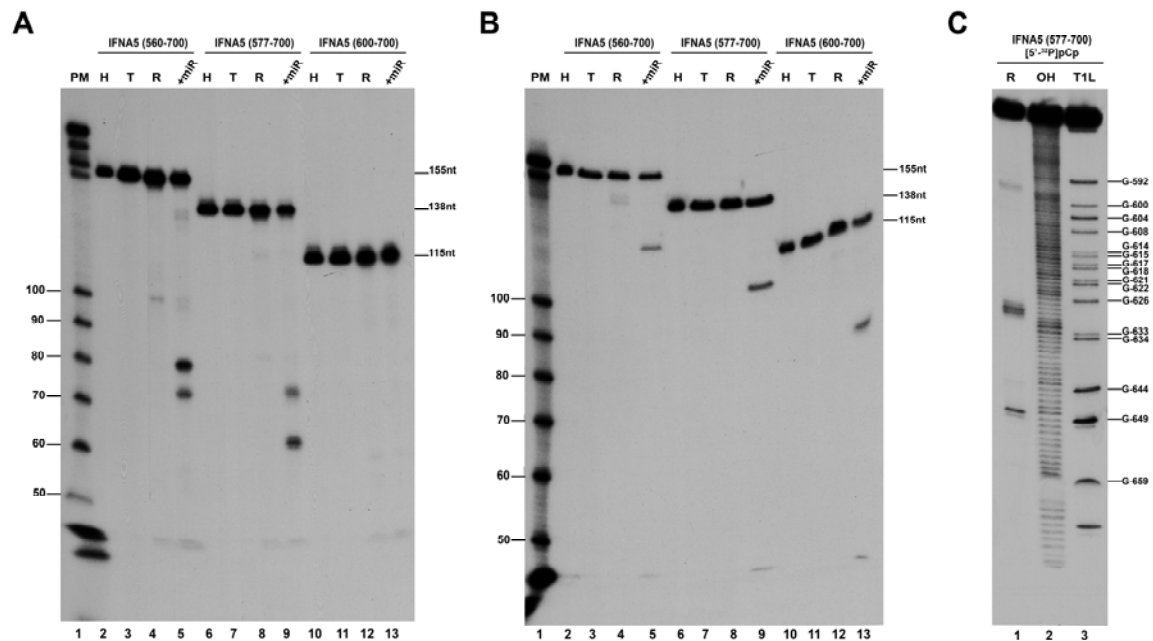


Figura 11: Determinación del fragmento mínimo de RNA *IFNA5* reconocido por la RNasa P humana o la RNasa III de *E.coli*, en presencia del micro RNA 122. Transcritos *in vitro* de diferentes tamaños fueron marcados internamente. Carriles 2-5: fragmento de RNA *IFNA5*(560-700) de 155nt. Carriles 6-9: RNA *IFNA5*(577-700) de 138nt. Carriles 10-13: RNA *IFNA5*(600-700) de 115nt. **A:** Digestión con RNasa P humana. Carril 1 pesos moleculares. Carriles 2, 6 y 10 RNA incubado en hielo. Carriles 3, 7 y 11 RNA incubado en tampón de reacción. Carriles 4, 8 y 12 reacción de digestión con RNasa P humana en ausencia de miR-122. Carriles 5, 9 y 13 reacción de digestión con RNasa P humana en presencia de miR-122 a 15nM **B:** *idem* para el experimento de digestión con RNasa III de *E.coli* a una concentración 0.0005U/ μ l. En este caso la concentración de miR-122 en los carriles 5, 9 y 13 fue de 150nM. **C:** Reacción de secuenciación para determinar los puntos de corte de la RNasa P humana en el fragmento de RNA *IFNA5*(577-700). El transcrito empleado para el ensayo fue marcado en 3' con pCp[5'- 32 P]. Carril 1 reacción de digestión con RNasa P humana en presencia de miR-122 a 15nM. Carril 2 escalera de OH. Carril 3 escalera con RNasa T1 en condiciones desnaturalizantes. En todos los casos las autorradiografías corresponden a geles de acrilamida desnaturalizantes al 6%.



DISCUSIÓN



DISCUSIÓN 1

“Caracterización *in vitro* de un cambio conformacional en el que intervienen elementos estructurales de doble cadena, en la región 5’ del RNA del HCV, sensible al miR-122”

El conjunto de resultados obtenidos nos permite establecer la existencia de un cambio conformacional en la región 1-570 del RNA del HCV, que implica una transición estructural entre dos elementos de doble cadena mutuamente excluyentes. Este *switch* se encuentra modulado *in vitro* por acción del miR-122; microRNA específico del hígado. Las alteraciones estructurales observadas afectan a la región IRES de HCV, la cual pasaría de encontrarse dentro de una conformación cerrada a una conformación abierta. En el caso de la conformación cerrada las bases 24-38, situadas entre los dominios I y II, aparecen con las bases 428-442. Cuando la estructura se abre, los nucleótidos 428-442 interactúan con la secuencia comprendida entre las bases 494-508, formando la base del tallo lazo que constituye el dominio VI. El miR-122 rige el cambio estructural desfavoreciendo la formación del LRA. En el año 2005 se demostró que el miR-122 modula la abundancia del HCV en aquellas células que lo expresan (Jopling et al, 2005). Posteriormente se describió su capacidad para promover la traducción cuando se emplearon fragmentos del RNA que contenían los dominios V y VI (Henke et al, 2008). Planteamos aquí que el cambio conformacional del RNA 1-570 de HCV, promovido por el miR-122, constituye un elemento regulador integral del genoma viral. Nuestra propuesta solventa el aparente conflicto existente entre los estudios que defienden la presencia de una conformación cerrada (Beguiristain et al, 2005; Honda et al, 1999; Kim et al, 2003) y aquellos que describen el tallo lazo VI (Tuplin et al, 2004). Experimentos cinéticos previos realizados en nuestro laboratorio revelaron que al menos el 80% de las moléculas se encuentran en una conformación cerrada (Beguiristain et al, 2005). En aparente contradicción, un estudio estructural del RNA en la región que codifica para la proteína *core* indicó que la secuencia G₄₂₈-U₄₄₂ formaba parte de la base del tallo lazo VI, cuya presencia era incompatible con la conformación cerrada (Tuplin et al, 2004). Estas discrepancias desaparecen si consideramos que los transcritos de RNA empleados en el mencionado estudio incluían el IRES, pero carecían del dominio I, requerido para el establecimiento de la conformación cerrada, y si además tenemos presente el carácter dinámico de la molécula. Un problema similar resuelto de modo semejante es el encontrado para la región *leader* del RNA de HIV (Huthoff & Berkhout, 2001).

Los cambios de movilidad manifestados en los experimentos de retardo en geles nativos están relacionados con la alteración de la conformación a nivel global. Por lo tanto, la activación de la traducción inducida por el miR-122 podría estar relacionada con el incremento de accesibilidad para la subunidad pequeña del ribosoma o para factores de inicio (*i.e.* eIFIII) en la conformación abierta (Henke et al, 2008). Sin embargo, según un trabajo reciente, la activación de la traducción no parece requerir la transición estructural propuesta, sino que sería mediada por proteínas Argonauta (Roberts et al, 2011); en concreto se ha demostrado que Ago2 es necesaria para la promover la traducción de virus recombinante en presencia del miR-122 (Wilson et al, 2011). A pesar de ello, no debe descartarse la posibilidad de que el cambio estructural inducido por el miR-122 en el 5’UTR pueda afectar a otros procesos del ciclo biológico. Procesos como la encapsidación o la producción de proteínas derivadas de un cambio en el marco de lectura para la proteína *Core* (ARFPs) podrían verse afectados por cambios de elementos estructurales del RNA en la región 5’UTR (Branch et al, 2005; Morice et al, 2009).

El miR-122 actúa como inductor viral interactuando en tándem con la secuencia proximal comprendida entre los nucleótidos 23-40 (Jopling et al, 2008) del genoma de HCV, coincidiendo con la región que atañe al LRA. Con respecto a la influencia del miR-122 sobre la

población de confórmers *in vitro* cabe destacar varios factores. En primer lugar, la proporción de microRNA con respecto al RNA 1-570 de HCV requerida para inducir el *switch* (3:1). Este resultado es coherente con la diferente representación de ambas moléculas en el interior de los hepatocitos, superior a 10^3 moléculas para el miR-122 (Sarasin-Filipowicz et al, 2009) e inferior a 100 para el RNA de HCV (Agnello et al, 1998). En segundo lugar y referente a la secuencia de reconocimiento del miR-122 (*seed sequence*), esencial para la actividad del microRNA, hemos demostrado que de forma aislada es incapaz de ocasionar el cambio conformacional, salvo que se emplee a elevadas concentraciones. La importancia relativa de los nucleótidos situados en 3' con respecto a la secuencia de reconocimiento ha sido y sigue siendo investigada. Experimentos en los que se cuantificaron los niveles de replicación viral en respuesta a la adición ectópica de diferentes mutantes en 3' del miR-122, revelaron que únicamente son prescindibles los 3 últimos nucleótidos de la molécula para que el microRNA ejerza su función (Jopling et al, 2006). No obstante, si se atiende a los efectos sobre la traducción toda la región 3' es necesaria (nucleótidos 9-23) para que se produzca activación (Roberts et al, 2011). Recientemente se ha comprobado que el apareamiento de nucleótidos en 3' es funcionalmente importante para la estabilidad del genoma y la producción de partículas infecciosas (Shimakami et al, 2012). El tercer lugar parece que el cambio estructural inducido por el miR-122 es reversible, mientras que el generado por el oligonucleótido de DNA 22(-) no lo es. Esto indica que las alteraciones estructurales observadas trascienden el fenómeno de simple competición por el apareamiento de bases mediante enlaces tipo Watson-Crick. En el caso de los *riboswitches* se ha observado que usualmente uno de los confórmers se encuentra favorecido y constituye la estructura presente por defecto, incluso en presencia de concentraciones saturantes de ligando, sugiriendo un comportamiento parecido al de un detonador cotranscripcional (Garst & Batey, 2009). Es probable que en nuestro caso suceda algo similar.

Los resultados de digestión con RNasa III y miR-122 obtenidos en presencia de un lisado de reticulocitos de conejo sugieren que el *switch* se mantiene en un contexto biológico relevante. Por tanto, es razonable pensar que el cambio conformacional aquí descrito puede representar la correlación estructural del reciente efecto positivo que sobre la traducción de HCV ejerce el miR-122, ya sea en lisado de reticulocitos de conejo, o en cultivo celular (Henke et al, 2008). Siendo así, los datos proporcionarían un papel concreto a la zona proximal de la región del CORE, cuya función dependiente de estructura era desconocida pero ya se había calificado como esencial para la viabilidad viral en un modelo de infección en chimpancé (McMullan et al, 2007).

Finalmente, cabe discutir si la interacción del miR-122 con el RNA 1-570 es suficiente para provocar efectos biológicos o se requiere la acción de factores proteicos adicionales. En cualquier caso la actuación del miR-122 como inductor de un cambio conformacional en el fragmento 1-570 de HCV dista bastante del papel convencional atribuido a los microRNAs como reguladores post-transcripcionales en los mRNAs eucariotas. En estos casos sus efectos inhibidores suelen ocurrir a través de la unión directa en regiones 3' no traducidas; mientras que para el caso que nos ocupa la interacción se localiza en el 5' UTR y está relacionada con un incremento en la tasa de replicación y traducción del virus. Jopling y colaboradores sugieren que el efecto activador o represor sobre la expresión de un mRNA está vinculado con la posición que ocupa la diana de interacción del microRNA: una diana dentro de la región 5' UTR induciría expresión mientras que localizada en el 3'UTR promovería inhibición traduccional o degradación del RNA (Jopling et al, 2008). Sin embargo, existen casos en la literatura que describen microRNAs que activan la traducción ya sea hibridando en regiones 3'UTR (Vasudevan et al, 2007) o en regiones 5' UTR, como ocurre con los mRNAs que codifican para proteínas

ribosomales (Orom et al, 2008). Sea como fuere, el microRNA 122 se revela como uno de los principales actores responsables del tropismo hepático exhibido por el HCV, beneficiando sus procesos replicativos y traduccionales. Este hecho lo convierte en un blanco perfecto en la búsqueda de nuevas terapias dirigidas contra la infección viral. En la actualidad este potencial terapéutico ha sido explorado con éxito en un modelo de infección de HCV en chimpancés (Lanford et al, 2010).

DISCUSIÓN 2

“Identificación y caracterización de elementos de estructura tipo tRNA dentro de la población de mRNAs hepáticos humanos: ejemplo del mRNA IFNA5”.

El propósito de este bloque experimental fue explorar si el procesamiento *in vitro* detectado en varios RNAs de origen viral, utilizando la enzima RNasa P, se observaba también dentro de la población de mRNAs celulares. Siendo así, la identificación de especies concretas de mRNAs portadoras de señales reconocidas por la RNasa P podría aportar pistas sobre las ventajas adquiridas por los RNAs virales que han incorporado elementos tipo tRNA dentro de sus genomas.

En primer lugar, se realizaron experimentos de inhibición competitiva sobre la reacción de procesamiento del pre-tRNA^{Tyr} de *E.coli*, empleando un extracto de células HeLa enriquecido en actividad RNasa P. En base a los resultados obtenidos podemos deducir que la inhibición causada empleando como competidores el pre-tRNA^{Tyr} frío, o la población de mRNA hepático, no se debe simplemente al hecho de añadir cantidades crecientes de ácido ribonucleico a la mezcla de reacción, pues el comportamiento es claramente diferente al manifestado cuando se añadió poli-r(A) sintético, que no es sustrato de la RNasa P (Kole & Altman, 1981; Ziehler et al, 2000). Dado que la curva de inhibición del pre-tRNA^{Tyr} frío representa la inhibición específica de la RNasa P, el hecho de que el mRNA hepático sea mejor competidor de la reacción que un sustrato canónico puede interpretarse de diversas formas: 1) el mRNA hepático puede poseer gran cantidad de motivos estructurales capaces de ser reconocidos y procesados por la RNasa P; 2) el mRNA hepático podría interactuar con el holoenzima de forma específica, aunque tales interacciones resultasen improductivas respecto al corte; y/o 3) debido a que la longitud promedio estimada para los mRNAs hepáticos es 17 veces superior a la del pre-tRNA^{Tyr} de *E.coli*, la inhibición de la reacción podría suceder de modo inespecífico, *e.g.* a través de la interacción con proteínas del complejo (Marvin et al, 2011). De hecho, al considerar la masa de RNA agregada a la reacción, el mRNA hepático se revela peor competidor que el pre-tRNA^{Tyr}, necesitando una masa 2.5 veces superior para alcanzar el 50% de inhibición. Este efecto sugiere que el grueso de RNA presente en la reacción influye directamente sobre el porcentaje de inhibición. No obstante, el hecho de que el 50% de inhibición se alcance con valores de masa 15 veces inferiores, comparados con el poli-r(A) sintético, apunta a que las diferencias encontradas entre el pre-tRNA^{Tyr} y el mRNA se deben, al menos en parte, a la presencia específica de estructuras semejantes al tRNA dentro de la población hepática.

Al examinar directamente los productos de digestión a través de perfiles derivados de electroforesis capilar, usando dos tipos diferentes de actividades RNasa P (extracto de células HeLa, y RPR de *Synechocystis sp.*), no se observó ninguna diferencia significativa. Esto no fue del todo inesperado, teniendo en cuenta resultados publicados en los años 80 empleando hnRNA marcado con ³²P (Ferrari et al, 1980; Kole & Altman, 1981). La degradación de los mRNA hepáticos, tanto en las muestras control como en las muestras tratadas con el ribozima de *Synechocystis sp.* (Figura suplementaria 2B), se atribuyó a la hidrólisis inducida por la alta concentración de sales (100 mM Mg²⁺ y 1 M K⁺) requerida para que el ribozima sea activo *in vitro*, suceso que ya había sido advertido sobre otros sustratos con anterioridad.

El diferente comportamiento que manifiesta el mRNA hepático cuando actúa como inhibidor, o como sustrato, prueba que la mayoría de moléculas de mRNA no contiene dianas procesables por la RNasa P. No obstante, si existen especies concretas de mRNAs susceptibles al

procesamiento en escasa proporción su digestión puede quedar enmascarada por el grueso de la población, siendo de este modo imperceptibles por electroforesis capilar.

El hecho de que el número de genes obtenidos mediante el cribado diferencial a nivel genómico sea tan escaso (64 genes en total de aproximadamente 22.000 presentes en los chips), y que el promedio de infra/supra-representación en los chips sea relativamente bajo, es coherente con el hecho de que sólo una pequeña fracción de los mRNAs hepáticos sean procesados. La diferencia tan acusada entre el número de genes identificados mediante los ensayos con el extracto enriquecido en RNasa P humana (17 genes), y el ribozima de *Synechocystis sp.* (47 genes), junto a la ausencia de genes coincidentes entre ambos listados, puede explicarse en función de la distinta naturaleza de ambas RNasas, lo que repercute tanto en las condiciones de reacción como en las características de sustrato reconocidas por cada una de ellas. La mayor composición proteica del holoenzima humano con respecto a la RPR procariota determina de forma natural una mayor restricción de los sustratos diana, siendo más exigente que el ribozima de la cianobacteria en su reconocimiento. Como se mencionó en el apartado introductorio, la RNasa P procariota procesa sustratos sencillos capaces de mimetizar únicamente el apilamiento coaxial entre los brazos aceptor y T Ψ C del tRNA (McClain et al, 1987; Schlegl et al, 1992); el sustrato mínimo identificado para holoenzimas bacterianos consta de un tallo de 4 nt de longitud con un nucleótido en 5' protuberante (Hansen et al, 2001). La RNasa P eucariota requiere contactos adicionales con el brazo D o el brazo portador del anticodón para un reconocimiento eficiente (Yuan & Altman, 1995). Sin embargo, el uso de una actividad RNasa P humana purificada a partir de un extracto celular para los experimentos de rastreo masivo supone una serie de inconvenientes, pues la presencia en el extracto de otros factores proteicos capaces de interferir en la reacción, e.g. secuestrando moléculas de mRNA de forma inespecífica, enmascararía su reconocimiento por parte de la RNasa P humana.

Otro factor importante a valorar son las condiciones de reacción del ribozima de *Synechocystis sp.*, que sucede a alta fuerza iónica (100 mM MgCl₂ y 1 M KCl). Esta densa atmósfera catiónica estabilizaría estructuras terciarias (Draper & Misra, 1998; Misra & Draper, 1998) imponiendo una mayor rigidez conformacional a las moléculas de RNA, que en condiciones fisiológicas tienden a ser más flexibles y dinámicas. Además, como se mencionó en la sección introductoria, los cationes metálicos en solución apantallan las fuerzas electrostáticas de repulsión establecidas entre moléculas de RNA, facilitando su acercamiento (Draper & Misra, 1998; Misra & Draper, 1998).

No obstante, el hecho de que transcritos identificados mediante el tratamiento con la RPR de *Synechocystis sp.* sean procesados *in vitro* por la RNasa P humana (pero no hayan sido identificados es los chip RNasa P humana) indica que mediante nuestra técnica de cribado sólo hemos sido capaces de detectar una pequeña fracción del total de mRNAs portadores de estructuras tipo tRNA. Unido a este problema derivado de causas metodológicas, la subestimación del número de mRNAs con estructuras capaces de ser procesadas por la RNasa P también puede deberse a causas fisiológicas; si nos enfrentamos a un hipotético sustrato expresado en muy baja proporción, o si dicho mRNA emerge únicamente bajo determinadas condiciones metabólicas o se muestra sólo tras algunas modificaciones previas, nuestro método resultaría ciego. Este último caso se ha documentado para el mRNA del operón de la histidina, que es reconocido por la RNasa P bacteriana previo procesamiento por la RNasa E (Alifano et al, 1994).

Comparando cuantitativamente ambos resultados, es decir, por un lado el porcentaje de inhibición del corte del pre-tRNA^{Tyr} por la RNasa P humana al incrementar la cantidad de mRNA hepático en la reacción, y por otro lado el número de genes identificados mediante los chips de DNA, es evidente que no todas las estructuras parecidas al tRNA presentes en los mRNAs que compiten están siendo digeridas. Nuestros resultados apuntan a que el grueso de mRNAs hepáticos interacciona con el holoenzima, provocando la inhibición del procesamiento sin ser necesariamente cortados. En esta dirección el grupo de Dr. Engelke ha observado que moléculas de RNA en simple cadena, en forma de homopolímeros sintéticos, incapaces de ser procesados *in vitro* por la RNasa P de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, ejercen un efecto inhibitor sobre la reacción de digestión sobre el pre-tRNA^{Tyr} (Marvin et al, 2011; Ziehler et al, 2000). El Dr. Engelke postula la existencia de dos centros de unión para el sustrato, uno para el tRNA y otro para RNA de simple cadena, este último sería responsable de unir la secuencia tráiler en 3' del tRNA. El RNA de cadena sencilla podría unirse en este punto inhibiendo inespecíficamente la reacción de digestión. Dado que la mayoría de las RPPs eucariotas son fuertemente básicas (pI 9-10) (Coughlin et al, 2008; Walker & Engelke, 2006) y podrían operar uniendo RNA, es posible que *in vitro* dicha propiedad se encuentre forzada de forma inespecífica, magnificando el efecto inhibitor del RNA no estructurado.

Siguiendo un criterio de longitud, hemos seleccionado tres genes candidato – *RPS9*, *H2AFJ* e *IFNA5*- para confirmar, mediante digestión *in vitro*, la presencia de estructuras diana para la RNasa P. Los tres RNAs resultaron ser sustratos para la RNasa P humana, compitiendo de forma similar en la reacción de procesamiento del pre-tRNA^{Tyr} por esta enzima. La eficacia de corte de los mRNAs es baja, con valores que oscilan entre el 4% y el 15%. Para el caso concreto del transcrito *IFNA5*, se demostró la química de corte propia de la RNasa P y se determinaron los puntos exactos de procesamiento en los productos de digestión mayoritarios, *i.e.* posiciones A₃₇₆/A₃₇₈ y A₄₈₉/A₄₉₁₋₄₉₂. Se han detectado secuencias minoritarias que indicarían procesamiento en puntos adyacentes a los mencionados. Esta aparente imprecisión en los puntos de corte no es un fenómeno inusual, habiendo sido descrita para sustratos no canónicos; es el caso de la RNasa P de *E.coli*, que reconoce y procesa la estructura tipo tRNA encontrada en la región 3' del virus del mosaico amarillo del nabo en dos puntos contiguos (Green et al, 1988; Guerrier-Takada et al, 1988), del virus de la peste porcina clásica (Lyons & Robertson, 2003) y, probablemente, del virus de la diarrea viral bovina y del HCV (Lyons & Robertson, 2003; Nadal et al, 2002). La elección de varios puntos de corte próximos se ha asociado con las características de la región 5' respecto al punto de procesamiento, y por tanto dependería de la conformación que esta región pudiera adoptar (Guerrier-Takada et al, 1988).

Los transcritos también fueron digeridos por la RPR de *Synechocystis sp.*, mostrando un patrón de corte similar aunque no idéntico. Pese a que no existen estudios sistemáticos que impliquen actividades RNasa P de distinto origen sobre el mismo sustrato, a excepción de los precursores del tRNA, asumimos que la misma estructura está siendo reconocida y procesada en puntos diferentes y adicionales por ambas actividades RNasa P. Tal comportamiento ha sido descrito para los productos de corte del ribozima de *Synechocystis sp.* y la RNasa P humana sobre el mRNA de HCV, dentro de la estructura tipo tRNA que incluye el codón de inicio de la traducción. Los puntos de corte entre ambas actividades cuentan con una diferencia de al menos 26 nucleótidos (Nadal et al, 2002; Piron et al, 2005; Sabariego et al, 2004).

La expresión de los genes del interferón es un fenómeno imprescindible para desencadenar la respuesta antiviral. A pesar de ello, la mayor parte de los estudios efectuados

desde su descubrimiento a finales de los años cincuenta se ha centrado en su actividad a nivel proteico, a excepción de algunas publicaciones del grupo de Kaempfer *et. al.* con el mRNA del interferón gamma (Ben-Asouli *et al.*, 2002; Cohen-Chalamish *et al.*, 2009). A nivel de estructura secundaria, se ha documentado para el mRNA *IFNA1* una región comprendida entre los nucleótidos 208-452, responsable del transporte de la molécula desde el núcleo al citoplasma (Kimura *et al.*, 2010). Recientemente, empleando construcciones con fragmentos deletados progresivamente en ensayos de transfección en células HeLa e hibridación fluorescente *in situ*, se ha conseguido acotar esta región funcional entre los nucleótidos 229-411 (Lei *et al.*, 2011). Lei *et. al.* encuentran secuencias específicas del mRNA responsables de la exportación nuclear y estabilidad citoplásmica en otros transcritos sin intrones (*e.g.* *IFNB1* y *HSPB3*); todas estas secuencias con la misma función celular se denominan CAR (*Cytoplasmic accumulation region*) (Lei *et al.*, 2011). La secuencia codificante del mRNA entre los diferentes subtipos de interferón alfa (IFNA) se encuentra altamente conservada (Weissmann *et al.*, 1982). Si extrapolamos los datos obtenidos para el *IFNA1* de Kimura *et al.* y Lei *et. al.* sobre la secuencia del mRNA de *IFNA5*, las regiones funcionales se corresponden con las posiciones 198-442 y 242-424 respectivamente. Sorprendentemente, dentro de esta región hemos localizado uno de los principales puntos de corte para la RNasa P humana (A_{376} y A_{378}) y el ribozima de *Synechocystis sp.*, (± 10 nt respecto a la posición mencionada). Experimentos empleando transcritos deletados de forma gradual entorno a estas posiciones indican que el fragmento mínimo reconocido por la RNasa P dentro del motivo tipo tRNA I, concuerda con el delimitado según estudios funcionales en el CAR *IFNA1*, *i.e.* *IFNA5* (215-427). Este hallazgo nos anima a proponer la señal de exportación nuclear CAR descrita en los mRNAs sin intrones como una estructura mimética para el tRNA. Ensayos preliminares de digestión *in vitro* con RNasa P humana para los CAR *IFNB1* y *HSPB3* apoyan esta afirmación (resultados no mostrados).

Asimismo, se ha descrito un elemento de secuencia que favorece la acumulación a nivel citoplásmico en el caso del mRNA *H2A* murino, que también carece de intrones (Huang & Carmichael, 1997). El fragmento de RNA en cuestión consta de 100 nt aproximadamente y se encuentra dentro de la región codificante (199-298 nt) (Huang & Carmichael, 1997). Nuestra variante humana sufre dos cortes a una distancia estimada de 150 nt del extremo 3' en presencia del extracto RNasa P humana (resultados no mostrados). Lamentablemente la imposibilidad de obtener la secuencia exacta empleada en el trabajo de Huang *et. al.* nos impide establecer relaciones de secuencia y/o estructura en base a predicciones *in silico*. La existencia de secuencias de RNA con función similar se ha documentado en transcritos del HBV (Huang & Liang, 1993; Huang & Yen, 1995) y del virus del herpes simplex (Liu & Mertz, 1995).

El uso de enzimas, o preparaciones enzimáticas a partir de extractos celulares, capaces de cortar específicamente regiones estructuradas del RNA dentro del hnRNA, RNAs virales o de bacteriófagos, constituyó una provechosa herramienta de estudio en el área de la expresión genética durante los años comprendidos entre 1970 y 1980. Las regiones detectadas utilizando esta metodología proporcionaron información valiosa con respecto al procesamiento o la función de los RNA portadores (Dunn & Studier, 1975; Ojala *et al.*, 1981; Robertson, 1982; Saito & Richardson, 1981). Entre los datos obtenidos durante esta época destaca la ausencia de dianas detectables para la RNasa P, ya fuese de origen procariota o eucariota, dentro de la población de hnRNA (Ferrari *et al.*, 1980; Kole & Altman, 1981). En consecuencia, se estableció una ausencia de papel funcional para la RNasa P dentro del metabolismo de maduración de los mRNAs. En la actualidad varios trabajos a escala genómica respaldan la hipótesis de que la RNasa P pueda estar procesando sustratos diferentes al tRNA dentro de la célula eucariota: mediante depleción de

subunidades proteicas, mutantes termosensibles, o RNAs copurificados con el holoenzima (Coughlin et al, 2008; Mattijssen et al, 2010; Samanta et al, 2006; Yang & Altman, 2007). Los mRNAs de muchas proteínas ribosomales, algunos factores de inicio de la traducción y distintas subunidades de las RNA polimerasas I, II y III se han propuesto como posibles sustratos para la RNasa P en *Saccharomyces cerevisiae*; entre ellos se encuentra el RNA *RPS9A*, que copurifica con la RNasa P (Coughlin et al, 2008). Sin embargo todos estos trabajos realizados en levadura no aportan evidencias directas del procesamiento de mRNAs.

Una publicación relativamente reciente, en la cual los autores emplean tecnología de *microarrays* tras la depleción de dos RPPs (comunes para la RNasa P y la MRP) en células humanas HEP-2, ha permitido identificar 95 genes como potenciales candidatos para ser procesados por la RNasa MRP/P. Entre este listado de genes los autores demuestran la presencia de dos puntos de corte para la endoribonucleasa MRP/RNasa P en el transcrito de la viperina (*RSAD2*), localizados dentro de la región codificante del mRNA (Mattijssen et al, 2010). La viperina codifica una proteína de defensa antiviral inducida por infecciones virales, lipopolisacárido y los interferones tipo I y II (Fitzgerald, 2011). En sus listados no se encuentra ningún subtipo de interferón alfa; no obstante, llama la atención la presencia de variantes génicas muy próximas al comparar con nuestros listados, *e.g.* CASP7, ARPC1A, TNFSF10 y H2AC (Mattijssen et al, 2010), mientras nosotros obtenemos: CASP4, ARPC1B, ARPC3, TNFSF14 y H2AFJ. Aunque los citados autores no pueden distinguir con total seguridad cuál de las dos actividades enzimáticas es la responsable de las alteraciones observadas en el análisis, debido al método empleado para la purificación de la actividad MRP, defienden el procesamiento de estos sustratos por parte de la RNasa MRP (Mattijssen et al, 2010). Se recuerda aquí que la RNasa MRP nuclear cuenta con una especificidad diferente; no puede cortar los precursores del tRNA^{Tyr} (Karwan et al, 1991) y parece reconocer algunas características de secuencia (Esakova et al, 2011).

En organismos eucariotas, el mimetismo para el tRNA constituye un área poco explorada. Es probable que esto se deba a que la mayoría de enzimas del metabolismo del tRNA usualmente empleadas para estudiar el mimetismo del tRNA, requieren un extremo 3' libre (*i.e.* aminoacil tRNA sintetasas, ó la CCA nucleotidil transferasa). La mayor parte de estructuras semejantes al tRNA se han encontrado en el extremo 3' de virus de plantas (Rietveld et al, 1983; Rietveld et al, 1982) o en regiones 5' UTR dentro de IRES virales (Lyons & Robertson, 2003; Nadal et al, 2002; Sabariego et al, 2004; Serrano et al, 2007). También puede deberse en parte a la idea de que tales señales estructurales suponen un riesgo para la molécula portadora, que podría exponerse a un procesamiento inoportuno por parte de la RNasa P nuclear.

La RNasa P reconoce en su sustrato elementos estructurales, lo que explica que diversas RNasas P sean capaces de reconocer y procesar tRNAs de diferentes organismos, sin una secuencia nucleotídica particularmente conservada (Steinberg et al, 1997). Probablemente, todos los sustratos alternativos al tRNA descritos para la RNasa P, se parecen de algún modo a este sustrato primigenio. Es importante subrayar en este punto de la discusión la diferencia existente entre los conceptos de semejanza estructural y mimesis, que son términos habitualmente confundidos en la literatura (estructuras tipo tRNA, semejantes al tRNA, y miméticas para el tRNA suelen emplearse como sinónimos). La semejanza estructural posee un carácter estrictamente topológico; se sustenta sobre la posición, ángulos y distancias que ocupan los átomos en el espacio. En contraposición la mimesis se fundamenta sobre relaciones de comunicación; no se refiere a la arquitectura de la cadena de RNA, sino directamente al

“lenguaje” molecular y a su manipulación. Las estructuras de RNA encontradas empleando enzimas cuyo reconocimiento depende de características estructurales (*e.g.* RNasa P) constituyen potenciales señales de significación, pues dichos motivos estructurales son informativos para los enzimas dentro del contexto celular, donde los consideramos “intérpretes” (Díaz-Toledano & Cacho-Suelves, 2011). Sujeto a este criterio designamos tales estructuras como “motivos miméticos”. En caso de ser detectados utilizando la actividad RNasa P, hablaríamos de motivos miméticos para el tRNA (Frenkel et al, 2004; Giege et al, 1998).

Los motivos miméticos para el tRNA contenidos en los RNAs virales se relacionan con la captura del ribosoma en la traducción mediada por IRES (Costantino et al, 2008; Jan et al, 2003; Lyons & Robertson, 2003; Nadal et al, 2002; Serrano et al, 2007) y en la regulación entre los procesos de replicación, traducción y encapsidación (Dreher, 2009). En referencia al tmRNA procariota, interviene en la señalización de proteínas anormales para su posterior proteólisis (Bessho et al, 2007; Felden et al, 1998; Komine et al, 1994). En algunos plásmidos mitocondriales, como los pertenecientes al hongo *Neurospora crassa*, es responsable de cebar la síntesis del cDNA durante la replicación (Chen & Lambowitz, 1997), mientras que en plásmidos mitocondriales humanos se ha asociado con la pauta de procesamiento de los mRNAs policistrónicos (Ojala et al, 1981). A tenor de nuestros resultados, los motivos miméticos para el tRNA contenidos en los mRNAs celulares también pueden vincularse con señales de localización intracelular y de estabilidad citoplásmica. Este hallazgo ampliaría el abanico de recursos estructurales disponibles, en provecho de aquellos virus de RNA que los incorporasen en sus genomas.

DISCUSIÓN 3

“Identificación *in vitro* de un cambio estructural en la región 3' UTR del mRNA *IFNA5* inducido por el miR-122”

Por regla general, los miRNAs regulan la expresión génica uniéndose por complementariedad imperfecta a las secuencias diana que se encuentran en el 3'UTR de los mRNAs (Lewis et al, 2003). En primer lugar, este trabajo advierte de la presencia de un nuevo candidato a considerar bajo este tipo de regulación en el escenario hepático: el mRNA que codifica la proteína antiviral del interferón alfa subtipo 5, con potencial para ser regulado por acción del miR-122. En segundo lugar subraya el descubrimiento de una estructura semejante al tRNA originada como consecuencia de la interacción del miR-122 en el 3'UTR del RNA *IFNA5*, detectada empleando la enzima RNasa P humana.

La secuencia de interacción para el miR-122 predicha *in silico* está comprendida entre los nucleótidos 666 y 682 del mRNA *IFNA5*. Esta diana cuenta con un alto nivel de confianza no sólo porque la complementariedad entre la secuencia de reconocimiento del microRNA y la secuencia diana del mRNA es completa, sino porque satisface, además, una serie de cualidades determinantes más allá del apareamiento de la secuencia de reconocimiento (Grimson et al, 2007): 1) cuenta con la complementariedad de 12 bases adicionales en 3' de la molécula, y aunque existen 3 bases desapareadas, lejos de suponer un hándicap para la interacción constituye un rasgo característico del reconocimiento miRNA-mRNA en mamíferos (Brodersen & Voinnet, 2009); 2) la secuencia de unión no se localiza muy cerca del codón que marca el final de la traducción, existe una distancia de 38 nucleótidos respecto al AUG; 3) como suele ocurrir en otros casos, la diana que anunciamos se encuentra en un contexto de secuencia rico en AU; con seis pentámeros AUUUA localizados en el 3'UTR según predicciones del banco de datos *ARESite* (Gruber et al, 2011). Los elementos ARE (*AU rich elements*) son frecuentes entre las citoquinas (Caput et al, 1986) y se asocian con una mayor accesibilidad debido a su menor grado de estructuración. *ARESite* reseña un 3'UTR para el RNA *IFNA5* que alcanza los 361nt de longitud, lo que discrepa bastante de los 73 nt registrados en la base de datos de *GenBank*, que han sido empleados durante el desarrollo experimental de este trabajo. De ser así se cumpliría 4) que la diana para el miR-122 se sitúa lejos del centro del UTR, otra cualidad recurrente en el reconocimiento de los microRNAs de sus dianas.

Los experimentos de digestión *in vitro* con RNasas que reconocen dímeros DNA:RNA (RNasa H) y RNA:RNA (RNasa III) con diferentes mutantes para el miR-122, unidos a los resultados de sensibilidad diferencial para RNasas dependientes de estructura, apoyan la observación de que el microRNA 122 es capaz de unirse específicamente a la secuencia predicha mediante herramientas bioinformáticas. La alteración en el patrón de bandas observado para la RNasa III en presencia del miR-122 es una consecuencia clara del reconocimiento y corte de un nuevo motivo de doble cadena, causado por la hibridación del microRNA entre los nucleótidos 666-682 del RNA *IFNA5*. Esta apreciación se encuentra apoyada por los resultados obtenidos en la determinación de los puntos exactos de corte para cada uno de los productos de digestión. Sabemos que la longitud mínima de sustrato reconocida por la RNasa III bacteriana es de 22 nt, lo que equivale a dos vueltas de dsRNA en forma A. Este sustrato mínimo es procesado aunque presente interrupciones de 4-5 bases desapareadas (Pertzev & Nicholson, 2006; Robertson, 1982).

El análisis estructural reveló una serie de alteraciones en la región 3'UTR del *IFNA5* como consecuencia de la hibridación del miR-122. Estos cambios consisten en: 1) el

desplazamiento del codón UGA hasta la zona comprendida entre horquillas; 2) la apertura del lazo basal que une los tallos lazos 1 y 2, lo que ocasiona el desapareamiento de los nucleótidos 670-675 (inicialmente en la base del tallo lazo 2) y; 3) el secuestro de la secuencia 675-680, originado por la unión con el miR-122. El sutil incremento en la sensibilidad para la RNasa VI entre los nucleótidos 654-657, unido a la fuerte sensibilidad de la C₆₅₅ para la RNasa A en el lazo apical 2, es compatible con la presencia de un pseudonudo. La sensibilidad para ambas enzimas ya se ha descrito con anterioridad en las regiones de secuencia involucradas en la formación de pseudonudos tanto en el caso del tRNA, como de HCV (Kolupaeva et al, 2000; Pleij et al, 1985; Wang et al, 1995). Este posible pseudonudo, formado como consecuencia de la hibridación del miR-122 en el 3'UTR, implicaría la interacción entre la secuencia ⁶⁵¹UU-UCAUU₆₅₈ emplazada en el lazo apical 2, con los nucleótidos ⁶²³AAUGA-AA₆₂₉, circundantes al codón UGA. Un resumen de las alteraciones mencionadas se ilustra en la **figura D1**

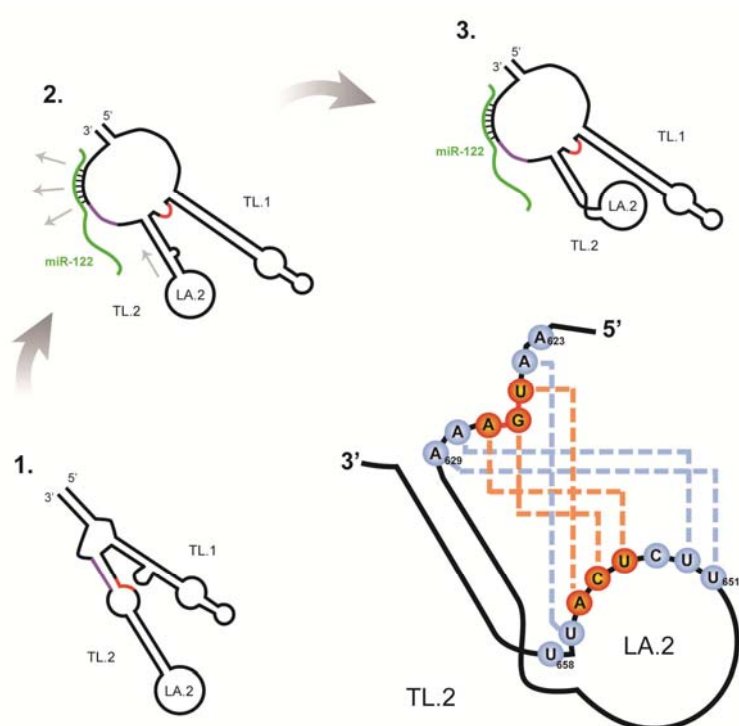


Figura D1: Representación esquemática de los cambios estructurales dentro de la región 3' UTR (570-700nt) del RNA *IFNA5* ocasionados por la interacción del miR-122. La secuencia de estructuras 1, 2 y 3 destaca: i) el desplazamiento del codón UGA (en rojo) a la zona entre horquillas; ii) la apertura de la burbuja que une los tallo-lazo 1 y 2 y el desapareamiento de los nucleótidos 670-675 (en morado), inicialmente emplazados en la base del tallo lazo 2; y iii) el secuestro de la secuencia 675-680 por parte del miR-122 (en verde). A mayor escala, detalle del posible pseudonudo formado en el 3'UTR como consecuencia de la unión de microRNA. La interacción implicaría a las secuencias ⁶²³AAUGA-AA₆₂₉ y ⁶⁵¹UU-UCAUU₆₅₈. TL.1: tallo lazo 1. TL.2: tallo lazo 2. LA.2: lazo apical 2

La secuencia diana para el miR-122 dentro del transcrito *IFNA5* se encuentra conservada entre las especies de mamíferos pertenecientes al orden Primates. La **figura D2** expone el alineamiento de las secuencias correspondientes a la región 3'UTR del mRNA *IFNA5* humano, de chimpancé, gorila, orangután y gibón de mejillas blancas. Como se puede observar los 7 nucleótidos implicados en el apareamiento con la secuencia de reconocimiento del miR-122 están totalmente conservados. Los 12 nucleótidos restantes que hibridarían con la región 3' del miR-122 también se encuentran conservados, y en los casos puntuales de variación siempre se observa un cambio entre pirimidinas lo que permitiría la formación de un par wobble con la guanina complementaria del miR-122.

La conservación parece extenderse a nivel de estructura secundaria si atendemos a predicciones del *software Mfold* para el motivo estructural que nos ocupa (**Figura D3**). Según estas predicciones la secuencia complementaria a la región de reconocimiento del miR-122

siempre quedaría expuesta en simple cadena como parte de un lazo interno que sostiene las dos horquillas principales. El tallo lazo 2 comprometería en regiones de doble cadena el codón UGA, al menos en parte para el caso humano. Finalmente, para todas las secuencias analizadas los nucleótidos que potencialmente estarían involucrados en la formación del pseudonudo se emplazarían en el lazo apical del tallo lazo 2.

```

HsaIFNA5      CAAGAAAGAUUAAGGAGGAAGGAAUGAAAACUGGUUCAACAUCGAAAUGAUUCUCAUUGA 660
PtroIFNA5     CAAGAAAGAUUAAGGAGGAAGGAAUGAAAACUGGUUCAACAUCGAAAUGAUUCUCAUUGA 660
GgorIFNA5     CAAGAAAGAUUAAGGAGGAAGGAAUGAAAACUGGUUCAACAUCGAAAUGAUUCUCAUUGA 660
PabeIFNA5     CAAGAAAGAUUAAGGAGGAAGGAAUGAAAACUG-UUCAACAUGGAAAUGAUUCUCAUUGA 659
NleuIFNA5     CAAGAGAGAUUAAGGAGGAAGGAGUGAAAACUGGUUCAACAUCGAAAUGAUUCUCAUUGA 660
*****
*****

HsaIFNA5      CUAGUACACCAUUUCACACUUCUUGAGUUCUGCCGUUUC----- 700
PtroIFNA5     CUAAUACACCAUUUCACACUUCUUGAGUUCUGCCGUUUCAAAUAUUAAUUUCUGCUAUAU 720
GgorIFNA5     UUAUUACACCAUUUCACACUUCUUGAGUUCUGCCGUUUCAAAUAUUAAUUUCUGCUAUAU 720
PabeIFNA5     CUAAUACACCAUUCACACUUCUUGAGUUCUGCGUUCAAAGAUUAUUUCUGCUAUAU 719
NleuIFNA5     CUAAUACACCAUUCACACUUCUUGAGUUCUGCCGUUUCAAAGAUUAAGUUCUGCUAUAU 720
**
*****
*****

```

Figura D2: Detalle de la comparación de secuencias entre los transcritos *IFNA5* correspondientes a diferentes mamíferos del orden Primates; Hsa (*Homo sapiens*), Ptro (*Pan troglodytes*), Ggor (*Gorilla gorilla*), Pabe (*Pongo abelii*), y Nleu (*Nomascus leucogenys*). Las posiciones conservadas se marcan con un asterisco. Los recuadros amarillo y azul marcan las regiones implicadas en el reconocimiento del miR-122 y la formación del pseudonudo respectivamente. En rojo nucleótidos complementarios a la secuencia de reconocimiento. En negrita nucleótidos complementarios fuera de la secuencia de reconocimiento. En gris, nucleótidos no conservados dentro de la región de interacción para el miR-122 según predicción de *RNAhybrid*. En azul, el codón UGA que marca el final de traducción. El alineamiento de secuencias se realizó con el programa *ClustalWT*. Las secuencias fueron obtenidas a partir de la base de datos genómica de *e!Ensembl*.

Por supuesto, son necesarios experimentos *in vivo* para validar el mRNA *IFNA5* como una diana funcional del miR-122. Esos resultados aportarían una información valiosa sobre la función hepática de este subtipo de interferón, pues existe la posibilidad de que nos encontremos ante un mRNA que actúe como pseudodiana, de tal modo que este transcrito de interferón contribuyese, junto a otras pseudodianas hepáticas, al secuestro de moléculas de microRNA, regulando su abundancia en estado libre. Si por el contrario la interacción del miR-122 con el mRNA *IFNA5* conduce a alteraciones moleculares relevantes, no amortiguadas por un robusto contexto celular que usualmente tolera pequeñas fluctuaciones, nos encontraríamos ante una verdadera diana (Seitz, 2009). Por otro lado, resulta difícil no asociar la coincidencia espacial del miR-122 y el *IFNA5* con el tropismo viral que manifiesta el virus de la hepatitis C. No sería descabellado proponer que la capacidad del virus para generar una infección productiva en el hígado se deba, como un factor adicional a tener en cuenta, a la relación del subtipo alfa 5 de interferón con el miR-122. El papel determinante que juegan las citoquinas en lo que concierne al tropismo viral está bien descrito (McFadden et al, 2009).

El segundo hallazgo importante gira en torno la formación de una estructura reconocida por la RNasa P en el extremo 3' UTR del RNA *IFNA5*. Esta estructura es detectada en presencia del miR-122 utilizando como herramienta la RNasa P humana. Los resultados con la RNasa III de *E.coli* en presencia del microRNA sugieren la independencia estructural entre la región de secuencia codificante y las zonas no traducidas del mRNA. Sin embargo, en el caso de la RNasa P humana se aprecia en varias autorradiografías una clara disminución del producto P1 localizado dentro de la región codificante. La pérdida del carácter estructural reconocido por la RNasa P en la región codificante puede deberse a un efecto a larga distancia provocado por la interacción del miR-122 en el 3'UTR o, más probablemente, puede ser consecuencia de la interacción del miR-

122 con una posible segunda diana de interacción, detectada en los experimentos con RNasa H. Dicha diana se ubicaría en la zona comprendida entre los nucleótidos 491 y 517 del RNA *IFNA5*, solapando con el punto de corte descrito para P1 (A₄₉₁) (figura suplementaria 4 en *Apéndices 3*). Al igual que se observó para el fragmento 1-570 de HCV, es necesaria la secuencia completa del miR-122 para ocasionar la aparición de la banda Z. La secuencia de reconocimiento del miR-122 de forma aislada es incapaz de ocasionar la nueva señal de corte reconocida por la RNasa P, salvo que se emplee a elevadas concentraciones (**Figura 3A** en Resultados 3, página 98).

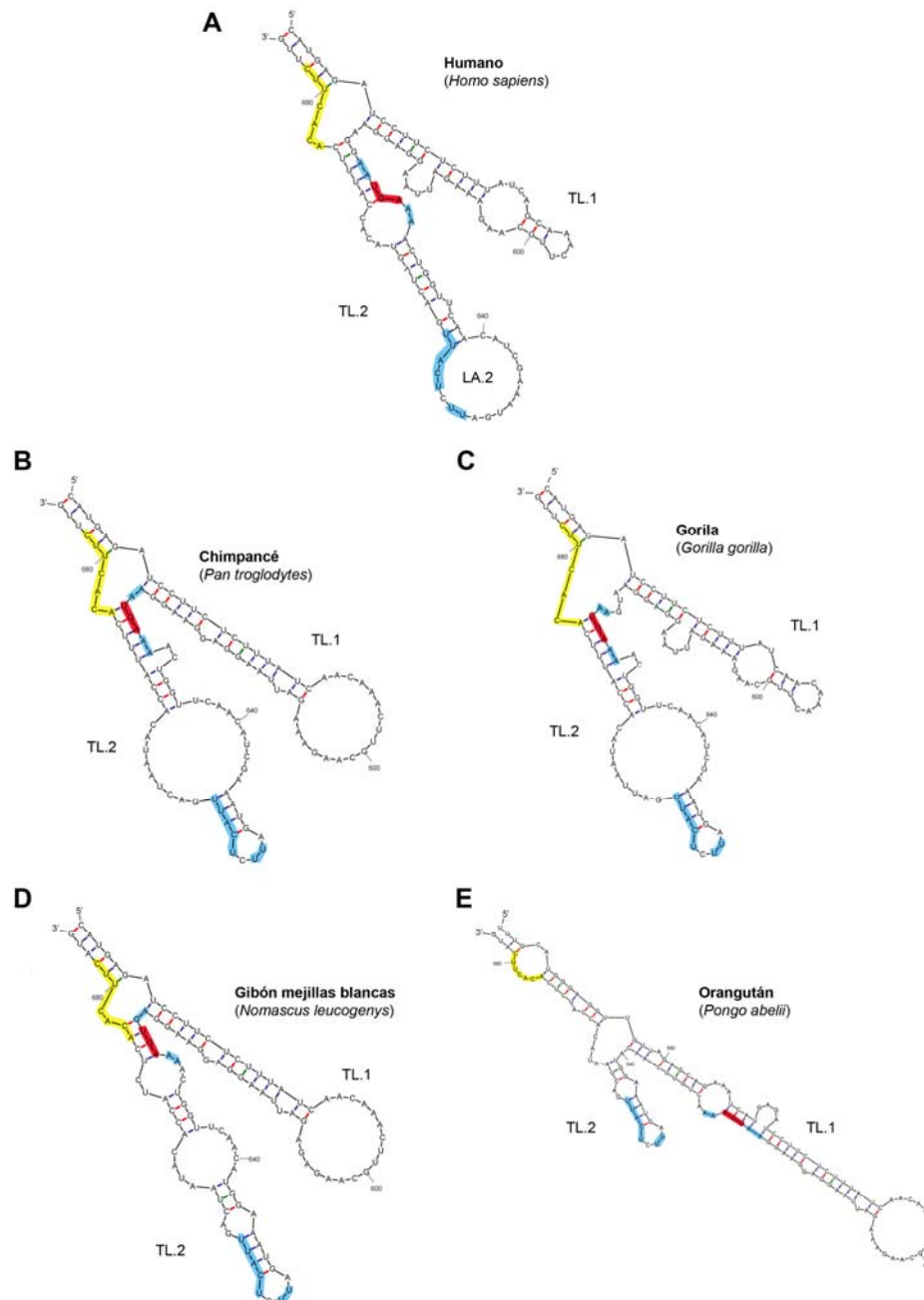


Figura D3: Comparación del motivo estructural afectado por el miR-122 en el RNA *IFNA5* de diferentes especies de primates. **A:** Humano. **B:** Chimpancé. **C:** Gorilla. **D:** Gibón de mejillas blancas. **E:** Orangután. Subrayada en amarillo la región de interacción con la secuencia de reconocimiento del miR-122, en rojo el codón que marca el final de traducción (UGA), en azul los nucleótidos posiblemente implicados en la formación del pseudonudo. TL.1: tallo lazo 1. TL.2: tallo lazo 2. LA.2: lazo apical 2. Predicciones realizadas con *RNAfold*. Únicamente para el caso del motivo humano la predicción se encuentra corregida según los resultados obtenidos mediante ensayos de sensibilidad diferencial con RNasas.

Por consiguiente, parece plausible que el miR-122 funcione *in vitro* de forma análoga a una secuencia guía externa, generando en el 3'UTR un cambio conformacional que desembocaría en la aparición de una estructura semejante al tRNA. El sustrato mínimo reconocido por la RNasa P humana ha de contar con los dominios correspondientes al tallo aceptor, al menos 1 nucleótido protuberante (A ó C), y el tallo lazo T. Se ha propuesto que la RNasa P humana determinaría el punto de corte valorando la longitud de la hélice formada por el apilamiento del tallo aceptor y el dominio T (Yuan & Altman, 1995; Yuan et al, 1992). Por tanto para que una construcción bimolecular pueda ser identificada y digerida por la RNasa P humana ha de parecerse en sus tres cuartas partes a la estructura de un tRNA. Oligonucleótidos con un tamaño de 30nt o menos son capaces de provocar esta similitud unidos a la diana adecuada (Werner et al, 1999). En la **figura D4** se muestra un modelo de estructura secundaria para la unión del miR-122 y parte del 3'UTR *IFNA5* que imita el plegamiento en hoja de trébol típico del tRNA.

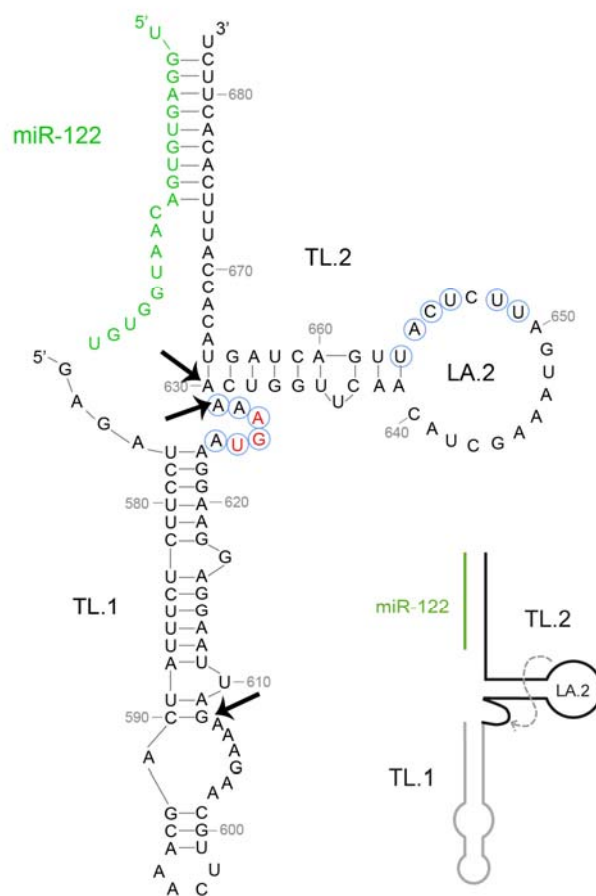
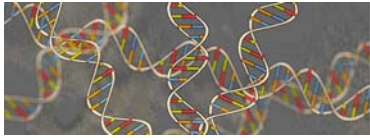


Figura D4: Parecido estructural entre los dominios característicos del tRNA y la estructura formada por la unión del miR-122 con el 3'UTR *IFNA5*. Como si de una secuencia guía externa se tratase la unión del miR-122, en color verde, produce los ajustes estructurales necesarios para transformar la región de RNA *IFNA5* en un motivo identificado por la RNasa P humana como sustrato de corte. El diagrama se basa en los resultados obtenidos mediante ensayos de sensibilidad diferencial con RNasas. **A:** En rojo el codón UGA que marca en final de la traducción. Englobados en azul los nucleótidos potencialmente implicados en la formación de un pseudonudo. Las flechas marcan los principales puntos de corte de la RNasa P humana sobre el RNA *IFNA5*. La pequeña representación lineal de la derecha destaca las analogías con un tRNA. TL.1: tallo lazo 1. TL.2: tallo lazo 2. LA.2: lazo apical 2.

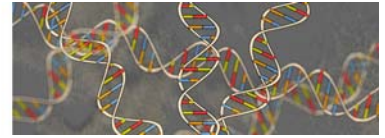
Aunque la principal función biológica de la RNasa P consiste en procesar los precursores inmaduros del tRNA, trabajos recientes la implican también en la transcripción y el procesamiento de ncRNAs de mayor o menor tamaño (Jarrous & Gopalan, 2010). Uno de esos sustratos denominado de forma abreviada MALAT 1 (transcrito 1 asociado a metástasis en adenocarcinoma de pulmón) es procesado por la RNasa P humana en una estructura semejante al tRNA localizada en el extremo 3', justo detrás de un tramo rico en adeninas codificado a nivel genómico. El producto de digestión de mayor tamaño queda retenido en el núcleo mientras que el pequeño RNA, semejante al tRNA, es transportado al citoplasma (Wilusz et al, 2008). Aunque la función del pequeño ncRNA parecido al tRNA es desconocida, los autores proponen que pueda estar implicado en la regulación de procesos traduccionales, o que su liberación en citoplasma

actúe como señal intra o intercelular. Esta observación sustenta la teoría de que la RNasa P humana pudiese estar implicada en mecanismos no canónicos de procesamiento en 3'; representando una alternativa a la poliadenilación estándar que sufren la mayoría de transcritos para la RNA polimerasa II. De hecho, la presencia de múltiples señales de corte en el extremo 3' de los mRNAs es la norma en muchos genes humanos. La elección entre uno u otro lugar durante el desarrollo explica por ejemplo diferencias de estabilidad de los transcritos, o de localización subcelular (Wilusz & Spector, 2010).

El sistema del interferón en mamíferos forma parte del mecanismo de respuesta inmunitaria innata contra infecciones virales. Como tal, no sorprende que contribuya a la defensa antiviral empleando para ello miRNAs (David, 2010). Aunque se ha descrito la capacidad de un interferón de tipo I (interferón β) para modular la expresión de miRNAs celulares como un mecanismo antiviral en la infección por HCV (Pedersen et al, 2007), la regulación directa por miRNAs celulares de la expresión de mRNAs codificantes de interferones, constituye un área de trabajo poco explorado. Recientemente se ha publicado un trabajo que describe la regulación de la expresión del interferón β en células humanas y de macaco por acción de varios miRNAs (miR-26a, mir-34a, miR-145 y let-7) que reconocen secuencias complementarias en el 3'UTR del mRNA (Witwer et al, 2010). De confirmarse *in vivo* la interacción y/o procesamiento por la RNasa P que proponemos aquí, y dado que el interferón alfa 5 es un subtipo abundante en hígado, al igual que el microRNA 122 es específicamente hepático, enriqueceríamos no solo nuestra visión del fenómeno de regulación por microRNAs en relación a los interferones, ampliando la compleja red de interacciones existente entre la defensa celular y la infección por HCV; sino que además ayudaríamos a extender la función biológica de una enzima tan antigua y versátil como es la RNasa P.



CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

RESULTADOS 1

1. Se ha caracterizado un nuevo punto de corte para la RNasa III dentro de la región 1-570 nt del genoma de HCV *in vitro*; localizado en el dominio VI entre las posiciones G₄₈₉ y G₄₉₀.
2. El nuevo producto de digestión de la RNasa III indica la existencia de dos estructuras alternativas e incompatibles (cerrada y abierta) dentro de la región 1-570 nt del genoma de HCV.
3. El miR-122 es capaz de inducir el cambio conformacional de la forma cerrada a la forma abierta.

RESULTADOS 2

4. El mRNA hepático humano es capaz de inhibir la reacción de corte de la RNasa P humana sobre el pre-tRNA^{Tyr}. La inhibición observada es parcialmente específica.
5. Utilizando chips de DNA hemos identificado una serie de mRNAs candidatos potenciales para ser dianas reconocidas por la RNasa P *in vitro*.
6. Se ha demostrado la presencia de motivos miméticos para el tRNA capaces de ser reconocidos y procesados *in vitro* por la RNasa P humana en tres mRNAs concretos: *H2AFJ*, *RPS9* e *IFNA5*.
7. Para el caso del RNA *IFNA5* se ha confirmado la especificidad y la secuencia exacta de los productos de corte de la RNasa P humana.
8. Dentro de la región codificante del RNA *IFNA5* se encuentran dos puntos principales de procesamiento (denominados tipo tRNA I y tipo tRNA II) para la RNasa P humana. El fragmento mínimo para el motivo tipo tRNA I coincide con una señal de acumulación citoplásmica (CAR) descrita para el mRNA del *IFNA1 in vivo*.

RESULTADOS 3

9. El RNA del *IFNA5*, subtipo específico del hígado, contiene una zona de hibridación para el miR-122 en su extremo 3'UTR, según predicciones *in silico*. La interacción entre ambas moléculas se ha confirmado experimentalmente mediante ensayos *in vitro* empleando los enzimas RNasa H y RNasa III.
10. La interacción del mRNA *IFNA5* con el miR-122 provoca un cambio conformacional en la región 3' UTR que ocasiona la aparición de una nueva diana para la RNasa P humana.
11. Usando la RNasa III de *Escherichia coli*, se ha caracterizado un motivo estructural de doble cadena dentro de la región codificante del mRNA *IFNA5 in vitro*. Dicha estructura es parte integral y necesaria para el reconocimiento del motivo mimético para el tRNA I.



APÉNDICES



APÉNDICES RESULTADOS 1

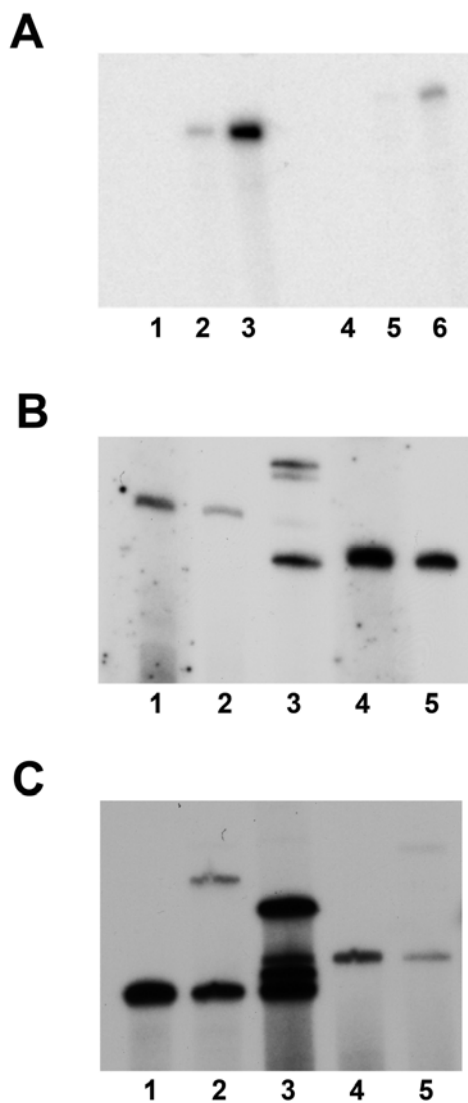


Figura suplementaria 1: Caracterización de los grupos químicos en los extremos de la banda X. La transcripción del RNA 1-570 de HCV se realizó a baja densidad de marca radiactiva. P2 se empleó como control positivo. Los productos de reacción P2 y X se purificaron de gel para analizar la química de los extremos mediante reacciones enzimáticas específicas. **A:** extremo 5'. Carril 1: P2 incubado en hielo. Carril 2: P2 tratado con T4 polinucleótido quinasa y ATP[γ - 32 P]. Carril 3: P2 tratado con T4 polinucleótido quinasa y ATP[γ - 32 P] previo tratamiento con fosfatasa alcalina. Carriles 4-6 lo mismo para la banda X. **B:** extremo 3'. Carriles 1 y 4 bandas X y P2 marcadas con pCp[5'- 32 P] y T4 RNA ligasa respectivamente. Carriles 2 y 5 bandas X y P2 incubadas en hielo. Carril 3: RNAs 1-570, P2P3, X y P2 como controles de movilidad. **C:** Circularización de P2 y X con T4 RNA ligasa (carriles 2 y 5 respectivamente). Carriles 1 y 4 bandas P2 y X incubadas en hielo. Carril 3: RNAs 1-570, X, P1P2 y P2 como controles de movilidad. Las bandas circularizadas se observan con movilidad electroforética retardada en relación al sustrato.

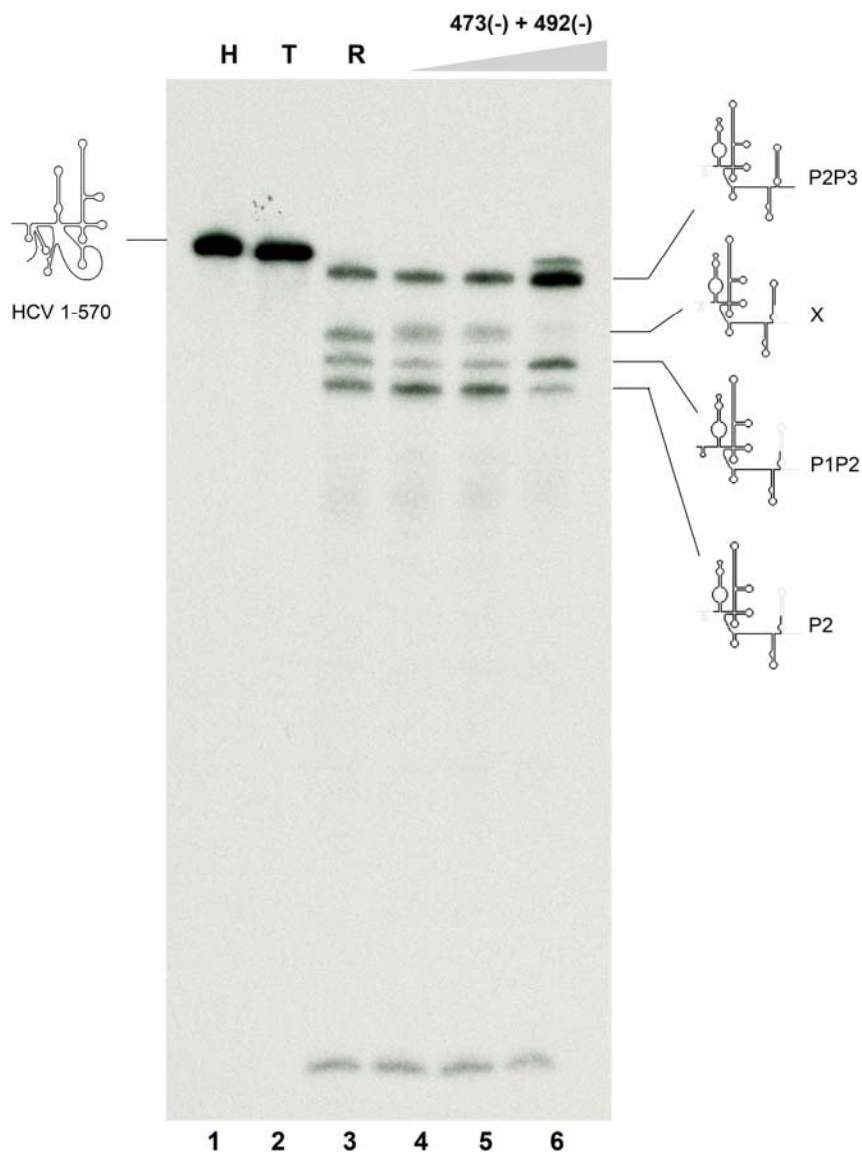


Figura suplementaria 2: Procesamiento de la RNasa III de *E.coli* sobre el RNA 1-570 de HCV en presencia de una mezcla de los ODN 473(-) y 492(-). Ambos oligonucleótidos son complementarios a la hebra derecha del tallo lazo VI. Carriles 1 y 2 RNA incubado en hielo o tampón de reacción respectivamente. Carril 3 reacción control con RNasa III a 0.001U/μl. Carriles 4-6 reacción de digestión en presencia de la mezcla a una concentración de 15nM, 150nM o 1500nM. Se observa cómo la mezcla impide la formación de la banda X.

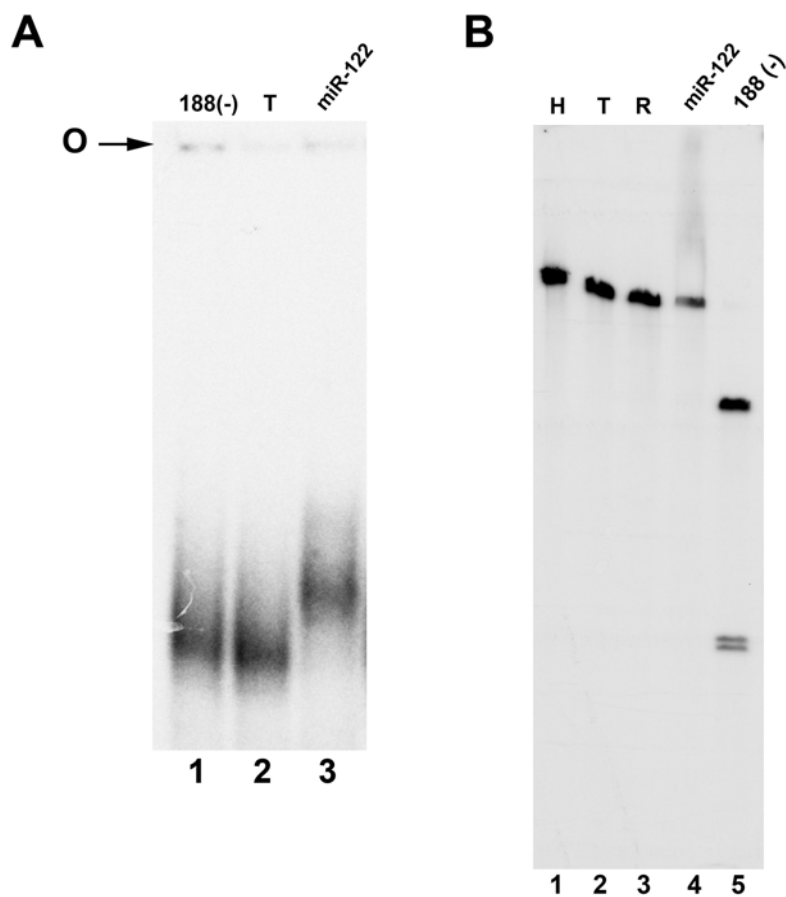


Figura suplementaria 3: El ODN 188(-), indiferente al *switch*, no produce un retardo en movilidad del RNA 1-570 de HCV. **A:** Análisis en gel nativo al 6% del efecto en movilidad electroforética del ODN 188(-) con respecto al miR-122. Carril 1 RNA incubado con el ODN 188(-) a una concentración de 1500nM. Carril 2 RNA incubado en tampón de reacción. Carril 3 RNA incubado con RNA miR-122 a 15nM como control positivo. **B:** La accesibilidad del ODN 188(-) se comprobó mediante tratamiento con RNasa H de *E.coli* a 0.5 U/ μ l y análisis de los productos en gel de acrilamida desnaturalizante al 4%. Carril 1 y 2 RNA incubado en hielo o tampón de reacción respectivamente. Carril 3 digestión en ausencia de oligonucleótido. Carriles 4 y 5 corresponden a digestiones en presencia de miR-122 a 150nM y ODN 188(-) a 1500nM.

***In vitro* characterization of a miR-122-sensitive double-helical switch element in the 5' region of hepatitis C virus RNA**

Rosa Díaz-Toledano^{1,2}, Ascensión Ariza-Mateos¹, Alex Birk³, Belén Martínez-García¹ and Jordi Gómez^{1,2,*}

¹Laboratorio de Arqueología del RNA, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Instituto de Parasitología y Biomedicina 'López Neyra' Armilla 18100, Granada, Spain, ²CIBERehd and ³Institute for Hepatitis and Virus Research, Doylestown, Pennsylvania, 18902, USA

Received November 26, 2008; Revised June 12, 2009; Accepted June 12, 2009

ABSTRACT

It has been proposed that the hepatitis C virus (HCV) internal ribosome entry site (IRES) resides within a locked conformation, owing to annealing of its immediate flanking sequences. In this study, structure probing using *Escherichia coli* dsRNA-specific RNase III and other classical tools showed that this region switches to an open conformation triggered by the liver-specific microRNA, miR-122. This structural transition, observed *in vitro*, may be the mechanistic basis for the involvement of downstream IRES structural domain VI in translation, as well as providing a role of liver-specific miR-122 in HCV infection. In addition, the induced RNA switching at the 5' untranslated region could ultimately represent a new mechanism of action of micro-RNAs.

INTRODUCTION

In a linear genomic map, the hepatitis C virus (HCV) internal ribosome entry site (IRES) (domains II–IV, bases 40–368) (1) is flanked upstream by domain I (bases 1–40), which is recognized by a liver-specific microRNA (miR-122) that acts as an enhancer of replication (2) (Figure 1A). Evidence accumulated over the last 10 years indicates that IRES downstream sequences in the coding region, particularly in domains V and VI (bases 368–510) are important for viral viability (3–6) through an unknown RNA structure-dependent mechanism.

In the secondary structure representation, functional (5), structural (7) and phylogenetic (6) studies indicate that bases 428–442 within the coding region interact with the complementary 5' unstructured sequence, 24–38, forming a long-range annealing (LRA) motif that constrains the IRES in a closed 'C' conformation (Figure 1B and C) known to inhibit viral translation (5,6).

Alternatively, earlier work suggested a structure within the core-coding domain, called stem-loop VI, in which bases 428–442 are paired with bases 495–508 (8) (Figure 1B and C), yielding an open conformation, which is designated 'O' herein in contraposition to the 'C' conformation.

We hypothesized that switching between the alternative 'C' and 'O' structures could regulate the ability of an HCV RNA molecule to participate in various biological processes (7). This idea was favored by subsequent descriptions of interactions between the most abundant liver microRNA, miR-122 and the 22–28 HCV region (2). Because this region overlaps with sequence 24–38, which anneals at long distance with 428–442, we hypothesized that miR-122 would inhibit LRA formation and thus promote the structural transition to stem-loop VI. This study investigates this possibility.

MATERIALS AND METHODS

RNA transcripts

The DNA templates for HCV RNA transcripts were derived from the plasmid vector pN(1 4728) Bluescript, which contains nt 1 4728 of HCV, under the T7 promoter. All RNA transcripts include the first base of the HCV genome and end at positions 402 (Aat II NEB), 466 (PCR product) and 570 (Bsp I NEB). The PCR product ending at base 466 was generated by amplification of pN(1 4728) with the upstream primer 5'-CGCGGATCC TAATACGACTCACTATAGGCCGCCCGGATTGGG GGCGA (which serves to introduce the T7 promoter in the PCR product) and the downstream primer 5'-GGGCC CCTGCGCGCAACAG.

***In vitro* transcription and internal labeling**

To obtain internally labeled substrates for the cleavage assays, 1–2 µg of DNA template was transcribed *in vitro*

*To whom correspondence should be addressed. Tel: 958181647; Fax: 958181632; Email: jgomez@ipb.csic.es

© 2009 The Author(s)

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/uk/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

for 1 h at 37°C with T7 RNA polymerase (Promega) and [α -³²P]GTP (Perkin Elmer) followed by a 10-min treatment with 0.04 U/ μ l RNase-free RQ1 DNase I (Promega) at 37°C (9). Cellulose CF11 chromatography was used to eliminate DNA, dsRNA fragments and unincorporated nucleotides (10). Transcripts were then purified by gel electrophoresis under denaturing conditions on 4% polyacrylamide gels containing 7 M urea. Bands were visualized by autoradiography, excised from the gel and eluted in buffer (100 mM Tris HCl, pH 7.5 and 10 mM EDTA, pH 7.5). The concentration of radioactive transcripts was determined by calculating the amount of incorporated [α -³²P]GTP based on quick count measures.

The 21-base transcripts representing the wt miR-122 and mutants were synthesized according to a T7 RNA polymerase transcription protocol in a 50 μ l reactions overnight at 37°C (9). Synthetic DNA oligodeoxynucleotides used as transcription templates were obtained from the Instituto de Parasitología y Biomedicina (C.S.I.C) facility. Transcripts were labeled by the inclusion of a [α -³²P]GTP labeled in the reaction mixture. Transcription reactions were subsequently subjected to RQ1 DNase I treatment, phenol extraction and ethanol precipitation. The transcripts were purified by electrophoresis in 10% polyacrylamide gel containing 7 M urea, and eluted and measured identically to larger *in vitro* transcripts.

5' end labeling

5' end-labeled RNA transcript was obtained in a standard transcription reaction with two differences, the labeled triphosphate nucleotide was [γ -³²P]GTP (Perkin Elmer), and the concentration of cold GTP in the nucleotide reaction mix was lowered to a quarter of the standard amount. Subsequent purification was performed as described above.

3' end labeling

Unlabeled transcripts prepared in standard transcription reactions were subsequently reacted as follows: aliquots containing a molar ratio of 2:1 pmol of 5' [³²P]pCp (Perkin Elmer) with respect to unlabeled RNA were incubated with T4 RNA ligase (Amersham Bioscience). The reaction was carried out in 10 μ l of 50 mM Tris HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 0.01% BSA, 0.1% PEG, 20 U RNasin (Promega) and 4 U/ μ l T4 RNA ligase. The reaction mixture was incubated for 4 days at 4°C. The labeled RNA was purified again using the electrophoretic procedure described above.

RNase III cleavage assay

Escherichia coli RNase III is a nuclease specific for dsRNA (11,12). The salt and buffer conditions used in all our experiments on HCV RNA cleavage by RNase III were the same as those used previously to detect RNase P cleavage of a tRNA-like structure near the AUG start triplet (13); these are known as secondary conditions of cleavage for RNase III (14). HCV RNA substrate was pre-heated at 90°C for 1 min before addition of reaction buffer (10 mM HEPES KOH [pH 7.5],

10 mM Mg[AcO]₂ and 100 mM NH₄[AcO]) and then left to cool down to room temperature. Cleavage reactions were performed with 20 U RNasin, and 0.0005 U/ μ l or 0.001 U/ μ l (final concentration [FC]) of *E. coli* RNase III (Ambion) in the presence of 2 μ g/ μ l of yeast tRNA (Ambion), and were carried out in a volume of 10 μ l at 37°C for 1 h. These optimal conditions were used in all the experiments and are referred to throughout the text as 'standard conditions'. However, when the reactions were performed in the presence of rabbit reticulocyte lysate (supplemented with a mixture of 0.01 mM aa minus Cys), RNA was extracted successively with phenol and chloroform/isoamyl alcohol and precipitated. The cleavage products were separated on 4% denaturing polyacrylamide gels and visualized by autoradiography on Kodak BioMax MR or Fuji Super RX film.

For the kinetic studies, samples were treated as above and scaled-up to 100 μ l reaction volumes. Aliquots of 10 μ l were drawn at 0, 10, 20, 30, 40, 50 and 60 min and analyzed on polyacrylamide gels, as described above. Product bands were quantified using a Storm PhosphorImager (Amersham-Pharmacia Biotech) as follows: percent RNase III cleavage product (A) = (A product)/(starting material + \sum products) \times 100. Fold increase of PIX was measured as: PIX product at 60 min in the desired conditions divided by PIX product in the control lane at 60 min, run in the same gel.

RNase H cleavage assay

The salt and buffer conditions used for *E. coli* RNase H (Ambion) digestion were the same as those used in the RNase III cleavage assay. HCV RNA substrate was pre-treated identically. Cleavage reactions were performed in the presence of 20-mer DNA oligodeoxynucleotides (15, 150 and 1500 nM) with 20 U RNasin in the presence of 2 μ g/ μ l of yeast tRNA (Ambion) and 0.5 U/ μ l of RNase H, and were carried out in a volume of 10 μ l at 37°C for 1 h. Cleavage products were separated on 4% denaturing polyacrylamide gels and visualized by autoradiography.

Analysis on non-denaturing gels

HCV RNA was prepared as described above. We compared the buffer and salt conditions commonly used for RNA conformation assays, which contain 20 mM Tris Ac (pH 7.6), 10 mM MgAcO and 100 mM NaCl (TMN 1X), with our standard conditions. Our conditions provided similar or even better results; hence, they were selected for the subsequent reactions. In all cases, just before addition of the probe, 2 μ g of carrier tRNA was added per reaction. Annealing reactions were incubated for 1 h at 37°C and transferred to an ice bucket. The RNA was left on ice for at least 10 min before re-suspending in loading buffer, consisting of 60% glycerol, TMN 1 \times , 0.4 μ g/ μ l yeast tRNA, 0.4% (w/v) xylene cyanol, and 0.4% (w/v) bromophenol blue, and was then used for gel analysis. Non-denaturing gels were 0.8 mM thick and contained 6% polyacrylamide, 50 mM Tris Ac, pH 8.3 and 10 mM MgAcO. The gels were run at constant amperage of 12 mA for 24 h at 4°C, and autoradiographed.

Structural mapping with the single- or double-stranded RNases, T1 and V1

Various concentrations were prepared of RNase T1 (Calbiochem) (0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) and RNase V1 (Ambion) (0.0005 and 0.001 $\text{U}/\mu\text{l}$). Analytical amounts of 3' end-labeled ^{32}P Cp 1 570 RNA with and without different probes were digested with these RNase fractions and the digestion products electrophoresed on a denaturing 4% and 10% 7 M urea-containing polyacrylamide gel. The optimal RNase T1 and V1 digestion conditions were found to be 0.0005 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in a 20-min reaction and 0.001 $\text{U}/\mu\text{l}$ in a 30-min reaction at 37°C, respectively. Adequate band separation to detect all differences between the electrophoretic lanes was achieved when bromophenol blue dye reached 80% of the length of a 4% polyacrylamide urea gel. These conditions were used for the subsequent analyses of 1 570 RNA alone or preincubated with the DNA or RNA probes at several concentrations before adding the nucleases T1 or V1. Preincubation was performed for 1 h at 37°C.

To allow identification of the cleavage sites, a parallel run was performed with a 3' end-labeled 1 570 RNA ladder generated with either limited alkaline hydrolysis or RNase T1 degradation in denaturing conditions. In the alkaline hydrolysis reactions, aliquots containing 10^4 c.p.m. of 3' end-labeled RNA were incubated with 2 μg of carrier tRNA in 0.2 M NaHCO_3 , Na_2CO_3 (pH 9) and 1 mM EDTA for 5 min at 90°C. The RNase T1 reaction in denaturing conditions was performed with similar amounts of labeled substrate in the presence of 7 M urea at 55°C for 5 min. All reactions were stopped with one volume of loading buffer and maintained in dry ice until loading on 4% polyacrylamide-urea sequencing gel.

RNA sequencing using RACE

Two bands from T1 RNase digestion gel were purified and sequenced by the Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) procedure (ROCHE 5'/3'RACE kit 2nd generation). 5' RACE reactions were performed according to the manufacturer's recommendations. The HCV-specific oligonucleotide used for first-strand cDNA synthesis was 5'-₅₄₂CTGGGGATAGGCTGTCGCCT₅₂₂, and the one used for PCR was 5'-₅₂₁TCCACGGGGTTGCGACC GCT₅₀₂.

Synthetic RNA oligonucleotides

The complete miR-122 RNA sequence is 5'-UGGAGUG UGACAAUGGUGUUUGU. The underlined portion (5'-UGGAGUGUGA) is a 10-mer oligoribonucleotide containing the 7 nt of the seed sequence. The remaining portion (5'-CAAUGGUGUUUGU) is miR-122 RNA minus the seed sequence. All oligoribonucleotides used were synthesized by IDT Integrated DNA Technologies.

Protein quantification

Protein concentration was determined using the Bio-Rad protein microassay procedure (Bio-Rad Laboratories).

RESULTS

Detection of a new RNase III cleavage event in 1–570 RNA indicates the potential of this region to form an alternative RNA structure

Previous RNase III cleavage experiments involved a 570-base HCV RNA transcript (nt 1 570). Figure 1A is a schematic drawing of the 1 570 RNA fragment showing the final reaction products characterized (P1, P2 and P3), located according to their corresponding positions. The autoradiogram in Figure 2, lane 2, reproduces an RNase III cleavage of a 1 570 RNA substrate resulting in partial digestion products (P2P3 and P1P2) and complete digestion products (P1, P2 and P3). It was demonstrated that these cleavages are only possible after annealing of both IRES flanking sequences (7). In the course of that experiment, we observed an additional minor band that appeared in a time-dependent manner [Figure 7 in reference (7)], but was not examined at that time. The band, which has a mobility between the two large partial product bands, P2P3 and P1P2, becomes a prominent band in the gel when, as in the present case, the reaction is performed at a higher RNase III concentration. The appearance of this band, referred to herein as band 'X', and its partner product, band Y, which comprise the total 1 570-base transcript, can only be observed when nearly all the 1 570 substrate has been processed and P2P3 becomes a dominant high molecular weight band. We propose two possible explanations for this: (i) Band X may correspond to a less sensitive site for RNase III in 1 570 RNA fragments, or (ii) Band X could be the result of an additional cleavage of P2P3 by RNase III, which does not occur in the 1 570 RNA substrate. This second option would indicate the presence of alternative structures within 1 570 RNA.

To investigate potential structural transitions within 1 570 RNA, we set up a parallel enzymatic reaction of 1 570 RNA and a 5' truncated ~36 570 HCV RNA transcript (nearly identical in size to P2P3) with RNase III. We found that band X was the main product of the reaction with the truncated transcript, where LRA formation is impeded (Figure 2, lanes 3 and 4). This is the key result that indicates that band X is not a direct product of 1 570 RNA cleavage, but instead, is a product of P2P3 cleavage.

Additional support was provided by titration experiments with RNase III on 1 570 RNA and purified P2P3. These fragments were incubated in the presence of increasing concentrations of RNase III, and the resulting products were analyzed in parallel migration in gel electrophoresis. As is shown in Figure 3A lanes 3–6, RNase III cleaves 1 570 RNA to produce P2P3 at an enzyme concentration 10-fold lower than the concentration needed to release band X. In contrast, both gel-purified and endogenously produced P2P3 incubated with RNase III releases the X band at an enzyme concentration similar to that producing P2P3 from 1 570 RNA (Figure 3A). In addition, a correlation was found between P2P3 decrease and band X formation curves. This demonstrates that both the LRA motif and its alternative conformation form stable helices, equally sensitive to RNase III, and strongly indicates that band X derives from P2P3.

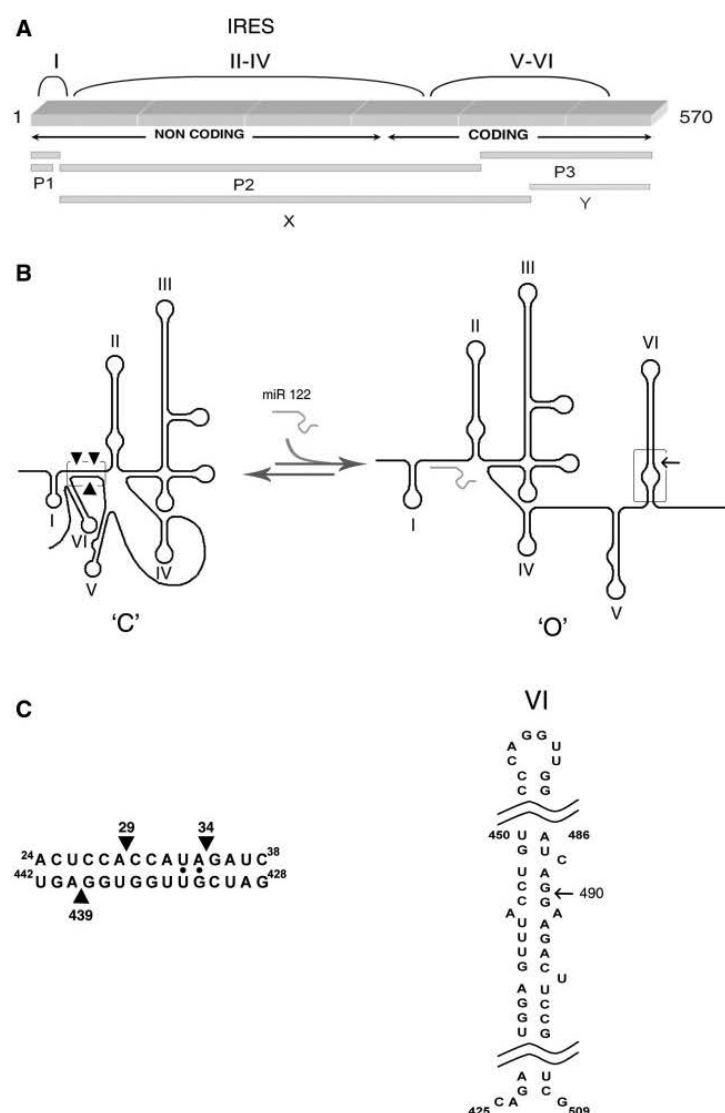


Figure 1. Schematic representation of 1 570 RNA. (A) Primary structure, where mapping of band X is indicated relative to 1 570 RNA and previously published products of the RNase III reaction with RNA in the closed conformation ('C'). (B) Proposed secondary structures. Left: closed ('C') conformation. Solid arrowheads indicate the RNase III cleavages in the LRA. Right: linear open ('O') conformation; new cleavage in stem-loop VI indicated with an arrow; (C) detailed sequences of the double helical elements recognized by RNase III.

It also further supports our previous data that the LRA within 1–570 RNA is the major structural conformation.

The new RNase III cleavage event is specific

Since HCV RNA is not a canonical large dsRNA substrate for RNase III, it must be proven that band X is the specific result of RNase III activity and not of ssRNase-specific contaminant activities or otherwise non-canonical actions of the commercial RNase III preparation. Therefore, for band X, we identified the

characteristic RNase III chemistry of cleavage, which leaves the 5' P and 3' OH end groups in the newly generated termini, using three different assays that included phosphatase, kinase and ligase treatment, as described in the Supplementary Figure 1A, B and C.

Sequence determination of band X

The exact 5' and 3' termini of band X were determined by cyclization of band X RNA, followed by reverse transcription and sequencing across the ligated RNA junction.

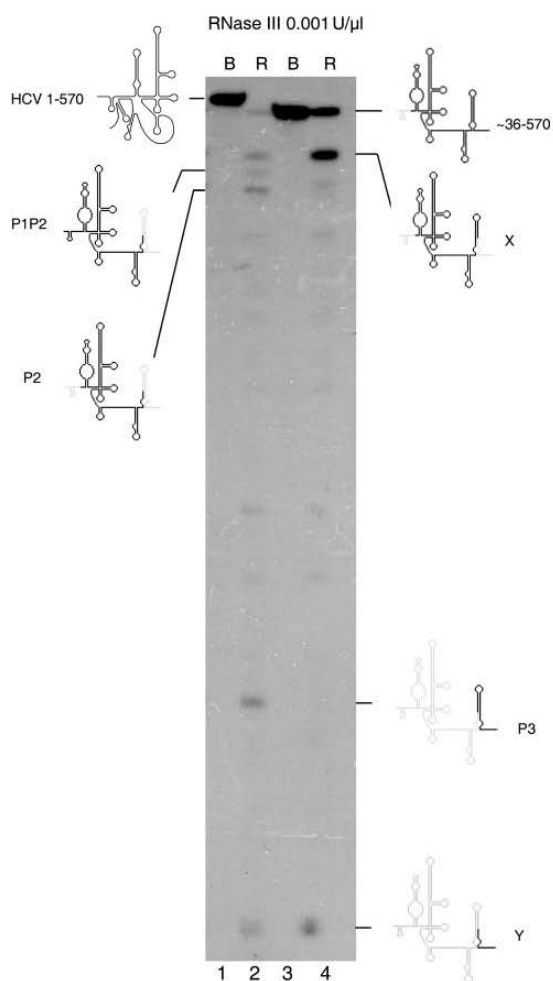


Figure 2. The new RNase III cleavage band detected in 1 570 RNA transcript (lanes 1 2) is indicated by X, and is shown to be highly promoted in a 5' truncated fragment ~36 570 (lanes 3 4). Lanes 1 and 3 are 1 570 and ~36 570 RNA transcripts incubated in buffer, and lanes 2 and 4 are the same transcripts incubated with 0.001 U/μl of RNase III.

Cleavage positions were 5' A29/A34 and 3' G490, which concurred with the results of direct RNA fingerprinting analysis of band X (Supplementary Figure 2B). Fingerprinting analysis (Supplementary Figure 2A) of the rest of the larger RNase III cleavage products demonstrated that their sequence corresponded to the already characterized bands (P2 P3, P1P2, p2 and P3), and that there is any new band product.

The A29/A34 position corresponds to a dsRNA region formed by the described LRA that produces RNase III cleavage at a low enzyme concentration. The new cleavage event between G489 and G490 maps approximately across from the 428–442 sequence in the secondary structure of stem-loop VI (Figure 1C). This suggests that stem-loop VI

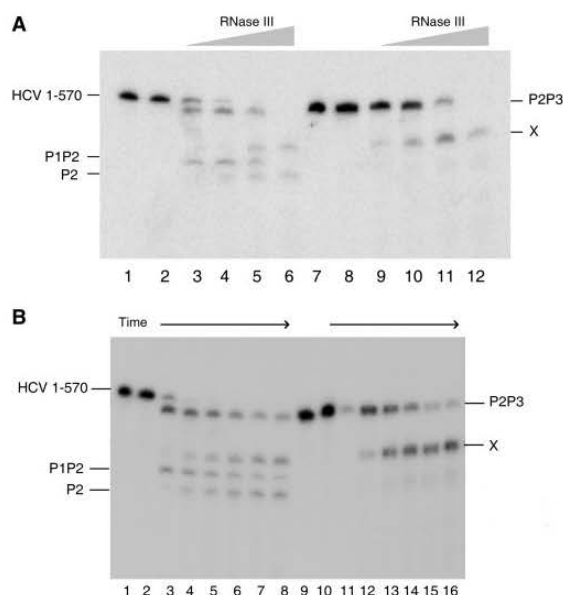


Figure 3. (A) A new RNase III cleavage detected in 1 570 RNA (lanes 1 6) is highly promoted in its larger cleavage product, P2P3 (lanes 7 12). 1 570 RNA and P2P3 were titrated for cleavage by *E. coli* RNase III at four concentrations: 0.0001 U/μl (lanes 3 and 9), 0.0005 U/μl (lanes 4 and 10), 0.001 U/μl (lanes 5 and 11) and 0.005 U/μl (lanes 6 and 12). Lanes 1 and 7 are RNA alone, whereas 2 and 8 are RNA incubated with reaction buffer alone. The new cleavage band is indicated by X. (B) Parallel kinetic analysis of *E. coli* RNase III cleavage of 1 570 RNA (lanes 1 8) and P2P3 RNA (lanes 9 16). Lanes 1 and 9, respectively, show 1 570 RNA and P2P3 transcripts alone, incubated on ice; Lanes 2 8 represent sequentially 10, 20, 30, 40, 50 and 60 min of incubation at 0.0005 U/μl of RNase III; Lanes 10 16 represent the same incubation times as two to eight at the same enzyme concentration.

is an alternative conformation to the LRA when LRA formation is impaired.

Factors involved in switching between alternative structures

The results described in the preceding paragraphs suggest that the 428–442 sequence can switch between two mutually exclusive base pairing conformations, either interacting with a ssRNA sequence in domain I of the LRA motif (allowing RNase III to recognize the LRA) or forming the basal part of stem-loop VI (allowing X cleavage). Because destabilization of the 'C' conformation and stabilization of the new alternative structure have to be achieved mechanically to allow switching, we subsequently assessed the role of *cis*-acting and *trans*-acting sequences on switching between the 'C' and 'O' conformations (Figure 1B).

Cis-acting elements. To delineate the sequence elements participating in the switch, two sets of RNase III and RNase H structure-dependent cleavage reactions were performed using an oligodeoxynucleotide 'blocking' assay and truncated fragments, as described below.

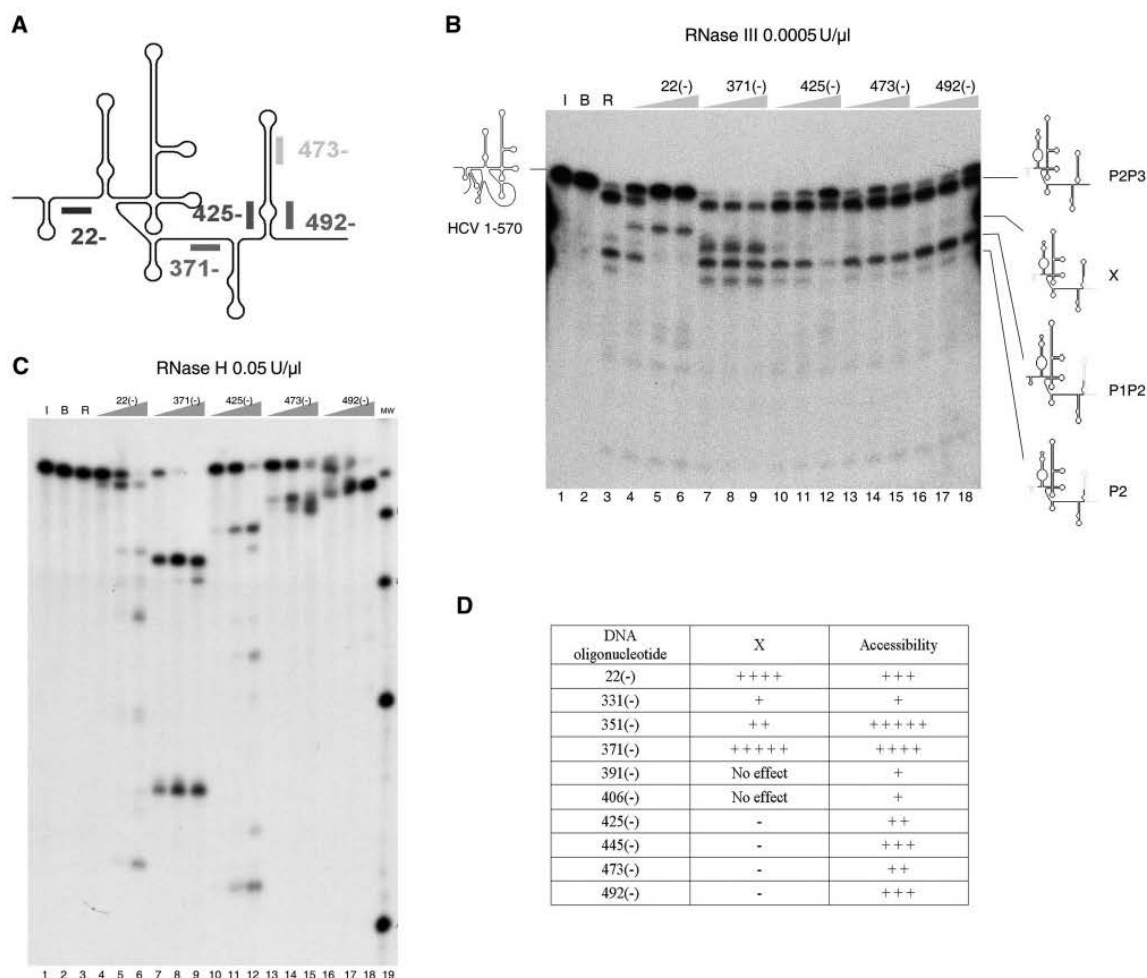


Figure 4. (A) Schematic drawing of 1-570 RNA, indicating a subset of 20-base ODNs, each complementary to an HCV IRES region beginning with the residue number shown; the (-) sign indicates complementary to the viral sequence. (B) Cleavage reaction of 1-570 RNA with *E. coli* RNase III in the presence of a set of ODNs complementary to the viral sequences: 22(-), 371(-), 425(-), 473(-) and 492(-). Cleavage reactions were performed at 0.0005 U/ μ l of RNase III. Lanes 1 and 2: 1-570 RNA alone incubated on ice and incubated with buffer, respectively. Lane 3: control cleavage reaction without oligonucleotide. Lanes 4-6: cleavage reaction in the presence of increasing concentrations of ODN 22(-); (lane 4: 15 nM; lane 5: 150 nM; lane 6: 1500 nM). The same for lanes 7-9, 10-12, 13-15 and 16-18 for ODN 371(-), 425(-), 473(-) and 492(-), respectively. RNA molecular weight markers of 1-502 and 1-466 nt in length are indicated by a line on the left of the gel fragments. (C) Analysis of *E. coli* RNase H digestion products of 1-570 RNA annealed with complementary ODNs. Lane 1 is RNA incubated on ice, lane 2 incubated in buffer and lane 3, buffer with 0.5 units of *E. coli* RNase H. Lanes 4 to 18: the annealing reaction was performed with a set of 20-mer ODNs, 22(-), 371(-), 425(-), 473(-) and 492(-), at increasing concentrations of 15, 150 and 1500 nM, as indicated at the top of the gel, and treated with 0.5 U/ μ l of RNase H. Lane 19 is a commercial radiolabeled ladder of RNA fragments of 100, 200, 300, 400, 500, 750 and 1000 bases in length, which will be referred to as 'MW marker' in the remaining figure legends. Only fragments 100-500 bases in size appear in this gel image. (D) Table summarizing the changes in reactivity of 1-570 RNA to RNase III in the presence of complementary ODNs. The 'oligonucleotide' column indicates the positions where DNA oligonucleotides hybridize to RNA. The 'X' column shows the relative activation of RNase III cleavage at the X site (including fragments X and P1X) in 1-570 RNA by the presence of ODNs. The 'accessibility' column indicates the relative sensitivities of 1-570 RNA to DNA-mediated RNase H cleavage.

We analyzed the RNase III cleavage pattern of 1-570 RNA in the presence of oligonucleotide (ODN) 22(-) and a consecutive set of 20-mer DNA oligonucleotides complementary to 1-570 RNA from domain IV to domain VI. The results are described in Figure 4B. ODN 22(-) inhibited LRA and promoted cleavage at the X site, producing a band containing fragments P1X that migrated more slowly than band X alone

(characterization is provided in the 'Trans-acting element: miR-122' section). ODNs 473(-) and 492(-) inhibited the small percentage of cleavage at the X site produced at 0.005 U/ μ l RNase III concentration and had no other effect on the cleavage pattern. ODNs 473(-) and 492(-) were not expected to cause any alteration in the 'C' conformation. When the experiment was repeated with a higher concentration of RNase III (0.001 U/ μ l), so that

the alternative 'O' structure is formed more quickly and in a higher percentage, the mix of ODN 473(-) and 492 (-) was then able to block band X formation (Supplementary Figure 3). The key result of this section is provided by ODN 425(-). The 428-442 sequence is theoretically involved in the formation of both structures, the LRA motif and stem-loop VI, and ODN 425(-) effectively inhibited production of all RNase III-dependent products. Unexpectedly, ODN 371(-) stimulates cleavage at both the LRA and X site (Figure 4B, lanes 7-9). The RNA folding application of the Mfold program (<http://mfold.bioinfo.rpi.edu/>) indicates possible folding of 1-570 RNA with an interaction between part of the sequence blocked by 371(-) and the key 'two partner' sequence, 428-442, which can hybridize with either 20-40 or the right arm of stem-loop VI. Specifically, the ₃₇₂ACCAAACCG₃₇₉ sequence, which spans interdomains IV and V and is commonly drawn as an ssRNA region, might base pair with the ₄₃₁CGUUGGU₄₃₇ sequence, which constitutes the basal part of the left strand of stem-loop VI in the 'O' form. If this interaction were to occur, it would disturb stem-loop VI and inhibit band X formation, or sequester the distal sequence for LRA formation, impeding cleavage at the LRA helix of the 'O' conformation. Thus, by blocking the 371-390 fragment, adequate formation of both the 'C' and 'O' structures would occur, favoring RNase III cleavage at both helices. Hence, the ₃₇₂A-G₃₇₉ sequence may be an additional element participating in the switch. Additional information consistent with this hypothesis was obtained in the T1 analysis (see 'Results' section, 'Partial T1 and VI digestions').

Oligonucleotides complementary to stem-loop IV and V had no effect on the LRA or switching (Figure 4D). A parallel RNase H analysis, performed for all the oligonucleotides used, indicated that (at least, at the highest concentration) the oligonucleotides were able to anneal to 1-570 RNA (Figure 4C) to saturation or, in the case of ODNs 473(-) (Figure 4C, lane 15), 331(-) and 391(-) (data not shown), to 80% of the starting material. This supports the conclusion that an absence of an effect of an oligonucleotide on RNase III activity is not due to an inability to hybridize to HCV RNA.

Parallel RNase III and RNase H analysis was performed on 1-570 RNA and transcripts consecutively shortened at their 3' ends (HCV RNA 1-466 and HCV RNA 1-402) in the presence of ODN 22(-) (Supplementary Figure 4). The results indicate that, in the absence of the right strand of stem-loop VI, RNase III cleavage in the LRA is faster and competition between ODN 22(-) and the LRA is more difficult, whereas the absence of both strands of stem-loop VI greatly favors ODN 22(-) annealing at its complementary site (Supplementary Figure 4B). Taken together, these experiments indicate a competitive interplay between sequence 20-40 and the right strand of stem-loop VI to anneal with sequence 425-445.

Trans-acting element: miR-122. As described above, two mutually exclusive and readily distinguishable conformations of 1-570 RNA are evident from the RNase III products. Because the proximal region of the LRA (bases 24-28) is involved in the interaction with specific liver

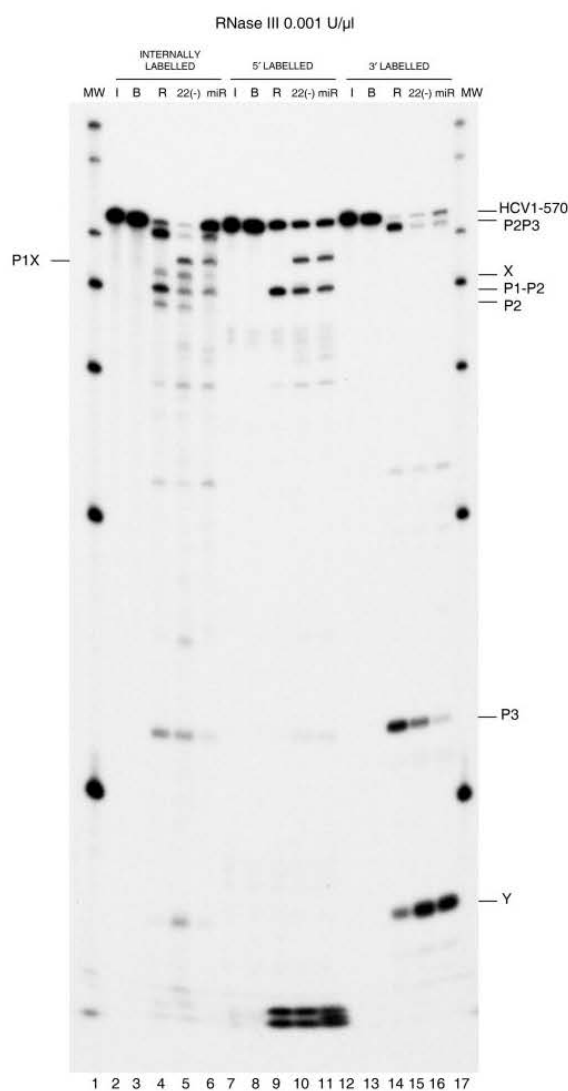


Figure 5. Characterization of an induced RNase III cleavage product of 1 570 RNA by ODN 22(-) and miR-122. Autoradiogram showing a parallel run of RNase III cleavage reaction and control reactions for differentially radiolabeled transcripts of 1 570 RNA: internally (lanes 2-6), in the 5' end (lanes 7-11), or in the 3' end (lanes 12-16). RNAs were either kept on ice (lanes 2, 7 and 12), incubated in standard conditions without the enzyme (lanes 3, 8 and 13), treated with RNase III alone (lanes 4, 9 and 14), or treated with RNase III plus either ODN 22(-) at 150nM final concentration (lanes 5, 10 and 15) or miR-122 at 15nM final concentration (lanes 6, 11 and 16). Previously identified RNA fragments are indicated on the right. Lanes 1 and 17 are MW markers.

miR-122 (2), this molecule is a good candidate to favor the alternative conformation by simple competition with the LRA. Examination of the RNase III products obtained after induction of the 'O' conformation with ODN 22(-) or miR-122 revealed a band pattern that indicated that cleavage positions were at similar positions as that obtained in the control reaction (Figure 5, lanes 4-6),

except for the appearance of a band that migrated more slowly than band X and was not present in the reactions without probes. This band could occur as follows: ODN 22(-) and miR-122 both carry complementary sequences in the 20-40 region of 1-570 RNA, and by annealing to it, the alternative 'O' conformation and cleavage at the X site are induced. However, concomitantly, the annealed DNA forms a hybrid DNA/RNA, and the miR-122 forms a short duplex miR-122/HCV RNA, which are no longer substrates for RNase III, and also partially abolish RNase III cleavage within the 20-40 sequence (i.e. between P1 and P2). Thus, in the presence of the probes, a new fragment starting at position 1 instead of at 27/34, and yielding a band length equivalent to P1X (1-490) is expected. The results of Figure 5 demonstrate that the new RNase III cleavage product band observed in the internally labeled transcript (lanes 5 and 6), contains the 5' triphosphate group (lanes 10 and 11), as is visualized in the γ - 32 P-labeled transcript. It also shows that the 3' end position of the new band coincides with the previously characterized bands. In the lanes in which RNA was internally labeled or 3' end-labeled, no differentiating product band appeared. In addition, attending to the 3' end-labeled reactions, the band that joins band X to give the complete 1-570-base transcript (which we call band Y) increased in intensity in the ODN 22(-) and miR-122-treated lanes relative to the untreated sample (Figure 5, lanes 14-16). Taken together, these findings indicate that the new band contains nt 1 of HCV 1-570 RNA and the 3' end of band X; therefore, the fragment is P1X.

Kinetic analysis of *E. coli* RNase III cleavage of 1-570 HCV RNA in the presence or absence of miR-122

We previously demonstrated that products P2P3 and P2 represent the 'C' conformation, and products X and P1X are characteristic of the 'O' conformation. Because several RNase III cleavage events occurred in the same molecule, we examined the efficiency of cleavage and order of events in the miR-122-induced transition from 'C' to 'O', using kinetic analysis.

Two concentrations of enzyme (0.0005 and 0.001 U/ μ l) were employed and three types of 1-570 HCV RNA substrate preparations: (i) alone; (ii) pre-incubated with different concentrations of miR-122 (1.5, 15 and 150 nM) during 60 min, with subsequent addition of RNase III; and (iii) without pre-incubation. The RNase III kinetic pattern of cleavage for a subset of experiments is shown in gels (Figure 6A and B). The results of these gels are summarized as the percentage formation of cleavage products: P2P3, P1X, P and X as a function of time (Figure 6C).

The fold increase on stimulating P1X band production in the presence of miR-122 was measured at the last time point of the reaction, as described in Material and methods section. 1-570 RNA pre-incubated with miR-122 in condition (ii) was cleaved by RNase III to produce P1X at a higher rate than 1-570 RNA alone (Figure 6). In reactions without preincubation, the effect of miR-122 on activating the P1X band was less pronounced

at 0.001 U/ μ l RNase III and undetectable at 0.005 U/ μ l (Figure 6).

The major RNase III single cleavage product of the 'C' conformation (P2P3) and the newly identified cleavage product induced in the presence of miR-122 (P1X) in the 0.001 U/ μ l RNase III and miR-122 15 nM reaction were compared in a kinetics analysis (Figure 6C). In the absence of miR-122, there was rapid production of P2P3 in the first 10 min. miR-122 significantly decreased the rate of P2P3 formation, suggesting that miR-122 competes with formation of the 'C' conformation. P1X can be only observed in the presence of miR-122. The initial kinetics of this effect was lower in miR-122 reactions without preincubation. These results are highly indicative that miR-122, after annealing with HCV 1-570 RNA induces the 'O' conformation.

Confirmation and characterization of the miR-122-induced RNA switch sequence by different methods

Because a secondary structure switch is at the basis of the 1-570 RNA conformational change, and there is evidence that the miR-122 sequence alone can induce switching, we evaluated the effect of miR-122 on the 1-570 RNA structure with three different methods that specifically respond to modifications of stable RNA:RNA duplexes. These include partial digestion with the single- and double-stranded nucleases T1 and V1, electrophoretic mobility in non-denaturing gels and the effect of mutated miR-122 on the RNase III cleavage pattern.

Partial RNase T1 and V1 digestion

Mapping the regions involved in the switch. Single- and double-stranded RNA-specific digestions were carried out under conditions leading to partial cleavage in order to evaluate whether conformational changes deduced from previous analyses could be visualized by this classical methodology and mapped to specific bases. We focused on the hypothetical key 'two-partner' sequence G₄₂₈-U₄₄₂, which should theoretically be displaced by competition from long range annealing with sequence A₂₄-C₃₈ by the ODN 22(-) or miR-122 sequences.

Comparative analysis of RNase T1 partial digestion of 1-570 RNA alone or pre-incubated with miR-122. RNase T1 partial digestions of the 3' radiolabeled 1-570 RNA alone or pre-incubated with a miR-122 sequence at 150 nM were run in parallel with a sequence ladder of 1-570 RNA treated with alkali and heat or with RNase T1 in denaturing conditions (Figure 7A). In the analysis of the changes, base G428 showed a newly acquired sensitivity after miR-122 incubation. These results confirm the hypothesis that ODN 22(-) and miR-122 can induce changes in the 'secondary status' of 1-570 RNA at a long distance, which is consistent with the proposed RNA conformational switch.

While change G428 resides in the left strand of stem loop VI, there is another change at base G494, which maps across the helix in the complementary strand of the newly formed stem loop VI, indicated in Figure 7B. Decrease in cleavage at base G494 suggest an increase in

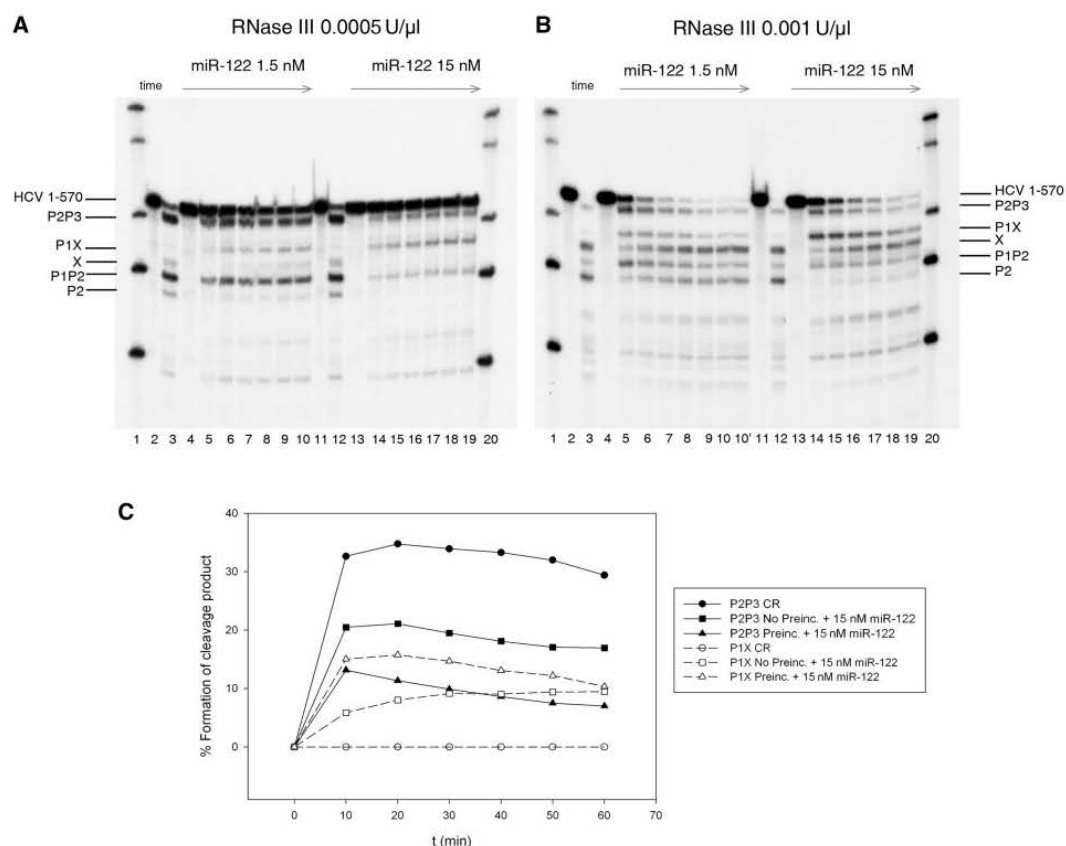


Figure 6. (A) Cleavage Kinetics of 1-570 RNA by *E. coli* RNase III at 0.0005 U/μl in the presence of 1.5 nM miR-122 (lanes 4-10) and 15 nM miR-122 (lanes 13-19). In this set of reactions, miR-122 was added to standard reaction, incubated for 1 hour at 37°C and then digested by the enzyme. In each individual reaction profile (lanes 4-10 and lanes 13-19) from left to right, each line represents time 0, 10, 20, 30, 40, 50 and 60 min incubation with RNase III. Lanes 2 and 11 RNA incubated on ice. Lanes 3 and 12 are control reactions without miR-122. Lanes 1 and 20 are MW century markers. (B) Same as panel A but reactions were performed at 0.001 U/μl *E. coli* RNase III. Bands are indicated by lines at the right of the figure. (C) Graphic representation of the time course processing of P2P3 and P1X by *E. coli* RNase III (0.001 U/μl) at different conditions: control reactions (CR), non-pre-incubated miR-122 reactions, or reactions pre-incubated with 15 nM miR-122.

stem loop VI formation as expected. Of particular interest is the increase in resistance of base G379 to RNase T1 attack after switch induction. This base forms part of the 372A-G379 sequence, which appeared in the RNase III/RNase H analysis as a third element participating in the switch. Changes in reactivity at other positions indicate that other RNA fragments reorganize because of the switching. Further study is needed to determine the relationship between the overall conformational switch we propose and the specific secondary structure variation.

Effect of different concentrations of ODN 22(-), miR-122 and the miR-122 seed sequence on the pattern of RNases T1 and V1. Figure 7C and D show a comparative analysis pattern of RNase T1 and V1 reactivity on 1-570 RNA alone or pre-incubated with several probes. ODN 22(-) and miR-122 are observed to have nearly identical qualitative stimulatory effects on switching, although quantitatively, miR-122 was 10-fold more effective than ODN

22(-); both exerted a dose-dependent effect. Regarding the effects on the RNase V1 pattern, ODN 22(-) as well as miR-122 promote similar changes. In agreement with the RNase T1 results, the changes are concentrated in the region around G494 in the left and right strand of stem loop VI. The seed sequence alone was found to have a far less pronounced ability to promote changes in the T1 pattern. The effects were limited to slight V1 nuclease resistance around position 494 only when the highest concentration of seed sequence was used.

Non-denaturing gels

Native gels were used to investigate the conformational change from 'C' to 'O' of 1-570 RNA in the presence of specific probes. Three potential oligonucleotide inducers, ODN 22(-), miR-122 and miR-122 seed sequence and a theoretically unreactive control probe, truncated miR-122 (lacking the seed sequence) were added to 0.6-nM samples

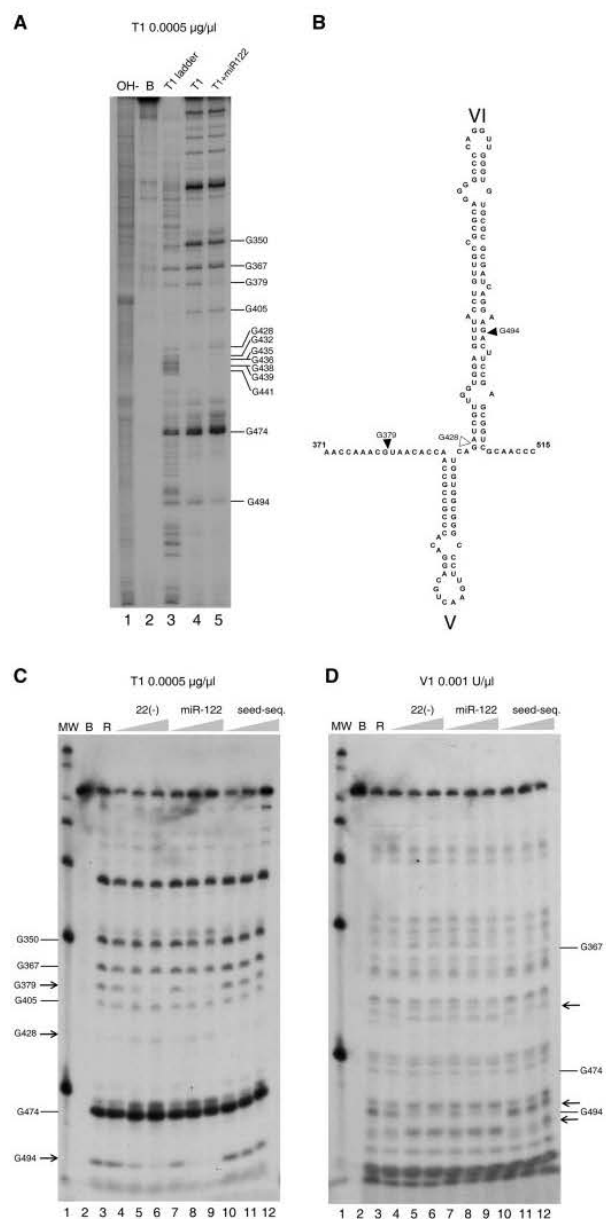


Figure 7. (A) 'G' sequence determination of 3' end-labeled 1-570 RNA in our standard conditions of cleavage by parallel running of RNA degradation with RNase T1 0.0005 µg/µl in denaturing conditions (lane 3), in standard buffer (lane 4) and in the presence of miR-122 at 15 nM (lane 5). Lane 1 is an alkali ladder degradation and lane 2, the RNA incubated in standard buffer alone. Gs are identified at the right of the gel. (B) Secondary structure of stem loop VI and its boundary regions summarizing the position with differential reactivity for RNase T1. Increased resistance is indicated by solid triangles and increased sensitivity by blank triangles. Nucleotide numbering is used, as in Figure 1. (C) Evaluation of the effect of increasing concentrations of probes on the T1 nuclease pattern of cleavage. Lane 1 is a MW marker. Control incubation of 1-570 RNA in the buffer (lane 2), or after addition 0.0005 µg/µl of RNase T1 (lane 3). In subsequent lanes, before addition of the T1 RNase, RNAs were pre-incubated for 1 h with increasing concentrations of ODN 22(-) of 15 nM, 150 nM and 1500 nM (lanes 4-6), or miR-122 at final concentrations of 1.5 nM,

of internally labeled 1-570 RNA, incubated and analyzed in non-denaturing acrylamide gels, as is described in Material and Methods section. As is seen in Figure 8A and B, addition of only buffer to the starting 1-570 RNA concentrates the radioactive label from a fuzzy smear to a more delineated band, consistent with a report demonstrating that Mg⁺⁺ is required for the 5' region of HCV RNA to achieve proper folding (15). Incubation of HCV RNA with increasing concentrations of ODN 22(-) at 15, 150 and 1500 nM (Figure 8A, lanes 3-5) induced a band that migrated more slowly than the untreated samples, showing a sharp transition between 15 and 150 nM. Incubations with miR-122 at 1.5, 15 and 150 nM (Figure 8B, lanes 3-5) showed a similar position for the retarded band migration (Figure 8, lane 6), except that a very slow migrating band appeared at the highest miR-122 concentration used. Complete band mobility retardation was attained repeatedly at a final concentration of 15 nM. The miR-122 seed sequence alone had a faint effect. At the most concentrated condition, the band slowed to a slightly retarded smear (Figure 8B, lanes 8-10). The miR-122 sequence lacking the seed sequence had no effect at any concentration (Figure 8A, lanes 8-10).

In another experiment, we changed the annealing conditions between the probes and 1-570 RNA. We found that if 1-570 RNA were preheated to 90°C in water and slowly cooled with a mixture of our standard buffer plus miR-122 or seed sequence, miR-122 at 1.5 nM was able to promote mobility retardation of all of the 1-570 RNA counts (data not shown). Because we had previously shown that annealing of ODN 22(-) with HCV RNA was favored in these conditions (16), this result, together with the previous findings, confirmed that the limiting factor in promoting the RNA switch is the ability of the probe to anneal with the viral RNA target. However, the effect of the seed sequence alone on retardation was only slightly more evident than in the experiments that did not include annealing during the preheating step (data not shown).

A control was performed to rule out that 1-570 RNA retardation in the experiments above was due to the increase in weight contributed by the annealed probe, even though it represents only about 3.5% in mass and charge. A 20-mer DNA, ODN 188(-), which hybridizes to completion with 1-570 RNA in apical stem-loop III at positions 188-207, promoted no mobility changes (Supplementary Figure 5A).

Effect of miR-122 seed sequence mutations on 1-570 RNA cleavage by RNase III

We determined the effect of the presence of mutations within the miR-122 seed sequence on the RNase III reaction and native gel electrophoresis of 1-570 RNA. We used 15 nM of all the probes whose sequences are described in panel A of Figure 9. We found that

15 nM and 150 nM (lanes 7-9) and a 10-mer oligoribonucleotide carrying the 7 nucleotides of the miR-122 seed sequence to a final concentration of 1.5 nM, 15 nM and 150 nM (lanes 10-12). (D) Same as panel B, but the RNase used was double-stranded RNase VI. Arrows indicate the changes in sensitivity to the nuclease.

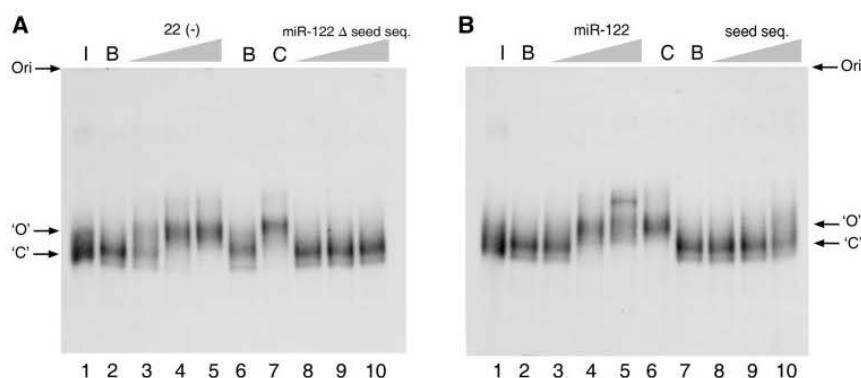


Figure 8. Analysis of induced conformational changes of 1 570 RNA on non-denaturing gel electrophoresis. (A) 1 570 RNA was resuspended at 0.6 nM in each of the following conditions: in water and kept on ice (lane 1), in standard buffer reaction alone (lanes 2 and 6), together with ODN 22(-) at a final concentration of 15 nM, 150 nM and 1500 nM (lanes 3-5), or with miR-122 minus seed sequence at increasing final concentrations of 1.5 nM, 15 nM or 150 nM (lanes 8-10). Lane 7, control ODN 22(-) at 1500 nM. (B) Ice-incubated control RNA is in lane 1, and buffer-incubated RNA controls are in lanes 2 and 7. RNA was incubated together with miR-122 at a final concentration of 1.5 nM, 15 nM and 150 nM (lanes 3-5). Lane 6, control 22(-) or together with seed sequence (5' U GGAGUGU GA 3') at concentrations of 1.5 nM, 15 nM and 150 nM (lanes 8-10). 'ORI' marks the origin of the electrophoresis. Arrows marked with 'O' and 'C' indicate open and close conformations respectively.

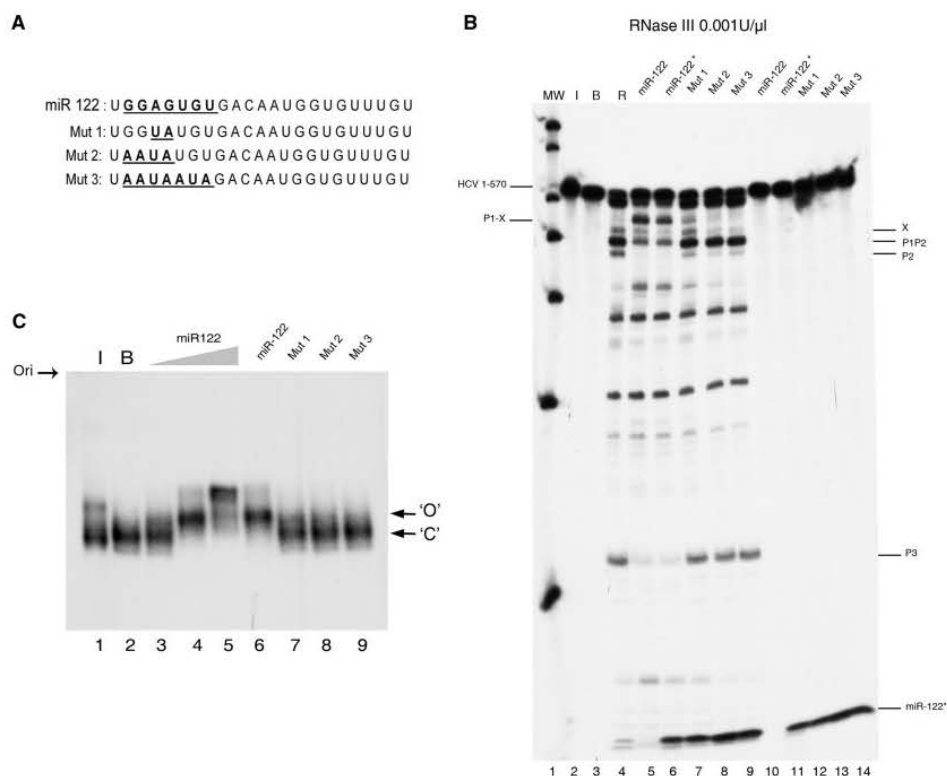


Figure 9. Effect of miR-122 seed sequence mutations on 1 570 RNA cleavage by RNase III (A) The miR-122 sequence and mutants 1, 2 and 3. Seed sequence mutations are indicated in bold and underlined. (B) Autoradiogram shows a 0.001 U/μl RNase III cleavage reaction of 1 570 RNA fragment alone (lane 5) or in the presence of a RNA sequence corresponding to the following: miR-122 (chemically synthesized and unlabeled in lane 5) or *in vitro*-transcribed from a DNA template and internally labeled in lane 6, referred to in the figures as miR-122*); or mutants of miR-122 transcribed from a DNA template and internally labeled: mut 1 (lane 7), mut 2 (lane 8), mut 3 (lane 9). Lane 1 is a MW marker, lane 2 is 1 570 RNA alone maintained on ice, and lane 3 is RNA incubated in reaction buffer. Lanes 10-14 are equivalent to lanes 6-8, but incubated in the absence of the enzyme. The miR-122-induced cleavage products are indicated at the left of the gel. The migration position of miR-122 and mutants are identified at the bottom of the gel. (C) Non-denaturing gel autoradiography of 1 570 RNA alone incubated on ice (Lane 1) or in buffer (Lane 2); or incubated for 1 h at 37°C with increasing final concentrations of miR-122: 1.5 (lane 3), 15 nM (lane 4) and 150 nM (lane 5); or with 15 nM final concentrations of mut 1 (lane 6), mut 2 (lane 7), mut 3 (lane 8) or mut 4 (lane 9).

2 mutations in the middle of the seed sequence (mutant 1) sufficed to drastically reduce the switch induction effect of miR-122 (Figure 9B, lane 7). This effect was totally abolished in the variants carrying 4 or 7 mutations (mutants 2 and 3, Figure 9, lanes 8 and 9, respectively). It was also observed that, unlike miR-122, these probes were unable to stabilize the retarded band in the native gel electrophoresis (Figure 9C, lanes 7–9). These results indicate that switch induction is a highly specific result of miR-122 interaction with 1 570 RNA through its seed sequence.

DISCUSSION

In this study, the transition between two double-helical elements is characterized in the context of a conformational change of 1 570 HCV RNA and its dynamic *in vitro* modulation by the liver-specific microRNA, miR-122. These conformational changes involve the HCV IRES, which switches from a closed ‘circular’ conformation ‘C’ (5,7), formed by LRA (bases 24–38 in interdomains I–II with bases 428–442 in the basal part of domain VI) to an open ‘O’ form (where bases 428–442 interact with bases 494–508; i.e. those forming the basal part of stem-loop VI). The *in vitro* switch is governed by the interaction of miR-122, which disfavors the LRA. Liver miR-122 has been demonstrated to modulate viral abundance (2) and recently, to stimulate translation (17) when viral RNA fragments containing stem-loop VI are used. This led us to propose that the 1 570 RNA conformational change induced by miR-122 is an integral regulatory component of the viral genome.

The conformational switch we propose solves the apparent conflict between studies supporting the closed conformation (5–7) and the report describing stem-loop VI (8). Kinetic analysis in our previous study (7) showed that at least, 80% of the molecules were in the closed conformation. In apparent contrast, a structural study of RNA in the core coding region indicated that the G₄₂₈-U₄₄₂ sequence forms the basal part of the large stem-loop VI, whose presence is incompatible with the closed conformation (8). The conflict disappears if we consider that the RNA transcript fragment used in the study did not include the most proximal region of HCV RNA, which is needed for the closed conformation, and propose that 1 570 RNA is a conformationally dynamic molecule, able to switch between two conformations. A similar conflict was identically resolved with the discovery of two alternating structures in HIV leader RNA (18).

Upon miR-122 binding, changes in the accessibility of 1 570 RNA to RNase H, T1 and V1 are mostly located downstream of the IRES and are consistent with transition from the ‘C’ to ‘O’ conformation. Therefore, we conclude that the mobility changes seen on gel shift analysis are related to changes in the overall conformation. Thus, translation activation after miR-122 induction (17) might be related to increased accessibility to the small ribosomal subunit or to other initiation factors (i.e. eIFIII) in the ‘O’ conformation.

miR-122 is a viral inducer that interacts in tandem with the proximal 23–40 nt of the viral sequence (19),

coinciding with the region involved in the LRA. Regarding the influence of miR-122 on the population of the two conformers *in vitro*, several factors seem of interest: (i) the low ratio of miR-122 to 1 570 RNA (3:1) needed to induce the switch. This is consistent with the differing representation of these two molecules in infected hepatocytes [$>10^3$ for miR-122 (20) to <100 for positive-stranded HCV RNA (21)]; (ii) the seed sequence, which we proved to be essential for miR-122 activity, is unable to promote the switch alone (unless it is used at a high concentration); (iii) the miR-122-induced switch is reversible, whereas the switch induced by the complementary ODN 22(–) is not. These three points indicate that the switch is not promoted by simple Watson-Crick pairing competition. More complicated interaction of miR-122 by 1 570 RNA is suggested, through a process that may be more similar to bacterial riboswitches.

The results of the RNase III reaction in the presence of miR-122 and RRL suggest that the conformational switch is maintained in a specific biological context (Supplementary Figure 6). This prompted us to propose that the 1 570 RNA switch in the presence of miR-122 may represent the structural correlate of the recently described positive effect that miR-122 exerts on HCV translation in RRL and cell cultures (17). If this is the case, the data provide a role for RNA in the proximal part of the CORE region, whose unknown structure-dependent function has been described as essential for the virus in a chimpanzee model (3).

An intriguing question is whether the interaction of miR-122 with 1 570 RNA suffices for this biological effect (i.e. with miR-122 acting as a ligand in a manner similar to small molecule-induced riboswitches in bacteria) or protein factors are involved. In any case, the activity of miR-122 as a conformational switch-inducer departs from the concept of microRNA regulation of mRNA translation in eukaryotes. While that reported effect is inhibitory and occurs through direct binding to the 3′ UTR of mRNA, in the present case it involves activation at the 5′ UTR.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Drs Encarnación Martínez-Salas, Josep Vilardell and Esteban Domingo for their helpful comments on the manuscript. We are grateful to Drs Cristina Romero and Francisco Muñoz for their help in the experimental procedures. Finally, the authors acknowledge the initial contribution to this study of Tchering Shorden and Dr Nerea Beguiristain, presented in Figure 2 of the Supplementary Data, which was done at Dr Hugh D Robertson’s laboratory in Cornell University, New York.

FUNDING

Ministerio de Ciencia e Innovación BIO2007-60106, BIO2004-06114 Proyecto Excelencia Comunidad

Autónoma de Andalucía CVI-03050; FISS (CIBERhd); FIPSE 36549/06 for work in Granada; National Institutes of Health grant NIH/NIDA K01 DAO18262 for work in Doylestown, Pennsylvania. Funding for open access charge: BIO-2007, 60106 (IPB-LN) CSIC. MCyT.

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

- Reynolds, J.E., Kaminski, A., Carroll, A.R., Clarke, B.E., Rowlands, D.J. and Jackson, R.J. (1996) Internal initiation of translation of hepatitis C virus RNA: the ribosome entry site is at the authentic initiation codon. *RNA*, **2**, 867–878.
- Jopling, C.L., Yi, M., Lancaster, A.M., Lemon, S.M. and Sarnow, P. (2005) Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science*, **309**, 1577–1581.
- McMullan, L.K., Grakoui, A., Evans, M.J., Mihalik, K., Puig, M., Branch, A.D., Feinstone, S.M. and Rice, C.M. (2007) Evidence for a functional RNA element in the hepatitis C virus core gene. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **104**, 2879–2884.
- Vassilaki, N., Friebe, P., Meuleman, P., Kallis, S., Kaul, A., Paranhos-Baccala, G., Leroux-Roels, G., Mavromara, P. and Bartenschlager, R. (2008) Role of the hepatitis C virus core+1 open reading frame and core cis-acting RNA elements in viral RNA translation and replication. *J. Virol.*, **82**, 11503–11515.
- Kim, Y.K., Lee, S.H., Kim, C.S., Seol, S.K. and Jang, S.K. (2003) Long-range RNA-RNA interaction between the 5' nontranslated region and the core-coding sequences of hepatitis C virus modulates the IRES-dependent translation. *RNA*, **9**, 599–606.
- Honda, M., Rijnbrand, R., Abell, G., Kim, D. and Lemon, S.M. (1999) Natural variation in translational activities of the 5' nontranslated RNAs of hepatitis C virus genotypes 1a and 1b: evidence for a long-range RNA-RNA interaction outside of the internal ribosomal entry site. *J. Virol.*, **73**, 4941–4951.
- Beguiristain, N., Robertson, H.D. and Gomez, J. (2005) RNase III cleavage demonstrates a long range RNA: RNA duplex element flanking the hepatitis C virus internal ribosome entry site. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 5250–5261.
- Tuplin, A., Evans, D.J. and Simmonds, P. (2004) Detailed mapping of RNA secondary structures in core and NS5B-encoding region sequences of hepatitis C virus by RNase cleavage and novel bioinformatic prediction methods. *J. Gen. Virol.*, **85**, 3037–3047.
- Milligan, J.F. and Uhlenbeck, O.C. (1989) Synthesis of small RNAs using T7 RNA polymerase. *Methods Enzymol.*, **180**, 51–62.
- Franklin, R.M. (1966) Purification and properties of the replicative intermediate of the RNA bacteriophage R17. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **55**, 1504–1511.
- Robertson, H.D. (1967) A Nuclease Specific for Double-Stranded RNA. *Virology*, **12**, 718–719.
- Nicholson, A.W. (1999) Function, mechanism and regulation of bacterial ribonucleases. *FEMS Microbiol. Rev.*, **23**, 371–390.
- Nadal, A., Martell, M., Lytle, J.R., Lyons, A.J., Robertson, H.D., Cabot, B., Esteban, J.I., Esteban, R., Guardia, J. and Gomez, J. (2002) Specific cleavage of hepatitis C virus RNA genome by human RNase P. *J. Biol. Chem.*, **277**, 30606–30613.
- Dunn, J.J. (1976) RNase III cleavage of single-stranded RNA. Effect of ionic strength on the fidelity of cleavage. *J. Biol. Chem.*, **251**, 3807–3814.
- Kieft, J.S., Zhou, K., Jubin, R., Murray, M.G., Lau, J.Y. and Doudna, J.A. (1999) The hepatitis C virus internal ribosome entry site adopts an ion-dependent tertiary fold. *J. Mol. Biol.*, **292**, 513–529.
- Lyons, A.J., Lytle, J.R., Gomez, J. and Robertson, H.D. (2001) Hepatitis C virus internal ribosome entry site RNA contains a tertiary structural element in a functional domain of stem-loop II. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 2535–2541.
- Henke, J.I., Goergen, D., Zheng, J., Song, Y., Schuttler, C.G., Fehr, C., Junemann, C. and Niepmann, M. (2008) microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J.*, **27**, 3300–3310.
- Huthoff, H. and Berkhout, B. (2001) Two alternating structures of the HIV-1 leader RNA. *RNA*, **7**, 143–157.
- Jopling, C.L., Schutz, S. and Sarnow, P. (2008) Position-dependent function for a tandem microRNA miR-122-binding site located in the hepatitis C virus RNA genome. *Cell Host Microbe.*, **4**, 77–85.
- Sarasin-Filipowicz, M., Krol, J., Markiewicz, I., Heim, M.H. and Filipowicz, W. (2009) Decreased levels of microRNA miR-122 in individuals with hepatitis C responding poorly to interferon therapy. *Nat. Med.*, **15**, 31–33.
- Agnello, V., Abel, G., Knight, G.B. and Muchmore, E. (1998) Detection of widespread hepatocyte infection in chronic hepatitis C. *Hepatology*, **28**, 573–584.

APÉNDICES RESULTADOS 2

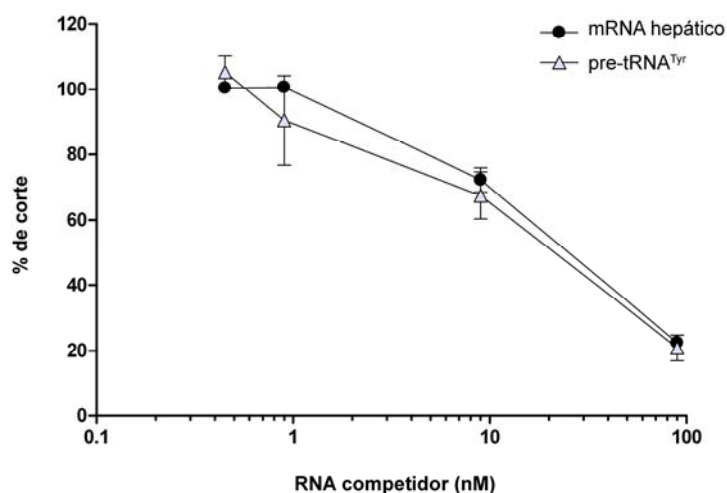


Figura suplementaria 1: Ensayos de inhibición competitiva sobre la reacción de procesamiento del precursor tRNA^{Tyr} por RNasa P humana. Representación gráfica del porcentaje de corte del pre-tRNA^{Tyr} en condiciones saturantes (exceso de actividad RNasa P) usando como competidores en la reacción mRNA hepático humano (círculos negros), o pre-tRNA^{Tyr} frío (triángulos grises). Los datos corresponden a la media para la cuantificación de tres experimentos independientes. Las barras de error representan la desviación estándar. Las medidas fueron normalizadas asumiendo el 100% de actividad de corte para la reacción control.

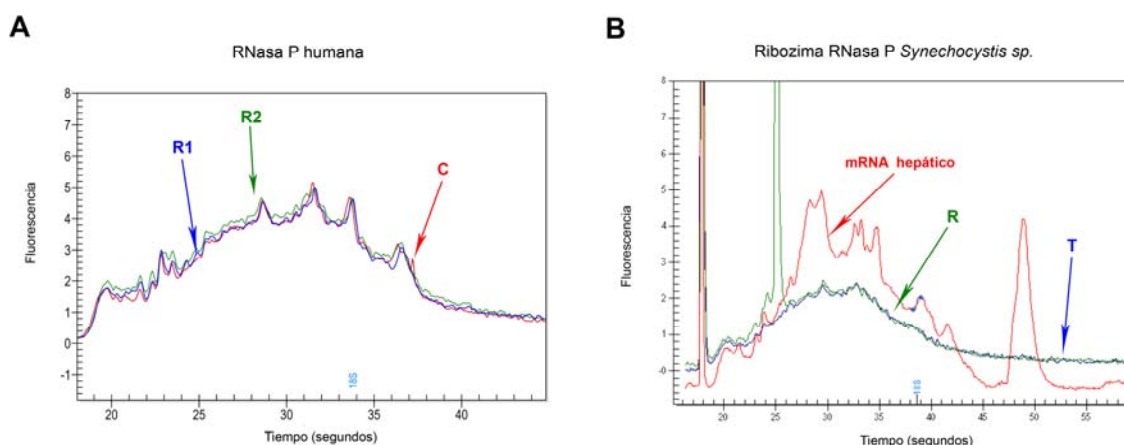


Figura suplementaria 2: Visualización de la población de mRNAs hepáticos tras digestión *in vitro* con RNasa P. Después de digerir 350ng de mRNA hepático utilizando RNasa P humana (panel A), o el ribozima RNasa P de *Synechocystis sp.* (panel B) los productos del procesamiento fueron analizados empleando la técnica de electroforesis capilar automatizada en condiciones desnaturizantes (equipo ExperionTM de BIO-RAD). **A:** Electroferograma obtenido tras digestión con RNasa P humana. La línea azul corresponde al perfil de mRNAs tras una reacción de digestión de 30 min a 30°C (R1), la línea verde corresponde a la misma reacción tras un tiempo de incubación de 1 hora a 30°C (R2). La línea roja (C) es un control que corresponde a la población de mRNAs hepáticos incubados durante 1 hora en ausencia de actividad enzimática; transcurrido este tiempo se añadió 0.5µl del extracto con actividad RNasa P e inmediatamente se realizó el tratamiento con proteinasa K y SDS. Este control se realizó para evaluar el posible aporte de RNA procedente del extracto, que fue considerado insignificante. **B:** Electroferograma obtenido tras digestión con el ribozima RNasa P de *Synechocystis sp.* La línea roja corresponde al perfil de mRNAs hepáticos incubado en hielo (C). La línea azul corresponde al perfil de mRNAs incubado en tampón de reacción (T), mientras que la línea verde corresponde a una reacción de digestión de 60 min a 37°C.

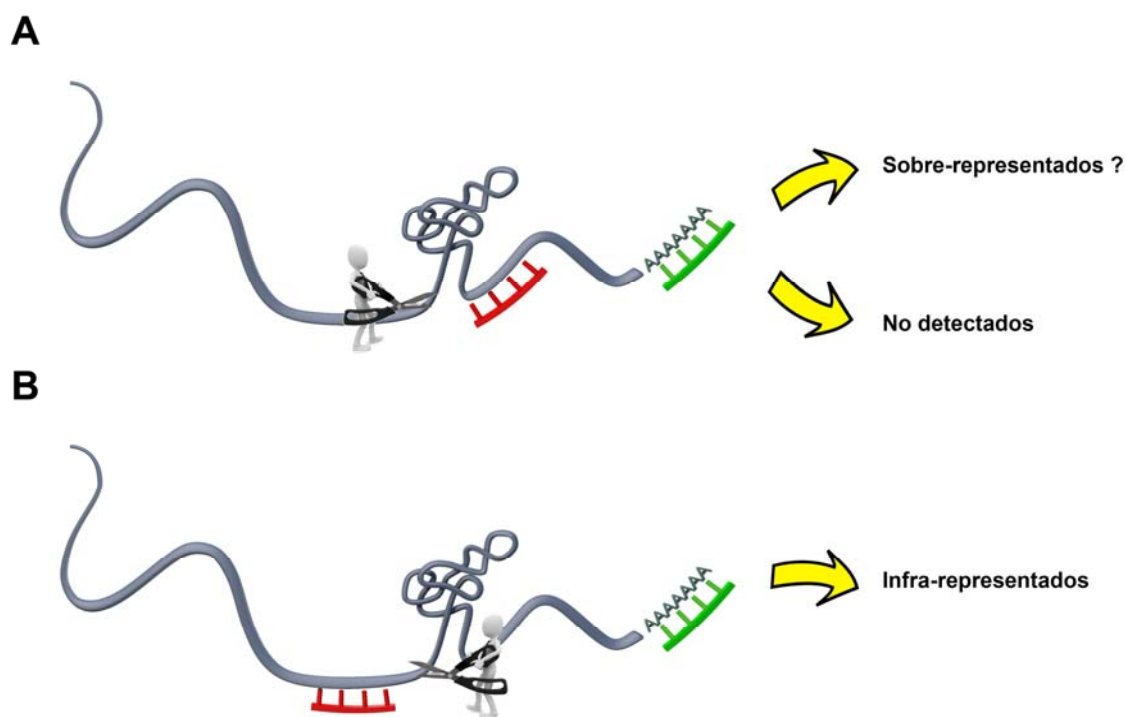


Figura suplementaria 3: Resumen esquemático del método de inferencia empleado para catalogar los mRNAs como dianas para la RNasa P, según cribado diferencial en chips de DNA. Los *microarrays* comerciales empleados para la investigación (20K *Human Genome* G4110B - *Agilent Technologies*) están diseñados para experimentos de perfiles de expresión genética, por lo cual una extrapolación directa del concepto de sobre o infra-expresión no es adecuada para referirnos a mRNAs cortados o no cortados. Los resultados fueron interpretados de acuerdo a dos hipótesis alternativas, dependiendo del punto de hibridación de la sonda con respecto a la hipotética señal de corte para la RNasa P. La mayoría de los oligonucleótidos que actúan como sondas génicas en el soporte del chip hibridan en la región 3' de la secuencia codificante de los mRNAs; esto se debe a que el kit de amplificación de la muestra emplea un oligo-dT (representada en color verde) para la síntesis del cDNA por retrotranscripción. De este modo se aseguran la mayor parte de las hibridaciones en caso de que la transcriptasa reversa no transcriba completamente las cadenas de RNA. **A:** En el caso de que la señal de reconocimiento para la RNasa P (simbolizada como un hombrecillo con tijeras) se localizase corriente arriba con respecto al punto de hibridación de la sonda génica fijada en el chip (representada en color rojo), tanto los mRNAs cortados como los no cortados generarían una señal positiva de hibridación y serían indistinguibles. **B:** En el caso de que la señal de reconocimiento para la RNasa P se localizase corriente abajo con respecto al lugar de hibridación de la sonda génica fijada en el chip, únicamente los mRNAs que hayan sido digeridos mostrarán señal negativa en hibridación, es decir aparecerán infra-representados. Un primer análisis de los resultados desveló la presencia de un pequeño grupo de genes con un nivel de sobre-representación relativamente elevado en comparación con el resto de valores. Postulamos que si la estructura semejante al tRNA se localizara muy cerca de la cola de poli(A), la transcriptasa reversa sería más eficaz copiando un fragmento de digestión más pequeño y menos estructurado con respecto al mismo mensajero sin cortar. La posterior amplificación lineal de la polimerasa del kit magnificaría este efecto, apareciendo dichos genes como fuertemente sobre-representados.

Tabla 1: Listado de genes sobre-representados en los chips sujetos al tratamiento con el ribozima RNasa P de la cianobacteria *Synechocystis sp.*

Símbolo	Descripción	Ribozima RNasa P <i>Synechocystis sp.</i>	Procesos biológicos*
<i>TAGLN2</i>	Transgelina	2,13	Desarrollo del tejido muscular
<i>JGFBP2</i>	Proteína 2 de unión al factor de crecimiento semejante a insulina	2,10	Transducción de señales/respuesta celular a estímulos hormonales y estrés/regulación del crecimiento celular
<i>FTCD</i>	Ciclodeaminasa formimino transferasa	2,07	Metabolismo de compuestos nitrogenados
<i>COPZ1</i>	Complejo proteico del coatómero. Subunidad zeta 1	2,05	Transporte vesicular/organización de la membrana celular/transporte intracelular de proteínas
<i>GSS</i>	Glutación sintetasa	1,98	Respuesta a estado redox
<i>GABARAP</i>	Proteína asociada a receptor GABA(A)	1,88	Transporte de proteínas/transmisión sináptica
<i>CHBL1</i>	Semejante a quitinasa 3	1,88	Metabolismo de carbohidratos
<i>CRTC2</i>	Proteína de unión a elementos de respuesta cAMP	1,85	Regulación de la transcripción
<i>CD99L2</i>	Antígeno semejante a CD99-2	1,84	Adhesión celular
<i>SFXN4</i>	Sideroflexina 4, variante 2	1,83	Transporte transmembrana
<i>DHRS4</i>	Alcohol deshidrogenasa peroxisomal cadena corta	1,77	Procesos oxidación y reducción
<i>KHDRBS1</i>	Dominio KH de unión a RNA, asociado a transducción de señales 1	1,76	Transducción de señales/proliferación celular
<i>PSAP</i>	Prosaposina (variante de la enfermedad de Gaucher y leucodistrofia metacromática)	1,75	Metabolismo de lípidos/coagulación sanguínea
<i>PC</i>	Gen nuclear para la proteína mitocondrial piruvato carboxilasa, variante A	1,69	Metabolismo de carbohidratos/metabolismo de glucosa/gluconeogénesis/biosíntesis lipídica
<i>CTDSP1</i>	CTD (dominio carboxiterminal, RNA polimerasa II) fosfatasa pequeña 1	1,69	Regulación de la transcripción de la RNA polimerasa II/defosforilación de proteínas
<i>ROBLD3</i>	Proteína de unión-interacción activada por mitógeno (MAPBP1P)	1,68	Crecimiento celular/respuesta celular a la presencia de aminoácidos/regulador positivo de la cascada de señalización TOR
<i>FCN2</i>	Ficolina 2 (hucolina), variante SV2	1,65	Activación del sistema del complemento/ruta de lectinas/opsonización/transducción de señales
<i>HIG2</i>	Proteína inducible por hipoxia 2	1,64	Respuesta a estrés/ señalización autocrina/regulación positiva de la proliferación celular
<i>HIPK2</i>	Homeodominio de interacción con proteína quinasa 2	1,64	Apoptosis/regulación de la transcripción/interacción virus-huésped
<i>FIS1</i>	Dominio 11 de repetición de tetratricopéptido (TC11)	1,63	Apoptosis/fisión mitocondrial/fisión peroxisoma
<i>CLPTM1L</i>	Proteína relacionada con resistencia a cisplatino (CRR9)	1,60	Apoptosis
<i>GP9</i>	Glicoproteína IX (plaquetas)	1,58	Coagulación sanguínea/adhesión celular/activación de plaquetas
<i>PMVK</i>	Fosfomevalonato quinasa	1,58	Metabolismo de lípidos/fosforilación de proteínas
<i>UBD</i>	Ubiquitina D	1,58	Proteólisis/regulación positiva de apoptosis
<i>ALDH9A1</i>	Miembro A1, familia 9, aldehído deshidrogenasa	1,57	Metabolismo celular de compuestos nitrogenados/procesos de oxido-reducción
<i>SLC39A7</i>	Miembro 7, familia 39, transporte de solutos (transportador de zinc)	1,57	Transporte transmembrana/transporte de iones
<i>ACAD9</i>	Miembro 9, familia acil-coenzima A deshidrogenasa	1,54	Procesos oxidación y reducción
<i>GANAB</i>	Glucosidasa, alfa neutral AB	1,53	Metabolismo de proteínas/metabolismo de carbohidratos
<i>CBS2</i>	Carboxilesterasa 2 (intestino, hígado) variante 1	1,53	Procesos catabólicos
<i>SESN2</i>	Sestrina 2	1,51	Arresto del ciclo celular
<i>NDUFS6</i>	NADH deshidrogenasa (ubiquinona) Fe-S proteína 6	1,51	Cadena respiratoria de transporte de electrones/transporte de electrones mitocondrial, NADH a ubiquinona
<i>H2AFJ</i>	Miembro J, familia de histona H2A, variante 2	1,51	Ensamblaje del nucleosoma
<i>RPS9</i>	Proteína ribosomal S9	1,51	Metabolismo de proteínas/expression génica
<i>ARPC1B</i>	Complejo 2/3 proteína relacionada con actina, subunidad 1B	1,51	Motilidad celular
<i>INTS5</i>	Proteína KIAA1698	1,51	Procesamiento de snRNA

* La asignación según procesos biológicos se realizó atendiendo al sistema de clasificación del consorcio *Gene Ontology* (Ashburner et al, 2000).

Tabla 2: Listado de genes infra-representados en los chips sujetos al tratamiento con el ribozima RNasa P de la cianobacteria *Synechocystis sp.*

Símbolo	Descripción	Ribozima RNasa P <i>Synechocystis sp.</i>	Procesos biológicos*
<i>ADAMTS16</i>	Semejante a disintegrina y metaloproteasa con motivo 16 trombospondina, tipo 1	-1,51	Proteólisis
<i>BMP6</i>	Proteína morfogenética ósea 6	-1,51	Crecimiento/desarrollo de sistema cartilaginoso y esquelético/respuesta inmune/regulador positivo de transcripción en promotores RNA polimerasa II
<i>TRPC4</i>	Subfamilia C, miembro 4, potencial canal de iones, potencial receptor transitorio	-1,54	Transporte transmembrana/transporte de iones
<i>PTPN5</i>	Proteína tirosin-fosfatasa, tipo 5 sin receptor	-1,54	Defosforilación de proteínas
<i>LOXL4</i>	Semejante a lisil oxidasa 4	-1,55	Procesos oxidación y reducción
<i>NBN</i>	Nibrina, síndrome Nijmegen	-1,63	Ciclo celular/meiosis
<i>LHB</i>	Hormona luteinizante (lutropina) subunidad beta	-1,71	Metabolismo de compuestos nitrogenados/transducción de señales
<i>SLC25A17</i>	Miembro 17, familia 25, transporte de solutos (mitocondrial; proteína de membrana peroxisomal)	-2,06	Transporte transmembrana /metabolismo lipídico
<i>DEFT1P</i>	Defensina Teta 1 (Retrociclina)	-2,08	Respuesta inmune
<i>ADARB2</i>	Editasa B2 específica de RNA de doble cadena	-2,14	Procesamiento de mRNA
<i>MEIS3</i>	Homeodominio proteico Meis3	-2,23	Regulación de la transcripción dependiente de DNA

Tabla 3: Listado de genes sobre-representados en los chips sujetos al tratamiento con RNasa P humana.

Simbolo	Descripción	RNasa P humana	Procesos biológicos*
<i>PTPN9</i>	Proteína tirosin-fosfatasa, tipo 9 sin receptor	1,46	Defosforilación de proteínas
<i>GAL</i>	Galanina	1,24	Respuesta a estrés/desarrollo de sistema nervioso/regulador positivo de apoptosis
<i>PLCD3</i>	Fosfolipasa C, delta 3	1,23	Regulación de la proliferación celular/angiogénesis/catabolismo de lípidos
<i>ASB16</i>	Repetición anquirina, contiene caja SOCS 16	1,22	Unión a proteínas
<i>TNFSF14</i>	Miembro 14, superfamilia del factor de necrosis tumoral (ligando), variante 1	1,21	Transducción de señales/respuesta inmune
<i>TNFRSF10B</i>	Miembro 10b, superfamilia de receptor para factor de necrosis tumoral, variante 1	1,20	Receptor de superficie celular vinculado a rutas de señalización/apoptosis
<i>KLC2</i>	Semejante a cadena 2 ligera de quinesina, variante 2	1,20	Coagulación sanguínea/movimiento basado en microtúbulos

Tabla 4: Listado de genes infra-representados en los chips sujetos al tratamiento con RNasa P humana.

Simbolo	Descripción	RNasa P humana	Procesos biológicos*
<i>DDIT4</i>	Inducible por daño a DNA, transcrito 4	-1,20	Apoptosis
<i>PPAP2B</i>	Ácido fosfatídico fosfatasa tipo 2B, variante 1	-1,27	Metabolismo lipídico
<i>LMO2</i>	Dominio LIM 2 (semejante a rombotina 1)	-1,28	Desarrollo de organismos multicelulares
<i>ATF5</i>	Factor de activación de transcripción 5	-1,44	Regulación de la transcripción, promotor RNA polimerasa II
<i>HRG</i>	Glicoproteína rica en histidinas	-1,44	Coagulación sanguínea/activación de plaquetas
<i>NR2E1</i>	Miembro 1, grupo E, subfamilia 2, receptor nuclear	-1,46	Expresión génica/desarrollo de organismos multicelulares/regulación de transcripción, dependiente de DNA
<i>CASP4</i>	Caspasa 4, cisteinproteasa relacionada con apoptosis, variante gamma	-1,51	Regulación de apoptosis/proteolisis
<i>HAT1</i>	Histona acetil-transferasa 1	-1,54	Modificación de la cromatina
<i>GPR135</i>	Receptor 135 acoplado a protein G	-1,58	
<i>ARPC3</i>	Complejo 2/3 proteína relacionada con actina, Subunidad 3	-3,01	Motilidad celular

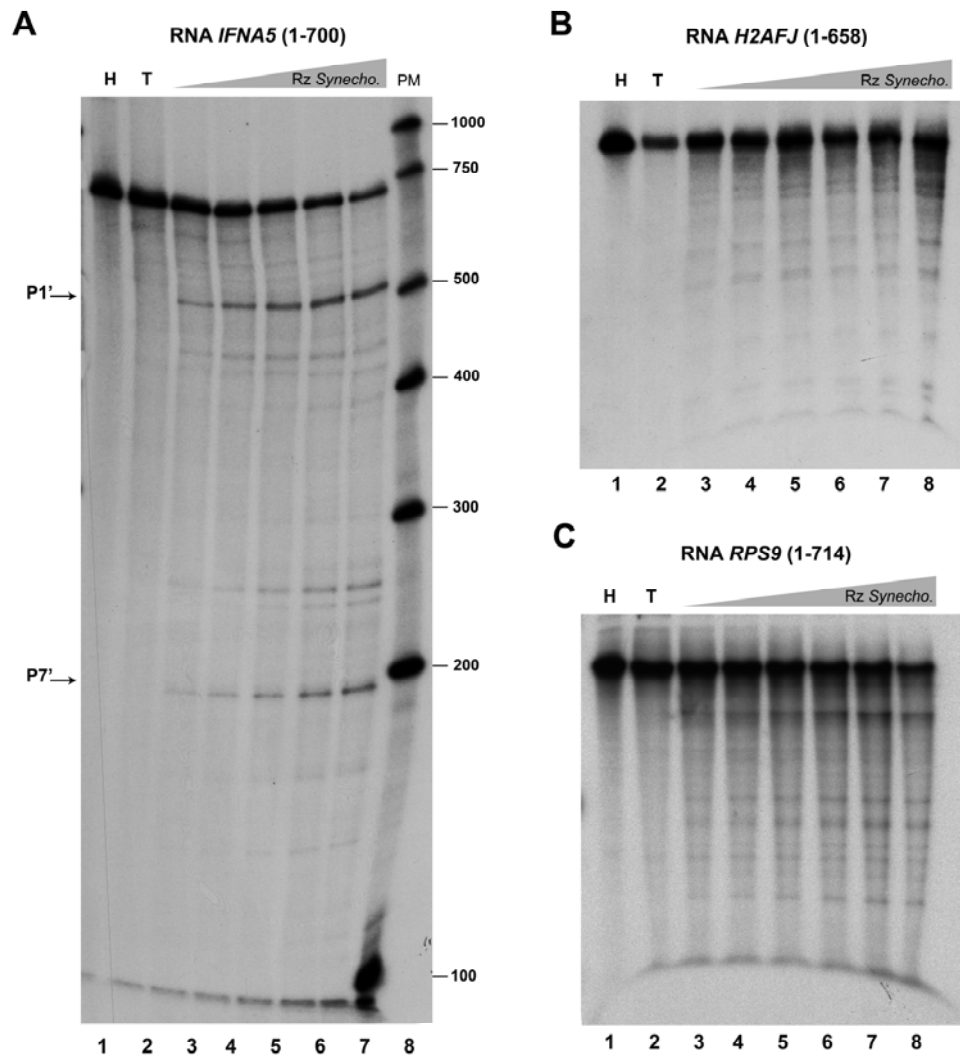


Figura suplementaria 4: Experimentos de dosis-respuesta para el ribozima RNasa P de *Synechocystis sp.* sobre los transcritos *IFNA5* (1-700), *H2AFJ* (1-658) y *RPS9* (1-714) marcados internamente. Para todos los casos carril 1 RNA incubado en hielo y carril 2 incubado en tampón de reacción. **A:** Reacción de corte para el RNA *IFNA5* (1-700). Carriles 3-7 reacciones con el ribozima a concentración: 33.75nM, 67.5nM, 135nM, 270nM y 540nM respectivamente. Carril 8 marcadores de peso molecular. **B:** Reacción de corte para el RNA *H2AFJ* (1-658). Carriles 3-8 reacciones con el ribozima a concentración: 33.75nM, 67.5nM, 135nM, 270nM, 540nM y 675nM. **C:** lo mismo para la reacción de corte sobre el RNA *RPS9* (1-714).

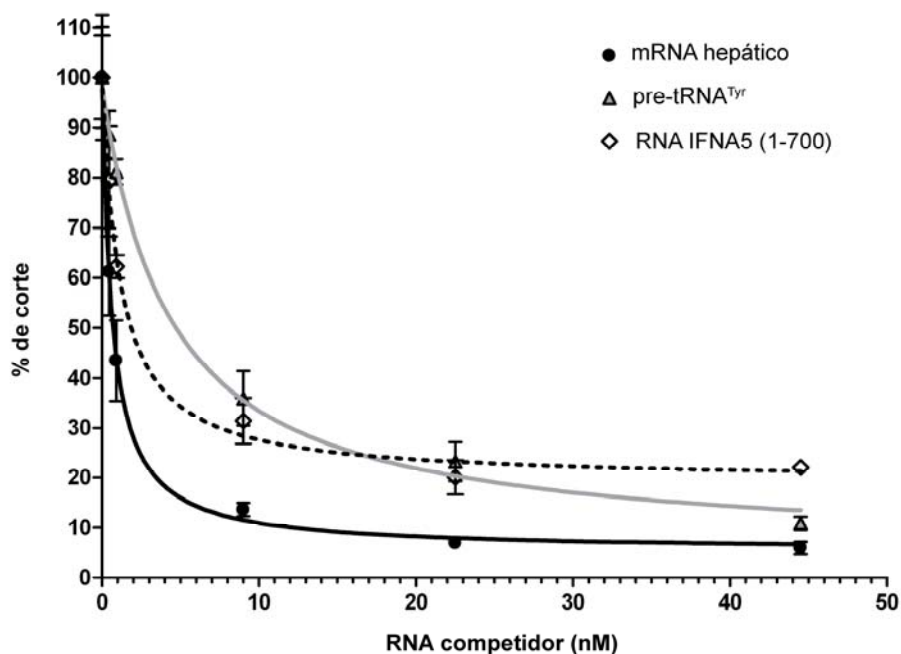


Figura suplementaria 5: Ensayo de inhibición competitiva sobre la reacción de procesamiento del precursor tRNA^{Tyr} por RNasa P humana empleando el RNA *IFNA5* (1-700) como competidor. Se muestra la representación gráfica del porcentaje de corte del pre-tRNA^{Tyr} en función de la concentración de RNA competidor: mRNA hepático humano (círculos negros), pre-tRNA^{Tyr} frío (triángulos grises), y RNA *IFNA5* (1-700) (rombos blancos). Para facilitar la comparación se repite aquí la información mostrada en la figura 1D (*Resultados 2*, página 84). Los datos corresponden a la media para la cuantificación de tres experimentos independientes. Las barras de error representan la desviación estándar. Las medidas fueron normalizadas asumiendo el 100% de actividad de corte para la reacción control y se ajustaron a la ecuación detallada en la sección *Materiales y Métodos* (página 63).

APÉNDICES RESULTADOS 3

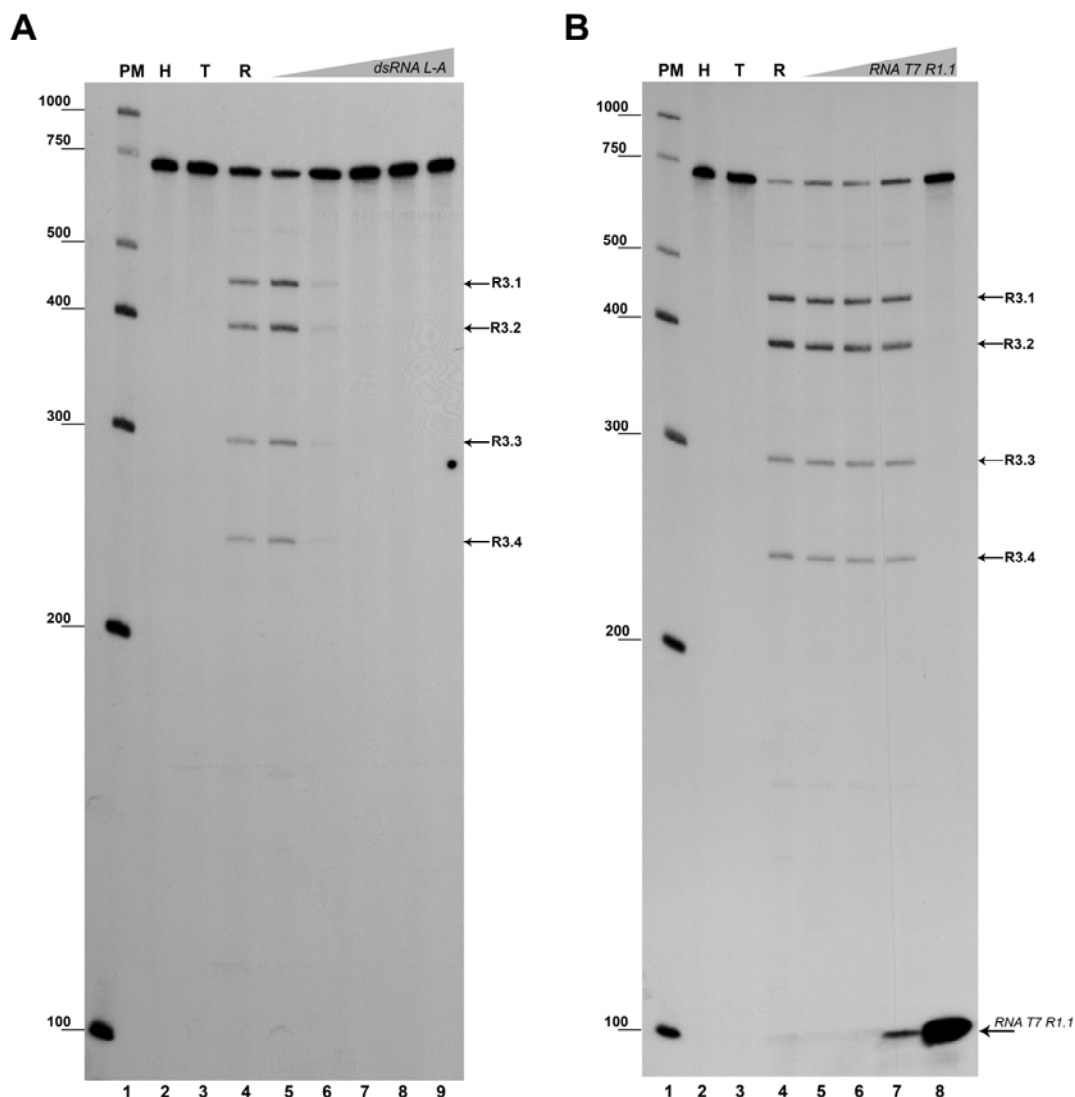


Figura suplementaria 1: Experimentos de inhibición competitiva para demostrar la especificidad de los cortes observados con RNasa III de *E.coli* sobre el RNA *IFNA5* (1-700nt) marcado internamente. **A:** Inhibición competitiva en relación de masa. Se emplea como competidor el RNA natural de doble cadena del virus L-A (4.7 Kb) que infecta la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Carril 1 pesos moleculares. Carril 2 RNA incubado en hielo. Carril 3 RNA incubado en tampón de reacción. Carril 4 reacción de digestión con RNasa III de *E.coli* a 0.0005U/ μ l. Carriles 5-9 digestiones competidas con: 142pg, 284pg, 568pg, 1136pg y 1420pg de dsRNA L-A respectivamente. **B:** Inhibición competitiva en relación molar. Como competidor el transcrito *in vitro* correspondiente al RNA R1.1 del bacteriófago T7 (58nt). Carril 1 pesos moleculares. Carril 2 RNA incubado en hielo. Carril 3 RNA incubado en tampón de reacción. Carril 4 reacción de digestión con RNasa III de *E.coli* a 0.0005U/ μ l. Carriles 5-8 digestiones en presencia de una relación molar entre el RNA *IFNA5*(1-700nt):RNA T7 R1.1 de 1:0.5/1:1/1:10/1:100. En este caso el transcrito T7 R1.1 se encuentra marcado internamente. Su incremento se indica con una flecha en el margen inferior derecho de la autorradiografía. Los principales productos de digestión de la RNasa III (R3.1, R3.2, R3.3 y R3.4) se indican con flechas en el margen derecho.

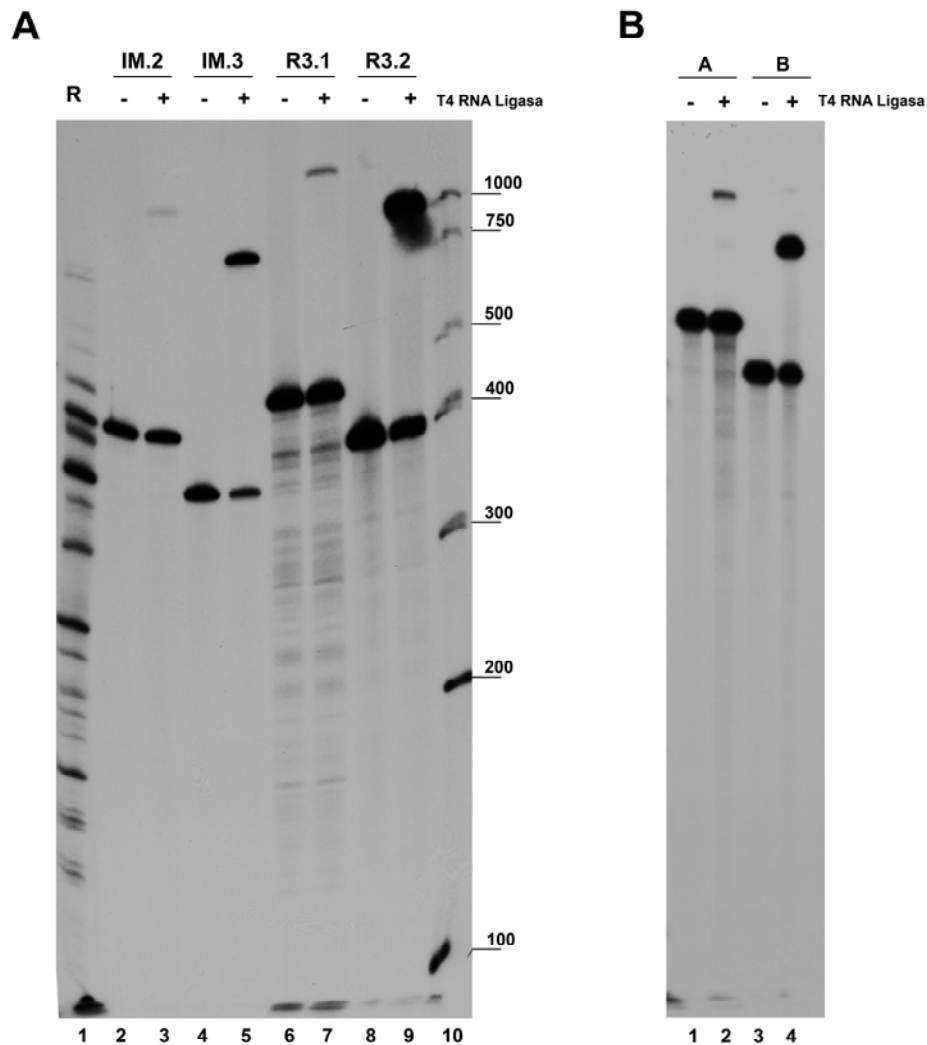


Figura suplementaria 2: Caracterización bioquímica del extremo 5' para los principales productos de digestión de la RNasa III de *E.coli* en los transcritos *IFNA5* de longitud completa (1-700nt; panel A), e *IFNA5* región codificante (58-627nt; panel B). La transcripción de ambos fragmentos se realizó a baja densidad de marca radiactiva. **A:** Carril 1 reacción de digestión control con 0.0005U/μl de RNasa III en presencia de mir-122 a 150nM. Carriles 3, 5, 7 y 9 corresponden a la circularización de las bandas IM.2, IM.3, R3.1 y R3.2 con T4 RNA ligasa. Carriles 2, 4, 6 y 8 las mismas bandas incubadas en hielo. Carril 10 pesos moleculares. **B:** Carriles 2 y 4 corresponden a la circularización de las bandas A y B con T4 RNA ligasa. Carriles 1 y 3 las mismas bandas incubadas en hielo. Las bandas circularizadas se observan con movilidad electroforética retardada por encima del material de partida.

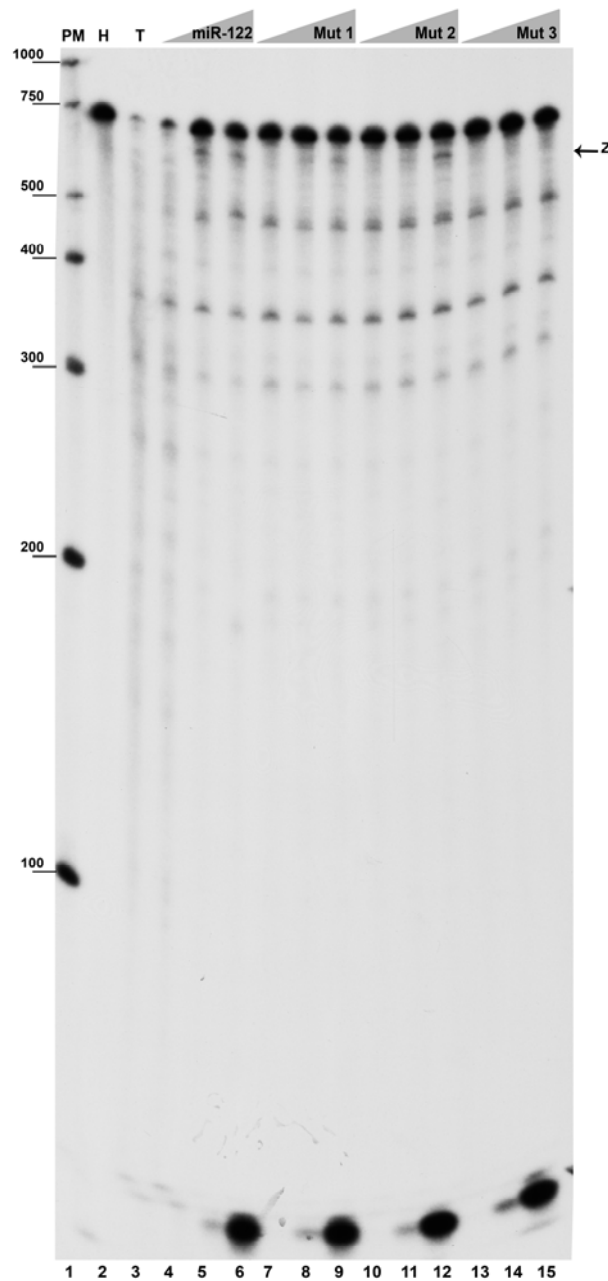


Figura suplementaria 3: Efecto de las mutaciones en la secuencia de reconocimiento del miR-122 sobre el patrón de digestión del RNA 1-700nt de *IFNA5* con RNasa P humana. Carril 1 pesos moleculares. Carril 2 RNA incubado en hielo. Carril 3 RNA incubado en tampón de reacción. Carriles 4-6 digestión con RNasa P humana en presencia de concentraciones crecientes de miR-122 (1.5nM, 15nM y 150nM respectivamente). Carriles 7-9/10-12/13-15 digestión en presencia de la misma gradación de concentraciones para los miR-122 mutantes 1, 2 y 3. Las mutaciones, resaltadas en negrita, se expanden dentro de la región de reconocimiento que se subraya a continuación. Mutante1: 5'U GGUAUGUGACAAUGGUGUUUGU3'; mutante2: 5'UAAUAUGU GACAAUGGUGUUUGU3'; mutante 3: 5'UAAUAAUAGACAAUGGUGUUUGU3'.

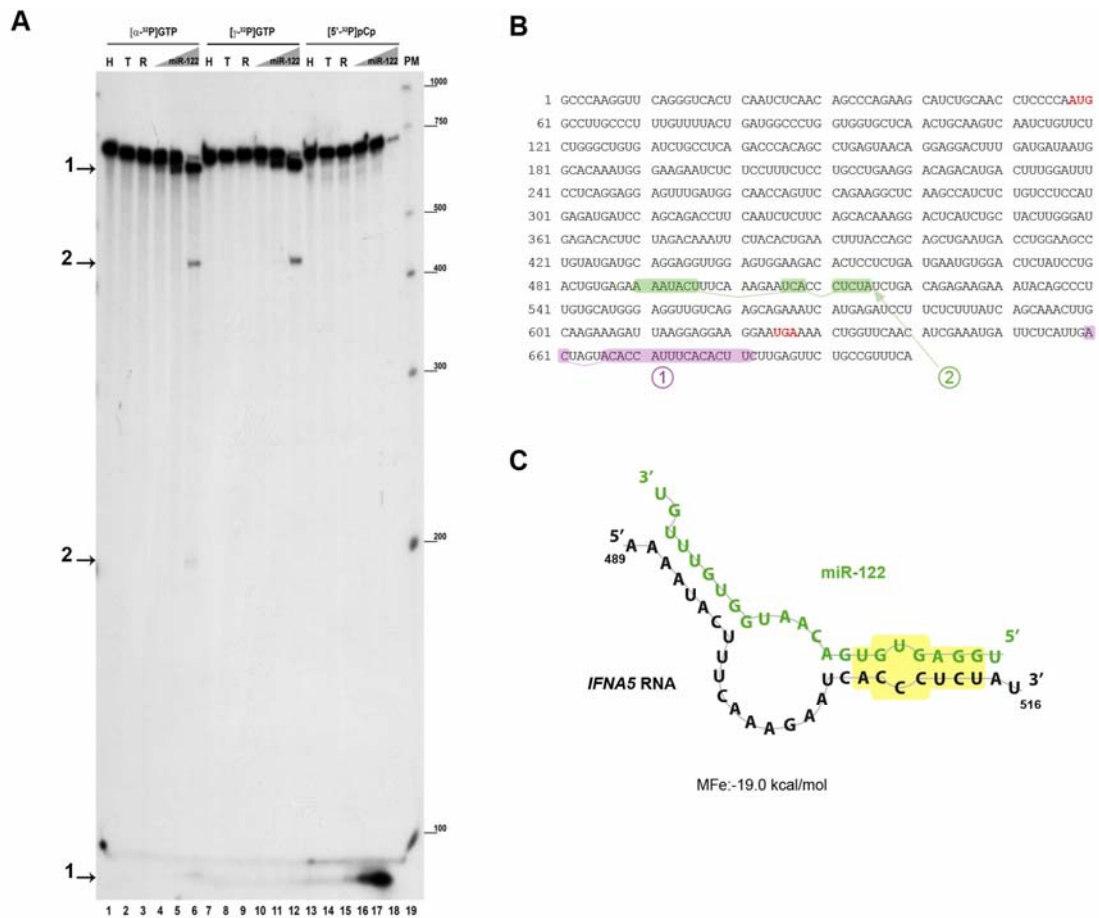


Figura suplementaria 4: **A:** Interacción del ODN correspondiente al miR-122 con el RNA *IFNα5* 700nt mediante el análisis de los productos de corte de la RNasa H de *E.coli*. Para localizar los puntos de interacción se emplearon diferentes marcajes: internamente con GTP[α-32P] (carriles 1-6), marcaje en el extremo 5' con GTP[γ-32P] (carriles 7-12) y marcaje en el extremo 3' con pCp[5'-32P] (carriles 13-18). Carriles 1, 7 y 13 RNA incubado en hielo. Carriles 2, 8 y 14 RNA incubado en tampón de reacción. Carriles 3, 9 y 15 reacciones con 0.5U/μl de RNasa H en ausencia del ODN miR-122. Carriles 4-6, 10-12 y 16-18 la misma reacción en presencia del ODN miR-122 a concentraciones crecientes: 15nM, 150nM y 1500nM respectivamente. Carril 19 pesos moleculares. Las flechas en el margen izquierdo señalan las parejas de productos generados en función del punto de hibridación: 1 punto mayoritario; 2 punto minoritario. **B:** Secuencia para el mRNA del *IFNα5* que cuenta con 700 nt de longitud. Enmarcado en color morado se encuentra en principal punto de hibridación para el ODN miR-122 (1), en color verde el punto de hibridación secundario (2). Los codones de inicio y fin de traducción se realzan en color rojo. **C:** Predicción del *software RNAhybrid* para la interacción entre el RNA *IFNα5* y el *miR-122* dentro de la región 489-516 del mRNA *IFNα5*. La zona de interacción que implica la secuencia de reconocimiento del miR-122 se destaca en amarillo.



BIBLIOGRAFÍA



- Agnello V, Abel G, Knight GB, Muchmore E (1998) Detection of widespread hepatocyte infection in chronic hepatitis C. *Hepatology* **28**: 573-584
- Alifano P, Rivellini F, Piscitelli C, Arraiano CM, Bruni CB, Carlomagno MS (1994) Ribonuclease E provides substrates for ribonuclease P-dependent processing of a polycistronic mRNA. *Genes Dev* **8**: 3021-3031
- Altman S, Smith JD (1971) Tyrosine tRNA precursor molecule polynucleotide sequence. *Nat New Biol* **233**: 35-39
- Altman S, Wesolowski D, Guerrier-Takada C, Li Y (2005) RNase P cleaves transient structures in some riboswitches. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 11284-11289
- Ank N, West H, Paludan SR (2006) IFN-lambda: novel antiviral cytokines. *J Interferon Cytokine Res* **26**: 373-379
- Apirion D (1980) Genetic mapping and some characterization of the rnpA49 mutation of Escherichia coli that affects the RNA-processing enzyme ribonuclease P. *Genetics* **94**: 291-299
- Aristarkhov A, Mikulskis A, Belasco JG, Lin EC (1996) Translation of the adhE transcript to produce ethanol dehydrogenase requires RNase III cleavage in Escherichia coli. *J Bacteriol* **178**: 4327-4332
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* **25**: 25-29
- Babitzke P, Granger L, Olszewski J, Kushner SR (1993) Analysis of mRNA decay and rRNA processing in Escherichia coli multiple mutants carrying a deletion in RNase III. *J Bacteriol* **175**: 229-239
- Bai S, Nasser MW, Wang B, Hsu SH, Datta J, Kutay H, Yadav A, Nuovo G, Kumar P, Ghoshal K (2009) MicroRNA-122 inhibits tumorigenic properties of hepatocellular carcinoma cells and sensitizes these cells to sorafenib. *J Biol Chem* **284**: 32015-32027
- Bardwell JC, Regnier P, Chen SM, Nakamura Y, Grunberg-Manago M, Court DL (1989) Autoregulation of RNase III operon by mRNA processing. *EMBO J* **8**: 3401-3407
- Bartkiewicz M, Gold H, Altman S (1989) Identification and characterization of an RNA molecule that copurifies with RNase P activity from HeLa cells. *Genes Dev* **3**: 488-499
- Beguiristain N, Robertson HD, Gomez J (2005) RNase III cleavage demonstrates a long range RNA: RNA duplex element flanking the hepatitis C virus internal ribosome entry site. *Nucleic Acids Res* **33**: 5250-5261
- Bellaousov S, Mathews DH (2010) ProbKnot: fast prediction of RNA secondary structure including pseudoknots. *RNA* **16**: 1870-1880
- Ben-Asouli Y, Banai Y, Pel-Or Y, Shir A, Kaempfer R (2002) Human interferon-gamma mRNA autoregulates its translation through a pseudoknot that activates the interferon-inducible protein kinase PKR. *Cell* **108**: 221-232

- Beran RK, Simons RW (2001) Cold-temperature induction of Escherichia coli polynucleotide phosphorylase occurs by reversal of its autoregulation. *Mol Microbiol* **39**: 112-125
- Berry KE, Waghray S, Doudna JA (2010) The HCV IRES pseudoknot positions the initiation codon on the 40S ribosomal subunit. *RNA* **16**: 1559-1569
- Bessho Y, Shibata R, Sekine S, Murayama K, Higashijima K, Hori-Takemoto C, Shirouzu M, Kuramitsu S, Yokoyama S (2007) Structural basis for functional mimicry of long-variable-arm tRNA by transfer-messenger RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 8293-8298
- Billiau A (2006) Interferon: the pathways of discovery I. Molecular and cellular aspects. *Cytokine Growth Factor Rev* **17**: 381-409
- Bluyssen HAR. (1998) Interferon-alpha. In Delves PJ, Roitt IM (eds.), *Encyclopedia of Immunology*. Academic Press, San Diego, Vol. 4, pp. 1413-1417.
- Boehringer D, Thermann R, Ostareck-Lederer A, Lewis JD, Stark H (2005) Structure of the hepatitis C virus IRES bound to the human 80S ribosome: remodeling of the HCV IRES. *Structure* **13**: 1695-1706
- Borchert GM, Lanier W, Davidson BL (2006) RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 1097-1101
- Bothwell AL, Garber RL, Altman S (1976a) Nucleotide sequence and in vitro processing of a precursor molecule to Escherichia coli 4.5 S RNA. *J Biol Chem* **251**: 7709-7716
- Bothwell AL, Stark BC, Altman S (1976b) Ribonuclease P substrate specificity: cleavage of a bacteriophage phi80-induced RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**: 1912-1916
- Bradrick SS, Walters RW, Gromeier M (2006) The hepatitis C virus 3'-untranslated region or a poly(A) tract promote efficient translation subsequent to the initiation phase. *Nucleic Acids Res* **34**: 1293-1303
- Bram RJ, Young RA, Steitz JA (1980) The ribonuclease III site flanking 23S sequences in the 30S ribosomal precursor RNA of E. coli. *Cell* **19**: 393-401
- Branch AD, Stump DD, Gutierrez JA, Eng F, Walewski JL (2005) The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: the alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others. *Semin Liver Dis* **25**: 105-117
- Brannvall M, Kikovska E, Kirsebom LA (2004) Cross talk between the +73/294 interaction and the cleavage site in RNase P RNA mediated cleavage. *Nucleic Acids Res* **32**: 5418-5429
- Brannvall M, Kikovska E, Wu S, Kirsebom LA (2007) Evidence for induced fit in bacterial RNase P RNA-mediated cleavage. *J Mol Biol* **372**: 1149-1164
- Brannvall M, Kirsebom LA (2001) Metal ion cooperativity in ribozyme cleavage of RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 12943-12947
- Brannvall M, Mattsson JG, Svard SG, Kirsebom LA (1998) RNase P RNA structure and cleavage reflect the primary structure of tRNA genes. *J Mol Biol* **283**: 771-783
- Brierley I, Pennell S, Gilbert RJ (2007) Viral RNA pseudoknots: versatile motifs in gene expression and replication. *Nat Rev Microbiol* **5**: 598-610

- Brodersen P, Voinnet O (2009) Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 141-148
- Buck AH, Dalby AB, Poole AW, Kazantsev AV, Pace NR (2005a) Protein activation of a ribozyme: the role of bacterial RNase P protein. *EMBO J* **24**: 3360-3368
- Buck AH, Kazantsev AV, Dalby AB, Pace NR (2005b) Structural perspective on the activation of RNase P RNA by protein. *Nat Struct Mol Biol* **12**: 958-964
- Busch S, Kirsebom LA, Notbohm H, Hartmann RK (2000) Differential role of the intermolecular base-pairs G292-C(75) and G293-C(74) in the reaction catalyzed by Escherichia coli RNase P RNA. *J Mol Biol* **299**: 941-951
- Cai T, Aulds J, Gill T, Cerio M, Schmitt ME (2002) The Saccharomyces cerevisiae RNase mitochondrial RNA processing is critical for cell cycle progression at the end of mitosis. *Genetics* **161**: 1029-1042
- Caput D, Beutler B, Hartog K, Thayer R, Brown-Shimer S, Cerami A (1986) Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 1670-1674
- Carrara G, Calandra P, Fruscoloni P, Tocchini-Valentini GP (1995) Two helices plus a linker: a small model substrate for eukaryotic RNase P. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 2627-2631
- Carrasco L, Feduchi E (2006) Los interferones. In *Virus patógenos.*, Feduchi E, Irurzun A (eds), 26, pp 537-552. Madrid: Hélice/Fundación BBVA
- Carthew RW, Sontheimer EJ (2009) Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* **136**: 642-655
- Castelruiz Y, Larrea E, Boya P, Civeira MP, Prieto J (1999) Interferon alfa subtypes and levels of type I interferons in the liver and peripheral mononuclear cells in patients with chronic hepatitis C and controls. *Hepatology* **29**: 1900-1904
- Cohen-Chalamish S, Hasson A, Weinberg D, Namer LS, Banai Y, Osman F, Kaempfer R (2009) Dynamic refolding of IFN-gamma mRNA enables it to function as PKR activator and translation template. *Nat Chem Biol* **5**: 896-903
- Collins LJ, Moulton V, Penny D (2000) Use of RNA secondary structure for studying the evolution of RNase P and RNase MRP. *J Mol Evol* **51**: 194-204
- Conrad C, Rauhut R (2002) Ribonuclease III: new sense from nuisance. *Int J Biochem Cell Biol* **34**: 116-129
- Costantino DA, Pfingsten JS, Rambo RP, Kieft JS (2008) tRNA-mRNA mimicry drives translation initiation from a viral IRES. *Nat Struct Mol Biol* **15**: 57-64
- Coughlin DJ, Pleiss JA, Walker SC, Whitworth GB, Engelke DR (2008) Genome-wide search for yeast RNase P substrates reveals role in maturation of intron-encoded box C/D small nucleolar RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 12218-12223

Coulouarn C, Factor VM, Andersen JB, Durkin ME, Thorgeirsson SS (2009) Loss of miR-122 expression in liver cancer correlates with suppression of the hepatic phenotype and gain of metastatic properties. *Oncogene* **28**: 3526-3536

Court DL (1993) RNA processing and degradation by RNase III. In *Control of Messenger RNA Stability*, Belasco J, Brawerman G (eds), pp 71-116. New York: Academic Press

Crary SM, Niranjankumari S, Fierke CA (1998) The protein component of *Bacillus subtilis* ribonuclease P increases catalytic efficiency by enhancing interactions with the 5' leader sequence of pre-tRNA^{Asp}. *Biochemistry* **37**: 9409-9416

Chamberlain JR, Lee Y, Lane WS, Engelke DR (1998) Purification and characterization of the nuclear RNase P holoenzyme complex reveals extensive subunit overlap with RNase MRP. *Genes Dev* **12**: 1678-1690

Chang DD, Clayton DA (1987a) A mammalian mitochondrial RNA processing activity contains nucleus-encoded RNA. *Science* **235**: 1178-1184

Chang DD, Clayton DA (1987b) A novel endoribonuclease cleaves at a priming site of mouse mitochondrial DNA replication. *EMBO J* **6**: 409-417

Chang DD, Hauswirth WW, Clayton DA (1985) Replication priming and transcription initiate from precisely the same site in mouse mitochondrial DNA. *EMBO J* **4**: 1559-1567

Chang J, Nicolas E, Marks D, Sander C, Lerro A, Buendia MA, Xu C, Mason WS, Moloshok T, Bort R, Zaret KS, Taylor JM (2004) miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1. *RNA Biol* **1**: 106-113

Chang SE, Smith JD (1973) Structural studies on a tyrosine tRNA precursor. *Nat New Biol* **246**: 165-168

Chelladurai B, Li H, Zhang K, Nicholson AW (1993) Mutational analysis of a ribonuclease III processing signal. *Biochemistry* **32**: 7549-7558

Chen B, Lambowitz AM (1997) De novo and DNA primer-mediated initiation of cDNA synthesis by the mauriceville retroplasmid reverse transcriptase involve recognition of a 3' CCA sequence. *J Mol Biol* **271**: 311-332

Chen CY, Shyu AB (1995) AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem Sci* **20**: 465-470

Chen D, Huang S (2001) Nucleolar components involved in ribosome biogenesis cycle between the nucleolus and nucleoplasm in interphase cells. *J Cell Biol* **153**: 169-176

Chen JL, Pace NR (1997) Identification of the universally conserved core of ribonuclease P RNA. *RNA* **3**: 557-560

Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, Gallegos C, Coit D, Medina-Selby R, Barr PJ, et al. (1991) Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 2451-2455

Chu S, Archer RH, Zengel JM, Lindahl L (1994) The RNA of RNase MRP is required for normal processing of ribosomal RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 659-663

- David M (2010) Interferons and microRNAs. *J Interferon Cytokine Res* **30**: 825-828
- Davila Lopez M, Rosenblad MA, Samuelsson T (2009) Conserved and variable domains of RNase MRP RNA. *RNA Biol* **6**: 208-220
- Diaz-Toledano R, Cacho-Suelves I (2011) Virus de RNA y mimesis: un enfoque biosemiótico. *Virología* **14**: 57-59
- Donis-Keller H (1979) Site specific enzymatic cleavage of RNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 179-192
- Draper DE, Misra VK (1998) RNA shows its metal. *Nat Struct Biol* **5**: 927-930
- Dreher TW (2009) Role of tRNA-like structures in controlling plant virus replication. *Virus Res* **139**: 217-229
- Dunn JJ (1976) RNase III cleavage of single-stranded RNA. Effect of ionic strength on the fidelity of cleavage. *J Biol Chem* **251**: 3807-3814
- Dunn JJ, Studier FW (1973) T7 early RNAs and Escherichia coli ribosomal RNAs are cut from large precursor RNAs in vivo by ribonuclease 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**: 3296-3300
- Dunn JJ, Studier FW (1975) Effect of RNAase III, cleavage on translation of bacteriophage T7 messenger RNAs. *J Mol Biol* **99**: 487-499
- Dunn JJ, Studier FW (1983) Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and the locations of T7 genetic elements. *J Mol Biol* **166**: 477-535
- Eder PS, Kekuda R, Stolc V, Altman S (1997) Characterization of two scleroderma autoimmune antigens that copurify with human ribonuclease P. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 1101-1106
- Egger D, Wolk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, Moradpour D, Bienz K (2002) Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* **76**: 5974-5984
- Ehresmann C, Baudin F, Mougel M, Romby P, Ebel JP, Ehresmann B (1987) Probing the structure of RNAs in solution. *Nucleic Acids Res* **15**: 9109-9128
- England TE, Uhlenbeck OC (1978) 3'-terminal labelling of RNA with T4 RNA ligase. *Nature* **275**: 560-561
- Esakova O, Perederina A, Quan C, Berezin I, Krasilnikov AS (2011) Substrate recognition by ribonucleoprotein ribonuclease MRP. *RNA* **17**: 356-364
- Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M, Watts L, Booten SL, Graham M, McKay R, Subramaniam A, Propp S, Lollo BA, Freier S, Bennett CF, Bhanot S, Monia BP (2006) miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab* **3**: 87-98
- Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E (2008) Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* **132**: 9-14
- Eun H-M (1996) Enzymology Primer for Recombinant DNA Technology In *Nucleases*, 3, pp 145-231. Academic Press

Evans D, Marquez SM, Pace NR (2006) RNase P: interface of the RNA and protein worlds. *Trends Biochem Sci* **31**: 333-341

Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W (2010) Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem* **79**: 351-379

Fehr C, Conrad KD, Niepmann M (2012) Differential stimulation of hepatitis C virus RNA translation by microRNA-122 in different cell cycle phases. *Cell Cycle* **11**: 277-285

Felden B, Florentz C, Giege R, Westhof E (1994) Solution structure of the 3'-end of bromo mosaic virus genomic RNAs. Conformational mimicry with canonical tRNAs. *J Mol Biol* **235**: 508-531

Felden B, Florentz C, Giege R, Westhof E (1996) A central pseudoknotted three-way junction imposes tRNA-like mimicry and the orientation of three 5' upstream pseudoknots in the 3' terminus of tobacco mosaic virus RNA. *RNA* **2**: 201-212

Felden B, Hanawa K, Atkins JF, Himeno H, Muto A, Gesteland RF, McCloskey JA, Crain PF (1998) Presence and location of modified nucleotides in Escherichia coli tmRNA: structural mimicry with tRNA acceptor branches. *EMBO J* **17**: 3188-3196

Ferrari S, Yehle CO, Robertson HD, Dickson E (1980) Specific RNA-cleaving activities from HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**: 2395-2399

Finlay BB, McFadden G (2006) Anti-immunology: evasion of the host immune system by bacterial and viral pathogens. *Cell* **124**: 767-782

Finter NB (1991) Why Are There So Many Subtypes of Alpha-Interferons? *Journal of Interferon Research*: 185-194

Fitzgerald KA (2011) The interferon inducible gene: Viperin. *J Interferon Cytokine Res* **31**: 131-135

Forster AC, Altman S (1990a) External guide sequences for an RNA enzyme. *Science* **249**: 783-786

Forster AC, Altman S (1990b) Similar cage-shaped structures for the RNA components of all ribonuclease P and ribonuclease MRP enzymes. *Cell* **62**: 407-409

Foster GR, Finter NB (1998) Are all type I human interferons equivalent? *J Viral Hepat* **5**: 143-152

Franch T, Thisted T, Gerdes K (1999) Ribonuclease III processing of coaxially stacked RNA helices. *J Biol Chem* **274**: 26572-26578

Frank DN, Pace NR (1998) Ribonuclease P: unity and diversity in a tRNA processing ribozyme. *Annu Rev Biochem* **67**: 153-180

Frenkel FE, Chaley MB, Korotkov EV, Skryabin KG (2004) Evolution of tRNA-like sequences and genome variability. *Gene* **335**: 57-71

Friebe P, Bartenschlager R (2002) Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *J Virol* **76**: 5326-5338

- Friebe P, Lohmann V, Krieger N, Bartenschlager R (2001) Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J Virol* **75**: 12047-12057
- Gao L, Aizaki H, He JW, Lai MM (2004) Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. *J Virol* **78**: 3480-3488
- Gardiner KJ, Marsh TL, Pace NR (1985) Ion dependence of the Bacillus subtilis RNase P reaction. *J Biol Chem* **260**: 5415-5419
- Garst AD, Batey RT (2009) A switch in time: detailing the life of a riboswitch. *Biochim Biophys Acta* **1789**: 584-591
- Gatewood ML, Bralley P, Weil MR, Jones GH (2012) RNA-Seq and RNA immunoprecipitation analyses of the transcriptome of Streptomyces coelicolor identify substrates for RNase III. *J Bacteriol* **194**: 2228-2237
- Gatfield D, Le Martelot G, Vejnar CE, Gerlach D, Schaad O, Fleury-Olela F, Ruskeepaa AL, Oresic M, Esau CC, Zdobnov EM, Schibler U (2009) Integration of microRNA miR-122 in hepatic circadian gene expression. *Genes Dev* **23**: 1313-1326
- Giege R (1996) Interplay of tRNA-like structures from plant viral RNAs with partners of the translation and replication machineries. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 12078-12081
- Giege R, Frugier M, Rudinger J (1998) tRNA mimics. *Curr Opin Struct Biol* **8**: 286-293
- Gill T, Aulds J, Schmitt ME (2006) A specialized processing body that is temporally and asymmetrically regulated during the cell cycle in Saccharomyces cerevisiae. *J Cell Biol* **173**: 35-45
- Gill T, Cai T, Aulds J, Wierzbicki S, Schmitt ME (2004) RNase MRP cleaves the CLB2 mRNA to promote cell cycle progression: novel method of mRNA degradation. *Mol Cell Biol* **24**: 945-953
- Girard M, Jacquemin E, Munnich A, Lyonnet S, Henrion-Caude A (2008) miR-122, a paradigm for the role of microRNAs in the liver. *J Hepatol* **48**: 648-656
- Gosert R, Egger D, Lohmann V, Bartenschlager R, Blum HE, Bienz K, Moradpour D (2003) Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol* **77**: 5487-5492
- Grafi G, Sela I, Galili G (1993) Translational regulation of human beta interferon mRNA: association of the 3' AU-rich sequence with the poly(A) tail reduces translation efficiency in vitro. *Mol Cell Biol* **13**: 3487-3493
- Gramantieri L, Ferracin M, Fornari F, Veronese A, Sabbioni S, Liu CG, Calin GA, Giovannini C, Ferrazzi E, Grazi GL, Croce CM, Bolondi L, Negrini M (2007) Cyclin G1 is a target of miR-122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* **67**: 6092-6099
- Green CJ, Vold BS, Morch MD, Joshi RL, Haenni AL (1988) Ionic conditions for the cleavage of the tRNA-like structure of turnip yellow mosaic virus by the catalytic RNA of RNase P. *J Biol Chem* **263**: 11617-11620

- Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP (2007) MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell* **27**: 91-105
- Gross G, Dunn JJ (1987) Structure of secondary cleavage sites of E. coli RNAaseIII in A3t RNA from bacteriophage T7. *Nucleic Acids Res* **15**: 431-442
- Gruber AR, Fallmann J, Kratochvill F, Kovarik P, Hofacker IL (2011) AREsite: a database for the comprehensive investigation of AU-rich elements. *Nucleic Acids Res* **39**: D66-69
- Grunberg-Manago M (1999) Messenger RNA stability and its role in control of gene expression in bacteria and phages. *Annu Rev Genet* **33**: 193-227
- Guarneros G, Montanez C, Hernandez T, Court D (1982) Posttranscriptional control of bacteriophage lambda gene expression from a site distal to the gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**: 238-242
- Guerrier-Takada C, Altman S (1984) Structure in solution of M1 RNA, the catalytic subunit of ribonuclease P from Escherichia coli. *Biochemistry* **23**: 6327-6334
- Guerrier-Takada C, Gardiner K, Marsh T, Pace N, Altman S (1983) The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* **35**: 849-857
- Guerrier-Takada C, van Belkum A, Pleij CW, Altman S (1988) Novel reactions of RNAase P with a tRNA-like structure in turnip yellow mosaic virus RNA. *Cell* **53**: 267-272
- Gupta R (1984) Halobacterium volcanii tRNAs. Identification of 41 tRNAs covering all amino acids, and the sequences of 33 class I tRNAs. *J Biol Chem* **259**: 9461-9471
- Haas ES, Brown JW (1998) Evolutionary variation in bacterial RNase P RNAs. *Nucleic Acids Res* **26**: 4093-4099
- Hall TA, Brown JW (2002) Archaeal RNase P has multiple protein subunits homologous to eukaryotic nuclear RNase P proteins. *RNA* **8**: 296-306
- Hammond JA, Rambo RP, Filbin ME, Kieft JS (2009) Comparison and functional implications of the 3D architectures of viral tRNA-like structures. *RNA* **15**: 294-307
- Hansen A, Pfeiffer T, Zuleeg T, Limmer S, Ciesiolka J, Feltens R, Hartmann RK (2001) Exploring the minimal substrate requirements for trans-cleavage by RNase P holoenzymes from Escherichia coli and Bacillus subtilis. *Mol Microbiol* **41**: 131-143
- Hartmann RK, Heinrich J, Schlegl J, Schuster H (1995) Precursor of C4 antisense RNA of bacteriophages P1 and P7 is a substrate for RNase P of Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 5822-5826
- Henke JI, Goergen D, Zheng J, Song Y, Schuttler CG, Fehr C, Junemann C, Niepmann M (2008) microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *Embo J* **27**: 3300-3310
- Holm PS, Krupp G (1992) The acceptor stem in pre-tRNAs determines the cleavage specificity of RNase P. *Nucleic Acids Res* **20**: 421-423

- Holzmann J, Frank P, Loffler E, Bennett KL, Gerner C, Rossmann W (2008) RNase P without RNA: identification and functional reconstitution of the human mitochondrial tRNA processing enzyme. *Cell* **135**: 462-474
- Honda M, Rijnbrand R, Abell G, Kim D, Lemon SM (1999) Natural variation in translational activities of the 5' nontranslated RNAs of hepatitis C virus genotypes 1a and 1b: evidence for a long-range RNA-RNA interaction outside of the internal ribosomal entry site. *J Virol* **73**: 4941-4951
- Hopper AK, Phizicky EM (2003) tRNA transfers to the limelight. *Genes Dev* **17**: 162-180
- Hua Y, Zhou J (2004) Rpp20 interacts with SMN and is re-distributed into SMN granules in response to stress. *Biochem Biophys Res Commun* **314**: 268-276
- Huang J, Liang TJ (1993) A novel hepatitis B virus (HBV) genetic element with Rev response element-like properties that is essential for expression of HBV gene products. *Mol Cell Biol* **13**: 7476-7486
- Huang Y, Carmichael GG (1997) The mouse histone H2a gene contains a small element that facilitates cytoplasmic accumulation of intronless gene transcripts and of unspliced HIV-1-related mRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 10104-10109
- Huang ZM, Yen TS (1995) Role of the hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element in export of intronless transcripts. *Mol Cell Biol* **15**: 3864-3869
- Huthoff H, Berkhout B (2001) Two alternating structures of the HIV-1 leader RNA. *Rna* **7**: 143-157
- Isaacs A, Lindenmann J (1957) Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **147**: 258-267
- Isaacs A, Lindenmann J, Valentine RC (1957) Virus interference. II. Some properties of interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **147**: 268-273
- Ito T, Tahara SM, Lai MM (1998) The 3'-untranslated region of hepatitis C virus RNA enhances translation from an internal ribosomal entry site. *J Virol* **72**: 8789-8796
- Jacobson MR, Cao LG, Taneja K, Singer RH, Wang YL, Pederson T (1997) Nuclear domains of the RNA subunit of RNase P. *J Cell Sci* **110** (Pt 7): 829-837
- Jaks E, Gavutis M, Uze G, Martal J, Piehler J (2007) Differential receptor subunit affinities of type I interferons govern differential signal activation. *J Mol Biol* **366**: 525-539
- Jan E, Kinzy TG, Sarnow P (2003) Divergent tRNA-like element supports initiation, elongation, and termination of protein biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 15410-15415
- Jarrous N (2002) Human ribonuclease P: subunits, function, and intranuclear localization. *RNA* **8**: 1-7
- Jarrous N, Eder PS, Guerrier-Takada C, Hoog C, Altman S (1998) Autoantigenic properties of some protein subunits of catalytically active complexes of human ribonuclease P. *RNA* **4**: 407-417
- Jarrous N, Eder PS, Wesolowski D, Altman S (1999a) Rpp14 and Rpp29, two protein subunits of human ribonuclease P. *RNA* **5**: 153-157

Jarrous N, Gopalan V (2010) Archaeal/eukaryal RNase P: subunits, functions and RNA diversification. *Nucleic Acids Res* **38**: 7885-7894

Jarrous N, Reiner R (2007) Human RNase P: a tRNA-processing enzyme and transcription factor. *Nucleic Acids Res* **35**: 3519-3524

Jarrous N, Reiner R, Wesolowski D, Mann H, Guerrier-Takada C, Altman S (2001) Function and subnuclear distribution of Rpp21, a protein subunit of the human ribonucleoprotein ribonuclease P. *RNA* **7**: 1153-1164

Jarrous N, Wolenski JS, Wesolowski D, Lee C, Altman S (1999b) Localization in the nucleolus and coiled bodies of protein subunits of the ribonucleoprotein ribonuclease P. *J Cell Biol* **146**: 559-572

Jopling CL, Norman KL, Sarnow P (2006) Positive and negative modulation of viral and cellular mRNAs by liver-specific microRNA miR-122. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **71**: 369-376

Jopling CL, Schutz S, Sarnow P (2008) Position-dependent function for a tandem microRNA miR-122-binding site located in the hepatitis C virus RNA genome. *Cell Host Microbe* **4**: 77-85

Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P (2005) Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* **309**: 1577-1581

Joshi S, Chapeville F, Haenni AL (1982) Length requirements for tRNA-specific enzymes and cleavage specificity at the 3' end of turnip yellow mosaic virus RNA. *Nucleic Acids Res* **10**: 1947-1962

Joshi S, Haenni AL, Hubert E, Huez G, Marbaix G (1978) In vivo aminoacylation and 'processing' of turnip yellow mosaic virus RNA in *Xenopus laevis* oocytes. *Nature* **275**: 339-341

Karwan R, Bennett JL, Clayton DA (1991) Nuclear RNase MRP processes RNA at multiple discrete sites: interaction with an upstream G box is required for subsequent downstream cleavages. *Genes Dev* **5**: 1264-1276

Katoh T, Sakaguchi Y, Miyauchi K, Suzuki T, Kashiwabara S, Baba T (2009) Selective stabilization of mammalian microRNAs by 3' adenylation mediated by the cytoplasmic poly(A) polymerase GLD-2. *Genes Dev* **23**: 433-438

Kazakov S, Altman S (1991) Site-specific cleavage by metal ion cofactors and inhibitors of M1 RNA, the catalytic subunit of RNase P from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 9193-9197

Kazantsev AV, Pace NR (2006) Bacterial RNase P: a new view of an ancient enzyme. *Nat Rev Microbiol* **4**: 729-740

Kazantsev AV, Rambo RP, Karimpour S, Santalucia J, Jr., Tainer JA, Pace NR (2011) Solution structure of RNase P RNA. *RNA* **17**: 1159-1171

Khabar KS, Young HA (2007) Post-transcriptional control of the interferon system. *Biochimie* **89**: 761-769

Kieft JS, Zhou K, Jubin R, Doudna JA (2001) Mechanism of ribosome recruitment by hepatitis C IRES RNA. *RNA* **7**: 194-206

- Kieft JS, Zhou K, Jubin R, Murray MG, Lau JY, Doudna JA (1999) The hepatitis C virus internal ribosome entry site adopts an ion-dependent tertiary fold. *J Mol Biol* **292**: 513-529
- Kikovska E, Svard SG, Kirsebom LA (2007) Eukaryotic RNase P RNA mediates cleavage in the absence of protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 2062-2067
- Kim SH, Suddath FL, Quigley GJ, McPherson A, Sussman JL, Wang AH, Seeman NC, Rich A (1974) Three-dimensional tertiary structure of yeast phenylalanine transfer RNA. *Science* **185**: 435-440
- Kim YK, Lee SH, Kim CS, Seol SK, Jang SK (2003) Long-range RNA-RNA interaction between the 5' nontranslated region and the core-coding sequences of hepatitis C virus modulates the IRES-dependent translation. *Rna* **9**: 599-606
- Kimura T, Hashimoto I, Nishizawa M, Ito S, Yamada H (2010) Novel cis-active structures in the coding region mediate CRM1-dependent nuclear export of IFN-alpha 1 mRNA. *Med Mol Morphol* **43**: 145-157
- Kindler P, Keil TU, Hofschneider PH (1973) Isolation and characterization of a ribonuclease 3 deficient mutant of Escherichia coli. *Mol Gen Genet* **126**: 53-59
- King TC, Sirdeshmukh R, Schlessinger D (1984) RNase III cleavage is obligate for maturation but not for function of Escherichia coli pre-23S rRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 185-188
- Kirsebom LA (2007) RNase P RNA mediated cleavage: substrate recognition and catalysis. *Biochimie* **89**: 1183-1194
- Kirsebom LA, Svard SG (1992) The kinetics and specificity of cleavage by RNase P is mainly dependent on the structure of the amino acid acceptor stem. *Nucleic Acids Res* **20**: 425-432
- Kirsebom LA, Svard SG (1994) Base pairing between Escherichia coli RNase P RNA and its substrate. *EMBO J* **13**: 4870-4876
- Kirsebom LA, Trobro S (2009) RNase P RNA-mediated cleavage. *IUBMB Life* **61**: 189-200
- Kiss T, Filipowicz W (1992) Evidence against a mitochondrial location of the 7-2/MRP RNA in mammalian cells. *Cell* **70**: 11-16
- Kleineidam RG, Pitulle C, Sproat B, Krupp G (1993) Efficient cleavage of pre-tRNAs by E. coli RNase P RNA requires the 2'-hydroxyl of the ribose at the cleavage site. *Nucleic Acids Res* **21**: 1097-1101
- Knapp G (1989) Enzymatic Approaches to Probing of RNA Secondary and Tertiary Structure. In *Methods in Enzymology*, Dahlberg JE, Abelson JN (eds), Vol. 180 RNA Processing Part A. General Methods., 16, pp 192-212. San Diego: Academic Press, Inc.
- Ko JH, Altman S (2007) OLE RNA, an RNA motif that is highly conserved in several extremophilic bacteria, is a substrate for and can be regulated by RNase P RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 7815-7820
- Kole R, Altman S (1981) Properties of purified ribonuclease P from Escherichia coli. *Biochemistry* **20**: 1902-1906

- Kolupaeva VG, Pestova TV, Hellen CU (2000) An enzymatic footprinting analysis of the interaction of 40S ribosomal subunits with the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. *J Virol* **74**: 6242-6250
- Kolykhalov AA, Feinstone SM, Rice CM (1996) Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol* **70**: 3363-3371
- Kolykhalov AA, Mihalik K, Feinstone SM, Rice CM (2000) Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo. *J Virol* **74**: 2046-2051
- Komine Y, Kitabatake M, Yokogawa T, Nishikawa K, Inokuchi H (1994) A tRNA-like structure is present in 10Sa RNA, a small stable RNA from Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 9223-9227
- Koraimann G, Schroller C, Graus H, Angerer D, Teferle K, Hogenauer G (1993) Expression of gene 19 of the conjugative plasmid R1 is controlled by RNase III. *Mol Microbiol* **9**: 717-727
- Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, Langer JA, Sheikh F, Dickensheets H, Donnelly RP (2003) IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol* **4**: 69-77
- Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M (2005) Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* **438**: 685-689
- Kruys V, Wathélet M, Poupart P, Contreras R, Fiers W, Content J, Huez G (1987) The 3' untranslated region of the human interferon-beta mRNA has an inhibitory effect on translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 6030-6034
- Kufel J, Kirsebom LA (1996) Different cleavage sites are aligned differently in the active site of M1 RNA, the catalytic subunit of Escherichia coli RNase P. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 6085-6090
- Kurz JC, Fierke CA (2002) The affinity of magnesium binding sites in the Bacillus subtilis RNase P x pre-tRNA complex is enhanced by the protein subunit. *Biochemistry* **41**: 9545-9558
- Kurz JC, Niranjanakumari S, Fierke CA (1998) Protein component of Bacillus subtilis RNase P specifically enhances the affinity for precursor-tRNA^{Asp}. *Biochemistry* **37**: 2393-2400
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T (2002) Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* **12**: 735-739
- LaGrandeur TE, Huttenhofer A, Noller HF, Pace NR (1994) Phylogenetic comparative chemical footprint analysis of the interaction between ribonuclease P RNA and tRNA. *Embo J* **13**: 3945-3952
- Lai LB, Vioque A, Kirsebom LA, Gopalan V (2010) Unexpected diversity of RNase P, an ancient tRNA processing enzyme: challenges and prospects. *FEBS Lett* **584**: 287-296
- Lambert NJ, Gu SG, Zahler AM (2011) The conformation of microRNA seed regions in native microRNPs is prearranged for presentation to mRNA targets. *Nucleic Acids Res*
- Lancaster AM, Jan E, Sarnow P (2006) Initiation factor-independent translation mediated by the hepatitis C virus internal ribosome entry site. *RNA* **12**: 894-902

- Lanford RE, Hildebrandt-Eriksen ES, Petri A, Persson R, Lindow M, Munk ME, Kauppinen S, Orum H (2010) Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* **327**: 198-201
- Lee B, Matera AG, Ward DC, Craft J (1996) Association of RNase mitochondrial RNA processing enzyme with ribonuclease P in higher ordered structures in the nucleolus: a possible coordinate role in ribosome biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 11471-11476
- Lee BJ, de la Pena P, Tobian JA, Zasloff M, Hatfield D (1987) Unique pathway of expression of an opal suppressor phosphoserine tRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 6384-6388
- Lee MC, Knapp G (1985) Transfer RNA splicing in *Saccharomyces cerevisiae*. Secondary and tertiary structures of the substrates. *J Biol Chem* **260**: 3108-3115
- Lei H, Dias AP, Reed R (2011) Export and stability of naturally intronless mRNAs require specific coding region sequences and the TREX mRNA export complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 17985-17990
- Lemon SM, Walker C, Alter MJ, Yi M (2007) Hepatitis C viruses. In *Fields virology*, Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Roizman B, Straus SE (eds), Vol. 1, 5th edn, pp 1253-1304. Philadelphia, P.A.: Lippincott Williams & Wilkins
- Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB (2003) Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* **115**: 787-798
- Li Y, Altman S (2003) A specific endoribonuclease, RNase P, affects gene expression of polycistronic operon mRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 13213-13218
- Lilley DM (2011) Mechanisms of RNA catalysis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **366**: 2910-2917
- Lim B, Sim SH, Sim M, Kim K, Jeon CO, Lee Y, Ha NC, Lee K (2012) RNase III controls the degradation of *corA* mRNA in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **194**: 2214-2220
- Lim LP, Glasner ME, Yekta S, Burge CB, Bartel DP (2003a) Vertebrate microRNA genes. *Science* **299**: 1540
- Lim LP, Lau NC, Weinstein EG, Abdelhakim A, Yekta S, Rhoades MW, Burge CB, Bartel DP (2003b) The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev* **17**: 991-1008
- Lindahl L, Bommankanti A, Li X, Hayden L, Jones A, Khan M, Oni T, Zengel JM (2009) RNase MRP is required for entry of 35S precursor rRNA into the canonical processing pathway. *RNA* **15**: 1407-1416
- Lindahl L, Fretz S, Epps N, Zengel JM (2000) Functional equivalence of hairpins in the RNA subunits of RNase MRP and RNase P in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* **6**: 653-658
- Litvak S, Tarrago A, Tarrago-Litvak L, Allende JE (1973) Elongation factor-viral genome interaction dependent on the aminoacylation of TYMV and TMV RNAs. *Nat New Biol* **241**: 88-90
- Liu F, Altman S (1994) Differential evolution of substrates for an RNA enzyme in the presence and absence of its protein cofactor. *Cell* **77**: 1093-1100

Liu F, Altman S (1996) Requirements for cleavage by a modified RNase P of a small model substrate. *Nucleic Acids Res* **24**: 2690-2696

Liu X, Mertz JE (1995) HnRNP L binds a cis-acting RNA sequence element that enables intron-dependent gene expression. *Genes Dev* **9**: 1766-1780

Loesch-Fries LS, Hall TC (1982) In vivo aminoacylation of Brome mosaic and barley stripe mosaic virus RNAs. *Nature* **298**: 771-773

Loria A, Pan T (1996) Domain structure of the ribozyme from eubacterial ribonuclease P. *RNA* **2**: 551-563

Lourenco S, Costa F, Debarges B, Andrieu T, Cahour A (2008) Hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation is stimulated by cis-acting RNA elements and trans-acting viral factors. *FEBS J* **275**: 4179-4197

Lowman HB, Draper DE (1986) On the recognition of helical RNA by cobra venom V1 nuclease. *J Biol Chem* **261**: 5396-5403

Lumelsky N, Altman S (1988) Selection and characterization of randomly produced mutants in the gene coding for M1 RNA. *J Mol Biol* **202**: 443-454

Lundblad EW, Altman S (2010) Inhibition of gene expression by RNase P. *N Biotechnol* **27**: 212-221

Lygerou Z, Allmang C, Tollervey D, Seraphin B (1996a) Accurate processing of a eukaryotic precursor ribosomal RNA by ribonuclease MRP in vitro. *Science* **272**: 268-270

Lygerou Z, Pluk H, van Venrooij WJ, Seraphin B (1996b) hPop1: an autoantigenic protein subunit shared by the human RNase P and RNase MRP ribonucleoproteins. *EMBO J* **15**: 5936-5948

Lyons AJ, Lytle JR, Gomez J, Robertson HD (2001) Hepatitis C virus internal ribosome entry site RNA contains a tertiary structural element in a functional domain of stem-loop II. *Nucleic Acids Res* **29**: 2535-2541

Lyons AJ, Robertson HD (2003) Detection of tRNA-like structure through RNase P cleavage of viral internal ribosome entry site RNAs near the AUG start triplet. *J Biol Chem* **278**: 26844-26850

MacRae IJ, Doudna JA (2007) Ribonuclease revisited: structural insights into ribonuclease III family enzymes. *Curr Opin Struct Biol* **17**: 138-145

Maizels N, Weiner AM (1994) Phylogeny from function: evidence from the molecular fossil record that tRNA originated in replication, not translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 6729-6734

Mann H, Ben-Asouli Y, Schein A, Moussa S, Jarrous N (2003) Eukaryotic RNase P: role of RNA and protein subunits of a primordial catalytic ribonucleoprotein in RNA-based catalysis. *Mol Cell* **12**: 925-935

Mans RM, Pleij CW, Bosch L (1991) tRNA-like structures. Structure, function and evolutionary significance. *Eur J Biochem* **201**: 303-324

- Maran T. Mimicry. In Bouissac P (ed.). E.J. Pratt Library - Victoria University / e-resources, Ontario-Canada, p. Semiotics Encyclopedia Online: <http://www.semioticon.com/seo/M/mimicry.html#>.
- Martell M, Esteban JI, Quer J, Genesca J, Weiner A, Esteban R, Guardia J, Gomez J (1992) Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* **66**: 3225-3229
- Marvin MC, Walker SC, Fierke CA, Engelke DR (2011) Binding and cleavage of unstructured RNA by nuclear RNase P. *RNA* **17**: 1429-1440
- Matera AG, Frey MR, Margelot K, Wolin SL (1995) A perinucleolar compartment contains several RNA polymerase III transcripts as well as the polypyrimidine tract-binding protein, hnRNP I. *J Cell Biol* **129**: 1181-1193
- Matsunaga J, Simons EL, Simons RW (1996) RNase III autoregulation: structure and function of rncO, the posttranscriptional "operator". *RNA* **2**: 1228-1240
- Mattijssen S, Hinson ER, Onnekink C, Hermans P, Zabel B, Cresswell P, Pruijn GJ (2010) Viperin mRNA is a novel target for the human RNase MRP/RNase P endoribonuclease. *Cell Mol Life Sci*
- McCaffrey AP, Ohashi K, Meuse L, Shen S, Lancaster AM, Lukavsky PJ, Sarnow P, Kay MA (2002) Determinants of hepatitis C translational initiation in vitro, in cultured cells and mice. *Mol Ther* **5**: 676-684
- McClain WH, Guerrier-Takada C, Altman S (1987) Model substrates for an RNA enzyme. *Science* **238**: 527-530
- McFadden G, Mohamed MR, Rahman MM, Bartee E (2009) Cytokine determinants of viral tropism. *Nat Rev Immunol* **9**: 645-655
- McMullan LK, Grakoui A, Evans MJ, Mihalik K, Puig M, Branch AD, Feinstone SM, Rice CM (2007) Evidence for a functional RNA element in the hepatitis C virus core gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 2879-2884
- Misra VK, Draper DE (1998) On the role of magnesium ions in RNA stability. *Biopolymers* **48**: 113-135
- Moore SD, Sauer RT (2007) The tmRNA system for translational surveillance and ribosome rescue. *Annu Rev Biochem* **76**: 101-124
- Morice Y, Ratinier M, Miladi A, Chevaliez S, Germanidis G, Wedemeyer H, Laperche S, Lavergne JP, Pawlotsky JM (2009) Seroconversion to hepatitis C virus alternate reading frame protein during acute infection. *Hepatology* **49**: 1449-1459
- Morse DP, Schmidt FJ (1992) Sequences encoding the protein and RNA components of ribonuclease P from *Streptomyces bikiniensis* var. *zorbonensis*. *Gene* **117**: 61-66
- Muller U, Steinhoff U, Reis LF, Hemmi S, Pavlovic J, Zinkernagel RM, Aguet M (1994) Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* **264**: 1918-1921

Nadal A, Martell M, Lytle JR, Lyons AJ, Robertson HD, Cabot B, Esteban JI, Esteban R, Guardia J, Gomez J (2002) Specific cleavage of hepatitis C virus RNA genome by human RNase P. *J Biol Chem* **277**: 30606-30613

Nasheri N, Singaravelu R, Goodmurphy M, Lyn RK, Pezacki JP (2011) Competing roles of microRNA-122 recognition elements in hepatitis C virus RNA. *Virology* **410**: 336-344

Neumann AU, Lam NP, Dahari H, Gretch DR, Wiley TE, Layden TJ, Perelson AS (1998) Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* **282**: 103-107

Nicholson AW (2003) The Ribonuclease III Superfamily: Forms and Functions in RNA Maturation, Decay, and Gene Silencing. In *RNAi a guide to gene silencing*, Hannon GJ (ed), 8, pp 149-174. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press

Nikolaev N, Silengo L, Schlessinger D (1973) Synthesis of a large precursor to ribosomal RNA in a mutant of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**: 3361-3365

Niranjanakumari S, Stams T, Crary SM, Christianson DW, Fierke CA (1998) Protein component of the ribozyme ribonuclease P alters substrate recognition by directly contacting precursor tRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 15212-15217

Nissen P, Kjeldgaard M, Nyborg J (2000) Macromolecular mimicry. *EMBO J* **19**: 489-495

Oh BK, Pace NR (1994) Interaction of the 3'-end of tRNA with ribonuclease P RNA. *Nucleic Acids Res* **22**: 4087-4094

Ojala D, Montoya J, Attardi G (1981) tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature* **290**: 470-474

Okamoto H, Kojima M, Okada S, Yoshizawa H, Iizuka H, Tanaka T, Muchmore EE, Peterson DA, Ito Y, Mishiro S (1992) Genetic drift of hepatitis C virus during an 8.2-year infection in a chimpanzee: variability and stability. *Virology* **190**: 894-899

Oldstone MB (2005) Molecular mimicry, microbial infection, and autoimmune disease: evolution of the concept. *Curr Top Microbiol Immunol* **296**: 1-17

Ono Y, Onda H, Sasada R, Igarashi K, Sugino Y, Nishioka K (1983) The complete nucleotide sequences of the cloned hepatitis B virus DNA; subtype adr and adw. *Nucleic Acids Res* **11**: 1747-1757

Oppenheim AB, Kornitzer D, Altuvia S, Court DL (1993) Posttranscriptional control of the lysogenic pathway in bacteriophage lambda. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **46**: 37-49

Orom UA, Nielsen FC, Lund AH (2008) MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell* **30**: 460-471

Pace NR, Brown JW (1995) Evolutionary perspective on the structure and function of ribonuclease P, a ribozyme. *J Bacteriol* **177**: 1919-1928

Pan T, Loria A, Zhong K (1995) Probing of tertiary interactions in RNA: 2'-hydroxyl-base contacts between the RNase P RNA and pre-tRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 12510-12514

- Pannucci JA, Haas ES, Hall TA, Harris JK, Brown JW (1999) RNase P RNAs from some Archaea are catalytically active. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 7803-7808
- Park BH, Lee JH, Kim M, Lee Y (2000) Effects of C5 protein on Escherichia coli RNase P catalysis with a precursor tRNA(Phe) bearing a single mismatch in the acceptor stem. *Biochem Biophys Res Commun* **268**: 136-140
- Pascual A, Vioque A (1996) Cloning, purification and characterization of the protein subunit of ribonuclease P from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Eur J Biochem* **241**: 17-24
- Pascual A, Vioque A (1999) Substrate binding and catalysis by ribonuclease P from cyanobacteria and Escherichia coli are affected differently by the 3' terminal CCA in tRNA precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 6672-6677
- Paste M, Huez G, Kruys V (2003) Deadenylation of interferon-beta mRNA is mediated by both the AU-rich element in the 3'-untranslated region and an instability sequence in the coding region. *Eur J Biochem* **270**: 1590-1597
- Peck-Miller KA, Altman S (1991) Kinetics of the processing of the precursor to 4.5 S RNA, a naturally occurring substrate for RNase P from Escherichia coli. *J Mol Biol* **221**: 1-5
- Pedersen IM, Cheng G, Wieland S, Volinia S, Croce CM, Chisari FV, David M (2007) Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism. *Nature* **449**: 919-922
- Perederina A, Esakova O, Quan C, Khanova E, Krasilnikov AS (2010) Eukaryotic ribonucleases P/MRP: the crystal structure of the P3 domain. *EMBO J* **29**: 761-769
- Persson T, Cuzic S, Hartmann RK (2003) Catalysis by RNase P RNA: unique features and unprecedented active site plasticity. *J Biol Chem* **278**: 43394-43401
- Pertzev AV, Nicholson AW (2006) Characterization of RNA sequence determinants and antideterminants of processing reactivity for a minimal substrate of Escherichia coli ribonuclease III. *Nucleic Acids Res* **34**: 3708-3721
- Pestka S, Krause CD, Walter MR (2004) Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* **202**: 8-32
- Pestova TV, Shatsky IN, Fletcher SP, Jackson RJ, Hellen CU (1998) A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes Dev* **12**: 67-83
- Piccinelli P, Rosenblad MA, Samuelsson T (2005) Identification and analysis of ribonuclease P and MRP RNA in a broad range of eukaryotes. *Nucleic Acids Res* **33**: 4485-4495
- Piron M, Beguiristain N, Nadal A, Martinez-Salas E, Gomez J (2005) Characterizing the function and structural organization of the 5' tRNA-like motif within the hepatitis C virus quasispecies. *Nucleic Acids Res* **33**: 1487-1502
- Pleij CW, Bosch L (1989) RNA pseudoknots: structure, detection, and prediction. In *Methods in Enzymology*, Dahlberg JE, Abelson JN (eds), Vol. 180 RNA Processing Part A. General Methods., 21, pp 289-303. San Diego: Academic Press, Inc.
- Pleij CW, Rietveld K, Bosch L (1985) A new principle of RNA folding based on pseudoknotting. *Nucleic Acids Res* **13**: 1717-1731

Pluk H, van Eenennaam H, Rutjes SA, Pruijn GJ, van Venrooij WJ (1999) RNA-protein interactions in the human RNase MRP ribonucleoprotein complex. *RNA* **5**: 512-524

Portier C, Dondon L, Grunberg-Manago M, Regnier P (1987) The first step in the functional inactivation of the Escherichia coli polynucleotide phosphorylase messenger is a ribonuclease III processing at the 5' end. *EMBO J* **6**: 2165-2170

Poumbourios P, Drummer HE (2007) Recent advances in our understanding of receptor binding, viral fusion and cell entry of hepatitis C virus: new targets for the design of antiviral agents. *Antivir Chem Chemother* **18**: 169-189

Pragai B, Apirion D (1981) Processing of bacteriophage T4 tRNAs. The role of RNAase III. *J Mol Biol* **153**: 619-630

Prochiantz A, Haenni AL (1973) TYMV RNA as a substrate of tRNA maturation endonuclease. *Nat New Biol* **241**: 168-170

Puglisi JD, Wyatt JR, Tinoco I, Jr. (1988) A pseudoknotted RNA oligonucleotide. *Nature* **331**: 283-286

Puranam RS, Attardi G (2001) The RNase P associated with HeLa cell mitochondria contains an essential RNA component identical in sequence to that of the nuclear RNase P. *Mol Cell Biol* **21**: 548-561

Randall RE, Goodbourn S (2008) Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol* **89**: 1-47

Randau L, Schroder I, Soll D (2008) Life without RNase P. *Nature* **453**: 120-123

Regnier P, Grunberg-Manago M (1989) Cleavage by RNase III in the transcripts of the met Y-nus-A-infB operon of Escherichia coli releases the tRNA and initiates the decay of the downstream mRNA. *J Mol Biol* **210**: 293-302

Regnier P, Grunberg-Manago M (1990) RNase III cleavages in non-coding leaders of Escherichia coli transcripts control mRNA stability and genetic expression. *Biochimie* **72**: 825-834

Reich C, Olsen GJ, Pace B, Pace NR (1988) Role of the protein moiety of ribonuclease P, a ribonucleoprotein enzyme. *Science* **239**: 178-181

Reimer G, Raska I, Scheer U, Tan EM (1988) Immunolocalization of 7-2-ribonucleoprotein in the granular component of the nucleolus. *Exp Cell Res* **176**: 117-128

Reiner R, Ben-Asouli Y, Krilovetzky I, Jarrous N (2006) A role for the catalytic ribonucleoprotein RNase P in RNA polymerase III transcription. *Genes Dev* **20**: 1621-1635

Reiner R, Krasnov-Yoeli N, Dehtiar Y, Jarrous N (2008) Function and assembly of a chromatin-associated RNase P that is required for efficient transcription by RNA polymerase I. *PLoS One* **3**: e4072

Reiter NJ, Osterman A, Torres-Larios A, Swinger KK, Pan T, Mondragon A (2010) Structure of a bacterial ribonuclease P holoenzyme in complex with tRNA. *Nature* **468**: 784-789

- Rietveld K, Pleij CW, Bosch L (1983) Three-dimensional models of the tRNA-like 3' termini of some plant viral RNAs. *EMBO J* **2**: 1079-1085
- Rietveld K, Van Poelgeest R, Pleij CW, Van Boom JH, Bosch L (1982) The tRNA-like structure at the 3' terminus of turnip yellow mosaic virus RNA. Differences and similarities with canonical tRNA. *Nucleic Acids Res* **10**: 1929-1946
- Rijnbrand R, Bredenbeek PJ, Haasnoot PC, Kieft JS, Spaan WJ, Lemon SM (2001) The influence of downstream protein-coding sequence on internal ribosome entry on hepatitis C virus and other flavivirus RNAs. *RNA* **7**: 585-597
- Roberts AP, Lewis AP, Jopling CL (2011) miR-122 activates hepatitis C virus translation by a specialized mechanism requiring particular RNA components. *Nucleic Acids Res*
- Robertson HD (1967) A Nuclease Specific for Double-Stranded RNA. *Virology* **12**: 718-719
- Robertson HD (1982) Escherichia coli ribonuclease III cleavage sites. *Cell* **30**: 669-672
- Robertson HD (1990) Escherichia coli ribonuclease III. *Methods Enzymol* **181**: 189-202
- Robertson HD, Altman S, Smith JD (1972) Purification and properties of a specific Escherichia coli ribonuclease which cleaves a tyrosine transfer ribonucleic acid precursor. *J Biol Chem* **247**: 5243-5251
- Robertson HD, Webster RE, Zinder ND (1968) Purification and properties of ribonuclease III from Escherichia coli. *J Biol Chem* **243**: 82-91
- Robertus JD, Ladner JE, Finch JT, Rhodes D, Brown RS, Clark BF, Klug A (1974) Structure of yeast phenylalanine tRNA at 3 Å resolution. *Nature* **250**: 546-551
- Romero-Lopez C, Berzal-Herranz A (2009) A long-range RNA-RNA interaction between the 5' and 3' ends of the HCV genome. *RNA* **15**: 1740-1752
- Rosenblad MA, Lopez MD, Piccinelli P, Samuelsson T (2006) Inventory and analysis of the protein subunits of the ribonucleases P and MRP provides further evidence of homology between the yeast and human enzymes. *Nucleic Acids Res* **34**: 5145-5156
- Sabariegos R, Nadal A, Beguiristain N, Piron M, Gomez J (2004) Catalytic RNase P RNA from Synechocystis sp. cleaves the hepatitis C virus RNA near the AUG start codon. *FEBS Lett* **577**: 517-522
- Saito H, Richardson CC (1981) Processing of mRNA by ribonuclease III regulates expression of gene 1.2 of bacteriophage T7. *Cell* **27**: 533-542
- Saiz JC, Lopez de Quinto S, Ibarrola N, Lopez-Labrador FX, Sanchez-Tapias JM, Rodes J, Martinez-Salas E (1999) Internal initiation of translation efficiency in different hepatitis C genotypes isolated from interferon treated patients. *Arch Virol* **144**: 215-229
- Salamanca U. (2007-2011) dicciomed.eusal.es Ediciones Universidad de Salamanca, Salamanca, pp. Diccionario médico-biológico, histórico y etimológico: <http://dicciomed.eusal.es/palabra/mimetismo>.

Samanta MP, Tongprasit W, Sethi H, Chin CS, Stolc V (2006) Global identification of noncoding RNAs in *Saccharomyces cerevisiae* by modulating an essential RNA processing pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 4192-4197

Sarasin-Filipowicz M, Krol J, Markiewicz I, Heim MH, Filipowicz W (2009) Decreased levels of microRNA miR-122 in individuals with hepatitis C responding poorly to interferon therapy. *Nat Med* **15**: 31-33

Schedl P, Primakoff P (1973) Mutants of *Escherichia coli* thermosensitive for the synthesis of transfer RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**: 2091-2095

Scheller N, Mina LB, Galao RP, Chari A, Gimenez-Barcons M, Noueir A, Fischer U, Meyerhans A, Diez J (2009) Translation and replication of hepatitis C virus genomic RNA depends on ancient cellular proteins that control mRNA fates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 13517-13522

Schlegl J, Furste JP, Bald R, Erdmann VA, Hartmann RK (1992) Cleavage efficiencies of model substrates for ribonuclease P from *Escherichia coli* and *Thermus thermophilus*. *Nucleic Acids Res* **20**: 5963-5970

Schmitt ME, Clayton DA (1992) Yeast site-specific ribonucleoprotein endoribonuclease MRP contains an RNA component homologous to mammalian RNase MRP RNA and essential for cell viability. *Genes Dev* **6**: 1975-1985

Schmitt ME, Clayton DA (1993) Nuclear RNase MRP is required for correct processing of pre-5.8S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **13**: 7935-7941

Seitz H (2009) Redefining microRNA targets. *Curr Biol* **19**: 870-873

Serrano P, Gomez J, Martinez-Salas E (2007) Characterization of a cyanobacterial RNase P ribozyme recognition motif in the IRES of foot-and-mouth disease virus reveals a unique structural element. *Rna*

Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, Whitmore TE, Kuestner R, Garrigues U, Birks C, Roraback J, Ostrand C, Dong D, Shin J, Presnell S, Fox B, Haldeman B, Cooper E, Taft D, Gilbert T, Grant FJ, Tackett M, Krivan W, McKnight G, Clegg C, Foster D, Klucher KM (2003) IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol* **4**: 63-68

Shi ST, Lai MMC (2006) HCV 5' and 3'UTR: When Translation Meets Replication. In *Hepatitis C viruses: genomes and molecular biology.*, Tan SL (ed), 2, pp 49-87. Norfolk (UK): Horizon Bioscience

Shimakami T, Yamane D, Welsch C, Hensley L, Jangra RK, Lemon SM (2012) Base pairing between hepatitis C virus RNA and microRNA 122 3' of its seed sequence is essential for genome stabilization and production of infectious virus. *J Virol* **86**: 7372-7383

Silber R, Malathi VG, Hurwitz J (1972) Purification and properties of bacteriophage T4-induced RNA ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**: 3009-3013

Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deleage G, Enomoto N, Feinstone S, Halfon P, Inchauspe G, Kuiken C, Maertens G, Mizokami M, Murphy DG, Okamoto H, Pawlotsky JM, Penin F, Sablon E, Shin IT, Stuyver LJ, Thiel HJ, Viazov S, Weiner AJ, Widell A (2005) Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* **42**: 962-973

Smith D, Burgin AB, Haas ES, Pace NR (1992) Influence of metal ions on the ribonuclease P reaction. Distinguishing substrate binding from catalysis. *J Biol Chem* **267**: 2429-2436

Smith D, Pace NR (1993) Multiple magnesium ions in the ribonuclease P reaction mechanism. *Biochemistry* **32**: 5273-5281

Sommereyns C, Paul S, Staeheli P, Michiels T (2008) IFN-lambda (IFN-lambda) is expressed in a tissue-dependent fashion and primarily acts on epithelial cells in vivo. *PLoS Pathog* **4**: e1000017

Song Y, Friebe P, Tzima E, Junemann C, Bartenschlager R, Niepmann M (2006) The hepatitis C virus RNA 3'-untranslated region strongly enhances translation directed by the internal ribosome entry site. *J Virol* **80**: 11579-11588

Spahn CM, Kieft JS, Grassucci RA, Penczek PA, Zhou K, Doudna JA, Frank J (2001) Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40s ribosomal subunit. *Science* **291**: 1959-1962

Springer M, Portier C, Grunberg-Manago M (1998) RNA Mimicry in the Translational Apparatus. In *RNA Structure and Function*, Grunberg-Manago RWSaM (ed), Vol. Monograph 35, pp 377-413. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press

Steege DA (2000) Emerging features of mRNA decay in bacteria. *RNA* **6**: 1079-1090

Steinberg S, Leclerc F, Cedergren R (1997) Structural rules and conformational compensations in the tRNA L-form. *J Mol Biol* **266**: 269-282

Stohl LL, Clayton DA (1992) *Saccharomyces cerevisiae* contains an RNase MRP that cleaves at a conserved mitochondrial RNA sequence implicated in replication priming. *Mol Cell Biol* **12**: 2561-2569

Sun L, Campbell FE, Zahler NH, Harris ME (2006) Evidence that substrate-specific effects of C5 protein lead to uniformity in binding and catalysis by RNase P. *EMBO J* **25**: 3998-4007

Sun L, Harris ME (2007) Evidence that binding of C5 protein to P RNA enhances ribozyme catalysis by influencing active site metal ion affinity. *RNA* **13**: 1505-1515

Sunwoo H, Dinger ME, Wilusz JE, Amaral PP, Mattick JS, Spector DL (2009) MEN epsilon/beta nuclear-retained non-coding RNAs are up-regulated upon muscle differentiation and are essential components of paraspeckles. *Genome Res* **19**: 347-359

Svard SG, Kirsebom LA (1992) Several regions of a tRNA precursor determine the *Escherichia coli* RNase P cleavage site. *J Mol Biol* **227**: 1019-1031

Svard SG, Kirsebom LA (1993) Determinants of *Escherichia coli* RNase P cleavage site selection: a detailed in vitro and in vivo analysis. *Nucleic Acids Res* **21**: 427-434

Swerdlow H, Guthrie C (1984) Structure of intron-containing tRNA precursors. Analysis of solution conformation using chemical and enzymatic probes. *J Biol Chem* **259**: 5197-5207

Tallsjo A, Kirsebom LA (1993) Product release is a rate-limiting step during cleavage by the catalytic RNA subunit of *Escherichia coli* RNase P. *Nucleic Acids Res* **21**: 51-57

Tanaka T, Kato N, Cho MJ, Sugiyama K, Shimotohno K (1996) Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome. *J Virol* **70**: 3307-3312

Taniguchi T, Takaoka A (2001) A weak signal for strong responses: interferon-alpha/beta revisited. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 378-386

Thomas BC, Li X, Gegenheimer P (2000) Chloroplast ribonuclease P does not utilize the ribozyme-type pre-tRNA cleavage mechanism. *RNA* **6**: 545-553

Tinoco I, Jr., Bustamante C (1999) How RNA folds. *J Mol Biol* **293**: 271-281

Topper JN, Clayton DA (1990) Characterization of human MRP/Th RNA and its nuclear gene: full length MRP/Th RNA is an active endoribonuclease when assembled as an RNP. *Nucleic Acids Res* **18**: 793-799

Tovey MG, Streuli M, Gresser I, Gugenheim J, Blanchard B, Guymarho J, Vignaux F, Gigou M (1987) Interferon messenger RNA is produced constitutively in the organs of normal individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 5038-5042

Tsai WC, Hsu PW, Lai TC, Chau GY, Lin CW, Chen CM, Lin CD, Liao YL, Wang JL, Chau YP, Hsu MT, Hsiao M, Huang HD, Tsou AP (2009) MicroRNA-122, a tumor suppressor microRNA that regulates intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **49**: 1571-1582

Tsonis PA, Dwivedi B (2008) Molecular mimicry: structural camouflage of proteins and nucleic acids. *Biochim Biophys Acta* **1783**: 177-187

Tuplin A, Evans DJ, Simmonds P (2004) Detailed mapping of RNA secondary structures in core and NS5B-encoding region sequences of hepatitis C virus by RNase cleavage and novel bioinformatic prediction methods. *J Gen Virol* **85**: 3037-3047

Van-Wright RI (1980) On the definition of mimicry. *Biological Journal of the Linnean Society*: 1-6

van Eenennaam H, Lugtenberg D, Vogelzangs JH, van Venrooij WJ, Pruijn GJ (2001a) hPop5, a protein subunit of the human RNase MRP and RNase P endoribonucleases. *J Biol Chem* **276**: 31635-31641

van Eenennaam H, van der Heijden A, Janssen RJ, van Venrooij WJ, Pruijn GJ (2001b) Basic domains target protein subunits of the RNase MRP complex to the nucleolus independently of complex association. *Mol Biol Cell* **12**: 3680-3689

van Heuvel M, Bosveld IJ, Luyten W, Trapman J, Zwarthoff EC (1986) Transient expression of murine interferon-alpha genes in mouse and monkey cells. *Gene* **45**: 159-165

Vassilaki N, Friebe P, Meuleman P, Kallis S, Kaul A, Paranhos-Baccala G, Leroux-Roels G, Mavromara P, Bartenschlager R (2008) Role of the hepatitis C virus core+1 open reading frame and core cis-acting RNA elements in viral RNA translation and replication. *J Virol* **82**: 11503-11515

Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA (2007) Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* **318**: 1931-1934

Vioque A (1992) Analysis of the gene encoding the RNA subunit of ribonuclease P from cyanobacteria. *Nucleic Acids Res* **20**: 6331-6337

- Vioque A (1997) The RNase P RNA from cyanobacteria: short tandemly repeated repetitive (STRR) sequences are present within the RNase P RNA gene in heterocyst-forming cyanobacteria. *Nucleic Acids Res* **25**: 3471-3477
- Vioque A, Altman S (2001) Ribonuclease P. In *RNA*, Söll D, Nishimura S, Moore PB (eds), 9, pp 137-154. Oxford: Pergamon
- Walker SC, Engelke DR (2006) Ribonuclease P: the evolution of an ancient RNA enzyme. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **41**: 77-102
- Wang C, Le SY, Ali N, Siddiqui A (1995) An RNA pseudoknot is an essential structural element of the internal ribosome entry site located within the hepatitis C virus 5' noncoding region. *RNA* **1**: 526-537
- Wang MJ, Davis NW, Gegenheimer P (1988) Novel mechanisms for maturation of chloroplast transfer RNA precursors. *EMBO J* **7**: 1567-1574
- Wang TH, Rijnbrand RC, Lemon SM (2000) Core protein-coding sequence, but not core protein, modulates the efficiency of cap-independent translation directed by the internal ribosome entry site of hepatitis C virus. *J Virol* **74**: 11347-11358
- Waugh DS, Pace NR (1990) Complementation of an RNase P RNA (*rnpB*) gene deletion in *Escherichia coli* by homologous genes from distantly related eubacteria. *J Bacteriol* **172**: 6316-6322
- Wegscheid B, Condon C, Hartmann RK (2006) Type A and B RNase P RNAs are interchangeable in vivo despite substantial biophysical differences. *EMBO Rep* **7**: 411-417
- Wegscheid B, Hartmann RK (2006) The precursor tRNA 3'-CCA interaction with *Escherichia coli* RNase P RNA is essential for catalysis by RNase P in vivo. *RNA* **12**: 2135-2148
- Weissmann C, Nagata S, Boll W, Fountoulakis M, Fujisawa A, Fujisawa JI, Haynes J, Henco K, Mantei N, Ragg H, Schein C, Schmid J, Shaw G, Streuli M, Taira H, Todokoro K, Weidle U (1982) Structure and expression of human IFN-alpha genes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **299**: 7-28
- Welting TJ, Kikkert BJ, van Venrooij WJ, Pruijn GJ (2006) Differential association of protein subunits with the human RNase MRP and RNase P complexes. *RNA* **12**: 1373-1382
- Welting TJ, van Venrooij WJ, Pruijn GJ (2004) Mutual interactions between subunits of the human RNase MRP ribonucleoprotein complex. *Nucleic Acids Res* **32**: 2138-2146
- Werner M, Rosa E, Al Emran O, Goldberg AR, George ST (1999) Targeted cleavage of RNA molecules by human RNase P using minimized external guide sequences. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **9**: 81-88
- Westphal H, Crouch RJ (1975) Cleavage of adenovirus messenger RNA and of 28S and 18S ribosomal RNA by RNase III. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**: 3077-3081
- Whittemore LA, Maniatis T (1990) Postinduction turnoff of beta-interferon gene expression. *Mol Cell Biol* **10**: 1329-1337

Wienholds E, Kloosterman WP, Miska E, Alvarez-Saavedra E, Berezikov E, de Bruijn E, Horvitz HR, Kauppinen S, Plasterk RH (2005) MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. *Science* **309**: 310-311

Wilson JA, Zhang C, Huys A, Richardson CD (2011) Human Ago2 is required for efficient microRNA 122 regulation of hepatitis C virus RNA accumulation and translation. *J Virol* **85**: 2342-2350

Wilusz JE, Freier SM, Spector DL (2008) 3' end processing of a long nuclear-retained noncoding RNA yields a tRNA-like cytoplasmic RNA. *Cell* **135**: 919-932

Wilusz JE, Spector DL (2010) An unexpected ending: noncanonical 3' end processing mechanisms. *RNA* **16**: 259-266

Witwer KW, Sisk JM, Gama L, Clements JE (2010) MicroRNA regulation of IFN-beta protein expression: rapid and sensitive modulation of the innate immune response. *J Immunol* **184**: 2369-2376

Wolin SL, Matera AG (1999) The trials and travels of tRNA. *Genes Dev* **13**: 1-10

Yang L, Altman S (2007) A noncoding RNA in *Saccharomyces cerevisiae* is an RNase P substrate. *RNA* **13**: 682-690

Yi M, Lemon SM (2003) 3' nontranslated RNA signals required for replication of hepatitis C virus RNA. *J Virol* **77**: 3557-3568

Yot P, Pinck M, Haenni AL, Duranton HM, Chapeville F (1970) Valine-specific tRNA-like structure in turnip yellow mosaic virus RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **67**: 1345-1352

Young RA, Steitz JA (1978) Complementary sequences 1700 nucleotides apart form a ribonuclease III cleavage site in *Escherichia coli* ribosomal precursor RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**: 3593-3597

Yuan Y, Altman S (1994) Selection of guide sequences that direct efficient cleavage of mRNA by human ribonuclease P. *Science* **263**: 1269-1273

Yuan Y, Altman S (1995) Substrate recognition by human RNase P: identification of small, model substrates for the enzyme. *Embo J* **14**: 159-168

Yuan Y, Hwang ES, Altman S (1992) Targeted cleavage of mRNA by human RNase P. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 8006-8010

Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W (2004) Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* **118**: 57-68

Zhang K, Nicholson AW (1997) Regulation of ribonuclease III processing by double-helical sequence antideterminants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 13437-13441

Ziehler WA, Day JJ, Fierke CA, Engelke DR (2000) Effects of 5' leader and 3' trailer structures on pre-tRNA processing by nuclear RNase P. *Biochemistry* **39**: 9909-9916

Ziehler WA, Morris J, Scott FH, Millikin C, Engelke DR (2001) An essential protein-binding domain of nuclear RNase P RNA. *RNA* **7**: 565-575

Zuker M (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* **31**: 3406-3415