



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Importància de la plataforma d'expressió per a la interacció entre l'adenosilcobalamina i el seu ribocommutador de *Klebsiella pneumoniae*

Marc Servera Caldentey

Grau de Química

Any acadèmic 2016-17

DNI de l'alumne: 41571060D

Treball tutelat per Miquel Barceló Oliver
Departament de Química

S'autoritza la Universitat a incloure aquest treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
	X		X	

Paraules clau del treball:

RNA, ribocommutador, adenosilcobalamina, plataforma d'expressió, ITC.

ÍNDIX

RESUM.....	1
1. INTRODUCCIÓ	2
1.1. Àcids nucleics i RNA world.....	2
1.2. Ribocommutadors.....	3
1.3. Cobalamines	7
1.3.1. Proteïna btuB.....	9
1.3.2. Ribocommutadors de B ₁₂	9
1.3.3. Ribocommutador btuB de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	10
2. OBJECTIUS.....	13
3. PROCEDIMENT EXPERIMENTAL.....	14
3.1. Instrumentació	14
3.2. Reactius i materials.....	15
3.3. Disseny del plasmidi.....	16
3.4. Transformació del plasmidi dins cèl·lules químicament competents.....	16
3.5. Obtenció del plasmidi.....	17
3.6. Digestió del plasmidi	17
3.7. Transcripció (producció d'RNA).....	18
3.8. Purificació de l'RNA	19
3.9. Mesures mitjançant ITC	20
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ	21
4.1. Seqüenciació del DNA	21
4.2. Mesures calorimètriques.....	21
5. CONCLUSIONS.....	30

RESUM

Els ribocommutadors són parts del mRNA no codificants que s'uneixen a diferents metabòlits o ions metàl·lics, fet que provoca un canvi conformacional que permet la regulació de l'expressió genètica. Estan constituïts per dos dominis: l'aptàmer (on s'uneix el metabòlit) i la plataforma d'expressió. El ribocommutador *btuB* de *Klebsiella pneumoniae* és el responsable de la introducció de cobalamines dins la cèl·lula, sent una diana interessant per a futurs antibiòtics. En aquest treball es pretén sintetitzar i purificar la seqüència de RNA que no contengui la plataforma d'expressió del ribocommutador *btuB* de *Klebsiella pneumoniae*, i estudiar la seva interacció amb l'adenosilcobalamina, per tal de conèixer la importància de la plataforma d'expressió durant la unió, comparant els resultats experimentals amb els d'altres estudis realitzats.

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Àcids nucleics i RNA world

Des que els Professors James Watson i Francis Crick van dilucidar l'estructura del DNA,¹ sempre s'ha pensat que el flux de la informació genètica es realitzava des del DNA fins a les proteïnes. El "Dogma Central de la Biologia Molecular", enunciat per Crick al 1958² va ser ràpidament acceptat i adoptat per la gran majoria de biòlegs interessats en la síntesi de proteïnes. El flux d'aquesta informació es va limitar des del DNA a l'RNA i de l'RNA a les proteïnes³ (Figura 1).

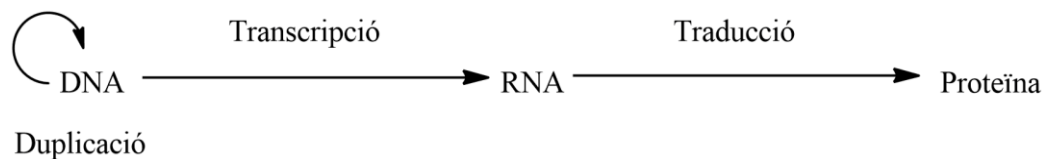


Figura 1. Dogma Central de la Biologia Molecular simplificat.²

Ara bé, a partir de la dècada dels 50, diversos descobriments relacionats amb els denominats virus RNA varen servir com a crítica a aquest dogma, qüestionant el rol exclusiu dels àcids nucleics a l'herència de la informació genètica. Alguns d'aquests descobriments foren l'RNA com a material genètic del virus del mosaic del tabac (TMV)⁴ i la caracterització de la DNA polimerasa dependent d'RNA aïllada del virus del sarcoma de Rous.⁵

La importància de l'RNA no és una novetat. La hipòtesi d'un món primigeni en què tot el material genètic es trobava en forma d'RNA i què, a més, actuava com a catalitzador químic, està bastant acceptada; és l'anomenada hipòtesi de l'*RNA world*.⁶ La principal evidència que reforça la idea de l'*RNA world* ve de les funcions de l'RNA a cèl·lules no primitives; aquestes són considerades fòssils moleculars d'un sistema de vida més primitiu.⁷

Per a què aquest hipotètic món es pogués donar, faria falta una forma de síntesi del primer polímer d'RNA i la seva replicació. Estudis diversos han donat una possible explicació: les petites concentracions de Pb^{2+} o Mg^{2+} presents a l'ambient catalitzaren la condensació de quatre nucleobases activades mitjançant un grup imidazol enllaçat al fosfat, per formar un conjunt d'oligòmers d'RNA a la fase eutèctica del gel, a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Per tal d'allargar aquesta cadena mitjançant una reacció no enzimàtica, pot actuar el mateix parell Pb^{2+}/Mg^{2+} del medi aquós com a catalitzadors.

El darrer pas per l'inici de l'*RNA world* seria la unió de dos oligòmers prèviament formats. Tot i que la unió requereix la formació de dobles cadenes, s'ha demostrat en experiments al laboratori que els oligonucleòtids que contenen 2',3'-fosfats cíclics s'uneixen immediatament

¹ J.D. Watson, F.H.C. Crick, *Nature* 171, 737-738 (1953).

² F.H.C. Crick, *Symp. Soc. Exp. Biol.* XII, 193-163 (1958).

³ J.D. Watson, *Molecular Biology of the Gene*, W. A. Benjamin, New York (USA) 1965.

⁴ H. Fraenkel-Conrat, *J. Am. Chem. Soc.* 78, 882-883 (1956).

⁵ D. Baltimore, *Nature* 226, 1209-1211 (1970).

⁶ W. Gilbert, *Nature* 319, 618 (1986).

⁷ D.C. Jeffares, A.M. Poole, D. Penny, *J. Mol. Evol.* 46, 18-36 (1998).

amb Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} i Pb^{2+} . És un cop completades aquestes tres passes, que la mida dels oligòmers formats ja és suficient per formar ribozims, sent aquest el requisit indispensable per pensar amb la possibilitat de l'*RNA world*.⁸

1.2. Ribocommutadors

Tot ésser viu en general, i les cèl·lules en particular, són molt sensibles al subministrament de nutrients i a l'estrès, tenint la necessitat de mantenir el perfecte balanç, la homeòstasi, de tots els metabòlits, macromolècules biològiques i ions metàl·lics dins dels límits adequats per a cada organisme.

La naturalesa ha desenvolupat diversos mecanismes per tal de mantenir aquest delicat equilibri en els nivells de concentració adequats per la vida. Quasi sempre són les proteïnes les encarregades del transport de molècules a través de la membrana i dins el citoplasma, així com el posterior ús d'aquests metabòlits. Ara bé, també l'activitat d'aquestes proteïnes necessita estar regulada específicament.

L'RNA, a més de tenir com a funció el traspàs de la informació genètica des del DNA fins a les proteïnes,⁹ presenta una gran quantitat de funcions, descobertes en les darreres dècades, dels RNAs no codificants,¹⁰ entre els quals es troben els ribocommutadors, que representen una elegant forma de regulació.^{11,12}

Els ribocommutadors (*riboswitches*, en anglès) es defineixen com a seqüències altament estructurades d'entre 35 i 250 nucleòtids (tot i que ja n'hi ha algunes més llargues) que es troben a l'extrem 5'-UTR (*untranslated region*, regió no traduïda) de certs mRNA, i tenen com a funció la regulació de l'expressió gènica.¹³ Els ribocommutadors exerceixen el seu poder regulador quan a ells s'hi uneix un metabòlit, provocant un canvi conformacional a la seva estructura secundària i terciària que altera l'expressió del gen que codifica la resta del mRNA. Es tracta, per tant, d'elements que actuen en *cis* per controlar l'expressió de la seqüència codificant.^{14,15}

La unió d'aquests metabòlits (que poden ser de naturalesa molt diversa) als ribocommutadors es produeix de forma altament específica i amb elevada afinitat, fet que pot resultar sorprenent si pensem que l'RNA està format per la combinació d'únicament 4 bases nitrogenades diferents, adenina (A), citosina (C), guanina (G) i uracil (U), unides al carboni 1' d'una ribosa amb un grup fosfat a la posició 5'. Els ribocommutadors interaccionen amb els metabòlits per mitjà de les riboses i aquestes nucleobases.

El canvi conformacional que el metabòlit provoca, genera una cavitat que resulta extremadament específica, amb la capacitat de discriminar entre anàlegs estructurals molt similars. És per això que cada part del lligand és directament reconeguda per enllaços

⁸ J. Palou-Mir, M. Barceló-Oliver, R.K.O. Sigel, *Metal Ions in Life Sciences* 17, 403-434 (2017).

⁹ J. Barciszewski, B. Frederic, C. Clark, *RNA biochemistry and biotechnology*, Springer, 1999.

¹⁰ R.W. Carthew, E.J. Sonthelmer, *Cell* 126(4), 642-655 (2009).

¹¹ W.C. Winkler, *Nature* 419, 952-956 (2002).

¹² W.C. Winkler, *PNAS-USA* 99, 15908-15913 (2002).

¹³ B.J. Tucker, R.R. Breaker, *Curr. Op. Struct. Biol.* 15, 342-348 (2005).

¹⁴ C.A. Wakeman, W.C. Winkler and C.E. Dann, *Trends in Biochemical Sciences* 32, 415-424 (2007).

¹⁵ A.G. Vitreschak et al., *Trends Genetics* 20, 44-50 (2004).

d'hidrogen amb les bases o les riboses, fet que justifica de forma parcial l'elevada afinitat per el compost.

Per altra banda, la inaccessibilitat del dissolvent al lloc d'unió entre el lligand i l'RNA implica que l'aptàmer ha d'adoptar una forma oberta i amb certa flexibilitat que permeti l'accés del lligand a la cavitat. A continuació, es produeix un canvi conformacional que tanca la cavitat i encapsula el lligand. Aquest mecanisme d'unió a l'aptàmer s'anomena ajustament induït i és un fet comú a les reaccions en què un metabòlit s'uneix a l'RNA.¹⁶

Per tant, els ribocommutadors necessiten constituir estructures moleculars amb una complexitat suficient com per poder dur a terme aquestes dues funcions: reconeixement molecular i canvi conformacional. L'estructura més bàsica és la coneguda i estudiada doble hèlix, similar a la que es troba al DNA, tot i que se sap que molts RNAs no necessiten establir interaccions entre parells de bases tipus Watson-Crick, podent formar altres tipus d'estructures. Un exemple és la formació de forquilles, compostes per hèlixs i *loops*. A RNAs de mida més gran, les hèlixs i les forquilles s'empaqueten juntament formant patrons específics, com les *3 way (Y) junction* o les *4 way junction*, formant així l'estructura terciària.¹⁶

El metabòlit que provoca el canvi conformacional està relacionat de forma més o menys directa amb el gen codificant del mRNA. Un clar exemple és el que s'ha realitzat en aquest treball, en què s'ha estudiat la interacció del coenzim B₁₂ amb el ribocommutador *btuB* (realment, només amb una part d'aquest), degut a que és aquest el gen que codifica la proteïna transportadora de Vitamina B₁₂.¹⁷

Pel que fa a l'estructura d'aquestes seqüències d'RNA, hi podem distingir dues parts funcionals diferents.^{18,19}

- a) Aptàmer: és la zona a la qual es produeix la unió amb el metabòlit. És la part dels ribocommutadors més conservada durant l'evolució.²⁰ La unió entre el metabòlit i el ribocommutador es produeix degut a que aquest adopta una estructura tridimensional compacta formant una cavitat, on s'hi pot col·locar el lligand en qüestió, capaç de reconèixer de forma altament selectiva entre metabòlits semblants (mitjançant enllaços d'hidrogen) per donar una adequada resposta.
- b) Plataforma d'expressió: és la zona immediatament anterior a la informació genètica. Un cop el metabòlit ha estat reconegut per l'aptàmer, es produeix la unió i la posterior interacció entre els dos dominis mitjançant l'aparellament de bases. És aquesta interacció la que aconsegueix la regulació dels diferents processos. La plataforma d'expressió i l'aptàmer comparteixen una regió coneguda com a seqüència de commutació, que s'encarrega de dirigir el plegament que sofrirà l'RNA i, en conseqüència, la modificació estructural que interferirà a la regulació del gen. En aquest

¹⁶ A. L. Edwards and R.T. Batey, *Nature Education* 3(9): 9 (2010)

¹⁷ S. Gallo, Tesi doctoral, Universitat de Zürich (2009).

¹⁸ F. Aboul-ela, W. Huang, M. Abd Elrahman, V. Boyapati and P. Li, *WIREs RNA* 6, 631–650 (2015).

¹⁹ L. Bastet, A. Dubé, E. Massé and D.A. Lafontaine, *Molec. Microb.* 80, 1148-1154 (2011).

²⁰ J.E. Barrick and R.R. Breaker, *Genome Biology* 8, R239 (2007).

estudi s'intenta estudiar la rellevància que té aquest domini del ribocommutador, i si afecta o no a la unió d'aquest amb el seu metabòlit natural.

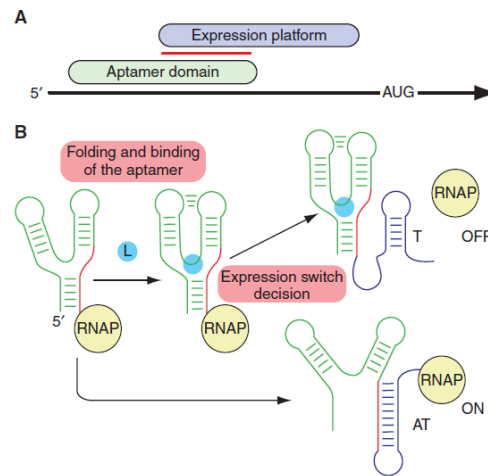


Figura 2. Organització i mecanisme d'un ribocommutador típic. (A) Elements estructurals dels ribocommutadors. Hi ha una regió de la seqüència (vermell) que forma part tant de l'aptàmer (verd) com de la plataforma d'expressió (violeta). (B) Durant la transcripció, el lligand (L, blau) s'uneix a l'aptàmer. L'RNA adopta un o altre plegament de la plataforma d'expressió, regulant així l'expressió gènica.²²

Els ribocommutadors poden actuar a través de diversos mecanismes de regulació,^{21,22} activant o reprimint determinats gens, tot depenent de la seqüència del propi ribocommutador. A continuació, s'expliquen els dos més comuns:

- Inhibició prematura de la transcripció:** es produeix quan el metabòlit s'uneix al ribocommutador i causa canvis conformacionals a la plataforma d'expressió a més de a l'aptàmer. Generalment, els ribocommutadors que actuen seguint aquest mecanisme controlen la formació d'un *loop* d'aparellament intrínsec al mateix extrem 5'-UTR, estabilitzat per aparellament de bases, que provoca l'alliberament de la cadena de DNA motlle per part de l'*RNA polimerasa* i causa la terminació prematura de la síntesi del mRNA (Figura 3a). Ara bé, també hi ha casos en què la regulació es dona mitjançant l'activació del gen degut al segrest del *loop* de terminació quan s'hi uneix el metabòlit (Figura 3c).
- Regulació a nivell de traducció del mRNA a proteïna:** la unió del metabòlit al ribocommutador produeix un canvi conformacional a l'aptàmer i al primer fragment de la plataforma d'expressió. Durant aquest canvi conformacional, es genera un *pseudoknot* que fa que la zona d'enllaç del ribosoma, RBS (*Ribosome Binding Site*), quedi segrestada a una zona aparellada que impedeix la unió del ribosoma al mRNA i, per tant, s'inhibeix la producció de proteïnes (Figura 3b). Com en el cas anterior, també es pot donar aquest mecanisme per l'activació del gen quan la unió del metabòlit provoca l'estabilització del *pseudoknot* amb la zona antisequestadora, deixant el RBS lliure i activant la traducció de la proteïna (Figura 3d).

²¹ E. Nudler and A.S. Mironov, *Trends in Biochemical Sciences* 29, 11-17 (2004).

²² A.D. Garst, A.L. Edwards & R.T. Batey a J.F. Atkins, R.F. Gestelnd & T.R. Cech (Eds), *RNAs Worlds: From life's origins to diversity in gene regulation*, Cold Spring Harbor laboratoty press, 79-91 (2011), New York

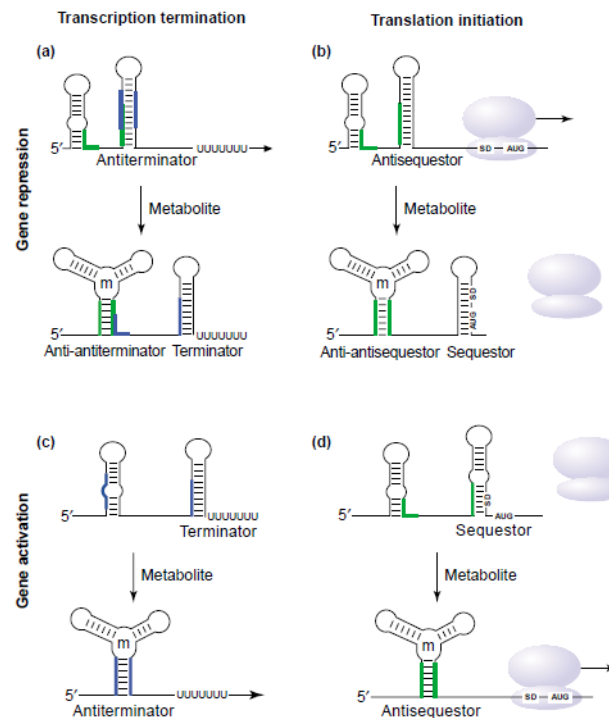


Figura 3. Mecanismes de control de l'expressió gènica produïts pels ribocommutadors. Els ribocommutadors activen o reprimeixen gens depenent de la conformació que adopten. En resposta al canvi de concentració de metabòlit controlen la terminació de la transcripció (a, c) o l'inici de la traducció (b, d), o ambdós si l'estructura del *loop* de terminació també serveix com a segrestador del RBS. En cada cas, la unió del metabòlit (m) provoca un canvi conformacional a l'estructura, finalitzant la transcripció (a) o activant-la (c), o també segrestant la regió RBS (b) o alliberant-la (d).²¹

Hi ha ribocommutadors que tenen capacitat per reconèixer com a metabòlit a espècies que es troben carregades negativament. Pensant què, globalment, l'RNA és un polianió, cal tenir present la gran importància dels ions Mg^{2+} , essencials per l'estabilització de l'estructura de l'RNA i per la neutralització de les repulsions.

Avui dia es coneixen un gran nombre de ribocommutadors, havent-hi fins a 16 sistemes caracteritzats que actuen com a tal, responen a metabòlits de naturalesa diversa, tals com: nucleobases d'adenina, guanina, hipoxantina, pre-queosina i di-GMP cíclic; alguns aminoàcids com la lisina, la glutamina i la glicina i altres cofactors com Mg^{2+} , adenosilcobalamina (AdoCbl), tiamina pirofosfat (TPP), glucosamina-6-fosfat (GlcN₆P), tetrahidrofolat (THF) i S-adenosilmetionina (SAM). En els darrers anys, s'ha proposat un nou ribocommutador que respon al MoCo (cofactor de molibdè), entre altres que encara no tenen cap metabòlit assignat i sobre els quals s'estan realitzant nous estudis.^{23,24}

Els ribocommutadors s'han conservat com a mecanisme de regulació de l'expressió gènica al llarg de l'evolució, ja que hi ha certes classes de ribocommutadors com els de TPP o AdoCbl àmpliament distribuïts.²³ Encara que és cert que la velocitat en què el lligand s'uneix al metabòlit ha de ser elevada per tal de que es produeixi el *switch* abans que l'RNA polimerasa

²³ R.R. Breaker a J.F. Atkins, R.F. Gestelnd & T.R. Cech (Eds), *RNAs Worlds: From life's origins to diversity in gene regulation*, Editorial Cold Spring Harbor laboratoty press, 63-77, (2011).

²⁴ M. Giedyk, K. Golszewska and D. Gryko, *Chem. Soc. Rev.* 44, 3391-3404 (2015).

s'uneixi al mRNA, el cost energètic és menor pel fet que la regulació gènica a nivell d'RNA estalvia la síntesi de proteïnes.

Una de les aplicacions més prometedores d'aquestes seqüències de mRNA és el seu ús com a diana per a nous antibiòtics. En els darrers 30 anys només s'ha desenvolupat un nou tipus d'antibiòtics, i avui dia, ja és evident que cada cop són més els bacteris amb resistència als antibiòtics, i és fa patent la necessitat d'actuar sobre alguna altra diana, a part d'alterar un dels quatre processos vitals dels bacteris.²⁵ És en aquest punt en què l'elevada especificitat dels ribocommutadors i la seva capacitat de regulació de l'expressió gènica, a més de la seva presència gairebé exclusiva a organismes procarïotes, com els bacteris, fa que aquests siguin una excel·lent diana a la investigació de nous antibiòtics. Es poden usar anàlegs estructurals als metabòlits naturals per bloquejar els ribocommutadors dels organismes patògens i, d'aquesta manera, interferir a la seva expressió gènica. De fet, s'ha confirmat que alguns fàrmacs actuals actuen a nivell de ribocommutadors, com són la piritiamina pirofosfat (DTPP) que actua sobre el ribocommutador de TPP, inhibint l'expressió del gen de TPP a l'organisme patògen, la roseoflavina, que actua sobre el ribocommutador de FMN i també la L-aminoetil cisteïna (AEC) i la L-4-oxalisina, que actuen sobre el ribocommutador de la lisina, inhibint la síntesi d'aquests aminoàcids i impeding el creixement del bacteri.^{26,27,28}

1.3. Cobalamines

Tot i que el cobalt és un dels elements menys abundants a la litosfera, és un element que realitza diverses funcions biològiques molt específiques, juntament amb altres que comparteix amb altres metalls.²⁹

El terme cobalamines fa referència a la família de composts de cobalt derivats de la vitamina B₁₂ o cianocobalamina, que es diferencien segons la naturalesa del seu lligand apical superior. Aquests enzims estan presents des d'*Archaea* fins humans, i no es troben presents en plantes. Duen a terme una gran varietat de funcions dins l'organisme:³⁰

- Transferència del grup metil en processos de metagènesi a *Archaea*, cetogènesi a bacteris anaeròbics i síntesi de metionina a bacteris i mamífers.
- Generació del radical deoxiadenosil, que catalitza la reducció de ribonucleòtids i reordenaments d'aminoàcids a bacteris i de metilmalonil coenzim A a bacteris i també a mamífers.
- Eliminacions mitjançant diol deshidratasa i etanolamina amoni liasa.

La vitamina B₁₂ va ser descoberta gràcies a estudis relacionats amb l'anèmia perniciosa l'any 1926. Després que Minot i Murphy³¹ descobrissin els beneficis de consumir grans quantitats de fetge, van intentar aïllar el principi actiu, que es trobava en concentracions de 1 ppm. Es va

²⁵ U. Theuretzbacher and J.H. Toney, *Curr. Opin. Investig. Drugs* 7, 158-166 (2006).

²⁶ N. Sudarsan, S. Cohen-Chalamish, S. Nakamura, G.M. Emilsson & R.R. Breaker, *Chem. Biol.* 12, 1325-1335 (2005).

²⁷ E. Cressina, L. Chen, C. Abell, F.J. Leeper & A.G. Smith, *Chem. Sci.* 2, 157-165 (2011).

²⁸ K.F. Blount & R.R. Breaker, *Nat. Biotechnol.* 24, 1558-1564 (2006).

²⁹ J. S. Casas, V. Moreno, A. Sánchez and J. Sordo, *Química Bioinorgánica*, Editorial Síntesis, Madrid, 2002.

³⁰ J. I. Toohey, *BioFactors* 26, 45-57, (2006).

³¹ G.R. Minot & W.P. Murphy, *J. Am. Med. Assoc.* 87, 470-476, (1926).

aconseguir aïllar al 1948, anomenant-se factor anti anèmia perniciosa o vitamina B₁₂.³² L'anàlisi química va donar com a resultat la identificació d'una part nucleotídica, l'existència d'un grup pirrol i de cianur. El 1957, Dorothy Crowfoot Hodgkin en resol l'estructura de Raigs X. En la mateixa època, H.A. Barker aïlla el coenzim B₁₂, un compost que en ser tractat amb cianur donava la vitamina B₁₂. El 1962, Hodgkin resol també l'estructura del coenzim B₁₂ (premi Nobel Química 1964).³³

Estructuralment, les cobalamines tenen un tetrapirrol similar a la porfirina (amb un àtom de carboni menys i un sistema π menys ric en electrons), la corrina, que coordina el cobalt mitjançant els 4 nitrògens. El fet que tengui el sistema π menys estès ajuda a estabilitzar l'enllaç Co-C i, a més, resisteix l'acció reductora dels estats d'oxidació baixos del cobalt, com el Co(I). L'anell de corrina conté 7 substituents de tipus propanamida i 8 substituents de tipus metil als anells, que donen un major caràcter hidrofílic a la molècula i que faciliten la unió d'aquesta amb la proteïna. Un dels substituents propanamida està unit a una ribosa fosforilada a la posició 3' mitjançant un enllaç α -sucre-nucleòtid, essent aquest nucleòtid el 5,6-dimetilbenzimidazol (*dmbim*). El *dmbim* bloqueja la sisena posició de coordinació del cobalt, originant la conformació de *base on*; per contra, quan el *dmbim* es troba desplaçat (per algun aminoàcid d'una proteïna o bé per una altra base nitrogenada, en el cas de la unió de la cobalamina a un àcid nucleic) tenim la conformació de *base off*.³⁴

Pel que fa a la cinquena posició de coordinació del cobalt, pot estar ocupada per diferents substituents de naturalesa molt diversa, donant lloc a les diferents espècies que formen la família de les cobalamines (Figura 4). Si aquest substituent és una adenosina unida pel carboni 5', formant un enllaç Co-C, tenim l'adenosilcobalamina (AdoCbl), també anomenat coenzim B₁₂ (formant un compost de tipus organometàl·lic molt sensible al llum). Si en lloc d'adenosina tenim un metil (formant també un enllaç Co-C sensible al llum), ens trobam amb la metilcobalamina (MeCbl). Són aquestes dues cobalamines les actives als organismes, formant part dels centres actius de diverses proteïnes.

Ara bé, també formen part de la família de les cobalamines altres espècies inactives, però que si són absorbides i transportades dins els organismes, com la cianocobalamina o vitamina B₁₂, l'aquocobalamina (H₂O-Cbl) i la hidroxocobalamina (HO-Cbl) depenent de si el cinquè substituent és un grup cianur (CN⁻), una molècula d'aigua o un grup hidroxil respectivament.

Per tal de complir amb el principi d'electroneutralitat, les cobalamines són composts amb cobalt amb estat d'oxidació +III, ja que l'anell de corrina (desprotonat) aporta una càrrega negativa, igual que el radical R i el grup fosfat, tenint en total, un còmput de tres càrregues negatives. Per tant, les cobalamines són complexos octaèdrics de Co(III) de baix espí.

³² E.L. Rickes, N.G. Brink, F.R. Koniuszy, T.R. Wood & K. Folkers, *Science* 107, 396-397, (1948).

³³ C. Brink, D.C. Hodgkin, J. Lindsey & J. Pickwort, *Nature* 174, 1169-1171, (1954).

³⁴ K. Gruber, B. Puffer and B. Kräutler, *Chem.Soc.Rev.* 40, 4346-4363, (2011).

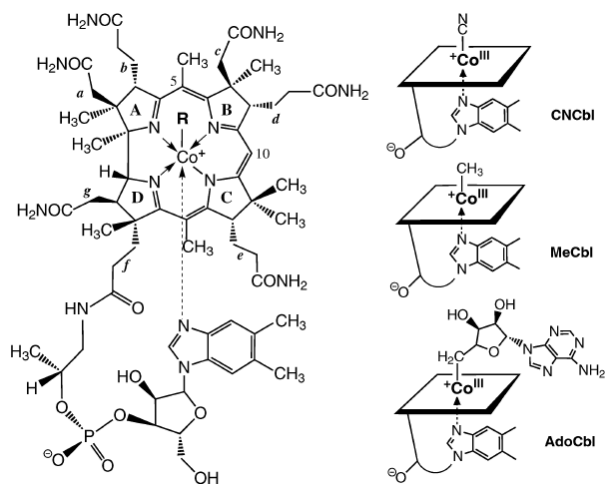


Figura 4. Estructura de diferents cobalamines: Vitamina B₁₂ (R = CN, cianocobalamina, CNCbl), metilcobalamina (R = CH₃, MeCbl) i coenzim B₁₂ (R = 5'-deoxi-5'-adenosil, adenosilcobalamina, AdoCbl). S'anomenen de A a D els anells de pirrol de l'anell de corrina, així com també els substituents (a-g) i s'enumeren els àtoms de l'anell.³⁴

1.3.1. Proteïna *btuB*

Alguns tipus de bacteris, com els Gram-negatius, compten amb sistemes de transport actiu especialitzats que tenen com a funció el transport de cofactors organometàl·lics, com les cobalamines, a través de les seves membranes, ja que aquestes són massa grans com per difondre-hi a través dels seus porus. El transport dels corrinoïdes depèn del *B-twelve-uptake* (*btu*). El *btu* està compost per dos transportadors diferents: un encarregat del transport a través de la membrana externa, anomenat transportador *btuB*, i l'altre transportador que controla el trànsit de la membrana interna requerint energia, anomenat transportador *btuC₂D₂F*.³⁵

La síntesi de la proteïna *btuB* depèn de la disponibilitat dels seus substrats, i pertany a la classe de proteïnes de transport actiu, associada al *TonB*. L'energia per a realitzar el transport de cobalamines es deu a la generació d'un potencial de protons de la membrana interna per l'acoblament a la proteïna *TonB* a través d'una seqüència altament conservada, la *Ton-box*.³⁶

1.3.2. Ribocommutadors de B₁₂

El primer ribocommutador que es va descobrir que interaccionava directament amb un metabòlit cel·lular en absència de proteïnes va ser la seqüència corresponent al coenzim B₁₂, regulat pel gen *btuB* de *Escherichia coli*.³⁷

La família de ribocommutadors de cobalamines (també anomenats ribocommutadors de B₁₂) es classifica en dos grups, uns relacionats amb l'expressió del gen *btuB* i altres relacionats amb processos de fermentació de l'etanolamina. El primer grup es divideix en dos subgrups, segons si al ribocommutador s'hi uneix l'adenosilcobalamina o l'aquocobalamina, tenint en comú un mateix nucli, molt conservat evolutivament. Els ribocommutadors que responen a l'aquocobalamina solen estar presents en organismes marins, ja que hi ha una major quantitat

³⁵ K. Gruber, B. Puffer i B. Kräutler, *Chem. Soc. Rev.*, 40, 4346-4363, (2011).

³⁶ D. P. Chimento, R. J. Kadner and M. C. Wiener, *J. Mol. Biol.* 332, 999-1014. (2003).

³⁷ M.D. Lundrigan, R.J. Koster, R.J. Kadner, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 1479-1483 (1991).

d'aigua que no en el medi terrestre. A més, la radiació que arriba permet rompre l'enllaç entre el cianur (de la vitamina B₁₂) i el cobalt, tenint com a resultat evolutiu la unió del cobalt a l'aigua.

Les dues subclasses de ribocommutadors relacionats amb l'expressió de *btuB* presenten un centre on hi conflueixen quatre hèlixs (P3 – P6 a la Figura 5), que es considera el lloc d'unió de les cobalamines. L'altre element que comparteixen és una interacció *kissing-loop* (KL) entre el *loop* L5 de l'aptàmer i el L13 de la plataforma d'expressió. Pels ribocommutadors de B₁₂ que regulen la traducció, el RBS sol estar al L13. Les diferències que existeixen entre les dues classes són la diferència entre la presència d'una extensió perifèrica P6 a una classe (AdoCbl, majoritari entre la família de ribocommutadors de B₁₂) i l'absència de la mateixa a l'altra (AqCbl), així com una altra extensió entre P1 i P3.³⁸

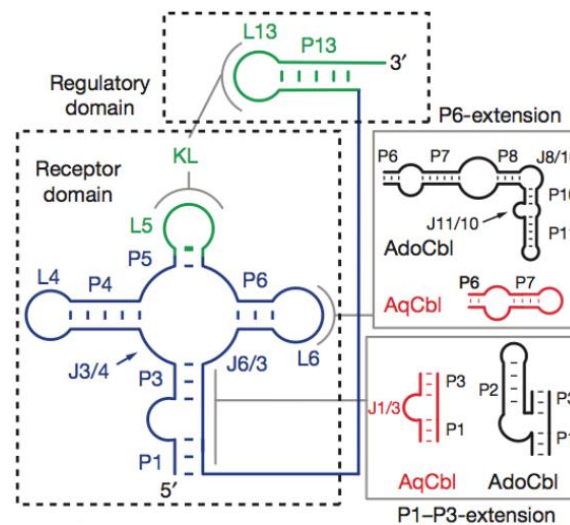


Figura 5. Estructura secundària de la família dels ribocommutadors de cobalamines. La part conservada es mostra en blau, la interacció KL en verd, i les extensions perifèriques que distingeixen les dues classes en negre (AdoCbl) i vermell (AqCbl).³⁸

Diferents anàlisis filogenètics han indicat que els ribocommutadors del coenzim B₁₂ es troben àmpliament distribuïts tan a bacteris Gram-positius com a Gram-negatius. Generalment, els gens baix el control d'aquests ribocommutadors es troben involucrats en el transport de cobalamines, o associats a la ruta biosintètica del coenzim. Hi ha parts de la seqüència d'aquests ribocommutadors es troba molt conservada evolutivament parlant, com l'anomenada *B₁₂-box*, necessària pel reconeixement del metabòlits, o l'anti-RBS, involucrat en la regulació de la traducció.³⁹

1.3.3. Ribocommutador *btuB* de *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae és un bacteri immòbil del tipus Gram-negatiu que es troba com a resident al tracte gastrointestinal i al sistema respiratori humà. És una causa important de malalties humanes, sobretot a individus immunocompromesos i pacients de llarga estància a

³⁸ J. E. Johnson Jr., F. E. Reyes, J. T. Polanski and R. T. Batey, *Nature* 492, 133-138 (2012).

³⁹ J. Palou-Mir, A. Musiari, R.K.O. Sigel, M. Barceló-Oliver, *J. Inorg. Bio.* 160, 106-113 (2016).

hospitals. És un patogen oportunista causant d'una varietat d'infeccions respiratòries com la pneumònia, del tracte urinari, ferides, septicèmia i meningitis.⁴⁰

Aquest patogen presenta, com molts altres bacteris, un ribocommutador que regula l'expressió del gen *btuB*. Aquest gen codifica la proteïna amb la qual comparteix nom. La seqüència del ribocommutador (que està formada per 243 nucleòtids) s'enllaça a l'adenosilcobalamina amb una elevada afinitat, gràcies al reconeixement entre l'aptàmer i el metabòlit mitjançant la identificació del mateix per interaccions tipus enllaç d'hidrogen i apilaments hidròfobs (*stacking*).³⁸ Com a conseqüència d'aquesta interacció es produeix un canvi conformacional en l'estructura de l'RNA, que modifica els aparellaments de les bases que el conformen, permetent la interacció entre les zones anti-RBS i RBS, segregant així la zona d'unió al ribosoma, presentant la forma *gene-off* (Figura 6a), en què es produeix la inhibició de la traducció.

Ara bé, quan no hi ha derivats de cobalamines, el ribocommutador es troba amb la forma *gene-on*, en què no es produeix interacció entre el metabòlit i l'aptàmer, quedant la zona RBS lliure, degut a l'aparellament de la regió anti-RBS i anti-anti-RBS (*sequestor-antisequestor stem* a la Figura 6b), fent possible la unió dels ribosomes a l'RNA i, conseqüentment, el procés de traducció.

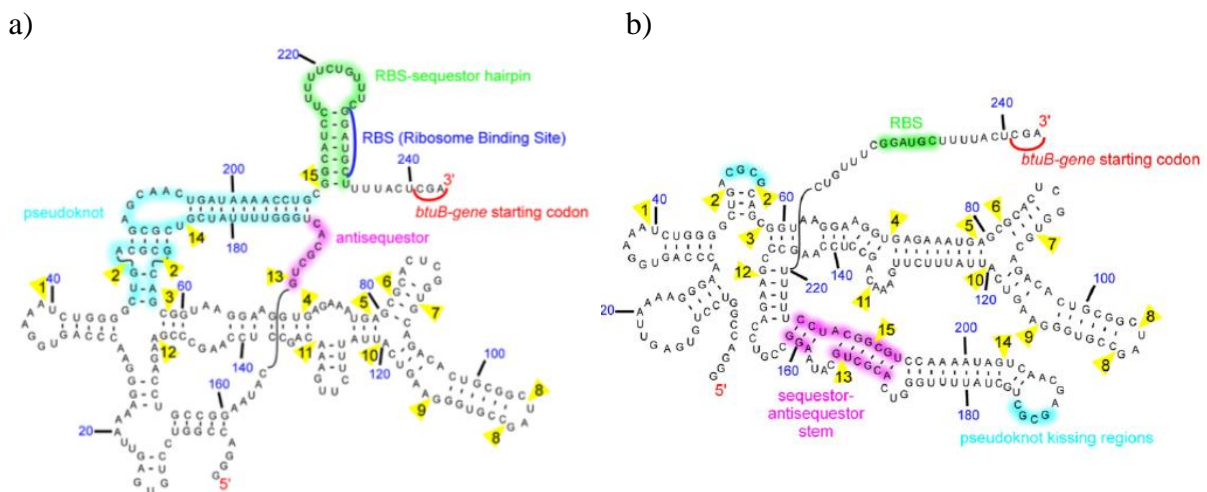


Figura 6. Estructura secundària proposada per la conformació *gene-off* (a) quan el coenzim B₁₂ es troba unit, del ribocommutador B₁₂ de la *Klebsiella pneumoniae*, així com també de la conformació *gene-on* (b), quan el coenzim B₁₂ no es troba unit.³⁹

Els estudis de la interacció del ribocommutador de *E.coli* amb diversos derivats de cobalamina han fet possible determinar les interaccions més importants entre la cobalamina i l'RNA. S'ha vist que les interaccions que es produeixen entre els substituents de la propanamida de l'anell de corrina i l'RNA són essencials pel *switch* (canvi de *gene-on* a *gene-off*) mentre que els lligands axials augmenten l'afinitat, però no tenen cap influència sobre el plegament de l'aptàmer. També s'ha comprovat que no és del tot important si la cobalamina es troba en forma *base-on* o *base-off*.⁴¹

⁴⁰ W-C. Ko, D.L. Paterson et al. *EID Journal* 8 (2), 160-166 (2002).

⁴¹ S. Gallo, M. Oberhuber, R.K.O. Sigel & B. Kräutler, *ChemBioChem* 9, 1408-1414 (2008).

A més, mitjançant estudis *in-line probing*, s'ha pogut determinar que és l'anell de corrina, i no els seus lligands axials, el que provoca la reestructuració de l'aptàmer del *btuB* gen.

La valoració calorimètrica isoterma (ITC, *isothermal titration calorimetry* en anglès) és una tècnica que ha permès determinar els paràmetres termodinàmics de molts processos biològics d'associació, com la interacció entre proteïna-proteïna, proteïna-l·ligand, proteïna-DNA... Aquesta és l'única tècnica amb capacitat suficient com per mesurar de manera directa l'energia d'unió a aquests processos (ΔG , ΔH , K_D , n...)

La ITC ha estat una eina importantíssima en l'estudi de proteïnes, però no ha estat pràcticament utilitzada en estudis d'àcids nucleics. En aquest present estudi si que s'ha utilitzat, gràcies a la capacitat per mesurar els paràmetres termodinàmics de la unió entre l'adenosilcobalamina i l'aptàmer del ribocommutador *btuB*.

Per tal de mesurar els paràmetres termodinàmics com l'entalpia, entropia, energia de Gibbs, etc., l'instrument mesura la quantitat d'energia necessària per mantenir la temperatura constant a la mostra i la cel·la de referència mentre es va addicionant el valorant a la mostra, mitjançant una microxeringa amb agitació, tal i com es pot observar a la Figura 7.⁴²

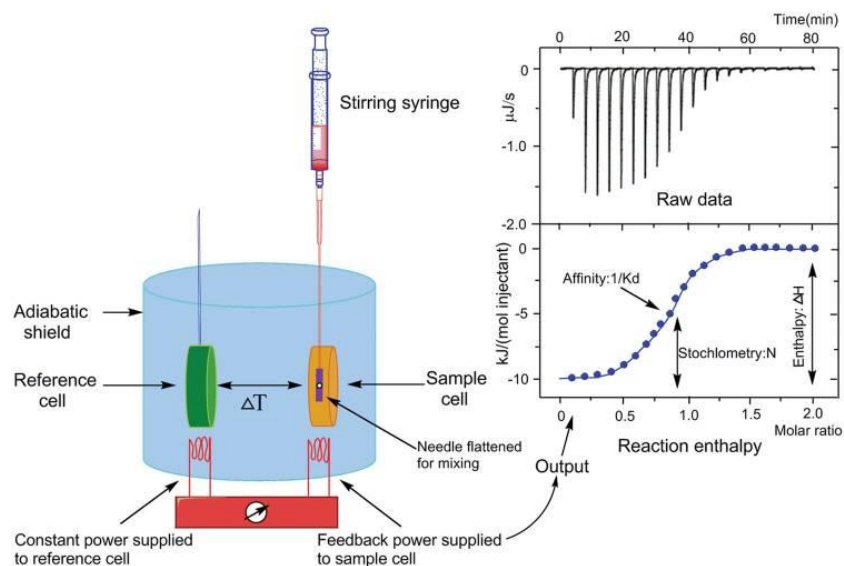


Figura 7. Esquema del funcionament de la ITC i exemple dels resultats que s'obtenen. La microxeringa va addicionant el valorant i es calcula l'energia necessària que s'ha d'aplicar o absorbir per tal de mantenir les dues cel·les a igual temperatura. La integració dels pics representa el calor que s'ha aplicat o absorbit.⁴³

Gràcies a aquesta tècnica, s'han pogut obtenir les variables termodinàmiques en l'associació de l'adenosilcobalamina amb el ribocommutador *btuB* tant de *E.coli* com de *K.pneumoniae*. S'ha trobat el valor de $K_D = 250 \pm 40 \text{ nM}$ ⁴⁴ pel ribocommutador de *E.coli*, comparable amb el de *K.pneumoniae*: $210 \pm 8 \text{ nM}$ a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ i $530 \pm 57 \text{ nM}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.³⁹

⁴² Andrew L. Feig, *Biopolymers* 87 (5-6), 293-301 (2007).

⁴³ C. Song, S. Zhang, H. Huang, *Front. Microbiol.* 6, 1049 (2015).

⁴⁴ James E. Johnson Jr, Francis E. Reyes, Jacob T. Polaski & Robert T. Batey, *Nature* 492, 133-138 (2012).

2. OBJECTIUS

L'objectiu general d'aquest treball és:

1. Estudiar la importància de la plataforma d'expressió a la interacció entre el ribocommutador *btuB* de *Klebsiella pneumoniae* i el seu metabòlit natural, l'adenosilcobalamina, mitjançant tècniques calorimètriques.

Els objectius específics són:

- 1.1. Sintetitzar la seqüència correcta d'RNA a partir del plasmidi pMB01 i purificar-la mitjançant transcripció *in vitro*.
- 1.2. Estudiar la interacció entre l'adenosilcobalamina i el ribocommutador *btuB*, usant una seqüència que no contengui la plataforma d'expressió.
- 1.3. Realitzar mesures de diferents paràmetres termodinàmics per estudiar la interacció entre el ribocommutador i l'adenosilcobalamina mitjançant la tècnica calorimètrica ITC a quatre temperatures diferents, per tal de poder analitzar la variació d'aquests paràmetres amb la temperatura.
- 1.4. Comparar els resultats amb altres estudis realitzats amb seqüències de *Klebsiella pneumoniae* que contenen els dos dominis del ribocommutador, per tal de poder conèixer la vertadera importància de la plataforma d'expressió a la unió del metabòlit al ribocommutador.

3. PROCEDIMENT EXPERIMENTAL

3.1. Instrumentació

El cultiu de bacteris es realitza en instal·lacions de bioseguretat autoritzades (laboratori QI-114). La incubació de les mostres tant per la digestió del plasmidi com per la transcripció de l'RNA es duen a terme amb Thermomixer Confort de Eppendorf, i pel xoc tèrmic s'utilitza un Heat Block de VWR.

Per la centrifugació de les mostres s'utilitzen les centrifugues refrigerades 5810R, amb rotors F45-6-30 (angle fix 45°, per a 6 tubs de 50 ml) i S-4-104 (oscil·lant, per a botelles de fins 750 ml o tubs de 15 i 50 ml), i 5415R amb rotor F45-24-11 (angle fix 45°, per a 24 tubs de 1.5-2 ml), de Eppendorf. També s'usa un concentrador Vacuum Concentrator Plus de Eppendorf.

Per mesurar la concentració de les mostres i la dispersió òptica (OD_{600}) dels cultius s'utilitza un espectrofotòmetre Ultrospec 700 de GE Healthcare Life Sciences, usant una cubeta de quars de 100 μ L i 1 cm de pas òptic de Hellma Analytics. Els coeficients d'extinció molar per l'RNA es calculen en funció dels coeficients per les bases: A, $\epsilon = 15,4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$; G, $\epsilon = 11,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$; C, $\epsilon = 7,4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$; U, $\epsilon = 9,9 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. En el cas del coenzim B₁₂, van ser utilitzats els següents valors: $\epsilon_{260} = 34700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; $\epsilon_{375} = 10900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; $\epsilon_{522} = 8000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.⁴⁵

Per esterifiltrar les dissolucions s'utilitzen filtres estèrils d'un sol ús, de poliestersulfona (PES) amb 0,2 μ m de porus, amb embut incorporat (Top filtration unit de VWR i Steritop de Merck Millipore) o d'acetat de cel·lulosa (CA) de 0,2 μ m de porus per acoblar a una xeringa (GE Healthcare Life Sciences (abans Whatman)).

Per l'electroforesi, s'usa una font d'alimentació EC 300XL de Thermo Scientific. En el gels d'agarosa s'aplica un potencial de 2,5 V/cm els 10 primers minuts, i de 5 V/cm durant les 2 hores següents. Aquests es poden revelar amb bromur d'etidi dissolt en tampó TAE i visualitzats amb el sistema MiniBIS Pro de DNR Bio-Imaging Systems. Per altra banda, per la purificació d'RNA s'usen gels d'acrilamida de 45x30 cm² i 1,5 mm de gruixa, en els quals s'aplica un potencial de 40 W/gel durant unes 6 hores. Posteriorment es disposen damunt una placa de cromatografia de capa fina (TLC) amb indicador UV i mitjançant una làmpada UV de 254 nm s'observa l'ombra de l'RNA que conté el gel.

Per tal d'extreure l'RNA del gel, s'usa un mètode d'extracció sòlid-líquid, usant un agitador orbital o rotatori VWR Tub Rotator.

Per concentrar les mostres d'RNA, així com per dialitzar les mostres per la valoració calorimètrica, s'usen columnes per a centrífuga amb membrana de separació de polietersulfona Vivaspin 500 de 10000 MWCO (Sartorius Stedim biotech; 500 microlitres)

Finalment, les mesures en els experiments per calorimetria, es realitzen amb un Nano-ITC low volume de TA Instruments, programat per realitzar 17 injeccions (cada una de 3,03 μ L), amb un interval de temps de 300 segons entre cada injecció. Els resultats que s'obtenen s'analitzen amb el software NanoAnalyze, també de TA Instruments.

⁴⁵ Els valors de coeficients d'extinció molar s'extreuen de <http://www.drugfuture.com/chemdata/>.

3.2. Reactius i materials

Els reactius utilitzats han estat adquirits de VWR, Merck, Prolabo, Alfa Aesar, Sigma Aldrich, Applichem i Amresco amb qualitat *p.a.*, *molecular biology*, *biochemica* o superior i han estat usats sense purificacions addicionals. Totes les dissolucions estoc preparades s'autoclaven o esterifiltren abans de ser utilitzades i l'aigua que s'usa és de qualitat Milli-Q, autoclavada i esterifiltrada. Tot el material d'un sol ús que s'usa està esterilitzat i lliure d'RNases i DNases. El material reutilitzable sempre s'utilitza després de ser autoclavat 30 minuts a 121 °C.

Pel creixement dels bacteris d'*Escherichia coli* s'usa medi de cultiu Lysogeny Brothx (LB) de concentració 25 g/L. La dissolució s'autoclava durant 20 min a 121 °C i una vegada ha refredat fins a uns 50 °C s'hi afegeix l'antibiòtic corresponent. Pel que fa al cultiu en plaques de Petri, es prepara el mateix medi de cultiu LB 25 g/L i s'hi afegeixen 15 g/L d'Agar-Agar. De la dissolució autoclavada i amb el corresponent antibiòtic s'aboquen 25 ml de mescla dins cada placa de Petri i es deixa solidificar. Com antibiòtic s'usa ampicil·lina 100 mg/mL, en proporció 1:1000 al medi de cultiu, tenint sempre una concentració final de 100 µg/mL.

La purificació del DNA es duu a terme mitjançant els kits *E.Z.N.A. Plasmid Maxi Kits* de Omega bio-tek. L'enzim *T7-RNA polimerasa* és produït en el mateix grup de recerca. L'enzim de restricció *HindIII* per la linealització del plasmidi de DNA es compra a Fermentas GmbH.

Tots els tampons es preparen amb aigua Milli-Q, i es citen a continuació els usats per ordre alfabètic:

- Crush and Soak Buffer: 10 mM MOPS (pH=6), 1 mM EDTA i 250 mM NaCl. La dissolució s'esterifiltra i es guarda a 4 °C. La botella es recobreix amb paper d'alumini ja que el MOPS és sensible al llum.
- HEPES 1 M (pH=7,5) buffer: Es dissol HEPES en aigua, s'ajusta el pH amb KOH o HCl i s'esterifiltra.
- ITC buffer 10X: 1 M HEPES-KOH (pH=7,5), 1 M KCl i 50 mM MgCl₂.
- R buffer 10X: 100 mM Tris·HCl (pH = 8,5 a 25 °C), 100 mM MgCl₂, 1000 mM KCl i 1 mg/mL BSA. Aquest tampó és comercial, subministrat per la mateixa empresa que subministra l'enzim (Fermentas GmbH).
- TAE (Tris-Acetate-EDTA) buffer 50X: 2 M Tris-acetat; 50 mM EDTA a pH=8.3. Per a preparar el TAE es pesen les quantitats de sals necessàries, s'afegeix l'àcid acètic fins a arribar a pH 8,3 i s'enrasa amb aigua fins al volum final i s'autoclava.
- TBE (Tris-Borat-EDTA) buffer 10X: 890 mM Tris base, 890 mM àcid bòric i 20 mM EDTA a pH=8,3. En aquest cas es tracta d'un preparat comercial de la casa Amresco, degut a que s'usa en grans quantitats.
- TXN buffer 10X: 0,4 M Tris-HCl (pH=7,5), 0,02 M Espermidina i 0,05 M DTT. La dissolució s'esterifiltra, s'aliquota en vials de 1 ml i es guarda a -20 °C.
- ULB (Urea loading buffer) 3X: 23,6 M Urea, 16,7 % Sucrosa, 0,17 % (m/v) Xilè cianol, 0,17 % (m/v) Blau de bromofenol, 83 mM Tris-HCl (pH=7,5) i 1,7 mM EDTA. També s'empra la versió incolora (colorless ULB) 2X, que es compon de 10 M Urea i 1,5 mM EDTA.

Per a la separació de DNA es preparen gels d'agarosa al 1 % en TAE buffer 1X. La mescla s'escalfa al microones fins aconseguir una dissolució transparent i s'aboca al motlle. Per a cada gel s'utilitzen uns 100 ml de dissolució.

Per la separació de l'RNA s'usa un gel 10 % PAGE (Polyacrylamide Gel Electrophoresis) desnaturalitzant: 7 M urea, 10 % acrilamida i 1X TBE. La dissolució s'escalfa fins a la completa dissolució de l'urea i posteriorment s'esterifiltra i guarda a 4 °C. Per a la purificació dels RNAs sintetitzats s'empra una dissolució al 10 % d'acrilamida. Per evitar els efectes nocius de l'acrilamida no es pesa i s'usa una dissolució comercial (Amresco) al 40 % d'acrilamida-bisacrilamida en proporció 29:1.

3.3. Disseny del plasmidi

La seqüència completa del genoma del bacteri *Klebsiella pneumoniae*, subespècie *pneumoniae* de la branca MGH 78578, va ser obtinguda de la base de dades del National Center for Biotechnology Information, corresponent al codi GenBank: CP000647.1. El gen d'interès *btuB* va ser localitzat entre les posicions 4660313-4662169, mentre que la seqüència proposada per actuar com a ribocommutador de cobalamina va ser trobada a la regió sense traduir 5'-UTR, concretament a partir de la posició 4660061.

Al treball de fi de màster de la senyora Joana Palou Mir s'expliquen les modificacions fetes a la seqüència amb finalitats concretes, així com les condicions adequades tant per la digestió del plasmidi com per la posterior transcripció.⁴⁶

Taula 1. Seqüència del plasmidi pMB01 en sentit 5'-3'. En vermell s'indica el promotor de la *T7-RNA polimerasa*. En verd s'indiquen les tres guanines introduïdes per tenir un bon inici de la transcripció, la qual s'inicia després de la TATA box. Finalment, en blau es marca el punt de tall d'interès per l'estudi, la seqüència de restricció per l'enzim *HindIII*.

TAA	TAC	GAC	TCAC	TATA	GGGA	CCGG	TCCT	GTCA	GTTA	AAAG	GGAA
CCCA	GTGG	AAAT	CTGG	GGCT	GACG	CGCA	GCGG	TAAG	GAAG	GTGA	
GAAA	TGAG	CGCA	CTCG	GTGC	AGAC	ACTG	CGGC	TAGC	CGTG	GGAA	
GTCA	TTAT	TTCT	TGAA	ACAG	CCTC	CAAG	CCCG	AAGA	CCTG	CCGG	
AATA	CGTC	GCAC	TGGG	TTTT	ATCG	TCGC	GAGC	AACT	GATA	AAAC	
CTGC	GGCA	AGCT	TTTT	CTGT	TTCG	GATG	CTTT	TACT	CGAG		

3.4. Transformació del plasmidi dins cèl·lules químicament competents

El plasmidi dissenyat s'ha de transformar dins cèl·lules de bacteris *E.coli* químicament competents *DH5- α* . Aquests tipus de cèl·lules tenen la capacitat d'integrar material genètic exogen mitjançant medis químics, en aquest cas el plasmidi d'interès per l'estudi, i créixer amb aquesta informació genètica. Per tal de conferir aquesta capacitat, les cèl·lules es modifiquen químicament mitjançant la utilització de tampons i sals que provoquen un xoc osmòtic, conferint-li una certa porositat a la membrana cel·lular que permet l'entrada del material genètic del plasmidi.

⁴⁶ Joana Palou Mir, *B₁₂-Riboswitch de Klebsiella pneumoniae: estudi de la interacció amb adenosilcobalamina mitjançant in-line probing i calorimetria*, Universitat de les Illes Balears, 2014.

Per dur a terme la transformació, s'agafen 100 µL de bacteris químicament competents i s'hi addicionen 2 µL de plasmidi pMB01, agitant mitjançant cops suaus i incubats en gel durant 10 minuts. Posteriorment s'aplica un xoc tèrmic, sense agitació, durant 3 minuts a 37 °C, deixant de nou en gel durant 3 minuts. Amb aquest procediment s'aconsegueix que el plasmidi difongui cap a dins els bacteris i després tornar de nou a impermeabilitzar les membranes de les cèl·lules. Seguidament, s'hi addicionen 500 µL de medi de cultiu LB i s'incuba la mescla a 37 °C i 400 rpm durant 30 minuts. Es centrifuguen els tubs durant 2 min a 800 rpm i s'elimina part del sobrenedant deixant uns 50 µL dins, per tal de resuspendre les cèl·lules per la posterior sembra en placa. Es sembra una placa Petri de LB-Agar i ampicil·lina, en entorn innocu, amb els 50 µL, repartits homogèniament, i s'incuba tot el vespre a 37 °C.

Després d'unes 20 hores, es compten les colònies de la placa (unes 800) i es seleccionen les que tenen millor aspecte segons els criteris següents: han de ser petites i arrodonides, independents de les altres i presentar certa opacitat. Es seleccionen les colònies adequades amb una punta de pipeta i s'inoculen amb elles dins tubs de cultiu que contenen 6 ml de LB amb el corresponent antibiòtic. Aquests tubs s'incuben a 37 °C i 210 rpm durant 5 hores i mitja, temps en què s'aprecia terbolesa. Un cop passat aquest temps, per tal de preparar un estoc, es preparen alíquotes de 500 µL de medi de cultiu en glicerol autoclavat (1:1) i es guarden a -80°C per posteriors usos.

3.5. Obtenció del plasmidi

Per l'obtenció del plasmidi es prepararen quatre erlenmeyers amb 400 mL de medi de cultiu LB. Un cop refredats, s'hi addiciona l'ampicil·lina.

Cada un dels tubs anteriors, després de la incubació, es transvasa a un erlenmeyer i s'incuba tot un vespre (unes 18-20 hores) a 37 °C i 210 rpm. Un cop passat aquest temps es mesura la OD₆₀₀ de les mostres per conèixer el grau de creixement. A continuació es duu a terme l'extracció i purificació del plasmidi segons el protocol de *E.Z.N.A Plasmid Maxi Kit* comercial. El plasmidi es fa precipitar amb 1/10 (v/v) de CH₃COONa (pH = 5,2) i 0,7V d'isopropanol.

La pellet de DNA es resuspèn amb la mínima quantitat d'aigua (uns 200 µL) i mesuram la concentració de plasmidi per UV-vis (dilució 1:20). Per tenir un control de les seqüències produïdes, després de cada obtenció s'envia una mostra a seqüenciació.

3.6. Digestió del plasmidi

Per tal de fer la digestió del plasmidi, s'utilitza l'enzim de tall *HindIII*. Es preparen 400 µL de reacció, amb 100 µg de plasmidi, 1X de tampó R (R Buffer), 20 µL d'enzim *HindIII* (10 U/µL) i la resta d'aigua. Es digereix durant 4 hores, sense agitació, a 37 °C. Finalment, un cop la digestió ha finalitzat, es desactiva l'enzim tèrmicament a 80 °C durant 20 minuts.

Per tal de comprovar la correcta digestió del plasmidi es realitza una electroforesi en gel d'agarosa 1 % en TAE buffer. Per tal de mesurar la mida dels DNA separats per electroforesi d'agarosa, s'usa una escala de mesures, 5 XL Ladder, que consisteix en 12 fragments de DNA purificats individualment mitjançant HPLC de mides (en parell de bases, pdb): 10000, 8000, 5000, 2000, 1600, 1000 (de doble intensitat, per poder localitzar-ho millor), 700, 500, 400, 300, 200 i 100.

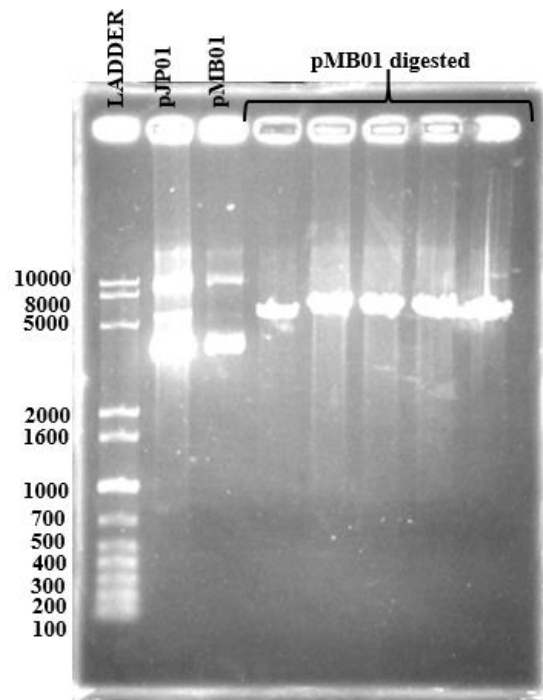


Figura 8. Gel d'agarosa 1 %. Es veu que l'enzim digerit amb *HindIII* presenta el mateix corrent en tots els pouets amb una banda propera a 5000 bp. Els altres plasmidis (pMB01 i pJP01) es posaren a mode de control, per tal de veure la diferència en la distància recorreguda. Es veu que els digerits han corregut més que els controls

3.7. Transcripció (producció d'RNA)

La síntesi de l'RNA es produeix amb la proteïna *T7-RNA polimerasa*. Es preparen 25 mL de mescla de transcripció que sigui: 5 mM de ATP, CTP, GTP i UTP, 1X TXN Buffer, 30 mM MgCl₂, 0,01 % Tritón-X-100, 70 µg/mL de *T7-RNA polimerasa* i 20 µg/mL de plasmidi. S'incuba la mescla en 24 tubs Eppendorf de 1,5 mL durant 5 hores, a 37 °C i 300 rpm.

Un cop acabada la incubació, es centrifuguen els tubs 2 minuts a 6000 rpm a una temperatura de 4 °C, per tal d'eliminar els pirofosfats inorgànics. El sobrenedant es transfereix a tubs de centrífuga Falcon per dur a terme la precipitació de l'RNA. A cada tub se li addicionen 2,5 volums d'etanol fred (-20°C) i NaCl 5M fins obtenir una concentració final de 250 mM. Els tubs es guarden a -20 °C durant una nit i després es centrifuguen durant 30 min a 4 °C i 12000 g per tal d'obtenir el pellet d'RNA.

Una vegada eliminat el sobrenedat, els pellets d'RNA s'eixuguen amb el *Concentrator plus* durant 30 min a temperatura ambient. Una vegada eixuts, es resuspenen amb aigua, arribant a un volum final de 3 mL, que es separen amb dos tubs, obtenint dues fraccions de 1,5 mL cada una.

Taula 2. Seqüència de l'RNA (en sentit 5'-3') proposada per actuar com a ribocommutador de cobalamina de *Klebsiella pneumoniae*.

GGGA	CCGG	UCCU	GUCA	GUUA	AAAG	GGAA	CCCA	GUGG	AAAU	CUGG
GGCU	GACG	CGCA	GCGG	UAAG	GAAG	GUGA	GAAA	UGAG	CGCA	CUCG
GUGC	AGAC	ACUG	CGGC	UAGC	CGUG	GGAA	GUCA	UUAU	UUCU	UGAA
ACAG	CCUC	CAAG	CCCG	AAGA	CCUG	CCGG	AAUA	CGUC	GCAC	UGGG
UUUU	AUCG	UCGC	GAGC	AACU	GAUA	AAAC	CUGC	GGCA	AGCU	

3.8. Purificació de l'RNA

Per tal de purificar l'RNA obtingut anteriorment es realitza una electroforesi de poliacrilamida (PAGE) al 10 % en condicions desnaturalitzants. A cada fracció de 1,5 mL d'RNA se li addiciona la meitat del seu volum (0,75 mL) de ULB i es fa córrer cada fracció a un gel. Pels dos gels s'utilitzaren 500 mL d'acrilamida al 10 % amb 2,5 mL de persulfat amònic (APS) al 10 % i 250 µL de tetraetilendiamina (TEMED) per la seva polimerització.

Un pic transcorregudes les 6 hores, s'agafa el gel i es col·loca damunt una placa de cromatografia fina amb indicador UV, l'il·luminam amb una làmpada UV de 254 nm i es veu una ombra a la banda d'RNA. La zona del gel que conté l'RNA es talla amb un bisturí, es fa passar per una xeringa per obtenir fragments més petits i es guarda dins tubs a -20 °C durant una nit per millorar-ne la posterior extracció, ja que amb el congelat, la poliacrilamida torna més trencadissa.

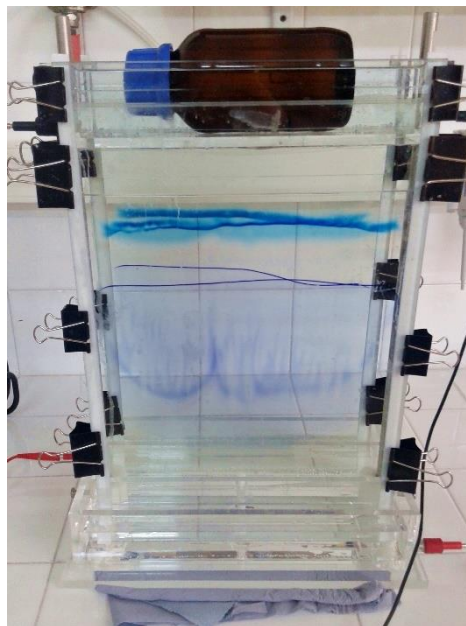


Figura 9. Muntatge de l'electroforesi per la purificació de l'RNA. Es poden observar els tres colorants diferents que ens permeten anar seguint com va avançant l'electroforesi.

Per extreure l'RNA del gel s'usa el Crush and Soak, un mètode d'extracció sòlid-líquid. Als tubs que contenen l'RNA se'ls hi addicionen 3 volums del Crush and Soak buffer i s'agita amb vòrtex, per posteriorment posar-los a un agitador orbital a 4 °C durant 2,5 hores, passant pel vòrtex cada 30 minuts. Finalment els tubs es centrifuguen durant 15 min a 4 °C i 12000 g per separar els fragments de gel del sobrenedant. Es realitzen alíquotes de 12 ml de dissolució (que conté RNA) i es precipita amb EtOH segons les condicions esmentades anteriorment.

Al cap d'una nit, es centrifuguen els tubs 30 minuts a 4 °C i 12000 g per tal d'obtenir el pellet d'RNA. El sobrenedant s'elimina i els pellets s'eixuguen al concentrador durant 30 min a temperatura ambient. Una vegada els pellets estan eixuts, l'RNA es resuspèn amb 200 µl d'aigua per tub i es van recollint les alíquotes. Per tal d'eliminar les restes de gel, cal centrifugar la

mostra durant 10 min a 4 °C i 12000 g. Quan tenim la mostra d'RNA lliure de gel, es realitza una dilució 1:50 i es mesura la seva concentració per UV-vis.

Per tal de juntar totes les al·líquotes i concentrar-les, es dialitzen totes les mostres amb columnes VivaSpin 500. Durant tot el procediment, es centrifuguen els tubs durant 7 minuts a 4 °C i 3214 g. Per la preparació de la columna, es fan passar 20 mL d'aigua, 20 mL d'etanol 70 % per esterilitzar els tubs i 3 rentades amb 20 mL d'aigua cada una per tal d'eliminar les restes d'etanol. A continuació s'introdueix la mostra i es realitzen després, 4 o 5 passades d'aigua. Finalment, es centrifuga la mostra el temps necessari per obtenir el volum de dissolució adient per a la concentració final d'RNA desitjada (uns 50 µM). Un cop concentrada la mostra es dilueix 1:200 per poder mesurar la concentració per UV-vis i s'aliquoten en tubs Eppendorf.

3.9. Mesures mitjançant ITC

Per tal de començar les valoracions calorimètriques, primer de tot s'ha de netejar l'aparell amb una dissolució de SDS al 2 %, per tal d'eliminar possibles restes de proteïnes. Posteriorment es renta amb abundant aigua Milli-Q, per tal d'assegurar-no que no hi ha restes de brutícia dins la cel·la. Per acabar la neteja, es deixa eixugar tot un vespre i s'estabilitza tèrmicament a la temperatura de treball.

Per tal de realitzar cada una de les valoracions s'ha de preparar:

- 1 mL de ITC Buffer 1X.
- 400 µL de AdoCbl (~100 µM) en ITC Buffer 1X.
- 300 µL d'RNA (15-20 µM) en ITC Buffer 1X. Aquesta dissolució s'ha d'escalfar durant 45 segons a 90 °C abans d'afegir l'ITC Buffer, per tal de desnaturalitzar tot l'RNA.

Aquests experiments es realitzen amb una concentració de 5 mM de Mg²⁺, per tal de que hi hagi un correcte plegament de l'RNA. Altres estudis⁴⁶ s'han realitzat a concentracions de 20 mM de Mg²⁺, però s'arriben a formar agregats d'RNA, que interfereixen en la valoració, obtenint dades errònies.

Una vegada preparades les dilucions de AdoCbl i ARN es mesura la seva concentració exacta per UV-vis (dilucions 1:50 per a el ARN i 1:10 per a la AdoCbl). Les dissolucions es desgasen durant 20 minuts a la temperatura de l'experiment.

Posteriorment s'injecten 250 µl de ITC Buffer 1X a la cel·la de referència, 250 µl de la dissolució de ARN a la cel·la de valoració i s'omple la xeringa d'injecció amb 50 µl del valorant, AdoCbl. Per a les valoracions es realitzen 15 injeccions de 3,03 µl amb un interval de recollida de dades de 300 segons entre injeccions. Es realitzen les valoracions per triplicat a quatre temperatures: 15, 20, 25 i 30 °C. Després de cada valoració es neteja l'equip.

Per tal de calcular el calor de dilució es fa, per a cada temperatura a la que es realitza l'experiment, una valoració sobre el dissolvent (ITC Buffer 1X), que servirà com a blanc, per saber el calor de dilució i corregir el calor de cada valoració.

Al final del dia, un cop acabades les valoracions a una temperatura determinada, l'aparell es renta seguint el procediment explicat al principi d'aquest apartat i es deixa estabilitzant a la temperatura de treball del dia següent.

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1. Seqüenciació del DNA

Després de la transformació del plasmidi en cèl·lules competents i la posterior extracció i purificació, s'envia una mostra a seqüenciar.

La seqüència del plasmidi va ser confirmada per Secugen (Sequencing and Molecular Diagnostics, Madrid) utilitzant l'encebedor (5'-3') CTA GTT ATT GCT CAG CGG. Els resultats s'obtenen en forma reversa.

4.2. Mesures calorimètriques

Com ja hem comentat amb anterioritat, la ITC és una tècnica que es basa en la mesura de la calor que es desprèn/absorbeix durant una valoració. Aquesta tècnica ens permet calcular paràmetres termodinàmics d'interaccions entre substàncies en dissolució (ΔH i ΔS), d'on podem derivar la constant d'associació, i a més ens dóna informació de l'estequiometria de la reacció (n).

Com s'ha explicat anteriorment, es valora una certa quantitat d'RNA en presència de Mg^{2+} , per tal de tenir un correcte plegament d'aquest. S'usa adenosilcobalamina com a valorant, i la temperatura d'aquesta cel·la es compara constantment amb la temperatura de referència que està plena de ITC buffer 1X. De fet, el calorímetre mesura l'energia necessària per a mantenir la cel·la de mesura a la mateixa temperatura que la cel·la de referència.

Per a poder utilitzar aquesta tècnica, l'energia que es desprèn durant la reacció ha de ser major que el calor que es genera per la simple dilució del valorant. És a dir, que als darrers punts de la valoració, quan tots els llocs d'unió del ARN estan ocupats, el calor és igual al calor degut a la dilució del valorant al dissolvent.

Un exemple dels pics que s'obtenen després de cada addició de valorant es pot observar a la Figura 10.

Un cop que es corregeix el calor de la valoració amb el calor de dilució, les dades es poden ajustar a un procés independent, amb el mateix software abans esmentat. Un exemple d'aquest ajustament es pot veure a la Figura 11.

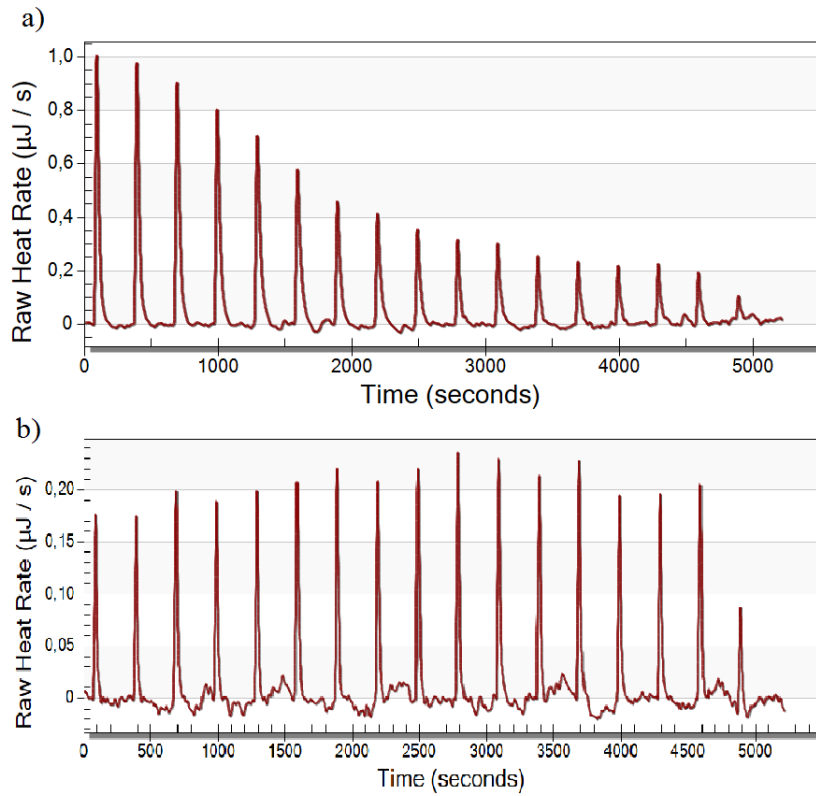


Figura 10. Exemple dels pics obtinguts durant la valoració de l'RNA amb adenosilcobalamina per ITC (a) i de la valoració del calor de dilució (b). A ambdues gràfiques es representa calor ($\mu\text{J/s}$) front el temps (s).

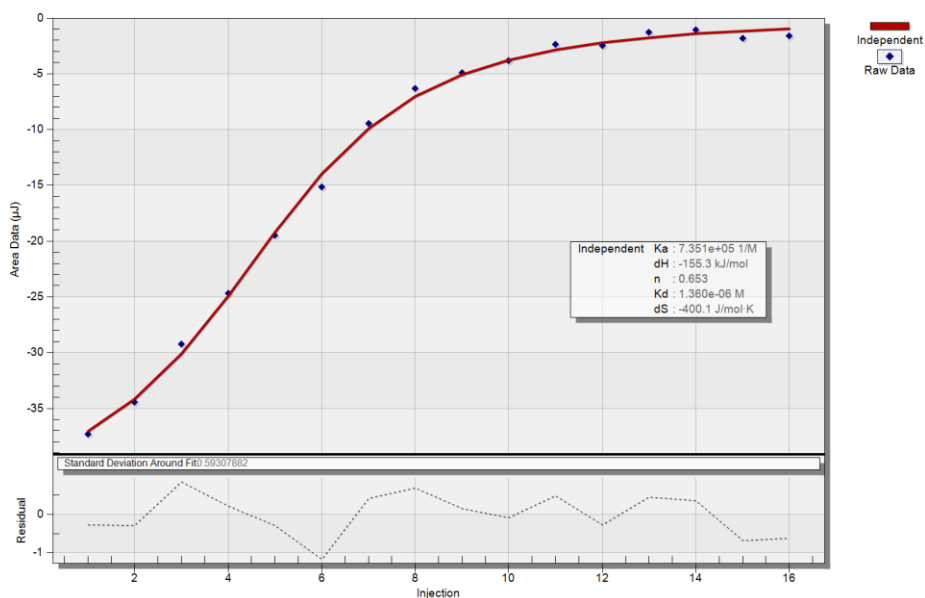


Figura 11. Ajust de les dades a una isoterma d'enllaç 1:1 per una de les valoracions entre el ribocommutador i l'AdoCbl, amb una concentració de Mg^{2+} 5 mM. Es representa l'àrea corregida dels pics en funció del nombre d'injeccions. Amb aquest ajust es poden trobar o calcular els valors de K_A , ΔH , n , ΔG , K_D i ΔS .

Després de l'anàlisi de totes les valoracions, els resultats es poden agrupar a la Taula 3, així com les gràfiques obtingudes a la Figura 12. Els valors que s'obtenen són del mateix ordre de magnitud que els esperats, comparables amb els de la seqüència completa del ribocommutador.

Taula 3. Paràmetres termodinàmics determinats mitjançant ITC per la interacció entre l'adenosilcobalamina i el seu ribocommutador (sense la plataforma d'expressió) a quatre temperatures diferents (15, 20, 25 i 30 °C). Els errors que es donen corresponen a la desviació estàndard.

15 °C	K_A (M^{-1})	ΔH ($kJ \cdot mol^{-1}$)	n	ΔS ($J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$)
Experiments individuals	$8,743 \cdot 10^6$	-71,6	0,756	-115,5
	$7,898 \cdot 10^6$	-59,8	1,070	-75,6
	$1,056 \cdot 10^7$	-50,6	0,764	-41,1
Mitjana	$9,067 \cdot 10^6 \pm 1,360 \cdot 10^6$	$-60,7 \pm 10,5$	$0,86 \pm 0,18$	$-77,4 \pm 37,3$
Log K_A	$6,96 \pm 0,07$			
K_D (nM)	110 ± 17			

20 °C	K_A (M^{-1})	ΔH ($kJ \cdot mol^{-1}$)	n	ΔS ($J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$)
Experiments individuals	$1,730 \cdot 10^6$	-90,4	0,859	-188,8
	$1,467 \cdot 10^6$	-99,5	0,685	-221,4
	$2,202 \cdot 10^6$	-95,0	0,820	-202,7
Mitjana	$1,800 \cdot 10^6 \pm 3,724 \cdot 10^5$	$-79,1 \pm 4,6$	$0,79 \pm 0,09$	$-204,3 \pm 16,4$
Log K_A	$6,26 \pm 0,09$			
K_D (nM)	556 ± 115			

25 °C	K_A (M^{-1})	ΔH ($kJ \cdot mol^{-1}$)	n	ΔS ($J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$)
Experiments individuals	$1,231 \cdot 10^6$	-123,6	0,697	-298,0
	$1,474 \cdot 10^6$	-122,7	0,798	-293,5
	$1,190 \cdot 10^6$	-121,8	0,679	-292,1
Mitjana	$1,298 \cdot 10^6 \pm 1,535 \cdot 10^5$	$-122,7 \pm 0,9$	$0,73 \pm 0,06$	$-294,5 \pm 3,1$
Log K_A	$6,11 \pm 0,05$			
K_D (nM)	770 ± 91			

30 °C	K_A (M^{-1})	ΔH ($kJ \cdot mol^{-1}$)	n	ΔS ($J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$)
Experiments individuals	$8,434 \cdot 10^5$	-147,2	0,684	-372,1
	$6,952 \cdot 10^5$	-150,0	0,635	-383,0
	$7,351 \cdot 10^5$	-155,3	0,653	-400,1
Mitjana	$7,579 \cdot 10^5 \pm 7,669 \cdot 10^4$	$-150 \pm 4,1$	$0,66 \pm 0,03$	$-385,1 \pm 14,1$
Log K_A	$5,88 \pm 0,04$			
K_D (nM)	1319 ± 134			

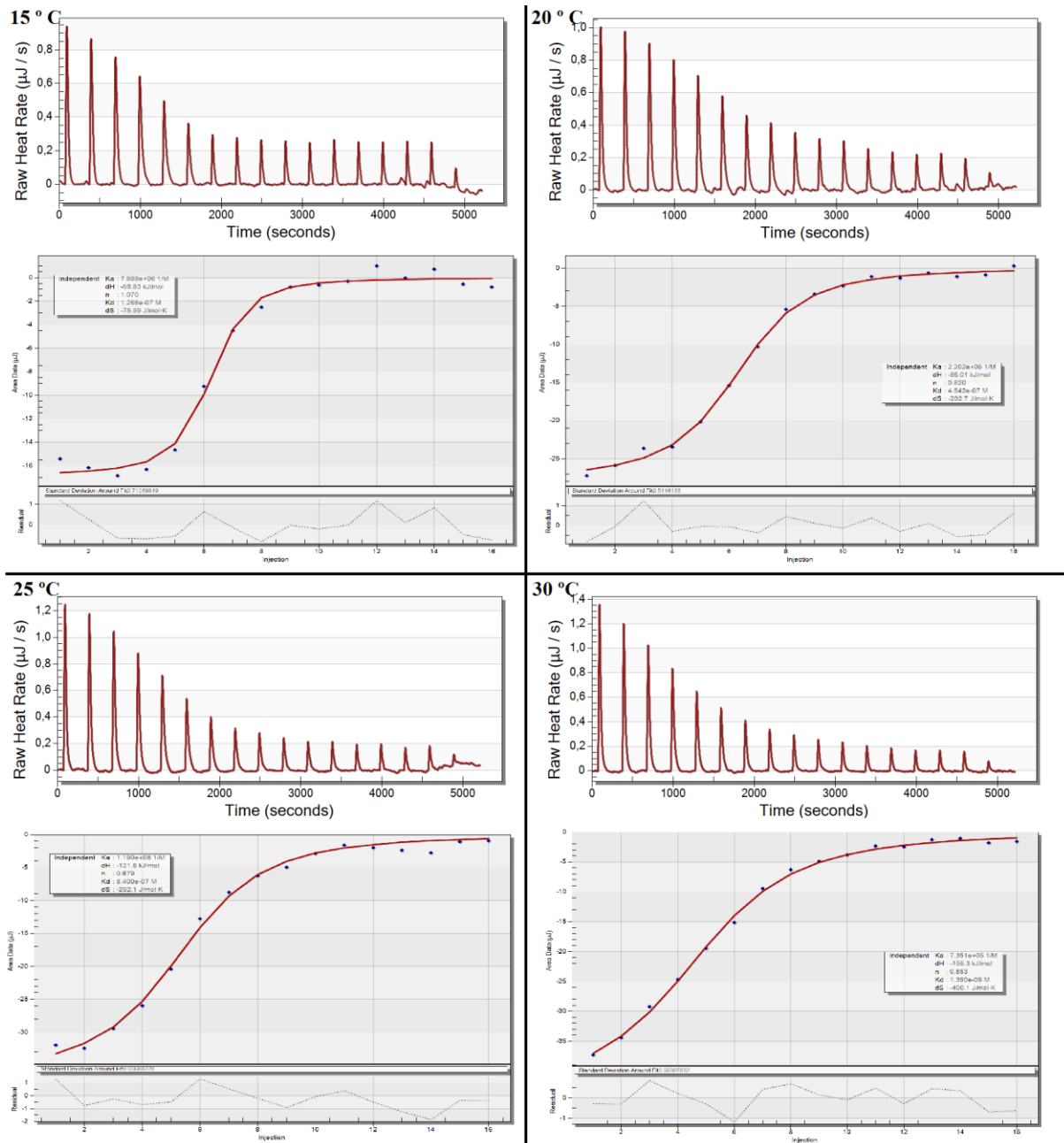


Figura 12. Resultats de les valoracions ITC. Hi ha representats el gràfic del calor involucrat en la interacció ($\mu\text{J/s}$) front el temps (s) i la integració dels pics (μJ) front el nombre d'injecció en la valoració del ribocommutador *btuB* sense la plataforma d'expressió amb adenosilcobalamina a quatre temperatures diferents. Les dades s'ajusten a un procés independent.

Si s'observen els resultats obtinguts (Taula 3) es veu una marcada tendència en què la constant d'afinitat (K_A) disminueix a mesura que augmenta la temperatura. De forma anàloga, la constant de dissociació (K_D) augmenta amb la temperatura. Es podria explicar en tant que, a major temperatura, hi ha més mobilitat de les interaccions que es formen entre el ribocommutador i l'adenosilcobalamina, de tal manera que hi ha una major dificultat perquè s'uneixin provocant el canvi conformacional a l'RNA.

La reacció que es dona entre el ribocommutador i el seu metabòlit natural és exotèrmica, és a dir, desprèn calor ($\Delta H < 0$). La interacció entre ambdós es molt favorable, fent que l'adducte entre RNA i AdoCbl sigui molt estable. A mesura que augmenta la temperatura, la reacció és més exotèrmica.

El valor de n és molt pròxim a 1 (es troba al voltant del 0,8). Teòricament la reacció és 1:1 per l'adenosilcobalamina i la seqüència completa del ribocommutador (aptàmer i plataforma d'expressió), i en el nostre cas, amb la seqüència que no inclou la plataforma d'expressió hem obtingut un valor força pròxim. Aquesta diferència es deu a petits errors experimentals, així com del propi aparell. A la pràctica, es pot considerar que $n = 1$.

A més, mitjançant diferents representacions es pot observar com hi ha una variació dels paràmetres termodinàmics amb la temperatura, que es deu a un canvi no menyspreable a la capacitat calorífica ($\Delta C_p = d\Delta H/dT$). S'han realitzat les representacions de Van't Hoff ($\ln K = -\Delta H/RT + \Delta S/R$) i Gibbs-Helmholtz ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$) per tal d'estudiar la dependència del nostre sistema (ribocommutador-AdoCbl) amb la temperatura.

Aquestes dues representacions són lineals sempre i quan ΔC_p sigui igual a zero, és a dir, que no variï la capacitat calorífica del sistema amb la temperatura. Quan es veu que la representació és en forma de corba, es pot afegir un terme addicional a l'equació de la capacitat calorífica, i la corba s'ajusta generalment a una funció polinòmica de segon ordre.

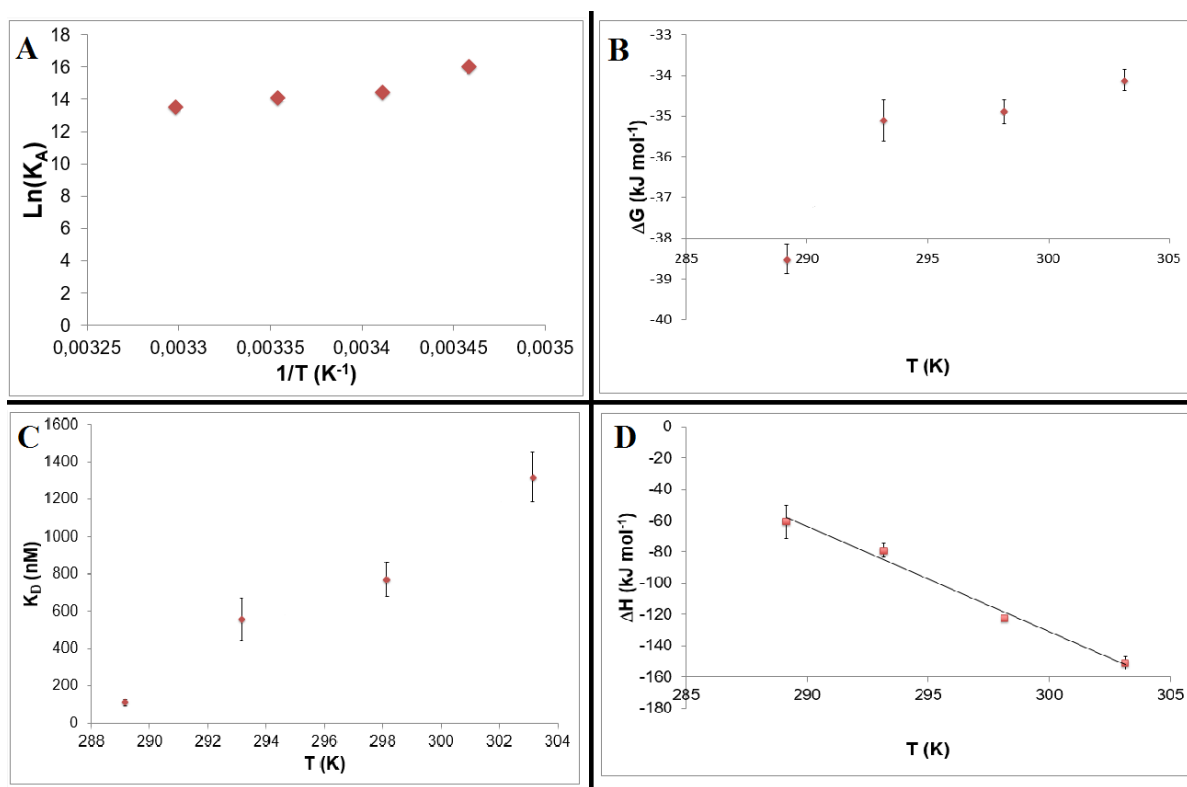


Figura 13. Interpretació de les dades obtingudes mitjançant ITC. Es representen les equacions de Van't Hoff (A) i Gibbs-Helmholtz (B), que indiquen un canvi no menyspreable de la ΔC_p amb la temperatura, ja que no es poden ajustar a un polinomi de segon grau. Igualment, la representació de K_D front la temperatura (C) no s'ajusta a una recta, podent intuir un canvi mecànic dependent de la temperatura. La representació de ΔH front temperatura (D) sí que es pot ajustar, mínimament bé, a una recta ($R^2 = 0,988$) podent trobar el valor de ΔC_p , encara que sigui una simplificació del sistema. Les barres dels errors es corresponen a la desviació estàndard.

Com es pot veure a la Figura 13A;B, les dades no es poden ajustar a una corba corresponent a un polinomi de segon grau. Per tant, només podem dir que hi ha una dependència més complexa del sistema ribocommutador-AdoCbl amb la temperatura, o tal vegada un canvi mecanístic dependent de la temperatura. El fet que la representació de la constant de dissociació (K_D) front la temperatura (Figura 13C) no es pugui ajustar a una recta també ens permet intuir que es produeix aquest canvi mecanístic. Es pot observar com es poden diferenciar dues rectes: una amb els dos primers punts i l'altra amb els dos darrers.

Caldria realitzar més proves amb aquest sistema a altres temperatures intermèdies, per tal de veure si es pot comprendre millor aquest canvi mecanístic, i saber amb exactitud a quina temperatura es dona.

Finalment, per acabar amb el tractament de dades es pot calcular un aparent $\Delta C_p = 6,7068$ kJ/K·mol ($R^2 = 0,988$), a partir de la representació de l'entalpia front la temperatura (Figura 13D), tot i que no ens pot donar una idea general del sistema, només és una simplificació. Sempre s'havia pensat que la capacitat calorífica en àcids nucleics no era rellevant, que la seva variació era menyspreable, no com a les proteïnes que si hi havia major canvi estructural i, conseqüentment, una major variació de la capacitat calorífica.⁴⁷ Aquest experiment és un clar exemple que ΔC_p si depèn del substrat que es considera, i que en àcids nucleics també es poden observar variacions d'aquest paràmetre degut a canvis conformacionals importants.

Aquestes dades obtingudes es poden comparar amb els resultats obtinguts al mateix grup d'investigació mitjançant un experiment anàleg.³⁹ Aquest consistia en una valoració calorimètrica amb adenosilcobalamina d'una seqüència d'RNA similar a la usada en aquest treball. La seqüència proposada per actuar com a ribocommutador estava formada per 243 nucleòtids, contenint la plataforma d'expressió, no només l'aptàmer, i va ser preparada mitjançant la digestió del plasmidi pJP01 amb l'enzim *XhoI*, amb una posterior síntesi i purificació de l'RNA de manera idèntica a l'explicat anteriorment. Els resultats, també a quatre temperatures diferents, es poden observar de manera resumida a la Taula 4.

Taula 4. Paràmetres termodinàmics obtinguts a la valoració de l'RNA JP01 amb AdoCbl, a les mateixes temperatures que en aquest treball (15, 20, 25 i 30 °C). Els experiments foren realitzats amb les mateixes condicions que en aquest treball. Els errors que es donen corresponen a la desviació estàndard.

T (°C)	K_A (M^{-1})	ΔH (kJ·mol ⁻¹)	n	ΔS (J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹)	K_D (nM)
15	$5,424 \cdot 10^6 \pm 2,785 \cdot 10^5$	$-60,7 \pm 5,5$	$0,82 \pm 0,03$	$-81,6 \pm 19,0$	184 ± 9
20	$4,762 \cdot 10^6 \pm 1,785 \cdot 10^5$	$-83,7 \pm 2,9$	$0,9 \pm 0,2$	$-157,6 \pm 9,9$	210 ± 8
25	$1,887 \cdot 10^6 \pm 2,036 \cdot 10^5$	$-119,6 \pm 2,5$	$1,0 \pm 0,3$	$-281,2 \pm 9,1$	530 ± 57
30	$1,001 \cdot 10^6 \pm 2,079 \cdot 10^5$	$-132,2 \pm 4,7$	$0,91 \pm 0,08$	$-321,6 \pm 16,4$	1000 ± 208

⁴⁷ P.J. Mikulecky, A.L. Feig, *Nucleic Acids Res.* 32, 3967–3976 (2004).

En aquest cas, també s'intueix un canvi mecanístic depenent de la temperatura, ja que en la representació de K_D front la temperatura es diferencien a la perfecció dues rectes distintes, però amb una forma totalment diferent a l'obtinguda en el present treball. Aquest fet dóna una idea de la importància de considerar tota la seqüència del ribocommutador sencera (aptàmer i plataforma d'expressió), ja que considerant la seqüència curta, el canvi mecanístic no es tan clar i sembla ser diferent.

Es pot observar que la variació d'entalpia del sistema no varia de manera significativa entre les valoracions realitzades per la seqüència curta (només considerant l'aptàmer) o la llarga (considerant ambdós dominis). La reacció és exotèrmica en ambdós casos, tenint un valors molt similars a les mateixes temperatures.

D'igual manera, es pot observar com la variació d'entropia del sistema no varia de forma significativa entre les dues seqüències d'RNA. Tot i que hi ha petites diferències, aquestes es deuen a la diferència de mida dels ribocommutadors, i no són significatives.

Cal comentar que el paràmetre més important, ja que ens dóna vertaderament informació sobre la importància de la plataforma d'expressió és la constant d'afinitat (K_A) o el seu logaritme. Aquesta constant ens dóna una idea de la fortalesa de la interacció que s'estableix entre el ribocommutador i l'adenosilcobalamina. Com més gran sigui aquest valor, significa que més forta és la interacció entre ambdós substrats. A la Taula 5 s'estableix una comparació entre els $\log K_A$ a cada temperatura per cadascuna de les seqüències: MB01 (la utilitzada al present treball, sense la plataforma d'expressió) i JP01 (considerant els dos dominis: aptàmer i plataforma d'expressió). Es veu clarament que els valors pel ribocommutador amb els dos dominis és major que si només tenim l'aptàmer, deixant clar que la interacció és més forta si es tenen en compte els dos dominis. També es pot apreciar clarament aquesta diferència al gràfic mostrat a la Figura 14.

Taula 5. Comparació del $\log K_A$ entre les dues seqüències del ribocommutador: MB01 (la utilitzada al present treball, sense la plataforma d'expressió) i JP01 (considerant els dos dominis: aptàmer i plataforma d'expressió). Els errors que es donen corresponen a la desviació estàndard.

T (°C)	$\log K_A$ (MB01)	$\log K_A$ (JP01)
15	$6,69 \pm 0,07$	$6,73 \pm 0,02$
20	$6,26 \pm 0,09$	$6,68 \pm 0,02$
25	$6,11 \pm 0,05$	$6,28 \pm 0,05$
30	$5,88 \pm 0,04$	$6,00 \pm 0,09$

Per acabar, es poden comparar els valors de la constant de dissociació (K_D) obtinguts en aquest treball amb les constants d'altres ribocommutadors de B_{12} d'altres espècies. Per exemple, s'ha trobat el valor de $K_D = 250 \pm 40 \text{ nM}^{44}$ pel mateix ribocommutador de *E.coli*, comparable amb el de *Klebsiella pneumoniae* (JP01): $210 \pm 8 \text{ nM}$ a 20 °C i $530 \pm 57 \text{ nM}$ a 25 °C .³⁹ Alhora, els valors obtinguts també són comparables amb els obtinguts en aquest treball per la seqüència del ribocommutador sense la plataforma d'expressió (MB01): $556 \pm 115 \text{ nM}$ a 20 °C i $770 \pm 91 \text{ nM}$ a 25 °C .

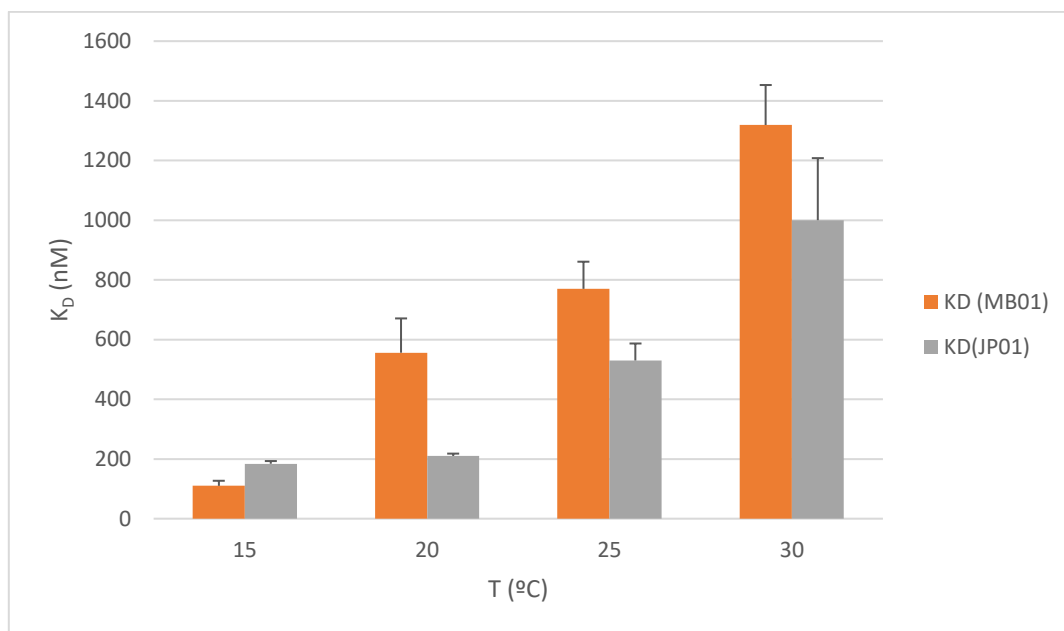


Figura 14. Comparació dels valors de K_D a quatre temperatures diferents entre el ribocommutador JP01 (aptàmer i plataforma d'expressió) i MB01 (només aptàmer). Es pot veure que són clarament diferents, i que no hi ha cap tipus de relació entre ells. Els errors que es donen corresponen a la desviació estàndard.

Podem dir que la interacció entre l'adenosilcobalamina i l'RNA és similar a altres espècies que també tenen ribocommutadors de B_{12} , tot i que les seqüències siguin distintes. Això vol dir que el nucli de l'estructura es troba conservada en diferents espècies de bacteris. A més, el valor de la variació d'entalpia indica que no hi ha ni ruptura ni formació d'enllaços covalents, sinó que s'estableixen interaccions tipus enllaç d'hidrogen i d'apilament hidròfob, a diferència de quan les cobalamines s'uneixen a proteïnes, que es sol rompre l'enllaç entre el cobalt i els lligands axials.⁴⁸

A més, s'observa que, clarament, amb la seqüència curta del ribocommutador s'obtenen valors de la constant de dissociació molt més elevats que els obtinguts pels altres dos casos. Així, queda palesa, novament, la importància de la plataforma d'expressió en la interacció entre el ribocommutador i el seu metabòlit natural, l'adenosilcobalamina.

Així, és comprensible la diferència de constants de dissociació, sobretot si es té en compte la diferència de longitud d'ambdues seqüències i les diferències en el plegament (Figura 15). Per tant, queda ben clara la importància de tenir els dos dominis del ribocommutador, ja que es formen interaccions més fortes que no pas si només hi tenim l'aptàmer.

⁴⁸ B. Kräutler, B.T. Golding, D. Arigoni (Eds.), *Vitamin B₁₂ and B₁₂-Proteins*, Wiley-VCH, p. 559 (2008).

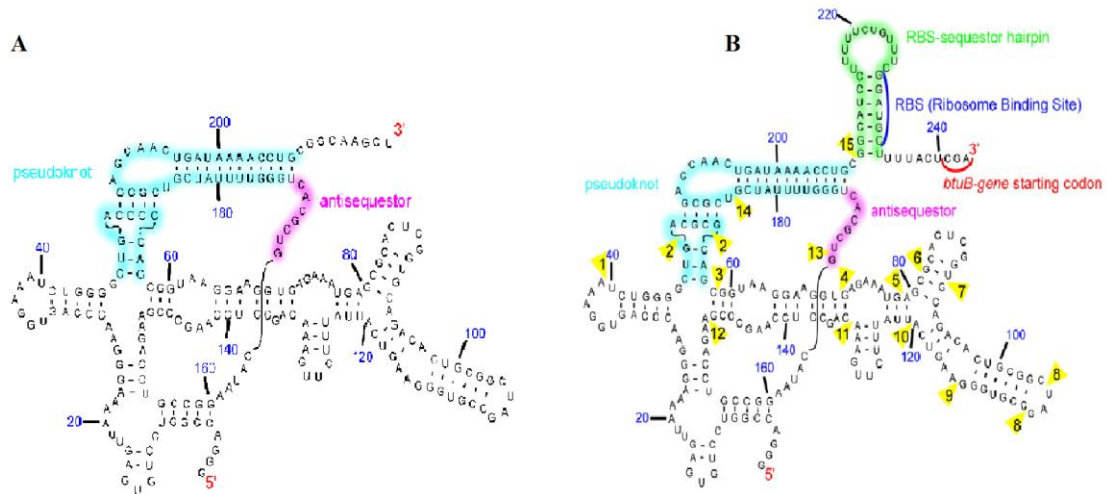


Figura 15. Estructura secundària proposada per la conformació *gene-off* del ribocommutador MB01 (A) i del JP01 (B). S'observa clarament la diferència de mida que hi ha entre el primer (que només té l'aptàmer) i el segon (que consta de l'aptàmer i la plataforma d'expressió).

5. CONCLUSIONS

Les conclusions que es poden extreure de la memòria presentada d'aquest treball de fi de grau es poden resumir en:

1. El plasmidi ha estat preparat mitjançant la transformació dins cèl·lules químicament competents de *Escherichia coli*.
2. La digestió del plasmidi s'ha realitzat amb l'enzim de restricció *HindIII* sota les condicions òptimes estudiades a altres treballs.
3. Després de la digestió del plasmidi s'ha obtingut correctament la seqüència d'RNA corresponent al ribocommutador mitjançant la transcripció del DNA amb la *T7 RNA-polimerasa*, preparada pel mateix grup d'investigació.
4. S'han realitzat estudis calorimètrics amb ITC de la interacció que es dona entre el ribocommutador i l'adenosilcobalamina a quatre temperatures diferents, per tal d'obtenir-ne informació termodinàmica.
5. S'ha vist que es formen interaccions tipus ponts d'hidrogen i d'apilament i s'han pogut comparar els resultats amb els d'altres estudis, fet que ha permès veure les diferències que hi ha entre la seqüència amb ambdós dominis o només amb l'aptàmer.
6. S'ha comprovat la importància de la plataforma d'expressió en la interacció entre el ribocommutador i l'adenosilcobalamina degut a la diferència observada en les constants d'associació entre les dues seqüències comparades.

Per acabar, comentar que aquest treball de fi de grau m'ha permès obtenir una gran quantitat de coneixements dins el món de la Química Bioinorgànica, tant pel que fa a tècniques instrumentals usades, com la ITC, recerca d'informació, redacció de memòries, com funciona el món de la investigació...

Tot això m'ha permès tenir una visió molt més global i, sobretot, més real del que suposa fer feina en un grup de recerca, de les dificultats que això suposa i, per damunt de tot, dels beneficis que et pot aportar. En conjunt ha estat una experiència enriquidora, tant a nivell acadèmic com a nivell personal.