



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Estudi de la interacció del coenzim B₁₂ amb el *btuB* riboswitch de *Klebsiella pneumoniae*

Maria Francisca Armero Adrover

Grau de Química

Any acadèmic 2015-2016

DNI de l'alumne: 41572802A

Treball tutelat per Dr. Miquel Barceló Oliver

Departament de Química Inorgànica



S'autoritza la Universitat a incloure el meu treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Paraules clau del treball:

Riboswitch, Adenosilcobalamina, *Klebsiella pneumoniae*, RNA, ITC

ÍNDIX

Introducció	4
Riboswitches	4
Cobalamines	7
Riboswitches de cobalamines	8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12
Objectius	13
Procediment experimental	14
Instrumentació	14
Reactius i materials	15
Disseny del plasmidi	16
Transformació del plasmidi	17
Producció del plasmidi	18
Digestió del plasmidi amb l'enzim de restricció	18
Síntesi de l'RNA	19
Purificació de l'RNA	21
Estudi del plegament de l'RNA	22
Mesures de calorimetria	23
Resultats i discussió	26
Seqüenciació del DNA	26
Transcripció	27
Gels natus	28
Mesures de calorimetria	28
Conclusions	32

1. INTRODUCCIÓ

1.2. Riboswitches

La vida i el desenvolupament d'un organisme eren entesos per la presència de molècules amb la capacitat d'obtenir i transmetre informació genètica heretable, així com actuar de catalitzadors químics. Aquestes molècules essencials eren el DNA i l'RNA. No obstant, quedava per esbrinar com aquest organisme era capaç de sofrir regulació gènica davant els constants canvis ambientals.

Durant molt de temps es va pensar que les proteïnes eren les úniques molècules que jugaven un paper indispensable en la regulació de l'expressió gènica, degut a ser elements de control bàsic i actuar com a sensors. No obstant això, una recerca exhaustiva ha conduït al descobriment dels riboswitches, mitjans de regulació gènica comuns en el regne bacterià.^{1,2,3}

Els riboswitches són seqüències de ribonucleòtids⁴ presents a la regió 5'-UTR (regió no traduïda) de certs mRNA, que exerceixen el seu poder regulador quan a ells s'hi uneix un metabòlit concret. Es tracta, per tant, d'elements que actuen en *cis* per controlar l'expressió de la seqüència codificant.^{2,5} La unió d'un metabòlit provoca un canvi en la estructura secundària i terciària de l'RNA, alterant per tant l'expressió del gen que codifica.

És important remarcar que el metabòlit que provoca els esmentats canvis està relacionat, en major o menor grau, amb el gen codificant del mRNA. Un exemple és aquest estudi, en el qual s'ha treballat amb la interacció del coenzim B₁₂ amb el *btuB* riboswitch, degut a ser aquest el gen que codifica per la proteïna transportadora de Vitamina B₁₂.

Pel que fa a l'estructura dels riboswitches, aquesta es divideix en dos dominis funcionals diferents.^{6,7,8}

i) Aptàmer: és la zona que reconeix la molècula efectora. El lligand es pot unir a l'aptàmer degut a que aquest pren una estructura tridimensional compacta en forma de cavitat. El lligand és reconegut per enllaços d'hidrogen amb les riboses o les bases nitrogenades, fet que confereix a l'aptàmer la capacitat de discriminar, amb elevada selectivitat, entre metabòlits similars.

ii) Plataforma d'expressió: un cop el metabòlit és reconegut, aquest s'uneix provocant la interacció entre els dos dominis per aparellament de bases. La plataforma d'expressió i l'aptàmer comparteixen una regió coneguda com a seqüència de commutació, la qual és l'encarregada de dirigir el plegament que sofrirà l'RNA i, en conseqüència, la modificació estructural que interferirà en la regulació del gen.

¹ A. Nahvi, N. Sudarsan, M.S. Ebert, X. Zou, K.L. Brown, R.R. Breaker, *Chemistry and Biology* 9, 2002, 1043-1049

² T.M. Henkin, *Cold Spring Harbor Laboratory Press* 22, 2015, 3383-3390

³ N. Sudarsan, J.E. Barrick and R.R. Breaker, *Cold Spring Harbor Laboratory Press, RNA* 9, 2003, 644-647

⁴ Aquestes seqüències són variables d'un organisme a un altre, estant formades per entre 35 i 250 ribonucleòtids.

⁵ C.A. Wakeman, W.C. Winkler and C.E. Dann, *Trends in Biochemical Sciences*, 32, 2007, 415-424

⁶ A.D. Garst, A.L. Edwards and R.T. Batey, *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 2011, 3:a003533

⁷ F. Aboul-ela, W. Huang, M. Abd Elrahman, V. Boyapati and P. Li, *WIREs RNA*, 6, 2015, 631-650.

⁸ L. Bastet, A. Dubé, E. Massé and D.A. Lafontaine, *Molec. Microb.*, 80, 2011, 1148-1154

D'aquesta manera, la unió del metabòlit a l'aptàmer del riboswitch provoca una reorganització al·lostèrica, la qual es potencia a la plataforma d'expressió per regular l'expressió del gen adjacent.^{9,10}

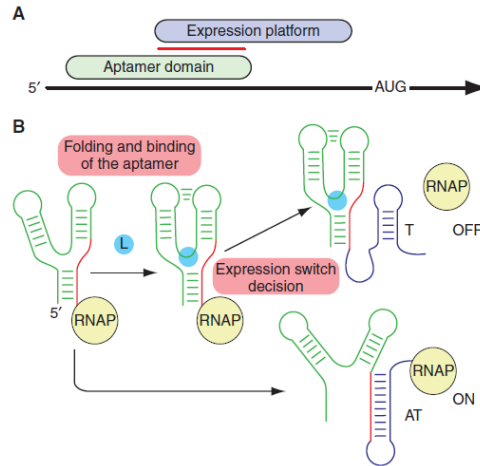


Figura 1. Esquematzació d'un dels mecanismes de regulació per part del riboswitch. a) Elements estructurals del riboswitch: en verd es mostra l'aptàmer, en violeta la plataforma d'expressió i en vermell la seqüència de commutació. b) Canvi conformacional sofert per la unió d'un lligand. A la part inferior es mostra la unió dels dos dominis en absència del lligand, formant-se el *loop* anti-terminació. A la part superior, canvi induït quan el lligand s'uneix a l'aptàmer⁶.

Els riboswitches tenen la capacitat d'exercir el seu poder regulador activant o reprimint els seus gens afins, tot dependent de la seqüència líder, mitjançant dos mecanismes diferents^{11,12}, essent aquests:

i) Regulació a nivell de transcripció: la unió del metabòlit provoca canvis estructurals els quals es tradueixen en la formació d'un *loop* de terminació que implica l'alliberament de la cadena motlle de DNA i la finalització prematura de la síntesi del mRNA (Figura 2a). En altres casos, la regulació es dona per l'activació del gen degut al segrest del *loop* anti-terminació (Figura 2c).

ii) Regulació a nivell de traducció: la unió del metabòlit provoca canvis estructurals en els dos dominis. D'aquesta manera, s'impedeix la unió del ribosoma al mRNA degut a que els canvis produïts a l'estructura provoquen el segrest de la zona RBS, zona d'enllaç del ribosoma. Es produeix, per tant, la inhibició de la síntesi de la proteïna corresponent (Figura 2b). La regulació a aquest nivell es pot donar pel cas contrari, és a dir, per l'alliberament de la regió RBS (Figura 2d).

⁹ J.E. Barrick and R.R. Breaker, *Genome Biology*, 2007, 8: R239

¹⁰ J.E. Barrick, K.A. Corbino, W.C. Winkler, A. Nahvi, M. Mandal, J. Collins, M. Lee, A. Roth, N. Sudarsan, I. Jona, J.K. Wickiser and R.R. Breaker, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101, 2004, 6421-6426

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

¹² M. Santillán and M.C. Mackey, *Phys. Biol.*, 2, 2005, 29-35

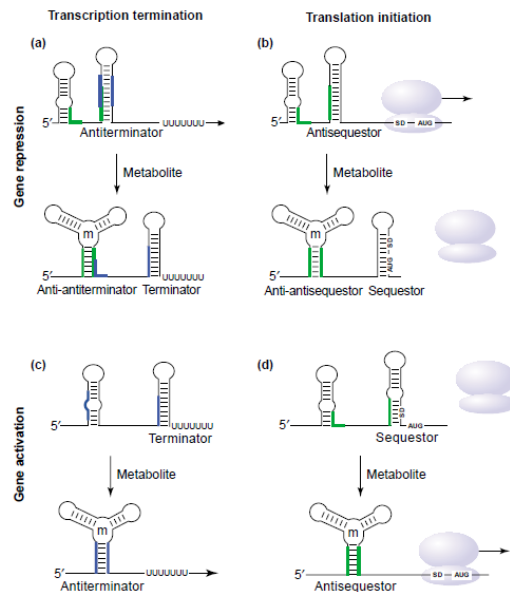


Figura 2. Mecanismes de regulació produïts per un riboswitch. **a,c**) Regulació a nivell de transcripció: (a) per la finalització d'aquesta, (c) per la seva activació. **b,d**) Regulació a nivell de traducció: b) segrest de la regió RBS, d) alliberament de la zona RBS.¹¹

Els estudis realitzats s'han traduït, fins al moment actual, en la caracterització de 16 sistemes que actuen com a riboswitches, responent cada un d'aquestes a metabòlits concrets (veure Taula 1).

Taula 1. Riboswitches i metabòlits als quals responen¹³.

<i>Riboswitch</i>	<i>Metabòlit implicat</i>
Coenzim B ₁₂	Adenosilcobalamina
FMN	Mononucleòtid de flavina (FMN)
THI box	Tiamina pirofosfat (TPP)
S box (SAM-I)	S-adenosilmetionina (SAM)
SAM-II	S-adenosilmetionina (SAM)
S _{MK} box (SAM-III)	S-adenosilmetionina (SAM)
SAH	S-adenosilmetionina (SAM)
L box	Lisina
Glicina	Glicina
Purina	Guanina/adenina
dG	Desoxiguanosina
Di-GMP cíclic	Di-GMP cíclic
glmS	Glucosamina-6-fosfat
PreQ1	Pre-quosina
Mg ²⁺	Catió magnesi
Moco	Cofactor de molibdè ¹⁴

¹³ M. Giedyk, K. Goliszewska and D. Gryko, *Chem. Soc. Rev.* 44, 2015, 3391-3404

¹⁴ Aquest és un de les darreres propostes per actuar com a riboswitch, el qual continua en estudi.

1.2. Cobalamines¹⁵

El Cobalt, a pesar de ser un dels elements menys abundants a l'escorça terrestre, realitza funcions biològiques molt específiques a més d'altres més habituals que també poden realitzar altres metalls.

Les biomolècules que contenen aquest element poden dividir-se en dos grups: i) Els enzims que utilitzen com a coenzim derivats de la vitamina B₁₂, és a dir, cobalamines; ii) La resta de metal·loproteïnes que contenen Cobalt.

Pel que concerneix a aquest treball, es focalitzarà l'atenció en les cobalamines. Aquests enzims compleixen una àmplia varietat de funcions, tals com: actuar com a *mutasses de l'esquelet carbonat*, *eliminasses*, *aminomutasses* o *ribonucleòtid reductasa*, així com estar implicats en la transferència de grups metil en diferents processos.

El descobriment de la vitamina B₁₂ es va produir degut als estudis efectuats en relació a la malaltia de l'anèmia perniciosa.¹⁶ Posteriorment a aquest descobriment i gràcies a la utilització de Raig X va ser possible determinar l'estructura de les cobalamines i de les espècies que conformen aquest grup.¹⁷

En les cobalamines, l'estructura general bàsica es dona per la coordinació del Cobalt als quatre nitrògens donadors del macrocicle denominat corrina, situat en el pla equatorial, el qual estabilitza els estats d'oxidació baixos del Cobalt, Co(I) i l'enllaç Co-C.

Pel que fa a aquest macrocicle, posseeix vuit substituents de tipus metil i set de tipus propanamida. Es creu que aquests darrers són els encarregats d'atorgar a la molècula el seu caràcter hidrofílic i són els responsables d'unir el coenzim a l'apoenzim o a les proteïnes de transport. Un dels substituents propanamida està unit a una ribosa fosforilada en 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 es té la conformació de *base off*. El canvi entre ambdues formes modifica el centre Cobalt-corrina degut a que ajusta la seva reactivitat organometàl·lica i redox en processos de catàlisi enzimàtica.¹⁸

Finalment, la cinquena posició de coordinació és l'encarregada de determinar la diferència entre les espècies constituents del grup de cobalamines, en funció del substituent que l'ocupa, tal i com es pot observar a la Figura 3. En el cas que ens ocupa, l'Adenosilcobalamina, a la cinquena posició de coordinació s'hi localitza una adenosina unida al Cobalt pel carboni 5'.

¹⁵ J.S. Casas, V. Moreno, A. Sánchez, J.L. Sánchez y J. Sordo, *Química Bioinorgánica*, Editorial Síntesis, 2002, Madrid.

¹⁶ J.M. Scott and A.M. Molloy, *Ann. Nutr. Metab.*, 61, 2012, 239-245

¹⁷ K. Okuda, *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 14, 1999, 301-308

¹⁸ K. Gruber, B. Puffer and B. Kräutler, *Chem.Soc.Rev.*, 40, 2011, 4346-4363

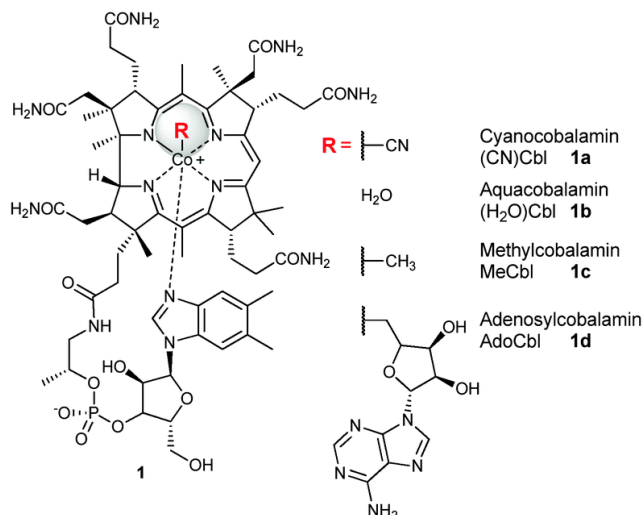


Figura 3. Estructura de les cobalamines i els substituents que originen els diversos derivats.¹³

Centrant l'atenció a l'estructura, es pot observar com el macrocicle desprotonat aporta una càrrega negativa, el radical R aporta la segona i, finalment, el grup fosfat la tercera. Així doncs, per donar-se la neutralitat d'aquestes espècies, el Cobalt ha d'estar present en la forma Co(III). En conclusió, les cobalamines són complexos octaèdrics de Co(III) de baix espí les quals presenten activitat redox.

1.3. Riboswitches de cobalamines

Certs fenòmens de control gènic els quals afectaven al metabolisme de cobalamines no es podien explicar mitjançant la regulació per proteïnes, però s'observava com semblava estar controlada pel propi coenzim B₁₂ mitjançant un procés d'inhibició sense la presència de cap factor proteic.¹⁹ Aquest mecanisme es va poder explicar per l'acció dels riboswitches de B₁₂. Aquests, estan presents a tots els grups taxonòmics de bacteris i representen la classe més complexa de riboswitches descoberts fins l'actualitat, responent al metabòlit Adenosilcobalamina.²⁰

Aquest grup de riboswitches regula els gens implicats a la codificació de les proteïnes encarregades de la biosíntesi i el transport de cobalamines, el transport de porfirina i de cobalt, la síntesi de ribonucleòtid reductasa independent de B₁₂, a més dels enzims implicats en la fermentació de succinat i glutamat.²¹

A bacteris Gram-positius la regulació es dona a nivell de transcripció, en contraposició al bacteris Gram-negatiu en els quals aquesta es dona a nivell de traducció.

¹⁹ X.W. Nou and R.J. Kadner, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97, 2000, 7190-7195

²⁰ A. Nahvi, J.E. Barrick and R.R. Breaker, *Nucleic Acid Research*, 32, 2004, 143-150

²¹ W.C. Winkler, R.R. Breaker, *Annu. Rev. Microbiol.*, 59, 2005, 487-517

Aquests elements de regulació gènica han estat estudiats en el *btuB* gen de *Escherichia Coli* i *Salmonella typhimurium*, el qual codifica per la proteïna transmembrana encarregada d'activar el transport de cobalamines, i en el *cob operó* de *Salmonella tyhimurium*, encarregat de codificar les proteïnes de la ruta biosintètica de cobalamines.

Els estudis efectuats sobre les seqüències de riboswitch de cobalamines esmentades anteriorment, ha permès establir la presència de seqüències altament conservades, com és la B₁₂-box.²² Així doncs, es té un nucli comú per tots els riboswitches d'aquesta família, el qual està format per dos dominis diferents: i) Domini receptor en el qual es produeix l'unió al metabòlit, ii) Domini regulador encarregat de la regulació del gen.

En funció de l'extensió perifèrica al voltant de les zones altament conservades, s'han determinat dos grups diferents de riboswitches de B₁₂, els quals son²³: i) Riboswitch d'Adenosilcobalamina: posseeix un domini perifèric a l'aptàmer; ii) Riboswitch d'Aquocobalamina: té manca del domini perifèric de l'aptàmer.

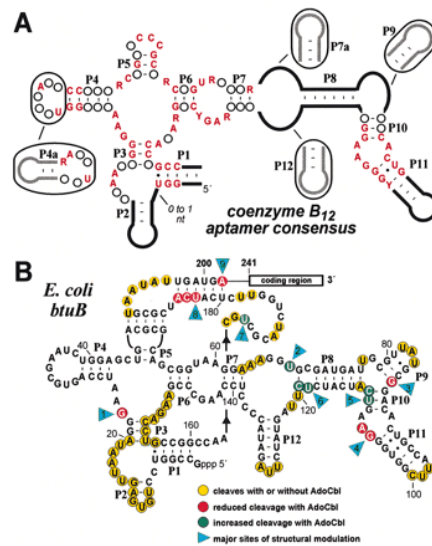


Figura 4. Seqüències proposades per actuar de riboswitches de B₁₂. **a)** Aptàmer de la família de riboswitches de cobalamines: en vermell es representen els nucleòtids altament conservats; les regions encerclades son les zones perifèriques variables. **b)** Seqüència del *btuB* riboswitch de B₁₂ de *E.coli* en presència de l'Adenosilcobalamina: en verd es marquen les zones on es produeix augment d'escissió en presència del metabòlit, en vermell les zones en les que es dona una disminució de tall; mentre que en groc les zones que s'escindeixen en presència i manca de metabòlit.²⁰

La seqüència del riboswitch de cobalamina s'enllaça a l'Adenosilcobalamina amb elevada afinitat i especificitat, degut a que es dona reconeixement entre l'aptàmer i el metabòlit per complementaritat mitjançant unes poques interaccions d'enllaç d'hidrogen.²⁴

²² A.G. Vitreschak, D.A. Rodionov, A.A. Moronov and M.S.Gelfand, *Cold Spring Harbor Laboratory Press, RNA*, 9, 2003, 1084-1097

²³ P.K. Choudhary, A. Duret, E. Rohrbach-Brandt, C. Holliger, R.K.O. Siegel and J. Maillard, *Journal of Bacteriology*, 195, 2013, 5186-5195

²⁴ J.E. Johnson Jr, F.E. Reyes, J.T. Polaski and R.T. Batey, *Nature*, 492, 2012, 133-138

En conseqüència es dona un canvi estructural a l'RNA, el qual modifica els aparellaments intramoleculars de les bases que el conformem, fet que implica la interacció entre les zones anti-RBS i RBS, traduint-se en el segrest de la zona d'unió del ribosoma (Figura 5, dreta). Així, es té la forma de *gene-off*, en la qual es produeix la inhibició de la traducció.

En contraposició, l'absència de derivats de cobalamina condueix a la forma *gene-on*. A aquesta, no es produeix interacció entre l'aptàmer i el metabòlit, fet pel qual l'RNA adopta una estructura a la que la zona RBS queda lliure, per aparellament entre la regió anti-RBS i anti-anti-RBS (Figura 5, esquerra). Així doncs, la unió dels ribosomes és possible i, en conseqüència, es dona el procés de traducció.²⁵

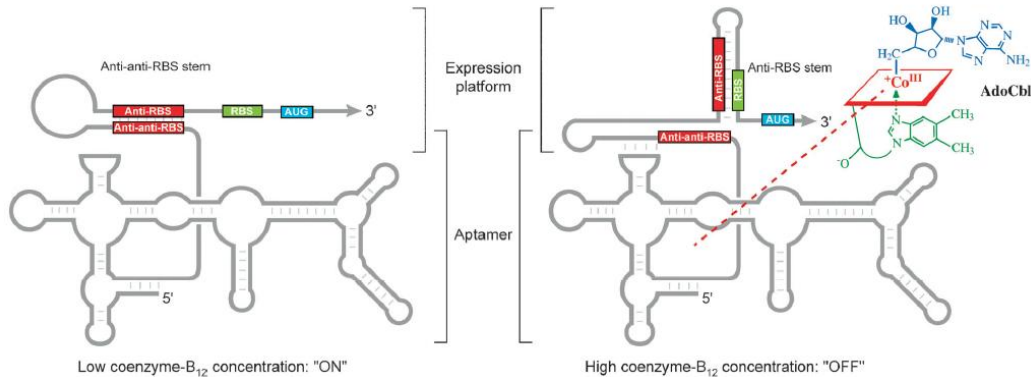


Figura 5. Mecanisme d'acció del riboswitch de B₁₂ en presència d'AdoCbl. A baixes concentracions de coenzim B₁₂ la zona RBS es troba lliure, mentre que a elevades concentracions d'AdoCbl es produeix la interacció anti-RBS i RBS quedant segrestada aquesta darrera regió.¹⁸

La longitud de les seqüències necessàries per a que es produeixi la regulació difereixen segons el mecanisme de control gènic que es dona. En el cas dels riboswitches de cobalamines, la regulació de la traducció del *btuB* gen requereix que la seqüència del riboswitch estigui formada per aproximadament 240 nucleòtids. Per altra banda, la regulació a nivell de transcripció necessita, a més d'aquesta seqüència esmentada, la presència d'entre 60 i 100 nucleòtids en la regió codificant pròxima.²⁶

Per altra banda, estudis referents a la interacció de l'aptàmer del *btuB* gen d'*E.coli* amb diferents derivats de coenzim B₁₂ han conduït a demostrar com afecta l'estructura de les cobalamines a aquest mecanisme.²⁷ En aquests estudis s'han utilitzat seqüències de 202 nucleòtids que conformen l'aptàmer, en presència de coenzim B₁₂, vitamina B₁₂, factor adenosil-A i adenosilcobinamida.

El factor adenosil-A és un anàleg natural de l'adenosilcobalamina en el qual el grup axial 5,6-dimetilbencimidazol és substituït per 2-metiladenina; aquest existeix preferentment en forma de *base off*. Per altra banda, a l'adenosilcobinamida es té un grup hidroxil en la posició del 5,6-dimetilbencimidazol, fet pel qual aquest derivat també es troba en la forma de *base off*. Finalment, en el cas de la Vitamina B₁₂, la forma és de *base on*, on el lligand axial superior és un grup cianur.

²⁵ M.F. Soulière, A. Haller, T. Santner and R. Micura, *Angew. Chem. Int. Edit.*, 52, 1013, 1874-1877

²⁶ X. Nou and R.J. Kadner, *J. Bacteriol.*, 180, 1998, 6719-6728

²⁷ S. Gallo, M. Oberhuber, R.K.O. Siegel and B. Kräutler, *ChemBioChem*, 9, 2008, 1408-141

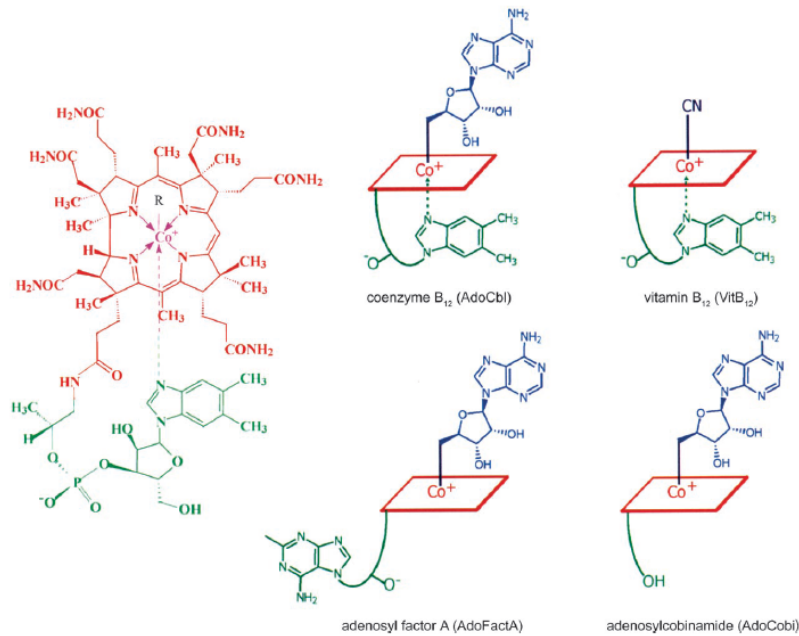


Figura 6. Derivats de B₁₂ utilitzats a l'estudi d'interacció amb el *btuB* gen de *E.coli*²⁷

Mitjançant in-line probing²⁸ s'ha determinat que és l'anell de corrina, i no els lligands axials, el responsable de provocar la reestructuració de l'aptàmer del *btuB* gen i, en conseqüència, provocar un canvi estructural en tot el gen. No obstant, l'ampliació d'aquest estudi permet concloure que els lligands axials contribueixen a l'afinitat d'unió del derivat de B₁₂ al riboswitch de *btuB*, és a dir, son importants per arribar a un complex altament estable entre el derivat i l'RNA. Per les dades experimentals obtingudes es pot concloure que la manca d'un dels lligands axials voluminosos, ja sigui a la posició superior o inferior, provoca una disminució de l'afinitat d'unió.

Finalment, mitjançant l'anàlisi i comparació d'un elevat nombre de genomes de bacteris ha estat possible construir un arbre filogenètic per tots els riboswitches de B₁₂ existents. Cada una de les branques indica els grups taxonòmics presents, tal i com és el cas per exemple de *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* i *Escherichia coli*, els quals posseeixen el *btuB* gen encarregat, com ja s'ha esmentat, del transport de cobalamines.

²⁸ Mètode per assignar els canvis estructurals de l'RNA.

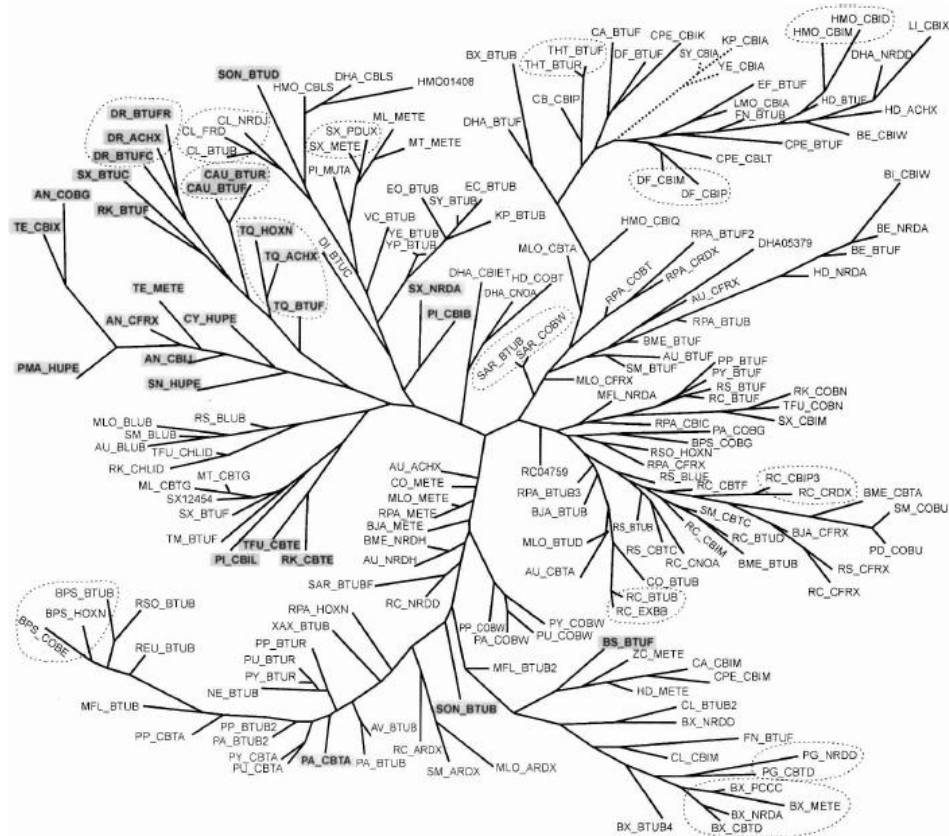


Figura 7. Arbre filogenètic dels Riboswitches de cobalamina.²²

1.4. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae és un bacteri Gram-negatiu de la família *Enterobacteriaceae* present al sistema respiratori i al tracte gastrointestinal humà, a més de ser un patògen comú en hospitals, essent el causant de nombroses malalties infeccioses nosocomials.

Degut al seu potencial infecciós, resulta de gran interès estudiar la seva seqüència riboswitch per determinar la possibilitat de trobar un nou fàrmac que utilitzi com a diana terapèutica aquestes seqüències de control gènica.

Per altra banda, observant l'arbre filogenètic (veure Figura 7) pot comprovar-se com *Klebsiella pneumoniae* pertany a la mateixa branca d'*Escherichia coli* i *Salmonella Typhimurium*, sistemes estudiats i caracteritzats amb anterioritat, allunyant-se emperò d'aquests.

Així doncs, el conjunt d'aquests fets promou l'elecció de la seqüència riboswitch *btub* de *Klebsiella pneumoniae* com a objecte principal d'aquest estudi.

2. OBJECTIUS

L'objectiu general del projecte presentat és:

1. Estudiar la interacció entre el riboswitch de cobalamina de *Klebsiella pneumoniae* i el seu metabòlit, l'Adenosilcobalamina, fent ús de tècniques calorimètriques.

Els objectius específics proposats són:

- 1.1. Estudiar la interacció entre el riboswitch i l'Adenosilcobalamina fent ús d'una seqüència que no conté la plataforma d'expressió; avaluar així si es produeixen diferències per la manca d'aquesta respecte a altres sistemes ja estudiats.
- 1.2. Calcular i analitzar els paràmetres termodinàmics de la interacció abans esmentada en funció de la temperatura. Aquests paràmetres són: constant d'afinitat (K_{aff}), constant de dissociació (K_{D}), variació de l'entalpia (ΔH_{cat}) i estequiometria (n).

3. PROCEDIMENT EXPERIMENTAL

3.1. Instrumentació

El cultiu de bacteris va ser realitzat al laboratori de microbiologia del IUNICS. La incubació de les mostres per la digestió dels plasmidis i la transcripció de l'RNA van ser realitzades amb un Thermomixer Confort de Eppendorf, mentre que pel xoc tèrmic d'aquestes va ser utilitzat un Heat Block de VWR.

Per realitzar la centrifugació de les mostres van ser utilitzades dues centrífugues refrigerades d'Eppendorf: i) 5810R amb dos rotors diferents, F45-6-30 (angle fixe de 45°, per 6 tubs de 50 ml) i S-4-104 (oscil·lant per botelles de volum fins 750 ml o tubs de 15 i 20 ml). ii) 5414R amb un sol rotor F45-24-11 (angle fixe de 45° per a 24 tubs de 1.5-2 ml).

La seqüència del plasmidi va ser confirmada per Sequgen (Sequencing and Molecular Diagnostics, Madrid) utilitzant el *primer* (5'-3') CTA GTT ATT GCT CAG CGG, obtenint-se el resultat en forma reversa.

Les concentracions de les mostres i la dispersió òptica dels cultius (OD_{600}) varen ser mesurades per espectroscòpia UV-vis mitjançant un espectrofotòmetre Ultrospec 7000 de GE Healthcare Life Sciences, utilitzant-se 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 varen ser calculats 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: $\epsilon_{260} = 34700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; $\epsilon_{375} = 10900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; $\epsilon_{522} = 8000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

L'electroforesi realitzada en els gels pel control de la digestió dels plasmidis, la purificació de l'RNA i els assajos en condicions natives va ser duta a terme mitjançant una font d'alimentació EC 300XL de Thermo Scientific. En els gels d'agarosa va ser aplicat un potencial de 2,5 V/cm els 10 primers minuts, mentre que va ser de 5 V/cm durant les 2 hores següents. Aquests van ser revelats en bromur d'etidi dissolt en tampó TAE i van ser visualitzats amb el sistema MiniBIS Pro de DNR bio-imaging Systems. Per altra banda, per la purificació d'RNA van ser utilitzats gels de 45x30 cm² i 1,5 mm de gruixa, en els quals va ser aplicat un potencial de 40 W/gel; mentre que en els gels analítics, de 25x30 cm² i 1,5 mm de gruixa o 25x17 cm² i 0,5 mm de gruixa va ser aplicat, en ambdós casos, un potencial de 20 W/gel.

Les mesures de calorimetria van ser realitzades amb un Nano-ITC low volume de TA Instruments, realitzant-se 17 injeccions, cada una de 3.03 μ l, amb un interval de recollida de dades de 300 segons entre cada una. Els resultats obtinguts van ser analitzats mitjançant el software NanoAnalyze.

3.2. Reactius i materials

Els reactius utilitzats varen ser obtinguts de Merck, VWR, Panreac, Sigma Aldrich, Applichem, Prolabo, Alfa Aesar i Amresco en qualitat *p.a.*, *molecular biology*, *biochemica* o superior.

Tot el material d'un sol ús va ser utilitzat esterifiltrat i lliure d'RNases i DNases. Per altra banda, el material reutilitzable va ser usat després de ser autoclavat 30 minuts a 121°C.

Les dissolucions estoc preparades van ser autoclavades o esterifiltrades, convenientment. L'aigua utilitzada en cada un dels processos va ser de qualitat MilliQ, posteriorment autoclavada i esterifiltrada abans de ser utilitzada.

Per l'estudi, va ser utilitzada la informació genòmica de *Klebsiella pneumoniae*, encara que per motius de seguretat, la producció de plasmidis plantilla va ser duta a terme utilitzant *E.coli*. Els bacteris *E.coli* químicament competents van ser preparats en el mateix grup d'investigació a partir d'*E.coli* DH5- α .

Pel cultiu en plaques va ser utilitzat el medi de cultiu Lysogeny Broth (LB) a concentració igual a 25 g/L i Agar-agar de 15 g/L. Un cop autoclavada aquesta dissolució i deixada refredar, va ser-hi addicionat l'antibiòtic seleccionat, és a dir, ampicil·lina.²⁹ El creixement dels bacteris va dur-se a terme en el medi de cultiu LB a concentració 25 g/L, el qual va ser autoclavat 20 minuts a 121°C i, un cop refredat, va ser-hi addicionat l'antibiòtic ampicil·lina. En ambdós casos, l'ampicil·lina va ser utilitzada a dilució 1:1000 de les alíquotes inicials de 100 mg/ml, fet pel qual la concentració final va resultar de 100 µg/ml.

La purificació del DNA va ser duta a terme mitjançant els kits *E.Z.N.A. Plasmid Maxi Kits* de Omega bio-tek. Per la separació del DNA van ser preparats gels d'agarosa a l'1% en TAE Buffer 1X. Aquest va ser preparat a partir del tampó 50X: 2 M Tris-acetat (2 M Tris base, 1 M àcid acètic) i 50 mM EDTA (pH=8.3).

L'enzim *T7 RNA polimerasa* també va ser produït en el mateix grup. El tampó de transcripció va ser TXN Buffer 10X: 400 mM Tris·HCl (pH =7.5), 20 mM espermidina i 50 mM DTT (DL-ditiotreitol). Aquesta dissolució va ser esterifiltrada i guardada a -20°C.

L'enzim de restricció *HindIII* per la linealització del plasmidi de DNA va ser obtingut de Fermentas GmbH.

Per la purificació de l'RNA van ser utilitzats gels desnaturalitzants d'acrilamida (PAGE 10%): 7M urea, 10% acrilamida i 1X TBE. En aquests, va ser utilitzada una dissolució al 40% d'acrilamida-bisacrilamida en proporció 29:1. El tampó utilitzat per dur a terme l'electroforesi d'aquests gels va ser TBE 1X a partir de l'estoc 10X, proporcionant aquest darrer les següents condicions: 890 mM Tris base, 890 mM àcid bòric i 20 mM EDTA (pH=8.3).

²⁹ Cal deixar refredar la dissolució degut a que l'antibiòtic es degrada a elevades temperatures.

Per estudis en condicions natives van ser utilitzats gels d'acrilamida (PAGE NATIU al 6%): 6% acrilamida i 1X Native Buffer. El tampó va ser preparat a partir de Native Buffer 5X: 170 mM Tris-acetat, 15 mM MgCl₂ i 0,36 M HEPES (pH=7.5).

Per la polimerització del gels d'acrilamida van ser utilitzats com a catalitzadors APS (persulfat amònic) 10% (m/v) i TEMED (tetrametiletilendiamina). Així doncs, la dissolució del gel va resultar en una concentració final igual a 0,05% en APS i 0,05% en TEMED. Per la separació de l'RNA purificat del gel d'acrilamida va ser utilitzat Crush and Soak Buffer: 10 mM MOPS (pH=6.0), 1 mM EDAT i 250 mM NaCl.

L'estudi de calorimetria va ser realitzat amb tampó ITC Buffer 1X, per dilució del corresponent tampó a concentració 10X proporcionant aquest darrer les següents condicions: 1 M HEPES·KOH (pH=7.5), 1 M KCl i 50 mM MgCl₂.

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 riboswitch de cobalamina²² va ser trobada a la regió sense traduir 5'-UTR, concretament a partir de la posició 4660061. Aquesta seqüència d'interès és la mostrada a continuació.

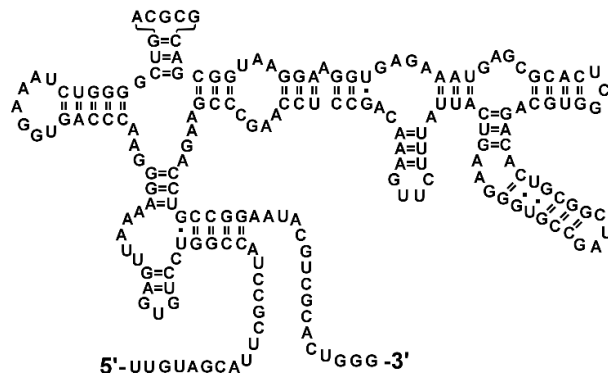


Figura 8. Seqüència proposada de DNA que codifica pel riboswitch d'estudi.

Per la realització d'aquest estudi van ser dutes a terme una sèrie de modificacions en la seqüència original:

- a) Amb la finalitat de comptar amb un bon inici de la transcripció, la cadena inicial de l'extrem 5' va ser retallada abans de la primera zona d'aparellament i van ser introduïdes tres guanines. D'aquesta modificació resulta una cadena que s'inicia amb la seqüència GGGA.

b) Les bases originals T₂₁₃ i C₂₁₄ van ser mutades per A₂₁₃ i G₂₁₄, introduint-se d'aquesta manera un punt de tall, just abans de la zona anti-RBS, per l'enzim de restricció *HindIII*³⁰: A^AGCT_T.

c) Al triplet iniciador del gen, va ser introduïda la darrera mutació, en la qual les bases A₂₄₁, T₂₄₂ i G₂₄₃ van ser canviades per C₂₄₁, G₂₄₂ i A₂₃₂. Així, va ser possible la introducció de la seqüència de reconeixement per l'enzim de restricció *XhoI*: C^TCGA_G.

D'aquesta manera, la seqüència dissenyada per actuar com a riboswitch de cobalamina va ser introduïda entre el promotor de la *T7-RNA polimerasa* i el primer codó del *btuB* gen. Així doncs, en presència de *HindIII* com a únic enzim de restricció va ser possible treballar amb una seqüència riboswitch més curta, la qual té manca de la plataforma d'expressió.

La seqüència dissenyada, la qual codifica pel *btub* riboswitch de B₁₂, es va sintetitzar per GenScript (USA) i va ser subclonada dins un plasmidi el qual conté el promotor de la *T7-RNA polimerasa* i posseeix resistència a l'antibiòtic de selecció, l'ampicil·lina.

Taula 2. Seqüència del plasmidi pMB01 en sentit 5'-3'. En blau s'indica el promotor de la *T7-RNA polimerasa*. En taronja es mostren les tres guanines introduïdes per tenir un bon inici de la transcripció, la qual s'inicia després de la TATA box. En vermell es marca la seqüència de restricció per l'enzim *XhoI*. Finalment, en verd es marca el punt de tall d'interès per l'estudi, la seqüència de restricció per l'enzim *HindIII*.

```
5'-T AATA CGAC TCAC TATA GGG 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'
```

3.4. Transformació del plasmidi en bacteris *E. coli* químicament competents

El plasmidi dissenyat va ser transformat dins bacteris *E. coli* químicament competents *DH5-α*. Les cèl·lules químicament competents tenen la capacitat d'integrar material genètic exogen, en aquest cas el plasmidi d'interès per l'estudi. Per tal de conferir aquesta capacitat, les cèl·lules han estat modificades químicament mitjançant la utilització de tampons i sals que provoquen un xoc osmòtic el qual confereix porositat a la membrana cel·lular, permetent l'entrada del material genètic del plasmidi.

Per dur a terme aquesta transformació, van ser adicionats 2 µl de plasmidi a 100 µl de cèl·lules químicament competents, agitant amb cops suaus amb el dit i van ser incubats 10 minuts en gel. Posteriorment, va ser aplicat un xoc tèrmic, sense agitació, durant 3 minuts a 37°C i, de nou, la mescla va ser incubada 3 minuts en gel. Seguidament, van ser adicionats 500 µl de medi de cultiu LB de 25 g/l sense ampicil·lina i el conjunt va ser incubat 30 minuts a 37°C i 400 rpm.

³⁰ Els enzims de restricció escindeixen enllaços fosfodièster del material genètic a partir d'una seqüència palindròmica de reconeixement. En el cas de l'enzim *HindIII*, aquest escindeix el DNA en presència de Mg²⁺ per la seqüència A^AGCT_T: on ^ indica la posició de tall en la cadena 5', mentre que _ indica la posició de tall en la cadena 3'.

A continuació, la mescla va ser centrifugada 2 minuts a 4°C i 800 rpm i va ser eliminat part del sobrenedant fins obtenir un volum d'entre 50-100 µl, en el qual van ser resuspeses les cèl·lules transformades. Una placa Petri d'LB-Agar amb ampicil·lina va ser sembrada, en entorn innocu i de forma homogènia, amb 50 µl de la resuspensió. Aquesta va ser incubada durant un vespre a 37°C.

Passat aquest temps i després del recompte de colònies, varen ser seleccionades les de millor aspecte seguint amb el criteri següent: aquestes havien de ser petites i arrodonides, independents cada una de les altres i de color blanc opac. Un cop produïda la selecció, la colònia d'interès va ser agafada amb una punta de pipeta i va ser inoculada en un tub de cultiu que contenia 6 ml de medi de cultiu LB de 25 g/l amb ampicil·lina. Els quatre tubs resultants varen ser incubats entre 6 i 8 hores a 37°C i 220 rpm.

Un cop passat aquest temps, per tal de preparar un estoc, varen ser preparades alíquotes de 500 µl de medi de cultiu en glicerol autoclavat (1:1) i varen ser guardades a -80°C per posteriors usos.

3.5. Producció del plasmidi

Per la producció del plasmidi van ser preparats quatre erlenmeyers amb 400 ml de medi de cultiu LB, els quals van ser autoclavats 20 minuts a 121°C. Un cop refredats va ser-hi addicionada l'ampicil·lina.

Cada medi va ser inoculat amb el contingut d'un dels tubs de cultiu generats anteriorment i incubat durant un vespre a 37°C i 220 rpm. Passat aquest temps, va ser determinat el valor de OD₆₀₀ el qual va ser igual a 2,05.³¹

A continuació, les cèl·lules van ser decantades per centrifugació i el plasmidi va ser extret i purificat segons el protocol de *E.Z.N.A Plasmid Maxi Kit*, utilitzant-se 4 kits pel volum total de cultiu. El plasmidi va ser precipitat emprant 1/10 (v/v) de NaCl 5M i 0,7V de Isopropanol. El pellet de DNA obtingut del procés va ser resuspès en 1 ml d'aigua i va ser mesurada la concentració de plasmidi resultant per UV-vis.

Amb la finalitat de comprovar la seqüència del plasmidi, una mostra d'aquest va ser enviada a seqüenciar. Finalment, la dissolució de plasmidi va ser guardada a -20°C.

3.6. Digestió del plasmidi amb l'enzim de restricció

Amb la finalitat de conèixer les condicions òptimes de digestió del plasmidi, van ser preparades una sèrie de reaccions en les que la concentració de plasmidi i d'enzim *HindIII* va mantenir-se constant i el temps de la digestió va variar-se.

Per efectuar aquest estudi van ser preparats una sèrie de vials, cada un dels quals contenia 100 µg de plasmidi (43,8 µl) als que van ser addicionats 40 µl de tampó RBuffer 10X (corresponent a l'enzim

³¹ El valor de OD₆₀₀ permet determinar el grau de creixement cel·lular. Així doncs, per un valor de OD₆₀₀ igual a 1 es tenen 8·10⁸ cèl·lules/ml.

Procediment experimental

HindIII) i 200 unitats d'enzim *HindIII* (20 µl). El plasmidi va ser digerit a 37°C i 300 rpm, retirant els vials després de 1, 2, 3 i 4 hores de reacció.

A continuació, va ser comprovat quin era el temps més idoni de digestió mitjançant un gel d'agarosa 1% tal i com es mostra a la Figura 9. Les mostres carregades van preparar-se a partir de 5 µl de plasmidi digerit més 1 µl de LD 6X, a més del control de tall.

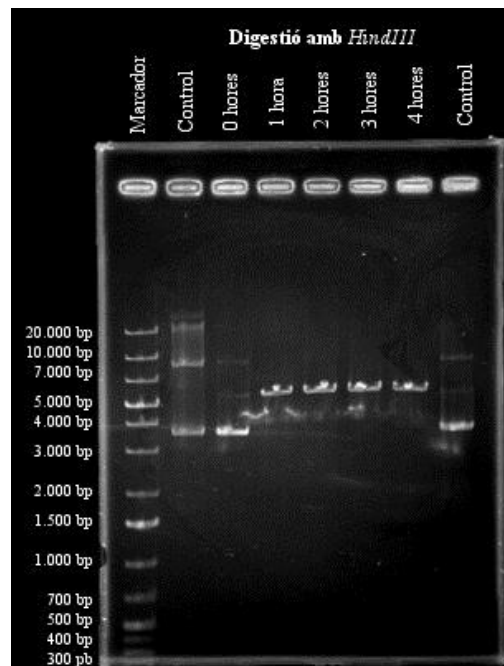


Figura 9. Gel d'agarosa 1% per determinar les condicions òptimes de tall del plasmidi. A l'esquerra es mostra el marcador de pesos moleculars (ladder), el control de tall, seguida d'una mescla de plasmidis preparada amb anterioritat. Seguidament un plasmidi control sense tallar, igual que la mostra present a la dreta del gel. Entre mig dels dos controls es carreguen les mostres de plasmidi digerides amb *HindIII* per ordre creixent en hores de la reacció.

Els resultats obtinguts van concloure que les condicions òptimes de digestió amb l'enzim *HindIII* van ser assolides a les 4 hores. Així doncs, les properes digestions van ser realitzades a partir de 100 µg de plasmidi, 200 unitats de *HindIII*, 1X de RBuffer 10X en un volum total de 400 µl a 37°C i 300 rpm durant 4 hores. Finalment, una vegada digerit el plasmidi, va produir-se la inactivació tèrmica de l'enzim a 80°C durant 20 minuts.

3.7. Síntesi d'RNA

Degut a que la síntesi d'RNA havia de produir-se amb la proteïna *T7-RNA polimerasa* sintetitzada al propi grup d'investigació i no amb una proteïna comercial, va ser imprescindible efectuar diverses proves per establir la concentració òptima d'aquesta.

Aquest assaig va dur-se a terme sota les següents condicions en un volum total de reacció igual a 50 µl: 20 µg/ml de plasmidi pMP01 digerit i inactivat, 5 mM dels corresponents nucleòtids trifosfat, 30 mM

Procediment experimental

MgCl₂, 1X TXN Buffer, 0.01% Triton-X-100 i quantitats ascendents de *T7-RNA polimerasa* (0, 30, 40, 50, 60, 70 µg/ml), tal i com es pot observar a la Taula 3. Varen ser preparades totes les mescles de reacció i aquestes van ser incubades 5 hores a 37°C i 300 rpm. A continuació, les mostres van ser centrifugades 2 minuts a 4°C i 6000 rpm.

Taula 3. Condicions de reacció de l'assaig efectuat per determinar la concentració òptima de *T7-RNA polimerasa*.

Reacció	1	2	3	4	5	6
pMB01 (µg/ml)	20					
MgCl ₂ (mM)	30					
NTP (mM)	5					
<i>T7-RNA polimerasa</i> (µg/ml)	0	30	40	50	60	70

De la mescla resultant van retirar-se 40 µl de sobrenedant i hi van ser addicionats 20 µl de FLB. Amb les mostres va ser carregat un gel d'acrilamida desnaturalitzant del 10% de 25x30 cm² i va deixar-se córrer durant 3 hores a 20 W.

Un cop van ser comprovats els resultats fou possible determinar que les condicions òptimes per la transcripció van donar-se sota una concentració de *T7-RNA polimerasa* igual a 70 µg/ml (Figura 10).

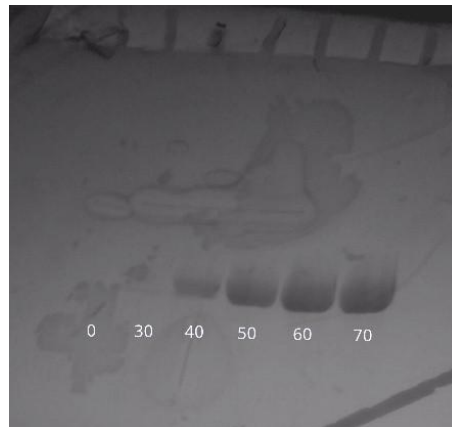


Figura 10. Imatge del gel d'acrilamida desnaturalitzant al 10%. Es pot observar la màxima aparició d'RNA per una concentració de *T7-RNA polimerasa* igual a 70 µg/ml.

Així doncs, a les properes transcripcions van realitzar-se 24 reaccions de volum total igual a 1 ml cada una d'elles, seguint amb les condicions estipulades: 20 µg/ml de plasmidi pMP01 digerit i inactivat, 5 mM NTP, 30 mM MgCl₂, 1X TXN Buffer, 0.01% Triton-X-100 i 70 µg/ml *T7-RNA polimerasa*. Les mostres van ser incubades cada cop durant 5 hores a 37°C i 300 rpm.

Passat aquest temps, van ser centrifugades durant 2 minuts a 4°C i 6000 rpm per tal d'eliminar els pirofosfats inorgànics. A continuació, el sobrenedant va ser transferit a tubs de centrifuga Falcon per dur a terme de precipitació de l'RNA a -20°C durant una nit, utilitzant-se 2,5 volums d'etanol fred (-20°C) i NaCl 5M fins obtenir una concentració final de 250 mM.

Transcorregut aquest temps, les mostres van ser centrifugades durant 30 minuts a 4°C i 12000 g, obtenint-se així el pellet d'RNA, i va eliminar-se l'etanol residual en el concentrador. L'RNA resultant va ser resuspès en 3,5 ml d'aigua per tal de dur a terme la purificació d'aquest.

3.8. Purificació de l'RNA

La purificació de l'RNA obtingut va dur-se a terme mitjançant electroforesi en gel d'acrilamida desnaturalitzant al 10%. Per la preparació dels dos gels van ser utilitzats 500 ml d'acrilamida al 10% i van addicionar-se 2,5 ml de persulfat amònic (APS) al 10% i 250 µl de tetraetilendiamina (TEMED).³² Amb la dissolució resultant van ser carregats ambdós gels de 45x30 cm² i 1,5 mm de gruixa i van deixar-se polimeritzar.

A la mostra de 3,5 ml d'RNA van ser addicionats 1,5 ml de tampó de càrrega ULB 3X i van carregar-se els dos gels, els quals van fer-se córrer a 40W/gel, durant 5 hores.

Passat el temps estipulat, ambdós gels van ser retirats dels suports de l'aparell d'electroforesi i depositats sobre una placa de cromatografia de capa fina amb indicador UV. La regió del gel que contenia l'RNA va ser comprovada mitjançant llum ultraviolada de 254 nm. L'ombra formada per la presència de l'RNA va ser tallada amb ajuda d'un bisturí i va fer-se passar a través d'una xeringa amb la finalitat d'obtenir fragments més petits. La mostra resultant va guardar-se a -20°C durant una nit per tal de facilitar el procés d'extracció posterior.

L'extracció de l'RNA del gel d'acrilamida va dur-se a terme mitjançant Crush and Soak, mètode d'extracció sòlid-líquid. Per tant, als tubs que contenien el gel i l'RNA van ser addicionats 3 volums de Crush and Soak Buffer i agitats al vòrtex. A continuació, van ser disposats en un agitador rotatori durant 2,5 hores a 4°C, agitant el contingut en el vòrtex cada 30 minuts.

Finalment, els tubs van ser centrifugats durant 15 minuts a 4°C i 12000 g per tal de separar el gel del sobrenedant que contenia l'RNA diluït. D'aquest sobrenedant resultant van ser preparades vàries alíquotes de 12,5 ml a les quals van addicionar-se etanol a -20°C i NaCl 5M sota les mateixes condicions esmentades en la síntesi de l'RNA, per tal de dur a terme la precipitació durant una nit.

Un cop produïda l'extracció i la precipitació de l'RNA, els tubs resultants van ser centrifugats durant 30 minuts a 4°C i 15000 g. El sobrenedant resultant va retirar-se amb molta cura i el pellet resultant va ser assecat en el concentrador durant 30 minuts a temperatura ambient. El pellet sec va ser resuspès amb 100 µl d'aigua per tub i les alíquotes resultants van ser recollides en un tub net. Els tubs resultants

³² El TEMED catalitza la formació de radicals lliures, els quals dirigeixen la reacció a partir de l'ió persulfat que s'addiciona en forma de APS, el qual actua d'iniciador.

Procediment experimental

van centrifugar-se 10 minuts a 4°C i 12000 g per tal de precipitar i eliminar els possible residus de gel. La concentració de l'RNA resultant va ser comprovada per UV-vis a partir d'una dilució 1:50.

Per tal de concentrar la mostra i dialitzar-la, van utilitzar-se columnes VivaSpin 500. Per la preparació de la columna, aquesta va ser netejada varies vegades durant 10 minuts a 12000 rpm i 4 °C utilitzant: 500 µl d'aigua, 500 µl d'etanol 70% per esterilitzar el sistema i 3x500 µl d'aigua per eliminar els residus d'etanol. Seguidament, la mostra va ser introduïda a la columna i centrifugada sota les mateixes condicions. La seva neteja va donar-se fent passar aigua 5 vegades per la columna, centrifugant cada cop. Finalment, la mostra va ser centrifugada fins obtenir un volum de dissolució igual a 100 µl.

La concentració de la dissolució resultant va ser determinada per espectroscòpia UV-visible a dilució 1:400 i van realitzar-se varies alíquotes per usos posteriors.

3.9. Estudi del plegament de l'RNA

Amb l'objectiu d'estudiar l'efecte del magnesi sobre el plegament i l'estructura secundària de l'RNA, van realitzar-se gels d'acrilamida al 6% en condicions natives, és a dir, sense la presència de cap agent desnaturalitzant com la urea. Així doncs, van ser realitzades diverses reaccions amb concentracions de Mg²⁺ diferents i van mantenir-se constants les concentracions dels altres reactius, en un volum total de dissolució igual a 10 µl: 5 µM RNA, 100 mM KCl, 100 mM HEPES (pH=7,5) i concentracions creixents de MgCl₂ (veure Taula 4.1 i 4.2).

Taules 4.1 i 4.2. Concentracions utilitzades per estudiar l'efecte del Mg²⁺ en el plegament de l'RNA.

Gel 1							
Mostra	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6	1.7
RNA	5 µM						
KCl	100 mM						
HEPES	100 mM (pH=7,5)						
MgCl ₂	0 mM	0,25 mM	0,5 mM	0,75 mM	1 mM	1,5 mM	2 mM

Gel 2							
Mostra	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6	2.7
RNA	5 µM						
KCl	100 mM						
HEPES	100 mM (pH=7,5)						
MgCl ₂	0 mM	1 mM	3 mM	5 mM	10 mM	20 mM	50 mM

Procediment experimental

Les mostres van preparar-se mesclant, en primer lloc, l'RNA i el KCl amb l'aigua i van ser escalfades durant 1 minut a 90°C, desnaturalitzant així l'RNA. Seguidament, van ser addicionats l'HEPES i el MgCl₂, depenent la quantitat d'aquest darrer de la mostra en qüestió, i van ser incubades 30 minuts a temperatura ambient, afavorint d'aquesta manera el correcte plegament de l'RNA. En darrer lloc, van addicionar-se 10 µl de glicerol al 80% a cada mostra.

En aquest cas, van ser utilitzats dos gels d'acrilamida PAGE NATIU 6% (Veure Secció 3.2.) de 25x17 cm² i 0,5 mm de gruixa. Un cop polimeritzats els gels i realitzat el seu muntatge van ser carregats amb les mostres preparades. Finalment, van fer-se córrer durant 3 hores a 4°C i 10W/gel.

3.10. Mesures de calorimetria³³

La valoració calorimetria isotèrmica (ITC) és la única tècnica amb la capacitat de mesurar directament l'energia d'unió de processos biològics, tal com la unió proteïna-lligand, proteïna-proteïna o DNA-proteïna entre d'altres. Així doncs, determina amb elevada precisió el canvis a l'energia de Gibbs, l'entalpia, l'entropia i la capacitat calorífica, paràmetres associats amb la unió que es produeix.

Per tal d'obtenir aquests valors, l'instrument d'ITC mesura la quantitat d'energia que es requereix per mantenir una temperatura constant a la mostra i la cel·la de referència.

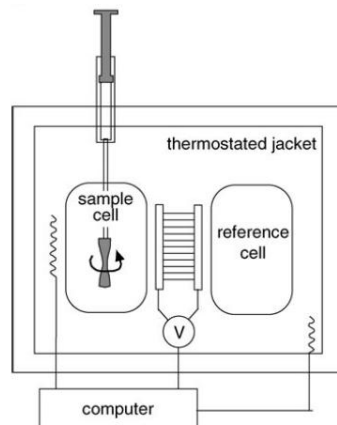


Figura 11. Esquema bàsic de l'aparell d'ITC. Es mostren les dues cel·les, la de la mostra i la de referència, envoltades per una camisa termoestabilitzada, la xeringa d'injecció que també funciona com a dispositiu d'agitació i els sistemes controlats per ordinador.

Inicialment cal l'estabilització del sistema a la temperatura de treball. Posteriorment, cada injecció de valorant desencadena la reacció d'unió entre aquest i la mostra i, depenent de l'afinitat d'unió i la concentració dels reactius, es forma una determinada quantitat del complex mostra-valorant. La formació d'aquest ve acompanyada de l'alliberament o absorció d'energia (en funció de si la reacció

³³ A. Velázquez-Campoy, H. Ohtaka, A. Nezami, S. Muzammil and E. Freire, *Current Protocols in Cell Biology*, 23, 2004, 17.8.1-17.8.24

es exotèrmica o endotèrmica, respectivament) que provoca una diferència de temperatura entre ambdues cel·les. Per tant, el sistema disminueix o augmenta la potencia tèrmica aplicada per compensar el desequilibri de temperatura que es produeix per la reacció. D'aquesta manera, la senyal observada és el valor de la potència subministrada o eliminada per tal de mantenir una temperatura constant a les dues cel·les.

La integració de l'àrea sota els pics, suposant la línia base de referència, proporciona la quantitat de calor associada a la injecció, essent possible la determinació dels paràmetres termodinàmics de la unió en estudi.

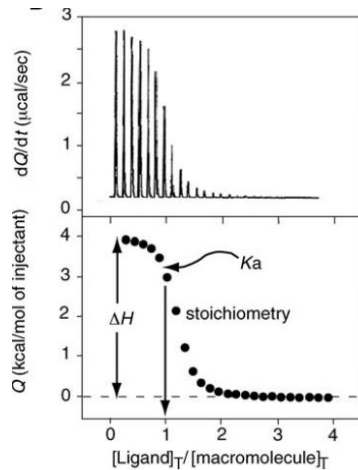


Figura 12. Exemple d'una mesura d'ITC endotèrmica. A la part superior pot observar-se la seqüència de pics corresponent cada un a una injecció de valorant. A la part inferior es mostra el gràfic de la integració de les àrees sota els pics, que permet obtenir els paràmetres termodinàmics de la unió produïda.

Per tal de dur a terme les valoracions calorimètriques correctament, va ser imprescindible la neteja de l'aparell. Així doncs, aquest va ser netejat fent passar una dissolució de SDS al 2% la qual va romandre dins la cel·la de mesura durant 1 hora a 80°C . Després, aquesta solució va ser aspirada i va rentar-se de nou la cel·la, primer amb etanol al 70% i després amb abundant aigua MilliQ autoclavada. Finalment, va deixar-se assecar la cel·la mentre s'estabilitzava tèrmicament durant un vespre a la temperatura de treball seleccionada.

Per a la presa de mesures, va ser necessària la preparació del tampó ITC Buffer 1X i les següents dissolucions: 500 μl de valorant AdoCbl estoc i 250 μl d'RNA, ambdues en ITC Buffer 1X per tal d'eliminar les possibles interferències per reacció del tampó.

Per la preparació de la dissolució de l'RNA va ser descongelat un dels vials de mostra, de 40 μl de volum total, i va aplicar-se un xoc tèrmic a 90°C durant 40 segons, per posteriorment deixar-se refredar en gel. A continuació, van ser adicionats els volums necessaris de ITC 1X i aigua per obtenir una dissolució de 300 μl .

La dissolució d'Adenosilcobalamina va ser realitzada a partir de l'estoc (10 mM) per dilució amb ITC Buffer 1X i aigua per obtenir una dissolució de volum igual a 500 μl . En aquest punt cal remarcar que degut a que l'Adenosilcobalamina conté un enllaç Co-C, el qual és sensible al llum, a l'hora de treballar

Procediment experimental

amb el coenzim B₁₂ va ser necessari fer-ho sota llum vermell degut a que el compost no absorbeix aquesta longitud d'ona.

Per ambdues dissolucions va ser necessari mesurar la seva concentració mitjançant espectroscòpia UV-vis. Així doncs, es va poder concloure que les mesures de calorimetria es durien a terme per una concentració de RNA igual a 12,61 µM; mentre que la concentració de valorant, Adenosilcobalamina, va ser 88,76 µM.

Un cop preparades totes les dissolucions i abans de realitzar les valoracions calorimètriques, les mostres van ser desgasades durant 20 minuts a 25°C i 125 mmHg.

A continuació, van ser injectats 250 µl de ITC Buffer 1X a la cel·la de referència, 250 µl de la dissolució de l'RNA a la cel·la de valoració i va carregar-se la xeringa d'injecció amb 50 µl de la dissolució de coenzim B₁₂. Un cop tancat el sistema, va connectar-se l'agitació i va deixar-se estabilitzar la línia base. Un cop va produir-se l'estabilització va produir-se l'inici de l'experiment, el qual va constar de 17 injeccions de 3,03 µl cada una, separades entre elles 300 segons.

Adicionalment, va ser realitzat un altre experiment, utilitzant els mateixos paràmetres, per tal de determinar el calor de dilució de l'Adenosilcobalamina, amb la finalitat de dur a terme la correcció dels valors obtinguts per la interacció entre el *btuB* riboswitch i el coenzim B₁₂. En aquest, van ser realitzades injeccions del valorant amb la mateixa concentració sobre el dissolvent ITC Buffer 1X.

Finalment, les dades obtingudes van ser analitzades pel software NanoAnalyze.

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1. Seqüenciació del DNA

Després de procedir a la transformació del plasmidi en cèl·lules competents i l'extracció i purificació d'aquest, una mostra va ser enviada a seqüenciar. El resultat de la seqüenciació, la qual va ser duta a terme per Secugen S.L., es mostra parcialment a continuació (veure Figura 13).

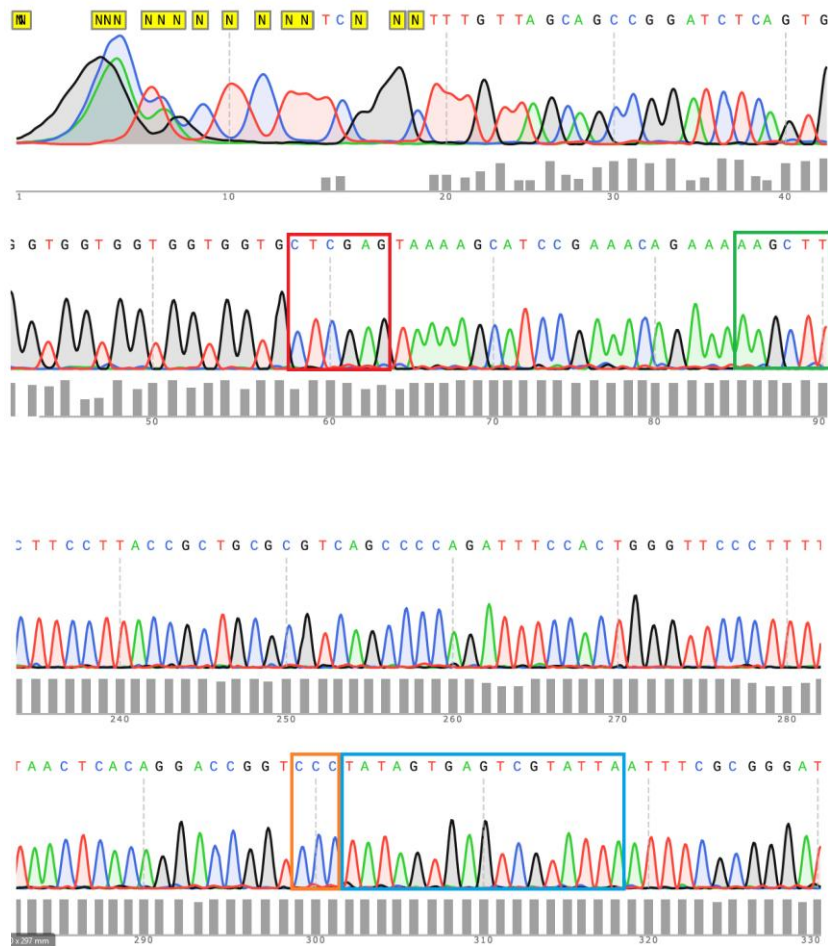


Figura 13. Es mostren part dels resultats de la seqüenciació de la cadena complementària (3'-5'),³⁴ on els nucleòtids Adenina, Guanina, Timina i Citosina es marquen amb les corresponents lletres A, G, T i C. Per altra banda, N marca les posicions dels nucleòtids que no van poder ser identificats amb seguretat. Els distintes colors indiquen: i) En blau es marca el promotor de la *T7-RNA polimerasa*; ii) En taronja es marquen les tres guanines introduïdes per tenir un bon inici de la transcripció; ii) En verd es remarca el punt de tall per l'enzim *HindIII*; iv) Finalment, en vermell s'observa el punt de tall per l'enzim de restricció *XhoI*.

Així doncs, la seqüència corresponent a aquests resultats obtinguts per Secugen S.L., de la cadena directa 5', és la que segueix en la Taula 5.

³⁴ Els resultats sempre son expressats en sentit 5'-3'.

Taula 5. Seqüència de la cadena 5' en sentit 5'-3' del plasmidi pMB01 per tal de comprovar si les mutacions s'han donat correctament. En blau s'indica la seqüència de reconeixement de la *T7-RNA polimerasa*. En vermell es marca la seqüència de restricció per l'enzim *XhoI*. Finalment, en verd es marca el punt de tall per l'enzim *HindIII*.

5'-T AATA CGAC TCAC TATA GGGG 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'

Reunint aquests resultats es pot comprovar com les mutacions produïdes a la seqüència d'interès per tal d'actuar com a *btub* riboswitch de B₁₂ van ser dutes a terme correctament.

Tal i com s'ha explicat anteriorment, la concentració de plasmidi resultant va ser determinada per UV-vis a una dilució 1:20, obtenint-se un valor de 353,1 µg/ml.

4.2. Transcripció

Inicialment, la *T7-RNA polimerasa* reconeix la seqüència promotora de 20 nucleòtids i s'enllaça a la cadena de DNA que la conté, iniciant-se el procés de transcripció a partir de la base que segueix a la TATA-box. És important remarcar que només la cadena 3'-5' és utilitzada com a motlle per la síntesi de l'RNA, fet pel qual aquest tindrà la mateixa seqüència de la cadena 5'-3', amb l'excepció de la timina que serà canviada a uracil.

El plasmidi que va ser utilitzat durant la transcripció, prèviament va ser digerit amb l'enzim de restricció *HindIII*, que presenta la seqüència de tall: A[^]AGCT_T, el qual tal i com s'ha explicat anteriorment, escindeix la cadena 5' després de la primera adenina, mentre que a la cadena 3' actua després de la primera timina.

Per tant, la seqüència de l'RNA sintetitzat en el procés de transcripció (veure Taula 6), resulta en la seqüència proposada en aquest treball per actuar com a *btuB* riboswitch de *Klebsiella pneumoniae*, en el qual existeix manca de la plataforma d'expressió degut al tall produït per l'enzim de restricció *HindIII*.

Taula 6. Seqüència, en sentit 5'-3', de l'RNA proposada per actuar com a riboswitch de cobalamina de *Klebsiella pneumoniae*.

5'-GGGA CCGG UCCU GUCA GUUA AAAG GGAA CCCA GUGG AAU 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'

Tal i com s'ha esmentat a l'Apartat 3.8., la concentració d'RNA va ser determinada per espectroscòpia UV-visible a dilució 1:400, obtenint-se un resultat igual a 94,45 µM.

4.3. Gels nadius

Aquests gels van ser realitzats amb la finalitat d'estudiar l'efecte del magnesi a l'estructura secundària resultant de l'RNA, degut al plegament que es produeix en presència del catió. Els resultats obtinguts són els que es mostren a la Figura 14.

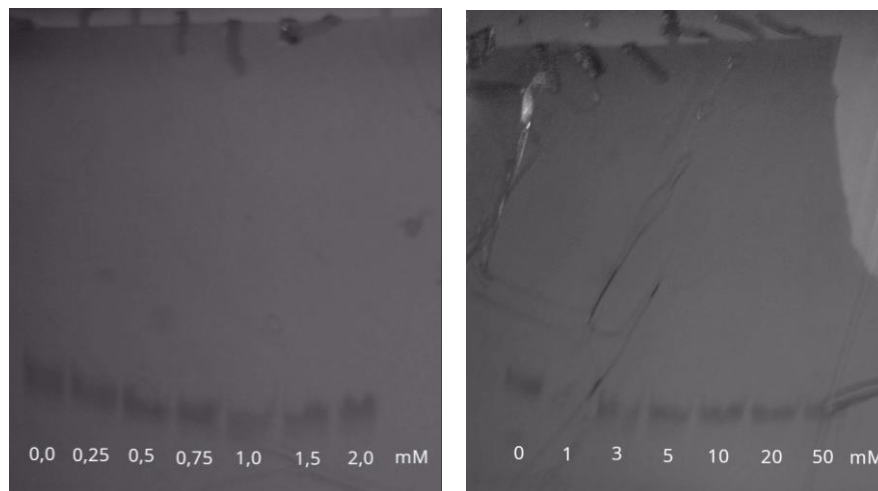


Figura 14. Gels nadius d'acrilamida per avaluar l'efecte del magnesi sobre el plegament de l'RNA. S'observen dos gels diferents: el primer mostra concentracions de magnesi entre 0,0 i 2,0 mM; per altra banda, el segon mostra concentracions entre 0,0 i 50 mM del catió.

El canvi sofert per part l'RNA en funció del magnesi present, pot avaluar-se a partir del recorregut que experimenta dins el gel. Així, aquest recorregut depèn de la càrrega de l'RNA, del seu plegament, radi i la mida de la seqüència. Per tant, degut a que la seqüència i la càrrega són les mateixes, el recorregut només es veu influenciat pel plegament i radi del compost format. Així doncs, a mesura que l'RNA es troba més plegat, el radi és menor i, en conseqüència, experimenta un major recorregut.

Al primer gel pot observar-se com, a mesura que augmenta la concentració de magnesi, la mostra té un recorregut major en el gel. Aquesta tendència continua fins assolir una concentració igual a 1.0 mM, punt en el qual les bandes d'RNA ja no mostren major desplaçament a mesura que augmenta la concentració de magnesi.

En el segon gel s'observa la mateixa tendència que en el cas anterior, essent la banda d'RNA menys intensa a mesura que la concentració de magnesi és més elevada. La disminució de la intensitat de la banda pot ser explicada per la formació d'agregats quan la concentració de magnesi és elevada.

4.4. Mesures de calorimetria

Un cop realitzades les mesures de calorimetria, va ser imprescindible el tractament d'aquestes amb la finalitat d'obtenir els paràmetres termodinàmics d'interès. Els pics obtinguts després de cada valoració

es mostren a la Figura 15, a la qual es representa $\mu\text{J/s}$ en funció del temps i es pot observar la disminució dels pics en altura a mesura que el nombre d'injeccions augmenta.

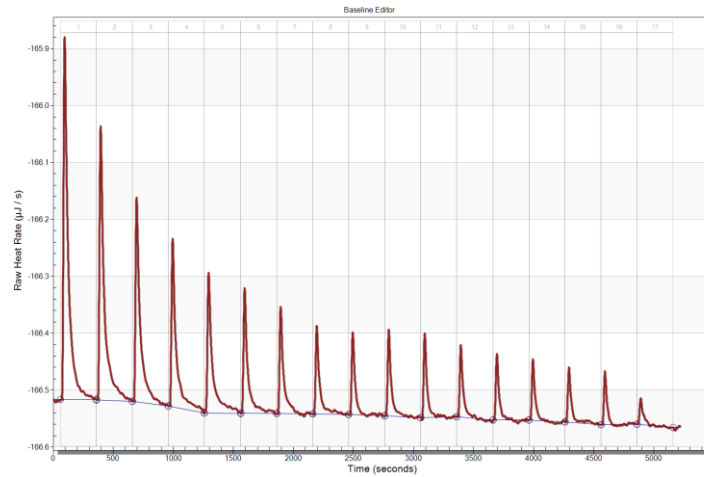


Figura 15. Pics obtinguts després de cada valoració de l'RNA amb Adenosilcobalamina a 25°C. Es representa $\mu\text{J/s}$ en funció del temps.

En aquest punt és important remarcar que el valor de l'àrea sota cada un dels pics és el resultat de la suma del calor de reacció més el calor de dilució de l'Adenosilcobalamina. D'aquesta manera, cal corregir els valors de les àrees mitjançant l'eliminació del calor de dilució.

Per tal d'efectuar aquesta correcció, va ser realitzat un experiment posterior, tal i com s'ha indicat a l'Apartat 3.10. Un cop obtinguts els pics de la valoració del blanc, va ser calculada la mitjana de les àrees i aquest valor va ser restat a cada una de les àrees corresponents a la valoració de l'RNA amb coenzim B₁₂. Un cop produïda la correcció, les dades obtingudes van ser ajustades a un procés independent, representant el resultat a la Figura 16.

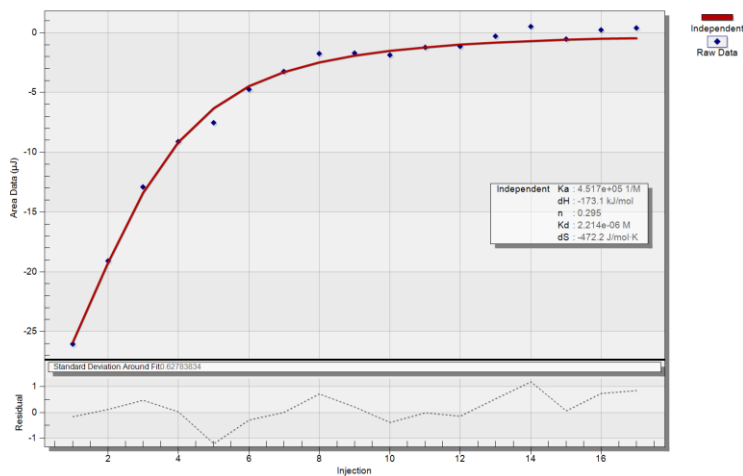


Figura 16. Ajust a un procés independent de les dades obtingudes a 25°C per la valoració d'RNA amb Adenosilcobalamina., a una concentració de Mg^{2+} 20 mM.

Un resum de les constants obtingudes pot ser observat a la Taula 7.

Taula 7. Constants termodinàmiques obtingudes en la valoració de l'RNA amb Adenosilcobalamina, a 25°C, a una concentració de Mg²⁺ 20 mM.

K_a (M⁻¹)	4,09·10 ⁵ ± 6,07·10 ⁴
ΔH (kJ/mol)	-191,25 ± 25,67
n	0,22 ± 0,11
K_D (nM)	2473,5 ± 36,69
ΔS (J/mol·K)	-533,95 ± 87,33

Aquests valors obtinguts poden ser comparats als resultats obtinguts mitjançant un experiment realitzat amb anterioritat al mateix grup d'investigació.³⁵ En aquest cas, va ser utilitzada una seqüència equivalent, que contenia emperò la plataforma d'expressió. La seqüència proposada per actuar com a riboswitch estava formada per 243 nucleòtids i va ser preparada mitjançant la digestió del plasmidi amb l'enzim *XhoI*. Per altra banda, el procés de síntesi i purificació de l'RNA va ser dut a terme de manera equivalent al procés explicat a aquest treball. Els resultats obtinguts en aquest cas son els exposats a la Taula 8.

Taula 8. Constants termodinàmiques obtingudes en la valoració de l'RNA JP01 amb Adenosilcobalamina, a 25°C, amb una concentració de Mg²⁺ 5 mM.

K_a (M⁻¹)	1,89·10 ⁶ ± 2,04·10 ⁵
ΔH (kJ/mol)	-119,60 ± 2,50
n	1,00 ± 0,30
K_D (nM)	530 ± 57
ΔS (J/mol·K)	-281,20 ± 9,10

La notable diferència en el valor de la constant de dissociació, essent major per la seqüència MB01, resulta en un fet incoherent degut a que aquesta, pel fet de ser una seqüència de menor longitud en comparació amb JP01 la qual conté la plataforma d'expressió, hauria de tenir un valor de constant de dissociació menor.

³⁵ J. Palou-Mir, et al., *Characterization of the full-length btuB riboswitch from Klebsiella pneumoniae*, *J. Inorg. Biochem.*, 2015, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.12.012>

Per altra banda, el valor de n obtingut per la interacció entre l'RNA d'aquest estudi i Adenosilcobalamina resulta difícil d'explicar. Tal i com es pot observar en el cas de la seqüència més llarga, s'espera que l'estequiometria de la reacció RNA-AdoCbl prengui un valor 1:1. En el cas que ens concerneix, aquesta estequiometria no es compleix. Aquest fet resulta difícilment justificable, però podria explicar-se degut a la possible degradació de l'RNA o a la presència d'agregats per l'elevada concentració de Mg^{2+} utilitzada.

Finalment, pel que fa al valor d'entalpia resulta contradictori l'obtenció del valor de MB01, el qual correspon a un procés més exotèrmic en comparació amb JP01. En realitat, s'esperaria que el valor més elevat d'entalpia fos el corresponent a JP01 degut a la presència d'interaccions addicional com a conseqüència d'una seqüència més llarga.

Així doncs, si es focalitza l'atenció en aquests resultats discordants, resulta d'elevada importància continuar amb l'estudi d'aquesta seqüència, per tal d'esbrinar les causes concretes d'aquestes diferències i establir les condicions més òptimes de treball per tal de que el procés es doni correctament.

5. CONCLUSIONS

Les conclusions que es poden extreure de la realització d'aquest treball son les que continuen:

1. Ha estat possible el disseny de la seqüència que codifica per al *btuB* riboswitch de *Klebsiella pneumoniae*, el qual respon a la presència d'Adenosilcobalamina. Aquesta seqüència té manca de la plataforma d'expressió, fet que marca una diferència amb els estudis realitzats amb anterioritat.

2. El plasmidi ha estat preparat per la transformació dins cèl·lules químicament competents d'*Escherichia coli*.

3. La digestió del plasmidi amb l'enzim de restricció *HindIII* s'ha dut a terme sota les condicions òptimes estudiades amb anterioritat.

4. Després de la linealització del plasmidi, ha estat possible la producció *in vitro* de l'RNA corresponent al B₁₂ riboswitch d'estudi.

5. Gràcies a l'electroforesi en condicions natives, s'han pogut establir les condicions de catió magnesi sota les que es dona el plegament de l'RNA o bé existeix presència d'agregats.

6. Els estudis de calorimetria ITC han permès determinar les constants termodinàmiques implicades a la reacció entre l'RNA preparat i l'Adenosilcobalamina. Aquest fet ha permès la comparació amb dades ja existents i establir les diferències entre aquestes degut a la mida de la seqüència utilitzada, segons la presència o manca de la plataforma d'expressió, i la concentració de Mg²⁺ que implica la presència d'agregats.

A títol personal aquest treball m'ha permès la introducció dins una branca de la Química Bioinorgànica de la que els coneixements eren bàsics.

Aquest fet m'ha brindat la oportunitat d'assolir tota una sèrie de coneixements nous, tant a nivell teòric per la recerca d'informació, l'aprenentatge d'un camp d'investigació desconegut i la redacció de la present memòria; com a nivell experimental, pel fet de treballar sota una metodologia desconeguda fins al moment.

En conjunt, aquest treball suposa una passa endavant a nivell acadèmic i personal.