

RNAs Autocatalíticos: Ribozimas de Cabeza de Martillo

Ricardo Flores, Alberto Carbonell, Marcos de la Peña y Selma Gago

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC), Universidad Politécnica de Valencia, Avenida de los Naranjos, Valencia 46022

Introducción. Perspectiva histórica

La mayor parte de los virus de plantas tienen como material genético RNA (por lo que abreviadamente se les denomina ribovirus) de simple cadena. Una manera de contrarrestar sus efectos patogénicos sería disponer de ribonucleasas (RNAsas) que catalizaran la degradación específica de estos RNAs sin afectar a los de la célula huésped donde se replican y acumulan. La evolución ha diseñado una estrategia de esta naturaleza, aunque en un contexto distinto. Las bacterias codifican las llamadas enzimas de restricción, que les permiten defenderse de la invasión por ciertos virus (bacteriófagos, o simplemente fagos) cuyo material genético está compuesto de DNA bicatenario. Estas enzimas son desoxiribonucleasas (DNAsas) y operan reconociendo motivos de cuatro o más nucleótidos consecutivos presentes en el DNA del fago, que es así degradado selectivamente (a esto hace referencia el calificativo “de restricción”). Aunque las bacterias son también invadidas por fagos de RNA, por razones que ignoramos no han desarrollado RNAsas de restricción, enzimas que tampoco han sido descritas en organismos eucarióticos. La evolución ha dotado a estos últimos con estrategias alternativas: el sistema inmunitario en vertebrados superiores (cuyos efectores específicos son proteínas) que sirve de barrera defensiva frente a virus y otros agentes exógenos, y el recientemente descubierto sistema denominado “RNA de interferencia” (cuyos efectores específicos son pequeños RNAs) que en animales, y particularmente en plantas, también desempeña un papel defensivo frente a virus (además de otras funciones). Como se verá en el capítulo siguiente, un componente clave del sistema de “RNA de interferencia” es el complejo

RISC (de *RNA-induced silencing complex*) que en cierto modo actúa como una RNasa de restricción, si bien con un mecanismo molecular muy distinto al de las DNasas de restricción bacterianas.

Así pues, las RNasas de restricción (empleando este término en sentido laxo, puesto que no existen enzimas de esta clase en sentido estricto) vendrían a ser en cierto modo unas “balas mágicas” porque, convenientemente manipuladas, permitirían la degradación selectiva de RNAs patogénicos, entre los que destacan los RNAs de virus (y viroides). Los viroides causan enfermedades en plantas similares a las inducidas por los virus, pero son estructural, funcional y evolutivamente distintos. Estos patógenos están exclusivamente compuestos por un pequeño RNA circular y son por lo tanto posibles dianas de RNasas de restricción, sobre todo considerando que no codifican proteína alguna por lo que carecen de una cápsida proteica que proteja su genoma (Diener, 2003; Tabler and Tsagris, 2004; Flores et al. 2005a; Flores et al. 2005b). Además, ciertos viroides convenientemente manipulados pueden ser una fuente de RNasas de restricción. Para comprender este último punto es necesario describir cómo se replican estos RNAs.

Las ribozimas de cabeza de martillo y su papel en la replicación de los viroides y RNAs satélites viroidales

La replicación de los viroides transcurre por un mecanismo de círculo rodante (Branch and Robertson, 1984). El RNA viroidal infeccioso, al que por convenio se le asigna la polaridad (+), es capaz de emplear una RNA polimerasa preexistente en la célula huésped para producir cadenas de polaridad complementaria (-). Esta RNA polimerasa, al ser circular el molde sobre el que actúa, es capaz de transcribirlo reiteradamente generando así un multímero formado por varias unidades en tándem. El RNA multimérico (-) puede: i) servir a su vez como molde para la síntesis de un RNA multimérico (+) que es luego procesado a longitud unitaria mediante una RNasa y finalmente circularizado por una RNA ligasa dando lugar a copias del producto de partida, o ii) ser cortado a longitud unitaria y luego circularizado a monómeros (-), que sirven entonces de molde para la síntesis de RNAs multiméricos (+) siguiendo la ruta descrita inmediatamente antes. En las dos variantes de este

mecanismo, denominadas asimétrica y simétrica respectivamente, son requeridas tres actividades catalíticas del tipo RNA polimerasa, RNasa y RNA ligasa. Inicialmente se presumió que las tres residían en proteínas celulares, puesto que los viroides carecen de actividad de mRNAs. A partir de resultados obtenidos fundamentalmente con inhibidores, se comprobó que la síntesis de las cadenas del viroide del tubérculo fusiforme de la patata (PSTVd) y otros miembros de la familia *Pospiviroidae* (que se replican en el núcleo siguiendo la variante asimétrica), era bloqueada por las bajas concentraciones de α -amanitina que típicamente inhiben a la RNA polimerasa II nuclear que cataliza la transcripción de los precursores de los mRNAs (Mühlbach and Sanger, 1979; Flores and Semancik, 1982; Schindler and Muhlbach, 1992). Experimentos similares empleando tagetitoxina (Navarro and Flores, 2000; Navarro et al. 2000) sugieren que una RNA polimerasa cloroplástica específica media la replicaci3n del viroide del manchado solar del aguacate (ASBVd), la especie tipo de la familia *Avsunviroidae* (cuyos miembros se replican en el cloroplasto siguiendo la variante simétrica). Estas RNA polimerasas nucleares y cloroplásticas transcriben en condiciones normales moldes de DNA, por lo que hay que admitir que los viroides son capaces de “manipularlas” para que acepten un molde extraño de RNA. En cuanto a la tercera actividad enzimática, la RNA ligasa (dejemos momentáneamente la segunda), se sabe relativamente poco sobre la biología molecular de estas enzimas (el gen de la primera RNA ligasa de plantas ha sido clonado recientemente). En todo caso parece que RNA ligasas de localizaci3n nuclear y cloroplástica deberían actuar en la replicaci3n de los miembros de las familias *Pospiviroidae* y *Avsunviroidae*, respectivamente.

Volvamos ahora a la segunda etapa de ciclo replicativo, el corte de los intermediarios multiméricos a RNAs de longitud unitaria catalizado en principio por una RNasa. En los viroides de la segunda familia la actividad RNasa no es una enzima convencional (es decir una proteína) sino una ribozima (una enzima compuesta de RNA), de la clase denominada cabeza de martillo, que reside en las propias cadenas viroidales. Este es un descubrimiento clave, con hondas implicaciones funcionales y evolutivas en lo que respecta a los viroides, y con otras que los trascienden y que afectan al objeto fundamental de este capítulo (como se

verá un poco más adelante). No es este el lugar para una exposición detallada de la estructura y mecanismo de acción de las ribozimas, pero sí conviene reseñar que de las varias clases que se conocen, las de cabeza de martillo descubiertas en los viroides (y en ciertos RNAs satélites, estructuralmente parecidos a los viroides pero funcionalmente dependientes de un virus auxiliar) (Prody et al. 1986; Hutchins et al. 1986; Forster and Symons, 1987), son las más sencillas y las que han sido sometidas a un estudio más pormenorizado desde todos los puntos de vista. La ribozima de cabeza de martillo es un pequeño motivo de RNA que a temperatura ambiente, pH en torno a neutralidad y en presencia de un catión divalente (generalmente Mg^{2+}), se autocorta en un enlace fosfodiéster específico por un mecanismo de transesterificación generando extremos 2',3' fosfodiéster cíclico y 5' hidroxilo (Fig. 1). La denominación de cabeza de martillo proviene de su representación inicial en dos dimensiones, que recuerda a la forma de esta herramienta (Fig. 2A), denominación que se sigue usando a pesar de que la conformación tridimensional es bien distinta (ver más abajo).

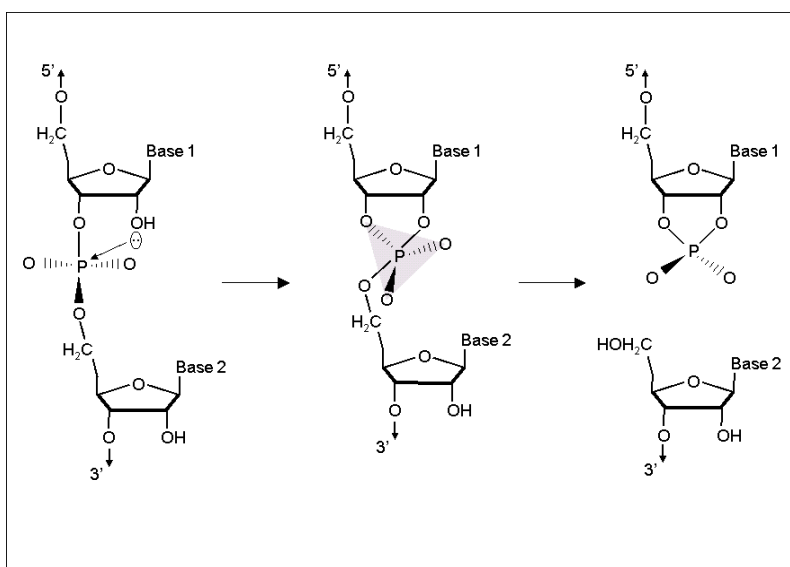


Figura 1. Mecanismo de autocorte de una ribozima de cabeza de martillo. Mediante una reacción de transesterificación y utilizando un catión divalente (generalmente el Mg^{2+}) como cofactor se produce un ataque nucleofílico de un grupo 2' hidroxilo al fósforo del enlace fosfodiéster adyacente. Dicho átomo de fósforo queda pentacoordinado en un estado de transición de bipirámide trigonal en el que los enlaces (2'-oxígeno)-fósforo-(5'-oxígeno) quedan alineados. Los productos resultantes tienen extremos 5' hidroxilo y 2'-3' fosfodiéster cíclico.

Ribozimas de cabeza de martillo: formatos *cis* y *trans*

En la Fig. 2A se muestra una estructura de cabeza de martillo consenso derivada del examen comparado de las estructuras de cabeza de martillo naturales (ver para una revisión Flores et al. 2001). Estas ribozimas contienen un bucle central de nucleótidos estrictamente conservados flanqueado por tres dobles hélices (I, II y III) con mínimas restricciones de secuencia excepto en las posiciones 15.1 y 16.1, que forman un par A-U, y 15.2 y 16.2, y 10.1 y 11.1, que usualmente forman pares C-G y G-C, respectivamente.

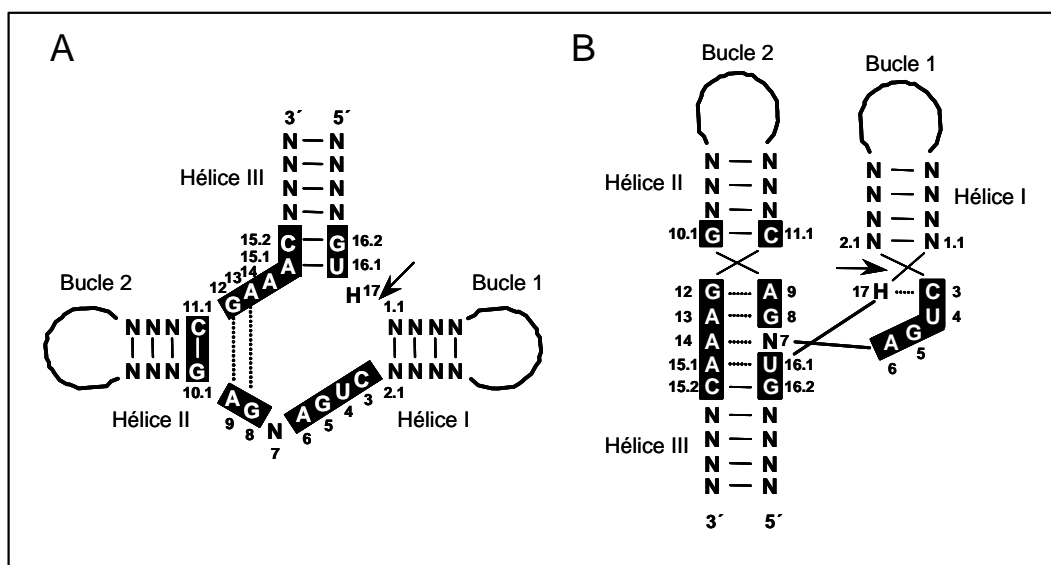


Figura 2. Estructura de la ribozima de cabeza de martillo. (A) Representación esquemática de la secuencia consenso de esta ribozima propuesta originalmente con su correspondiente numeración. (B) Representación esquemática de la misma secuencia consenso de acuerdo a los datos de cristalografía de rayos X obtenidos para una ribozima artificial. Los nucleótidos estricta o altamente conservados en las ribozimas de cabeza de martillo naturales se muestran sobre un fondo negro. El sitio de autocorte se señala con una flecha. N representa cualquier nucleótido y H cualquier nucleótido excepto G. Las líneas continuas y punteadas indican pares de Watson-Crick e interacciones no canónicas, respectivamente.

El análisis por mutagénesis dirigida de una estructura de cabeza de martillo artificial explica la conservación de los nucleótidos del bucle central, ya que su substitución conlleva una caída de la constante catalítica de corte (Ruffner et al. 1990), y estudios de cristalografía de rayos X con otras estructuras de cabeza de martillo artificiales (Pley et al. 1994; Scott et al. 1995) han revelado una compleja distribución de interacciones entre los nucleótidos del bucle central (que por tanto no

están desapareados), y más específicamente de tres pares de bases no canónicos (entre A9 y G12, G8 y A13, y U7 y A14, que extienden la hélice II), y un motivo “giro de uridina” constituido por el tetranucleótido CUGA (posiciones 3-6) que forma el bolsillo catalítico que rodea al sitio de corte (Fig. 2B). Globalmente, la estructura espacial de la ribozima de cabeza de martillo se asemeja a una Y deformada cuya base la constituiría la hélice III y sus dos brazos superiores las hélices I y II (siendo esta última casi colineal con la hélice III) (Fig. 2B).

Es importante señalar que en la replicación de los viroides las ribozimas de cabeza de martillo actúan en *cis*, es decir sobre la propia molécula de RNA que las contiene (lo que en términos cinéticos se denomina un mecanismo de recambio simple). Sin embargo, un experimento sencillo y al mismo tiempo con profundas repercusiones, puso de manifiesto que una ribozima de esta clase podía manipularse en el laboratorio para que actuara en *trans*, descomponiéndola en la ribozima propiamente dicha y el sustrato (Fig. 3), para lo que sólo era necesario abrir el bucle 1 que en principio parecía prescindible (Uhlenbeck, 1987). De esta idea se derivaron dos importantes predicciones: i) debía ser posible diseñar ribozimas capaces de degradar específicamente un RNA determinado (RNAsas de restricción), para lo que sólo era necesario identificar en el RNA diana una secuencia GUX (este triplete precede al sitio de corte en la mayoría de las ribozimas de cabeza de martillo naturales, donde X es cualquiera de las cuatro bases excepto G) (ver para una revisión Flores et al. 2001), y sintetizar la ribozima de manera que sus brazos formaran las hélices I y III con las secuencias del sustrato que flanquean el sitio de corte (Fig. 3), y ii) una molécula de ribozima podría así actuar sobre varias moléculas de sustrato (lo que en términos cinéticos se denomina un mecanismo de recambio múltiple), aumentando la eficiencia del proceso. Ambas predicciones fueron rápidamente comprobadas de forma experimental (Haseloff and Gerlach, 1988), abriéndose el camino a una nueva herramienta biotecnológica a la que muy descriptivamente se le denominó “tijeras genéticas”. En el fondo se trata de una metodología de la clase “RNA antisentido”, pues los brazos de la ribozima son complementarios al sustrato (Fig. 3), con la ventaja de que, como ya se ha dicho, una molécula de ribozima puede mediar la

degradación de varias moléculas de sustrato, comportándose como un catalizador en sentido estricto. En otras palabras, “RNAs antisentido catalíticos”.

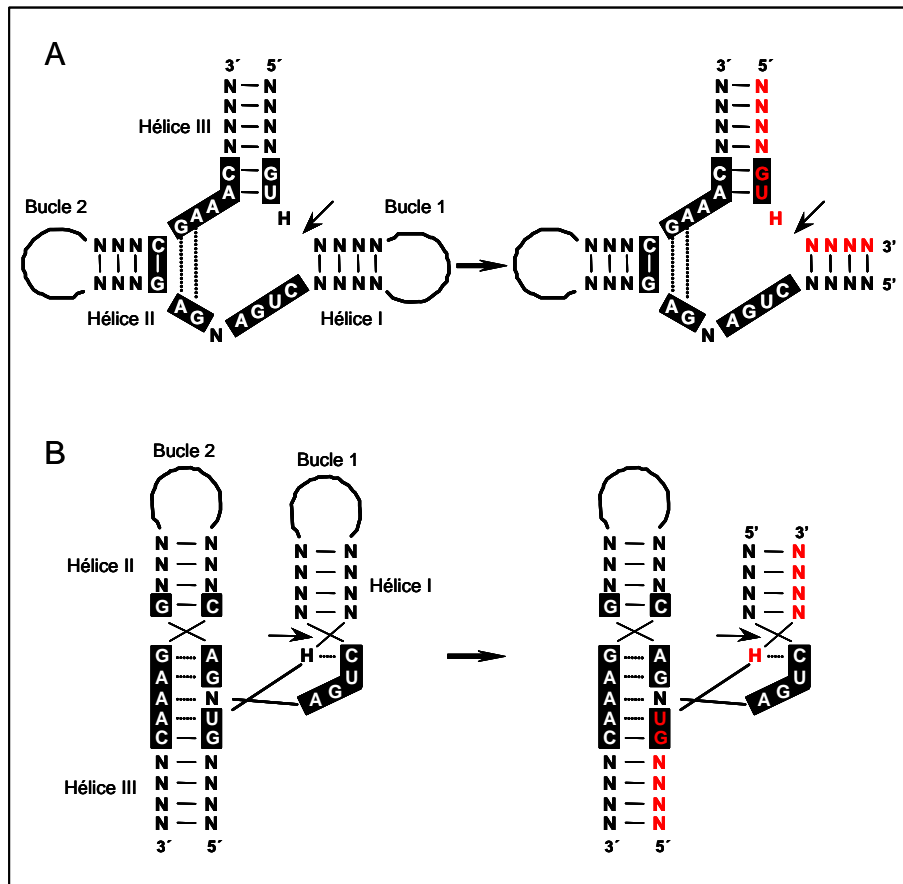


Figura 3. Transformación del formato *cis* de las ribozimas de cabeza de martillo naturales a un formato *trans*. (A) Esquema de la representación original. (B) Esquema de la estructura derivada de datos cristalográficos. La ribozima propiamente dicha se indica en negro y el sustrato en rojo. Las demás símbolos se describen en la figura 1.

Una serie de estudios adicionales refinaron y delimitaron mejor las características de las ribozimas de cabeza de martillo para que su corte en *trans* fuera más eficiente o versátil. Como ejemplos a este respecto se observó que una hélice I de tan sólo tres pares de bases era suficiente para que la ribozima mantuviera su capacidad catalítica, poniendo de manifiesto ciertas ventajas de un diseño asimétrico con hélices I y III de distinta longitud (Tabler et al. 1994), y que la hélice II podía ser reducida a unos pocos nucleótidos dando lugar a lo que se denominaron minizimas (McCall et al. 1992). Asimismo, se comprobó que existían alternativas al triplete GUX que precede al sitio de corte, con AUA como el caso más significativo, que también eran catalíticamente activas (Kore et al. 1998).

Primeros experimentos y primeras dificultades

Una de las aplicaciones iniciales de esta nueva herramienta biotecnológica consistió en la incorporación del dominio catalítico de una ribozima de cabeza de martillo a un RNA antisentido contra el RNA del virus de la inmunodeficiencia humana, comprobándose que cuando ambos RNAs eran cotransfectados en células humanas la presencia del dominio catalítico tenía un efecto inhibitorio sobre la replicación del virus de 4 a 7 veces mayor que el RNA antisentido parental o que un mutante catalíticamente inactivo (Homann et al. 1993). Estos resultados, aunque estimulantes porque demostraron que una ribozima de cabeza de martillo artificial era funcional *in vivo* (previamente se había comprobado que también lo era *in vitro*), pusieron de manifiesto que la eficiencia no era muy alta. Experimentos semejantes se llevaron a cabo en plantas de *Nicotiana clevelandii* en las que se expresó episómicamente (mediante recombinantes del virus X de la patata) un RNA antisentido contra el virus de la sharka (PPV), o una variante del RNA antisentido a la que se había incorporado el dominio catalítico de una ribozima de cabeza de martillo. Tras ser inoculadas con PPV, las plantas mostraron únicamente un cierto retraso en la aparición de síntomas que fue más acentuado con la segunda variante (Liu et al. 2000).

Otros experimentos con RNAs antisentido, con o sin ribozimas de cabeza de martillo contra las cadenas (+) o (-) del viroide de la exocortis de los cítricos (CEVd), expresados transgénicamente en plantas de tomate (un huésped experimental de este viroide), mostraron tras la inoculación un descenso del nivel de acumulación del viroide; sin embargo, esto sólo ocurrió en las construcciones contra la cadena de polaridad (-) (que se acumula *in vivo* considerablemente menos que la de polaridad complementaria) y, además, la incorporación del dominio catalítico no aportó un efecto adicional (Atkins et al. 1995). Por el contrario, en un trabajo muy similar pero con PSTVd y patata, sí que se observó una notable resistencia en las líneas transgénicas expresando las construcciones contra la cadena viroidal de polaridad (-), y el efecto pudo atribuirse al dominio catalítico ya que líneas control en las que este dominio fue inactivado no mostraron resistencia (Yang et al. 1997). La diferencia entre los experimentos en tomate y patata podría deberse a que CEVd y PSTVd se

acumulan a niveles menores en la segunda planta, mientras que la alta tasa de replicación viroidal en la primera sobrepasaría la resistencia aportada por el RNA antisentido catalítico. Un argumento semejante explicaría por qué las ribozimas son más eficientes cuando se dirigen contra la cadena de polaridad (-).

La cuestión de la colocación de la ribozima con su substrato

De lo expuesto en la sección anterior cabe concluir que si bien las ribozimas de cabeza de martillo ofrecen una alternativa muy prometedora para degradar de forma específica ciertos RNAs *in vivo*, quedan dificultades serias por resolver antes que esta tecnología sea aplicable. Un examen más detallado de la cuestión da razón de estas dificultades. Una ribozima de cabeza de martillo efectiva requiere: i) estabilidad frente a RNasas, que para ribozimas que se sintetizan externamente y posteriormente se transfieren puede incrementarse sustituyendo los grupos 2'-OH de las ribosas por otros grupos, ii) expresión en grandes cantidades, que para ribozimas que se sintetizan intracelularmente se consigue colocando las construcciones bajo el control de promotores fuertes, iii) accesibilidad de la ribozima a la región del RNA diana contra la que está dirigida, que resulta difícil de evaluar considerando que dicha región puede formar estructuras secundarias estables o estar asociada a proteínas, y iv) colocación de la ribozima en el mismo compartimiento subcelular donde se encuentra el RNA diana.

Con el fin de atenuar los efectos derivados de la estructura secundaria del RNA diana en torno al sitio de corte, se han diseñado ribozimas producidas intracelularmente capaces de abrir dobles cadenas, para lo que se une a la ribozima un motivo de RNA que interactúa y recluta RNA helicasas intracelulares, creando así una ribozima híbrida con una actividad catalítica significativamente mayor *in vivo* (Kawasaki and Taira, 2002). En cuanto a la relevancia de colocar la ribozima y el RNA diana, esta cuestión ha sido abordada experimentalmente mediante la coexpresión dentro de las mismas células animales de dos vectores retrovirales, uno codificando una ribozima de cabeza de martillo contra un RNA diana artificial y el otro dicho RNA artificial. A causa de la señal de empaquetamiento retroviral común, lo esperable era que la ribozima y el RNA diana se colocaran, y que no sucediera

lo mismo con un control en el que el RNA diana no estaba fusionado al vector viral. Los resultados confirmaron esta predicción: la ribozima redujo el título del virus infeccioso fusionado al RNA diana en un 90%, mientras que no mostró efecto sobre el RNA diana control (Sullenger and Cech, 1993). En un segundo estudio, esta vez empleando levaduras como sistema modelo, una ribozima de cabeza de martillo fue dirigida al nucleolo, fusionándola a un pequeño RNA nucleolar, donde se encontraba su RNA diana (otro RNA nucleolar). Esta colocalización condujo a una eficiencia de cerca del 100% (Samarsky et al. 1999). Una estrategia de esta clase debería ser en principio extrapolable para controlar el PSTVd y otros viroides que se acumulan en el nucleolo.

La cuestión del magnesio: un giro inesperado conducente a una nueva generación de ribozimas de cabeza de martillo

A pesar de las prolijas investigaciones efectuadas sobre las ribozimas de cabeza de martillo (una búsqueda en la base de datos Pub-Med sobre artículos publicados que hagan referencia a palabra “hammerhead” arroja una cifra de más de 1000, y si se restringe la búsqueda a que esta palabra aparezca en el título a más de 500), un aspecto crítico de su funcionamiento no ha quedado resuelto hasta hace muy poco tiempo. Muchos datos obtenidos de estudios con estructuras de cabeza de martillo modelo en *trans* (el diseño de ribozimas dirigidas contra RNAs específicos requiere este formato artificial, que además facilita el análisis cinético en un medio libre de proteínas) indican que el funcionamiento eficiente de las mismas *in vitro* necesita concentraciones de Mg^{2+} de 5-10 mM, mientras que la concentración de este catión *in vivo* es, aproximadamente, de tan sólo 0.5 mM. ¿Cuál es la explicación para esta discrepancia?. Resultados *in vitro* e *in vivo* publicados recientemente (De la Peña et al. 2003; Khvorova et al. 2003), han demostrado que las ribozimas de cabeza de martillo en *cis* (su formato natural) se autocortan mucho más rápidamente que sus derivados en *trans*, y que modificaciones de los bucles periféricos 1 y 2 de ribozimas de cabeza de martillo naturales inducen una drástica reducción de sus constantes catalíticas de autocorte. Estos datos indican que, en contra de la visión generalmente aceptada, regiones externas al bucle central conservado de las estructuras de cabeza de martillo

naturales desempeñan un papel crítico en la catálisis, al tiempo que sugieren la existencia de interacciones terciarias entre los bucles periféricos 1 y 2 que ayudarían al posicionamiento y rigidez del sitio activo, optimizando así la actividad catalítica a las bajas concentraciones de Mg^{2+} existentes en condiciones fisiológicas (Fig. 4).

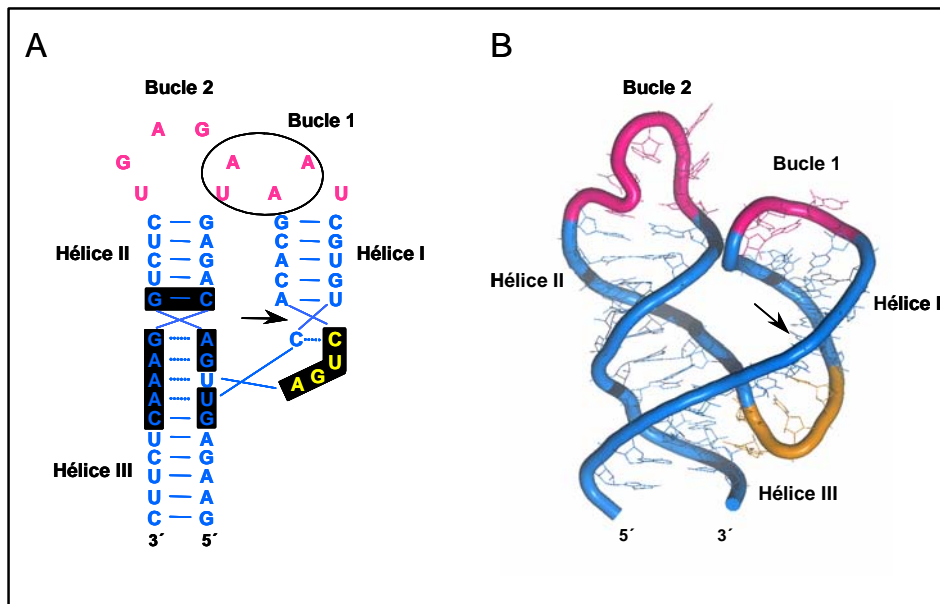


Figura 4. Interacción entre elementos periféricos de una ribozima de cabeza de martillo natural. (A) Representación esquemática de la ribozima de polaridad positiva del viroide del mosaico latente del melocotonero (PLMVd) en la que indica la interacción propuesta entre los bucles 1 y 2. (B) Modelo tridimensional (De la Peña *et al.*, 2003). Las hélices I, II y III se indican en azul, los bucles 1 y 2 en magenta y el bolsillo catalítico en amarillo. Los nucleótidos presumiblemente involucrados en interacciones terciarias entre ambos bucles están rodeados por un círculo.

Además, dichas interacciones podrían ser estabilizadas por proteínas, como sugiere la observación de que una proteína cloroplástica facilita *in vitro*, y presumiblemente *in vivo*, el autocorte de un RNA viroidal mediado por una ribozima de cabeza de martillo (Daròs and Flores, 2002).

Estos resultados, que explican la baja eficiencia *in vivo* de ribozimas de cabeza de martillo con formato *trans*, han proporcionando un nuevo enfoque e impulso al estudio de las mismas. De hecho, ya se han publicado trabajos en los que se mantienen o simulan las interacciones entre los bucles periféricos 1 y 2 (Saksmerprome *et al.* 2004; Weinberg and Rossi, 2005; Burke and Greathouse, 2005), lo que conduce a que esta nueva generación de ribozimas de cabeza de martillo con

formato *trans* actúe mucho más eficientemente en condiciones fisiológicas (Fig. 5). La disección molecular de dichas interacciones ayudará sin duda a mejorar el diseño de las ribozimas futuras. Un primer estudio en esta dirección ha sido recientemente publicado (Martick and Scott, 2006).

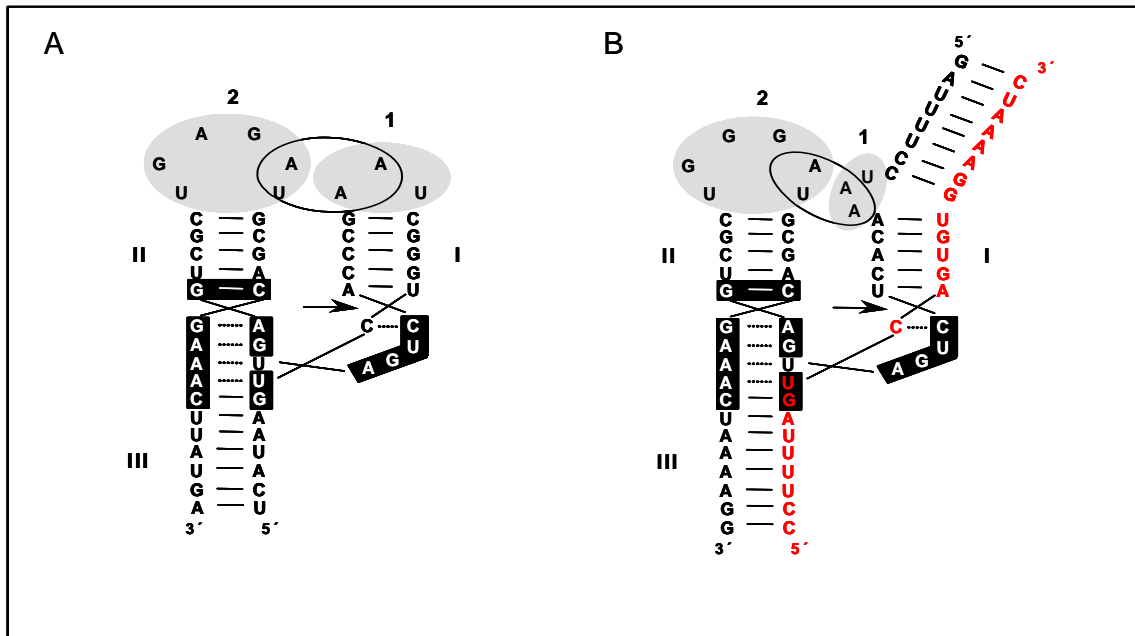


Figura 5. (A) Representación esquemática de la ribozima de cabeza de martillo de polaridad negativa del PLMVd. Los bucles periféricos 1 y 2 de la ribozima se indican sobre fondo gris, y los nucleótidos de ambos bucles que participan en la interacción están representados dentro de un círculo. (B) Representación esquemática de una ribozima de cabeza de martillo artificial con formato *trans* (en negro) y de su RNA sustrato (en rojo). La ribozima fue diseñada a partir de la anterior (Saksmerprome et al. 2004), mantiene las interacciones entre los bucles periféricos 1 y 2, y se une y degrada eficientemente, en condiciones de baja concentración de magnesio, un RNA artificial que corresponde a una porción del genoma del virus 1 de la inmunodeficiencia humana.

Conclusiones y Perspectivas

Una primera lección que se deriva de lo anteriormente expuesto es que el estudio detallado del mecanismo replicativo de un grupo de patógenos de plantas (los viroides), de interés aparentemente marginal, ha conducido al descubrimiento de las ribozimas de cabeza de martillo, con importantes implicaciones biotecnológicas que trascienden a los viroides y a las plantas (y con otras evolutivas, no menos relevantes, que quedan fuera del contexto de este capítulo). La investigación básica ha sido a lo largo de la historia la fuente última de innovaciones, y no debe relegarse en favor de

la exclusivamente dirigida (en palabras de Pasteur, “No existen ciencias aplicadas sino aplicaciones de las ciencias”).

La segunda lección es que, hasta donde sea posible, los sistemas biológicos deben ser estudiados en su contexto natural y con una perspectiva evolutiva (en palabras de Dobzhanski, “Nada en biología tiene sentido excepto a la luz de la evolución”). A pesar de que las ribozimas de cabeza de martillo naturales actúan en *cis*, apenas habían sido analizadas en su hábitat fisiológico debido a las dificultades técnicas que emanan de sus altas velocidades de autocorte (Forster and Symons, 1987; Beaudry et al. 1995; Ambrós and Flores, 1998), del interés aplicado de sus derivados en *trans* contra RNAs específicos (Uhlenbeck, 1987; Haseloff and Gerlach, 1988; Rossi and Couture, 1999), y de datos que indicaban que la constante de velocidad de una ribozima de cabeza de martillo en *cis* era esencialmente igual que la de un variante en *trans* de la misma (Long and Uhlenbeck, 1994) (aunque hay que matizar que la ribozima en *cis* empleada era artificial y con un diseño distinto al de la mayoría de las ribozimas naturales). Por el contrario, un experimento similar con una ribozima natural del PLMVd (Hernández and Flores, 1992) puso de manifiesto que su velocidad de autocorte (en *cis*) era considerablemente mayor (Ambrós and Flores, 1998), planteando la cuestión de si las propiedades catalíticas de las ribozimas naturales y artificiales debían ser necesariamente las mismas. Un argumento evolutivo adicional a favor de este último punto de vista es el siguiente: las ribozimas de cabeza de martillo más eficientes, seleccionadas *in vitro* a partir de una mezcla de oligoribonucleótidos con todas las posibles secuencias en el bucle central, contienen los motivos estrictamente conservados en las ribozimas naturales (Ishizaka et al. 1995; Tang and Breaker, 1997; Eckstein et al. 2001; Salehi-Ashtiani and Szostak, 2001). Esto indica que las ribozimas naturales han sido evolutivamente seleccionadas por optimización de su actividad catalítica, siendo por lo tanto concebible que, además del bucle central conservado, otras propiedades estructurales (como la secuencia y el tamaño de las hélices adyacentes, y de los bucles periféricos que las cierran) pudieran haber sido también seleccionadas para mejorar la actividad catalítica de dichas ribozimas en su contexto natural. Los resultados ya mencionados (De la Peña et al. 2003; Khvorova et al. 2003) muestran que efectivamente es así, explican cómo estas

ribozimas actúan a las bajas concentraciones de Mg^{2+} existentes *in vivo*, y aportan nuevas ideas para mejorar su diseño. Un esquema general que resume el modo de proceder se presenta en la Figura 6.

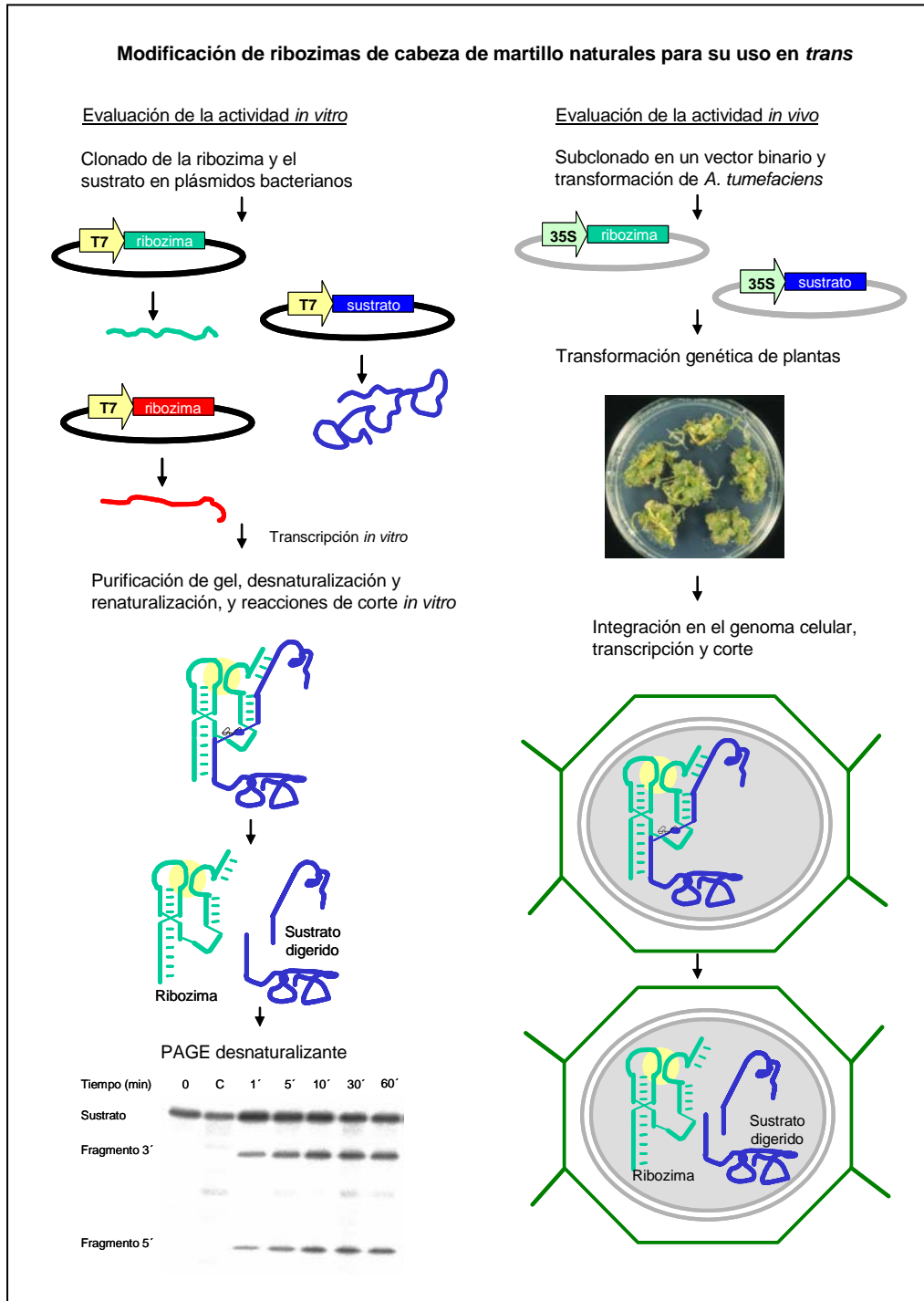


Figura 6. Esquema sobre el modo de proceder para diseñar ribozimas de cabeza de martillo específicas contra un RNA endógeno o foráneo (viral o viroidal). Los círculos con fondo amarillo indican interacciones entre bucles de la ribozima importantes para su eficiencia catalítica a las bajas concentraciones de magnesio existente *in vivo*.

AGRADECIMIENTOS

Nuestro trabajo ha sido sostenido en los últimos años por los Ministerios de Ciencia y Tecnología (MCyT) (BMC2002-03694), Educación y Ciencia (BFU2005-06808/BMC) y por la Generalidad Valenciana (GRUPOS03/064 y ACOMP06/141). Durante el mismo A. C. recibió una beca predoctoral del Ministerio de Educación, Cultura y Deportes (MECyD), M. D. P. una beca predoctoral del MCyT, y S. G. una ayuda del MECyD para la estancia de doctores y tecnólogos extranjeros y una beca posdoctoral de la Fundación “José y Ana Royo”.

LITERATURE CITED

- Ambrós, S., y Flores, R. 1998. *In vitro* and *in vivo* self-cleavage of a viroid RNA with a mutation in the hammerhead catalytic pocket. *Nucleic Acids Res.* 26: 1877-1883.
- Atkins, D., Young, M., Uzzell, S., Kelly, L., Fillatti, J., y Gerlach, W. L. 1995. The expression of antisense and ribozyme genes targeting citrus exocortis viroid in transgenic plants. *J. Gen. Virol.* 76 :1781-1790.
- Beaudry, D., Bussiere, F., Laureau, F., Lessard, C., y Perrault, J. P. 1995. The RNA of both polarities of the peach latent mosaic viroid self-cleavag *in vitro* solely by single hammerhead structures. *Nucleic Acids Res.* 23:745-752.
- Branch, A.D., y Robertson, H.D. 1984. A replication cycle for viroids and other small infectious RNAs. *Science* 223:450-454.
- Burke, D. H., y Greathouse, S. T. 2005. Low-magnesium, trans-cleavage activity by type III, tertiary stabilized hammerhead ribozymes with stem 1 discontinuities. *BMC Biochem.* 6:14.
- Daròs, J. A., y Flores, R. 2002. A chloroplast protein binds a viroid RNA *in vivo* and facilitates its hammerhead-mediated self-cleavage. *EMBO J.* 21:749-759.
- De la Peña, M., Gago, S., y Flores, R. 2003. Peripheral regions of natural hammerhead ribozymes greatly increase their self-cleavage activity. *EMBO J.* 22:5561-5570.
- Diener, T. O. 2003. Discovering viroids—a personal perspective. *Nat. Rev. Microbiol.* 1:75-80.
- Eckstein, F., Kore, A. R., y Nakamaye, K. L. 2001. *In vitro* selection of hammerhead ribozyme sequence variants. *ChemBiochem.* 2:629-635.

- Flores, R., y Semancik, J. S. 1982. Properties of a cell-free system for synthesis of citrus exocortis viroid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79:6285-6288.
- Flores, R., Daròs, J. A., y Hernández, C. 2000. The Avsunviroidae family: viroids containing hammerhead ribozymes. *Adv. Virus Res.* 55:271-323.
- Flores, R., Hernández, C., De la Peña, M., Vera, A., y Daròs, J. A. 2001. Hammerhead ribozyme structure and function in plant RNA replication. *Meth. Enzymol.* 341:540-552.
- Flores, R., Randles, J. W., Owens, R. A., Bar-Joseph, M., y Diener, T. O. 2005a. Viroidae. Pages 1145-1159 in: *Virus Taxonomy. Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, and A. L. Ball, eds. Elsevier/Academic Press, London.
- Flores, R., Hernández, C., Martínez de Alba, A. E., Daròs, J. A., y Di Serio, F. 2005b. Viroids and viroid-host interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:117-139.
- Forster, A. C., y Symons, R. H. 1987. Self-cleavage of plus and minus RNAs of a virusoid and a structural model for the active sites. *Cell* 49:211-220.
- Haseloff, J., y Gerlach, W. L. 1988. Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activity. *Nature* 334:585-591.
- Hernández, C., y Flores, R. 1992. Plus and minus RNAs of peach latent mosaic viroid self cleave in vitro via hammerhead structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:3711-3715.
- Homann, M., Tzortzakaki, S., Rittner, K., Sczakiel, G., y Tabler, M. 1993. Incorporation of the catalytic domain of a hammerhead ribozyme into antisense RNA enhances its inhibitory effect on the replication of human immunodeficiency virus type 1. *Nucleic Acids Res.* 21:2809-2814.
- Hutchins, C. J., Rathjen, P. D., Forster, A. C., y Symons, R. H. 1986. Self-cleavage of plus and minus RNA transcripts of avocado sunblotch viroid. *Nucleic Acids Res.* 14:3627-3640.
- Ishizaka, M., Ohshima, Y., y Tani, T. 1995. Isolation of active ribozymes from an RNA pool of random sequences using an anchored substrate RNA. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 214:403-409.

- Kawasaki, H., y Taira, K. 2002. Identification of genes by hybrid ribozymes that couple cleavage activity with the unwinding activity of an endogenous RNA helicase. *EMBO Rep.* 3: 443-50.
- Khvorova, A., Lescoute, A., Westhof, E., y Jayasena, S. D. 2003. Sequence elements outside the hammerhead ribozyme catalytic core enable intracellular activity. *Nature Struct. Biol.* 10:708-712.
- Kore, A. R., Vaish, N. K., Kutzke, U., y Eckstein, F. 1998. Sequence specificity of the hammerhead ribozyme revisited; the NHH rule. *Nucleic Acids Res.* 26:4116-4120.
- Liu, B., Tabler, M., y Tsagris, M. 2000. Episomal expression of a hammerhead ribozyme directed against plum pox virus. *Virus Res.* 68:15-23.
- Long, D. M., y Uhlenbeck, O. C. 1994. Kinetic characterization of intramolecular and intermolecular hammerhead RNAs with stem II deletions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:6977-6981.
- Martick, M., y Scott, W. G. 2006. Tertiary contacts distant from the active site prime a ribozyme for catalysis. *Cell* 126:1-12.
- McCall, M. J., Hendry, P., y Jennings, P. A. 1992. Minimal sequence requirements for ribozyme activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5710-5714.
- Mühlbach, H.P., y Sängler, H. L. 1979. Viroid replication is inhibited by α -amanitin. *Nature* 278:185-188.
- Navarro, J. A., y Flores, R. 2000. Characterization of the initiation sites of both polarity strands of a viroid RNA reveals a motif conserved in sequence and structure. *EMBO J.* 19:2662-2670.
- Navarro, J. A., Vera, A., y Flores, R. 2000. A chloroplastic RNA polymerase resistant to tagetitoxin is involved in replication of avocado sunblotch viroid. *Virology* 268:218-225.
- Pley, H. W., Flaherty, K. M., y McKay, D. B. 1994. Three-dimensional structure of a hammerhead ribozyme. *Nature* 372:68-74.
- Prody, G. A., Bakos, J. T., Buzayan, J. M., Schneider, I. R., y Bruening, G. 1986. Autolytic processing of dimeric plant virus satellite RNA. *Science* 231:1577-1580.
- Rossi, J. J., y Couture, L. A. 1999. *Intracellular Ribozyme Applications: Principles and Protocols*, pp. 294, Horizon Scientific Press, Wymondham, UK.

- Ruffner, D. E., Stormo, G. D., y Uhlenbeck, O. C. 1990. Sequence requirements of the hammerhead RNA self-cleavage reaction. *Biochemistry* 29:10695-10702.
- Saksmerprome, V., Roychowdhury-Saha, M., Jayasena, S., Khvorova, A., y Burke D. H. 2004. Artificial tertiary motifs stabilize trans-cleaving hammerhead ribozymes under conditions of submillimolar divalent ions and high temperatures. *RNA* 10:1916-1924.
- Salehi-Ashtiani, K., y Szostak, J. W. 2001. In vitro evolution suggests multiple origins for the hammerhead ribozyme. *Nature* 414:82-84.
- Samarsky, D.A., Ferbeyre, G., Bertrand, E., Singer, R. H., Cedergren, R., y Fournier, M. J. 1999. A small nucleolar RNA:ribozyme hybrid cleaves a nucleolar RNA target in vivo with near-perfect efficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:6609-14.
- Schindler, I. M., y Mühlbach, H. P. 1992. Involvement of nuclear DNA-dependent RNA polymerases in potato spindle tuber viroid replication: a reevaluation. *Plant Sci.* 84:221-229.
- Scott, W. G., Finch, J. T., y Klug, A. 1995. The crystal structure of an all-RNA hammerhead ribozyme: a proposed mechanism for RNA catalytic cleavage. *Cell* 81:991-1002.
- Sullenger, B. A, y Cech, T. R. 1993. Tethering ribozymes to a retroviral packaging signal for destruction of viral RNA. *Science* 262:1566-1569.
- Tabler, M., Omán, M., Tzortzakaki, S., y Sczakiel, G. 1994. A three-nucleotide helix I is sufficient for full activity of a hammerhead ribozyme: advantages of an asymmetric design. *Nucleic Acids Res.* 22:3958-3965.
- Tabler, M., y M. Tsagris. 2004. Viroids: petite RNA pathogens with distinguished talents. *Trends Plant Sci.* 9:339-348.
- Tang, J., y Breaker, R. R. 1997. Examination of the catalytic fitness of the hammerhead ribozyme by in vitro selection. *RNA* 3:914-925.
- Uhlenbeck, O. C. 1987. A small catalytic oligonucleotide. *Nature* 328:596-600.
- Weinberg, M. S., y Rossi, J. J. 2005. Comparative single-turnover kinetic analyses of trans-cleaving hammerhead ribozymes with naturally derived non-conserved sequence motifs. *FEBS Lett.* 579:1619-1624.

Yang, X., Yie, Y., Zhu, F ., Liu, Y., Kang, L., Wang, X., y Tien, P. 1997. Ribozyme-mediated high resistance against potato spindle tuber viroid in transgenic potatoes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:4861-4865.