

Riboswitches: sensores e interruptores bacterianos

Nataly Morales y Enrique Merino*

Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca Morelos 62271, México.

[*merino@ibt.unam.mx](mailto:merino@ibt.unam.mx)

Resumen

Los riboswitches son un grupo de ARNs que regulan la expresión de genes, principalmente en bacterias y arqueobacterias. Estos reguladores se localizan en extremos no codificantes de los ARN mensajeros y pueden reconocer moléculas con gran afinidad y especificidad; gracias a ese reconocimiento pueden formar estructuras que controlan la transcripción, la traducción, el procesamiento, la degradación o el silenciamiento del ARN mensajero. Este tipo de regulación está presente en genes que codifican para proteínas involucradas en la biosíntesis y transporte de metabolitos, tales como: aminoácidos, vitaminas, iones, coenzimas, etc. Recientemente, se ha descrito que además de regular la expresión del gen en el que se encuentran, regulación *in cis*, estos ARNs pueden regular también la expresión de otros genes, regulación *in trans*; participando en mecanismos aún más complejos a los ya caracterizados. Además, algunos riboswitches se encuentran duplicados y su actividad regulatoria responde a variaciones más finas en las concentraciones del ligando en cuestión, algunos de estos pueden responder a distintas moléculas relacionadas metabólicamente. Dado que los riboswitches no precisan de la intervención de una proteína para llevar a cabo su función, se cree que pudieron originarse en un mundo primigenio donde el ARN era la molécula reguladora más importante. Los riboswitches han sido muy atractivos para su utilización en la industria, se han creado algoritmos tanto para diseñar riboswitches artificiales, como para realizar análisis bioinformáticos que permiten su localización en los distintos genomas bacterianos y así, ayudar a los científicos a elucidar la función de algunos genes desconocidos.

Palabras clave: riboswitches, regulación genética, ARN, evolución.

Abstract

Riboswitches are RNAs that regulate gene expression in bacteria and archaeobacteria, mainly. These RNA regulators are located at non-coding regions of genes. They recognize molecules with great affinity and specificity and form structures that control transcription, translation, processing, degradation or silencing of messenger RNA. They regulate genes that codify proteins involved in the biosynthesis and transport of metabolites, such as: amino acids, vitamins, ions, coenzymes, etc. They have been described regulating the expression of the gene in which they are found, *in cis*, but recently, these RNAs can also regulate the expression of other genes, *in trans*, the mechanisms in which participate are even more complex. In addition, some riboswitches are duplicated and respond to fine variations in the concentrations of the ligand,

some of these may respond to different metabolically related molecules. The riboswitches do not require the intervention of a protein to carry out its function, for this reason is believed that they could originate in a primitive RNA world. Riboswitches have been attractive to industry, algorithms have been created to design artificial riboswitches, and to do bioinformatic analyzes that allow their location in the different bacterial genomes, then help to scientists to elucidate the function of some unknown genes.

Key words: riboswitches, genetic regulation, RNA, evolution.

Introducción

Entre 3,500 y 3,900 millones de años, las bacterias, organismos invisibles para el ojo humano, comenzaron a habitar el planeta Tierra. Con el paso del tiempo, estos microorganismos lograron adaptarse a los constantes cambios ambientales y evolucionaron, dando origen a la gran diversidad bacteriana que existe hoy en día. Las bacterias son consideradas los seres vivos más exitosos, ya que pueden transformar diferentes componentes de su entorno para utilizarlos como alimento, y pueden vivir en todos los hábitats terrestres y acuáticos del planeta, soportando condiciones extremas de temperatura, salinidad, presión y pH.

El éxito de las bacterias como organismos ubicuos, está estrechamente relacionado con las distintas estrategias que utilizan para expresar los genes que son necesarios, en los momentos y cantidades adecuadas, permitiéndoles así, fabricar las proteínas que requieren para vivir. La expresión genética en este grupo de organismos unicelulares se regula principalmente a nivel del inicio de la transcripción, y en un menor grado a nivel de los procesos relacionados con la síntesis de proteínas y con la replicación del ADN cromosomal. En esta revisión se describe un novedoso tipo de elementos de regulación de ARN, que se encargan de la regulación transcripcional y traduccional en eubacterias y

arqueobacterias, y que han sido denominados como Riboswitches (Breaker et al., 2002).

Regulación de la expresión génica. Una breve mirada histórica.

A pesar de la dificultad de ubicar los primeros trabajos científicos que pudieran explicar cómo es que una célula responde a cambios en su medio ambiente, es ampliamente reconocido a Jacques Monod como uno de los pioneros científicos en el campo de la regulación de la expresión genética. A principios de la década de los 40's, Monod fue el primero en observar que el crecimiento bacteriano podría variar en función de las distintas combinaciones de carbohidratos administrados a los medios cultivo, a lo que llamó "adaptación enzimática". Monitoreando el crecimiento de *Escherichia coli* en un medio con glucosa y sorbitol a distintas concentraciones, Monod documentó que la bacteria tiene dos fases de crecimiento en respuesta a la utilización secuencial de esas fuentes de carbono. Este tipo de crecimiento sucede cuando la fuente orgánica es el factor limitante y esta constituida de una mezcla de carbohidratos (Monod, 1949). Años después, Jacob y Monod demostraron que las enzimas encargadas de la utilización de la lactosa, codificadas en el operón *lac*, eran sintetizadas exclusivamente cuando dicho azúcar estaba presente en el medio de cultivo. Esas enzimas

Artículos

están codificadas por los genes: *lacZ*, *lacY* y *lacA*, y su expresión permite a la bacteria metabolizar la lactosa, sólo en ausencia de glucosa. Esta observación sugería que la bacteria era capaz de percibir los nutrientes disponibles en el medio y con base en ello, generar una respuesta de tipo regulatorio (Jacob & Monod, 1961). Aunque por algún tiempo fue un misterio la naturaleza de los elementos responsables de esta regulación, la comparación de cepas silvestres con cepas mutantes en las que se observaba la pérdida de la regulación, permitió a Monod inferir que eran factores proteicos, ahora llamados reguladores o factores transcripcionales, los responsables del

control de la transcripción; estos podían activarla o inhibirla, en respuesta a los metabolitos o señales efectoras presentes en el medio. El modelo de Monod basado en proteínas reguladoras demostró ser exitoso para describir la regulación de muchos otros tipos de sistemas, incluyendo los relacionados con la asimilación de azúcares (arabinosa, maltosa, ribosa, xilosa, galactosa, etc.), biosíntesis o transporte de metabolitos (aminoácidos, vitaminas, ácidos grasos, etc.), formación de componentes celulares (pili, flagelo, etc.), entre otros (ver figura 1).

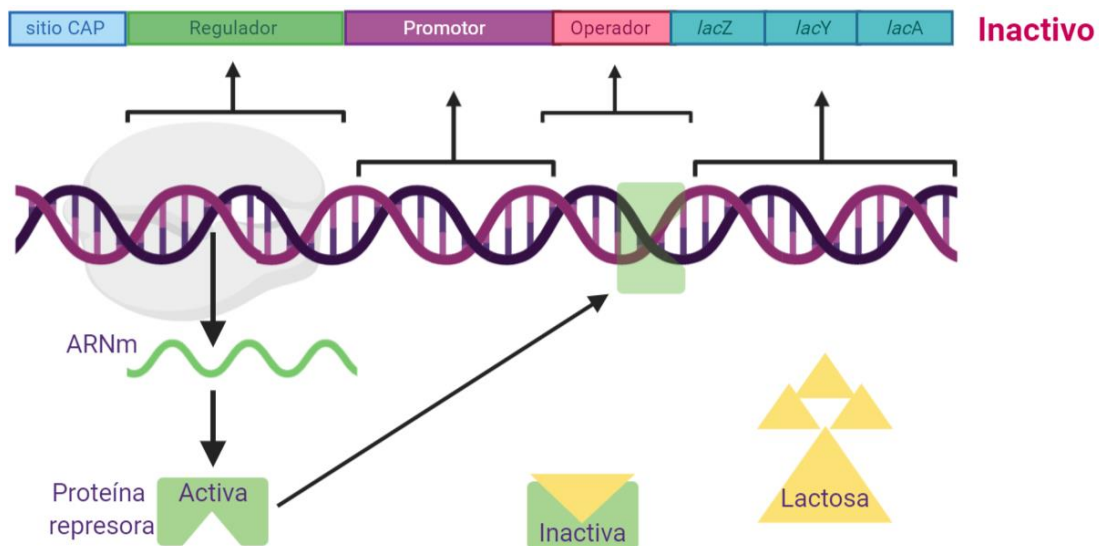


Figura 1. Modelo de regulación basado en proteínas. Monod descubrió que eran proteínas las encargadas de regular la transcripción del operón de utilización de lactosa. Un operón es un conjunto de genes contiguos que comparten el mismo promotor. El operón *Lac* codifica enzimas que se encargan de degradar el azúcar lactosa. Este operón es sintetizado siempre y cuando la bacteria se encuentre en un medio que contenga lactosa, y no glucosa. La bacteria utiliza dos proteínas como sensores. La primera proteína es un represor que se encuentra unido al ADN impidiendo el paso de la ARN polimerasa. En presencia de un derivado de lactosa este represor abandona al ADN permitiendo la transcripción del operón *Lac*. La segunda proteína es un activador que, en ausencia de glucosa, se une en una región contigua al promotor favoreciendo la transcripción del operón *Lac*. Este modelo de regulación a través de proteínas fue extendido para describir otros sistemas de control bacteriano.

A finales del siglo pasado, se propuso una interesante excepción al modelo de regulación de Monod. En un intento de caracterizar la regulación del operón de biosíntesis de tiamina de la bacteria *Rhizobium etli*, el Dr. Mario Soberón y colaboradores, observaron que la región 5' no-codificante ubicada inmediatamente río arriba del primer gen estructural del operon, era inusualmente larga y que contenía un secuencia o motivo excepcionalmente conservado y ampliamente distribuido entre diferentes grupos filogenéticos. A este motivo lo llamaron THI-box. Estas propiedades de conservación, tamaño y distribución, llevaron a Soberón y colaboradores, a proponer que el fragmento de ARN del ARNm que constituía al motivo THI-box, podría sin la participación de proteína alguna, reconocer al pirofosfato de tiamina (TPP) y ejercer un efecto de regulación sobre la síntesis del producto peptídico codificado por el operón (Miranda-Ríos et al., 1997).

En el 2002, el grupo del Dr. Ronald Breaker de la Universidad Yale, verificó experimentalmente la hipótesis propuesta por Soberón y colaboradores, al demostrar que el elemento de ARN correspondiente al motivo THI-box, podría unir con alta especificidad y gran afinidad, al pirofosfato de tiamina (Breaker et al., 2002). Por su naturaleza de tipo RIBOnucleico y su función de alternar (switching) entre los estados de activación e inhibición de la expresión de los genes regulados, a este tipo de elemento de regulación se le denominó riboswitch: una secuencia en la región no traducida del ARN

mensajero que reconoce una molécula o metabolito y en respuesta a ese reconocimiento puede regular la expresión del gen donde se localiza (ver figura 2).

Las predicciones estructurales y la resolución de la estructura tridimensional mediante cristalografía de rayos X del riboswitch TPP, demostró que la unión del pirofosfato de tiamina al riboswitch TPP provoca su reestructuración para favorecer la formación de una estructura que deja inaccesible el sitio de unión a ribosomas del ARN mensajero, inhibiendo así la traducción de su región codificante. Dada la novedad de este tipo de regulación, tanto el grupo del Dr. Braker, como el del Dr. Soberón, se dieron a tarea de buscar el riboswitch TPP en las secuencias de los genomas de otros organismos mediante análisis bioinformáticos. Ambos grupos descubrieron que la secuencia de dicho riboswitch era altamente conservada y ampliamente distribuida (Miranda-Ríos & Soberón, 2007). Hoy en día se sabe que el riboswitch TPP se encuentra en un gran número de bacterias, arqueobacterias e inclusive, en los genomas de algunas plantas y hongos. La regulación de los genes por este riboswitch en bacterias y arqueobacterias ocurre a nivel transcripcional o traduccional, mientras que en organismos eucariontes la regulación ocurre modulando el proceso de splicing del ARN mensajero. Estas características del riboswitch TPP lo hacen uno de los riboswitches más versátiles descritos hasta el momento (Serganov & Nudler, 2013).

Artículos

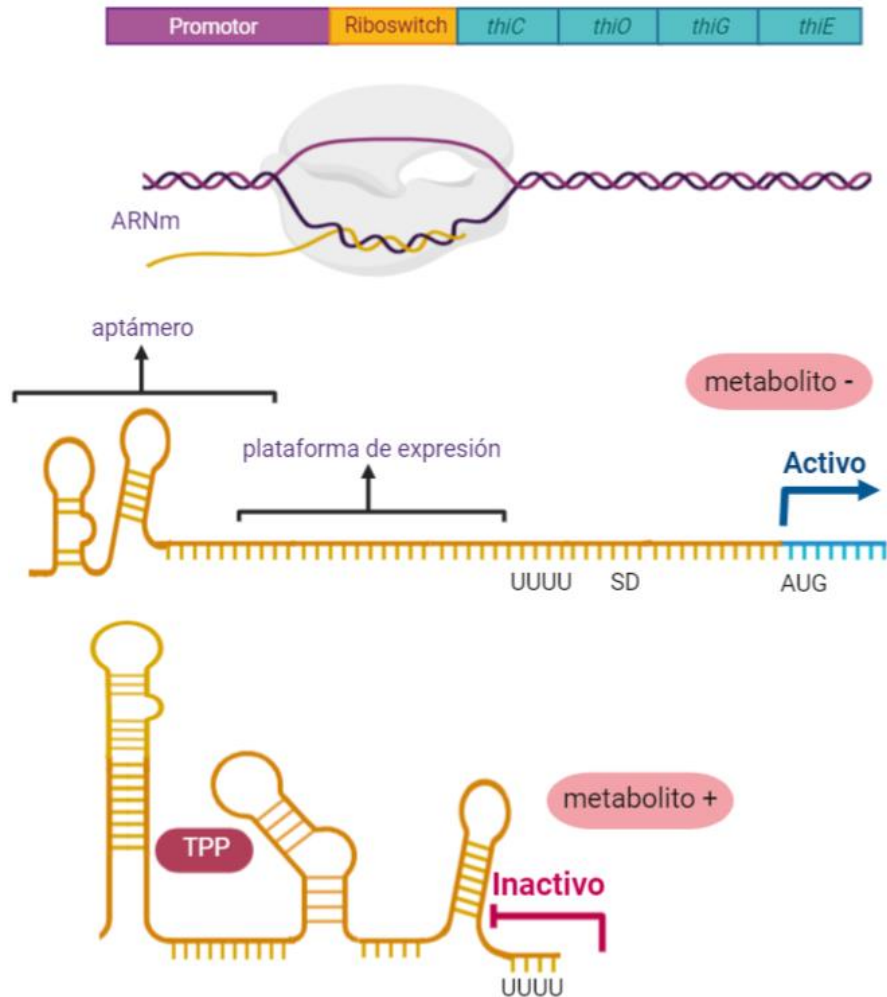


Figura 2. Modelo de regulación basado en ARN. A principios de siglo se descubrió que el ARN también tiene la capacidad de regular la expresión genética, estos ARNs reguladores fueron bautizados como riboswitches. Los riboswitches se localizan en la parte no codificante de un ARN mensajero, y constan de dos dominios estructurales denominados aptámero y plataforma de expresión. El aptámero es la secuencia de ARN que tiene la capacidad de reconocer específicamente a un metabolito y la plataforma de expresión es la secuencia que controla directamente la expresión de los genes. En la figura se muestra el riboswitch que reconoce al pirofosfato de tiamina (TPP) que regula la transcripción del operón *thi* de biosíntesis de tiamina. La unión de la TPP al riboswitch, produce un cambio conformacional en el dominio de reconocimiento, que posteriormente es transmitido hacia el dominio de expresión, favoreciendo la formación de un terminador transcripcional que impide que la ARN polimerasa continúe la transcripción del operón. En ausencia del metabolito, las estructuras secundarias de la plataforma de expresión corresponden a un antiterminador transcripcional, por lo que la transcripción del operón se completa. Este riboswitch está ampliamente distribuido en los diferentes filos bacterianos.

Distribución de los riboswitches bacterianos.

Existen 40 clases de riboswitches que tienen al menos un elemento caracterizado experimentalmente (ver figura 3), otras se han propuesto como resultado de análisis computacionales. El criterio para clasificar y nombrar a estos ARNs reguladores es principalmente el tipo de ligando que unen. Algunas clases reconocen el mismo metabolito y son poco conservadas en estructura y secuencia entre sí, por ejemplo, las clases de riboswitches que unen S-adenosil metionina o los que unen diGMP cíclico (Lotz & Suess, 2018; Mccown et al., 2017). Recientemente se han reportado variantes de algunas clases de riboswitches, en las que el dominio de reconocimiento presenta cambios que les permiten detectar otros metabolitos, como el riboswitch de guanina, que tras mutaciones en su sitio de unión es capaz de reconocer adenina (Weinberg et al., 2017). Además, se identificaron 226 candidatos de riboswitches huérfanos, denominados así por que aún se desconoce el ligando que unen (Weinberg, Lünse, et al., 2017).

Los riboswitches se han encontrado fundamentalmente asociados a genes de biosíntesis y transporte de metabolitos esenciales, tales como: nucleótidos (adenina, guanina, diGMP cíclico, prequeuosina y ATP), aminoácidos (lisina, glicina, SAM y S-adenosil homocisteína), carbohidratos (glucosamina-6-fosfato[Glc6P]), coenzimas (flavin mononucleótido, tiamina pirofosfato, cobalamina y tetrahidrofolato), y iones (molibdeno, magnesio); así como a parámetros fisicoquímicos como temperatura y pH (Serganov & Nudler,

2013). En la mayoría de los casos, el metabolito reconocido es el producto final de la vía biosintética que regula, de tal forma que su reconocimiento por el riboswitch conlleva al apagado de la expresión de los genes involucrados en su genes de biosíntesis o transporte.

La alta especificidad de los riboswitches por sus ligandos, impone restricciones en su estructura tridimensional, lo que resulta en que su secuencia sea altamente conservada a pesar de que se encuentren en organismos filogenéticamente distantes. Esta conservación ha sido un factor central para su identificación computacional en secuencias genómicas. Algunos riboswitches están ampliamente distribuidos en diferentes grupos filogenéticos, tal es el caso del riboswitch que reconoce al pirofosfato de tiamina; mientras que otros riboswitches presentan una distribución acotada a grupos filogenéticos específicos, como el riboswitch T-box, que reconoce ARNs de transferencia y se encuentra básicamente en el filo de los Firmicutes (Abreu-Goodger et al., 2004; Gutierrez-Preciado et al., 2009; Vitreschak, Mironov, Lyubetsky, & Gelfand, 2008). El número de riboswitches identificados *in silico* por genoma puede variar enormemente, desde organismos en los que no se encuentra ningún riboswitch (como el Tenericute *Mycoplasma genitalium*, o el endosimbionte *Carsonella ruddii*, entre otros), a organismos con más de 100 riboswitches (como los firmicutes *Geosporobacter ferrireducens* con 110, o *Bacillus thuringiensis* con 105 riboswitches).

Riboswitch	Ligando	Riboswitch	Ligando
AdoCbl	Adenosilcobalamina	PreQ1-I,1-3	Prequeuosina-1
TPP	Pirofosfato de Tiamina	PreQ1-II	Prequeuosina-1
T-box	ARNs de transferencia	Moco	Molibdeno
FMN	Flavín Mononucleótido	SAH	S-adenosil homocisteína
Adenina	Adenina	SAM-IV	S-adenosil metionina
Guanina	Guanina	Wco	Tungsteno
Lisina	L-Lisina	c-di-GMP-I	3'-5' di-GMP cíclico
AqCib	Acuacobalamina	SAM-V	S-adenosil metionina
GlmS	Glucosamina-6-fosfato	c-di-GMP-II	3'-5' di-GMP cíclico
Glicina	Glicina	SAM-I/IV	S-adenosil metionina
SAM-II	S-adenosil metionina	SAM-SAH	S-adenosil metionina S-adenosil homocisteína
SAM-III	S-adenosil metionina	THF	Tetrahidrofolato
Mg ²⁺ -I	Ion Magnesio	Glutamina	L-Glutamina
Mg ²⁺ -II	Ion Magnesio	Fluoruro	Iones fluoruros
2'-dG-I	2' deoxiguanosina	c-di-AMP	3'-5' di-AMP cíclico
Mn ²⁺	Iones manganeso	PreQ1-III	Prequeuosina-1
cAMP-GMP	3'-5' AMP-GMP cíclico	Guanidine-I	Guanidina
NiCo	Iones Níquel o Cobalto	2'-dG-II	2' deoxiguanosina
ZTP	5-aminoimidazol-4-carboxamida ribosido 5'-trifosfato	Guanidine-II	Guanidina
Aza-aromatic	Aza aromáticos	Guanidine-III	Guanidina

Figura 3. Clases de riboswitches. Los riboswitches se nombran de acuerdo con el ligando que unen. Algunos ligandos son reconocidos por varios tipos de riboswitches. Modificado de (Lotz & Sues, 2018).

Dominios estructurales y funcionales de los riboswitches.

Estructural y funcionalmente, puede considerarse que los riboswitches tiene dos dominios: un primer dominio de reconocimiento, también llamado áptamero, que es la región del riboswitch que adopta una estructura tridimensional específica que puede reconocer a su metabolito con gran afinidad y especificidad; y

un segundo dominio, llamado dominio de expresión, que es la región del riboswitch que debe su nombre a la capacidad que tiene para formar estructuras que controlan directamente la expresión del gen y que comunmente comprenden estructuras secundarias mutuamente excluyentes, también llamadas

atenuadores (Revisado en Peselis & Serganov, 2014; Serganov & Nudler, 2013) (ver figura 2). La decisión sobre cuál de las estructuras posibles será formada, depende de la unión del ligando a la plataforma de reconocimiento, ya que dicha unión le produce un cambio alostérico, que es a su vez transmitido a la plataforma de expresión, favoreciendo energéticamente la formación de estructuras secundarias asociadas a la inhibición de la expresión del gen regulado.

El repertorio de elementos estructurales presentes en la plataforma de expresión de los riboswitches pueden agruparse fundamentalmente en cuatro tipos: a) Atenuadores transcripcionales, b) Atenuadores traduccionales, c) Atenuadores que incluyen Ribozimas y c) Atenuadores que afectan la edición del ARN (splicing).

El término de la transcripción a través de los atenuadores transcripcionales de las plataformas de expresión, se da cuando la estructura secundaria correspondiente a la de un terminador transcripcional de tipo rho-independiente se favorece sobre el plegamiento de la estructura del antiterminador transcripcional; mientras que en los atenuadores traduccionales, el término de la traducción se da cuando la formación de una estructura secundaria de ARN que contiene el sitio de unión a ribosoma, Shine-Dalgarno, se favorece sobre su estructura alternativa. La identificación computacional de riboswitches y el análisis de las correspondientes estructuras secundarias de sus plataformas de expresión, han puesto en evidencia que existe un sesgo filogenético en el tipo de plataforma de expresión usada por los riboswitches. Así, por ejemplo, en Firmicutes, los riboswitches actúan preferencialmente a nivel

transcripcional, mientras que en Proteobacterias, lo hacen a nivel traduccional. Se ha hipotetizado que esta correlación puede deberse a que la velocidad de transcripción en Proteobacterias es mayor, y el tiempo de sensado del ligando por el dominio de reconocimiento podría no ser suficiente para el plegado, ni para la oportuna respuesta de la plataforma de expresión. En consecuencia, es probable que se favorecieran evolutivamente a los riboswitches transcripcionales sobre los traduccionales (Henkin, 2014).

Adicionalmente a los atenuadores transcripcionales o traduccionales, existen también plataformas que pueden estructurar ARN catalíticos que degradan el ARN mensajero. El gen *glmS* de bacterias Gram positivas como *Bacillus subtilis*, tiene un riboswitch que reconoce glucosamina-6-fosfato (GlcN6P) y actúa como ribozima. Este gen codifica para la enzima glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa, la cual se encarga de la síntesis de GlcN6P, un azúcar importante en la síntesis de la pared celular bacteriana. Cuando GlcN6P está presente en gran cantidad, se une al riboswitch y provoca que el sitio activo de su plataforma de expresión sea funcional, y el riboswitch comienza el autocorte con el objetivo de bajar la concentración de GlcN6P (McCown et al., 2012).

Además, las plataformas de expresión de algunos riboswitches contienen intrones con la capacidad para autoprocésarse y así modificar la longitud del ARN mensajero en el que se encuentran, modulando así la expresión genética. Tal es el caso del riboswitch c-di-GMP presente en el patógeno *Clostridium difficile*. Este riboswitch reconoce al segundo mensajero: guanosin monofosfato di-cíclico, c-di-GMP, y se

encuentra regulando genes de virulencia y motilidad de este organismo. Cuando el riboswitch detecta el c-di-GMP y una la molécula de guanosin trifosfato, GTP, el intrón se pliega para poder autocortarse, tras lo cual, ocurre un empalme del ARN mensajero que libera la secuencia de unión a ribosoma y es entonces cuando el ARN mensajero puede ser traducido. En este riboswitch se acoplan dos mecanismos, el corte y la traducción (Peselis & Serganov, 2014).

El riboswitch T-box, un riboswitch muy especial.

Estudios bioinformáticos sobre el conjunto de genomas secuenciados realizados por nuestro grupo de investigación, han revelado que el riboswitch T-box es el riboswitch más frecuentemente usado para regular la expresión genética. En ciertos Firmicutes, como el caso de *Lactobacillus parabuchneri*, puede existir hasta 48 copias del riboswitch T-box. Adicionalmente a lo anterior, entre todos los riboswitches conocidos a la fecha, el riboswitch T-box es un riboswitch único en su clase ya que el ligando que reconoce no es, como en otros casos, un metabolito de alguna vía metabólica, si no, como se mencionó anteriormente, detecta el grado de aminoacilación o cargado de los ARNs de transferencia por sus correspondientes aminoácidos (Grundy & Henkin, 1993, 1994). El aza de especificidad contiene un triplete de nucleótidos que funciona como un codón, este se aparea con el anticodón de un ARNt correspondiente. La interacción codón-anticodón determina que el riboswitch reconozca un ARNt específico entre varias posibilidades. En la mayoría de los riboswitches T-box, el aza de especificidad contiene el codón menos usado en

la síntesis de proteínas, por lo que su ARNt complementario también suele ser el menos abundante (Gutierrez-Preciado et al., 2009). Por otra parte, la secuencia T-box consta de 18 nucleótidos altamente conservados, que incluyen el triplete 5'UGG3'. Este 5'UGG3' se aparea con el 5'CCA3' libre que tienen todos los ARNs de transferencia cuando no están aminoacilados, con ese apareamiento, se favorece la formación de un antiterminador transcripcional. Cuando el nivel de un ARNt aminoacilado es alto, ese ARNt sólo se puede unir al sitio de especificidad del riboswitch, esto mantiene el terminador transcripcional intacto y la transcripción del gen inactiva. En cambio, cuando el nivel de un ARNt aminoacilado es bajo, la porción de ARNt que no tiene aminoácido, se puede unir tanto al sitio de especificidad, como a la secuencia T-box, tras lo cual se forma un antiterminador que permite la transcripción del gen (Grundy & Henkin, 1993, 1994; Henkin, 2014) (ver figura 4).

A través del riboswitch T-box, las bacterias pueden medir de forma indirecta, pero específica, la disponibilidad intracelular de un cierto tipo de aminoácido, ya que el nivel de un ARNt aminoacilado depende en gran medida de la cantidad de su aminoácido presente en el interior de la célula. Es por ello, que este tipo de riboswitch está localizado en genes involucrados tanto en el metabolismo, como en el transporte y cargado de aminoácidos de manera altamente específica, de tal forma que la identificación del ARNt que es reconocido mediante el análisis de la secuencia del aza de especificidad, permite inferir posibles relaciones funcionales de los genes regulados por este riboswitch (Gutiérrez-Preciado & Merino, 2012).

Artículos

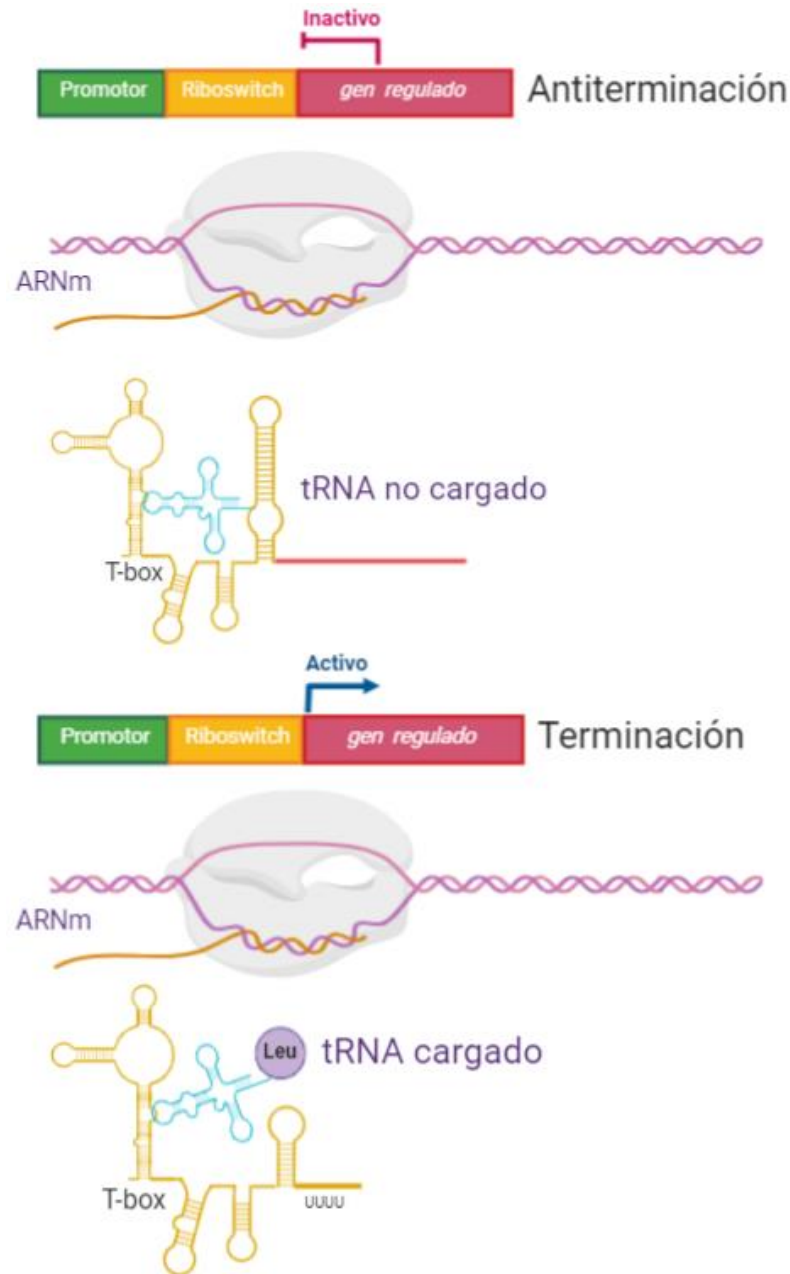


Figura 4. Mecanismo de acción del riboswitch T-box. El riboswitch T-box actúa principalmente a nivel transcripcional y regula genes involucrados en la síntesis, transporte, y cargado de aminoácidos, principalmente en bacterias del filo Firmicutes. Este tipo de riboswitch reconoce el estado de aminoacilación (cargado) de los tRNAs, e indirectamente, la disponibilidad de aminoácidos en el medio. Cuando un tRNA cargado es reconocido por la T-box, la estructura secundaria de la plataforma de expresión corresponde a la de un terminador transcripcional, y en consecuencia, la transcripción del operón regulado termina prematuramente. De manera contraria, cuando la T-box interactúa con un tRNA no cargado, la estructura secundaria de ARN que se forma en la plataforma de expresión corresponde a la de un antiterminador transcripcional, por lo que la transcripción del operón regulado se realiza en su totalidad.

Existen casos, en los que el T-box presenta codones para su interacción con dos tipos de ARNt que cargan aminoácidos distintos. Tal es el caso del llamado NT-box de *Clostridium acetobutylicum* que regula un operón de cuatro genes involucrados en una vía de transamidación; se demostró que este riboswitch reconoce tanto el ARNt^{Asn} como el ARNt^{Glu}. Se sabe que la biosíntesis de asparagina dependiente de ARNt usa glutamina como donador de un grupo amida, es por esta relación metabólica, que este riboswitch puede responder a ambos ARNt (Saad et al., 2013).

La caracterización bioinformática sobre el tipo de genes regulados por el riboswitch T-box nos ha permitido identificar que el operón bicistrónico *hisS-aspS* de *B. subtilis* es regulado por un riboswitch T-box. En el aza de especificidad de este riboswitch existe la secuencia GACAC, que contiene los codones para los aminoácidos aspártico (GAC) e histidina (CAC), el modelado *in silico* coloca el codón GAC en una posición favorable para su interacción con el ARNt^{Asp}, indicando que es más probable que el riboswitch regule en respuesta a la baja concentración de ácido aspártico; no obstante, otras estructuras secundarias también posibilitan su interacción con el ARNt^{His} (Gutierrez-Preciado et al., 2009). Esta observación aún no ha sido comprobada experimentalmente, pero es necesario que el riboswitch sea capaz de reconocer ambos ARNs de transferencia, para evitar un “desajuste regulatorio”. Por lo tanto, podría existir algún punto en común en la biosíntesis de histidina y ácido aspártico en *B. subtilis*, lo que justificaría la síntesis simultánea de *hisS* y *aspS*, que son las enzimas que cargan

esos aminoácidos a sus correspondientes ARNs de transferencia.

Regulación de la expresión de la regulación génica por riboswitches dispuestos en tandem.

Algunos riboswitches pueden tener aptámeros o plataformas de expresión en tándem, es decir, duplicadas. Estas arquitecturas llevan a cabo un mecanismo de regulación más complejo (Welz & Breaker, 2007). Por ejemplo, el riboswitch de glicina tiene dos aptámeros, ambos reconocen glicina y su función es cooperativa. Gracias a esa cooperatividad el riboswitch tiene la capacidad de medir variaciones finas en la concentración del aminoácido. Este riboswitch se localiza en el ARN mensajero de un operón de enzimas que se encargan de la degradación de glicina en *Bacillus subtilis* (Mandal et al., 2004).

El riboswitch SAM-AdoCbl, tiene un aptámero que une S-adenosilmetionina y otro que une adenosil-cobalamina, ambos tienen su plataforma de expresión y ambos son capaces de reprimir o activar el gen *meiE* de *Bacillus clausii* en función de la concentración de alguno o de ambos metabolitos (Welz & Breaker, 2007). En términos generales, la regulación mediada por riboswitches dispuestos en tándem, se localizan en genes que requieren una regulación más estricta, en caso de que las dos copias sean del mismo tipo de riboswitches, o de integrar más de una señal de reconocimiento, en caso de que los riboswitches en tándem reconozcan diferentes ligandos. Análisis bioinformáticos de nuestro grupo han identificado que el operón de biosíntesis de triptófano en Firmicutes suele estar regulado por dos copias del riboswitch T-box dispuestas en tándem (Gutierrez-Preciado et al.,

2009). Utilizando como modelo de estudio a *Bacillus cereus*, en nuestro laboratorio hemos determinado que esta disposición en tándem del riboswitch T-box, permite a los organismos responder a un rango de concentración de

Riboswitches que actúan regulando tanto in cis como in trans.

El modelo canónico de regulación por riboswitches considera que su actividad de regulación ocurre en el lugar en donde se encuentran localizados, es decir, que actúan *in cis*. No obstante, debido a que el producto resultante del cese prematuro de la transcripción de los riboswitches, produce ARNs de tamaño pequeño, existe la posibilidad de que estos fragmentos actúen de manera similar a los ARNs pequeños bacterianos que inhiben la traducción de sus genes blanco al unirse a la región Shine-Dalgarno de ARNs mensajeros y cuya interacción es mediada por la chaperona de ARNs llamada Hfq. La regulación por ARNs pequeños en bacterias ha sido ampliamente documentada regulando a genes involucrados en diferentes condiciones de estrés, como el oxidativo (oxyS), limitación de hierro (ryhB), temperaturas bajas (dsrA) o la coordinación de la respuesta al estrés

triptófano más amplio. Es probable que existan más casos de riboswitches T-box en tándem, debido a que la regulación a través del reconocimiento de ARNt es más sensible a las variaciones en las pozas de éstos.

de la imitación de glucosa y el fosfato (sgrR), entre otros. El único caso reportado en la literatura en donde un small-RNA proviene del cese prematuro de la transcripción lo constituye el riboswitch SAM de *Listeria monocytogenes* que regula al operón lmo2419-lmo2418-lmo2417, que codifica para un complejo transportador del tipo ABC (Loh et al., 2009). En presencia de S-adenosilmetionina, este riboswitch favorece la formación de un terminador rho-independiente en su plataforma de expresión que origina la terminación prematura de la transcripción, cuyo producto es un ARN pequeño que interactúa “in trans” con la región líder de los ARN mensajeros del gen *prfA*, inhibiendo su traducción. El gen *prfA* codifica para un regulador de virulencia, que tiene efecto sobre otros genes fundamentales para la patogenicidad de la bacteria. Este riboswitch de SAM es responsivo a la presencia de S-adenosilmetionina, pero su actividad *in trans* es independiente del reconocimiento de este ligando (Loh et al., 2009) (ver figura 5).

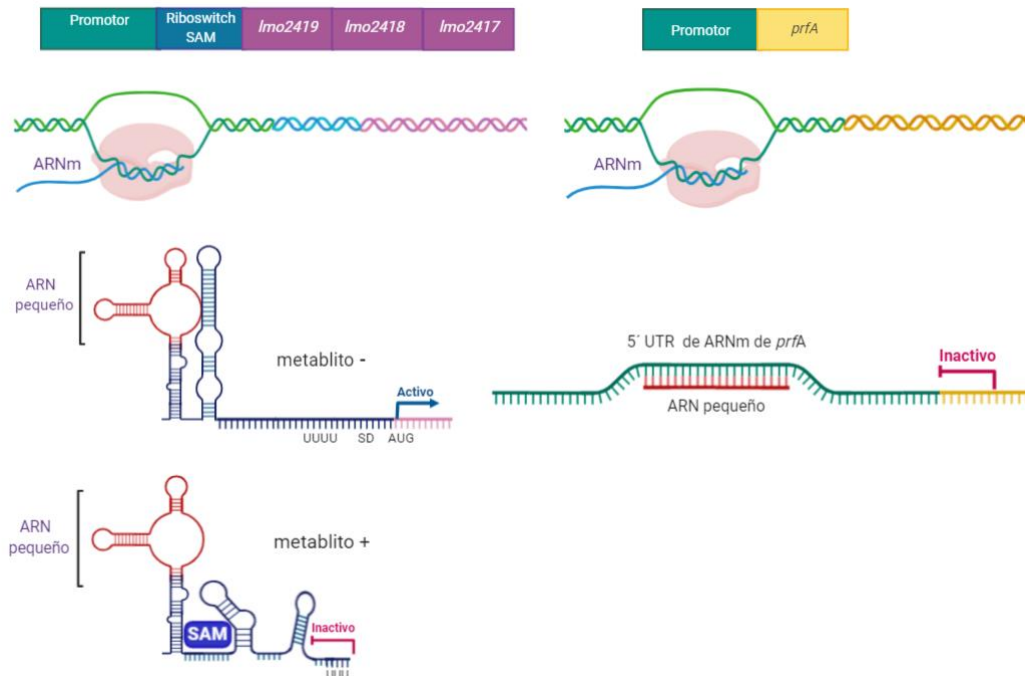


Figura 5. Riboswitch con actividad *in cis* y *in trans*. El operón *Imo2419-Imo2418-Imo2417*, que codifica para las proteínas del complejo transportador de tipo ABC de *Lysteria monocytogenes* está regulado por un riboswitch que reconoce S-adenosil metionina (SAM). En presencia de este metabolito, el riboswitch forma un terminador transcripcional que origina el término prematuro de la transcripción de dicho operón. En ausencia de SAM, el riboswitch forma un antiterminador que favorece que la transcripción del operón se complete. Adicionalmente a esta regulación del operón *in cis*, este riboswitch es capaz de actuar *in trans*, de manera similar a la de un ARN pequeño, ya que puede unirse de manera específica a la secuencia Shine-Dalgarno del gen *prfA*, que codifica para un regulador maestro de virulencia de este organismo. De esta manera, la regulación *in trans* de este riboswitch, tiene un efecto de inhibición sobre el inicio de la traducción de su gen blanco.

Riboswitches transcritos en antisentido al de su gen blanco.

Un segundo modelo no canónico de regulación por riboswitches lo constituyen los riboswitches que se encuentran en el extremo 3' y en dirección antisentido al del gen que regulan. En este caso, los riboswitches al ubicarse en el extremo 3' de su gen blanco, pueden inhibir la elongación transcripcional de los ARNm transcritos divergentemente mediante el fenómeno de colisión de ARN polimerasas. El primer caso reportado en la literatura de un

riboswitches antisentido lo constituye el riboswitch de la S-box que se encuentra en el extremo 3' del operón *ubiG-mccB-mccA* en *Clostridium acetobutylicum*. Las enzimas codificadas en este operón están involucradas en la conversión de metionina a cisteína. Cuando las concentraciones intracelulares de S-Adenosil Metioina, AdoMet, son bajas, en la plataforma de expresión de este riboswitch se favorece la formación de un antiterminador de la transcripción, y la ARN polimerasa que transcribe en dirección antisentido el operón *ubiG-mccB-*

mccA colisiona con la ARN polimerasa que transcribe en dirección 5´- 3´, resultando en la ausencia de la síntesis de las enzimas UbiG, MccB y MccA (André et al., 2008) (ver figura 6).

Origen de los riboswitches.

Existe la hipótesis de que la vida en la Tierra se originó en el llamado “mundo del ARN”, en el cual, las condiciones eran extremas e inestables, y el ADN y las proteínas no tenían la importancia que tienen para los seres vivos en la actualidad (Vázquez-Salazar & Lazcano, 2018). En ese mundo primigenio, es posible pensar que moléculas de ARN pudieron haber sido las primeras en adquirir actividades catalíticas y de almacenamiento de información genética. Considerando lo anterior, se ha propuesto que algunos riboswitches sean descendientes de los mecanismos regulatorios utilizados por los primeros microorganismos que habitaron nuestro planeta.

Las ribozimas son moléculas de ARN con capacidad catalítica, que fueron descubiertas en 1982. Hoy en día se cree que los microorganismos primitivos explotaron varias ribozimas alostéricas para poder sobrevivir en el mundo del ARN. Es factible pensar que mediante arreglos genómicos, las ribozimas se posicionaron cerca de secuencias que ya funcionaban como aptámeros celulares. Los ligandos de estos últimos pudieron modificar la actividad de las ribozimas o actuar como cofactores para acelerar las reacciones, dando origen así, a los primeros riboswitches (Breaker, 2012; Vázquez-Salazar & Lazcano, 2018; Waters & Storz, 2009)

Posiblemente, los riboswitches del pasado no tenían plataformas de expresión y formaban terminadores y/o antiterminadores que controlaban la actividad de una ARN polimerasa con actividad de ribozima en lugar de una basada en proteínas. Los riboswitches que actúan como ribozimas y aquellos que tienen embebidos intrones de tipo I y necesitan guanosa fosforilada para llevar a cabo su autoprocesamiento, son ejemplos de riboswitches ancestrales que han permanecido en el tiempo. Los riboswitches que reconocen moléculas orgánicas complejas, y los que actúan a nivel traduccional tuvieron que desarrollarse hasta que se estableció la maquinaria de síntesis de proteínas (Breaker, 2012).

Ya que el ARN sólo necesita cuatro monómeros para constituirse, es entendible que los riboswitches sean evolutivamente conservados, en lo que respecta a sus aptámeros. Las plataformas de expresión tienen más variabilidad, pero justo esa característica les brinda la posibilidad de llevar a cabo mecanismos de regulación más elaborados; tal como sucede con los riboswitches en tándem, que responden de manera más fina a pequeñas variaciones en sus respectivos metabolitos (Breaker, 2012; Welz & Breaker, 2007).

Los riboswitches de pirofosfato de tiamina, de flavin mononucleótido y de adenosilcobalamina son ampliamente distribuidos entre las bacterias; curiosamente, estos riboswitches son los que tienen aptámeros con estructuras complejas y los ligandos que reconocen son moléculas que se han hipotetizado como reliquias del mundo del ARN (Breaker, 2012).

Artículos

A

Cys	Plataforma de expresión T-box	Cys como producto	Met	Plataforma de expresión S-box	Met como sustrato	Estado del operón <i>ubiGmccAB</i>	Representación
-	AT	Necesario	-	AT	No existe	<ul style="list-style-type: none"> Inhibición del ARNm del operón por actividad del ARN antisentido 	
-	AT	Necesario	+	T	Si existe	<ul style="list-style-type: none"> Transcripción y traducción del ARNm Transcripción prematura del ARN antisentido 	
+	T	No necesario	-	AT	No existe	<ul style="list-style-type: none"> Transcripción prematura del ARNm Síntesis del ARN antisentido 	
+	T	No necesario	+	T	Si existe	<ul style="list-style-type: none"> Transcripción prematura del ARNm Transcripción prematura del ARN antisentido 	

B

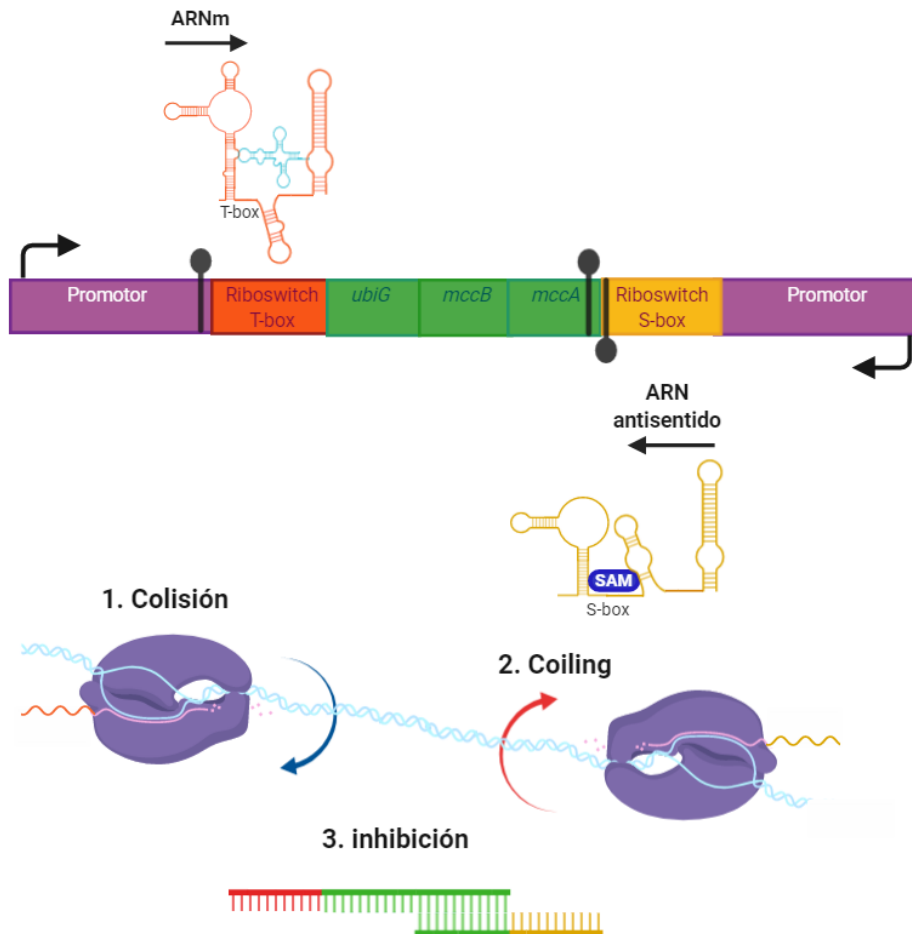


Figura 6. Riboswitch con actividad antisentido. El operón *ubiG-mccBA* en *Lysteria monocytogenes* codifica para las enzimas encargadas de la interconversión de los aminoácidos metionina a cisteína. La regulación de este operón es particularmente interesante, ya que está mediada por dos riboswitches: el riboswitch T-box localizado en su extremo 5' no-codificante y cuya dirección de transcripción es la misma a la del operón regulado, y el riboswitch que reconoce a SAM, localizado en el extremo 3' no-codificante y orientado de manera antisentido a la del operón. Mientras que el riboswitch T-box mide indirectamente, la disponibilidad de cisteína, que es el sustrato de la reacción de interconversión; el riboswitch SAM mide la disponibilidad de su producto, la metionina. La regulación del operón por el riboswitch de T-box de *cys* actuando en sentido, y el riboswitch de la S-box actuando en antisentido de la transcripción del operón *ubiG-mccBA*, garantizan que la síntesis de las enzimas UbiG, MccB y MccA se lleve a cabo únicamente cuando la bacteria requiere de la biosíntesis de cisteína y tiene disponible en su medio a la metionina (A). Los mecanismos por los cuales un promotor antisentido en el extremo 3' de un operón puede regular su expresión son: 1) Colisión de las ARN poldimerasas que provienen de promotores con dirección de transcripción convergente, 2) Super-enrollamiento del ADN originado por los giros en sentido opuestos que introducen las ADN polimerasas provenientes de los promotores localizados en los extremos 5' y 3', y 3) Apareamiento del ARN mensajero por su correspondiente ARN antisentido. (B) AT: Antiterminador transcripcional, T: Terminador transcripcional.

Aplicaciones biotecnológicas.

Los riboswitches tienen varias características que pueden ser explotadas para su uso en distintas aplicaciones biotecnológicas. Gracias a que los riboswitches regulan genes relacionados a la biosíntesis de moléculas que son importantes para la sobrevivencia de las bacterias, se proponen como blancos de nuevos antibióticos, con miras a detener el crecimiento de bacterias patógenas y evitar la resistencia bacteriana.

En el 2015, científicos estadounidenses dieron a conocer un nuevo antibiótico que bautizaron como ribocil, con este lograron disminuir el crecimiento de la bacteria *Escherichia coli*. El ribocil es una molécula sintética análoga a la vitamina B2, que compete con ella por su unión al riboswitch de flavín mononucleótido. Este riboswitch se localiza en

los genes que codifican las enzimas que sintetizan la vitamina B2; sólo bacterias, hongos y plantas cuentan con estos genes (Howe et al., 2015).

Cuando las bacterias están tomando la vitamina B2 de su medio y las concentraciones intracelulares son óptimas, el riboswitch la reconoce y presenta cambios conformacionales que impiden la expresión de las enzimas que la sintetizan, para no gastar energía. Cuando el ribocil se une, sucede lo mismo, pero la bacteria "es engañada", pues no tiene los niveles de la vitamina necesarios y en consecuencia su crecimiento se ve afectado (Howe et al., 2015). Debido a que los seres humanos carecen de enzimas que sintetizan vitamina B2, no hay posibilidad de que el hombre u otros animales se vean dañados por la presencia de ribocil en su cuerpo.

Los riboswitches pueden reconocer sus ligandos con alta especificidad y sin ayuda de otro componente celular, es por ello, que algunos grupos de investigación se han dedicado a construir aptámeros artificiales que les permitan regular procesos de interés biotecnológico o de salud. Un grupo de investigadores en Alemania utilizó riboswitches sintéticos (aptazymas) para controlar la expresión de proteínas viroides, que les permitieron modular indirectamente, la replicación de éstos, logrando así: disminución de la infección, propagación y citotoxicidad viral. Utilizaron el adenovirus y el virus del sarampión, un virus de ADN y ARN respectivamente. Los resultados de su trabajo sugieren el uso de estos riboswitches sintéticos en virus oncolíticos, los cuales son utilizados como herramienta terapéutica (Ketzner et al., 2014). La ventaja de usar aptámeros artificiales es que, las moléculas que unen pueden también ser artificiales y no suelen estar presentes en los hospederos.

Algunos aptámeros artificiales han sido seleccionados mediante una técnica llamada, evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial, SELEX, por sus siglas en inglés. Este protocolo ha sido muy útil en el desarrollo de biosensores o moduladores de la respuesta bacteriana. Algunos aptámeros como el de teofilina, tetraciclina y neomicina han sido ampliamente explotados, principalmente para modular la traducción de los genes a los que han sido fusionados. El primero es altamente selectivo para teofilina, a pesar de que esta molécula es similar a otras como la cafeína; no obstante, concentraciones altas de teofilina son tóxicas para las células (Findeiß, Etzel, Will, Mörl, & Stadler, 2017).

Los riboswitches pueden ser aprovechados también en proyectos de investigación. Se pueden fusionar a genes de interés para modular su expresión y conocer más acerca de su función. Los aptámeros de espinaca, brócoli y mango también han sido derivados de SELEX y su propiedad fluorescente, producida como consecuencia de su interacción con su ligando correspondiente; ha sido utilizada para screening celular *in vivo*, o para monitorear la expresión de ARNs pequeños. Los ARN fluorescentes tienen algunas desventajas, pues sólo son transcritos uno por unidad de ARN, mientras que las proteínas fluorescentes son traducidas varias veces (Etzel & Mörl, 2017).

Se ha desarrollado todo un campo de investigación en el desarrollo de aptámeros artificiales, algunos han tenido éxito, sin embargo, los resultados suelen depender del tipo de bacteria en el que son introducidos y del gen que están modulando. Crear riboswitches sintéticos completos, es aún más complejo ya que comúnmente involucran diversos estudios de secuencia y estructura, a nivel físico, bioquímico y molecular. En general, crear riboswitches que controlen la transcripción es más complicado que aquellos que regulan la traducción debido a que los riboswitches transcripcionales deben de responder rápidamente ante la presencia de su correspondiente ligando para que la decisión sobre cuál de las dos estructuras mutuamente excluyentes: antiterminador o terminador, se forme antes de que la ARN polimerasa empiece a transcribir el gen estructural. Afortunadamente, hoy en día se cuenta con programas computacionales para diseñar riboswitches sintéticos (Findeiß et al., 2017).

Retos y perspectivas en el estudio de los riboswitches.

La evolución en el estudio de los riboswitches refleja que este tipo de regulación puede ser a través de un mecanismo de control simple, pero también puede derivar en mecanismos mucho más complejos y diversos (Serganov & Nudler, 2013). Es probable entonces que existan varios riboswitches que aún no han sido descritos (McCown et al., 2017).

Las clases de riboswitches recientemente caracterizadas tienen pocos representantes dentro de los filos bacterianos. Es posible que en los análisis computacionales, los riboswitches desconocidos estén siendo enmascarados por aquellos con una mayor distribución (McCown et al., 2017). Por lo tanto, es necesario desarrollar algoritmos más flexibles, pero igual de sistemáticos, que sean capaces de localizar nuevos elementos de este tipo de reguladores. Un grupo de trabajo utilizó modelos de resolución atómica dentro de los parámetros de sus análisis y lograron identificar nuevas variantes de riboswitches que tienen modificaciones en su dominio de reconocimiento y que pueden unir metabolitos distintos. Este estudio apoya la idea de que cambios pequeños en la secuencia del ARN de los riboswitches pueden provocar grandes cambios en la afinidad y especificidad por su ligando (Weinberg et al. 2017).

La creación de novedosos métodos computacionales también permitirá conocer más casos de los riboswitches que actúan *in trans*, y de los que se localizan en la hebra complementaria de las regiones codificantes que están regulando (André et al., 2008; Loh et al., 2009). Además, es factible descubrir riboswitches

diferentes en otras regiones génicas, como los intrones y las regiones 3' no traducidas (Breaker, 2012).

Cada vez hay más casos reportados de riboswitches traducionales que utilizan formas más elaboradas para regular la expresión de sus genes correspondientes (Breaker, 2018). Al unir lisina, el riboswitch *lysC* de *Escherichia coli* se pliega en una estructura que además de esconder el sitio de unión a ribosoma, también deja libres sitios que son blanco de la RNasa E, enzima que se encarga de degradar ARN mensajero. A través de estos procesos, la bacteria controla tanto los niveles de transcritos como su traducción. Las nuevas clases de riboswitches identificadas *in silico* representan un reto para su caracterización experimental, pues los análisis genéticos, biofísicos y bioquímicos tradicionales ya no son suficientes para determinar la totalidad de mecanismos que llevan a cabo estos interruptores celulares. Técnicas de marcado fluorescente, análisis de molécula única y modelado de resolución atómica son algunas de las herramientas que habría que implementar en las metodologías actuales (Caron et al., 2012).

A pesar de que los riboswitches tienen una alta conservación en secuencia y en estructura secundaria, sus arreglos tridimensionales siguen siendo difíciles de predecir, incluso para aquellas clases de las que ya se determinó alguna estructura cristalográfica. Esto es una limitante para la caracterización experimental de los interruptores bacterianos, pues la dinámica del ARN que se observa *in vitro* puede ser bastante diferente de la que sucede *in vivo* (Caron et al., 2012). La flexibilidad estructural de un riboswitch también impacta negativamente a la tecnología en el diseño de

riboswitches sintéticos. Investigación adicional enfocada en las propiedades de los ARNs de los diferentes aptámeros, ligandos y plataformas de expresión existentes, incrementaría el conocimiento sobre la actividad y plasticidad de estos reguladores, y favorecería la construcción de más biosensores y/o sistemas biológicos complejos que sean útiles a nivel industrial (Findeiß et al., 2017; Peselis & Serganov, 2014).

Conclusiones.

Los riboswitches son elementos de regulación versátiles y ampliamente usados en bacterias y arqueobacterias. Evolutivamente han sido seleccionados para reconocer una gran gama de metabolitos y señales celulares que permiten la regulación de la expresión génica rápida y específica. El análisis computacional de los riboswitches en el conjunto de genomas secuenciados, así como su caracterización experimental han revelado que tienen una gran plasticidad para generar diferentes modos de regulación a niveles de la transcripción, traducción y procesamiento del ARN y ha permitido asociar genes de desconocida función a metabolitos específicos, ayudando así a identificar la función de las proteínas correspondientes. Debemos de continuar desarrollando nuevos métodos de análisis y un criterio abierto para encontrar nuevos riboswitches y entender sus dinámicas de acción.

Referencias.

André, G., Even, S., Putzer, H., Burguière, P., Croux, C., Danchin, A., Soutourina, O. (2008). S-box and T-box riboswitches and antisense RNA control a sulfur metabolic operon of *Clostridium*

acetobutylicum. *Nucleic Acids Res*, 36(18):5955–5969.

Breaker, R. R. (2012). Riboswitches and the RNA world. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 4(2):1–15.

Breaker, R. R. (2018). Riboswitches and translation control. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*10(11):1-14.

Breaker, R. R., Winkler, W., & Nahvi, A. (2002). Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature*, 419(6910):952–956.

Caron, M. P., Bastet, L., Lussier, A., Simoneau-Roy, M., Massé, E., & Lafontaine, D. A. (2012). Dual-acting riboswitch control of translation initiation and mRNA decay. *PNAS*, 109(50):E34444-E3453.

Etzel, M., & Mörl, M. (2017). Synthetic Riboswitches: From Plug and Pray toward Plug and Play. *Biochem* 56(9):1181–1198.

Findeiß, S., Etzel, M., Will, S., Mörl, M., & Stadler, P. F. (2017). Design of artificial riboswitches as biosensors. *Sensors* 17(9):1–28.

Grundy, F. J., & Henkin, T. M. (1993). tRNA as a positive regulator of transcription antitermination in *B. subtilis*. *Cell*, 74(3): 475–482.

Grundy, F. J., & Henkin, T. M. (1994). Conservation of a transcription antitermination mechanism in aminoacyl-tRNA synthetase and amino acid biosynthesis genes in Gram-positive bacteria. *J Mol Biol*, 235:798–804.

Gutierrez-Preciado, A., Henkin, T. M., Grundy, F. J., Yanofsky, C., & Merino, E. (2009). Biochemical Features and Functional

- Implications of the RNA-Based T-Box Regulatory Mechanism. *Microbiol Mol Biol Rev*, 73(1):36–61.
- Gutiérrez-Preciado, A., & Merino, E. (2012). Elucidating metabolic pathways and digging for genes of unknown function in microbial communities: The riboswitch approach. *Clin Microbiol Infect*, 18(SUPPL. 4):35–39.
- Henkin, T. M. (2014). The T box riboswitch: A novel regulatory RNA that utilizes tRNA as its ligand. *Biochim Biophys Acta* 1839(10):959–963.
- Howe, J. A., Wang, H., Fischmann, T. O., Balibar, C. J., Xiao, L., Galgoci, A. M., ... Roemer, T. (2015). Selective small-molecule inhibition of an RNA structural element. *Nature*, 526(7575):672–677.
- Jacob, F., & Monod, J. (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol* 3:318–356.
- Ketzer, P., Kaufmann, J. K., Engelhardt, S., Bossow, S., Von Kalle, C., Hartig, J. S., ... Nettelbeck, D. M. (2014). Artificial riboswitches for gene expression and replication control of DNA and RNA viruses. *PNAS*, 111(5):E554–E562.
- Loh, E., Dussurget, O., Gripenland, J., Vaitkevicius, K., Tiensuu, T., Mandin, P., & Johansson, J. (2009). A trans-Acting Riboswitch Controls Expression of the Virulence Regulator PrfA in *Listeria monocytogenes*. *Cell*, 139 (4):770–779.
- Lotz, T. S., & Suess, B. (2018). Small-Molecule-Binding Riboswitches. *Microbiol Spectrum* 6(4):1–12.
- Mandal, M., Lee, M., Barrick, J. E., Weinberg, Z., Emilsson, G. M., Ruzzo, W. L., & Breaker, R. R. (2004). A glycine-dependent riboswitch that uses cooperative binding to control gene expression. *Science*, 306(5694):275–279.
- Mccown, P. J., Corbino, K. A., Stav, S., Sherlock, M. E., & Breaker, R. R. (2017). Riboswitch diversity and distribution. *RNA*, 23(7):995–1011.
- McCown, P. J., Winkler, W. C., & Breaker, R. R. (2012). Mechanism and Distribution of glmS Ribozymes. *Meth Mol Biol*, 848:1–4.
- Miranda-Ríos, J., Morera, C., Taboada, H., Dávalos, A., Encarnación, S., Mora, J., & Soberón, M. (1997). Expression of thiamin biosynthetic genes (thiCOGE) and production of symbiotic terminal oxidase cbb3 in *Rhizobium etli*. *J Bact* 179(22):6887–6893.
- Miranda-Ríos, J., & Soberón, M. (2007). Cronología del descubrimiento de los riboswitches (ARN que regula la expresión genética). Disponible en http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/libro_25_aniv/capitulo_08.pdf
- Monod, J. (1949). a Certain Number. *Ann Rev Microbio* 3(XI):371–394.
- Peselis, A., & Serganov, A. (2014). Themes and variations in riboswitch structure and function. *Biochim Biophys Acta*, 1839(10):908–918.
- Saad, N. Y., Stamatopoulou, V., Brayé, M., Drainas, D., Stathopoulos, C., & Becker, H. D. (2013). Two-codon T-box riboswitch binding two tRNAs. *PNAS* 110(31):12756–12761.

- Serganov, A., & Nudler, E. (2013). A decade of riboswitches. *Cell*, 152(1–2):17–24.
- Vázquez-Salazar, A., & Lazcano, A. (2018). Early Life: Embracing the RNA World. *Curr Biol*, 28:R220–R222.
- Waters, L. S., & Storz, G. (2009). Regulatory RNAs in Bacteria. *Cell*, 136(4):615–628.
- Weinberg, Z., Lünse, C. E., Corbino, K. A., Ames, T. D., Nelson, J. W., Roth, A., ... Breaker, R. R. (2017). Detection of 224 candidate structured RNAs by Comparative analysis of specific subsets of intergenic regions. *Nucleic Acids Res* 45(18):10811–10823.
- Weinberg, Z., Nelson, J. W., Lönse, C. E., Sherlock, M. E., & Breaker, R. R. (2017a). Bioinformatic analysis of riboswitch structures uncovers variant classes with altered ligand specificity. *PNAS* 114(11):E2077–E2085.
- Weinberg, Z., Nelson, J. W., Lönse, C. E., Sherlock, M. E., & Breaker, R. R. (2017b). Bioinformatic analysis of riboswitch structures uncovers variant classes with altered ligand specificity. *PNAS* 114(11):E2077–E2085.
- Welz, R., & Breaker, R. R. (2007). Ligand binding and gene control characteristics of tandem riboswitches in *Bacillus anthracis*. *RNA* 13(4):573–582.