



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Papel de los dominios de la proteína ribosomal S1 en la
interacción de los mRNAs ricos en adeninas o uracilos con la
subunidad ribosomal 30S”**

Tesis que presenta:

Q. NUBIA JAZMÍN OLVERA MATURANO

Para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias

En la especialidad de

Genética y Biología Molecular

Director de tesis:

Dr. Javier Hernández Sánchez

México, D. F.

Noviembre 2015

Agradezco al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) la beca otorgada durante el desarrollo de este trabajo, mismo que fue realizado en el Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional.

CONTENIDO

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
1. Inicio de la traducción en bacterias	3
1.1 Ribosomas	4
1.1.1 Subunidad ribosomal 50S	5
1.1.2 Subunidad ribosomal 30S	5
1.1.2.1 Proteína ribosomal S1	7
1.1.2.1.1 Dominios OB	8
1.1.2.1.1.1 Características de los dominios OB	8
1.2 Efecto de los codones ricos en adeninas cercanos al codón de inicio	9
Antecedentes	10
Justificación	15
Hipótesis	15
Objetivos	16
Objetivo general	16
Objetivos específicos	16
Materiales y métodos	17
Resultados	33
I. Obtención de las deleciones de la proteína ribosomal S1	33
II. Purificación de las proteínas recombinantes de S1	38
III. Los dominios 1-3 de la proteína S1 son importantes en la interacción con mensajeros ricos en adeninas o uracilos.	41
Discusión	45
Conclusión	48
Perspectivas	48
Referencias	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras terciarias de las subunidades 30S y 50S	6
Figura 2. Dominios de la proteína ribosomal S1	7
Figura 3. Ubicación de la proteína ribosomal S1 en la subunidad 30S	7
Figura 4. Dominios OB canónicos	9
Figura 5. Efecto de las adeninas río abajo del codón de inicio en la síntesis de proteína	11
Figura 6. Codones con un mayor número de adeninas aumentan la unión de mRNA de lacZ a la subunidad 30S	11
Figura 7. RNAs mensajeros ricos en adeninas y uracilos río abajo del codón de inicio, aumentan su unión a la subunidad 30S por medio de la proteína ribosomal S1	13
Figura 8. Efecto de las variantes de S1 en la unión y formación del complejo de inicio de la traducción	14
Figura 9. Obtención de las variantes de S1 mediante PCR	34
Figura 10. Clonación de las mutantes de S1 en el plásmido pJET1.2/blunt	35
Figura 11. Restricción del vector pProEX-1 y de las variantes de S1-pJET1.2/blunt con las enzimas <i>EcoRI</i> y <i>BamHI</i>	36
Figura 12. Restricción de las variantes de S1-pProEX-1 con las enzimas <i>EcoRI</i> y <i>BamHI</i>	37
Figura 13. Alineamiento de la secuencia de la construcción S1 Δ 1-pProEX-1	38
Figura 14. Análisis de la expresión de las variantes de S1	39
Figura 15. Purificación de las proteínas mutantes de S1	40
Figura 16. Inmunodetección de las variantes de S1 purificadas	41
Figura 17. Los dominios 1 a 3 de la proteína ribosomal S1 son necesarios para la interacción con RNAs mensajeros ricos en adeninas río abajo del codón de inicio	42
Figura 18. Los dominios 1 a 3 de la proteína ribosomal S1 son necesarios para la interacción con RNAs mensajeros ricos en uracilos río abajo del codón de inicio	43
Figura 19. La proteína S1 o sus variantes no se unen con RNAs mensajeros ricos en guaninas río abajo del codón de inicio.	44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cantidad de reactivos utilizados en la mezcla de reacción de PCR	19
Tabla 2. Condiciones del programa de amplificación de PCR	19
Tabla 3. Condiciones para generar extremos romos en los productos de PCR	20
Tabla 4. Condiciones de reacción de la mezcla de ligación de los productos de PCR en pJET1.2	20
Tabla 5. Cantidad de reactivos utilizados en la mezcla de reacción de PCR	21
Tabla 6. Condiciones del programa de amplificación de PCR	22
Tabla 7. Condiciones de restricción de pJET1.2-variantes de S1 y pProEx-1	23
Tabla 8. Condiciones de ligación de pProEx-1-variantes de S1	24
Tabla 9. Condiciones de restricción de pProEx-1-variantes de S1	25
Tabla 10. Cepa utilizada	29
Tabla 11. Plásmidos usados	29
Tabla 12. Características de los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR	30
Tabla 13. Características de los oligonucleótidos de pJET1.2	31
Tabla 14. Buffers utilizados en la purificación de las proteínas recombinantes de S1 por cromatografía de afinidad	31
Tabla 15. Secuencia de los oligonucleótidos de RNA utilizados en los ensayos de retardamiento	32

Resumen

Las adeninas río abajo del codón de inicio promueven la síntesis de proteínas, al incrementar la afinidad del ARN mensajero con la subunidad ribosomal 30S. La proteína ribosomal S1 parece ser responsable de ésta afinidad, ya que dota a la subunidad 30S con una actividad de chaperona de ARN la cual es esencial para el acoplamiento y desdoblamiento de ARNs mensajeros; así como para posicionar correctamente el codón de inicio dentro del canal de decodificación.

Con la finalidad de analizar la afinidad de unión de la proteína S1 con ARNs mensajeros sintéticos ricos en adeninas, uracilos o guaninas, y los dominios involucrados, se analizó la interacción de la proteína S1 silvestre y diferentes mutantes con éstos mensajeros. Se obtuvieron, mediante PCR, mutantes de la proteína S1 que carecen de los dominios 1, 1-2, 1-3 y 6 y se analizó, por medio de ensayos de retardamiento, su interacción con ARNs mensajeros ricos en adeninas, uracilos o guaninas.

Los resultados mostraron que la afinidad de unión de S1 silvestre y mutantes fue mayor con los ARNs mensajeros ricos en adeninas, seguido por uracilos y guaninas. Adicionalmente, los resultados indicaron que los dominios 1-3 de S1 son esenciales para la unión de todos los ARNs mensajeros probados.

Abstract

Adenines downstream of the start codon enhance protein synthesis by increasing the affinity of the messenger RNA with the 30S ribosomal subunit. Ribosomal protein S1 seems to be responsible for this affinity because it endows the 30S subunit with an RNA chaperone activity that is essential for the docking and unfolding of structured mRNAs and to position the initiation codon inside the decoding channel correctly.

To analyze the binding affinity of S1 protein with adenine-, uracil- and guanine-rich synthetic mRNAs, and the domains involved, the interaction of S1 WT and mutants with these messengers was tested. S1 mutants lacking domains 1, 1-2, 1-3 and 6 were obtained by PCR and their interaction with adenine-, uracil- and guanine-rich mRNAs was analyzed by Electrophoretic Mobility Shift Assays.

The results showed that the binding affinity of S1 WT and mutants was higher with adenine-rich mRNAs followed by those rich uracils and then those with guanines. In addition, the results indicated that domains 1-3 of S1 are essential for the binding of all the mRNAs tested.

Introducción

1. Inicio de la traducción en bacterias

El “flujo de la información genética”, transcurre a través de los procesos de replicación, transcripción y traducción. La molécula generada en cada etapa aporta la información necesaria para la síntesis de la siguiente molécula (Luque y Sánchez, 2001).

El proceso de síntesis de proteínas, es muy similar en todos los reinos (Gualerzi, *et al.*, 2000; Laursen, *et al.*, 2005), dentro de la maquinaria celular que también es altamente conservada (Kozak, 1983). Dicho proceso toma lugar en el ribosoma y comprende cuatro etapas: inicio, elongación, terminación y reciclamiento (Gualerzi, *et al.*, 2000; Laursen, *et al.*, 2005). En el inicio de la traducción, los pasos que preceden a la formación del primer enlace peptídico tienen notables diferencias entre procariontes y eucariontes (Kozak, 1983).

El inicio de la traducción es de suma importancia, debido a que es el paso limitante para la síntesis de proteínas (Ray y Pearson, 1975). Esta fase es promovida por tres factores de inicio: IF1, IF2 e IF3 (Shine y Dalgarno, 1974) e involucra el reconocimiento y unión de la subunidad 30S al sitio de unión al ribosoma (RBS, por sus siglas en inglés) del mRNA, con el fin de seleccionar el codón de inicio apropiado (Gualerzi, *et al.*, 2000). Dentro del sitio de unión al ribosoma se encuentra una secuencia rica en pirimidinas denominada Shine-Dalgarno (SD) cerca de 6 a 9 nucleótidos (nt) río arriba del codón de inicio de la traducción, con una región espaciadora de 3 a 12 nucleótidos entre éste codón y la secuencia Shine-Dalgarno (Gold, 1989; Ringquist, *et al.*, 1992), la cual interactúa con la secuencia anti-SD en el extremo 3' del RNA ribosomal (rRNA, por sus siglas en inglés) 16S (Shine y Dalgarno, 1974).

Es fundamental que los elementos del mRNA, los factores de inicio (IF1, IF2 e IF3) y el formil-metionil RNA de transferencia (fMet-tRNA^{fMet}) trabajen en conjunto con los ribosomas para que se lleve a cabo la traducción.

1.1 Ribosomas

El ribosoma es la ribozima más grande y compleja que se ha encontrado en la naturaleza. En bacterias, consta de dos subunidades de distinto tamaño; una subunidad pequeña 30S y una grande 50S. Éstas se ensamblan durante el inicio de la traducción y tienen una tasa de sedimentación de 70S (Condon, *et al.*, 1995).

En *E. coli*, un tercio de la masa del ribosoma consiste en proteínas y dos tercios consiste en rRNA (Schuwirth, *et al.*, 2005). La subunidad 30S, está compuesta por 21 proteínas y un rRNA de 1542 nucleótidos que sedimenta a 16S.

Por otra parte, la subunidad ribosomal 50S, se compone de 33 proteínas y dos rRNAs que contienen alrededor de 120 y 2900 nucleótidos; los cuáles sedimentan a 5S y 23S, respectivamente (Noller y Nomura, 1996).

Las subunidades ribosomales llevan a cabo distintas funciones durante la síntesis de proteínas, la subunidad ribosomal interacciona con el mRNA durante el inicio de la traducción y decodifica el mensaje (Gualerzi, *et al.*, 2000), ya que contiene el centro de decodificación el cual se asegura que el tRNA con el anticodón correcto este unido al ribosoma y se aparee con el codón del mRNA. Por otro lado, la subunidad grande cataliza la formación del enlace peptídico (Moore y Steitz, 2003) mediante el centro de peptidil-transferasa (PTC, por sus siglas en inglés).

La función y calidad de los ribosomas determinan la eficiencia de traducción. La célula no solo necesita la cantidad correcta de ribosomas, sino que además aquellos ribosomas producidos deben funcionar correctamente (van de Peer *et al.*, 1999). Además, el ribosoma, cuando está correctamente ensamblado, es resistente a la actividad de nucleasas y es utilizado durante muchos ciclos de traducción (Kaczanowska y Rydén-Aulin, 2007).

1.1.1 Subunidad ribosomal 50S

En la subunidad ribosomal grande 50S (Fig. 1B), la estructura secundaria del rRNA 23S puede ser subdividida en seis dominios (Noller, *et al.*, 1981) y el rRNA 5S es considerado el séptimo dominio de las subunidades (Steitz y Moore, 2003). El rRNA 5S y los seis dominios de estructuras secundarias del rRNA 23S, tienen formas complejas y complicadas que encajan entre ellas para producir una masa de RNA compacta. Sin embargo, el rRNA 5S y 23S no interactúan extensamente el uno con el otro (Ban, *et al.*, 2000; Harms, *et al.*, 2001).

La actividad enzimática central de la subunidad 50S, el centro de peptidil-transferasa (PTC), está ubicada en el dominio V. Existen 15 proteínas que interactúan con este dominio pero ninguna fracción proteica es observable dentro de aproximadamente 18 Å de la PTC lo que significa que el ribosoma es una ribozima (Nissen, *et al.*, 2000). El túnel de salida del polipéptido comienza justo abajo del PTC y provee un pasaje estable para el polipéptido naciente a través de la subunidad al lado citoplasmático de la subunidad 50S. Este túnel tiene una longitud aproximada de 100 Å y hasta 25 Å de diámetro, además está formado en gran medida por RNA (Nissen, *et al.*, 2000).

La mayoría de las proteínas ribosomales de la subunidad 50S se encuentran situadas en la superficie exterior, mientras que el interior es pobre en proteínas (Ban, *et al.*, 2000; Harms, *et al.*, 2001).

1.1.2 Subunidad ribosomal 30S

En la subunidad ribosomal 30S (Fig. 1A), el rRNA 16S puede dividirse en dominios terciarios los cuales son responsables de la forma global de la subunidad pequeña. El dominio 5' del rRNA 16S forma el cuerpo, el dominio central forma la plataforma y el dominio 3'; el cual se subdivide en un dominio mayor 3' que forma la cabeza (Yusupov, *et al.*, 2001) y un dominio menor 3' que consiste en dos hélices en la superficie de la subunidad (hélice 44 y 45).

Las proteínas ribosomales de la subunidad 30S principalmente se concentran en la parte superior, algunas otras se localizan en la periferia de la interfaz lo que les permite hacer contacto con la subunidad 50S (Wimberly, *et al.*, 2000).

El entorno de la plataforma consiste de diversas proteínas ribosomales esenciales, llamadas S1, S2, S7, S11 y S18 (Yusupova, *et al.*, 2001; Marzi, *et al.*, 2007; Sengupta, *et al.*, 2001). Entre estas, S1 es una proteína ribosomal atípica debido a que es la más grande y ácida, además de que está débilmente y no siempre asociada con la subunidad 30S (Subramanian y van Duin, 1977).

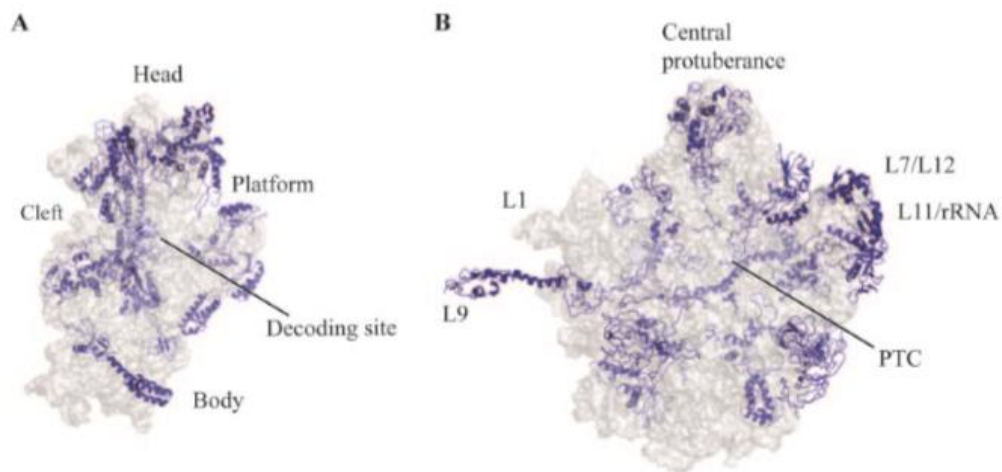


Figura 1. Estructuras terciarias de las subunidades 30S (A) y 50S (B), vistas desde el lado de la interfaz las proteínas ribosomales se muestran como cintas azules y el rRNA se muestra como esferas gris traslúcido. Las características importantes están etiquetadas. Imagen adaptada de (Kaczanowska y Rydén-Aulin, 2007).

1.1.2.1 Proteína ribosomal S1

S1 es una proteína ácida de unión a RNA (Draper y van Hippel, 1978) codificada dentro del gen *rpsA* (Sorensen, *et al.*, 1998). Es la proteína ribosomal más grande de la subunidad 30S, consiste de 557 aminoácidos con seis motivos repetidos “Dominios OB” (Fig.2) (Duval, *et al.*, 2013) y tiene un peso de 61 kDa (Giorginis y Subramanian, 1980). Se encuentra, aunque no siempre, débilmente asociada con la subunidad 30S en la región de la plataforma (Fig.3) (Subramanian y van Duin, 1977).

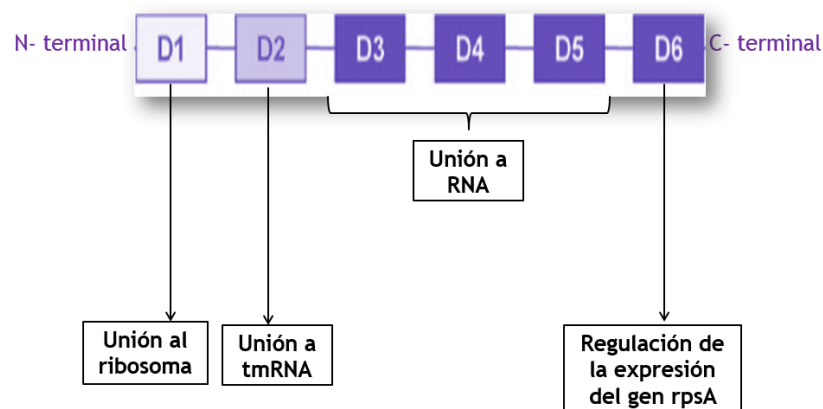


Figura 2. Dominios de la proteína ribosomal S1. Información obtenida de (Dreyfus, M. 1988; Condon, C. 2003; Diwa *et al.*, 2002).

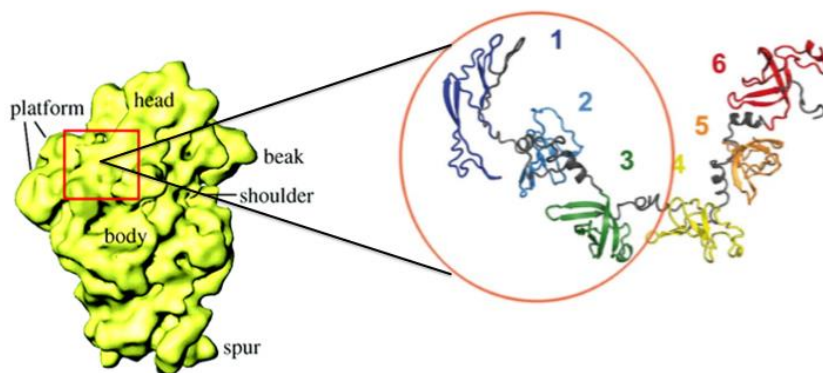


Figura 3. Ubicación de la proteína ribosomal S1 en la subunidad 30S. Imagen modificada de (Sengupta, *et al.*, 2001; Duval, *et al.*, 2013).

1.1.2.1.1 Dominios OB

Los dominios OB (Oligonucleotide/Oligosaccharide-Binding) son motivos estructurales compactos, nombrados por sus propiedades de unión de oligonucleótidos/oligosacáridos. Las proteínas que contienen este motivo están involucradas, casi en su mayoría, en procesos que requieren la manipulación de DNA o RNA de cadena sencilla (ssDNA/ssRNA, por sus siglas en inglés). La presencia de dominios OB en muchas proteínas les permite participar en diferentes procesos como replicación, recombinación y reparación de DNA, así como para la transcripción, traducción, respuesta a choque frío y mantenimiento de la telomerasa (Theobald, *et al.*, 2003).

1.1.2.1.1.1 Características de los dominios OB

Los dominios OB (Fig.4) consisten de dos láminas β antiparalelas, con dos o tres cadenas donde la cadena 1 es compartida por ambas láminas. Tienen una longitud entre 70 y 150 aminoácidos. La variabilidad en la longitud de estos dominios es principalmente debido a diferencias en la longitud de sus asas, las cuales son estructuras secundarias bien conservadas.

Estos motivos son comunes como dominios de reconocimiento para ácidos nucleicos en proteínas grandes que frecuentemente oligomerizan (Murzin, 1993). Ciertas características de unión del ligando están conservadas entre complejos OB-DNA, incluyendo la localización de la superficie de unión, la polaridad del ácido nucleico con respecto al dominio OB, y particularmente las interacciones entre ácido nucleico-proteína comúnmente utilizadas para reconocimiento de ácidos nucleicos de cadena sencilla inusualmente estructurados (Theobald, *et al.*, 2003).

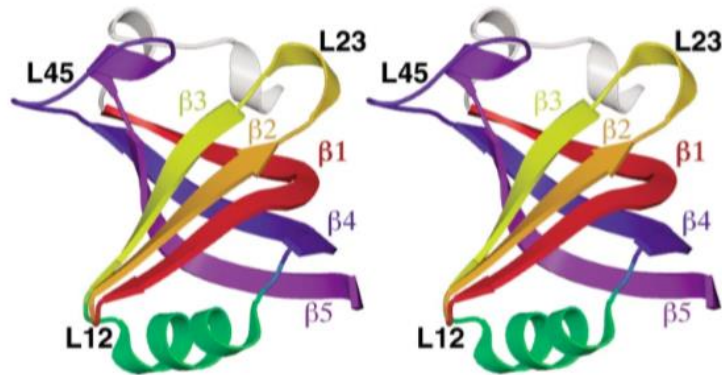


Fig.4 Dominios OB canónicos. Imagen adaptada de (Theobald, *et al.*, 2003).

1.2 Efecto de los codones ricos en adeninas cercanos al codón de inicio

Análisis estadísticos de los sitios de inicio de la traducción en *E. coli* han revelado que la región río abajo del codón de inicio de muchos genes contiene secuencias ricas en adeninas (Rudd y Schneider, 1994). En un estudio de las secuencias de nucleótidos de los ORFs de *E. coli* se observó una tendencia en la cual AAA y AAU son los codones que aparecen con mayor frecuencia en la segunda posición, y que dichos codones están relacionados con una alta eficiencia de la traducción (Sato, *et al.*, 2001). Debido a esos estudios se ha propuesto que las secuencias ricas en adeninas incrementan la eficiencia de la traducción en *E. coli*, como lo ha demostrado el aumento en la expresión de los genes del interferón gama humano y del cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) después de incrementar el contenido de adeninas en la región río abajo del codón de inicio (Chen, *et al.*, 2004).

Secuencias ricas en adeninas río abajo del codón de inicio, pueden contribuir significativamente a la unión del ribosoma y a la expresión del mensajero en *E. coli* (Brock, *et al.*, 2007). Estas secuencias favorecen la expresión del mensajero incluso en ausencia de Shine-Dalgarno (Zamora-Romo, *et al.*, 2007).

Los multímeros de CA río abajo del codón de inicio del mensajero promueven su unión con el ribosoma así como la traducción de éste, aunque en este trabajo no queda claro si las citosinas juegan algún papel en este efecto (Martin-Farmer y Janssen, 1999).

Los codones ricos en adeninas producen un incremento en la unión del mRNA al ribosoma *in vivo*, incluso en ausencia de la secuencia SD y otras señales de traducción contenidas dentro de la región 5'UTR, favoreciendo su integridad al quedar protegido de la degradación (Martin-Farmer y Janssen, 1999). En concordancia con esto, otras investigaciones han reportado que la sustitución de bases que disminuye las adeninas río abajo en uno o dos nucleótidos y aumenta las guaninas y/o citosinas en las secuencias codificantes de los genes *aroL*, *pncB* y *cysJ* de *E. coli*, disminuye significativamente su expresión y la afinidad del transcrito correspondiente por el ribosoma. (Brock, *et al.*, 2007).

Sin embargo, cuando las adeninas forman parte de codones raros (AGA, AGG), y la poza de tRNAs específicos es reducida, la síntesis de proteína es inhibida debido a pausas ribosomales sobre los codones cuyo tRNA es escaso y a la acumulación de peptidil tRNA (Jacinto-Loeza, *et al.*, 2008).

Antecedentes

El evento más crítico en el inicio de la traducción involucra el reconocimiento y unión de la subunidad 30S a la región de inicio de la traducción en el mRNA, para seleccionar el codón de inicio apropiado (Gualerzi, *et al.*, 2000).

Evidencia experimental muestra, mediante un ensayo de transcripción-traducción *in vitro* (Fig. 5) para el cual se hicieron construcciones del mensajero de *lacZ* en los codones 2 y 3, que al aumentar el contenido de adeninas en dichos codones se incrementa la síntesis de β -galactosidasa. Éste incremento en la síntesis de proteína está correlacionado con una mayor afinidad del mensajero por la subunidad 30S al aumentar el contenido de adeninas río abajo del codón de inicio (Fig. 6) (Castillo-Méndez, *et al.*, 2012).

Así, estos autores plantean que las adeninas regulan la traducción en dos etapas: 1) durante el inicio de la traducción, potenciando la afinidad del mRNA con los ribosomas, 2) Durante la elongación temprana, debido a que éstos codones son fácilmente decodificados, siempre y cuando la poza de tRNA no esté limitada.

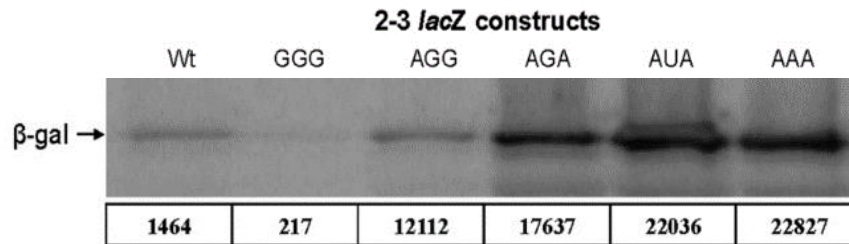


Fig.5 Efecto de las adeninas río abajo del codón de inicio en la síntesis de proteína. Imagen modificada de (Castillo-Méndez, *et al.*, 2012).

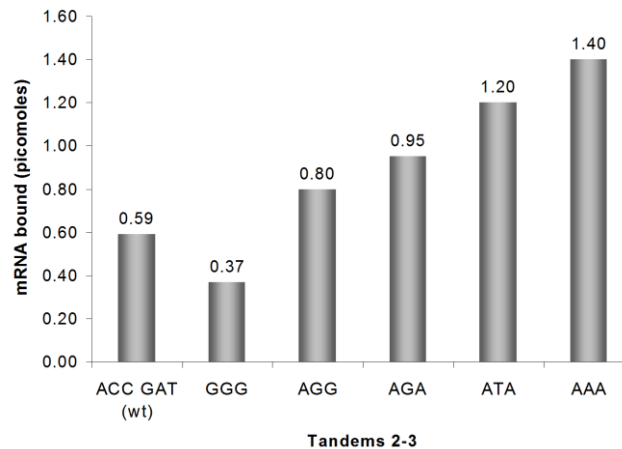


Fig.6 Codones con un mayor número de adeninas aumentan la unión de mRNA de lacZ a la subunidad 30S. Imagen modificada de (Castillo-Méndez, *et al.*, 2012).

Sin embargo, no se sabe si esta mayor afinidad es debida a la interacción del mensajero con RNA ribosomal o con proteínas ribosomales. Se han descrito diversas funciones de la proteína ribosomal S1 que tienen que ver con su unión a RNA, por lo que S1 es una excelente candidata a participar en dicha interacción.

Se conoce que la proteína ribosomal S1 puede actuar como factor traduccional, favoreciendo la traducción tanto de mensajeros que contienen Shine-Dalgarno, como de mensajeros sin esta secuencia. Así mismo, se sabe que la sobreexpresión de S1 está relacionada con un aumento en la vida media del mensajero, mientras que su eliminación tiene el efecto contrario (Boni *et al.*, 1991; Braun *et al.*, 1998; Wagner *et al.*, 1994. Coburn *et al.*, 1999). Recientemente, S1 se ha implicado, aunque con funciones auxiliares, en trans-traducción [Componente clave de múltiples vías de control de calidad en las bacterias que aseguran que las proteínas se sintetizan con alta fidelidad, se lleva a cabo por un complejo de ribonucleoproteína compuesta de tmRNA y la proteína SmpB.] (Saguy, *et al.*, 2007; Keiler,) y en la modulación de la eficiencia de la traducción (Sukhodolets, *et al.*, 2006). S1 se sabe que funciona principalmente en el inicio de la traducción, aunque es también un componente de la polimerasa de RNA dependiente de RNA del fago Q β y se ha reportado que funciona como helicasa y un anti-terminador (Subramanian, 1983).

Cifuentes y colaboradores sugieren que al aumentar el contenido de adeninas o uracilos río abajo del codón de inicio se incrementa la unión de los mensajeros con la subunidad 30S por medio de la proteína ribosomal S1 (Fig. 7) (Cifuentes, *et al.*, 2013).

Lo anterior sugiere la participación de la proteína S1 en la formación del complejo ternario, sin embargo se desconoce qué dominios de la proteína S1 son los que participan en dicha formación cuando se tienen mensajeros ricos en adeninas o uracilos río abajo del codón de inicio.

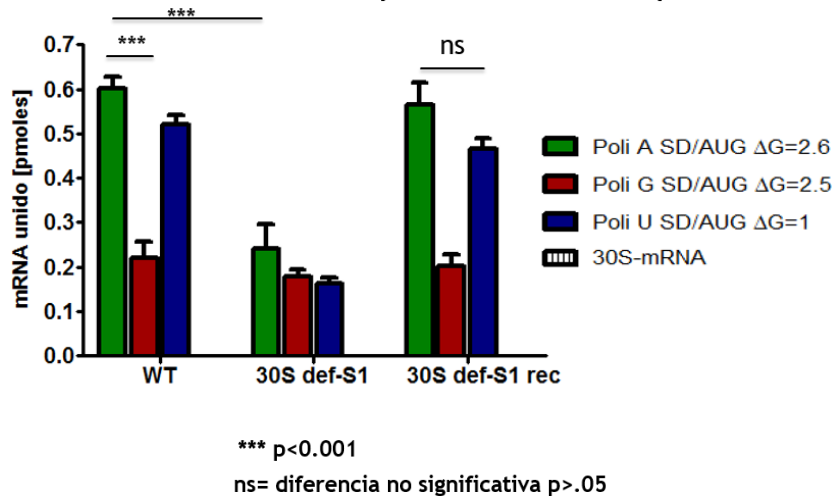
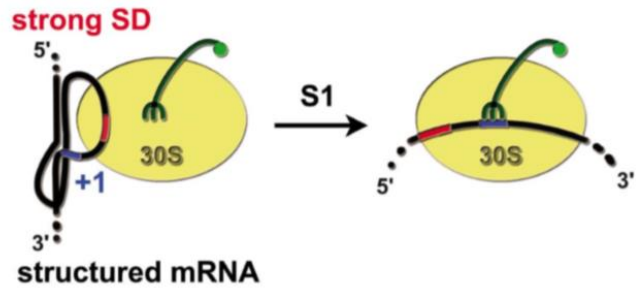
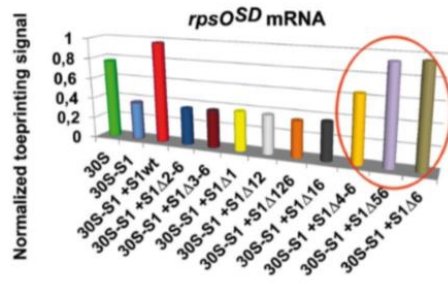


Fig.7 RNAs mensajeros ricos en adeninas y uracilos rí abajo del codón de inicio, aumentan su unión a la subunidad 30S por medio de la proteína ribosomal S1. Imagen modificada de (Cifuentes, *et al.*, 2013).

Actualmente, se sabe que los tres primeros dominios de la proteína S1 dotan a la subunidad 30S con una actividad de chaperona de RNA que es esencial para el acoplamiento y desdoblamiento de mRNAs estructurados, y para el correcto posicionamiento del codón de inicio dentro del canal de decodificación, al cual provee una actividad de fusión de RNA . Sin embargo, S1 no es requerida por todos los mRNAs y actúa de forma distinta dependiendo del tipo de elementos regulatorios presentes en un mRNA (Duval, *et al.*, 2013). Estos autores, proponen un modelo en el que explican el efecto de las variantes de S1 (deleciones de los dominios de S1) en la unión y formación del complejo de inicio de la traducción (Fig. 8), mediante un proceso de dos pasos: el primero conlleva la interacción del mensajero con la subunidad 30S y el segundo implica el desdoblamiento del RNA para su posterior acomodamiento dentro de la subunidad pequeña.

El objetivo de este trabajo fue analizar la interacción de las mutantes de la proteína S1 con mRNAs ricos en adeninas, guaninas, citosinas o uracilos rí abajo del codón de inicio.

mRNA accommodation



mRNA docking and accommodation

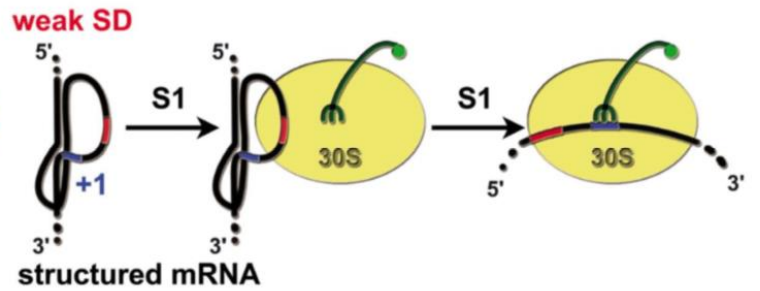
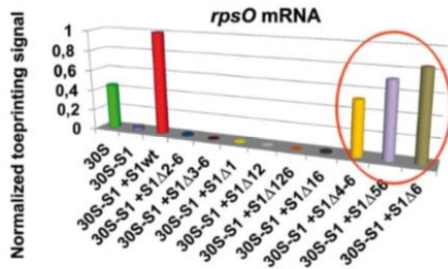


Fig.8 Efecto de las variantes de S1 en la unión y formación del complejo de inicio de la traducción. Modificada de (Duval, *et al.*, 2013).

Justificación

El inicio de la traducción es el paso determinante de la síntesis de proteínas. La interacción del mensajero con el ribosoma es esencial en esta etapa, debido a que se ha observado una reducción en la síntesis de proteínas cuando estas interacciones son débiles o nulas. Diversos estudios indican que un aumento en el contenido de adeninas o uracilos río abajo del codón de inicio incrementan la eficiencia de la traducción. La proteína ribosomal S1 es una excelente candidata a contribuir en la interacción del RNA mensajero con el ribosoma a través de su unión a éstas regiones, además de funcionar como proteína de anclaje en la formación del complejo ternario de mensajeros estructurados.

Por lo tanto, el análisis de la interacción de la proteína ribosomal S1 y los mRNAs ricos en adeninas o uracilos río abajo del codón de inicio, contribuirá a entender los mecanismos por los cuales dichas regiones promueven la síntesis de proteínas.

Hipótesis

Los dominios del extremo N-terminal 1-3 de la proteína ribosomal S1 participan en la interacción con mRNAs ricos en adeninas o uracilos.

Objetivos

Objetivo general

Determinar el papel de los dominios del extremo N-terminal 1, 2 y 3 de la proteína ribosomal S1 en la interacción entre RNAs mensajeros ricos en adeninas o uracilos.

Objetivos específicos

1. Obtener mutantes de la proteína ribosomal S1 con deleciones de los dominios 1,1-2, 1-3 y 6.
2. Purificar las mutantes de la proteína ribosomal S1.
3. Evaluar la interacción de las mutantes de la proteína ribosomal S1 con mRNAs ricos en adeninas, guaninas o uracilos.

Materiales y métodos

I. Cepas

Se utilizaron las cepas de *Escherichia coli* DH5 α y C600. Las características de estas cepas se encuentran en la Tabla 10.

II. Plásmidos

Se usó el vector de transición pJET1.2 para clonar las secuencias codificantes del gen *rpsA* y sus variantes, así mismo se utilizó el plásmido de expresión pProEX-1 para subclonar las mismas. Las características de ambos plásmidos se encuentran en la Tabla 11 (La expresión del plásmido pProEX-1-S1 y sus variantes en DH5 α estuvo bajo el control del promotor *ptac*, inducible por IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido, SIGMA).

III. Preparación de células competentes DH5 α

A. Obtención con CaCl₂

Las células DH5 α se crecieron durante toda la noche a 37°C en 5 ml de medio LB. El cultivo se diluyó 1:100 en 100 ml de medio LB, pre-incubado a 37° durante 30 minutos, y se crecieron a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica (D.O.) a 600nm de 0.6-0.9. Las células se recuperaron mediante centrifugación a 7000 rpm por 10 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en 20 ml de CaCl₂ 0.1 M; éste procedimiento se repitió utilizando 15, 10 y 5 ml de CaCl₂ 0.1 M. Posteriormente se realizó una última centrifugación a 7000 rpm durante 10 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet, manteniéndolo en hielo, en 2.5 ml de CaCl₂ 0.1 M y 250 μ l de glicerol estéril. Por último, la suspensión de células se dividió en alícuotas de 100 μ l y se congelaron inmediatamente en hielo seco con metanol. Finalmente se almacenaron a -70°C.

B. Obtención con TFB

Las células DH5 α se crecieron durante toda la noche a 37°C en 5 ml de medio LB. El cultivo se diluyó 1:100 en 100 ml de medio LB, pre-incubado a 37° durante 30 minutos, y se crecieron a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica (D.O.) a 600nm de 0.4-0.6. Las células se recuperaron mediante centrifugación a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante, se resuspendieron en 10 ml de TFB I y se incubaron en hielo durante 10 minutos. Posteriormente se realizó una última centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet, manteniéndolo en hielo, en 4 ml de TFB II. Por último, la suspensión de células se dividió en alícuotas de 100 μ l y se congelaron inmediatamente en hielo seco con metanol. Finalmente se almacenaron a -70°C.

IV. Diseño de oligonucleótidos

Las características de los oligonucleótidos que se utilizaron en este proyecto se encuentran en las Tabla 12.

V. Amplificación de las secuencias codificantes del gen *rpsA* y sus variantes

Para amplificar el gen *rpsA* y sus deleciones se utilizó la enzima *Taq* DNA polimerasa (New England Biolabs) y los oligonucleótidos forward y reverse mencionados en la tabla 12. Esta enzima posee la actividad de DNA polimerasa 5'→3' y 5' endonucleasa, por lo que generó extremos cohesivos en los productos de amplificación. Las condiciones que se usaron para cada una de las reacciones de amplificación fueron:

Tabla 1. Cantidad de reactivos utilizados en la mezcla de reacción de PCR.

Reactivo	Cantidad
10X Standard <i>Taq</i> Reaction Buffer	2.5 μ l
2.5 mM dNTPs	2 μ l
10 μ M Forward Primer	0.5 μ l
10 μ M Reverse Primer	0.5 μ l
<i>Taq</i> DNA Polymerase	0.125 μ l
Template DNA [<1000 ng]	1 μ l
H ₂ O Milli-Q®	18.375 μ l
Total volume	25 μ l

Tabla 2. Condiciones del programa de amplificación de PCR.

Temperatura	Tiempo	No. Ciclos
95 °C	5 min	1X
95 °C	30 s	30X
65 °C	30 s	
68 °C	2 min	
68 °C	10 min	1X
4 °C	∞	

VI. Clonación en el vector transitorio pJET1.2/Blunt

Los productos de PCR obtenidos de la amplificación del gen *rpsA* y sus variantes se limpiaron por columna con el “QIAquick® Gel Extraction Kit (250)”. Las condiciones de reacción para clonar en el vector pJET1.2, se modificaron con respecto a las indicaciones del “CloneJET™ PCR Cloning Kit” para la obtención de mayor número de clonas transformadas. Se generaron extremos romos incubando a 70 °C por 5 minutos de acuerdo a las condiciones siguientes:

Tabla 3. Condiciones para generar extremos romos en los productos de PCR.

Reactivo	Cantidad
2X Reaction Buffer	10 μ l
DNA Blunting Enzyme	1 μ l
Purified PCR product	2 μ l
H ₂ O Milli-Q®	5 μ l
Total volume	18 μ l

Una vez que se obtuvieron los productos de PCR con extremos romos, las mezclas se mantuvieron en hielo y se clonaron en pJET1.2 adicionando los reactivos siguientes, para obtener un volumen final de 20 μ l por muestra:

Tabla 4. Condiciones de reacción de la mezcla de ligación de los productos de PCR en pJET1.2.

Reactivo	Cantidad
pJET1.2 Blunt Cloning Vector	1 μ l
T4 DNA Ligase (New England Biolabs)	1 μ l
Total volume	20 μ l

Posteriormente se homogeneizaron las mezclas de ligación, se incubaron a 22 °C durante 30 minutos y se transformó todo el volumen de cada una de las ligaciones (20 μ l) en células DH5 α .

VII. Selección de clonas candidatas mediante obtención de plásmido y PCR

A. Cultivo de cepas y obtención de DNA plasmídico

Se seleccionaron 2 candidatas de cada placa de células DH5 α transformadas con S1 y sus variantes, para resembrarlas 3 veces en placa de LB^{Amp100}. Se seleccionó una candidata purificada de cada placa de LB^{Amp100} y se inocularon cultivos de 5 ml de LB^{Amp100} para cada una, se incubaron durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente, se extrajeron los plásmidos con “Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System” y se cuantificaron con “NanoDrop 2000c (Thermo SCIENTIFIC)”.

B. Amplificación de las candidatas clonadas en pJET1.2/Blunt

Las candidatas clonadas en pJET1.2 se amplificaron con la enzima *Taq* DNA polimerasa (New England Biolabs) y los oligonucleótidos forward y reverse mencionados en la tabla 13. Esta enzima posee la actividad de DNA polimerasa 5'→3' y 5' endonucleasa, por lo que generó extremos cohesivos en los productos de amplificación. Las condiciones que se usaron para cada una de las reacciones de amplificación fueron:

Tabla 5. Cantidad de reactivos utilizados en la mezcla de reacción de PCR.

Reactivo	Cantidad
10X Standard <i>Taq</i> Reaction Buffer	2.5 μ l
2.5 mM dNTPs	2 μ l
10 μ M Forward Primer	0.5 μ l
10 μ M Reverse Primer	0.5 μ l
<i>Taq</i> DNA Polymerase	0.125 μ l
Template DNA [<1000 ng]	1 μ l
H ₂ O Milli-Q®	18.375 μ l
Total volume	25 μ l

Tabla 6. Condiciones del programa de amplificación de PCR.

Temperatura	Tiempo	No. Ciclos
95 °C	5 min	1X
95 °C	30 s	30X
60 °C	30 s	
68 °C	2 min	
68 °C	5 min	
4 °C	∞	1X

C. Secuenciación de candidatas en pJET1.2/Blunt

De las candidatas amplificadas, se seleccionó una por cada mutante de S1. Dichas candidatas se secuenciaron utilizando el “*BigDye® Terminator v3.1 Cycle sequencing Kit*” y posteriormente los productos de reacción se precipitaron. Finalmente se analizaron en “310 Genetic Analyzer Applied Biosystems” en la Unidad de Ácidos Nucleicos del Departamento GBM.

D. Precipitación de la reacción de secuenciación

A los tubos de la reacción de secuenciación se les dió un spin y se pasó la reacción a tubos Eppendorf de 1.5 ml. Se adicionó 5 µl de EDTA 125 mM y 60 µl de etanol al 100%, se mezcló muy bien la reacción y se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos (manteniendo cubiertos los tubos con papel aluminio). Posteriormente, se centrifugó a 10,000 rpm durante 30 minutos a 4°C e inmediatamente se eliminó el sobrenadante. Se adicionaron 60 µl de etanol al 70% y se centrifugó nuevamente a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Finalmente, se eliminó cuidadosamente el sobrenadante, se secó en el generador de vacío por 5 minutos, envolviendo los tubos de reacción con papel aluminio y se guardó a -20°C.

VIII. Subclonación en pProEX-1

A. Restricción de clonas candidatas de pJET1.2/Blunt que contienen el gen *rpsA* silvestre o mutante, con las enzimas *EcoRI* y *BamHI*

El DNA plasmídico de las mutantes *rpsA* Δ 6, *rpsA* Δ 1-2 y *rpsA* Δ 1-3 en pJET1.2 y el plásmido pProEx-1 que anteriormente se extrajeron con “Wizard® Plus SV MiniprepsDNA Purification System”, se restringieron utilizando las enzimas *EcoRI* y *BamHI*; incubándose durante 2 horas a 37°C. En el caso de la mutante S1 Δ 1, producto de la amplificación del gen *rpsA* Δ 1, ésta se incubó durante 4 horas a 37°C y posteriormente a 4°C toda la noche. Las condiciones utilizadas para dichas restricciones se describen en la tabla siguiente:

Tabla 7. Condiciones de restricción de pJET1.2-variantes de S1 y pProEx-1.

Reactivo	pJET-S1 Δ 6	pJET-S1 Δ 12	pJET-S1 Δ 13	S1 Δ 1	pProEX-1
DNA	3 μ l	16 μ l	16 μ l	16 μ l	10 μ l
<i>EcoRI</i>	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l
<i>BamHI</i>	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l
Buffer 4	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l
H ₂ O Milli-Q®	13 μ l	-	-	-	6 μ l
Total volume	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l

Las mutantes y el vector pProEX-1 restringidos se corrieron en un gel de agarosa al 0.9% y posteriormente se limpiaron por columna con el “QIAquick® Gel Extraction Kit (250)”.

B. Ligación de los insertos de las mutantes de S1 a pProEX-1

Se incubaron los insertos correspondientes a cada mutante de S1 con el vector pProEX-1 restringido durante toda la noche a 4°C, de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 8. Condiciones de ligación de pProEx-1-variantes de S1.

Reactivo	S1Δ6, S1Δ12 y S1Δ13	S1Δ1
Insert	13 µl	3.43 µl
Vector	3.5 µl	1 µl
T4 DNA ligase Buffer	2 µl	1 µl
T4 DNA ligase enzyme	0.2 µl	1 µl
H ₂ O Milli-Q®	1.3 µl	3.57 µl
Total volume	20 µl	10 µl

En el caso de la mutante S1Δ1, ésta se utilizó en una relación 5:1 (inserto: vector), se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente y posteriormente a 4°C toda la noche. Una vez ligada cada mutante de S1 al vector de expresión se transformaron en células DH5α. Posteriormente, se seleccionaron 2 clonas candidatas de cada variante de S1 de acuerdo al protocolo descrito en la sección VII, inciso A.

C. Restricción de clonas candidatas de pProEX-1 con las enzimas *EcoRI* y *BamHI*

El DNA plasmídico de las mutantes S1Δ1, S1Δ6, S1Δ1-2 y S1Δ1-3 en pProEx-1 que se obtuvo previamente, se restringió utilizando las enzimas *EcoRI* y *BamHI*. Se incubaron las muestras durante 2 horas a 37°C de acuerdo a la tabla siguiente:

Tabla 9. Condiciones de restricción de pProEx-1-variantes de S1.

Reactivo	Cantidad
DNA	10 μ l
<i>Eco</i> RI	1 μ l
<i>Bam</i> HI	1 μ l
Buffer 4	2 μ l
H ₂ O Milli-Q®	6 μ l
Total volume	20 μ l

Finalmente, las clonas candidatas para cada variante de S1 se secuenciaron de acuerdo al protocolo descrito en la sección VII, incisos C y D.

IX. Expresión de las variantes de la proteína S1

A. Inducción de clonas con IPTG

Se inocularon alícuotas de 5 ml de LB^{Amp100} con una colonia candidata transformada con alguna de las construcciones (pProEx-1/S1 Δ 1, pProEx-1/S1 Δ 6, pProEx-1/S1 Δ 1-2 y pProEx-1/S1 Δ 1-3). Se crecieron a una densidad óptica de 0.6 y se indujeron durante 1 hora con IPTG de manera que cada cultivo inducido tuviera IPTG a una concentración de 1mM/ml (3 mM/ml en el caso de la mutante S1 Δ 6). Se tomó 1 ml de cada cultivo y se empastilló a 9000 x g durante 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se procesó para identificar la proteína.

B. Análisis de la expresión de las variantes de S1

Cada pastilla celular del paso anterior se resuspendió en 50 μ l de buffer de carga (adicionado con β -mercaptoetanol), se calentaron 5 minutos a 94°C y se enfriaron en hielo durante 3 minutos. Posteriormente, se centrifugaron a 10,000 x g por 10 minutos a 4°C. Se cargaron ~40 μ l de sobrenadante en el gel de electroforesis de poliacrilamida desnaturalizante al 12.5%.

Una vez cargadas las muestras, se corrió el gel a 70 volts hasta que el colorante llegó al final del gel. Inmediatamente después el gel se equilibró con buffer de transferencia y se transfirió, en húmedo, a una membrana de PVDF durante toda la noche a 4°C y 15 volts. Al día siguiente, se verificó que hubiera transferencia tiñendo la membrana con rojo de Ponceau y destiñéndola con agua destilada. Para la detección de la proteína con anticuerpos, se colocó la membrana con solución bloqueadora [Leche al 15% preparada en una solución de PBS 1X-Tween® [20 ml de PBS 10X, 200 µl de Tween® (SIGMA for Molecular Biology), aforado a 200 ml], y se bloqueó durante 2 horas con movimiento constante. Se descartó la solución bloqueadora y se efectuaron 3 lavados de 5 minutos a la membrana con buffer PBS 1X-Tween®. Se diluyó el anticuerpo primario (dilución 1:8000) contra S1, en una solución bloqueadora nueva y se dejó incubando a temperatura ambiente con movimiento constante durante 2 horas. Se efectuaron 3 lavados de 5 minutos a la membrana con buffer PBS 1X-Tween®. Se agregó el anticuerpo secundario (IgG Rata, 1:6000) diluido en solución bloqueadora y se dejó actuar durante 2 horas con movimiento constante. Se lavó 3 veces con buffer PBS1X-Tween®.

Para la detección de la proteína se utilizó el Kit "ECL Western Blotting Detection Reagents GE" (Healthcare).

X. Purificación de las proteínas recombinantes de S1

Se realizó un overnight, para cada mutante, de *E. coli* DH5α de 60 ml de LB^{Amp100} (100µg/ml) que sirvió como pie de cultivo. Después se inocularon 2L de LB^{Amp100}, para cada una de las mutantes, y se incubó a 37°C con agitación constante hasta que alcanzó una densidad óptica de 0.6-0.7. Para inducir la expresión de la proteína ribosomal S1 y sus variantes, se agregó IPTG a una concentración final de 1 mM y se incubó a 37°C durante 4 horas en agitación constante (3 mM de IPTG durante 1 hora y 30 minutos, en el caso de la mutante S1Δ6). El cultivo se enfrió mediante agitación en agua-hielo y después se cosecharon las células mediante centrifugación a 4°C

durante 20 minutos a 6000 rpm. El sobrenadante se descartó y la pastilla celular se resuspendió mediante pipeteo con 40 ml de una solución fría de PBS 1X. Se centrifugó a 6000 rpm durante 20 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante y la pastilla se almacenó a -70°C hasta su uso.

Las células se lisaron resuspendiendo la pastilla mediante pipeteo en 10 ml de buffer NPI-10 (ver tabla 14), suplementado con DNasa (2 u/μl) y RNasa (2 mg/ml), y agregando 1 mg de lisozima por cada mililitro de buffer. La mezcla se incubó durante 30 minutos en hielo, se añadió 10 ml de buffer NPI-10 y se homogeneizó mediante vortexeo. Finalmente, se centrifugó a 15,00 x g durante 30 minutos a 4°C y se colectó el sobrenadante.

La purificación de las proteínas se realizó en condiciones nativas según indicaciones del Kit QUIAGEN (NI-NTA Agarose purification of 6xHis-tagged Proteins from *E. coli*. under Native Conditions). El proceso de elución de la proteína se realizó a 4°C. Las fracciones proteicas eluidas de la columna Ni-NTA agarosa se analizaron en gel al 0.1% de SDS-PAGE para observar la banda correspondiente al tamaño de la proteína ribosomal S1 y sus variantes, así como seleccionar las fracciones a dializar de forma conjunta. La diálisis se llevó a cabo en buffer NaH₂PO₄ 500 mM, 300mM de NaCl y 5% de glicerol, a 4°C y con agitación constante. Se verificó la presencia de las proteínas mediante Western-blot y se reveló con un anticuerpo anti-S1.

XI. Cuantificación de las proteínas

Para cuantificar la concentración de la proteína ribosomal S1 y sus variantes se utilizó el método de Bradford.

XII. Marcaje de oligonucleótidos sintéticos con ³²P

El marcaje de los oligonucleótidos (ver tabla 15) se realizó usando el Kit T4 polynucleotideKinase (Life Technologies™GIBCOBRL), con algunas modificaciones.

Se agregaron los componentes, en el siguiente orden, a un tubo eppendorf de 1.5 ml:

Fragmentos de RNA desfosforilados 1 μ l
Buffer de reacción T4 PNK 10X 2 μ l
T4 polinucleótido cinasa (10 unidades) ..1 μ l
[γ -³²P]ATP 10 μ Ci/ μ l, 3000 Ci/mmol) 1.5 μ l
H₂O destilada estéril Hasta 20 μ l

Los tubos se agitaron y se centrifugaron brevemente. Enseguida se incubaron durante 30 minutos a 37°C e inmediatamente se detuvo la reacción mediante el calentamiento de los tubos a 65°C. Enseguida se precipitaron los mensajeros sintéticos marcados. Para esto, a la mezcla se agregaron 1 μ l de glicógeno, 80 μ l de H₂O destilada estéril, 10 μ l de acetato de sodio 3M pH 5.0 y 300 μ l de etanol absoluto. Los oligonucleótidos se dejaron precipitando durante toda la noche a -20°C. Al día siguiente se centrifugaron a 14,000 rpm durante 15 minutos a 4°C y se desechó el sobrenadante. El precipitado se lavó con 200 μ l de etanol al 70% y se centrifugó a 9000 x g durante 15 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante y se secaron las pastillas a 37°C durante 30 min. Se resuspendieron mediante pipeteo en 11 μ l de H₂O destilada estéril y finalmente se homogenizaron suavemente. Para el ensayo de retardamiento se resuspendieron cada uno de los mensajeros sintéticos en 300 μ l de buffer de unión, que contiene 10mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NH₄Cl, 1 mM DTT, 100 μ g/ml tRNA, 100 μ g/ml BSA, glicerol al 5% y agua desionizada, adicionado con 1 mM de MgCl₂. A cada reacción se adicionaron 2 μ l de mensajero para que tener una concentración final de 150 fmoles.

XIII. Ensayos de retardamiento

La proteína S1 y sus variantes fueron pre-incubadas en tubos Eppendorf de 1.5 ml a 37°C durante 30 minutos en buffer de unión. La formación del complejo se llevó a cabo a 37°C durante 15 minutos con los RNAs marcados y concentraciones crecientes de la proteína S1 o sus variantes. Posteriormente, se adicionaron 5 μ l de colorantes en glicerol. Las muestras se corrieron en geles de acrilamida al 6% (pre-corridos durante 1 hora, a 4°C y 10

mA, en buffer TBE 1X) bajo condiciones no desnaturizantes, durante 1 hora y 20 minutos a 20 mA en buffer TBE 1X a T.A.

Finalmente, los geles se fijaron en una solución de metanol al 10% y ácido acético al 10% en agitación constante durante 5 minutos y se secaron (“Gel Dryer”, modelo 583, Bio-Rad) durante 1 hora a 80°C.

Los geles se escanearon con “Storage Phosphor Screen, Amersham Biosciences” y con Typhon PhosphorImager (Storm 800). Se cuantificaron cada una las manchas de los geles utilizando el software QuantityOne, los valores obtenidos se graficaron en Excel 2013 y se calculó la constante de disociación para cada complejo.

Tabla 10. Cepa utilizada.

CEPAS	CARACTERÍSTICAS	FUENTE
<i>DH5α</i>	<i>fhuA2 Δ(argF-lacZ) U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	Colección del laboratorio

Tabla 11. Plásmidos usados.

PLÁSMIDOS	CARACTERÍSTICAS	FUENTE
pJET1.2	Linearizado con <i>EcoR</i> V, los extremos blunt contiene grupos 5´-forforilados. El plásmido tiene las señales rep (pMB1), inicio de replicación, bla(Ap ^R), <i>eco47IR</i> , P _{lacUVS} , promotor T7, sitio de clonación múltiple (MCS), sitio de inserción, sitios de unión a primers forward y reverse para secuenciación.	Fermentas

pProEX-1	Incorpora una secuencia de 6 histidinas a la proteína expresada, posee un sitio de corte para la proteasa TEV, contiene un promotor Trc y el operador <i>lacI^q</i> , tiene una región intergénica f1 de M13 que permite la producción de ssDNA, y un gen que codifica para β- lactamasa que confiere resistencia a ampicilina.	Deborah Polayes A. John Hughes Jr. Molecular Biology Research and Development Life Technologies, Inc. Gaithersburg, MD 20884.
-----------------	---	--

Tabla 12. Características de los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR.

PRIMER	SECUENCIA 5'-3'	Tm	%GC	nt	CARACTERÍSTICA
FORWARD PARA S1Δ1	GCGGAATTCCCCGTG AGAAAGCTAAACG	57.8	53.6	28	S1Δ1 (1-85 aa), con sitios de restricción para EcoRI
FORWARD PARA S1Δ1-2	GCGGAATTCCCGGCA TGGAAGTTAAAGG	57.8	53.6	28	S1Δ1-2 (1-191aa), con sitios de restricción para EcoRI
FORWARD PARA S1Δ1-3	GCGGAATTCCCAAACA GCTGGGCGAAGATC	60.6	56.7	30	S1Δ1-3 (1-259aa), con sitios de restricción para EcoRI
REVERSE PARA S1Δ1, S1Δ1-2, S1Δ1-3	GCGGATCCTTACTCGC CTTTAGCTGCTTT	57.8	51.7	29	Sitio de restricción para BamHI
FORWARD PARA S1Δ6	GCGGAATTCCCATGACT GAATCTTTTGCTCAAC	58. 1	45.5	33	S1Δ6 (433-557aa), con sitios de restricción para EcoRI
REVERSE PARA S1Δ6	GGATCCCCAGGGAGA TACGTTCACGTTT	59.2	57.1	28	Sitio de restricción para BamHI

Tabla 13. Características de los oligonucleótidos de pJET1.2.

PRIMER	SECUENCIA 5'-3'	nt	CARACTERÍSTICA
FORWARD	CGACTCACTATAGGGAGAGC GGC	23	Primer sentido de secuenciación para pJET1.2
REVERSE	AAGAACATCGATTTTCCATGG CAG	24	Primer anti-sentido de secuenciación para pJET1.2

Tabla 14. Buffers utilizados en la purificación de las proteínas recombinantes de S1 por cromatografía de afinidad.

BUFFER	COMPONENTES	CANTIDAD PARA 500 ml:
NPI-10	50 mM NaH ₂ PO ₄	3.45 g
	300 mM NaCl	8.77 g
	10 mM Imidazol	0.34 g
	5 mM PMSF	10 ml (De stock 250 mM PMSF)
	5% Glicerol	25 ml de Glicerol al 100%
	1 mM DTT	500 µl (De stock 1 M DTT)
	0.5% Tritón	2.5 ml
NPI-20	50 mM NaH ₂ PO ₄	3.45 g
	300 mM NaCl	8.77 g
	20 mM Imidazol	0.68 g
	5 mM PMSF	10 ml (De stock 250 mM PMSF)
	5% Glicerol	25 ml de Glicerol al 100%
	1 mM DTT	500 µl (De stock 1 M DTT)
	0.5% Tritón	2.5 ml
NPI-40	50 mM NaH ₂ PO ₄	3.45 g

	300 mM NaCl	8.77 g
	40 mM Imidazol	1.36 g
	5 mM PMSF	10 ml (De stock 250 mM PMSF)
	5% Glicerol	25 ml de Glicerol al 100%
	1 mM DTT	500 μ l (De stock 1 M DTT)
	0.5% Tritón	2.5 ml
NPI-250	50 mM NaH ₂ PO ₄	3.45 g
	300 mM NaCl	8.77 g
	250 mM Imidazol	8.51 g
	5 mM PMSF	10 ml (De stock 250 mM PMSF)
	5% Glicerol	25 ml de Glicerol al 100%
	1 mM DTT	500 μ l (De stock 1 M DTT)
	0.5% Tritón	2.5 ml

Tabla 15. Secuencia de los RNAs mensajeros utilizados en los ensayos de retardamiento. En negritas se señalan la secuencia Shine-Dalgarno, el codón de inicio y los codones 2-3.

Nombre de los mRNAs sintéticos.	Secuencia de los mRNAs sintéticos utilizados en los ensayos de unión mRNA-30S.
mRNA 2-3 AAA $\Delta G = 1$ kcal/mol	5'- GGA AGC AAGGAG GUA ACA AAA AUGAAA AAA CGA CAG -3'
mRNA 2-3 GGG $\Delta G = -1.9$ kcal/mol	5'- GGA AGC AAG GAG GUA ACA AAA AUGGGG CGG CGA CAG -3'
mRNA 2-3 TTT $\Delta G = -3.4$ kcal/mol	5'- GGA AGC AAGGAG GUA ACA AAA AUGTTT TTT CGA CAG -3'

Resultados

I. Obtención de las deleciones de la proteína ribosomal S1.

A partir de DNA cromosomal de células C600 se obtuvieron mutantes de la proteína ribosomal S1 con deleciones de los dominios 1,1-2, 1-3 y 6; utilizando los primers forward y reverse que en su región 5' contienen los sitios de restricción para las enzimas *EcoRI* y *BamHI* respectivamente, y en su región 3' contienen un extremo corto de la secuencia inicial o final de cada una de las variantes del gen *rpsA* (ver Materiales y métodos, Tabla 12). El producto de la PCR (figura 9) se limpió por columna con el "QIAquick® Gel Extraction Kit (250)", se clonó en el vector de tránsito pJET1.2/blunt (Fermentas) y la construcción resultante sirvió para transformar células *E.coli* DH5 α . Se seleccionaron candidatas mediante la extracción del plásmido y por PCR se analizaron los productos en un gel de agarosa al 0.9%. Se observaron bandas que corresponden al tamaño de las mutantes S1 Δ 6, S1 Δ 1-2 y S1 Δ 1-3-pJET1.2/blunt, sin embargo no fue posible clonar la mutante de S1 sin el dominio 1 en el vector de tránsito (figura 10). Se confirmó la identidad los productos de PCR clonados mediante secuenciación (imágenes no mostradas).

Posteriormente, las variantes de S1 se subclonaron en el vector pProEX-1 bajo un tag de histidinas conservando el marco de lectura, lo cual facilitó la purificación de las proteínas mediante columnas de afinidad de Níquel. Para la subclonación se realizaron dobles restricciones de las construcciones pJET1.2- S1 Δ 6, S1 Δ 1-2 y S1 Δ 1-3 y del vector pProEX-1 (figura 11), con las enzimas *EcoRI* y *BamHI* (ver Materiales y métodos). Cada uno de los fragmentos de las mutantes restringidas y purificados (del vector de tránsito) y el producto de PCR correspondiente a la mutante S1 Δ 1 (figura 9) se ligaron al vector pProEX-1 con la enzima T4 DNA ligasa (New England Biolabs).

Los productos de ligación (pPROEX- 1/ S1 Δ 1, S1 Δ 6, S1 Δ 1-2 y S1 Δ 1-3) se transformaron en bacterias DH5 α competentes. Se seleccionaron candidatas transformantes, los plásmidos pProEX-variantes de S1 se extrajeron y se realizaron dobles restricciones con las enzimas *EcoRI* y *BamHI* y los productos de restricción se analizaron en un gel de agarosa al 0.9% (figura 12). Se observó una banda de mayor tamaño que corresponde al vector pProEX-1 y bandas de aproximadamente 1419 pb, 1299 pb, 1101 pb y 897 pb que corresponden a las mutantes S1 Δ 1, S1 Δ 6, S1 Δ 1-2 y S1 Δ 1-3, respectivamente. Las secuencias de las variantes de S1 subclonadas se verificaron con “*BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle sequencing Kit*” (310 Genetic Analyzer Applied Biosystems) y la secuencias resultantes se alinearon con la secuencia de *rpsA* de la cepa *E. coli K12* de la base de datos NCBI con el software “*Multiple sequence alignment with hierarchical clustering*” (sólo se muestra el alineamiento para la mutante S1 Δ 1, en la figura 13).

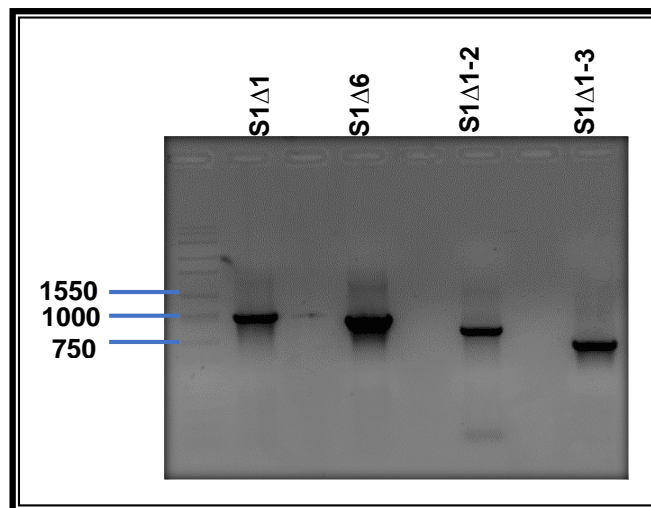


Fig. 9. Obtención de las variantes de S1 mediante PCR. Las deleciones de los dominios del gen *rpsA* se generaron por PCR usando los primers indicados en la tabla 12, a partir de DNA cromosomal de células de *E. coli* cepa C600. Los productos de PCR se analizaron en gel de agarosa al 0.9%.

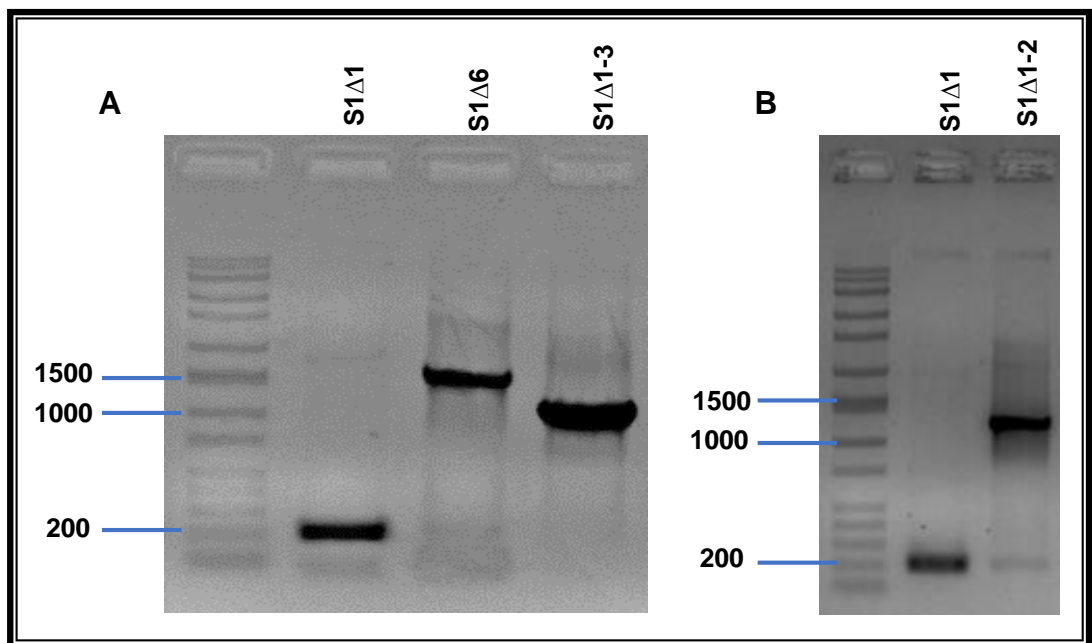


Fig. 10. Clonación de las mutantes de S1 en el plásmido pJET1.2/blunt. A. Amplificación de las mutantes S1 Δ 1, S1 Δ 6 y S1 Δ 1-3. **B.** Amplificación de las mutantes S1 Δ 1 y S1 Δ 1-2. En **A** y **B**, los productos de PCR obtenidos como se describe en la **figura 9** fueron clonados en el plásmido pJET1.2/blunt. La clonación de los fragmentos se verificó por PCR y se analizaron en un gel de agarosa al 0.9%.

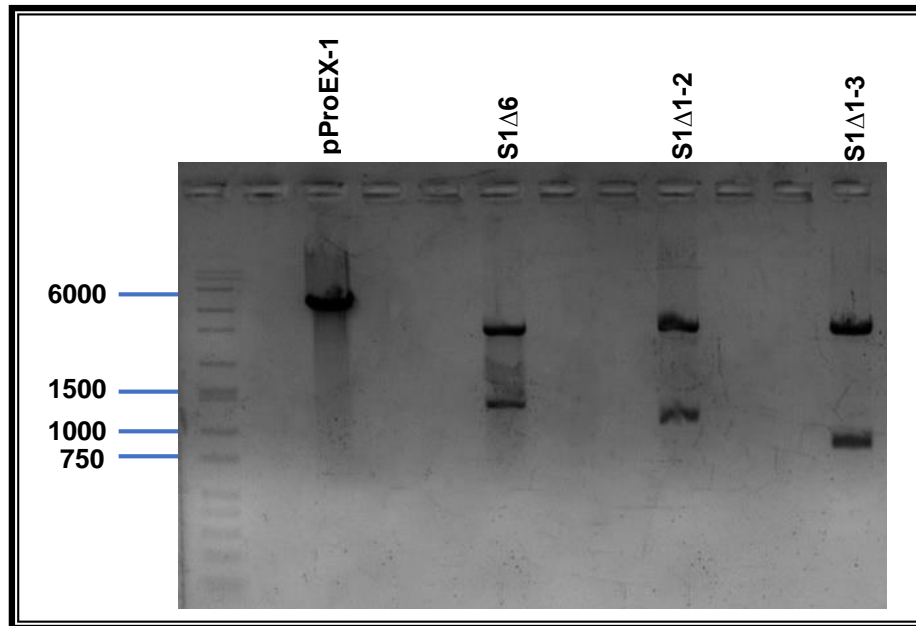


Fig. 11. Restricción del vector pProEX-1 y de las variantes de S1-pJET1.2/blunt con las enzimas *EcoRI* y *BamHI*. Las construcciones derivadas de pJET conteniendo las mutantes de S1, fueron restringidas con *EcoRI* y *BamHI* para ser subclonadas en el vector pProEX-1. La banda de 4700 pb corresponde al vector pProEX-1 linearizado, mientras que las bandas de 1299 pb, 1101 pb y 897 pb corresponden a las mutantes S1 Δ 6, S1 Δ 1-2 y S1 Δ 1-3, respectivamente. Los productos de la restricción fueron analizados en un gel de agarosa al 0.9%.

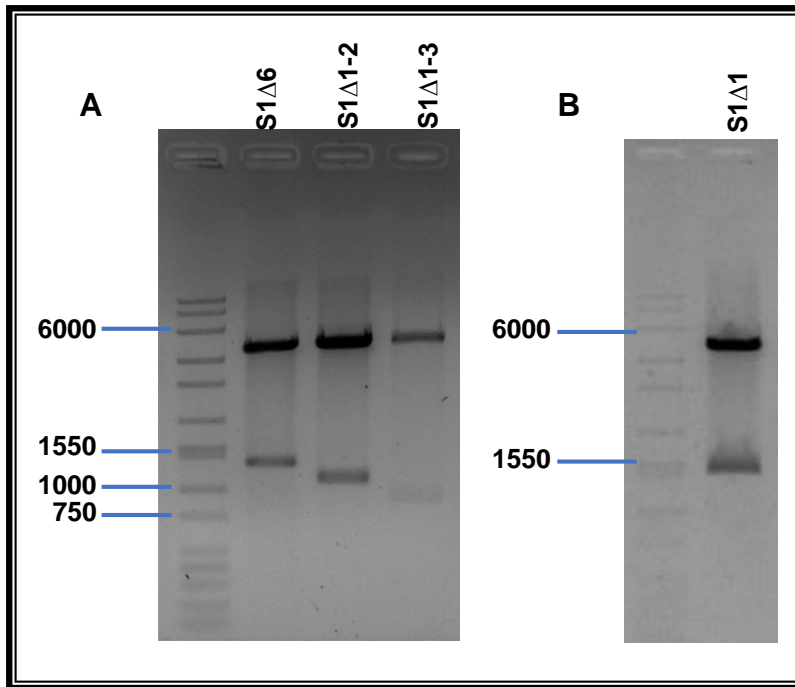


Fig. 12. Restricción de las variantes de S1-pProEX-1 con las enzimas *EcoRI* y *BamHI*. Las construcciones derivadas de pProEX-1 conteniendo las mutantes de S1, fueron restringidas con *EcoRI* y *BamHI*. **A.** Las bandas de 1299 pb, 1101 pb y 897 pb corresponden a las mutantes S1 Δ 6, S1 Δ 1-2 y S1 Δ 1-3, respectivamente. **B.** La banda de 1419 pb corresponde a la mutante S1 Δ 1. En **A** y **B**, los productos de restricción se analizaron en un gel de agarosa al 0.9%.

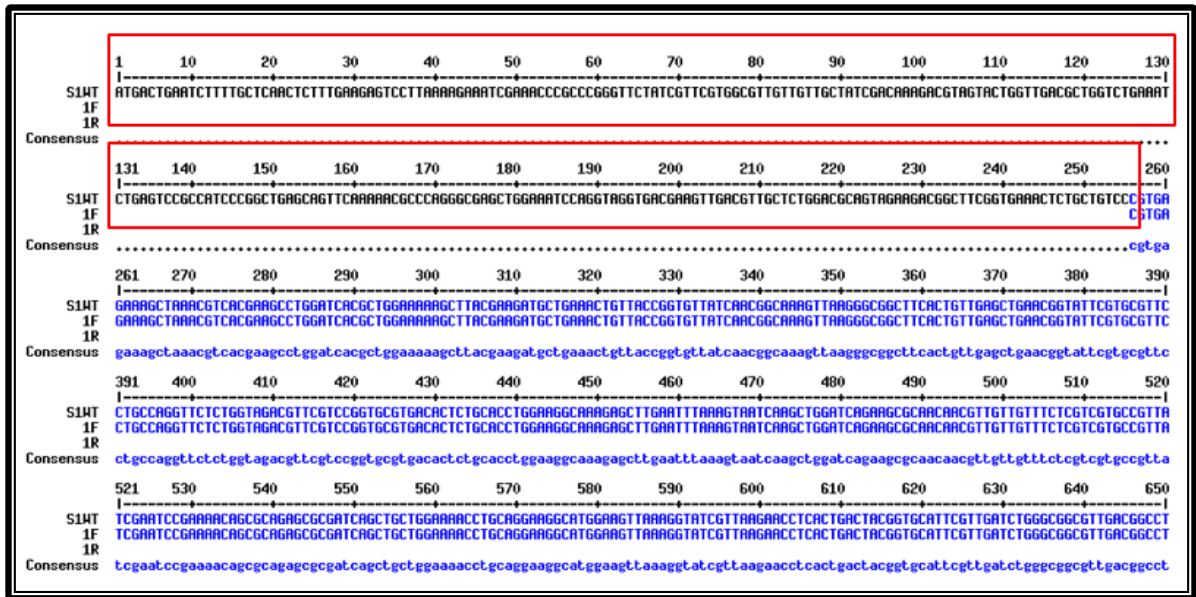


Fig. 13. Alineamiento de la secuencia de la construcción S1Δ1-pProEX-1. Se alineó la secuencia de la construcción S1Δ1-pProEX-1 con la secuencia de la base de datos de NCBI del gen *rpsA* de la cepa *E. coli* K-12. Los recuadros rojos indican la delección correspondiente al dominio 1 del gen *rpsA*.

II. Purificación de las proteínas recombinantes de S1.

Las células *E. coli* DH5α transformadas con las construcciones pPROEX- 1/ S1Δ1, S1Δ6, S1Δ1-2 y S1Δ1-3 fueron crecidas hasta la fase logarítmica a 37°C en medio LB/ampicilina. La expresión de las variantes de la proteína S1 fue inducida con IPTG 1mM por 60 minutos y las células fueron lisadas como se describe en Materiales y métodos. Se monitoreó la expresión de las variantes de S1 mediante ensayos de inmunodetección empleando anticuerpos policlonales anti-S1. Al inducir cada variante de S1 con IPTG, se observó un incremento de la expresión de las mutantes de S1 sin el dominio 1-2, 1-3 y 1, sin embargo éste efecto no se presentó en la mutante sin el dominio 6 (figura 14).

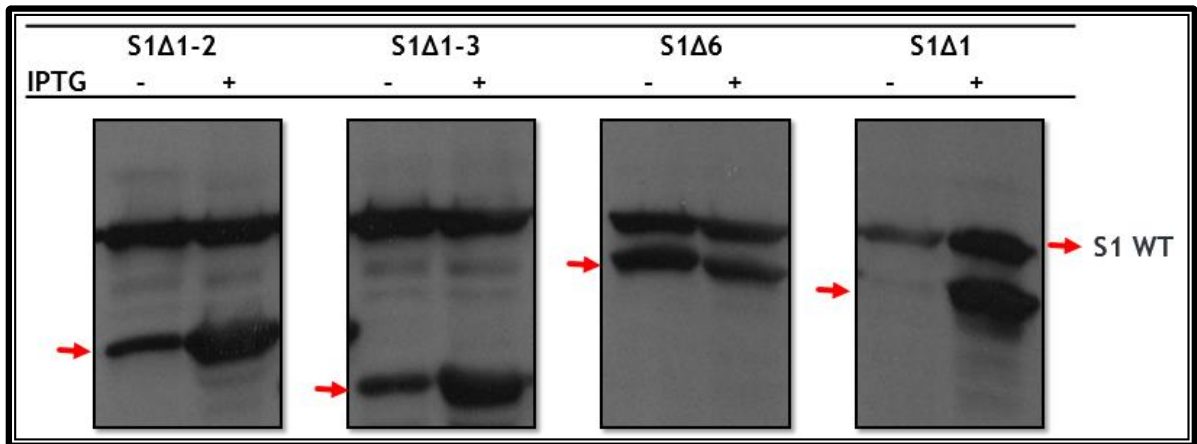


Fig. 14. Análisis de la expresión de las variantes de S1. Se obtuvo extracto total de proteínas de células DH5α transformadas con las construcciones derivadas de pProEx-1 conteniendo las mutantes de S1, bajo el promotor inducible por IPTG. Los extractos se analizaron mediante Western-Blot utilizando un anticuerpo policlonal anti-S1. Las flechas rojas indican las bandas correspondientes a cada variante de S1 y a la proteína S1 silvestre.

Con el objetivo de purificar las variantes de S1, las células transformadas con cada una de las construcciones de las mutantes de S1 fueron incubadas hasta una densidad óptica de 0.6 $\lambda_{600 \text{ nm}}$, a partir de ese momento se indujeron con 1 mM de IPTG durante 4 horas a 37 °C (3 mM de IPTG durante 1 hora y 30 minutos, en el caso de la mutante S1Δ6). Se obtuvieron los lisados aclarados, que contenían las proteínas mutantes, de acuerdo a lo descrito en la sección de Materiales y métodos, para purificarlos mediante cromatografía de afinidad usando columnas de Ni-Agarosa. Las fracciones obtenidas después de purificar cada mutante se analizaron mediante electroforesis (figura 15). Para comprobar la identidad de las proteínas purificadas, se realizó una inmunodetección de las mismas empleando anticuerpos policlonales anti-S1 (figura 16).

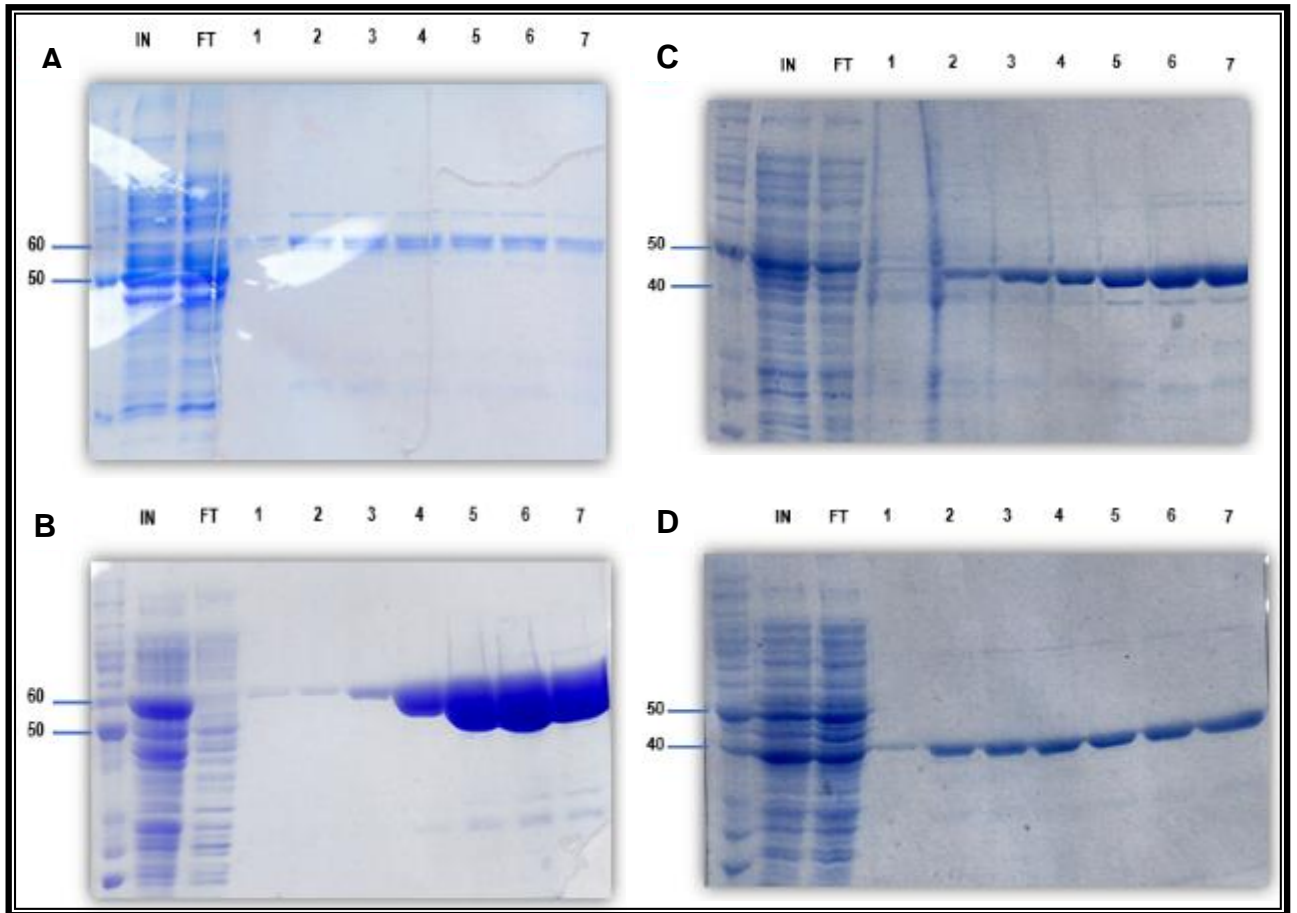


Fig. 15. Purificación de las proteínas mutantes de S1. Células DH5 α transformadas con las construcciones derivadas de pProEx-1 conteniendo las mutantes de S1, fueron inducidas con IPTG y procesadas para obtener el extracto celular. Las proteínas mutantes se purificaron por cromatografía de afinidad y las fracciones obtenidas se analizaron mediante SDS-PAGE. **A.** S1 Δ 6, **B.** S1 Δ 1-2, **C.** S1 Δ 1, **D.** S1 Δ 1-3.

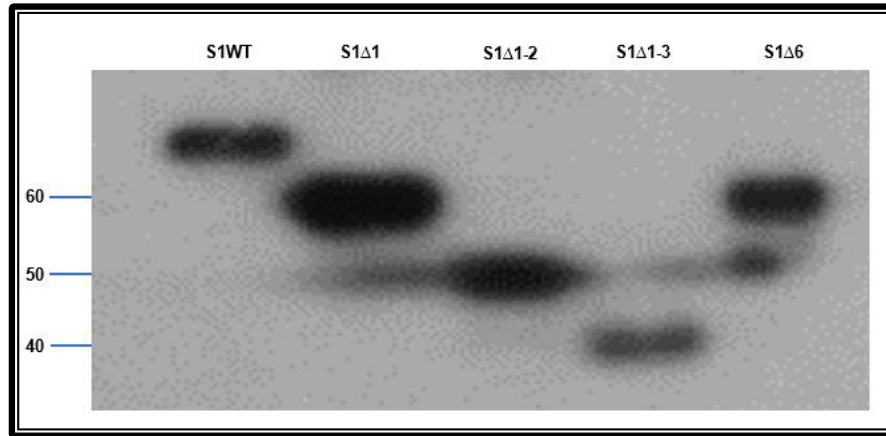


Fig. 16. Inmunodetección de las variantes de S1 purificadas. Las fracciones enriquecidas de las mutantes de S1 y S1 silvestre se analizaron por medio de Western Blot, utilizando un anticuerpo policlonal anti-S1. S1 Δ 1, S1 Δ 1-2, S1 Δ 1-3 y S1 Δ 6 representan a las mutantes con las deleciones de los dominios correspondientes.

III. Los dominios 1-3 de la proteína S1 son importantes en la interacción con mensajeros ricos en adeninas o uracilos.

Con la finalidad de determinar el papel de los dominios del extremo N-terminal 1, 2 y 3 de la proteína ribosomal S1 en la interacción con RNAs mensajeros ricos en adeninas, uracilos o guaninas, se analizó la afinidad relativa de los complejos mRNA-S1. Mediante ensayos de retardamiento (EMSA) empleando la proteína S1 silvestre y las mutantes descritas anteriormente (a excepción de la mutante sin el dominio seis); así como mRNAs sintéticos ricos en adeninas, guaninas o uracilos río abajo del codón de inicio (ver Materiales y métodos, tabla 15), marcados en sus extremos 5' con ^{32}P . Primeramente se demostró que la proteína S1 silvestre se une únicamente a los mRNAs ricos en adeninas o uracilos, no así con los ricos en guaninas. La eliminación del dominio 1 o de los dos primeros dominios del extremo N-terminal de la proteína S1 no causó una pérdida en la capacidad de interacción con los mRNAs ricos en adeninas, pero sí en la afinidad por el mensajero como se aprecia en las constantes de disociación. En el caso de los mensajeros ricos en uracilos la

mutante de S1 con la delección de los dominios 1-2, sí provocó una pérdida en la capacidad de interacción proteína-mRNA.

En contraste y como se esperaba, la delección de los dominios 1-3 de la proteína S1 provocó una pérdida total de la unión de los mRNAs ricos en adeninas o uracilos. El análisis de la constante de disociación (Kd) demostró que la afinidad de la proteína S1 y sus variantes es mayor con mRNAs ricos en adeninas seguido de uracilos (figuras 17 y 18, respectivamente) en comparación con los mensajeros ricos en guaninas con los cuáles no formó complejo (figura 19); cabe resaltar que en este caso las bandas que se aprecian pertenecen a dos isoformas de dicho mensajero.

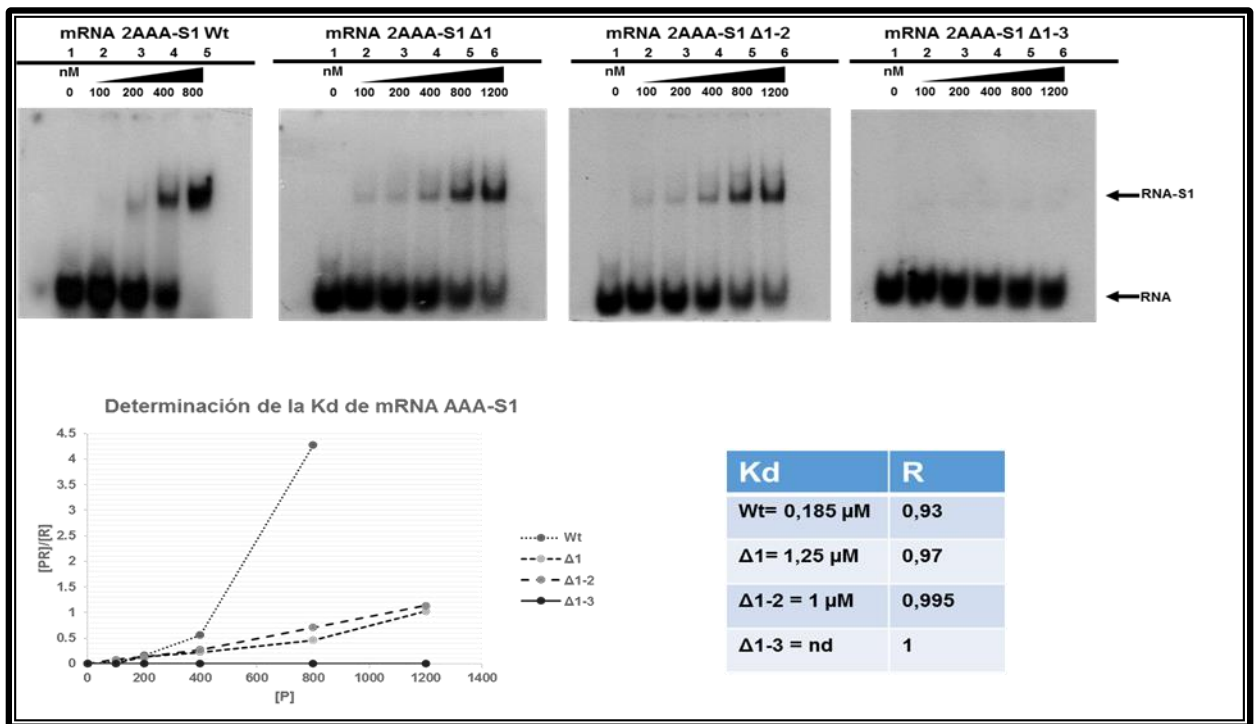


Fig. 17. Los dominios 1 a 3 de la proteína ribosomal S1 son necesarios para la interacción con RNAs mensajeros ricos en adeninas río abajo del codón de inicio. Se realizaron ensayos de retardamiento en gel de la formación de complejos de RNAs ricos en adeninas río abajo del codón de inicio, marcados con 32 P en el extremo 5', y la proteína S1 silvestre y mutantes. En todas las autoradiografías el carril 1, corresponde al control del mRNA incubado sin proteína; los carriles 2-6 indican la formación del complejo a distintas concentraciones de S1 silvestre y sus variantes como está indicado. El cálculo de la constante de disociación se hizo escaneando las imágenes y utilizando el software Quantity One y Excel 2013. Los valores obtenidos se graficaron y se calculó la Kd.

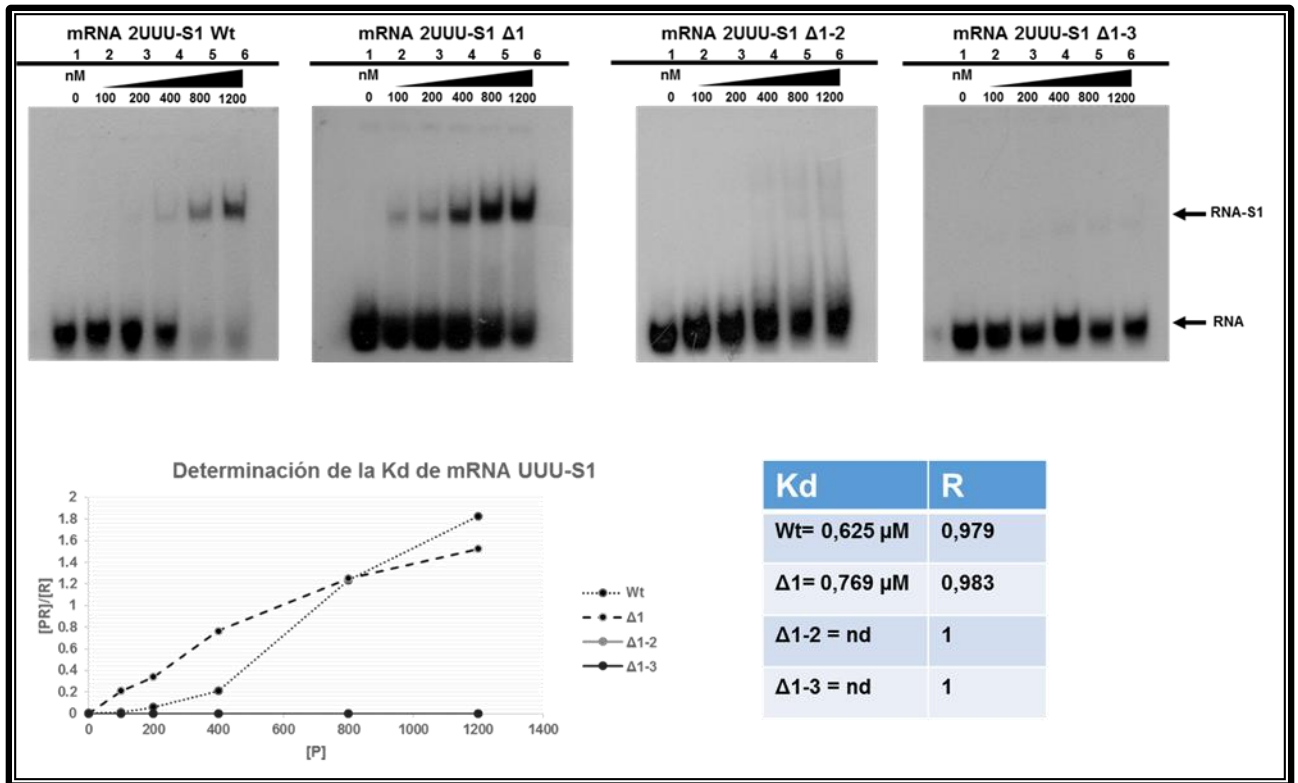


Fig. 18. Los dominios 1 a 3 de la proteína ribosomal S1 son necesarios para la interacción con RNAs mensajeros ricos en uracilos río abajo del codón de inicio. Se realizaron ensayos de retardamiento en gel de la formación de complejos de RNAs ricos en uracilos río abajo del codón de inicio, marcados con 32 P en el extremo 5', y la proteína S1 silvestre y mutantes. En todas las autorradiografías el carril 1, corresponde al control del mRNA incubado sin proteína; los carriles 2-6 indican la formación del complejo a distintas concentraciones de S1 silvestre y sus variantes como está indicado. El cálculo de la constante de disociación se hizo escaneando las imágenes y utilizando el software Quantity One y Excel 2013. Los valores obtenidos se graficaron y se calculó la Kd.

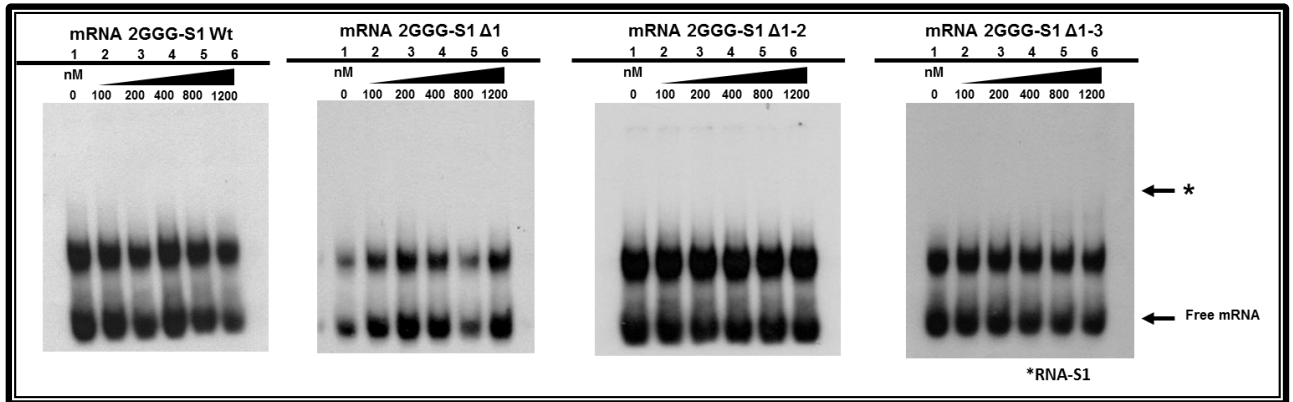


Fig. 19. La proteína S1 o sus variantes no se unen con RNAs mensajeros ricos en guaninas río abajo del codón de inicio. Se realizaron ensayos de retardamiento en gel de la formación de complejos de RNAs ricos en guaninas río abajo del codón de inicio, marcados con ^{32}P en el extremo 5', y la proteína S1 silvestre y mutantes. En todas las autorradiografías el carril 1, corresponde al control del mRNA incubado sin proteína; los carriles 2-6 indican que no existe formación del complejo a distintas concentraciones de S1 silvestre y sus variantes como está indicado.

Discusión

Los resultados presentados en este trabajo indican que los dominios 1-3 de la proteína ribosomal S1 son necesarios para la interacción con RNA mensajeros ricos en adeninas o uracilos. Esto se infiere de la falta de unión de éstos mensajeros con la mutante de la proteína S1 que carece de los tres primeros dominios del extremo N-terminal (S1 Δ 13). Asimismo, la afinidad de unión de la proteína S1 silvestre o mutantes fue superior con RNAs mensajeros ricos en adeninas, seguido por uracilos.

Algunos estudios indican que la región río abajo del codón de inicio de diversos genes incluye secuencias ricas en adeninas (Rudd y Schneider, 1994), además de que existe una tendencia en la que los codones AAA y AAU están presentes con mayor frecuencia en la segunda posición favoreciendo la traducción (Sato, et al., 2001). Dichas secuencias en *E. coli* contribuyen a la unión con el ribosoma y a la expresión del mensajero (Brock, et al., 2007). Se conoce que la proteína ribosomal S1 puede actuar como un factor traduccional favoreciendo la traducción de distintos mensajeros (Boni et al., 1991; Braun et al., 1998; Wagner et al., 1994. Coburn et al., 1999). Aunque el dominio 1 se conoce principalmente como el sitio de unión de la subunidad 30S, Duval y colaboradores han demostrado que éste primer dominio del extremo N-terminal es también crítico para la unión de RNA mensajeros estructurados. Además, se ha descrito que el dominio 3, en conjunto con el dominio 2 o con el dominio 4 de S1, confiere una alta afinidad a través de contactos cooperativos con RNAs (McGinness y Sauer, 2004). La flexibilidad de los dominios respecto el uno del otro podría conferir a S1 de una alta adaptabilidad de unión para una gran variedad de sustratos de RNA.

En nuestro grupo de trabajo se ha descrito que el incremento en la unión de mensajeros ricos en adeninas o uracilos en los codones 2 y 3 con la subunidad 30S, está mediada por la proteína ribosomal S1 (Cifuentes, et al., 2013). Lo anterior sugiere la participación de la proteína S1 en la formación del complejo ternario, sin embargo se desconoce qué dominios de la proteína S1 son los que participan en dicha formación cuando se tienen mensajeros ricos en adeninas o uracilos río abajo del codón de inicio.

En un intento por dilucidar los dominios de la proteína ribosomal S1 que participan en la mayor unión de los mensajeros ricos en adeninas o uracilos con la subunidad 30S, se obtuvo la proteína S1 silvestre y proteínas recombinantes de S1 que carecían de los dominios 1, 1-2 y 1-3, respectivamente, para formar complejos binarios con RNAs mensajeros sintéticos ricos en adeninas, uracilos o guaninas en los codones 2-3. De manera interesante, la unión de los mensajeros ricos en adeninas o uracilos con la proteína S1 se perdió cuando a ésta se le eliminaron los primeros tres dominios. Esta observación concuerda con lo reportado por Duval y colaboradores en 2013 donde mediante ensayos de retardamiento en gel determinaron que los tres primeros dominios del extremo N-terminal de la proteína S1 dotan a la subunidad 30S con una actividad de chaperona de RNA la cual es importante para el acoplamiento y desdoblamiento de mRNAs estructurados, así como para posicionar correctamente el codón de inicio dentro del canal de decodificación al cual provee una actividad de fusión de RNA. En otras palabras los primeros tres dominios de la proteína S1 son importantes para que pueda formarse el complejo ternario entre la subunidad 30S (de la cual forma parte la proteína S1), el RNA mensajero estructurado y el tRNA iniciador. Es claro que hay que demostrar si estos dominios también son esenciales para que la subunidad 30S interaccione con mensajeros que tengan diferente contenido de adeninas para lo cual es necesario realizar ensayos de formación de complejos ternarios.

Por otro lado, la afinidad de unión de la proteína S1 silvestre o mutantes aumenta con RNAs mensajeros ricos en adeninas, seguido por uracilos. Mientras que con RNAs mensajeros ricos en guaninas no hay formación de complejo. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en nuestro grupo de trabajo en los que el contenido de adeninas o uracilos en los codones 2-3 favorece la formación del complejo ternario, en contraste con la disminución observada cuando se tienen guaninas en dichos codones (Castillo-Méndez, *et al.*, 2012; Cifuentes, *et al.*, 2013).

Desde el principio de la era de la biotecnología moderna a principio de los 70s, *E. coli* ha sido utilizada ampliamente para la sobreexpresión de proteínas debido a su alta tasa de crecimiento, bajo costo y la disponibilidad de herramientas genéticas y moleculares. La optimización de la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* ha sido llevada a cabo por ensayo y error al modular diferentes parámetros tales como vectores de expresión, cepas hospederas, composición del medio y temperatura de crecimiento. Diversos estudios han demostrado que al remplazar dentro de un gen codones raros por codones sinónimos usados preferencialmente en la expresión del hospedero (optimización de codones) y la manipulación de la secuencia de nucleótidos de la región de inicio de la traducción pueden tener un importante efecto en la producción de proteína recombinante. En este trabajo se demuestra que el efecto promotor de adeninas y uracilos en la unión del mRNA a la proteína ribosomal S1 es por medio de sus tres primeros dominios del extremo N-terminal, y además que es la naturaleza del nucleótido la que fomenta la mayor afinidad de unión siempre y cuando los nucleótidos no estén enmascarados por estructuras secundarias fuertes.

Conclusión

- Los dominios 1-3 de la proteína S1 son importantes para la interacción con mensajeros ricos en adeninas o uracilos.
- La afinidad de unión de la proteína S1 silvestre o mutantes fue mayor con RNAs mensajeros ricos en adeninas, seguido por uracilos.
- Los mensajeros ricos en guaninas no forman complejos con la proteína S1 silvestre o mutantes.

Perspectivas

- Analizar cómo se afecta la formación del complejo ternario entre los RNAs mensajeros, tRNA iniciador y subunidades 30S con S1 silvestre o mutantes.
- Analizar la participación del dominio 3 de la proteína ribosomal S1 en la interacción de éstos mensajeros con la subunidad 30S.

Referencias

Ali, A., Wuyts, J., De Wachter, R., Meyer, A. y Van de Peer, Y. (1999). Construction of a variability map for eukaryotic large subunit ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*. 27: 2825-2831.

Boni, I.V., Artamonova, V.S. y Dreyfus, M. (2000). The last RNA-binding repeat of the *Escherichia coli* ribosomal protein S1 is specifically involved in autogenous control. *J. Bacteriol*. 182: 5872-5879.

Boni, I.V., Isaeva, D.M., Musychenko, M.L. y Tzareva, N.V. (1991). Ribosome messenger recognition: mRNA target sites for ribosomal protein S1. *Nucleic. Acids. Res.* 19: 155–162.

Bos, C., Lorenzen, D., Braun, V., Lorenzen, D., Braun, V. y Braun, V. (1998). Specific in vivo labeling of cell surface-exposed protein loops: Reactive cysteines in the predicted gating loop mark a ferrichrome binding site and a ligand-induced conformational change of the *Escherichia coli* FhuA protein. *J. Bacteriol*. 180: 605–613.

Brock, J.E., Paz, R.L., Cottle, P. y Janssen, G.R. (2007). Naturally Occurring Adenines within mRNA Coding Sequences Affect Ribosome Binding and Expression in *Escherichia coli*. 189:501-510.

Brosius, J., Dull, T.J., Sleeter, D.D. y Noller, H.F. (1981). Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol*. 148: 107-127.

Castillo-Mendez, M.A., Olivares-Trejo, J., Guarneros-Peña, G. y Hernández Sánchez, J. (2012). Adenine-containing codons close to the initiator either enhance or inhibit protein synthesis depending both on mRNA-ribosome binding strength and tRNA availability. *Biochimie*. 94: 662-672.

Chen, X.J. (2004). Sal1p, a calcium-dependent carrier protein that suppresses an essential cellular function associated with the Aac2 isoform of ADP/ATP translocase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 167: 607–617.

Cifuentes-Goches, J.C. (2013). Papel de las proteínas ribosomales S1 y S12 en la interacción de mRNAs ricos en adeninas o uracilos con la subunidad ribosomal 30S (Tesis de Maestría). Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México, D.F.

Coburn, G.A. y Mackie, G.A. (1999). Degradation of mRNA in *Escherichia coli*: an old problem with some new twists. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 62: 55-108.

Condon, C. (2003). RNA processing and degradation in *Bacillus subtilis*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 157-174.

Condon, C., Squires, C. y Squires, C. L. (1995). Control of rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 4: 623-645.

Diwa, A., Jiang, X., Schapira, M. y Belasco, J.G. (2002). Two distinct regions on the surface of an RNA-binding domain are crucial for RNase E function. *Mol. Microbiol.* 46: 959-969.

Draper, D.E., van Hippiel, P.H. (1978). Nucleic acid binding properties of *Escherichia coli* ribosomal protein S1. I. Structure and interactions of binding site I. *J. Mol. Biol.* 122: 321–338.

Dreyfus, M. (1988). What constitutes the signal for the initiation of protein synthesis on *Escherichia coli* mRNAs? *J. Mol. Biol.* 204: 79–94.

Duval, M., Korepanov, A., Fuchsbauer, O., Fechter, P., Haller, A., Fabbretti, A., Choulier, L., Micura, R., Klaholz, B.P., Romby, P., Springer, M. y Marzi, S. (2013). *Escherichia coli* Ribosomal Protein S1 Unfolds Structured mRNAs Onto the Ribosome for Active Translation Initiation. *PLoS Biol.* 11:e1001731.

Giorginis, S. y Subramanian, A.R. (1980). The major ribosome binding site of *Escherichia coli* ribosomal protein S1 is located in its N-terminal segment. *J. Mol. Biol.* 141: 393–408.

Gualerzi, C., Caserta, E., La Teana, A., Spurio, R., Tomsie, J., y Pon, C. (2000). Translation initiation in bacteria. In *The ribosome: Structure, function, antibiotics, and cellular interactions* (eds. R.A. Garrett et al.), ASM Press, Washington, D.C. pp. 477–494.

Guerrier-Takada, C., Subramanian, A.R. y Cole, P.E. (1983). The activity of discrete fragments of ribosomal protein S1 in Q beta replicase function. *J. Biol. Chem.* 258: 13649–13652.

Harms, J., Schluenzen, F., Zarivach, R., Bashan, A., Gat, S., Agmon, I., Bartels, H., Franceschi, F. y Yonath, A. (2001). High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium. *Cell.* 107: 679–688.

Hartz, D., McPheeters, D.S., y Gold, L. (1989). Selection of the initiator tRNA by *Escherichia coli* initiation factors. *Genes Dev.* 3:1899-1912.

Jacinto-Loaeza, E., Vivanco-Domínguez, S., Guarneros, G. y Hernández-Sánchez, J. (2008). Minigene-like inhibition of protein synthesis mediated by hungry codons near the start codón. *Nucl. Acids. Res.* 36: 4233-4241.

Kaczanowska, M. y Rydén-Aulin, M. (2007). Ribosome biogenesis and the translation process in *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71: 477-494.

Kozak, M. (1983). Comparison of initiation of protein synthesis in procaryotes, eucaryotes, and organelles. *Microbiol. Rev.* 1: 1-45.

Laursen, B. S., Sorensen, H. P., Mortensen, K.K. y Sperling-Petersen, H.U. (2005) Initiation of protein synthesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69: 101-123.

Luque, J. y Herráez, A., (2001), *Texto Ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética: Conceptos, Técnicas y Aplicaciones en Ciencias de la Salud.* Elsevier, España.

Martin-Farmer, J. y Jassen, G.R. (1999). A downstream CA repeat sequence increases translation from leadered and unleadered mRNA in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology U.S.A.* 31:1025-1038.

Marzi, S., Myasnikov, A. G., Serganov, A., Ehresmann, C., Romby, P., Yusupov, M. y Klaholz, B.P. (2007). Structured mRNAs Regulate Translation Initiation by Binding to the Platform of the Ribosome. *Cell.* 130: 1019-1031.

McGinness, K.E. y Sauer, R.T. (2004). Ribosomal protein S1 binds mRNA and tmRNA similarly but plays distinct roles in translation of these molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 13454–13459.

Murzin, A.G. (1993). OB (oligonucleotide/oligosaccharide binding)-fold: common structural and functional solution for non-homologous sequences. *EMBO J.* 12: 861-867.

Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P.B. y Steitz, T.A. (2000). The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science.* 289: 920–930.

Noller, H.F. y Nomura, M., (1996), Ribosomes, in *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, Second Edition, (Neidhardt, F.C.,ed.), American Society for Microbiology, Washington, D.C., Vol. 1, pp. 167-186.

Ray, P. N. y Pearson, M. L. (1975). Functional inactivation of bacteriophage lambda morphogenetic gene in RNA. *Nature.* 5493: 647-650.

Ringquist, S., Shinedling, S., Barrick, D., Green, L., Binkley, J., Stormo, G.D. y Gold, L. (1992). Translation initiation in *Escherichia coli*: sequences within the ribosome-binding site. *Mol. Microbiol.* 9: 1219-1229.

Rudd, K. E. y Schneider, T. D., (1992), Compilation of *E. coli* ribosome binding sites. In A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria, (Miller, J. H., ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. pp. 17.19-17.45.

Saguy, M., Gillet, R., Skorski, P., Hermann-Le Denmat, S. y Felden, B. (2007). Ribosomal protein S1 influences trans-translation in vitro and in vivo. *Nucleic Acids Res.* 35: 2368-2376.

Sato, T., Terabe, M., Watanabe, H., Gojobori, T., Hori-Takemoto, C. y Miura, K. (2001). Codon and base biases after the initiation codon of the open reading frames in the *Escherichia coli* genome and their influence on the translation efficiency. *J. Biochem.* 129: 851-860.

Schuwirth, B.S., Borovinskaya, M.A., Hau, C.W., Zhang, W., Vila-Sanjurjo, A., Holton, J.M. y Cate, J.H. (2005). Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science.* 5749: 827-834.

Sengupta, J., Agrawal, R.K. y Frank, J. (2001). Visualization of protein S1 within the 30S ribosomal subunit and its interaction with messenger RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 98: 11991-11996.

Shine, J. y Dalgarno, L. (1974). The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 4:1342-1346.

Sorensen, M.A., Fricke, J. y Pedersen, S. (1998). Ribosomal protein S1 is required for translation of most, if not all, natural mRNAs in *Escherichia coli* in vivo. *J. Mol. Biol.* 280: 561–569.

Steitz, T.A. y Moore, P.B. (2003). The structural basis of large ribosomal subunit function. *Annu. Rev. Biochem.* 72: 813-850.

Subramanian, A. R. y van Duin, J. (1977). Exchange of individual ribosomal proteins between ribosomes as studied by heavy isotope-transfer experiments. *Mol. Gen. Genet.* 258: 1–9.

Sukhodolets, M.V., Garges, S. y Adhya, S. (2006). Ribosomal protein S1 promotes transcriptional cycling. *RNA.* 12: 1505-13.

Theobald, D.L., Mitton-Fry, R.M. y Wuttke, D.S. (2003). Nucleic acid recognition by OB-fold proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 32: 115–133.

Wagner, L.A., Gesteland, R.F., Dayhuff, T.J. y Weiss, R.B. (1994). An efficient Shine-Dalgarno sequence but not translation is necessary for lacZ mRNA stability in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 176: 1683-8.

Wimberly, B.T., Brodersen, D.E., Clemons Jr., W.M., Morgan-Warren, R.J., Carter, A.P., Vornrhein, C., Hartsch, T. y Ramakrishnan, V. (2000). Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature.* 407: 327–339.

Yusupov, M.M., Yusupova, G.Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T.N., Cate, J.H. y Noller, H.F. (2001). Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science.* 292: 883–896.

Zamora-Romo, E., Cruz-Vera, L. R., Vivanco-Domínguez, S., Magos-Castro, M. y Guarneros, G. (2007). Efficient expression of gene variants that harbour AGA codons next to the initiation codon. *Nucl. Acids. Res.* 35: 5966-5974.