



**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 S1 en la traducción de RNAs
mensajeros ricos en adeninas o uracilos**

TESIS

que presenta

M. en C. Juan Carlos Cifuentes Goches

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

en la Especialidad de

GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Director de tesis

Dr. Javier Hernández Sánchez

Ciudad de México

Marzo, 2019

Director de tesis

Dr. Javier Hernández Sánchez
Departamento de Genética y Biología Molecular
CINVESTAV

Asesores de tesis

Dr. Gabriel Guarneros Peña
Departamento de Genética y Biología Molecular
CINVESTAV

Dr. Luis Y. Kameyama Kawabe
Departamento de Genética y Biología Molecular
CINVESTAV

Dr. Jesús Valdés Flores
Departamento de Bioquímica
CINVESTAV

Dra. Xochitl Pérez Martínez
Instituto de Fisiología Celular
UNAM

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.

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a Dios por permitir terminar una etapa más de mi vida profesional.

A mi esposa Lizbeth, quien ha sido un pilar en mi vida personal y profesional. Este trabajo te lo dedico con todo el amor que te tengo.

A mi madre y mis hermanas Leyla, Lupe y Magaly, que han estado siempre apoyándome en cada logro obtenido.

Al Dr. Javier Hernández por permitir que formara parte de su equipo de trabajo y por todo el apoyo personal y profesional que me brindó durante mi estancia en Cinvestav.

A mis asesores de tesis: Dra. Xochitl Pérez, Dr. Gabriel Guarneros, Dr. Jesús Valdés y Dr. Luis Kameyama, por todo el apoyo y consejos dados para hacer de éste un mejor proyecto.

A mis amigos Manuel, Mine, Ángeles, Óscar, Nicté, Arnulfo, Marco, Jesús, Eduardo, Kryss y Vic por todo el apoyo y la amistad brindada.

A mis compañeros de laboratorio Salma, Nubia, Marisol, Lizdy, Carlos, Andrea, Sergio, David, por la convivencia y su amistad.

A, por su amistad y apoyo.

A los chicos del laboratorio 3 y 8, Rodolfo, Víctor Flores, Enith, Francisco, Sandra, Marco Carballo, Yuri, Iraís y Ricardo. A los auxiliares, José, Eva y Marco.

A Gaby, por el apoyo administrativo y siempre estar al pendiente de todos.

A Lupita por el apoyo en la unidad de secuenciación.

A Hebert y a Flor, por el apoyo técnico y estar al pendiente de cualquier necesidad del laboratorio.

ÍNDICE

Resumen.....	4
Abstract.....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1 Etapa de iniciación.....	6
1.1.1 Factores de inicio.....	6
1.1.2 mRNA.....	7
1.1.3 tRNA iniciador.....	8
1.1.4 Ribosoma.....	8
Subunidad 50S.....	9
Subunidad 30S.....	9
1.2 Etapa de elongación.....	10
1.3 Etapa de terminación y reciclamiento.....	10
1.4 Elementos de regulación traduccional.....	11
1.4.1 La proteína ribosomal S1 y la etapa de iniciación.....	12
1.4.2 Dominios tipo OB.....	14
1.4.3 Secuencias ricas en A/U.....	16
2. ANTECEDENTES.....	17
3. JUSTIFICACIÓN.....	19
4. HIPÓTESIS.....	20
5. OBJETIVOS.....	20
5.1 Objetivo general:.....	20
5.2 Objetivos específicos:.....	20
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
6.1 Cepas y condiciones de crecimiento.....	21
6.2 Plásmidos y construcciones.....	21
6.3 Clonación de los genes <i>rplD</i> y <i>rpsA</i>	23
6.4 Producción de anticuerpos.....	23
6.5 Clonación y purificación de las mutantes <i>rpsA</i>	24
6.6 Clonación y purificación de las mutantes <i>rpsAΔ2</i> y <i>rpsAΔ3</i>	25
6.7 Purificación de subunidades ribosomales 30S silvestres y deficientes en S1.....	26
6.8 Ensayos de unión.....	27
6.9 Ensayo de movilidad electroforética en gel (EMSA).....	28

6.10 Transcripción-Traducción in vitro deficiente en S1	28
6.11 Marcaje metabólico	29
6.12 Análisis estadístico	30
7. RESULTADOS	31
7.1 Análisis estructural de los mRNAs sintéticos	31
7.2 La proteína S1 promueve la formación de complejos ternarios con mRNAs ricos en A/U en las bases +4 a +9.....	34
7.3 Los dominios 2-3 de la proteína S1 son necesarios para la unión entre la subunidad 30S y mRNAs ricos en adeninas y uracilos.....	36
7.4 La proteína S1 presenta mayor afinidad por mRNAs con mayor contenido en adeninas que uracilos río abajo del codón de inicio	44
7.5 El dominio 3 es esencial para la interacción de la proteína S1 con mRNAs ricos en adeninas o uracilos	47
7.6 La naturaleza de los nucleótidos determina las afinidades de los mRNAs con la proteína S1	48
7.7 La deficiencia de la proteína S1 disminuye la síntesis de proteínas	49
7.8 Los dominios 2-3 son esenciales para la traducción de mRNAs ricos adeninas y uracilos	51
7.9 Los dominios 2-3 son esenciales para la viabilidad celular	55
8. DISCUSIÓN.....	57
9. CONCLUSIONES	62
10. REFERENCIAS.....	63
11. ANEXOS	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proteína ribosomal S1	13
Figura 2. Dominios S1	14
Figura 3. Estructura esquemática del dominio OB-fold.....	15
Figura 4. Análisis estructural de mRNAs sintéticos.....	33
Figura 5. Deficiencia de S1 y su efecto en la formación de complejos ternarios.....	35
Figura 6. Clonación de las mutantes de la proteína S1.....	38
Figura 7. Clonación y expresión de la mutante rpsAΔ2	39
Figura 8. Purificación de las variantes de la proteína S1	41
Figura 9. La proteína S1 promueve la unión de mRNAs ricos en adeninas y uracilos con la subunidad 30S	43
Figura 10. La proteína S1 tiene mayor afinidad por secuencias ricas en adeninas que por uracilos.....	46
Figura 11. El dominio 3 impide la interacción de la proteína S1 con mRNAs ricos en guaninas	48
Figura 12. S1 no tiene afinidad por mRNAs ricos en guaninas	49
Figura 13. Condiciones para preparar extractos S30 deficientes en S1.....	50
Figura 14. Estandarización del ensayo de transcripción-traducción in vitro	52
Figura 15. S1 estimula la traducción de A/U-ricos mRNAs	53
Figura 16. Los dominios 2 y 3 son importantes para la traducción de mRNAs ricos en adeninas y uracilos.....	54
Figura 17. Efecto de las mutantes de la proteína S1 en la viabilidad celular	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Cepas bacterianas y oligonucleótidos de lacZ.....	22
Tabla II. Oligonucleótidos usados para la obtención de las mutantes.....	26

Resumen

La proteína ribosomal S1 es una proteína multidominio, asociada a la subunidad 30S, que es esencial para el inicio de traducción. Además, tiene mayor afinidad por RNAs de cadena sencilla que poseen secuencias de A/U río arriba del codón de inicio. Previamente fue reportado que los dominios 1-3 de la proteína S1 participan en el anclaje y desnaturalización de RNA con estructuras secundarias fuertes. Así mismo, en ese mismo estudio sugieren que la proteína S1 aparentemente no es necesaria para la unión de la subunidad 30S con mRNAs poco estructurados. El alto contenido de adeninas y uracilos después del codón de inicio aumentan la unión al ribosoma y la traducción de estos mRNAs. Sin embargo, hasta el momento se desconoce si la proteína ribosomal S1 es necesaria para potenciar la unión de mRNAs ricos en A/U río debajo de codón de inicio con la subunidad 30S y su traducción. Se evaluó la función de la proteína S1 y sus dominios en la unión con mRNAs poco estructurados ricos en A/U río abajo del codón de inicio, en la traducción y en la viabilidad celular, para ello, se generaron mutantes de la proteína S1 sin los dominios 1, 2, 3, 1-2 y 1-3 y se analizó su efecto en la formación de complejos ternarios con subunidades 30S deficientes de S1 y tRNA iniciador. Se emplearon ensayos in vitro de transcripción-traducción deficientes de S1 y en su capacidad de restablecer el cultivo de células deficientes de S1. De acuerdo a los resultados obtenidos, se demostró que el dominio 3 es necesario para discriminar mRNAs de acuerdo a las bases después del codón de inicio, porque su ausencia anuló la unión con mRNAs ricos en A/U y en cambio favoreció la unión con mRNAs ricos en G. De manera interesante, se observó que los dominios 2-3 son importantes para la unión y traducción de mRNAs ricos en A/U, y además estos dominios son esenciales para la viabilidad celular.

Abstract

S1 is a multi-domain ribosomal protein associated with the 30S subunit. S1 protein is essential for translation initiation and binds with high affinity to single-stranded mRNA containing AU-rich patches upstream of the start codon. It was previously reported that domains 1-3 of S1 protein play a role in the docking and unfolding of structured mRNAs to the ribosome. In the same study, the S1 protein is not apparently necessary for the binding of the 30S subunit with unstructured mRNAs. However, the high content of adenines and uracils after the start codon increase ribosome binding and translation of these mRNAs, suggesting that S1 ribosomal protein is capable of binding to these A/U rich regions. To evaluate the role of S1 protein and its domains in different functions like the binding with poorly structured mRNAs containing A/U downstream of the start codon, protein synthesis and cell viability, mutants of S1 protein were generated without the domains 1, 2, 3, 1-2 and 1-3. We analyzed the effect of these mutants in the formation of ternary complexes with S1-deficient 30S subunits, in protein synthesis using in vitro S1-deficient transcription-translation assay and its ability to re-establish the culture of S1 deficient cells. According to the results, it was demonstrated that domain 3 is necessary to discriminate mRNAs according to the bases after the start codon because its absence abolished the binding with A/U-rich. Indeed, the absence of domain 3 stimulated the affinity of S1 protein for G-rich mRNAs. Interestingly, we observed that domains 2-3 are necessary for the binding and translation of mRNAs A/U-rich. Additionally, these domains are essential for cell viability.

1. INTRODUCCIÓN

La traducción es el proceso de biosíntesis de proteínas, el cual se lleva a cabo por un complejo macromolecular ribonucleoproteico cuyo componente principal es el ribosoma. Los ribosomas son complejos enzimáticos que se encargan de la síntesis de polipéptidos de acuerdo al código genético del RNA mensajero (mRNA). La traducción está dividida en cuatro etapas: iniciación, elongación, terminación y reciclamiento.

1.1 Etapa de iniciación

Los ribosomas inician la traducción en mRNAs durante la transcripción en procariontes. Por ello, la transcripción y la traducción son procesos celulares acoplados. La etapa de iniciación es crucial, ya que determina normalmente la velocidad global de la síntesis de proteínas y es la fase más regulada.

El rango de tiempo en la cual el ribosoma se ensambla en el mRNA es en el orden de segundos, aunque es específico para cada mRNA. Los ribosomas traducen al mRNA con una velocidad aproximada de 12 aminoácidos por segundo (Kennell & Riezman, 1977). El ribosoma, el tRNA aminoacilado y formilado (fMet-tRNA^{fMet}), mRNA, y los tres factores proteicos de iniciación (IF1, IF2 e IF3) están involucrados en la etapa de iniciación.

1.1.1 Factores de inicio

Los factores IF1, IF2, IF3 y el cofactor GTP son requeridos para la formación del complejo de inicio de la traducción en bacterias (Gualerzi & Pon, 1990). IF1 interacciona con los mismos nucleótidos que son protegidos por el tRNA localizados en el sitio A. Por lo que se piensa que IF1 bloquea la unión del tRNA en el sitio A durante la etapa de inicio (Moazed, Samaha, Gualerzi, & Noller, 1995).

IF2 es una GTPasa que estimula la unión del tRNA iniciador con el sitio P de la subunidad ribosomal 30S (Pon & Gualerzi, 1986). Además de que estabiliza la interacción de fMet-tRNA con el ribosoma en el complejo de inicio (RajBhandary & Chow, 1995; Sundari, Stringer, Schulman, & Maitra, 1976). IF3 posee dos dominios: uno carboxilo y otro amino, el dominio carboxilo coincide con la localización de la hélice 69 del rRNA 23S por lo que este factor se libera previo a la unión de la subunidad 50S dado que ésta región del rRNA 23S también interacciona con la subunidad ribosomal grande en la formación del complejo de inicio. El dominio N colinda con las proteínas S7 y S11 y puede interferir en el sitio E de unión a tRNA (Dallas & Noller, 2001). Además, IF3 también incrementa la eficiencia de selección del tRNA iniciador (Hartz, Mcpheeters, & Gold, 1989). Estos factores trabajan en conjunto con el ribosoma para formar el complejo de inicio de la traducción.

1.1.2 mRNA

El mRNA interactúa específicamente con el tRNA iniciador así como con la subunidad ribosomal 30S en la formación del complejo de preinicio. En el inicio de la traducción el ribosoma protege al mRNA en una región llamada sitio de unión al ribosoma (RBS), el cual abarca aproximadamente 30 nucleótidos (Steitz, 1969). Los mRNAs bacterianos son policistrónicos y poseen múltiples señales para el inicio y terminación de la traducción.

El sitio de unión al ribosoma (RBS) en los mRNAs no están caracterizadas solamente por la presencia de un codón de inicio putativo. Existen otros elementos necesarios para promover el inicio de la traducción de manera correcta y evitar inicios erróneos. La región río arriba del codón de inicio es la región 5' no traducible (5' UTR). Esta región contiene la secuencia Shine-Dalgarno (SD), la cual es complementaria a la región 3' del rRNA 16S de la subunidad ribosomal 30S (Shine & Dalgarno, 1974). Un efecto directo de la interacción de SD es la ubicación del codón de inicio en el sitio P ribosomal, donde el codón de inicio interactúa con fMet-tRNA^{Met}. La región RBS de los mRNAs de *E. coli* típicamente poseen la secuencia

SD GGAGG localizada 7-12 nucleótidos río arriba del codón de inicio, el cual puede ser AUG, GUG o UUG (McCarthy & Brimacombe, 1994). Los codones de inicio en *E. coli* tienen una frecuencia de 90, 8 y 1% para AUG, GUG y UUG, respectivamente (Schneider, Stormo, Gold, & Ehrenfeucht, 1986).

Los mRNAs de bacterias pueden ser canónicos o no canónicos (leaderless), aunque este último es raro, no más de 40 mRNAs leaderless han sido identificados en bacteria (Moll et al., 2001). Los mRNAs canónicos poseen elementos del 5' UTR mencionados anteriormente, mientras que los mRNAs leaderless poseen unos cuantos nucleótidos río arriba del codón de inicio. Aunque diversos reportes demuestran que los factores de inicio son importantes en la formación del complejo de inicio, se ha visto que no afectan la interacción Shine Dalgarno-anti Shine Dalgarno (SD-ASD) o la asociación de la subunidad ribosomal 30S y mRNAs canónicos.

1.1.3 tRNA iniciador

El primer aminoácido de una cadena polipéptica es siempre una metionina, la cual entra al ribosoma unida al tRNA^{Met} iniciador. El papel del tRNA iniciador es asegurarse del inicio correcto de la traducción en el RBS del mRNA. En bacterias, así como en cloroplastos y mitocondrias, la metionina unida al tRNA^{Met} iniciador está N-formilada, lo cual excluye de manera selectiva a la fMet-tRNA^{Met} a partir de la etapa de elongación (RajBhandary & Chow, 1995).

1.1.4 Ribosoma

Los ribosomas están conformados por una subunidad grande y una pequeña. Los ribosomas de bacteria poseen una velocidad de sedimentación relativa de 70S y una masa de 2.4 MDa. La subunidad grande tiene una velocidad de sedimentación relativa de 50S y una masa de 1.5 MDa, mientras que la subunidad pequeña tiene una velocidad de sedimentación de 30S y una masa de 0.8 MDa. Aproximadamente

dos tercios del ribosoma es RNA y un tercio son proteínas (Moore, 2002). Las estructuras primarias tanto del RNA ribosomal (rRNA) como de las proteínas ribosomales de *E. coli* fueron las primeras en ser estudiadas.

Subunidad 50S

La subunidad ribosomal grande o 50S está constituida de 34 proteínas (L1-L34) y dos RNAs denominados 5S y 23S, conteniendo aproximadamente 120 y 2,900 nucleótidos, respectivamente. Seis dominios de estructura secundaria son definidos para el rRNA 23S, mientras que el rRNA 5S es considerado el séptimo dominio de la subunidad. La formación del enlace peptídico es la principal actividad enzimática que es llevada a cabo por los ribosomas. El centro activo nombrado centro peptidiltransferasa (PTC, siglas en inglés) está localizado en la subunidad 50S (Rodnina & Wintermeyer, 2003). Posiblemente, las proteínas L2 y L3 están involucradas en la formación del enlace peptídico. La proteína L2 es la candidata más probable, debido a que subunidades 50S carentes de esta proteína son inactivas en la formación del enlace peptídico y no pueden asociarse para formar ribosomas 70S.

Subunidad 30S

La subunidad ribosomal pequeña o 30S está conformada por 21 proteínas y un RNA de aproximadamente 1500 nucleótidos sedimentando a 16S. Las proteínas ribosomales fueron numeradas de acuerdo a su ubicación en un gel de poliacrilamida de dos dimensiones (S1-S21) donde la proteína de mayor peso molecular tiene el número más grande como la S1 y la de menor peso el más chico como la S21.

La subunidad 30S puede ser dividida en tres regiones: (1) El dominio 5' del rRNA 16S que interacciona con las proteínas S4, S5, S12, S16, S17 y S20. (2) El dominio 3' del rRNA 16S con las proteínas S2, S3, S7, S9, S10, S13, S14 y S19. (3) El

dominio menor 3' del rRNA 16S interactúa directamente o indirectamente con las proteínas S6, S8, S11, S15, S18 y S21 (Moll et al., 2001).

1.2 Etapa de elongación

Esta etapa comienza después que la subunidad 50S se une al complejo de inicio, posteriormente el factor de elongación Tu (EF-Tu) se une al aminoacil-tRNA (aa-tRNA) y protege el enlace aminoéster de la hidrólisis en el complejo ternario aa-tRNA:EF-Tu:GTP (Rodnina, Pape, Fricke, Kuhn, & Wintermeyer, 1996). En la primera parte de la elongación los complejos ternarios tratarán de decodificar el codón del mRNA en el sitio aminoacil tRNA (sitio A) (Rodnina et al., 1996). Una correcta interacción condón-anticodón en el sitio A, provoca que EF-Tu estimule la capacidad de GTPasa en el ribosoma convirtiendo a GTP en GDP (Rodnina, Fricke, Kuhn, & Wintermeyer1, 1995), como consecuencia la conformación de EF-Tu es diferente cuando está unido a GTP a cuando está unido a GDP. En la segunda etapa se forma el enlace peptídico entre el grupo amino del aminoácido unido al tRNA del sitio A y el grupo carboxilo del aminoácido unido al tRNA del sitio P (Rodnina & Wintermeyer, 2003). Durante la tercera parte de la elongación, el factor de elongación G (EF-G) estimula la translocación de tRNAs en los sitios A y P junto con el mRNA para que el segundo codón quede expuesto en el sitio A. El peptidil-tRNA es dejado en el sitio P, mientras el tRNA deacilado es movido al sitio de salida (sitio E). EF-Tu es reciclado en su forma activa unido a aa-tRNA por el factor de elongación Ts (EF-Ts) (Stark, Rodnina, Rinke-appel, & Heel, 1997). Estos pasos se pueden repetir múltiples veces, hasta cientos de veces, según el número de aminoácidos que contenga el polipéptido.

1.3 Etapa de terminación y reciclamiento

La terminación ocurre cuando un codón de paro (UAA, UAG y UGA) entra al sitio A del ribosoma, donde UAG y UAA son reconocido por el factor de liberación RF1 y

UGA y UAA por RF2 (Klaholz et al., 2003). RF1 o RF2 hidrolizan la cadena polipeptídica para terminar la traducción, y estos factores son disociados del ribosoma por RF3 en la etapa de reciclamiento (VFreistroffer, YuPavlov, MacDougall, HBuckingham, & Måns Ehrenberg, 1997). Finalmente, el ribosoma se disocia en sus subunidades 30s y 50S por el factor de elongación EF-G, y el factor de reciclamiento ribosomal (RRF). Un mRNA, si es lo suficientemente largo, puede ser leído o traducido por varios ribosomas a la vez, lo que se denomina polirribosoma o polisoma.

1.4 Elementos de regulación traduccional

La eficiencia traduccional en *Escherichia coli* generalmente es determinada por la etapa de iniciación, en donde la subunidad 30S se une directamente al RBS del mRNA. La secuencia y estructura del mRNA determina su interacción con la maquinaria traduccional y la eficiencia y frecuencia de traducción. Los mRNAs que se traducen más contienen algunos o todos de los siguientes elementos en el RBS: 1) un codón de inicio específico para la interacción con fMet-tRNA_f^{Met} (Guthrie & Nomura, 1968); 2) una secuencia SD complementaria a una secuencia ASD del rRNA 16S (Shine & Dalgarno, 1974); 3) una secuencia de A/U para interactuar con la proteína ribosomal S1 (Boni, Lsaeva, Musychenko, & Tzareva, 1991); y 4) elementos potenciadores río arriba o río abajo (Brock, Paz, Cottle, & Janssen, 2007) del codón de inicio.

mRNAs que se asocian rápidamente y se disocian lentamente forman complejos de iniciación estables y son traducidos eficientemente. Pero, las estructuras secundarias impiden la accesibilidad del mRNA al canal de decodificación, porque secuestran elementos del mRNA como la secuencia Shine-Dalgarno y el codón de inicio afectando la interacción con la subunidad 30S (Nivinskas, Malys, Klaus, Vaiškunaite, & Gineikiene, 1999).

Las estructuras secundarias disminuyen la eficiencia traduccional a través de un mecanismo competitivo donde secuencias en cis del mRNA compiten con la

subunidad 30S para unirse al RBS y formar un complejo inactivo (De Smit & Duin, 1990; De Smit & Van Duin, 1994). Por otro lado, la traducción de mRNAs altamente estructurados ha sido descrito en dos pasos: el primer paso consiste en la unión del mRNA con la subunidad 30S, esta unión es independiente de la secuencia SD y factores de inicio. En el segundo paso es necesaria la participación de la secuencia Shine-Dalgarno, codón de inicio, factores de inicio y el tRNA^{fMet} (Studer & Joseph, 2006).

1.4.1 La proteína ribosomal S1 y la etapa de iniciación

S1 es una proteína ribosomal atípica, con alta afinidad por secuencias ricas en A/U. Es la proteína más grande y ácida del ribosoma, se une débilmente y no siempre está asociada a la subunidad 30S (**Figura 1A y B**), está constituida por 557 aminoácidos y tiene un peso molecular de 61 kDa. S1 es esencial en *E. coli* y una proteína S1 homóloga está presente en todas las bacterias Gram-negativas. Además, la proteína S1 tiene la capacidad de interactuar con el ribosoma y con el mRNA. El dominio N-terminal de la proteína S1 (residuos 1-193) es responsable de la unión de la proteína S1 con el ribosoma a través de la proteína S2 (Konstantin, et al., 2012).

La proteína S1 está constituida de seis dominios tipo OB (**Figura 1C**), los cuales tienen un tamaño aproximado de 70 aminoácidos (Bycroft, Hubbard, Proctor, Freund, & Murzin, 1997). Aunque estructuralmente son similares estos dominios presentan funciones distintas: los dos primeros dominios del extremo N-terminal (D1 y D2) están involucrados con la unión al ribosoma y la interacción con la replicasa Q β (McGinness & Sauer, 2004; Okada, Wower, Wower, Zwieb, & Kimura, 2004). Los dominios D3-D5 se unen a RNA de una sola cadena (Boni et al., 1991; OKADA et al., 2004), mientras que el dominio del extremo C-terminal (D6) está involucrado en la regulación autógena de la expresión del gen *rpsA* (Boni, Artamonova, Tzareva, & Dreyfus, 2001) (**Figura 1C**).

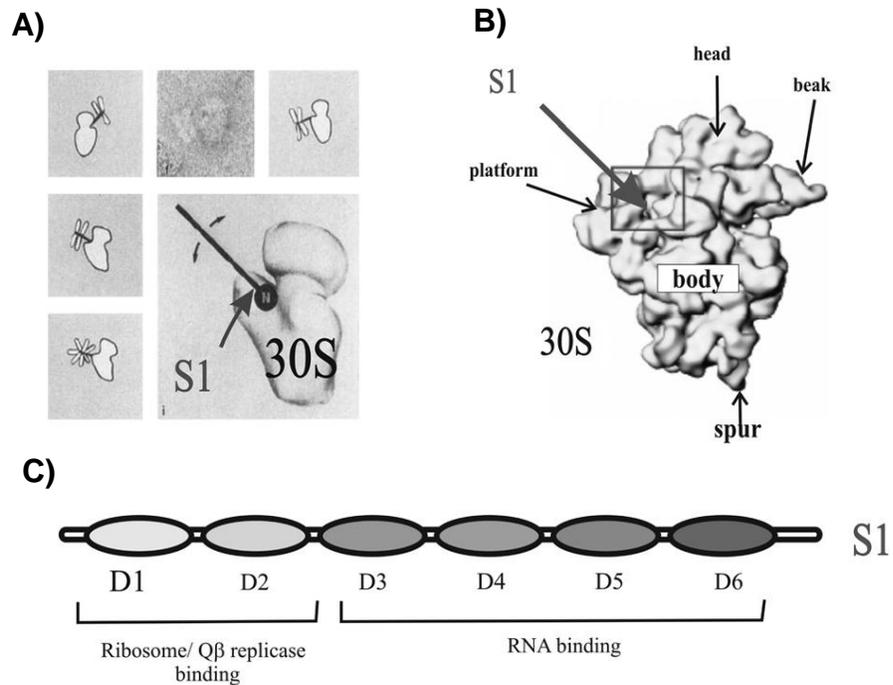


Figura 1. Proteína ribosomal S1. A) Criomicroscopía de la subunidad 30S de *E. coli*, en donde se indica la ubicación de la proteína S1. B) Imagen cristalográfica de la subunidad 30S, se indican las regiones de la misma. C) Esquema de los seis dominios OB-fold de la proteína S1, se muestran las funciones predichas de los dominios. (Imagen modificada de Sengupta, et al 2001)

El extremo N-terminal de la proteína S1 está conectado por una región flexible al extremo C-terminal, el cual contiene motivos repetidos tipo OB (4-6). Estos motivos están formados por 70 aminoácidos de longitud, contienen 5 láminas β barril antiparalelas. El motivo S1 es encontrado en muchas proteínas como la PNPasa de *E. coli* (**Figura 2**) o el factor de iniciación en eucariontes eIF2 α . El papel de la proteína S1 de dirigir el mRNA al ribosoma y facilitar el inicio de la traducción está soportado por las siguientes observaciones: (1) S1 puede estar unido al mRNA por crosslinking en complejos de inicio de la traducción, (2) presenta alta afinidad a ligandos de RNA similares a secuencias en mRNAs conocidas como potenciadores del inicio traduccional y (3) anticuerpos anti S1 muestran efectos inhibitorios solamente cuando son añadidos antes del inicio de la traducción, indicando que la proteína S1 es necesaria para el inicio de la traducción de cualquier mRNA.

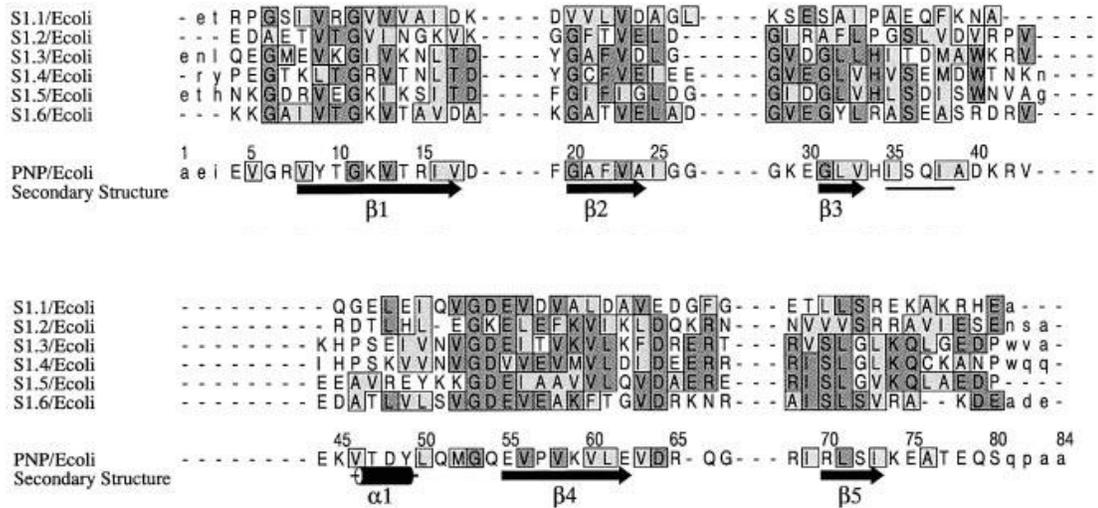


Figura 2. Dominios S1. Alineamiento de aminoácidos de los seis dominios de la proteína S1 tipo OB-fold con el dominio de unión a RNA de la PNPasa (motivo S1). Con flechas se indican las láminas β presentes en cada dominio y las alfa hélices son representadas mediante un cilindro. Los aminoácidos conservados se encuentran en cuadros gris obscuro. (figura modificada de Bycroft et al, 1997)

1.4.2 Dominios tipo OB

Los dominios con plegamiento de tipo OB son motivos estructuralmente pequeños nombrados así por sus propiedades de unión a oligonucleótidos/oligosacáridos. Los dominios tipo OB son dominios multifuncionales en muchas áreas de la biología (Lin & Scott, 2012; Murzin, 1993). Debido al plegamiento de estos dominios es muy difícil de predecir su estructura a partir de las secuencias primarias. Además, estos dominios muestran divergencia estructural y son capaces de unirse a una variedad de ligandos dentro de los cuales pueden ser DNA de cadena sencilla (ssDNA) y RNA de cadena sencilla (ssRNA) (Lin & Scott, 2012).

Los dominios de tipo OB contienen entre 70 y 150 aminoácidos de longitud. La variabilidad en longitud entre los dominios OB-fold es principalmente debido a las diferencias que existen en la longitud de los bucles encontrados entre elementos bien conservados de la estructura secundaria.

Frecuentemente descritos como motivo Greek key, los dominios tipo OB poseen cinco láminas plegadas antiparalela β barril (**Figura 3**), arregladas en 1-2-3-5-4-1. Entre las láminas 3 y 4 se puede encontrar frecuentemente un α hélice. Las láminas 3 y 5 pueden cerrar el β -barril por puentes de hidrógeno en un arreglo paralelo. Diversas características estructurales en común han sido identificadas en estos dominios (Bycroft et al., 1997). Una glicina (u otro residuo pequeño) en la primera mitad de $\beta 1$ y un giro β en la segunda mitad de $\beta 1$ le permite a esta lámina curvarse completamente para rodear al β -barril. Un segundo residuo de glicina frecuentemente se encuentra al inicio de $\beta 4$ en una conformación α -L. Además, los dominios OB usan una interfaz de unión común a ligandos centrada en las láminas $\beta 2$ y $\beta 3$ (Murzin, 1993). Esta interfaz canónica está conformada por bucles entre las láminas $\beta 1$ y $\beta 2$, $\beta 3$ y α , α y $\beta 4$, y $\beta 4$ y $\beta 5$. Estos bucles definen una hendidura que atraviesa la superficie del dominio OB de manera perpendicular al eje del β -barril. La mayoría de los ácidos nucleicos unidos tienen el mismo patrón dentro de esta hendidura, típicamente perpendicular a las láminas β antiparalelas, con una polaridad 5' a 3' desde las láminas $\beta 4$ y $\beta 5$ a la lámina $\beta 2$. Como evidencia de numerosas estructuras de alta resolución, los bucles presentados por una lámina β parecen proveer una superficie de reconocimiento ideal para ácidos nucleicos de cadena sencilla. Sin embargo, el tamaño de estos bucles es muy variable, estas características son una gran ventaja para los dominios OB-fold (**Figura 3**), ya que le permiten tener múltiples áreas de interacción con ácidos nucleicos.

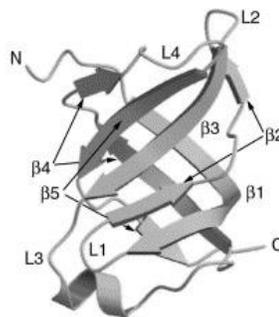


Figura 3. Estructura esquemática del dominio OB-fold. Láminas β y horquillas están indicadas junto con el extremo N- y C-terminal. Las láminas $\beta 2$, $\beta 4$ y $\beta 5$ se muestran interrumpidas y tienen giros y horquillas entre sus componentes.

1.4.3 Secuencias ricas en A/U

Los nucleótidos alrededor del codón de inicio tienen una gran influencia en la traducción. Un incremento de -1.4 kcal/mol en la energía libre del RBS corresponde a una reducción de aproximadamente 10 veces en la velocidad de inicio de la traducción (De Smit & Van Duin, 1994). Por lo que el ribosoma debe superar la barrera termodinámica para poder unirse al mRNA. En *E. coli* secuencias ricas en A/U río arriba y río abajo del codón de inicio actúan como “*enhancer*”, debido a que favorecen la unión del mRNA al ribosoma (Castillo-Méndez, Jacinto-Loeza, Olivares-Trejo, Guarneros-Peña, & Hernández-Sánchez, 2012; Del Campo, Bartholomäus, Fedyunin, & Ignatova, 2015; Komarova, Tchufistova, Dreyfus, & Boni, 2005). Estas regiones ricas en A/U favorecen la presencia de regiones de cadenas sencillas, las cuales son sitios de anclaje del ribosoma. Las secuencias ricas en A/U ubicadas principalmente río arriba del codón de inicio actúan como sitio blanco para la proteína ribosomal S1 (Boni et al., 2001). Debido a la afinidad de la proteína S1 a secuencias ricas en A/U, la vida media del mRNA aumenta, ya que la proteína S1 protege al mRNA de la degradación por parte de RNAsas de *E. coli* como lo es la PNPasa (Briani et al., 2008). Este incremento en la vida media del mRNA favorece la abundancia y por consecuencia su expresión.

2. ANTECEDENTES

La proteína ribosomal S1 es una proteína ácida y con una gran afinidad por RNA de cadena sencilla. Además, se ha determinado que la proteína S1 es esencial para la traducción de cualquier mRNA tanto sintético como natural (Sørensen, Fricke, & Pedersen, 1998). Un trabajo realizado en 1984 demostró que la proteína ribosomal S1 es esencial para la traducción de homopolímeros de adeninas y uracilos, estos resultados fueron observados mediante la incorporación in vitro de lisina y de fenilalanina en mRNAs de poli (A) y de poli (U), respectivamente, y observaron una marcada disminución en la incorporación de estos dos aminoácidos al emplear una mutante de la proteína S1 (Suryanarayana & Subramanian, 1984). Además, otro estudio reveló que secuencias ricas en A/U río arriba del codón de inicio son sitios de unión para la proteína ribosomal S1 (Boni et al., 1991).

En el 2003, en un estudio propuso un modelo de dos pasos de interacción del ribosoma con mRNAs estructurados denominado “Standby sites” (De Smit & Van Duin, 2003). De acuerdo con este modelo, existe un paso de unión rápida del mRNA con la subunidad 30S a través de regiones de cadena sencilla con la proteína S1, el cual es independiente de la secuencia SD, y un segundo paso de desnaturalización de la estructura secundaria presente en el RBS del mRNA y su acomodamiento del mRNA en la subunidad 30S para permitir la interacción SD/ASD. Studer y Joseph en el 2006, demostraron el segundo paso del modelo, en el cual las estructuras secundarias en el RBS son desnaturalizadas y en donde la SD y factores de inicio son necesarios. En el 2013 Duval et al, estudiaron el primer paso de dicho modelo y demostraron que los dominios 1 a 3 del extremo N-terminal de la proteína S1 son esenciales para el anclaje de mRNAs con estructuras secundarias fuertes a la subunidad 30S y no para aquellos mRNAs poco estructurados. Sin embargo, un estudio previo (Castillo-Méndez et al., 2012) empleando variantes del mRNA de *lacZ* en los cuales modificaron el contenido de adeninas en las bases +4 a +9, observaron que aquellos mRNAs con un mayor

contenido de adeninas aumentan la expresión de la proteína β -galactosidasa y ese aumento en la traducción correlaciona con la unión del mRNA a la subunidad 30S. Además, Edmund et al, 2012, reportó que las primeras 20 bases río abajo del codón de inicio que poseen una región de cadena sencilla son requeridas por el ribosoma para una eficiente unión e inicio traduccional. Por otro lado, en otro estudio (Del Campo et al., 2015) se observó que aquellos mRNAs con un gran contenido de adeninas río arriba del codón de inicio favorecen el anclaje del mRNA al ribosoma en comparación con mRNAs con un mayor contenido de GC. Esto podría deberse a que regiones ricas en A/U mantienen el RBS poco estructurado. Sin embargo, la afinidad de la proteína S1 por secuencias ricas en A/U podría indicar su posible participación en la unión de este tipo de mensajeros, incluyendo aquellos conteniendo nucleótidos A/U río bajo del codón de inicio, con la subunidad 30S. La afinidad de S1 por mRNAs ricos en A/U después del codón de inicio y su posible participación en la formación de complejos de inicio traduccional podrían explicar la traducción eficiente de este tipo de mensajeros.

Un análisis bioinformático (Deryusheva, Machulin, Selivanova, & Serdyuk, 2010) demuestra que el tercer dominio de la proteína S1 es el más conservado de los 6 dominios OB que posee. Posiblemente, este dominio confiere a la proteína S1 la capacidad de interactuar con mRNAs ricos en A/U río abajo del codón de inicio.

3. JUSTIFICACIÓN

La síntesis de proteínas es regulada a diferentes niveles originando cambios en la expresión de las proteínas. Se conoce hasta el momento que secuencias río abajo del codón de inicio pueden reprimir o potenciar la traducción, sin embargo, se desconoce el mecanismo como estas secuencias pueden provocar este efecto en la traducción.

La proteína ribosomal S1 presenta una gran afinidad por secuencias ricas en A/U y además participa en el anclaje de mRNAs estructurados a la subunidad 30S. Según Duval, et al. 2013, la unión de mRNAs no estructurados a la subunidad 30S es independiente de la proteína S1. Sin embargo, debido al efecto de las secuencias ricas en A/U río abajo del codón de inicio y a las características de la proteína S1, se sugiere que la proteína S1 es necesaria para que estas secuencias muestren un aumento en la unión del mRNA con la subunidad 30S y en la traducción.

Por otro lado, ya se ha demostrado el papel de los dominios 1-3 de la proteína S1 en la unión de mRNAs estructurados, pero no con mRNAs débilmente estructurados. Por lo tanto, es de interés evaluar la participación de los dominios de la proteína S1 en la interacción de mRNAs poco estructurados (conteniendo adeninas, uracilos o guaninas río abajo del codón de inicio) con la subunidad 30S y en la traducción de este tipo de mRNAs.

4. HIPÓTESIS

Los dominios 2 y 3 de la proteína ribosomal S1 son esenciales en el reconocimiento de mRNAs ricos A/U río abajo del codón de inicio y para la traducción de este tipo de mRNAs.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general:

Determinar el papel de los dominios 1-3 de la proteína ribosomal S1 en la unión y traducción de mRNAs ricos en A/U río abajo del codón de inicio.

5.2 Objetivos específicos:

- Analizar la afinidad relativa de la proteína S1 por mRNAs ricos en A, U y G
- Determinar el papel de los dominios 1-3 en la interacción de la proteína S1 con mRNAs ricos en A, U y G
- Analizar el papel de los dominios 1-3 de S1 en la formación de complejos ternarios con mRNAs ricos en A/U
- Determinar si los dominios 2 y 3 de la proteína S1 son necesarios para la traducción de mRNAs ricos en A, G y U río abajo del codón de inicio
- Evaluar el papel de los dominios 1-3 de la proteína ribosomal S1 en la viabilidad celular

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cepas y condiciones de crecimiento

Las cepas de *E. coli* y plásmidos usados en este estudio son enlistados en la tabla 1. Los cultivos bacterianos fueron crecidos a 37°C en Luria–Bertani con ampicilina 100 µg/mL (LB-Amp).

6.2 Plásmidos y construcciones

Las variantes de *lacZ* obtenidas por mutagénesis sitio dirigida contienen una composición variable de adeninas y/o guaninas en los codones 2-3 (Tabla 1), los oligonucleótidos empleados son complementarios entre si y fueron diseñados a partir de *p_{lacZ}*, el cual está clonado en el vector pKQV4 bajo los sitios de restricción EcoRI/HinDIII. Para cada construcción solamente se muestra el oligonucleotido 5' (tabla 1). Por ejemplo: 5'-GGAAACAGAATTCATGAAAAACCCGTCGTTTT ACAACGTCGTG-3' y 5'-CACGACGTTGTAAAACGACGGGTTTTTTCATGAATTCT GTTTCC-3' fueron usados para obtener las variantes de *lac Z* con adeninas en las posiciones 2-3 (ATGAAAAAA) y así sucesivamente. Todas las variantes de *lac Z* fueron transformadas en *E. coli C600* por el método de CaCl₂ y la expresión de proteínas se realizó bajo el control del promotor *ptac*, el cual es inducible con IPTG 1 mM.

Tabla I. Cepas bacterianas y oligonucleótidos de *lacZ*

Cepas	Genotipo y características
C-1a	Parental
5699	<i>ArapB-rpsA</i>
DH5α	F ⁻ φ80d, <i>lacZ</i> ΔM15, <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r_k⁻</i> , <i>mk⁺</i>), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>d⁻</i> , <i>gyrA96</i> , Δ(<i>lacZYA-argF</i>), U169
C600	F ⁻ , <i>thi-1</i> , <i>thr-1</i> , <i>leuB6</i> , <i>lacY1</i> , <i>tonA21</i> , <i>supE44</i> , λ ⁻
Plasmidos	Descripción
pProEx-1	Blac <i>lacI</i> Q pTrc
pJET 1.2 blunt	Blac pT7
pKQV4	Blac <i>lacI</i> Q pTrc
T7 <i>lacZ</i> 5'	5'- CTAATACGACTCACTATAGGTGAGCGGATAACAATT TCACACAGGAAACAG-3'
<i>LacZ</i> reverse	5'-GCTGGCGTAATAGCGAAG-3'
<i>placZwt</i>	pKQV4 contiene el gen <i>lacZ</i> insertado en <i>plexlacZ</i> con los sitios de restricción <i>EcoRI</i> / <i>HinDIII</i> <i>lacZ</i>
<i>placZ23AAA</i>	Derivado de <i>placZwt</i> con sustituciones en <i>lacZ</i> ACC2AAA GAT3AAA
<i>placZ23GGG</i>	Derivado de <i>placZwt</i> con sustituciones en <i>lacZ</i> ACC2GGG GAT3GGG
<i>placZ23AGG</i>	Derivado de <i>placZwt</i> con sustituciones en <i>lacZ</i> ACC2AGG GAT3AGG
<i>placZ23AGA</i>	Derivado de <i>placZwt</i> con sustituciones en <i>lacZ</i> ACC2 AGA GAT3 AGA
<i>placZ23TTT</i>	Derivado de <i>placZwt</i> con sustituciones en <i>lacZ</i> ACC2TTT GAT3TTT

6.3 Clonación de los genes *rplD* y *rpsA*

El DNA genómico fue preparado a partir de *E. coli* C600 por métodos ya estandarizados. Los genes *rpsA* and *rplD* fueron amplificados por PCR a partir de DNA genómico usando los oligonucleótidos siguientes: *rpsAS1f* (5'-GCGgaattc **CCATG**ACTGAATCTTTTGCTCAAC-3'), *rpsAS1r* (5'-GCg gatccTTACTCGC CTTTAGCTGCTTT-3'), y *rplDL4f* (5'-CGgaattc**CGATG**GGAATTAGTATTG-3') y *rplDL4r* (5'-CGg gatccCCGTCATGCCAGCATCTCC-3'), respectivamente. Los sitios de restricción *EcoRI* y *BamHI* son indicados con letras minúsculas, y el sitio de inicio de la traducción en negritas. Los productos de PCR del tamaño esperado (1674 pb y 563 pb) fueron purificados y clonados en el vector de transición pJET usando CloneJET™ PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, USA). Los genes *rpsA* y *rplD* fueron subclonados en el vector de expresión pProEx-1, el cual le añade un tag de histidinas en el extremo N-terminal. La identidad de los productos clonados fue verificada por secuenciación usando *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, USA). Células *E. coli* DH5α fueron transformadas con el vector pProEx-1 con los genes clonados *rplD* and *rpsA* para expresar las proteínas L4 y S1 con el tag de 6 histidinas. Las proteínas fueron purificadas por cromatografía de afinidad empleando columnas de Ni-NTA agarosa (Qiagen, Germany).

6.4 Producción de anticuerpos

Ratas Wistar fueron inmunizadas dos veces con la proteína S1 a una concentración de 100 µg totales por inmunización diluido en 10 mM Tris-HCl pH 8 y adyuvante incompleto de Freund (Sigma #F5506-10ML), las ratas fueron retadas 30 días después, y diez días después de la última inmunización se determinaron los títulos de anticuerpo anti-S1 mediante la técnica de ELISA. Debido a que la pureza de la proteína L4 fue <60%, la proteína L4 fue separada mediante SDS-PAGE 10% y transferida a una membrana de PVDF, la banda correspondiente a L4 fue cortada y disuelta en DMSO al 100%. La membrana disuelta fue mezclada en adyuvante incompleto de Freund, y las ratas fueron inmunizadas con la emulsión resultante como se describió previamente para S1.

Los niveles de expresión de las proteínas ribosomales S1 y L4 fueron analizadas por western blotting diluyendo el suero inmunizado 1:20,000 en 15% de leche libre de grasa en PBS-T 1x para la detección de S1 y 1:500 en 7% de leche libre de grasa en TBS-T 1x para L4.

6.5 Clonación y purificación de las mutantes *rpsA*.

Las mutantes del gen *rpsA* (*rpsA* Δ 1, *rpsA* Δ 1-2 y *rpsA* Δ 1-3) fueron amplificadas mediante PCR a partir de la construcción pProEx-*rpsA* usando los oligonucleótidos mostrados en la tabla I y clonados en el vector pJET usando el kit de clonación CloneJET™ PCR (Thermo Scientific, USA). Cada una de las mutantes del gen *rpsA* fueron restringidas usando las enzimas ECoRI y BamHI, y subclonados en el vector pProEx-1, el cual añade un tag de histidinas en el extremo N-terminal. La identidad de los productos clonados fue verificada por secuenciación usando *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, USA). Células *E. coli* DH5 α fueron transformadas con el vector pProEx-1 con las mutantes *rpsA* Δ 1, *rpsA* Δ 1-2 y *rpsA* Δ 1-3, y crecidas toda la noche en medio LB adicionado con ampicilina (100 μ g/ml). Las células fueron diluidas 1:100 en medio fresco, crecidas hasta una densidad D.O._{600nm} de 0.6-0.8, e inducidas con IPTG 1mM por 6 h. Las células fueron cosechadas por centrifugación y lisadas mediante una prensa francesa a 8000 p. s. i en buffer de lisis (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 5mM PMSF, 5% Glicerol, 1mM DTT, 0.5% Triton X-100). El lisado celular se incubó por 30 min a 4 °C con 10 unidades de DNasa I (DN25, Sigma-Aldrich, USA) y 4 μ g/ μ l RNasa A. El lisado fue clarificado por centrifugación a 30, 000 g por 30 min. Después de la centrifugación, las proteínas en el sobrenadante fueron purificadas por cromatografía de afinidad empleando columnas de Ni-NTA agarosa (Qiagen, Germany). La pureza de la proteína S1 fue >95%, lo cual se analizó mediante SDS-PAGE.

6.6 Clonación y purificación de las mutantes *rpsAΔ2* y *rpsAΔ3*

Las mutantes *rpsAΔ2* y *rpsAΔ3* fueron obtenidas de acuerdo a un método reportado previamente (Gibson et al., 2009). De manera breve, en el caso de la mutante *rpsAΔ2*, los dominios 1 y 3-6 fueron amplificados mediante PCR a partir de la construcción pProEx-*rpsA* con los oligonucleótidos mostrados en la tabla I. Asimismo, para la mutante *rpsAΔ3*, los dominios 1-2 y 4-6 fueron amplificados mediante PCR a partir de la construcción pProEx-*rpsA* con los oligonucleótidos mostrados en la tabla I. La mezcla de los dominios amplificados, para cada mutante fueron empleados como templado par amplificar tanto *rpsAΔ2* y *rpsAΔ3* usando los oligonucleótidos *rpsAS1f* y *rpsAS1r* y finalmente clonados en el vector pJET y subclonados en el vector pProEx-1. Solamente la mutante *rpsAΔ3* se tradujo y su purificación fue igual a la utilizada con las otras mutantes.

Tabla II. Oligonucleótidos usados para la obtención de las mutantes

Oligonucleotidos	Secuencia 5'-3'	Características
ForS1Δ1	GCG GAATTC CCCGTGAGAAAGCTAAACG	Delección de dominio 1 y sitio EcoRI
ForS1Δ1-2	GCG GAATTC CCCGGCATGGAAGTTAAAGG	Delección de los dominios 1-2 y sitio EcoRI
ForS1Δ1-3	GCG GAATTC CCCAAACAGCTGGGCGAAGA TC	Delección de los dominios 1-3 y sitio EcoRI
ForS1Δ3	CTGCTGGAAAACCTGCAGGAAGGCGAAG ATCCGTGGGTAGCTA	Delección del dominio 3
RevS1Δ3	TAGCTACCCACGGATCTTCGCCTTCCTGC AGGTTTTCCAGCAG	Delección del dominio 3
RevS1	GCG GATCCTT ACTCGCCTTTAGCTGCTTT	Usado para generar templados de DNA de las formas truncadas (S1Δ1, S1Δ1-2 y S1Δ1-3) y con el sitio BamHI
ForS1Δ2	GTGAAACTCTGCTGTCCTGGAAGTTA AAGGTATC	Delección del dominio 2
RevS1Δ2	GATACCTTTAACTTCCAGGACAGCAG AGTTTCAC	Delección del dominio 2

6.7 Purificación de subunidades ribosomales 30S silvestres y deficientes en S1

Células *E. coli* C600 fueron crecidas en medio LB a una D.O. 600 nm (A_{600}) entre 0.9 y 1.2. Las células fueron enfriadas rápidamente, se cosecharon mediante centrifugación y el pellet fue lavado con 1/100 volúmenes de buffer A (10 mM Tris-Acetato, pH 7.8, 10.5 mM $Mg(Ac)_2$, 60 mM NH_4Cl , 6 mM β -Mercaptoetanol). Las células fueron cosechadas por centrifugación a 6,000 g por 15 min a 4°C. Se

determinó el peso húmedo del pellet celular y se resuspendió en buffer A suplementado con PMSF 0.5 mM, en una proporción de 1.3 ml por gramo de peso húmedo. Las células fueron lisadas a través de una Prensa Francesa a 10,000 p.s.i. El extracto celular fue incubado en buffer A con DNasa I (DN25, Sigma-Aldrich, USA) en hielo por 30 min y el lisado fue clarificado por centrifugación a 30,000 g por 45 min a 4 °C. Al sobrenadante S30 se le adicionó sulfato de amonio 1.5 M y se centrifugó a 10,000 rpm durante 30 min a 4 °C, el sobrenadante fue centrifugado nuevamente a 150, 000 g en el rotor SW40 Ti durante 12 h a 4 °C. El pellet correspondiente a los ribosomas 70S fue lavado con buffer B (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 1M NH₄Cl, 10 mM Mg(Ac)₂ y 5 mM β-Mercaptoetanol), en agitación suave y constante, para obtener subunidades deficientes en S1. Los ribosomas resuspendidos en buffer B fueron centrifugados nuevamente a 150,000 g por 12 h a 4°C. El pellet fue resuspendido en buffer C (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1.1 mM Mg(Ac)₂, 60 mM NH₄Cl, 0.1 mM EDTA y 2 mM β-Mercaptoetanol) y se cargó 30 unidades de absorbancia A₂₆₀ sobre un gradiente lineal de sacarosa 5-20% (w/v), el cual se hizo en buffer C para disociar ribosomas y centrifugado a 27,000 rpm durante 3.5 h a 4°C en un rotor SW28 Beckman. Las subunidades 30S fueron recuperadas a partir del pico correspondiente para cada condición.

6.8 Ensayos de unión

Los mRNAs empleados en los ensayos de formación de complejos ternarios fueron sintetizados por SIGMA Life Sciences. Las mezclas de reacción para los ensayos de unión (20µl) conteniendo mRNA marcado con γ-³²P (44 nM), subunidades 30S ribosomales (440 nM) y tRNA^{fMet} (880 nM) (a una proporción 1:10:20), dicha reacción fue realizada en buffer E (100 mM NH₄Cl, 10 mM Tris-acetato [pH 7.5], 10 mM Mg(Ac)₂, 1 mM DTT), e incubadas por 1 hora a 37°C. Los ensayos realizados con subunidades ribosomales 30S deficientes en S1 fueron en las mismas concentraciones que las subunidades 30S silvestres. La reconstitución con la proteína S1 se realizó empleando una concentración de 220 nM de S1. Las reacciones fueron diluidas con 500 µl de buffer E y filtradas a través de membranas

de nitrocelulosa (0.45 μm) en un manifold (Millipore), seguido de 3 lavados de 1 ml cada uno con buffer E. Las membranas fueron secadas a temperatura ambiente y a las muestras se les realizó cross-link con luz UV (UVC 500; Hoefer). La cantidad de complejo formado fue determinado de acuerdo a la cantidad de mRNA unido, el cual fue cuantificado por los valores de pixeles medido por el equipo Typhoon PhosphorImager.

6.9 Ensayo de movilidad electroforética en gel (EMSA)

Las formas truncadas y silvestre de la proteína S1 fueron pre-incubadas por 30 min a 37°C en buffer S1 (10mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NH₄Cl, 1mM DTT, 5% Glicerol, 0.7 ng/ μl tRNA, 100 $\mu\text{gr/ml}$ BSA). Concentraciones crecientes de la proteína S1 silvestre y mutantes fueron incubadas por 15 min a 37°C con 150 fmol de mRNA renaturalizado y marcado en el extremo 5' con γ -³²P en 12 μl de buffer S1. Los complejos mRNA-S1 fue analizado en geles PAGE al 6% (Acilamida/bisacrilamida 80:1, TBE 1X, Glicerol 2.5%). Los geles fueron secados y visualizados por autoradiografías. El nivel de radioactividad fue analizado y cuantificado por el equipo Typhoon PhosphorImager.

6.10 Transcripción-Traducción in vitro deficiente en S1

La traducción de las variantes de *lacZ* fue evaluada empleando extractos crudos S30 deficientes en S1, los cuales fueron obtenidos a partir de la cepa *E. coli* 5699 *AraBp-rpsA*. Las reacciones in vitro (30 μl) fueron preparadas con 500 ng de DNA plasmídico de las variantes de *lacZ* in TE (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA), 11 μl de premix [87.5mM Tris- Ac pH 8.0, 476 mM glutamato de potasio, 75 mM NH₄(Ac), 5 mM DTT, 20 mM Mg(Ac)₂, 1.25 mM de cada uno de los 20 aminoácidos, 5 mM ATP, 1.25 mM de cada ribonucleótido CTP, UTP, GTP, 50 mM Fosfoenolpiruvato, 250 mg/ml *E. coli* tRNA, 87.5 mg/ml PEG (8000 Mr), 2.5 mM cAMP, 50 mg/ml ácido fólinico] y 7 μl de extracto crudo S30 deficiente en S1, el cual fue obtenido como se ha descrito previamente (Hernández-Sánchez, Valadez,

Herrera, Ontiveros, & Guarneros, 1998). Las proteínas marcadas radioactivamente fueron sintetizadas usando un premix sin metionina. 10 μCi [^{35}S]-metionina (1170 Ci/mmol) fueron añadidos a una concentración final de 2×10^{-11} M. Las proteínas fueron precipitadas a partir de la reacción de 30 μl por adición de 120 μl de acetona seguido de una centrifugación de 15,000 g por 5 min. El sobrenadante fue retirado y el pellet de proteína fue secado y resuspendido en buffer de carga para proteína conteniendo SDS. Las muestras fueron corridas en un gel SDS-PAGE 10%. Posteriormente, los geles fueron secados y visualizados con autoradiografías. Los geles secos fueron rehidratados y teñidos con plata para visualizar la carga en cada carril. Las autoradiografías fueron analizadas con el programa ImageJ y los niveles de expresión de las variantes de *lacZ* fueron cuantificados como densidad electrónica (píxeles).

6.11 Marcaje metabólico

La actividad traduccional del extracto crudo S30 deficiente en S1 fue evaluado por marcaje metabólico. Cultivos bacterianos de la cepa *E. coli* 5699 (3 ml) fueron crecidos a 37°C en medio mínimo M9 suplementado con tiamina, biotina en ausencia o presencia de arabinosa. Los cultivos fueron crecidos durante 90 min y 120 min, se realizó un pulso por 10 min con 30 μCi de [^{35}S]-metionina (New England Nuclear, 1000 Ci mmol) y las reacciones fueron detenidas con un exceso de metionina fría (10 mM). Las muestras fueron centrifugadas por 10 min a 14,000 g y 4°C. Los pellets celulares fueron resuspendidos en 100 ml de buffer de lisis (30mM Tris-HCl, pH 6.8, 1% SDS, 5% glicerol, 2.5% β -mercaptoetanol), hervidas por 4 min y centrifugadas en las condiciones previamente mencionadas. Las proteínas fueron separadas en un gel SDS-PAGE al 10%. El gel fue secado y expuesto a placas radiográficas. Posteriormente, el gel fue rehidratado y teñido con plata para verificar la carga.

6.12 Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media \pm DS para los ensayos de unión y traducción *in vitro*. El análisis estadístico fue realizado usando el programa GraphPad Prism 5 para Windows. Las diferencias entre los valores de media fueron evaluadas usando la prueba t-Student y son expresados como **P<0.01 y ***P<0.0001 al compararse con el control.

7. RESULTADOS

7.1 Análisis estructural de los mRNAs sintéticos

La proteína ribosomal S1 tiene un papel más relevante en la formación de complejos ternarios con mensajeros más estructurados que con mRNAs poco estructurados (Duval et al., 2013). Sin embargo, los mRNAs que poseen un mayor contenido de adeninas o uracilos en las bases +4 a +9 además de ser poco estructurados, presentan una mayor afinidad con la subunidad 30S (Brock et al., 2007; Castillo-Méndez et al., 2012). Posiblemente, la proteína ribosomal S1 sea la responsable de la mayor afinidad que presentan este tipo de mRNAs en la formación de complejos ternarios. Con este propósito de definir la participación de la proteína S1 en la formación de complejos ternarios con RNA mensajeros ricos en adeninas y/o uracilos, se diseñaron oligonucleótidos sintéticos de RNA con una longitud de 36 nucleótidos, una estabilidad termodinámica baja (-3.4 a 2.6) y además con un sitio de unión al ribosoma (secuencia Shine-Dalgarno, región espaciadora y codón de inicio). Primero se diseñó un conjunto de tres RNAs (mRNA AUG-6A, mRNA AUG-5G y mRNA AUG-6U) con el mismo contexto de nucleótidos río arriba de la secuencia SD y región espaciadora, pero con nucleótidos diferentes en las posiciones +4 a +9 (adeninas, uracilos o guaninas). Asimismo, las energías libres de estos mensajeros con ΔG s entre 1 a -3.4 indican la presencia de estructuras secundarias débiles (**Figura 4A**). Esta serie de mRNAs fue nombrada de la siguiente manera: el número representa la cantidad del nucleótido más frecuente en las bases +4 a +9 y la letra mayúscula después del número corresponde al nucleótido más frecuente. El segundo conjunto de oligonucleótidos (mRNA rbs-A, mRNA rbs-G y mRNA rbs-U) (ΔG 2.6, 1 y 2.5, respectivamente) (**Figura 4B**) fueron diseñados con un contenido predominante de nucleótidos de adeninas, guaninas o uracilos en la región del RBS (río arriba de la secuencia SD, región espaciadora y río abajo del codón de inicio). Como un control para determinar la ausencia de estructuras secundarias en los mRNAs anteriores, se diseñaron homopolímeros de adeninas y uracilos (Poli A y Poli U) y un heteropolímero Poli GGC como control de la presencia de estructuras secundarias (**Figura 4C**).

Las estructuras secundarias y energía libre de Gibbs (ΔG) fueron predichas por el algoritmo Mfold (Zuker, 2003). En general, la estabilidad estructural de los mensajeros indicó baja estabilidad estructural ($\Delta G = -3.4$ a 2.6), con excepción del RNA poli GGC ($\Delta G = -20.3$ kcal/mol). Para corroborar los datos obtenidos por el algoritmo Mfold, se determinó la T_m de los RNA de manera experimental y se evaluó la migración electroforética de cada uno de los RNA analizados. Como se esperaba, el mRNA Poli GGC ($\Delta G = -20.3$ kcal/mol; $T_m = 70$ °C), el cual posee la estabilidad estructural más fuerte, presentó una mayor migración en comparación con mRNAs de estabilidad estructural intermedia mRNA AUG-5G ≈ 50.2 °C ($\Delta G = -1.9$ kcal/mol), mRNA AUG-6U ≈ 25 °C ($\Delta G = -3.4$ kcal/mol), mRNA AUG-6A ≈ 25 °C ($\Delta G = 1$ kcal/mol), mRNA rbs-U ≈ 25 °C ($\Delta G = 1$ kcal/mol) (**Fig. 4B**). Los mRNAs rbs-A y rbs-G (**Figura 4A**) tienen una estabilidad estructural similar ($\Delta G = 2.5$ y 2.6 kcal/mol, respectivamente), lo cual fue confirmado mediante el corrimiento electroforético (**Figura 4D**).

Los homopolímeros (poli A y poli U) no presentaron estructuras, principalmente el de uracilos cuya T_m no fue determinable y su migración fue menor que los demás mRNAs, sin embargo, el Poli A presentó una migración como si presentara estructuras secundarias, esto es debido a un fenómeno en donde ocurre un apilamiento de adeninas (Holder & Lingrel, 1975). Por lo tanto, hubo una correlación fuerte entre la T_m y la migración de los mRNAs. A diferencia de Poli GGC, en general los mRNAs analizados presentan una estabilidad termodinámica baja.

7.2 La proteína S1 promueve la formación de complejos ternarios con mRNAs ricos en A/U en las bases +4 a +9

Un análisis estadístico de la naturaleza de los nucleótidos en las posiciones +4 a +9 de los RNA mensajeros de *E. coli*, indican una alta frecuencia de nucleótidos de adeninas y uracilos (Sato et al, 2001). Asimismo, la alta frecuencia de adeninas río abajo del codón de inicio se ha asociado con una alta afinidad del mRNA con la subunidad 30S y la formación de complejos ternarios (Brock et al., 2007). Por otro lado, la proteína S1 se ha asociado con un papel relevante en la desnaturalización e interacción con RNA mensajeros estructurados (Duval et al., 2013).

Para analizar si la proteína S1 es importante en la interacción de la subunidad 30S con mRNAs poco estructurados y con una alta frecuencia de adeninas o uracilos después del codón de inicio, se llevó a cabo la formación de complejos ternarios incubando subunidades 30S deficientes de la proteína S1 ($30S^{\text{defS1}}$) con los mRNAs AUG-6A, AUG-5G y AUG-6U. Asimismo, se emplearon subunidades 30S silvestre (wt 30S) y $30S^{\text{defS1}}$ suplementadas con la proteína S1 purificada ($30S^{\text{defS1+S1}}$), además del tRNA iniciador. La deficiencia de la proteína S1 en ribosomas 70S fue de aproximadamente 70% (**Figura 5A**), ambos ribosomas tanto silvestre como deficientes en S1, fueron disociados con una concentración baja de Mg^{+2} (1mM) y las subunidades 30S fueron purificadas por medio de un gradiente de sacarosa 5-20% (**Figura 5B y 5C**), las subunidades 30S fueron precipitadas y resuspendidas en buffer de acetatos como se describe en materiales y métodos. Los mRNAs AUG-6A y AUG-6U presentaron una unión con la subunidad wt 30S más alta con respecto al mRNA AUG-5G (**Figura 5D**). El uso de subunidades $30S^{\text{defS1}}$ causó una reducción drástica en la unión de mRNAs ricos en adeninas y uracilos (mRNA AUG-6A 58.4% y mRNA AUG-6U 59.2%), dando lugar a una menor cantidad de complejos ternarios. La débil unión del mRNA AUG-5G con la subunidad wt 30S mostró una disminución con subunidades $30S^{\text{defS1}}$ estadísticamente no significativa ($p>0.05$) (**Figura 5D**).

Para corroborar si la proteína S1 era la responsable de favorecer la unión de mRNAs ricos en adeninas y uracilos con la subunidad 30S, se emplearon subunidades $30S^{\text{defS1+S1}}$. La proteína S1 restableció parcialmente la unión con los mRNAs AUG-

6A y AUG-6U en comparación con las subunidades wt 30S (**Figura 5D**). Estos resultados demuestran que la proteína S1 es necesaria para promover la unión de mRNAs poco estructurados ricos en adeninas y uracilos río abajo del codón de inicio con la subunidad 30S en la formación de complejos ternarios.

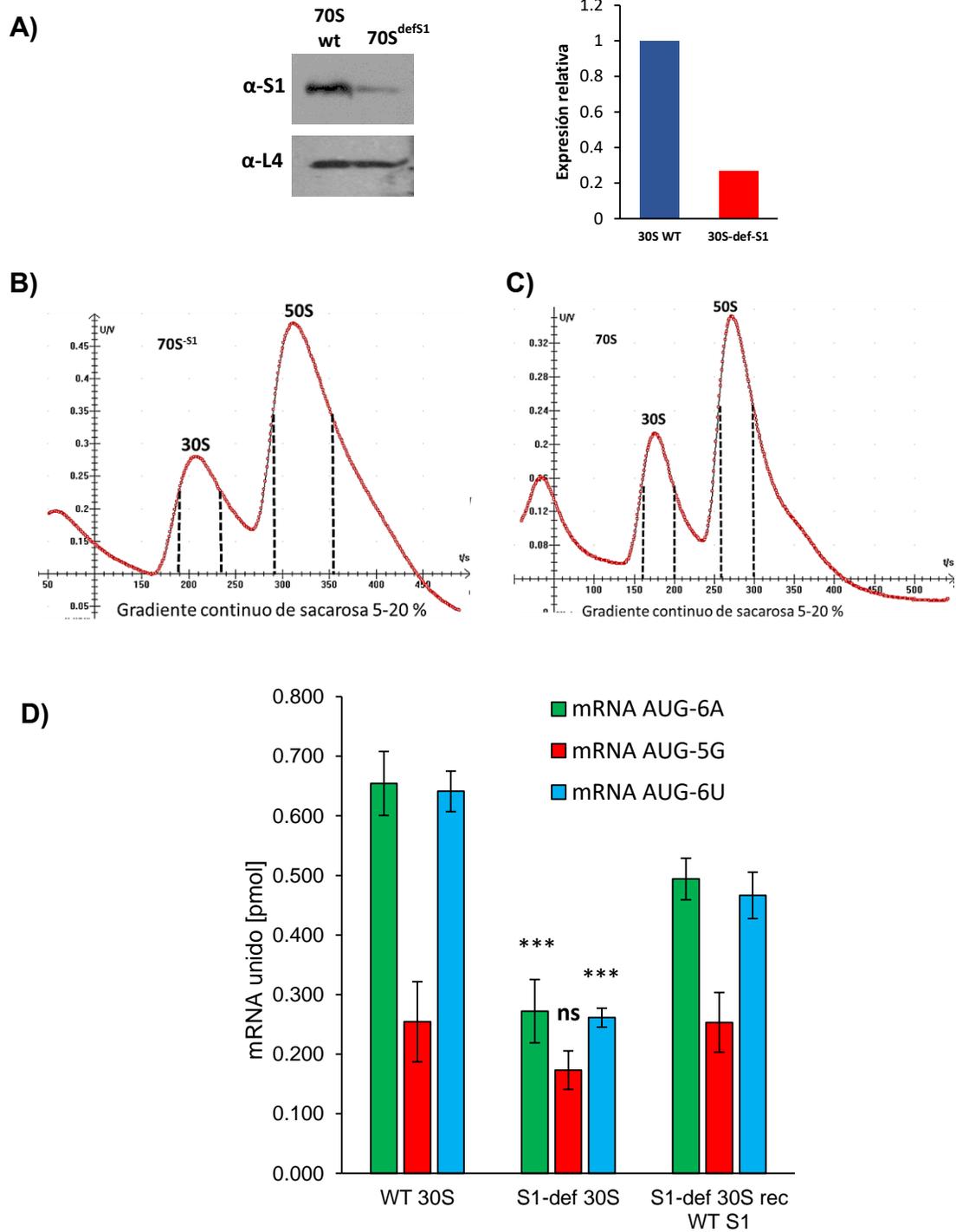


Figura 5. Deficiencia de S1 y su efecto en la formación de complejos ternarios.

Ribosomas 70S fueron lavados para eliminar la proteína S1 unida. **A)** La cantidad de proteína S1 residual fue analizada por Western blot usando anticuerpos anti-S1. Ribosomas wild-type 70S (WT 70S), ribosomas deficientes de S1 ($70S^{\text{defS1}}$). Se realizó un análisis densitométrico mediante el software ImageJ y que normalizado con la proteína L4. **B)** Ribosomas WT 70S ($30 A_{260}$ units) fueron disociados en condiciones iónicas 1 mM de Magnesio y 0.1 mM de EDTA y fraccionados en un gradiente lineal 5-20% de sacarosa como se describe en materiales y métodos. Las áreas marcadas del gradiente fueron precipitadas para obtener subunidades WT 30S. **C)** Ribosomas 70S deficientes en S1 fueron disociados y fraccionados en las mismas condiciones que los ribosomas WT. Las áreas marcadas de los gradientes fueron precipitadas para obtener subunidades 30S deficientes en S1. **D)** La formación de complejos ternarios fueron realizados incubando subunidades WT y S1-def 30S con tRNA iniciador y mRNAs AUG-6A, AUG-5G y AUG-6U marcados con ^{32}P en el extremo 5'. Los ensayos de union fueron incubados a 37 °C durante 15 min, los complejos fueron pasados por una membrana de nitrocelulosa y lavadas como se describe en materiales y métodos. El complejo ternario formado es retenido en la membrana y la señal emitida por el mRNA es cuantificada y graficada como cantidad de mRNA unido.

7.3 Los dominios 2-3 de la proteína S1 son necesarios para la unión entre la subunidad 30S y mRNAs ricos en adeninas y uracilos

Los dominios 1-3 del extremo N-terminal de la proteína S1 son necesarios para la desnaturalización de mRNAs altamente estructurados y su anclaje a la subunidad 30S (Duval et al., 2013). Posiblemente, estos dominios tengan un papel relevante en la interacción de mRNAs con un alto contenido de adeninas y uracilos en las bases próximas al codón de inicio con la subunidad 30S.

Para determinar el papel de los dominios de la proteína S1 en esta interacción, las subunidades $30S^{\text{defS1}}$ fueron reconstituidas con mutantes de la proteína S1 sin los dominios 1 ($S1\Delta 1$), 1 y 2 ($S1\Delta 1-2$) y 1-3 ($S1\Delta 1-3$) del extremo N-terminal (**Figura 6A**). Éstas mutantes fueron obtenidas mediante PCR y clonadas en el vector de

expresión pProEx-1 (**Figura 6B**). La mutante sin el dominio 3 (S1Δ3) fue obtenida de acuerdo al método ya reportado por (Gibson et al., 2009) y clonada en el vector pProEx-1 (**Figura 6C y 6D**).

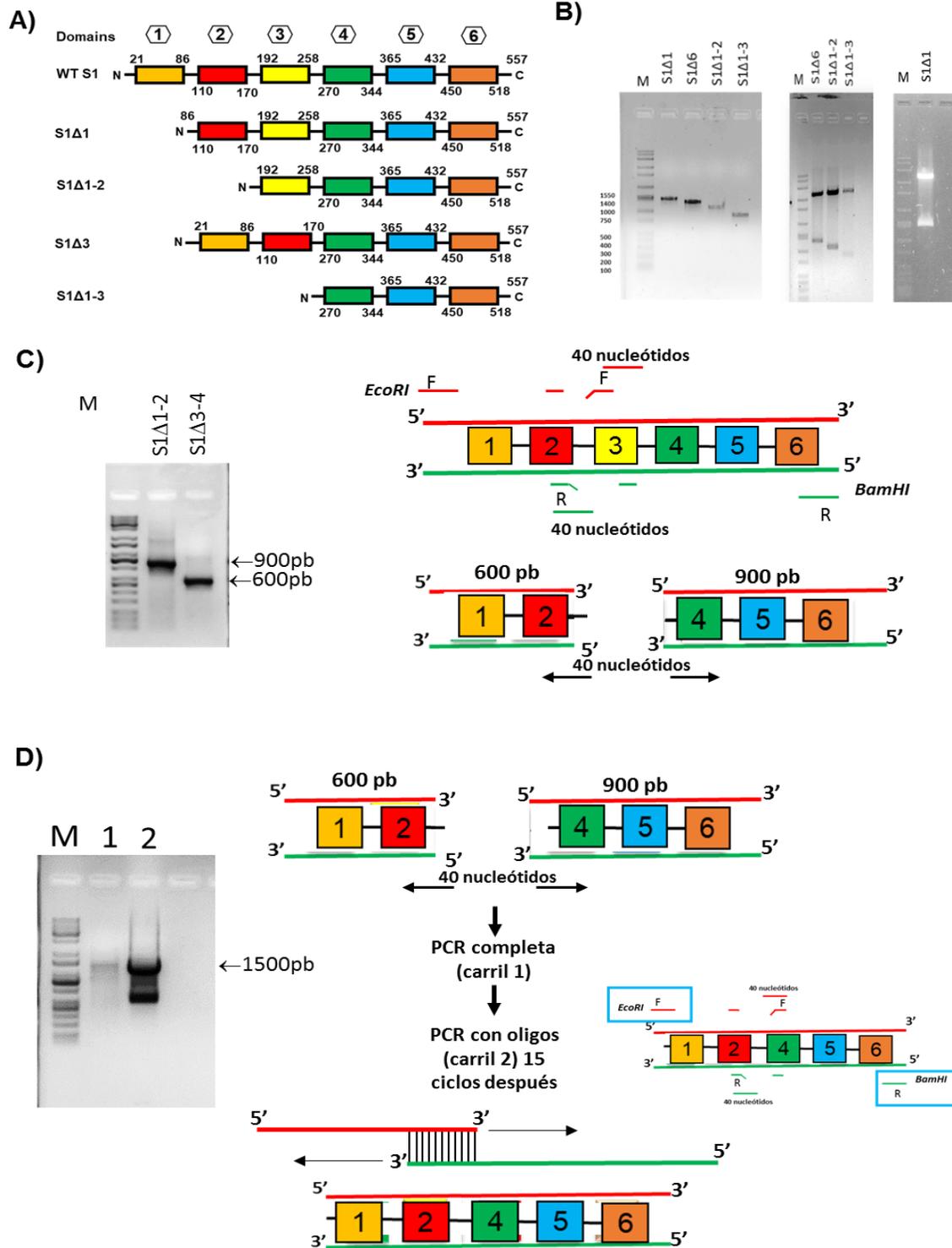


Figura 6. Clonación de las mutantes de la proteína S1. **A)** Representación esquemática de las mutantes de la proteína S1 clonadas en el vector de expresión pPrOEx-1, los números indican los aminoácidos correspondientes a cada dominio. **B)** PCR de las mutantes S1 Δ 1, S1 Δ 6, S1 Δ 1-2 y S1 Δ 1-3. Los oligos sentido poseen el sitio de restricción EcoRI y el antisentido BamHI que permitió su clonación en el vector pPrOEx-1. **C)** Las mutantes *rpsA* Δ 2 y *rpsA* Δ 3 (solo se muestra el ejemplo de *rpsA* Δ 3) fueron obtenidas mediante el método descrito por Gibson, el cual consistió en amplificar por PCR las secuencias de los extremos 5' y 3' del gen *rpsA*, excluyendo en este caso la secuencia del dominio 3 del gen. Los amplicones de los extremos 5' y 3' del gen contienen unas secuencias complementarias de 20 nucleótidos en los extremos 3' representadas por las líneas verticales negras que unen las secuencias amplificadas indicadas en la parte inferior de la figura. **D)** La mezcla de los dos fragmentos correspondientes a los dominios 1-2 (600 pb) y dominios 4-6 (900 pb) permitió amplificar el fragmento correspondiente a 1500 pb, el cual no poseía el dominio 3.

Cabe mencionar que también se clonó por el mismo método la mutante *rpsA* Δ 2 (**Figura 7A-D**), sin embargo, aunque su RNA mensajero pudo detectarse tanto por Northern blot (**Figura 7E**) como por RT-PCR (**Figura 7F**), la proteína correspondiente no se detectó mediante Western blot (**Figura 7G**).

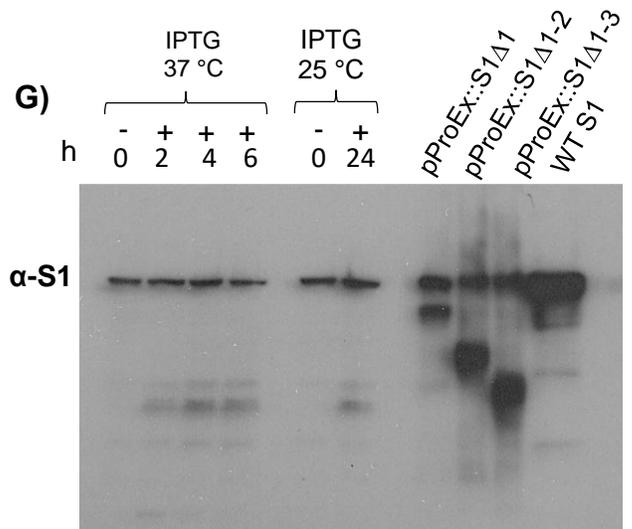
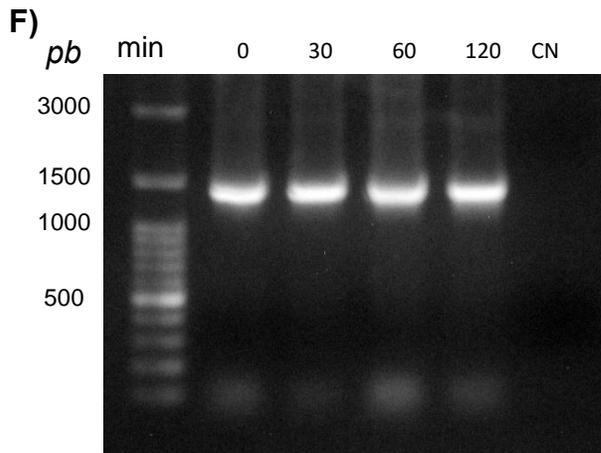
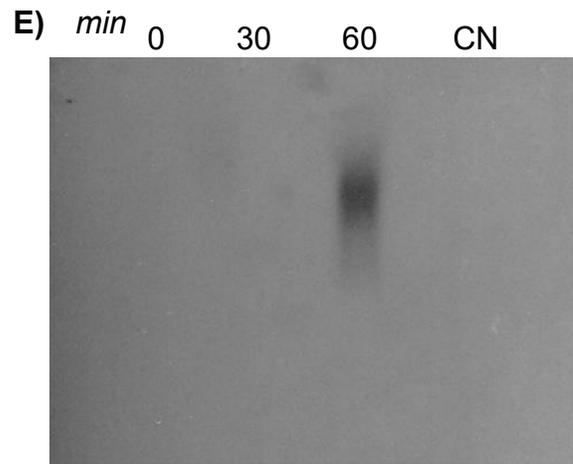
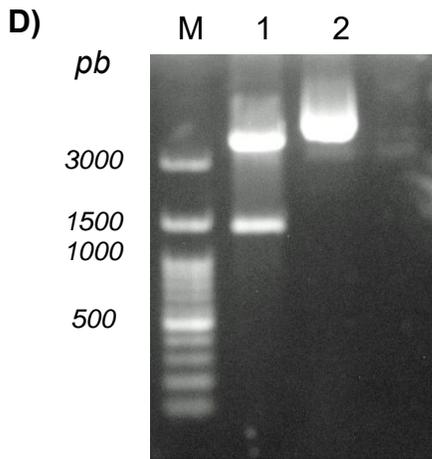
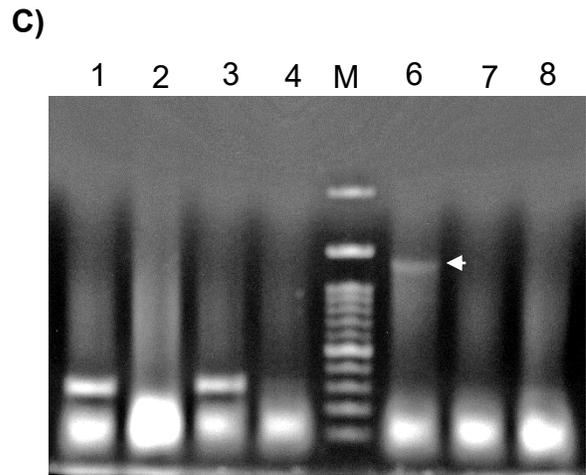
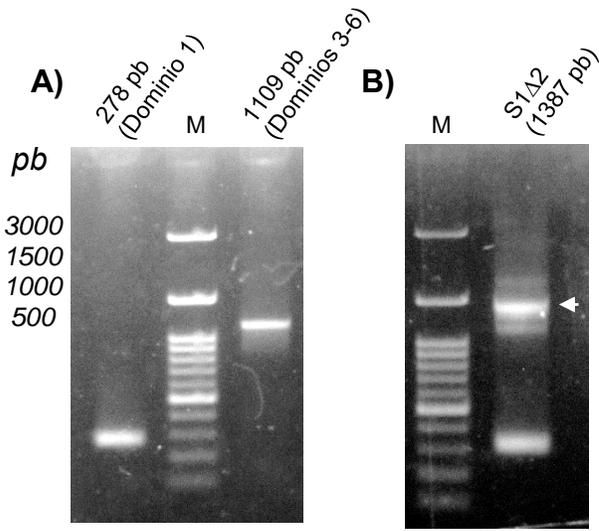


Figura 7. Clonación y expresión de la mutante *rpsA* Δ 2. **A)** Amplificación del fragmento del dominio 1 del gen *rpsA* (carril 1), marcador de peso molecular (M) (carril 2) y fragmento de los dominios 3-6 del gen *rpsA* (carril 3). **B)** Los productos de PCR de los dominios 1 y 3-6 fueron mezclados y el fragmento de PCR de 1387 pb es indicado (flecha blanca) (carril 2). **C)** PCR de colonia de candidatas de la mutante *rpsA* Δ 2 clonado en pProEx-1 (carril 1-4 y 6-8), la mutante *rpsA* Δ 2 fue detectada en una candidata solamente (carril 6). **D)** Construcción pProEx-*rpsA* Δ 2 digerida con EcoRI y BamHI (carril 1) y sin digerir (carril 2). **E)** RNA total de *E. coli* DH5 α transformada con pProEx-*rpsA* Δ 2 fue evaluada por Northern blot a distintos tiempos de inducción con IPTG (1mM). 0 min (carril 1), 30 min (carril 2), 60 min (carril 3) y RNA total de ratón (carril 4) como control negativo (CN). **F)** RT-PCR a partir de RNA total de *E. coli* DH5 α transformada con pProEx-*rpsA* Δ 2 a 0 min, 30 min, 60 min y 120 min después de la inducción con IPTG (1 mM). **G)** Se utilizó anticuerpo anti-S1 para la detección de la mutante S1 Δ 2 de un extracto proteico de *E. coli* DH5 α transformada con pProEx-*rpsA* Δ 2 durante 0, 2, 4 y 6 horas después de la inducción con IPTG (1 mM) a 37 °C y extracto proteico de *E. coli* DH5 α transformada con pProEx-*rpsA* Δ 2 a 0 y 24 horas después de la inducción con IPTG (1 mM) a 16 °C. Como control fueron utilizadas las mutantes S1 Δ 1, S1 Δ 1-2, S1 Δ 1-3 y WT.

La purificación de la mayoría de las proteínas que se sobre expresaron se realizó por columna de afinidad de níquel y fueron obtenidas con un 95% de pureza de acuerdo a geles SDS-PAGE (**Figura 8A-D**). El tamaño y pureza de las mutantes de S1 se verificó mediante Western blot empleando anticuerpos anti-S1 (**Figura 8E**).

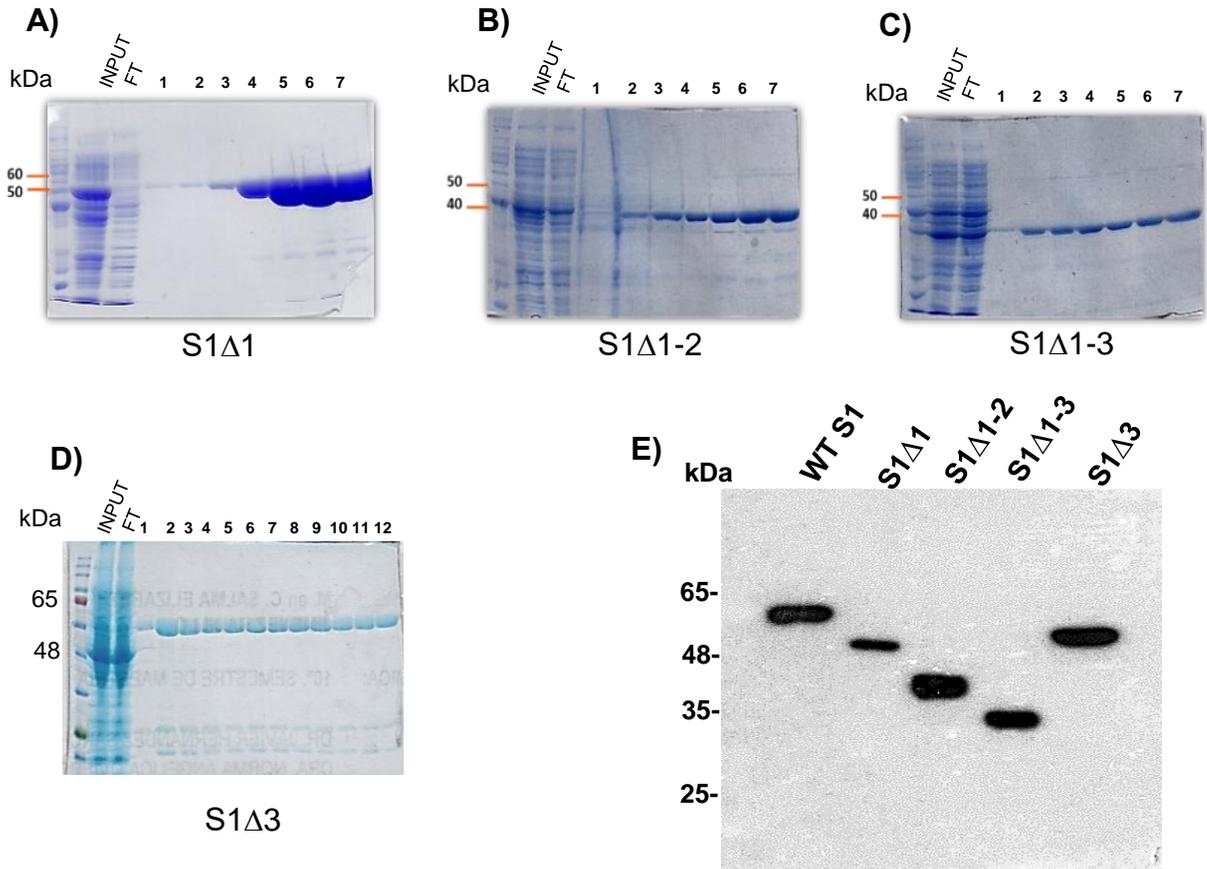


Figura 8. Purificación de las variantes de la proteína S1. Las mutantes **A)** S1Δ1, **B)** S1Δ1-2, **C)** S1Δ1-3 y **D)** S1Δ3, fueron sobreexpresadas y purificadas por cromatografía de afinidad en columnas de agarosa con níquel. 5 μ l de cada fracción de las mutantes de S1 purificadas fueron analizadas mediante SDS-PAGE al 10% y los geles fueron teñidos con azul de Coomassie. Carril 1, Input; carril 2, FT= Flow through, carril 3 en adelante, fracciones purificadas. **E)** Las mutantes fueron cuantificadas por el método de Bradford y 50 ng de cada mutante fue analizada por Western blot empleando anticuerpos anti-S1, evidenciándose la ausencia de la proteína S1 nativa.

De acuerdo a los resultados de los ensayos de formación de complejos ternarios, se observó que la falta del primer dominio no afectó negativamente la capacidad de la proteína S1 para restablecer la formación de los complejos ternarios con los mRNAs AUG-6A y AUG-6U (**Figura 9A**). Sin embargo, la pérdida de los primeros dos o tres dominios no restablecieron la formación de dichos complejos. De manera interesante, la ausencia del dominio 3 mostró el mismo efecto en la formación de complejos ternarios con las mutantes S1 Δ 1-2 y Δ 1-3.

Los mRNAs AUG-6A, 5G y 6U tienen energías libres que indican una débil estructura de los RNAs (-3.4 a 1) que podrían afectar su interacción con la subunidad 30S. Para minimizar la influencia de posibles estructuras y poner de manifiesto el efecto de los nucleótidos y su naturaleza en la interacción con la subunidad 30S, se analizó un segundo conjunto de mRNAs (rbs-A, rbs-U, rbs-G) con energías libres positivas y por lo tanto con menos estabilidad estructural. De forma similar a como se comportaron los mRNAs AUG-6A, AUG-6U y AUG-6G, la formación de los complejos ternarios con rbs-A y rbs-U fue mayor con respecto a rbs-G (**Figura 9B**). Además, el empleo de subunidades 30S^{defS1} redujo la formación de complejos ternarios en un 56% y 58% con los mRNAs rbs-A y rbs-U, respectivamente. Por otro lado, la disminución de la cantidad de complejos ternarios formados entre el mRNA AUG-5G y subunidades 30S^{defS1} fue estadísticamente no significativa ($p > 0.05$) en comparación con las subunidades wt 30S (**Figura 9B**). La reconstitución de las subunidades 30S^{defS1} con la proteína WT S1 restableció la unión de aquellos mRNAs con mayor contenido de adeninas y uracilos. En cuanto a la importancia de los dominios de S1 en la formación de los complejos ternarios, los resultados fueron similares a lo que se observaron con los mRNAs AUG-A, AUG-U y AUG-G, es decir que la falta del dominio 1 de S1 no afectó su capacidad de restablecer la formación de los complejos ternarios como ocurrió con las mutantes que perdieron los primeros dos o tres dominios (**Figura 9C**). La mutante sin el dominio 3 también perdió la capacidad para restablecer la formación de los complejos ternarios con los mRNAs rbs-A y rbs-U (**Figura 9C**).

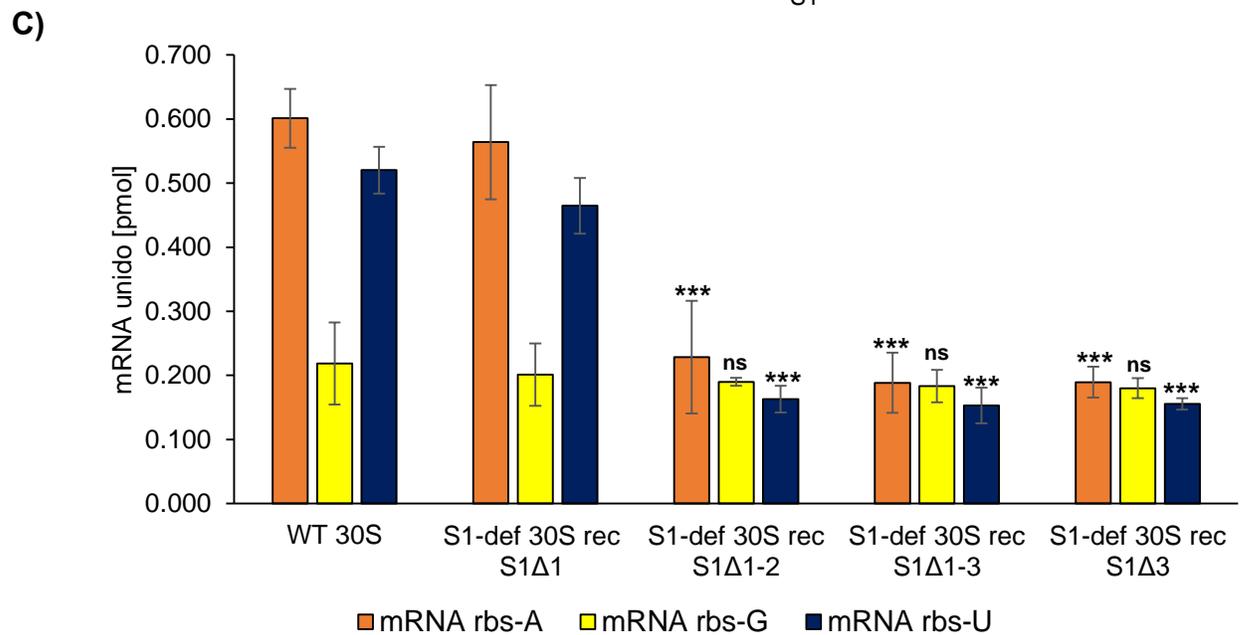
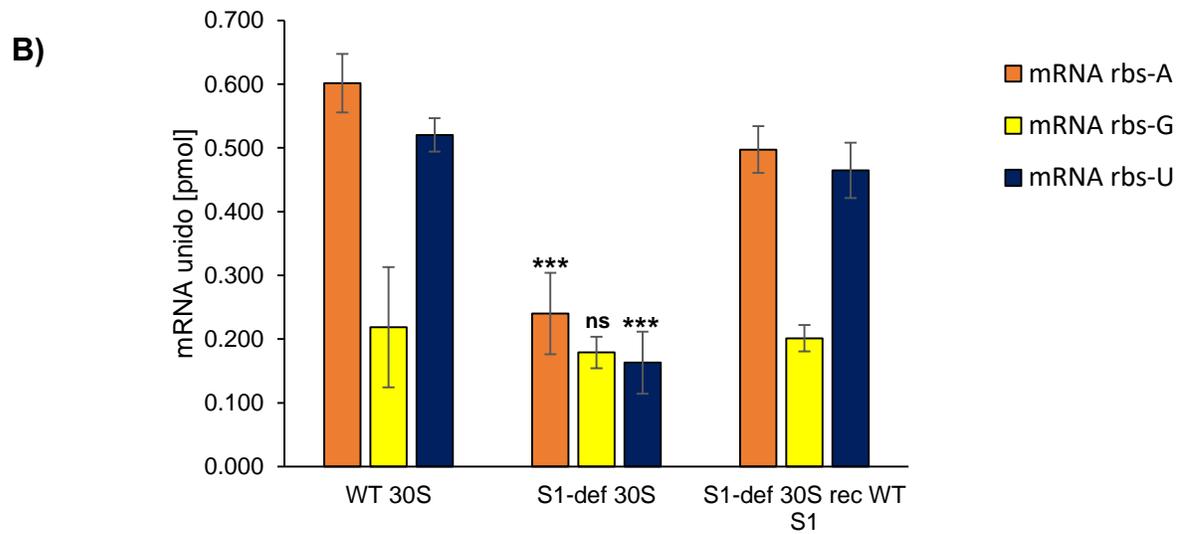
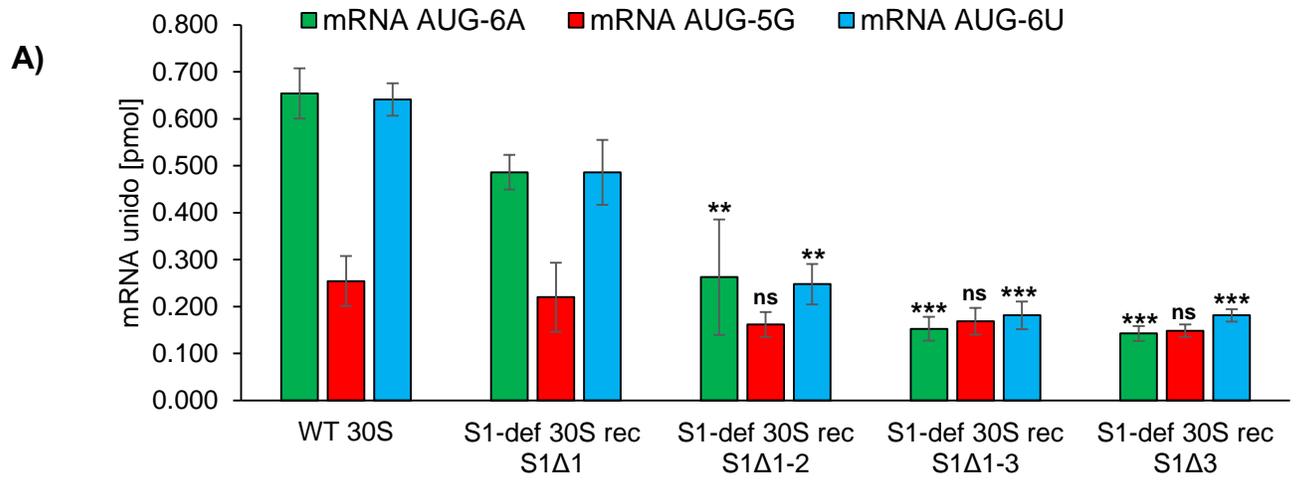


Figura 9. La proteína S1 promueve la unión de mRNAs ricos en adeninas y uracilos con la subunidad 30S. A) mRNA AUG-6A, AUG-5G y AUG-6U fueron calentados a 65 °C e incubados con subunidades 30S WT o deficientes en S1 reconstituidas con las mutantes S1 Δ 1, S1 Δ 1-2, S1 Δ 1-3 y S1 Δ 3 y tRNA iniciador para dar lugar a complejos ternarios. Dichos complejos fueron pasados por una membrana de nitrocelulosa y la señal emitida por el mRNA marcado con 32 P fue cuantificada y graficada como mRNA unido [pmol]. **B)** La afinidad de la subunidad 30S deficiente en S1 con los mRNAs rbs-A, rbs-G y rbs-U fue analizada en las mismas condiciones de las del inciso (A). **C)** Las subunidades 30S deficientes en S1 fueron reconstituidas con las variantes de S1 y su afinidad por los mRNAs rbs-A, rbs-G y rbs-U fueron analizadas en las condiciones mencionadas anteriormente.

7.4 La proteína S1 presenta mayor afinidad por mRNAs con mayor contenido en adeninas que uracilos río abajo del codón de inicio

El incremento en la formación de complejos ternarios con mRNAs con un alto contenido de adeninas y uracilos río abajo del codón de inicio, depende de la proteína S1. Por lo tanto, mediante ensayos EMSA se evaluó la afinidad de la proteína S1 por mRNAs ricos en adeninas, uracilos o guaninas, para ello se realizaron ensayos de retardamiento (EMSA) con los mRNAs (mRNA AUG-6A, AUG-6U y AUG-5G) marcados en el extremo 5' con 32 P y la proteína WT S1 o formas truncadas de la misma (S1 Δ 1, S1 Δ 1-2 y S1 Δ 1-3). Utilizando una concentración constante de mRNA marcado (150 fmol) y concentraciones crecientes de proteína (0-1200 nM), se observó que la proteína WT S1 presentó mayor afinidad con el mRNA AUG-6A ($K_d \approx 0.185 \mu\text{M}$) que con el mRNA AUG-6U ($K_d \approx 0.625 \mu\text{M}$) (**Figura 10A y 10B**). La delección del dominio 1 o de los primeros dos dominios del extremo N-terminal de la proteína S1 causó una disminución de aproximadamente 10 veces en la afinidad con el mRNA AUG-6A de acuerdo a las constantes de disociación (k_d) calculadas (S1 Δ 1 $k_d \approx 1.25 \mu\text{M}$; S1 Δ 1-2 $k_d \approx 1 \mu\text{M}$) (**Figura 10D**). Solamente la ausencia de los tres primeros dominios provocó que la proteína S1 perdiera la capacidad de interaccionar con el mRNA AUG-6A. La unión del mRNA AUG-6U y

la proteína S1 no vio disminuida por la ausencia del dominio 1 (S1 Δ 1 kd \approx 0.769 μ M), en comparación con la proteína WT S1 (WT S1 kd \approx 0.625 μ M) (**Figura 10E**), sin embargo, la deleción de los dominios 1-2 y 1-3 (S1 Δ 1-2 y S1 Δ 1-3), provocó una pérdida total en la unión del mRNA AUG-6U con la proteína S1 (**Figura 10B**), aún a la concentración de 1200 nM. Al evaluar la unión de la proteína S1 y de sus variantes con el mRNA AUG-5G, no se observó formación de complejo RNA-S1, aún a concentraciones altas de S1 (**Figura 10C**). Además, el mRNA AUG-5G presentó dos isoformas, ya que se observaron dos bandas.

Estos resultados indican que los dominios 3 y 2-3 son importantes para la unión de la proteína S1 con mRNAs ricos en adeninas o uracilos, respectivamente.

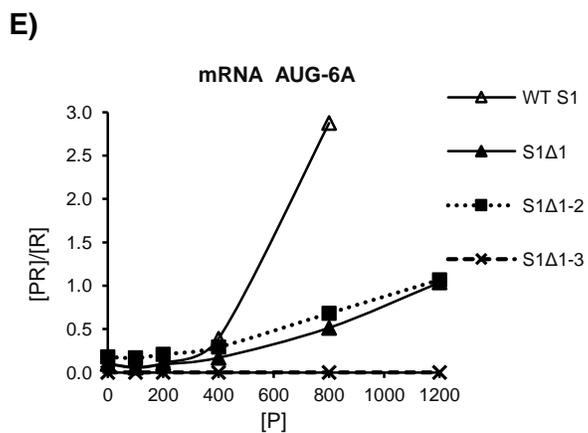
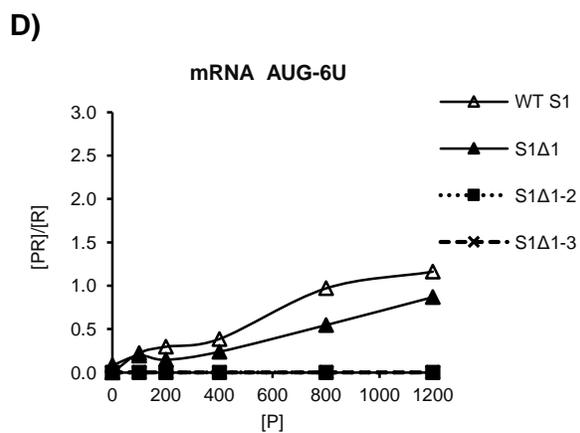
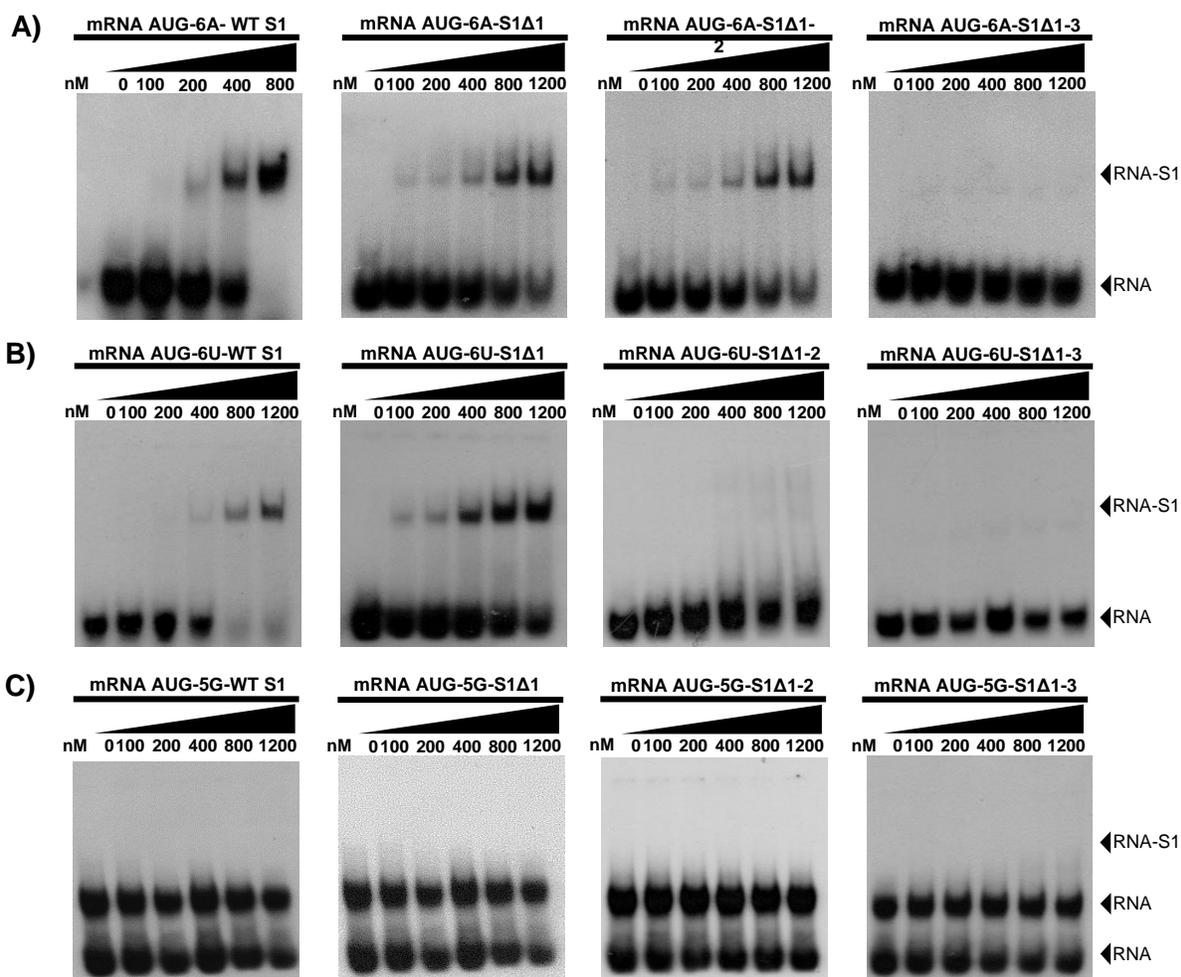


Figura 10. La proteína S1 tiene mayor afinidad por secuencias ricas en adeninas que por uracilos. Los complejos formados entre S1 (WT S1) o sus mutantes y los mRNAs A) AUG-6A, B) AUG-6U o C) AUG-5G marcados en el extremo 5' con ^{32}P fueron resueltos mediante ensayos de retardamiento en gel. Carril 1, mRNA sin proteína como control; Carriles 2-5, formación de complejos con concentraciones crecientes de WT S1 o mutantes (S1 Δ 1, S1 Δ 1-2 y S1 Δ 1-3) como se indica en la parte superior de la autorradiografía. Las posiciones del complejo (mRNA-S1) y el RNA libre son indicados. La constante de disociación (Kd) se determinó mediante regresión lineal, graficando la relación entre el complejo formado (RNA-S1) [PR] y el RNA libre [R] con respecto a las concentraciones de proteína [P] para los mRNAs AUG-6U (D) y AUG-6A (E).

7.5 El dominio 3 es esencial para la interacción de la proteína S1 con mRNAs ricos en adeninas o uracilos

Para comprobar que el dominio 3 es esencial para la interacción de la proteína S1 con mRNAs ricos en adeninas o uracilos en las bases +4 a +9, se evaluó la afinidad de la proteína S1 carente del dominio 3 con los mRNAs AUG-6A, AUG-6U y AUG-5G mediante ensayos EMSA. Los resultados demostraron que la ausencia del dominio 3 causa una completa pérdida en la unión de la proteína S1 con mRNAs AUG-6A y AUG-6U (**Figura 11A y 11B, respectivamente**). Sorprendentemente, la ausencia de este dominio permitió la interacción de la proteína S1 con el mRNA AUG-5G (**Figura 11C**). Por lo tanto, estos datos indican que el dominio 3 es esencial para la interacción de la proteína S1 con mRNAs ricos A/U y en cambio su ausencia, aunque débil, permite la interacción con mensajeros ricos en guaninas.

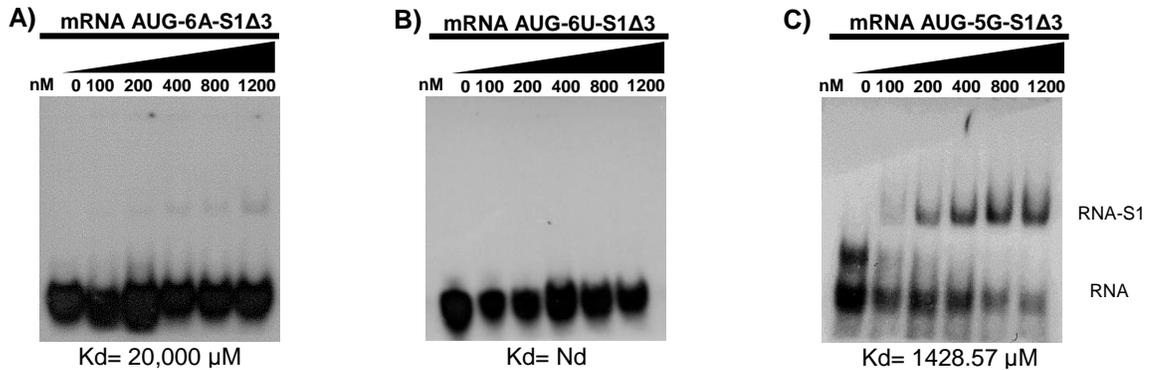


Figura 11. El dominio 3 impide la interacción de la proteína S1 con mRNAs ricos en guaninas. Los complejos binarios de S1 Δ 3 con **A)** AUG-6A, **B)** AUG-6U o **C)** AUG-5G fueron analizados por EMSA. Carril 1, mRNAs control; Carriles 2 - 5, formación de complejos con concentraciones crecientes de WT S1 como se indica en la parte superior de la autorradiografía. Los complejos fueron analizados en geles al 6% en condiciones no desnaturalizantes. Se indican las posiciones del complejo

7.6 La naturaleza de los nucleótidos determina las afinidades de los mRNAs con la proteína S1

Aunque débiles, los mRNAs AUG-6A, AUG-6U y AUG-5G presentan estructuras que podrían influir en la interacción con la proteína S1, sobretodo AUG-5G que tiene una energía libre de -3.4. Por ello, se analizó la formación de los complejos binarios entre S1 y el segundo conjunto de mRNAs (rbs-A, rbs-U y rbs-G) al igual que se hizo con los complejos ternarios. Los resultados confirmaron la afinidad de la proteína ribosomal S1 por mRNAs con un mayor contenido de adeninas y uracilos (**Figura 12A y 12B, respectivamente**). Sin embargo, el mRNA rbs-G, aun cuando presenta la misma estabilidad estructural que el mRNA rbs-A ($\Delta G = 2.5$ y 2.6 kcal/mol, respectivamente), no interactuó con la proteína S1 (**Figura 12C**). Estos resultados confirman la afinidad de la proteína S1 por mRNAs ricos en adeninas y uracilos, sugiriendo fuertemente que esta interacción se debe principalmente a la naturaleza del nucleótido siempre.

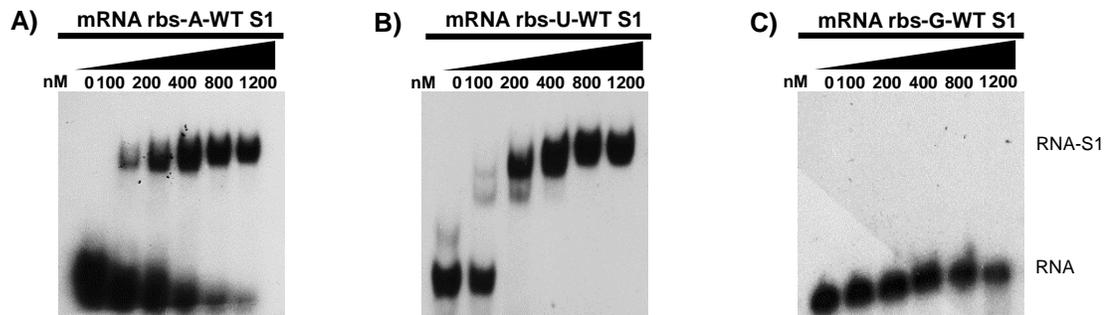


Figura 12. S1 no tiene afinidad por mRNAs ricos en guaninas. Los complejos binarios de S1 con **A)** rbs-A, **B)** rbs-U o **C)** rbs-G fueron analizados por EMSA. Carril 1, mRNAs control; Carriles 2 - 5, formación de complejos con concentraciones crecientes de WT S1 como se indica en la parte superior de la autorradiografía. Los complejos fueron analizados en geles al 6% en condiciones no desnaturalizantes. Se indican las posiciones del complejo (RNA-S1) y el RNA libre (RNA).

7.7 La deficiencia de la proteína S1 disminuye la síntesis de proteínas

El gen *rpsA* codifica para la proteína S1 y la delección de este gen es letal para la bacteria (Kitakawa & Isono, 1982). Con el objetivo de obtener un sistema de traducción deficiente en S1 para evaluar la traducción de mRNAs ricos en adeninas y uracilos, se empleó la cepa mutante condicional *E. coli AraBp-rpsA 5699*, en la que el gen *rpsA* está bajo el promotor de arabinosa. A partir de esta cepa se preparó un extracto S30 deficiente en S1 pero con actividad traduccional importante. Con este propósito, la cepa 5699 se creció en medio Luria-Bertani en presencia (condición permisiva) o ausencia de arabinosa (condición no permisiva). Se monitoreó el crecimiento a una D.O. 600 nm cada 30 min por 150 min, como se observa en la gráfica de crecimiento (**Figura 13A**), la ausencia de arabinosa provocó una expresión baja de la proteína S1 afectando negativamente el crecimiento bacteriano en comparación con la condición permisiva (**Figura 13A**). El análisis mediante Western blot de la expresión de la proteína S1 en la condición no permisiva mostró una disminución creciente en la expresión de la proteína S1 durante el tiempo monitoreado (**Figura 13B**).

Los resultados indicaron que a los 90 min, la expresión de S1 se redujo considerablemente, sin embargo, para determinar si se conservaba la actividad traduccional se analizó la síntesis de proteínas a los 90 y 120 min mediante marcaje metabólico como se describe en materiales y métodos. Un extracto total de proteínas de células obtenidas a éstos tiempos de cultivo bajo condiciones permisivas y no permisivas se analizaron mediante SDS-PAGE. La baja expresión de la proteína S1 bajo condiciones no permisivas provocó un nivel de traducción menor a los 90 min (**Figura 13C**). Sin embargo, la traducción a los 120 min disminuyó aun en la condición permisiva lo cual podría deberse a un incremento en la actividad proteolítica de la cepa, por lo que se decidió emplear para los ensayos de transcripción-traducción *in vitro* el extracto S30 de las células cultivadas durante 90 min bajo condiciones no permisivas donde se redujo significativamente el nivel de la proteína S1, pero todavía se observó actividad de síntesis de proteínas.

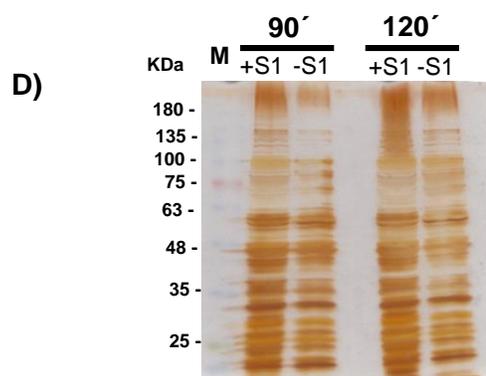
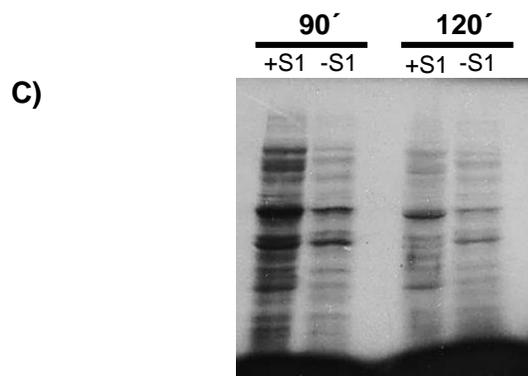
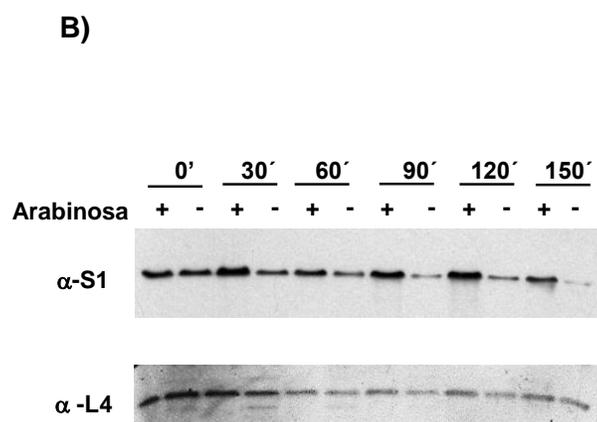
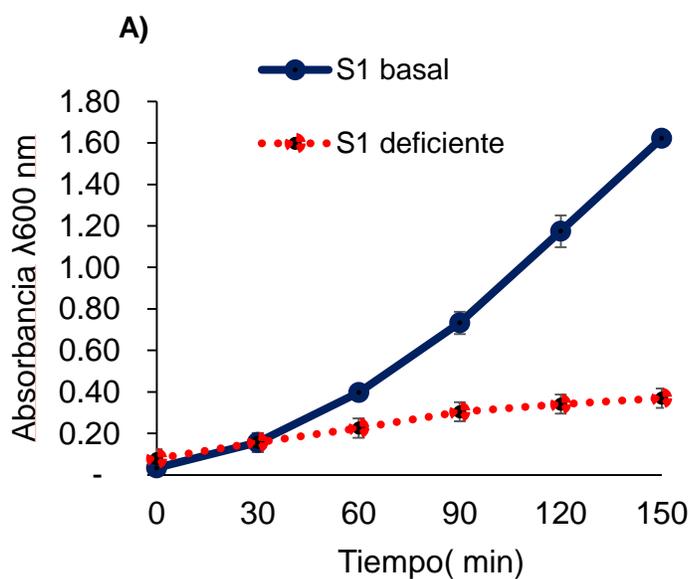


Figura 13. Condiciones para preparar extractos S30 deficientes en S1. A) Se cultivaron células *E. coli* 5699 *AraBp-rpsA* en presencia o ausencia de arabinosa para inducir o reprimir la expresión de S1 y se crecieron durante 150 min (A). La absorbancia λ 600 nm se midió en los tiempos indicados. En los mismos tiempos, la expresión de la proteína S1 fue analizada mediante Western blot (B). Las células crecidas durante 90 o 120 minutos se les realizó marcaje metabólico como se describe en materiales y métodos. Se prepararon extractos celulares, se sometieron a electroforesis y los geles se secaron y se expusieron a autorradiografía (C). El gel fue rehidratado y teñido con plata como control de carga (D).

7.8 Los dominios 2-3 son esenciales para la traducción de mRNAs ricos adeninas y uracilos

La síntesis de proteínas a partir de mRNAs, con un alto contenido de adeninas o uracilos alrededor del RBS es mayor en comparación con aquellos que presentan más guaninas y citosinas (Brock et al., 2007; Castillo-Méndez et al., 2012), y esto se ha correlacionado con la mayor afinidad que tienen éstos mRNAs para formar complejos ternarios. Sin embargo, el papel de la proteína S1 en la síntesis de proteínas a partir de mRNAs ricos en adeninas y uracilos no ha sido estudiado. En este trabajo se demuestra que la proteína S1 es esencial para promover la unión de mRNAs ricos en adeninas y uracilos en la formación de complejos ternarios (**Figura 5D**), lo cual sugiere que haya una eficiente formación de complejos de inicio traduccional y se promueva la traducción de estos mRNAs. Para demostrar el papel de la proteína S1 en la traducción de mRNAs ricos en adeninas y uracilos, se empleó un sistema de transcripción traducción *in vitro* deficiente en S1 empleando los extractos S30 descritos arriba. Para ello se emplearon variantes de *lacZ* con diferente contenido de nucleótidos en los codones 2 y 3 (ACC GAT, GGG GGG, AGG AGG, AGA AGA, AAA AAA y TTT TTT) (**Figura 14A**). Se estandarizaron las condiciones de los ensayos *in vitro* deficientes en S1 como se describe en materiales y métodos suplementando la reacción con dos concentraciones de la proteína S1 (6.8 y 13.6 μ M) y empleando como DNA molde la variante *lacZ* AAA (conteniendo adeninas en los codones 2 y 3) derivada del gen wt *lacZ* (**Figura 14B**).

La concentración 13.5 μM de S1 originó mayor síntesis de $\beta\text{-gal}$, con un tiempo de incubación de 15 min y a los 30 min la síntesis de proteína fue aún mayor (**Figura 14C**) por lo que en los experimentos de traducción *in vitro* se incubaron durante 30 min y en su caso se reconstituyeron con 13.5 μM de S1.

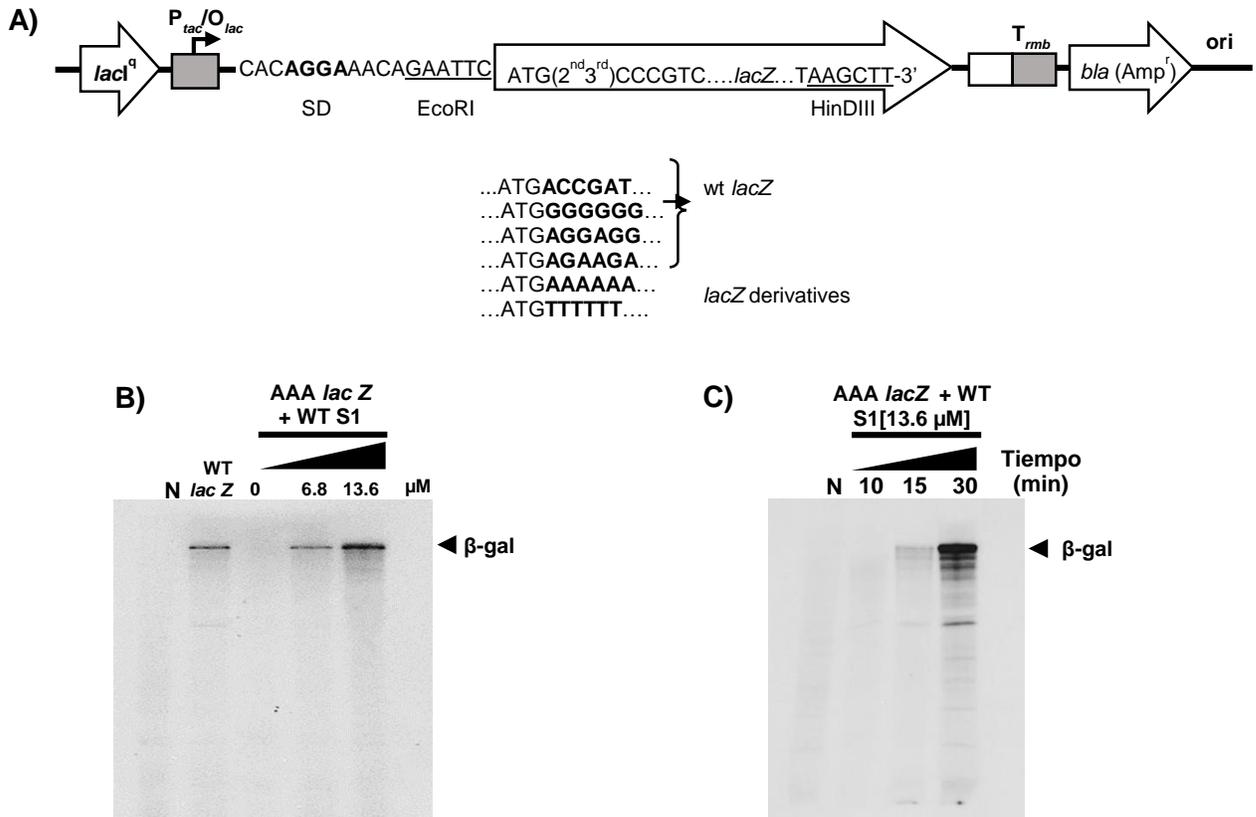


Figura 14. Estandarización del ensayo de transcripción-traducción *in vitro*. A)

Representación esquemática de los derivados de *lacZ* modificados por mutagénesis sitio dirigida en las bases 4-9 río abajo del codón de inicio y clonados en el vector pKQV4, el cual está bajo el promotor *P_{tac}*. **B)** Evaluación de la concentración adecuada de la proteína S1 adicionada a los extractos de traducción *in vitro* deficientes en S1, carril 1: control negativo (N) sin DNA; carril 2, wt *lacZ*; carril 3, AAA *lacZ* sin proteína S1; carril 4, AAA *lacZ* con 6.8 μM de S1 y carril 5 AAA *lacZ* con 13.6 μM de S1. Todas las reacciones fueron incubadas a 37 °C durante 20 min y corridas en un gel al 12%. **C)** Síntesis de proteínas de las reacciones de transcripción-traducción *in vitro* a diferentes tiempos de incubación. Carril 1, control negativo sin DNA; carril 2,3 y 4, AAA *lacZ* con tiempos de incubación de 10 15 y 30 min, respectivamente. Los geles fueron secados y expuestos a placas radiográficas.

De manera interesante, comparado con las reacciones in vitro que contenía wt *lacZ*, la deficiencia de S1 disminuyó considerablemente la traducción de las demás variantes de *lacZ* (**Figura 15A**). La reconstitución del sistema de transcripción-traducción in vitro con la proteína WT S1 restauró la traducción de las variantes de *lacZ* (**Figura 15A**), incrementando la expresión de la proteína β -galactosidasa en las variantes conteniendo un mayor contenido de adeninas y uracilos hasta 6 veces más comparado con wt *lacZ* (**Figura 15B**). Sin embargo, la proteína β -galactosidasa no fue expresada a partir de GGG *lacZ*, aun cuando la reacción fue suplementada con la proteína WT S1 (**Figura 15A**).

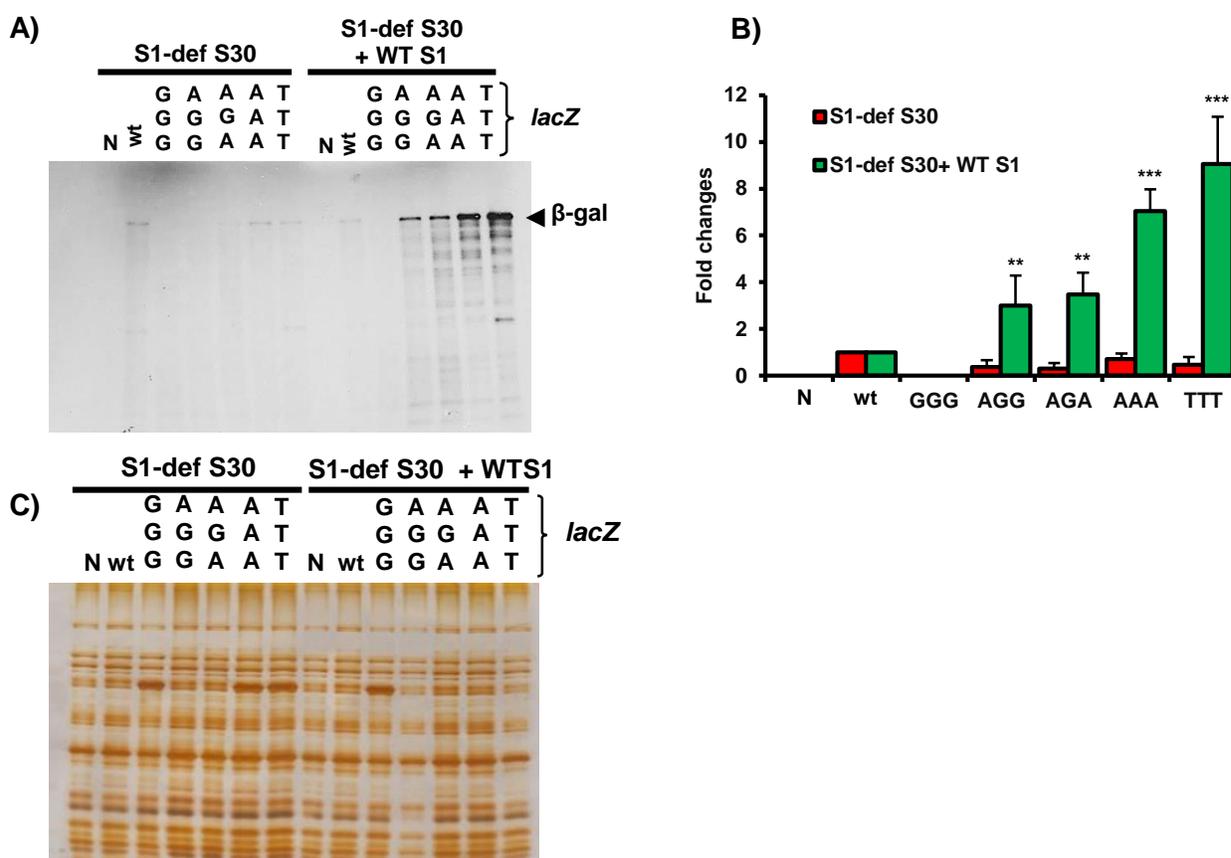


Figura 15. S1 estimula la traducción de A/U-ricos mRNAs. **A)** Ensayos de transcripción-traducción in vitro a partir de los derivados de *lacZ* usando extractos S30 deficientes en S1 reconstituidos con WT S1. Después de 30 min, las mezclas de reacción se resolvieron en SDS-PAGE al 10%, el gel se secó y se expuso a autorradiografía. **B)** Se realizó un análisis densitométrico de la banda superior con el software ImageJ a partir de tres experimentos independientes. Los gráficos de barras representan las medias (veces de cambio con respecto a wt *lacZ*) \pm DS, $n = 3$. ** $p < 0.01$, *** $p \leq 0.001$. **C)** Los geles secos se rehidrataron y se tiñeron con plata como control de carga.

Para demostrar el papel de los dominios 2-3 de la proteína S1 en la traducción de mRNAs ricos en adeninas y uracilo, el extracto S30 deficiente en S1 fue reconstituido con las variantes de la proteína S1 sin los dominios 1, 1-2 y 1-3 (S1 Δ 1, S1 Δ 1-2 y S1 Δ 1-3). La mutante S1 Δ 1 fue capaz de reconstituir la síntesis de proteína al nivel de WT S1 a partir de las variantes mRNAs AAA y UUU *lacZ* (**Figura 16A**), sin embargo, las mutantes S1 Δ 1-2 y S1 Δ 1-3, no fueron capaces de restablecer la traducción de las mismas variantes (**Figura 16B y 16C, respectivamente**). Como control de carga los geles fueron teñidos con plata (**Figura 16D-F**). Estos resultados demuestran la importancia de los dominios 2-3 de la proteína S1 en la traducción de mRNAs con un mayor contenido de adeninas y uracilos en las bases +4 a +9.

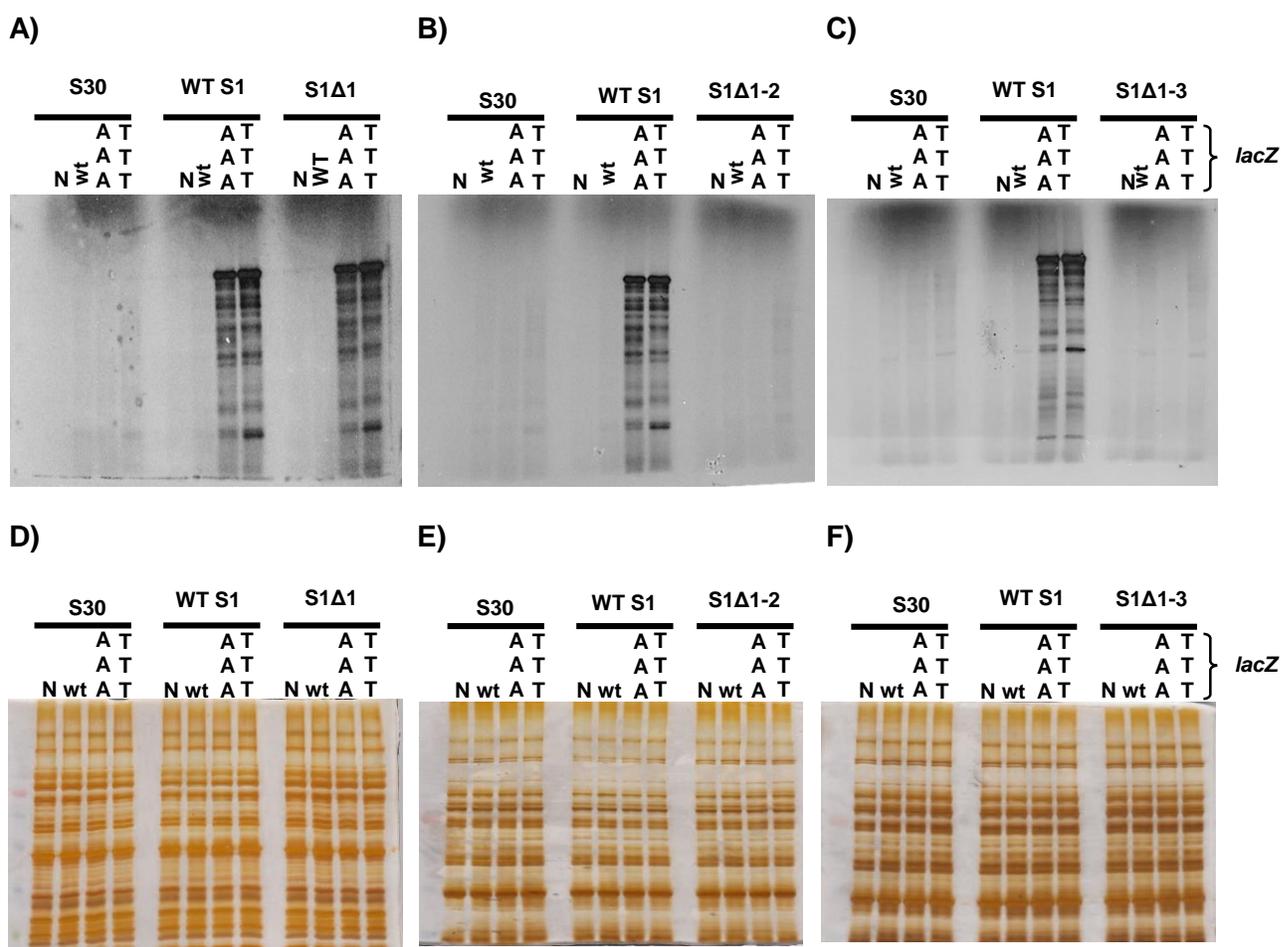


Figura 16. Los dominios 2 y 3 son importantes para la traducción de mRNAs ricos en adeninas y uracilos. Se realizaron ensayos de transcripción-traducción *in vitro* empleando un extracto S30 deficiente en S1 y variantes de *lacZ* (wt, AAA y TTT). Los sistemas de transcripción-traducción fueron reconstituidos con la proteína WT S1 o la mutante S1 Δ 1 (**A**), a una concentración de 13.6 μ M, o bien con las variantes S1 Δ 1-2 (**B**) o S1 Δ 1-3 (**C**) a las mismas concentraciones que en (**A**). N control negativo sin DNA; WT, wt *lacZ*; AAA, AAA *lacZ*; TTT, TTT *lacZ*. En la parte superior de los paneles A-C. En la parte superior de todos los paneles se indican los carriles en los que las reacciones fueron reconstituidas con WT S1 o alguna variante de S1 (S1 Δ 1, S1 Δ 1-2 o S1 Δ 1-3). Cada una de las reacciones de transcripción-traducción fueron analizados en geles al 10% en condiciones desnaturalizantes (**D**, **E** y **F**) y los geles fueron teñidos con plata como control de carga.

7.9 Los dominios 2-3 son esenciales para la viabilidad celular

Los dominios OB de la proteína ribosomal S1 muestran la misma estructura, pero no son funcionalmente equivalentes (Duval et al., 2013). Los dominios 4-6 de la proteína S1 no son esenciales tanto en la unión de mRNAs estructurados a la subunidad 30S como en la viabilidad celular (Duval et al., 2013). Con el objetivo de evaluar la esencialidad de los primeros dominios de S1 en la viabilidad celular, la cepa *E. coli* 5699 *AraBp-rpsA* fue transformada ya sea con el plásmido pProEx-1 vacío o con el gen *rpsA* silvestre o algunas de las mutantes de S1 (*rpsA* Δ 1; *rpsA* Δ 1-2, *rpsA* Δ 1-3 and *rpsA* Δ 3) bajo el control del promotor inducible por IPTG. En ausencia de arabinosa (condición no permisiva), la proteína S1 no se expresa en la cepa *E. coli* 5699 *AraBp-rpsA*, afectando negativamente el crecimiento celular (**Figura 17**) en comparación con la cepa *E. coli* 5699 *AraBp-rpsA* cultivada bajo condiciones permisivas. El efecto drástico en el crecimiento bajo condiciones no permisivas fue rescatado en las células transformadas con el vector *pProEx-1* que contiene el gen *rpsA* WT e inducido con IPTG (**Figura 17**). Aunque no a los niveles de la proteína WT, S1 Δ 1 también restauró el crecimiento celular (**Figura 17**), mientras que el crecimiento celular no fue rescatado en las cepas transformadas con la construcción pProEx-1 conteniendo las mutantes *rpsA* Δ 1-2 y *rpsA* Δ 1-3 (**Figura**

17). De manera sorprendente, la delección del dominio 3 fue suficiente para que S1 perdiera la capacidad de restablecer el crecimiento celular (**Figura 17**). Estos datos demuestran que los dominios 2-3 de la proteína ribosomal S1 juegan un papel esencial en la viabilidad celular.

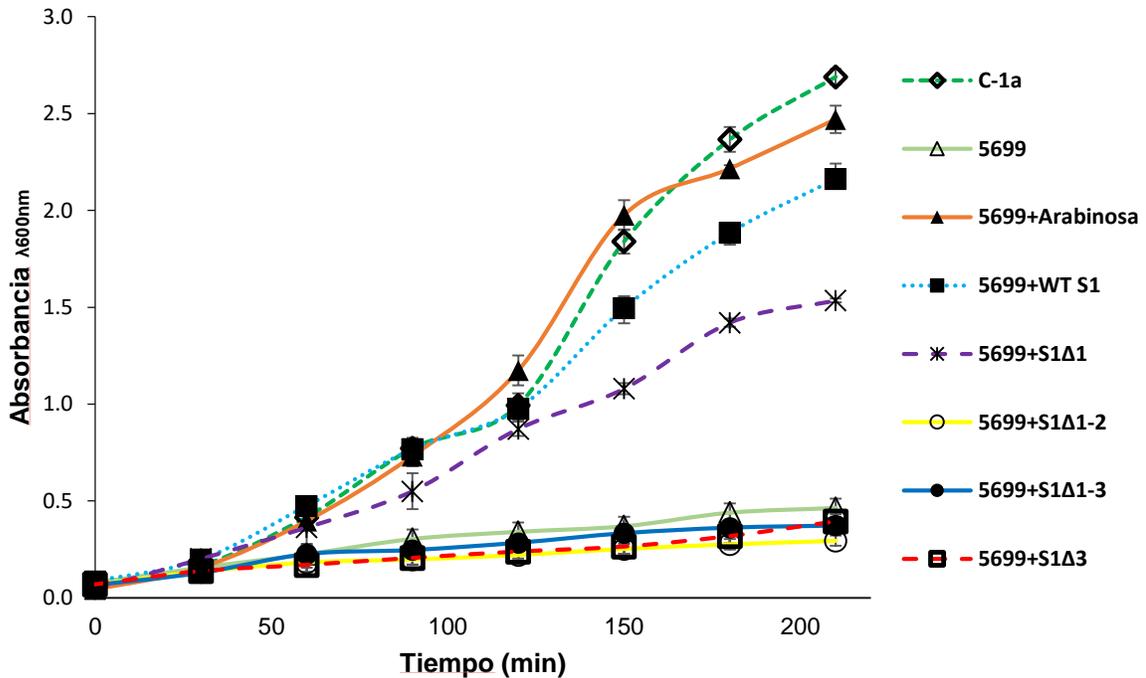


Figura 17. Efecto de las mutantes de la proteína S1 en la viabilidad celular. El efecto de la proteína WT S1 y sus mutantes en el crecimiento celular fue evaluado empleando una mutante condicional en el gen *rpsA*, las bacterias fueron crecidas a 37°C en medio LB con arabinosa hasta una $DO_{600} = 0.2$ y después el cultivo fue diluido 1:4 (tiempo= 0 en la gráfica) con medio LB precalentado en presencia de arabinosa (S1 basal, condición permisiva) o glucosa (S1 deficiente, condición no permisiva) e induciendo la expresión de WT S1 o sus mutantes (S1Δ1, S1Δ1-2, S1Δ1-3 y S1Δ3) con 1mM de IPTG (Tiempo= 0). El crecimiento bacteriano fue monitoreado midiendo la DO_{600} . Los puntos muestran la media de tres experimentos independientes \pm DS

8. DISCUSIÓN

S1 es una proteína de unión a RNA, en diversos organismos con proteínas similares puede contener de uno a seis dominios OB (Deryusheva et al., 2010). Los dominios de esta familia de proteínas tienen una estructura conservada, la cual adopta un plegamiento tipo OB que consiste de un barril formado de cinco láminas β antiparalelas altamente específicas de unión a ácidos nucleicos de cadena sencilla (Bycroft et al., 1997). Aunque la proteína ribosomal S1 de *E.coli* posee seis dominios tipo OB, solamente el tercer dominio tiene una estructura muy conservada homologa a dominios S1 de otras proteínas de la misma u otras especies (Deryusheva et al., 2010). La unión de la proteína S1 a mRNAs con secuencias ricas en A/U en la región 5'UTR ha sido reportada en diversos trabajos (Boni et al., 1991; Komarova et al., 2005), sin embargo, el papel específico de los dominios en la interacción con mRNAs que poseen estas secuencias después del codón de inicio no ha sido estudiado. Nuestros resultados demuestran fuertemente que el dominio 3 de la proteína S1 es necesario para distinguir mRNAs ricas en A/U de aquellos ricas en G. Además, los dominios 2-3 son necesarios en la formación de complejos ternarios con mRNAs ricas en A/U y su traducción in vitro, asimismo, estos dominios son importantes para la viabilidad celular. Aunque se demostró que los dominios 2-3 son necesarios para las funciones de la proteína S1, la participación de los dominios adyacentes con otro tipo de mRNAs podría ser posible.

En este trabajo se evidencia que la naturaleza de los nucleótidos A/U después del codón de inicio favorece la unión de mRNAs ricas en A/U con la proteína S1. Con este propósito se usaron dos grupos de mRNAs sintéticos cuyas estructuras son muy débiles (**Figura 4**), esto se hizo para favorecer la exposición de los nucleótidos y su interacción con la proteína S1. En este contexto, se observó que la unión de ambos grupos de mRNAs, correlaciona con la composición nucleotídica río abajo del codón de inicio más que con la T_m y la energía libre (ΔG). Para ambos grupos de mRNAs (**Figura 4A-B**), la unión con mRNAs ricas en adeninas o uracilos, y la

ausencia de unión con mRNAs ricos en G no correlaciona con la baja estabilidad estructural de cada mRNA ($\Delta G = 1$ Kcal/mol, $\Delta G = -3.4$ Kcal/mol and $\Delta G = -1.9$ Kcal/mol; respectivamente). Esto significa que las diferencias de unión deben ser atribuibles a la naturaleza de los nucleótidos. Aunque estas diferencias de unión son también compatibles con la idea de que las regiones ricas en A/U son menos estructuradas que regiones ricas en G, nuestros resultados revelan que la proteína S1 no se une a mRNAs ricos en G (rbs-G; $\Delta G = 2.5$ kcal mol⁻¹) a pesar de que estos mRNAs presentan una estabilidad estructural comparable a la de los mRNAs ricos en A (rbs-A; $\Delta G = 2.6$ kcal mol⁻¹).

Es interesante comparar nuestros resultados con los de Duval et al, 2013 quien encontró que los dominios 1-3 de S1 son esenciales para el reconocimiento del mRNA estructurado *rpsO*, indicando que los primeros tres dominios son necesarios para desnaturalizar la estructura del mRNA, sin embargo, para los mRNAs poco estructurados ricos en A/U evaluados en este trabajo, solamente son requeridos los dominios 2-3. Se sabe claramente que mRNAs con regiones A/U en cadena sencilla cerca del codón de inicio son mejor traducidos que aquellos con regiones ricas en GC (Del Campo et al., 2015). Estas regiones en cadena sencilla pueden constituir un sitio blanco (standby site), en el cual la subunidad 30S puede anclarse (De Smit & Van Duin, 2003). Por lo tanto, la formación de complejos de inicio requiere que la subunidad 30S sea capaz de anclarse con razonable afinidad a una región de cadena sencilla del mRNA posiblemente por medio de la proteína S1, la cual se ha sugerido que desempeña un papel importante durante el inicio de la traducción interactuando con el mRNA (Sørensen et al., 1998). Sin embargo, la participación de las secuencias ricas en A/U río abajo del codón de inicio como sitios de unión de S1 no ha sido descrita. Se ha sugerido que las regiones ricas A/U mantienen el RBS no estructurado. Sin embargo, los resultados presentados en este trabajo demuestran que la composición nucleotídica en las bases +4 a +9 son relevantes para facilitar la unión de la proteína S1 y la asociación de la subunidad ribosomal 30S siempre y cuando el mensajero este debilmente estructurado y se exponga la

naturaleza de los nucleótidos. Estos resultados concuerdan con los de Edmund Loh et al, 2011, quien reportó que las primeras 20 bases río abajo del codón de inicio que contienen una región en cadena sencilla, permiten que el ribosoma se una eficientemente al ribosoma y sea mejor traducido. Asimismo, la eficiente formación de complejos ternarios con mRNAs ricos en A/U y poco estructurados sugiere que la proteína S1 en el contexto de la subunidad 30S facilita la unión de este tipo de mRNAs con la subunidad 30S (**Figura 5D**) y que la participación de los dominios 2 y 3 es necesaria para la formación de estos complejos (**Figura 9A y 9D**). Duval et al, 2013, demostró que los dominios 1-3 son esenciales para el anclaje y acomodamiento de mRNAs muy estructurados en el 5' UTR a la subunidad 30S. Este resultado es razonable, ya que estos dominios pueden participar en la desnaturalización de la estructura secundaria estable presente en el mRNA *rpsO* a diferencia de los mRNAs débilmente estructurados evaluados en este trabajo. De manera sorprendente, nuestros ensayos de formación de complejos ternarios demuestran que la pérdida del dominio 1 de la proteína ribosomal S1 no afecta mucho su capacidad de restaurar la formación de estos complejos (**Figura 9A y 9D**). De manera similar, la ausencia del dominio 1 (S1 Δ 1) solo afecta parcialmente la funcionalidad de la proteína S1 para mantener el crecimiento celular (**Figura 17**). Este resultado contrasta con un estudio previo, en donde purificaron solamente el dominio 1 y observaron que se une indirectamente al ribosoma a través de la proteína S2 inhibiendo la unión de la proteína S1 nativa (**Byrgasov et al, 2012**), sin embargo, el comportamiento del dominio 1 solo por un lado, y la proteína que carece del dominio 1 (S1 Δ 1) por otro lado, no es lo mismo como nuestros resultados lo indican. Estos resultados están de acuerdo con lo reportado por Duval et al, 2013, donde la mutante S1 Δ 1 aunque débilmente se une a la subunidad 30S in vitro. En conjunto, éstos resultados demuestran que los dominios 2-3 de la proteína S1 son esenciales para la formación de complejos ternarios con mRNAs ricos en A/U en las bases +4 y +9.

El efecto de la delección de los dominios 1-2 o 1-3 en la formación de complejos ternarios pueden ser explicados por la incapacidad de estas proteínas truncadas para unirse al ribosoma ya que los primeros dos dominios S1 han sido involucrados en la unión con la subunidad 30S. Aunque la delección del dominio 3 (S1 Δ 3) anula la interacción directa con mRNAs ricos en A/U en la formación de complejos ternarios (**Figura 9A y 9D**), sería interesante demostrar que esta mutante conserva la capacidad de unirse a la subunidad 30S. Inexplicablemente, esta mutante adquiere la habilidad de unirse a mRNAs ricos en G (**Figura 11C**); sin embargo, esto no se refleja en la interacción con la subunidad 30S en la formación de complejos ternarios (**Figura 9A**). Estas diferencias se pueden explicar si se considera que todos los dominios S1 tienen la posibilidad de interactuar con el mRNA en la formación de complejos binarios, a diferencia de los dominios S1 expuestos en la superficie de la subunidad 30S para la formación de complejos ternarios. Lo anterior sugiere que la proteína S1 confiere a la subunidad 30S la habilidad de discriminar por secuencia a los mRNAs.

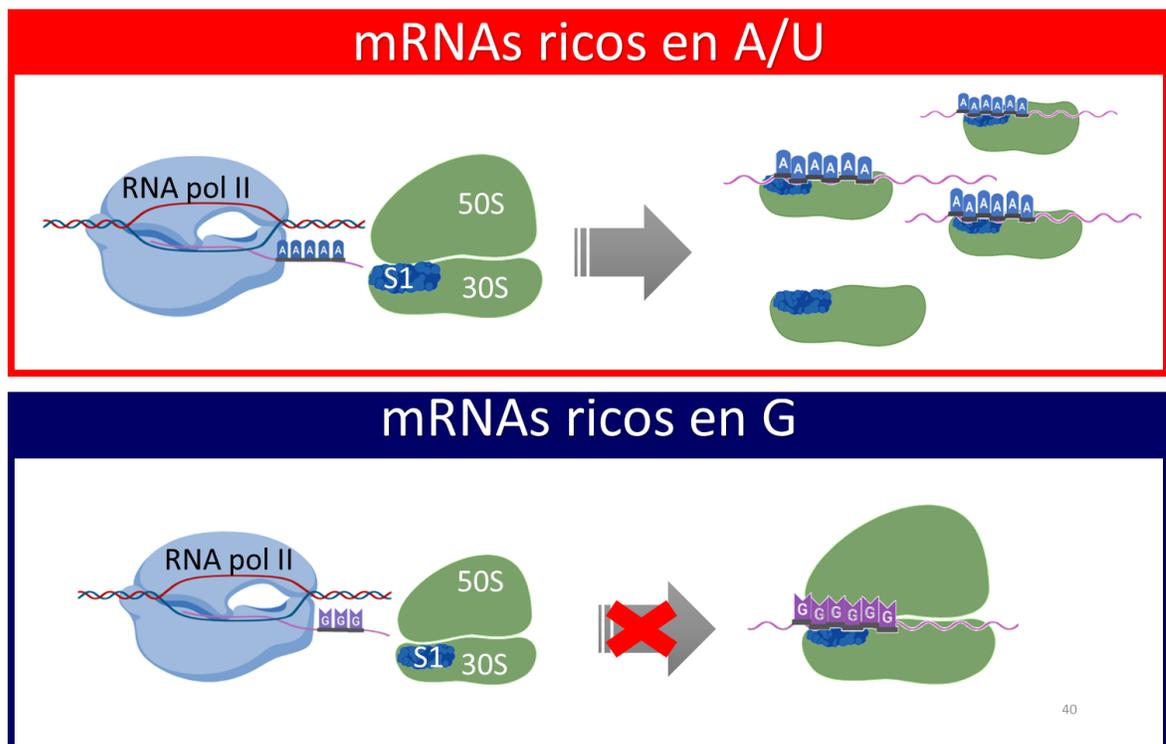
Diversos reportes han asociado la presencia de nucleótidos de adeninas o uracilos cerca del codón de inicio con una traducción mas eficiente (Brock et al., 2007; Castillo-Méndez et al., 2012; Qing, Xia, & Inouye, 2003). La esencialidad de los dominios 2 y 3 de S1 en la interacción de la subunidad 30S con mRNAs ricos en A/U sugieren que los mismos dominios sean importantes en la traducción de este tipo de mRNAs. De acuerdo a lo reportado, la traducción de variantes de *lacZ* se vio fuertemente afectada por la deficiencia de la proteína S1 en los ensayos de transcripción-traducción in vitro (**Figura 15A**) y la eficiencia de traducción de las variantes de *lacZ* (UUU > AAA > AGA > AGG) es congruente con la formación de complejos binarios de estos mensajeros con la proteína S1 y ternarios con la subunidad 30S. La ausencia del dominio 1 no afecta la síntesis de proteínas como ocurre con la pérdida de los primeros dos o tres dominios de manera similar a lo que se observa con la formación de complejos ternarios. Estos resultados indican que los dominios 2-3 también son importantes para la traducción. Se podría

argumentar que la baja traducción de *lacZ* GGG se debe a su alta estabilidad estructural ($\Delta G = -6.3$ kcal/mol). Sin embargo, la estabilidad estructural del mRNA GGG *lacZ* es comparable con la de los mRNA AAA, AGA y AGG *lacZ* (cada uno con una $\Delta G = -4.1$ kcal/mol) lo que sugiere que es la naturaleza del nucleótido la que causa las diferencias en la traducción.

Los resultados demuestran el requerimiento de los dominios 2 y 3 de la proteína S1 para la traducción de mRNAs ricos en A/U y la interacción con la subunidad 30S, sin embargo, surgió la pregunta de si estos dominios también son esenciales para la viabilidad celular. La mutante *E. coli* 5699 *AraBp-rpsA* empleada para evaluar las mutantes de S1, demuestra que solamente S1 WT y S1 Δ 1 permiten el crecimiento celular, pero no S1 Δ 1-2, S1 Δ 1-3 o S1 Δ 3 (**Figura 16A**) bajo condiciones de deficiencia de S1, indicando que los dominios 2-3 son esenciales para la viabilidad celular. Este resultado concuerda parcialmente con la esencialidad de los primeros tres dominios propuestos por Duval et al, 2013. Sin embargo, las bacterias con una copia cromosomal del gen *rpsA* con el primer dominio deletado (*rpsA* Δ 1) no fue incluido en su sistema. Ellos encontraron que *rpsA* Δ 4-6, aunque menos eficientemente, puede crecer pero no así las mutantes *rpsA* Δ 2-6 y *rpsA* Δ 3-6. Una mutante S1 sin el dominio 2 podría retener la actividad considerando que los dominios 1-2 permiten la unión de la proteína S1 al ribosoma y los dominios 3-5 la interacción con RNA de cadena sencilla. Aunque en este trabajo se obtuvo la mutante *rpsA* Δ 2 y su mRNA fue detectado, no fue posible la detección de la proteína S1 Δ 2 indicando que la proteína puede ser rápidamente degradada (**Figura 7G**). Nuestros resultados en conjunto con los de Duval indican que los dominios 4-6 no son necesarios y solamente los dominios 2 y 3 son esenciales para la viabilidad celular. En resumen, los datos presentados en este trabajo demuestran que los dominios 2 y 3 son críticos para la interacción mRNA-30S, para la traducción de mRNAs ricos en A/U (AAA y UUU *lacZ*) y para la viabilidad celular, sin embargo, un papel marginal o sinérgico para los dominios 1, 4, 5 y 6 no debe ser descartado.

9. CONCLUSIONES

- La proteína ribosomal S1 interacciona con mayor afinidad con mRNAs poco estructurados que poseen secuencias ricas en adeninas y uracilos río abajo del codón de inicio en comparación con aquellos mRNAs que poseen guaninas, esta capacidad de discriminar entre los mRNAs recae principalmente en el dominio 3 de la proteína S1.
- El aumento en la afinidad del ribosoma con mRNAs poco estructurados ricos en A/U río abajo del codón de inicio, se debe principalmente a los dominios 2 y 3, y no a la ausencia de estructuras secundarias.
- La traducción de mRNAs poco estructurados ricos en A/U río abajo del codón de inicio, es debido a que los dominios 2 y 3 favorecen la formación de complejos ternarios.



10. REFERENCIAS

1. Boni, I. V., Artamonova, V. S., Tzareva, N. V., & Dreyfus, M. (2001). Non-canonical mechanism for translational control in bacteria: Synthesis of ribosomal protein S1. *EMBO Journal*, *20*(15), 4222–4232. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.15.4222>
2. Boni, I. V., Lsaeva, D. M., Musychenko, M. L., & Tzareva, N. V. (1991). Ribosome-messenger recognition: mRNA target sites for ribosomal protein S1. *Nucleic Acids Research*, *19*(1), 155–162. <https://doi.org/10.1093/nar/19.1.155>
3. Briani, F., Curti, S., Rossi, F., Carzaniga, T., Mauri, P., & Deho, G. (2008). Polynucleotide phosphorylase hinders mRNA degradation upon ribosomal protein S1 overexpression in *Escherichia coli*. *RNA (New York, N.Y.)*, *14*(11), 2417–2429. <https://doi.org/10.1261/rna.1123908>
4. Brock, J. E., Paz, R. L., Cottle, P., & Janssen, G. R. (2007). Naturally occurring adenines within mRNA coding sequences affect ribosome binding and expression in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *189*(2), 501–510. <https://doi.org/10.1128/JB.01356-06>
5. Bycroft, M., Hubbard, T. J., Proctor, M., Freund, S. M., & Murzin, A. G. (1997). The solution structure of the S1 RNA binding domain: a member of an ancient nucleic acid-binding fold. *Cell*, *88*(2), 235–242.
6. Castillo-Méndez, M. A., Jacinto-Loeza, E., Olivares-Trejo, J. J., Guarneros-Peña, G., & Hernández-Sánchez, J. (2012). Adenine-containing codons enhance protein synthesis by promoting mRNA binding to ribosomal 30S subunits provided that specific tRNAs are not exhausted. *Biochimie*, *94*(3), 662–672. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.09.019>
7. Dallas, A., & Noller, H. F. (2001). Interaction of translation initiation factor 3 with the 30S ribosomal subunit. *Molecular Cell*, *8*(4), 855–864. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00356-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00356-2)
8. De Smit, M. H., & Duin, J. Van. (1990). Control of Prokaryotic Translational Initiation by mRNA Secondary Structure. *Progress in Nucleic Acid Research*

- and Molecular Biology*, 38(C), 1–35. [https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(08\)60707-2](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(08)60707-2)
9. De Smit, M. H., & Van Duin, J. (1994). Control of translation by mRNA secondary structure in *Escherichia coli*. A quantitative analysis of literature data. *Journal of Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1714>
 10. De Smit, M. H., & Van Duin, J. (2003). Translational standby sites: How ribosomes may deal with the rapid folding kinetics of mRNA. *Journal of Molecular Biology*, 331(4), 737–743. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00809-X](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00809-X)
 11. Del Campo, C., Bartholomäus, A., Fedyunin, I., & Ignatova, Z. (2015). Secondary Structure across the Bacterial Transcriptome Reveals Versatile Roles in mRNA Regulation and Function. *PLoS Genetics*, 11(10), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005613>
 12. Deryusheva, E. I., Machulin, A. V., Selivanova, O. M., & Serdyuk, I. N. (2010). The S1 ribosomal protein family contains a unique conservative domain. *Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1134/S0026893310040205>
 13. Duval, M., Korepanov, A., Fuchsbauer, O., Fechter, P., Haller, A., Fabbretti, A., ... Marzi, S. (2013). *Escherichia coli* Ribosomal Protein S1 Unfolds Structured mRNAs Onto the Ribosome for Active Translation Initiation. *PLoS Biology*, 11(12), 12–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001731>
 14. Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R. Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A., & Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, 6(5), 343–345. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>
 15. Gualerzi, C. O., & Pon, C. L. (1990). Initiation of mRNA translation in prokaryotes. *Biochemistry*, 29(25), 5881–5889. <https://doi.org/10.1021/bi00477a001>
 16. Guthrie, C., & Nomura, M. (1968). Initiation of protein synthesis: A critical test of the 30S subunit model. *Nature*, 219(5151), 232–235.

<https://doi.org/10.1038/219232a0>

17. Hartz, D., Mcpheeters, D. S., & Gold, L. (1989). Selection of the initiator tRNA by *Escherichia coli* initiation factors, *Genes Dev.* 1899–1912.
18. Hernández-Sánchez, J., Valadez, J. G., Herrera, J. V., Ontiveros, C., & Guarneros, G. (1998). λ bar minigene-mediated inhibition of protein synthesis involves accumulation of peptidyl-tRNA and starvation for tRNA. *EMBO Journal*, 17(13), 3758–3765. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.13.3758>
19. Holder, J. W., & Lingrel, J. B. (1975). Determination of Secondary Structure in Rabbit Globin Messenger RNA by Thermal Denaturation. *Biochemistry*, 14(19), 4209–4215. <https://doi.org/10.1021/bi00690a009>
20. Kennell, D., & Riezman, H. (1977). Transcription and translation initiation frequencies of the *Escherichia coli* lac operon. *Journal of Molecular Biology*, 114(1), 1–21. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(77\)90279-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(77)90279-0)
21. Kitakawa, M., & Isono, K. (1982). An amber mutation in the gene rpsA for ribosomal protein S1 in *Escherichia coli*. *MGG Molecular & General Genetics*, 185(3), 445–447. <https://doi.org/10.1007/BF00334137>
22. Klaholz, B. P., Pape, T., Zavialov, A. V., Myasnikov, A. G., Orlova, E. V., Vestergaard, B., ... Van Heel, M. (2003). Structure of the *Escherichia coli* ribosomal termination complex with release factor 2. *Nature*, 421(6918), 90–94. <https://doi.org/10.1038/nature01225>
23. Komarova, A. V., Tchufistova, L. S., Dreyfus, M., & Boni, I. V. (2005). AU-rich sequences within 5' untranslated leaders enhance translation and stabilize mRNA in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 187(4), 1344–1349. <https://doi.org/10.1128/JB.187.4.1344-1349.2005>
24. Lin, G. G., & Scott, J. G. (2012). NUCLEIC ACID RECOGNITION BY OB-FOLD PROTEINS Douglas, 100(2), 130–134. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.02.012>. Investigations
25. McCarthy, J. E. G., & Brimacombe, R. (1994). Prokaryotic translation: the interactive pathway leading to initiation. *Trends in Genetics*, 10(11), 402–407. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(94\)90057-4](https://doi.org/10.1016/0168-9525(94)90057-4)
26. McGinness, K. E., & 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 U S A*, 101(37), 13454–13459. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405521101>
27. Moazed, D., Samaha, R. R., Gualerzi, C., & Noller, H. F. (1995). Specific protection of 16 S rRNA by translational initiation factors. *Journal of Molecular Biology*, 248(2), 207–210. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(95\)80042-5](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(95)80042-5)
28. Moll, I., Huber, M., Grill, S., Sairafi, P., Mueller, F., Brimacombe, R., ... Bläsi, U. (2001). Evidence against an interaction between the mRNA downstream box and 16S rRNA in translation initiation. *Journal of Bacteriology*, 183(11), 3499–3505. <https://doi.org/10.1128/JB.183.11.3499-3505.2001>
29. Moore, P. B. (2002). The Structural Basis of Large Ribosomal Subunit Function. *Annual Review of Biochemistry*, 813–850. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135450>
30. Murzin, A. G. (1993). OB(oligonucleotide/oligosaccharide binding)-fold: *October*, 12(3), 861–867.
31. Nivinskas, R., Malys, N., Klaus, V., Vaiškunaite, R., & Gineikiene, E. (1999). Post-transcriptional control of bacteriophage T4 gene 25 expression: mRNA secondary structure that enhances translational initiation. *Journal of Molecular Biology*, 288(3), 291–304. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.2695>
32. OKADA, T., WOWER, I. K., WOWER, J., ZWIEB, C. W., & KIMURA, M. (2004). Contribution of the Second OB Fold of Ribosomal Protein S1 from *Escherichia coli* to the Recognition of TmRNA. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 68(11), 2319–2325. <https://doi.org/10.1271/bbb.68.2319>
33. Pon, C. L., & Gualerzi, C. O. (1986). Mechanism of translational initiation in prokaryotes. *FEBS Letters*, 195(1–2), 215–219. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(86\)81488-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(86)81488-0)
34. Qing, G., Xia, B., & Inouye, M. (2003). Enhancement of translation initiation by A/T-rich sequences downstream of the initiation codon in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 6(3–4), 133–144. <https://doi.org/10.1159/000077244>
35. RajBhandary, U. L., & Chow, C. M. (1995). Initiator tRNAs and initiation of

- protein synthesis. *TRNA: Structure, Biosynthesis, and Function*, American Society for Microbiology, Washington, (May), 511–528.
36. Rodnina, M. V., Pape, T., Fricke, R., Kuhn, L., & Wintermeyer, W. (1996). Initial binding of the elongation factor Tu-GTP-aminoacyl-tRNA complex preceding codon recognition on the ribosome. *Journal of Biological Chemistry*, 271(2), 646–652. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.2.646>
37. Rodnina, M. V., & Wintermeyer, W. (2003). Peptide bond formation on the ribosome: Structure and mechanism. *Current Opinion in Structural Biology*, 13(3), 334–340. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(03\)00065-4](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(03)00065-4)
38. Rodnina, M. V, Fricke, R., Kuhn, L., & Wintermeyer1, W. (1995). Codon-dependent conformational change of elongation factor Tu preceding GTP hydrolysis on the ribosome. *The EMBO Journal*, 14(11), 2613–2619. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC398375/pdf/emboj00035-0223.pdf>
39. Schneider, T. D., Stormo, G. D., Gold, L., & Ehrenfeucht, A. (1986). Information content of binding sites on nucleotide sequences. *Journal of Molecular Biology*, 188(3), 415–431. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90165-8](https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90165-8)
40. Shine, J., & Dalgarno, L. (1974). The 3'-terminal sequence of Escherichia coli 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71(4), 1342–1346.
41. Stark, H., Rodnina, M. V, Rinke-appel, J., & Heel, M. Van. (1997). 389403a0, 1–4. Retrieved from <papers://c33b182f-cf88-47e8-a9c5-ad67b5626483/Paper/p1554>
42. Steitz, J. A. (1969). Polypeptide chain initiation: Nucleotide sequences of the three ribosomal binding sites in bacteriophage R17 RNA. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/224957a0>
43. Studer, S. M., & Joseph, S. (2006). Unfolding of mRNA Secondary Structure by the Bacterial Translation Initiation Complex. *Molecular Cell*, 22(1), 105–

115. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.02.014>
44. Sundari, R. M., Stringer, E. A., Schulman, L. H., & Maitra, U. (1976). Interaction of bacterial initiation factor 2 with initiator tRNA. *Journal of Biological Chemistry*.
45. Sørensen, M. A., Fricke, J., & Pedersen, S. (1998). Ribosomal Protein S1 is Required for Translation of Most , If Not All , Natural mRNAs in *Escherichia coli* in Vivo, 1.
46. Suryanarayana, T., & Subramanian, A. R. (1984). Function of the repeating homologous sequences in nucleic acid binding domain of ribosomal protein S1. *Biochemistry*, 23(6), 1047–1051.
47. VFreistroffer, D., YuPavlov, M., MacDougall, J., HBuckingham, R., & Måns Ehrenberg, and. (1997). Release factor RF3 in *E.coli* accelerates the dissociation of release factors RF1 and RF2 from the ribosome in a GTP-dependent manner of RF3 on peptide release from the ribosome (Capecchi 1995). The expected stimulatory effect of GTP on poly. *The EMBO Journal*, 16(13), 4126–4133. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1170035/pdf/004126.pdf>
48. Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3406–3415. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg595>

11. ANEXOS

Domains two and three of *Escherichia coli* ribosomal S1 protein confers 30S subunits a high affinity for downstream A/U-rich mRNAs

Received August 16, 2018; accepted January 14, 2019; published online January 21, 2019

Juan C. Cifuentes-Goches¹,
Lizbeth Hernández-Ancheyta^{1,2},
Gabriel Guarneros¹, N. Oviedo² and
Javier Hernández-Sánchez^{1,*}

¹Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Av. IPN, No. 2508, San Pedro Zacatenco, 07360 Mexico City, México and ²Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Centro Médico Nacional, La Raza, Mexico City, México

*Javier Hernández-Sánchez, Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, México. Tel: +52-55-57473800 (Ext 5336, 5323), Fax: 52 (55)57473931, email: javierh@cinvestav.mx

S1, a multi-domain ribosomal protein associated with the 30S subunit, is essential for translation initiation. S1 binds with high affinity to single-stranded mRNA containing A/U-rich patches upstream of the start codon. It was previously reported that domains 1–3 of S1 protein play a role in the docking and unfolding of structured mRNAs to the ribosome. Moreover, S1-deficient 30S subunits are still able to bind to low structured mRNAs. However, mRNAs containing A/U-rich patches in the early base positions after start codon enhance protein synthesis and mRNA binding to the ribosome, which suggests that S1 is also able to interact with these A/U-rich regions. To evaluate the essentiality of S1 domains in the binding to low structured mRNAs containing A/U/G nucleotides after the start codon as well as their role in translation and cell viability, S1 protein deletion variants were generated. We show that S1 domain 3 is necessary to discriminate these mRNAs according to the nucleotide nature since its absence abrogated S1 binding to A/U-rich mRNAs and allowed binding to G-rich mRNAs. Interestingly, domains 2 and 3 were required for the binding of mRNAs containing A/U-rich sequences after the start codon to 30S, *in vitro* translation and cell viability.

Keywords: A/U/G-rich mRNAs; ribosomal protein S1; S1 domains.

Translation initiation can be regulated by several mechanisms, allowing the cell to express proteins from certain mRNAs only when needed. In bacteria, translation starts with the positioning and binding of the 30S ribosomal subunit to the mRNA ribosome binding site (RBS). RBS, which contains a Shine–Dalgarno sequence (SD) close to the translational start codon (usually AUG or GUG) (1, 2), allows ternary complex formation

among mRNA, fMet-tRNA^{fMet} and the 30S ribosomal subunit. A strong RBS results in frequent mRNA–ribosome binding, thus protecting the mRNA from degradation and providing a more abundant full-length message and increased translation (3). Translation signals and structural features within the RBS are major determinants for promoting protein synthesis from mRNA. Structure elements in the 5'UTR of mRNAs play an essential role in the control of translation initiation (4, 5). These structural motifs in the 5'UTRs represent a kinetic barrier in the binding of mRNA to the 30S since the ribosome must first overcome the thermodynamic barrier of mRNA secondary structure to form a stable mRNA–30S complex (6).

Several studies reveal that binding of structured mRNAs to 30S occurs in a two-step process, in the first step the mRNA docks into 30S subunit through r-protein S1 (4, 6, 7). Indeed, a study demonstrated that domains 1–3 of the r-protein S1 are essential to promote the formation of initiation complexes with structured mRNAs endowing the 30S subunit with an RNA chaperone activity while domains 4–6 are not essential for both the binding activity and cell survival (4). However, domains 3–5 interact with ssRNA (single-stranded RNA) and show high affinity for A/U-rich sequences (8, 9), which are frequently found upstream of the SD of *Escherichia coli* mRNAs. In addition, domains 1 and 2 have no detectable RNA-binding activity but rather allow the binding of protein S1 to the ribosome. Several reports have demonstrated that A/U-rich sequences stimulate translation when placed either upstream of the SD sequence (10) or downstream of the start codon (11–13). In fact, A/U-rich sequences upstream of the SD sequence represent S1 binding sites in bacterial mRNAs (14) however, whether A/U-rich sequences downstream of the start codon act as an S1 binding site has not been elucidated. A suggested explanation for these findings is that A/U-rich regions keep the RBS unstructured (15) and thus, facilitate the ribosome binding through the r-protein S1. Indeed, a high percentage of *E. coli* mRNAs harbour adenine nucleotides downstream of the initiation codon, mainly in the second and third codon positions (16). In addition to the low structural stability, the nature of the downstream nucleotides should also contribute to mRNA–ribosome interaction leading to the hypothesis that A/U-rich sequences in the base positions 4–9 (A/U-rich mRNAs), would also be target regions for the r-protein S1.

S1 protein is a member of the OB-fold (oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold) family which has a high affinity for single-stranded RNAs. Structurally,

S1 contains six contiguous OB-fold domains connected by linkers which may confer S1 the flexibility necessary for docking mRNA transcripts to the ribosome (17). The OB-fold is a small structural motif (70–150 amino acids) originally named for its oligonucleotide/oligosaccharide binding properties, consisting of two three-stranded antiparallel β -sheets (18). In addition, the presence of multiple S1 OB-fold domains could participate differentially in the affinity for A- or U-rich sequences making RNA–S1 interaction more versatile. However, several reports have suggested that domains 3–6 show an affinity for single-stranded RNA (8, 19). In contrast, a bioinformatics analysis demonstrated that the third domain of *Escherichia coli* S1 protein has a highly conserved folded structure homologous to S1 domain from other proteins (20), which could suggest strongly that this domain is essential for S1 protein function.

To determine the role of the first three domains of S1 protein in the interaction with mRNAs containing adenines, uracils or guanines at positions 4–9, we used *E. coli* wild type S1 (WT S1) or variants lacking domains: 1 (S1 Δ 1), 1 and 2 (S1 Δ 1–2), 1–3 (S1 Δ 1–3) or 3 (S1 Δ 3). Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) revealed that S1 bound strongly to A-rich followed by U-rich mRNAs, whereas no binding to G-rich mRNAs was observed. In addition, domain 3 of the r-protein S1 played a pivotal role in distinguishing these mRNAs, since its deletion abrogated the binding to A/U-rich mRNAs and instead allowed the interaction with G-rich mRNAs. Domains 2 and 3 were necessary for the interaction of A/U-rich mRNAs with 30S subunits in the formation of ternary complexes. These domains were also necessary for the *in vitro* translation of A/U-rich mRNAs and for cell viability.

Materials and Methods

Strains and growth conditions

Escherichia coli strains and plasmids used in this study are listed in Table I. Bacterial cultures were grown at 37°C in Luria–Bertani (LB) medium containing 100 μ g/ml of ampicillin.

Plasmid constructs

lacZ derivatives containing a variable composition of adenines, uracils or guanines at codons 2 and 3 (Table I) were constructed by site-directed mutagenesis from *placZ*, which is a pKQV4 derivative plasmid containing *EcoRI*/*HinDIII lacZ* gene insert from *plexlacZ* (13), using complementary oligonucleotides. For each construct, only the forward 5' oligonucleotide is shown in Table I. For example 5'-GGA AACAGAATTCATGAAAAACCCGTCGTTTTACAACGTCGTG-3' and 5'-CACGACGTTGTAAAAACGACGGGTTTTTCATG AATTCTGTTCC-3' were used to obtain the *lacZ* construct with adenines at positions 2 and 3 (ATGAAAAAA) and so forth. All plasmid constructs were transformed into the indicated *E. coli* strains by the CaCl_2 method, and proteins were expressed from the isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)-inducible Ptac promoter.

Cloning of *E. coli rplD* and *rpsA* genes

Genomic DNA was prepared from *E. coli* C600 cells by standard methods. *rpsA* and *rplD* genes were PCR amplified from genomic DNA using oligonucleotide primers *rpsAS1f* (5'-GCGg aattCCATGACTGAATCTTTTGCTCAAC-3'), *rpsAS1r* (5'-GCGg gatccTTACTCGCCTTTAGCTGCTTT-3') and *rplDL4f* (5'-CGg aattCCGATGGAATTAGTATTG-3') and *rplDL4r* (5'-CGggatccCGTCATGCCAGCATCTCC-3'), respectively. *EcoRI* and *BamHI*

restriction sites are indicated in lower case letters, and the translation initiation site is bolded. PCR products of the expected size (1,674 Bp and 563 Bp) were gel purified and cloned in pJET using the CloneJET™ PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, USA). *rpsA* and *rplD* genes were subcloned into pProEx-1. Candidates were analysed by sequencing using BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA).

Cloning and purification of *rpsA* mutants

Mutants of *rpsA* gene were PCR amplified from pProEx-*rpsA* construction using oligonucleotide primers showed in Table II and then cloned in pJET using the CloneJET™ PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, USA). The fragments of the *rpsA* mutants were restricted using *EcoRI* and *BamHI* and subcloned into pProEx-1, which adds an N-terminal His-6-tag. Candidates were analysed by sequencing using BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA). The constructs containing the *rpsA* mutants were transformed into *E. coli* DH5 α cells and grown overnight in LB medium plus 100 μ g/ml of ampicillin. Cells were diluted 100-fold into fresh medium, grown to an OD₆₀₀ of 0.6–0.8, and induced with IPTG (1 mM final concentration) for 6 h. Cells were harvested by centrifugation and lysed by passage through a chilled French press at 8,000 p.s.i. in lysis buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, 5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 5% glycerol, 1 mM DTT, 0.5% Triton X-100). The lysate was incubated for 30 min at 4°C with 10 units of DNAse I (DN25, Sigma-Aldrich, USA) and 4 μ g/ μ l RNase A. The lysate was clarified by centrifugation at 30,000 g for 30 min. After centrifugation, His-6-tagged proteins in the supernatant were purified by Ni–nitrilotriacetic acid agarose (Qiagen, Germany) chromatography. Protein purity was judged by SDS–PAGE analysis.

Cloning and purification of *rpsA* Δ 3

Mutant *rpsA* Δ 3 was constructed according to a previously method reported (21). Briefly, domains 1 and 2 and 4–6 were PCR amplified from pProEx-*rpsA* with the oligonucleotide primers showed in Table II. A mix of the resulting PCR was used as a template to amplify *rpsA* Δ 3 using primers *rpsAS1f* and *rpsAS1r*, and finally, it was cloned in pJET using the CloneJET™ PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, USA). pJET*rpsA* Δ 3 was restricted using *EcoRI* and *BamHI* and subcloned into pProEx-1. Candidates were analysed by sequencing using BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA). The construct containing the *rpsA* Δ 3 was transformed into *E. coli* DH5 α cells and grown overnight in LB medium plus 100 μ g/ml of ampicillin. Cells were diluted 100-fold into fresh medium, grown to an OD₆₀₀ of 0.6–0.8, and induced with IPTG (1 mM final concentration) for 4 h.

Antibodies and immunoblotting

Wistar rats were immunized with recombinant S1 protein (100 μ g) diluted in 10 mM Tris-HCl pH 8 and Freund's incomplete adjuvant (F5506, Sigma-Aldrich) and challenged again 30 days later. Ten days after the last immunization anti-S1 antibody titres were determined by ELISA. Since L4 protein purity was lower than 60%, it was separated by 10% SDS–PAGE and transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane. The His-tagged L4 was immunodetected with anti-histidine antibodies, and the band corresponding to L4 was excised and dissolved in 100% DMSO. The dissolved membrane was mixed with Freund's incomplete adjuvant, and rats were immunized with the resulting emulsion as described above for S1.

S1 and L4 expression levels were analysed by western blotting. Briefly, membranes were blocked with 15% non-fat dried milk in PBS-T (phosphate-buffered saline, 0.1% Tween 20) for S1 detection, or with 7% non-fat dried milk in TBS-T (Tris-buffered saline, 0.1% Tween 20) for L4 detection overnight and then incubated 2 h with immune serum diluted in blocking buffer (1:20,000 for S1 or 1:500 for L4). Finally, membranes were incubated 2 h with a goat Anti-Rat IgG Polyclonal Antibody, Horseradish Peroxidase conjugated (eBioscience Cat# 18-4818-82, 1:10,000 dilution) in blocking buffer. The peroxidase was developed using Enhanced chemiluminescence western blotting detection reagents (GE Healthcare Buckinghamshire, UK), and the autoradiographs were analysed by ImageJ software to quantify the relative expression levels as electronic density (pixels).

Table I. Strains, plasmids and *lacZ* derivatives

Strains or plasmids	Genotype and relevant characteristics	Source
C-1a	Parental	(24)
5699	<i>ArapB-rpsA</i>	(24)
DH5 α	F ⁻ , ϕ 80d, <i>lacZ</i> Δ M15, <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r_k</i> ⁻ , <i>mk</i> ⁺), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>d</i> ⁻ , <i>gyrA96</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>), U169	
C600	F ⁻ , <i>thi-1</i> , <i>thr-1</i> , <i>leuB6</i> , <i>lacY1</i> , <i>tonA21</i> , <i>supE44</i> , λ ⁻	
Plasmids	Description	
pProEx-1	Blac <i>lacIQ</i> pTrc	
pJET 1.2 blunt	Blac pT7	
pKQV4	Blac <i>lacIQ</i> pTrc	
T7 <i>lacZ</i> 5'	5'-CTAATACGACTCACTATAGGTGAGCGGATAAC AATTTACACAGGAAACAG-3'	Used to generate <i>lacZ</i> DNA templates for <i>in vitro</i> transcription
<i>LacZ</i> reverse	5'-GCTGGCGTAATAGCGAAG-3'	Used to generate <i>lacZ</i> DNA templates for <i>in vitro</i> transcription
<i>placZwt</i>	pKQV4 containing <i>EcoRI</i> / <i>HinDIII</i> <i>lacZ</i> gene insert from <i>plexlacZ</i>	(13)
<i>placZ23AAA</i>	Derivate of <i>placZwt</i> with ACC2AAA GAT3AAA substitutions in <i>lacZ</i>	(13)
<i>placZ23GGG</i>	A derivate of <i>placZwt</i> with ACC2GGG GAT3GGG substitutions in <i>lacZ</i>	(13)
<i>placZ23AGG</i>	A derivate of <i>placZwt</i> with ACC2AGG GAT3AGG substitutions in <i>lacZ</i>	(13)
<i>placZ23AGA</i>	A derivate of <i>placZwt</i> with ACC2 AGA GAT3 AGA substitutions in <i>lacZ</i>	(13)
<i>placZ23TTT</i>	A derivate of <i>placZwt</i> with ACC2TTT GAT3TTT substitutions in <i>lacZ</i>	This work

Table II. Oligonucleotide characteristics

Oligonucleotides	Sequence 5'-3'	Characteristics
ForS1 Δ 1	GCGGAATTCCTGAGAAAGCTAAACG	Deletion of domain 1 and <i>EcoRI</i> site
ForS1 Δ 1-2	GCGGAATTCCTGAGAAAGCTAAACG	Deletion of domains 1 and 2 and <i>EcoRI</i> site
ForS1 Δ 1-3	GCGGAATTCCTGAGAAAGCTAAACG	Deletion of domains 1-3 and <i>EcoRI</i> site
ForS1 Δ 3	CTGCTGGAAAACCTGCAGGAAGGCGAAGATCCCGTGGGTAGCTA	Deletion of domain 3
RevS1 Δ 3	TAGTACCCACGGATCTTCGCCTTCTGCAGGTTTCCAGCAG	Deletion of domain 3
RevS1	GCGGATCCCTACTCGCCTTTAGCTGCTTT	Used to generate DNA templates of the S1 truncated forms (S1 Δ 1, S1 Δ 1-2 and S1 Δ 1-3)
ForS1 Δ 2	GTGAAACTCTGCTGTCCTGGAAGTTAAAGGTATC	Deletion of domain 2
RevS1 Δ 2	GATACCTTAACTTCCAGGACAGCAGAGTTTCAC	Deletion of domain 2

Native gel migration and thermal melting experiments

mRNAs (100 mM) each were analysed by 15% PAGE (19:1) containing 40 mM Tris-acetate and 12 mM MgCl₂ (22) and visualized by UV shadowing with a silica gel matrix (Z193291, Sigma-Aldrich, USA). Thermal melting experiments were performed on a Beckman Coulter DU-640 spectrophotometer at a temperature interval of 0-95°C, and absorbance readings (λ 260 nm) were taken every 5 min. Before being placed in a Beckman Peltier Temperature Control, 20 μ l oil mineral was added on top of the 1-cm path length spectrophotometer cells containing 10 mM of mRNA solution, and the melting temperature (T_m) was taken as the temperature at which the absorbance had risen half-way between its initial and final absorbance (23). The values were analysed using Meltwin Software.

Purification of WT and S1-deficient 30S ribosomal subunits

Escherichia coli C600 cells were grown in LB medium to an OD₆₀₀ of 1.0. Cells were rapidly cooled, harvested by centrifugation and washed with 1/100 volume of buffer A [10 mM Tris-acetate, pH 7.8, 10.5 mM Mg(Ac)₂, 60 mM NH₄Cl, 6 mM 2-mercaptoethanol]. Cells were harvested by centrifugation at 6,000 g at 4°C for 15 min. The wet weight of the pellet was determined and was then resuspended in buffer A supplemented with 0.5 mM PMSF, at a rate of 1.3 ml per gram of wet weight. Cells were lysed by passage through a chilled French press at 10,000 p.s.i. Cell extract was incubated in buffer A with DNase I (DN25, Sigma-Aldrich, USA) on ice for

30 min and the lysate was clarified by centrifugation at 30,000 g for 45 min. Then (NH₄)₂SO₄ was added to the S30 supernatant to a final concentration of 1.5 M and centrifuged to 10,000 rpm for 15 min at 4°C. The S30 supernatant was centrifuged at 150,000 g for 12 h at 4°C in a Beckman SW40 Ti rotor. The pellet of ribosomes (10 units A₂₆₀) was first incubated 10 min at 37°C in buffer B containing 20 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 M NH₄Cl, 10 mM Mg(Ac)₂ and 5 mM 2-mercaptoethanol. The samples were loaded on a polyU-sepharose 4B column pre-equilibrated with buffer B to retain r-protein S1. The S1-deficient 70S particles were eluted with buffer B (10 ml). Fractions containing the S1-deficient 70S were pooled and dialysed overnight in buffer C containing 10 mM Tris-acetate pH 7.8, Mg(Ac)₂, 60 mM K(Ac). The deficiency of S1 in the 70S preparation was verified by western blotting using anti-S1 antibodies and anti-L4 as a loading control (Supplementary Fig. S1A). 30 units A₂₆₀ of 70S preparation were loaded over a 5-20% (w/v) linear sucrose gradient made up in buffer C and centrifuged at 27,000 rpm for 3.5 h at 4°C in a Beckman SW28 rotor (Supplementary Fig. S1B and C). The 30S subunits were recovered from the corresponding peak by centrifuging at 200,000 g for 12 h. 30S subunits were resuspended in storage buffer (10 mM Tris-acetate pH 7.8, Mg(Ac)₂, 60 mM K(Ac)).

Filter binding assays

lacZ derivative mRNAs used in the ternary complex formation assays were generated by *in vitro* transcription. To this aim, DNA

templates were prepared by PCR amplification from *lacZ* plasmid constructs containing wild type (WT) or *lacZ* derivatives harbouring adenine, uracil and/or guanine codons at positions 2 and 3 (13) using oligonucleotide primers T7 *lacZ* and *lacZ* reverse (Table I). The amplified DNA fragments, contained the T7 promoter, *lacZ* leader, and up to 100 bases downstream of ATG codon. mRNAs were synthesized in a 5 ml reaction mixture containing 5 mM dithiothreitol (DTT), each nucleoside triphosphate at a concentration of 2 mM, 14 mM MgCl₂, 10 µl T7 RNA polymerase buffer (New England Biolabs, UK), 0.05 mg template DNA, 0.35 ml T7 RNA polymerase (500U/ml; New England Biolabs, UK) and 2.3 µl [α -³²P] CTP. *lacZ* derivatives were isolated by phenol–chloroform extraction. Filter binding reaction mixtures (20 µl) containing radiolabelled mRNA (44 nM), S1-deficient or wild type 30S (WT 30S) ribosomal subunits (440 nM) and tRNA^{Met} (880 nM) (at a 1:10:20 ratio), as well as SB 1× [100 mM NH₄Cl, 10 mM Tris-acetate (pH 7.5), 10 mM Mg(Ac)₂, 1 mM DTT], were incubated for 1 h at 37°C. Where indicated, S1-deficient 30S subunits prepared as described above were used. The reaction mixtures were then diluted to 500 µl with chilled SB 1× and filtered through nitrocellulose membranes (pore size, 0.45 µm) in a manifold (Millipore, USA). Membranes were washed three times with SB 1× and dried at room temperature; samples were cross linked to the membranes by UV light (UVC 500; Hoefer). The amount of complex bound to the membrane was determined with a Typhoon PhosphorImager. Standard curves were used to convert pixel values to picomoles, and data were expressed in picomoles of bound mRNA.

Gel retardation assays

WT and truncated forms of S1 were pre-incubated for 30 min at 37°C in S1 buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NH₄Cl, 1 mM DTT, 5% glycerol, 0.7 ng/µl tRNA, 100 µg/ml BSA). Increasing concentrations of S1 (WT or deletion mutants) were incubated for 15 min at 37°C with 150 fmol of renatured 5' end-labelled mRNA in 12 µl of the S1 buffer. mRNA–S1 complex was analysed on 6% native polyacrylamide gels (acrylamide/bisacrylamide 80:1, TBE 1×, glycerol 2.5%). After electrophoresis, wet gels were dried and then visualized by autoradiography.

S1-deficient S30 extract

The S1-deficient S30 extract was prepared from *E. coli* 5699 *ArapB-rpsA* S1 conditional mutant cells. To obtain a partly S1-deficient S30 extract but translationally active, cell growth and S1 protein level were monitored at different culture times under not permissive conditions (Supplementary Fig. S4A and B). S30 extracts were prepared from 90-min culture cells where there was a reduction of S1 of about 60%. However, the cells showed translational activity as indicated by the pulse labelling of proteins at this time (Supplementary Fig. S4C and D). The *in vitro* transcription–translation reaction was standardized by priming the reaction with the AAA *lacZ* DNA (500 ng) and testing two concentrations of S1 protein (6.8 and 13.6 µM, which corresponds to 1 and 2 mol concerning S30 concentration, respectively) (Supplementary Fig. S4E). Three incubation times (10, 15 and 30 min) were also tested (Supplementary Fig. S4F). No translation was observed when no DNA was added even when the reaction was supplemented with WT S1 (13.6 µM) (Supplementary Fig. S4E and F).

Cell-free transcription–translation assay

The translation from *lacZ* derivatives was evaluated employing S1-deficient S30 crude extracts, which were obtained from the S1 conditional mutant *E. coli* 5699 *ArapB-rpsA* cells (24). *In vitro* reactions (30 µl) were prepared with 500 ng of plasmid DNA in TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA), 11 µl of premix [87.5 mM Tris-acetate pH 8.0, 476 mM potassium glutamate, 75 mM NH₄(Ac), 5 mM DTT, 20 mM Mg(Ac)₂, 1.25 mM each of 20 amino acids, 5 mM ATP, 1.25 mM each of CTP, UTP, GTP, 50 mM phosphoenol pyruvate, 250 mg/ml *E. coli* tRNA, 87.5 mg/ml polyethylene glycol (8000 Mr), 2.5 mM cAMP, 50 mg/ml folic acid] and 7 µl of S30 prepared as previously described in (25).

Radiolabelled proteins were synthesized using a premix lacking methionine. [³⁵S]-methionine (10 µCi) were then added to a final concentration of 2×10^{-11} M. Protein was precipitated from 30 µl reaction by addition of 120 µl of acetone followed by centrifugation. Protein pellets were dried and resuspended in loading buffer before SDS–PAGE. After electrophoresis, wet gels were dried and then

visualized by autoradiography. Dried gels were rehydrated and silver stained. Autoradiographies were analysed by ImageJ software to quantify the expression levels as electronic density values (pixels) and plotted as fold changes the WT expression.

Metabolic labelling

Escherichia coli 5699 *ArapB-rpsA* cells were grown at 37°C in M9 minimal medium supplemented with thiamin, biotin and induced with arabinose (see above) for 90 or 120 min. Cells were pulse labelled for 10 min with 30 mCi of [³⁵S]-methionine (1,000 Ci/mmol), and the incorporation was stopped with an excess (10 mM) of cold methionine. The samples were centrifuged for 10 min at 14,000 *g* and 4°C. The pellets were resuspended in 100 µl of lysis buffer (30 mM Tris-HCl, pH 6.8, 1% SDS, 5% glycerol and 2.5% 2-mercaptoethanol), boiled for 4 min and centrifuged. Protein extract was analysed by 10% SDS–PAGE. The gel was dried and then visualized by autoradiography. The gel was rehydrated and silver stained as a loading control.

Animal source

Two 6-month female Wistar rats were obtained from the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of the Center for Research and Advanced Studies (IACUC-CINVESTAV). Rats were given water and food ad libitum. Animal handling and all experimental protocols were fully accredited and performed in accordance with the Ethical Guidelines and Procedures from the IACUC-CINVESTAV, which fulfils the Mexican Official Norm (NOM-062ZOO-1999) 'Technical specifications for the Care and Use of Laboratory Animals'.

Statistical analysis

The results are expressed as the mean \pm sd for filter binding and *in vitro* translation assays. The statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5 software for Windows. Differences between the mean values of normally distributed data were assessed using the Student's *t*-test. *P*-values are expressed as **P* < 0.05, ***P* < 0.01 and ****P* < 0.0001 for comparison versus the control.

Results

Design and analysis of synthetic mRNAs

To analyse the binding specificity of A-, U- and G-rich mRNAs with S1 protein, irrespective of secondary structures, we designed two sets of synthetic and weakly structured mRNAs (ΔG from -3.4 to 2.6) containing adenine, guanine or uracil nucleotides both throughout the RBS and at base positions 4–9 (A/U-rich mRNAs). The mRNA secondary structures were predicted with Mfold algorithm software (26) (Fig. 1A–C). mRNA AUG-6A, mRNA AUG-5G and mRNA AUG-6U were named as follows: the number and the capital letter indicate the amount and type of nucleotides at base positions 4–9 downstream of the initiation codon. In the case of the rbs-A, rbs-U or rbs-G mRNAs, the capital letter indicates a context of adenines, uracils or guanines in the three regions of the RBS (upstream SD, between SD and AUG codons, and downstream of the AUG codon). Homopolymers Poly A and Poly U and heteropolymer Poly GGC were used as not structured and highly structured control RNAs, respectively (Fig. 1).

Native gel electrophoresis and thermal denaturation studies of the mRNAs were performed to determine the presence and stability of their secondary structures. Synthetic mRNAs were first analysed by thermal denaturation studies to determine the *T_m*. As expected, the highly structured control RNA Poly GGC showed the highest *T_m* (70°C) which correlated with the predicted negative free energy ($\Delta G = -20.3$). As to the

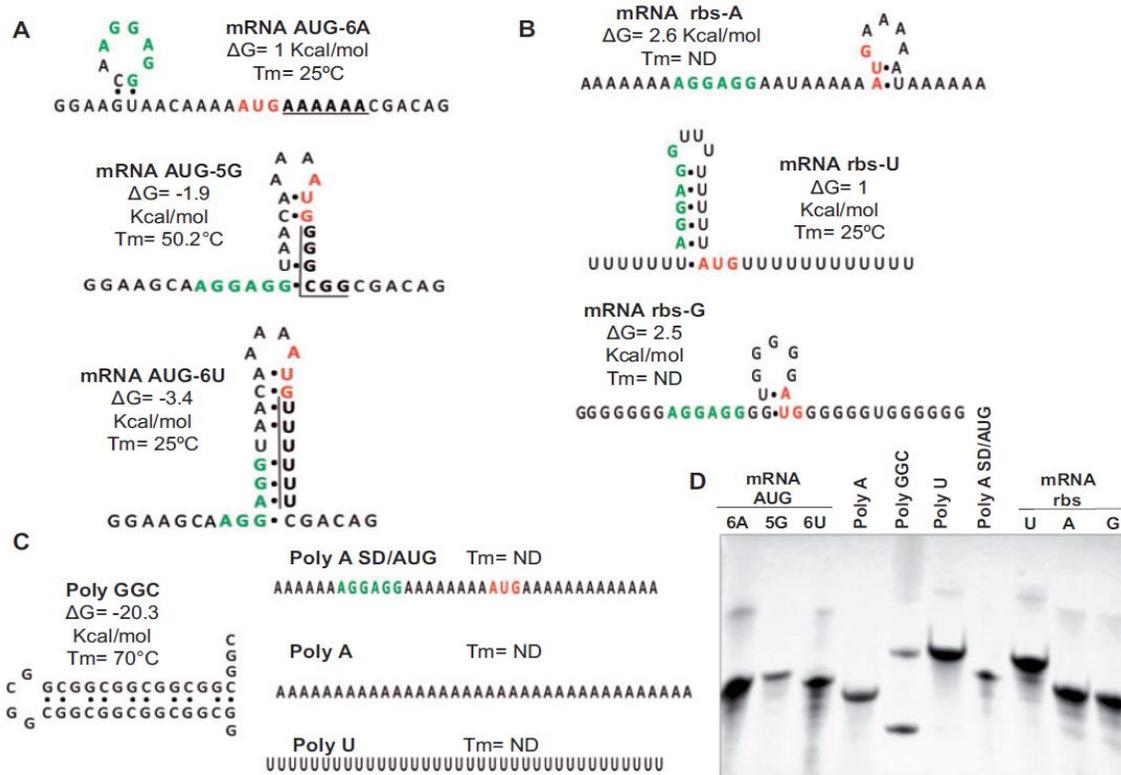


Fig. 1 Structural analysis of synthetic mRNA. Secondary structures predicted for synthetic mRNAs using Mfold Zuker algorithm. Location of the initiation codon (AUG) and 6-nt-long SD sequence (AGGAGG) are indicated. The experimentally determined melting temperatures (T_m) of the mRNAs are also indicated. (A) Set of the RNA messengers AUG-6A, mRNA AUG-5G and mRNA AUG-6U. (B) Set of the RNA messengers rbs-A, rbs-U and rbs-G. (C) Set of control RNAs Poly GGC, Poly A, Poly A SD/AUG and Poly U. (D) Folding of mRNAs [100 nM] was analysed on a 15% native polyacrylamide gel and visualized by UV shadowing. The mRNA names are indicated above the lanes.

mRNAs tested, both the T_m and the free energies indicated the presence of low and weak structures with T_m between 25 and 50 and ΔG -3.4 - -1 starting with the weakly structured AUG-5G followed by the even less structured AUG-6U, AUG-6A and rbs-U (25°C) (Fig. 1A–C). It was not feasible to determine the T_m of mRNA rbs-A, rbs-G, Poly U and Poly A due to their lack of stable secondary structures. To further corroborate the thermal denaturation studies, the synthetic mRNAs were analysed by non-denaturing gel electrophoresis. Poly A and Poly U were not expected to form secondary structures. Accordingly, Poly U migrated the slowest. However, Poly A migrated faster than expected. In this regard, it is known that a run of adenines stacks and migrates as highly structured RNAs do (27). Control RNA Poly GGC migrated the fastest according to its higher T_m . However, a slow-migrating second isoform was also observed. The other mRNAs showed intermediate migrations, but they were faster than the unstructured Poly U in agreement with their low, stable secondary structures. Overall, there was a reasonable correlation between the T_m of the mRNA and migration on the native gel (Fig. 1D).

S1 protein binds stronger to A- than U-rich mRNAs

We first evaluated the binding affinity of S1 protein for A/U/G-rich mRNAs. These mRNAs have been designed to have low structural stability, which will allow us to analyse whether S1 protein has a preference for a particular type of nucleotide. To this aim, we monitored by EMSA the binary complex formation between the mRNA and increasing concentrations of WT S1 or its variants lacking different domains (S1 Δ 1, S1 Δ 1–2, S1 Δ 1–3 and S1 Δ 3) (Supplementary Fig. S2A and B), and the results were analysed with data fit to calculate the dissociation constant (K_d). The S1 Δ 1 and S1 Δ 1–2 binding to AUG-6A was 4.5-fold less strong ($K_d \approx 1.25 \mu\text{M}$, each) than WT S1 (K_d of $0.27 \mu\text{M}$) (Fig. 2 and Supplementary Fig. S2C). Surprisingly, the deletion of the first three domains of S1 (S1 Δ 1–3) caused a complete loss of binding to AUG-6A even at a higher concentration of $1,200 \text{ nM}$ ($K_d = \text{not determinable}$) (Fig. 2A). We also assayed the binding of S1 and its variants to AUG-6U mRNA. WT S1 bound to this mRNA \approx 4-fold less tightly than AUG-6A ($K_d \approx 0.27 \mu\text{M}$), while the S1 Δ 1 showed an affinity for AUG-6U ($K_d \approx 1.6 \mu\text{M}$) close to that of WT S1 ($K_d \approx 1.1 \mu\text{M}$) (Fig. 2B and Supplementary Fig. S2D).

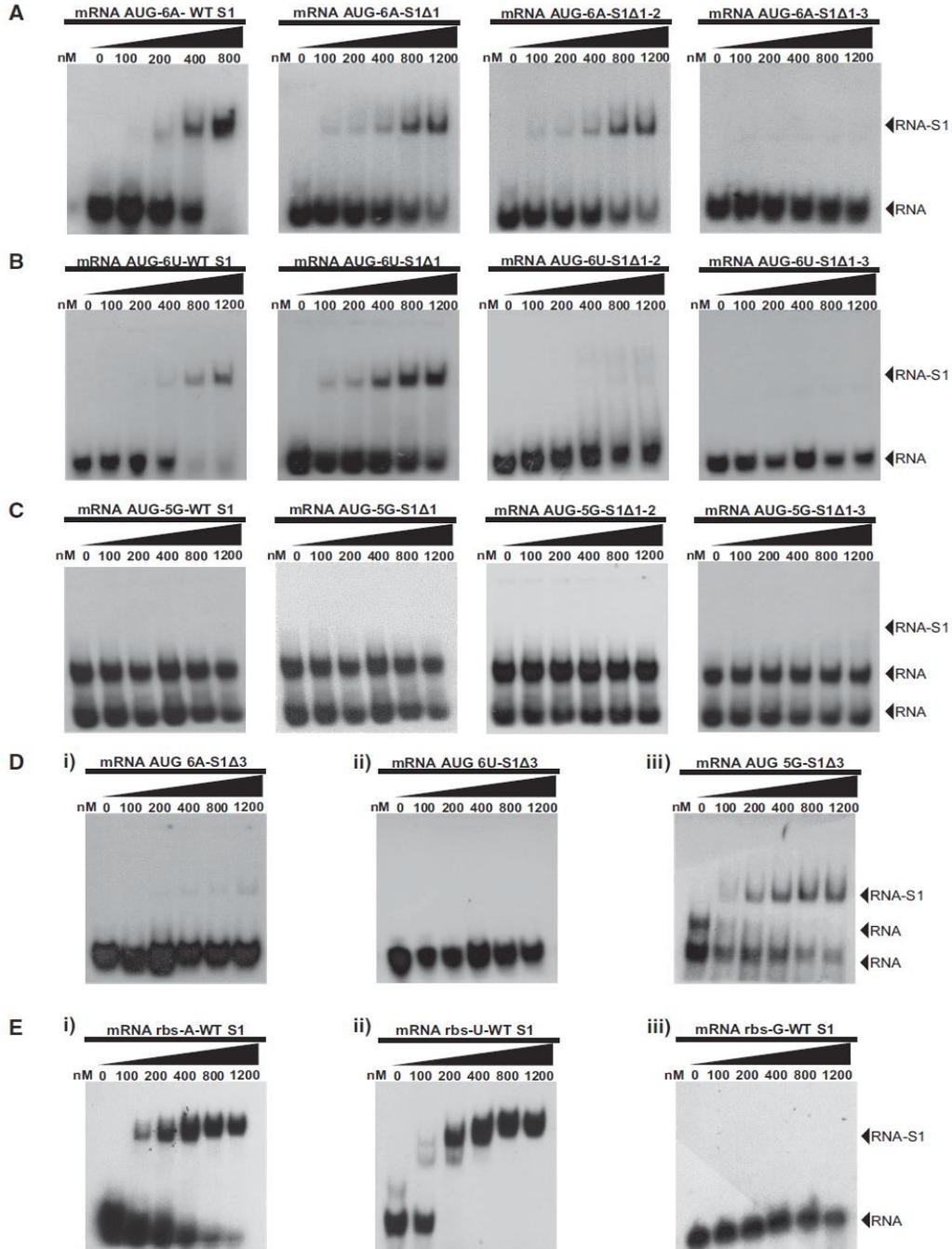


Fig. 2 Domains 2 and 3 of S1 are necessary for binding downstream A/U-rich mRNAs. Renatured 5' end-labelled mRNA (150 fmol) and S1 protein/variants (0–1,200 nM) were incubated in S1 buffer for 15 min at 37°C. Complexes formed were analysed on native polyacrylamide gels, dried and visualized by autoradiography as indicated in the Materials and Methods section. mRNAs: AUG-6A (A), mRNA AUG-6U (B) and mRNA AUG-5G (C) incubated with increasing concentrations of WT S1 or its truncated variants (S1Δ1, S1Δ1–2 and S1Δ1–3). (D) Mutant S1Δ3 was incubated with the set of 5' end-labelled mRNAs AUG-6A (i), AUG-6U (ii) and AUG-5G (iii) under the same conditions as in A–C. (E) The set of 5' end-labelled mRNAs rbs-A (i), uracils rbs-U (ii) or guanines rbs-G (iii) were incubated with WT S1 under the same conditions as in A–D. First lane of each gel, mRNA incubation control; lanes 2–5, complex performed between the indicated mRNA and increasing concentrations of WT S1 or truncated forms of S1 as indicated on the top of each autoradiography. The positions of the complex (RNA–S1) and free RNA (RNA) are indicated.

The removal of domains 1 and 2 abolished S1 mRNA binding capacity (K_d = not determinable) (Fig. 2B). Similarly, S1 Δ 1–3 did not show binding to AUG-6U. In addition, WT S1 protein or variants did not bind to AUG-5G mRNA (Fig. 2C). These data indicate that the downstream A/U-rich sequence close to the start codon may act as an S1 binding site. Furthermore, we demonstrated that S1 binds stronger to A-rich compared with U-rich mRNAs and the results also indicate that domain 3 of r-protein S1 is required for binding to A/U-rich mRNAs.

Domain 3 of r-protein S1 distinguishes the early base composition of mRNA

To examine the essentiality of the third domain of S1 protein for binding A/U/G-rich mRNAs, an S1 mutant lacking this domain was generated as described by Gibson *et al.* (21) to corroborate its participation in the binding to these mRNAs. To our knowledge, this is the first report of an S1 mutant lacking domain 3. The interaction of AUG-6A, AUG-6U and AUG-5G mRNAs with increasing concentrations of S1 Δ 3 mutant was then monitored. Interestingly, the single deletion of domain 3 (S1 Δ 3) abrogated S1 binding to both AUG-6A (K_d = 20,000 μ M) and AUG-6U mRNAs (K_d = not determinable) (Fig. 2Di and ii). Unexpectedly, AUG-5G mRNA, which did not bind to WT S1 or S1 Δ 1, S1 Δ 1–2 and S1 Δ 1–3 mutants (Fig. 2C), showed a shift (K_d = 714.3 μ M) although weaker than that between WT S1 and AUG-6A mRNA (Fig. 2Diii and Supplementary Fig. S2E). Overall, these results confirm the essentiality of domain 3 to distinguish A/U-rich mRNAs. In addition, its deletion allowed r-protein S1 binding to G-rich mRNA.

Although weak, the secondary structures from a set of mRNAs (AUG-6A, AUG-6U and AUG-5G) may still affect the binding between these messengers and S1. To further demonstrate that S1 makes a real distinction between adenine and uracil nucleotides in the absence of secondary structures a second set of mRNAs (Fig. 1B; rbs-A, rbs-U and rbs-G), whose free energies are positive and similar, was also tested by EMSA under the same conditions. Similar to the binding with AUG-6A and AUG-6U, WT S1 showed a higher affinity for rbs-A and rbs-U mRNAs (Fig. 2Ei and ii). Likewise, AUG, rbs-G did not show binding signal to WT S1 protein, even at increasing concentrations of protein S1 (Fig. 2Eiii). These data corroborate the higher affinity of S1 for A/U-rich mRNAs and indicate that the presence of domain 3 inhibits the binding with G-rich mRNAs, within a context of low structured mRNAs.

Domains 2 and 3 of r-protein S1 are required for the interaction with A/U-rich mRNA in the formation of ternary complexes

Based on the binding differences observed between the variants of S1 protein and A/U-rich mRNAs, we reasoned that S1 mutants would also display similar affinities within the context of the 30S subunit in the formation of ternary complexes among 30S subunit, messenger RNA and tRNA^{Met} initiator (30SIC).

Thus, we analysed the formation of 30SIC using filter binding assays by incubating *lacZ* mRNAs derivatives containing adenine, uracil or guanine nucleotides in the base positions 4–9 with WT 30S subunits (Supplementary Fig. S3ai, bi and ci), S1-deficient 30S subunits (S1-def 30S) (Supplementary Fig. S3aai, bii and cii) or S1-deficient 30S subunits reconstituted (S1-def 30S rec) with either WT or S1 mutants (Supplementary Fig. S3aiii, biii and ciii). Our S1-deficient system exhibits an S1 reduction of about 70% compared with WT (Supplementary Fig. S1A). That the signal observed in the filter binding assays corresponded to a ternary complex (mRNA–tRNA^{Met}–30S), was corroborated by the lack of signal when mRNAs (AAA, GGG and UUU *lacZ*) were incubated with WT 30S subunits in the absence of initiator tRNA^{Met} (Supplementary Fig. S3eii, iv, v). An enhanced binding was observed between A/U-rich *lacZ* mRNAs (AAA or UUU *lacZ*) and WT 30S (Fig. 3), compared with the significantly lower binding with GGG *lacZ* ($P < 0.01$). The deficiency of S1 on the 30S small subunit strongly decreased the binding to A/U-rich mRNAs (AAA *lacZ* 58.4%; UUU *lacZ* 59.3%) (Fig. 3), and the observed low interaction with GGG *lacZ* was not further affected. Although not to the level of WT 30S, WT S1 restored complex formation by S1-def 30S (Fig. 3). S1 participation in the binding was further corroborated by using S1 mutants. Thus, deletion of the first domain (S1 Δ 1) did not affect the capacity of S1 to restore the ternary complex formation (Supplementary Fig. S3av, bv and cv). However, deletion of the first two (Supplementary Fig. S3aiv, biv and civ) or three domains (S1 Δ 1–2 and S1 Δ 1–3) abrogated S1 capacity to restore the 30SIC. Noteworthy, deletion of domain 3 (S1 Δ 3) did not restore the binding of AAA or UUU *lacZ* with 30S subunits (Fig. 3). Together, these results reveal that domains 2 and 3 of S1 protein are key to the recognition of these mRNAs by the 30S subunit.

Domains 2 and 3 of ribosomal protein S1 are necessary for an efficient translation of A/U-rich mRNAs

To further explore whether S1 not only promotes the binding of A/U-rich mRNA to 30S subunits but also enhance the translation of these messengers, an S1-deficient *in vitro* transcription–translation assay was standardized. *De novo* synthesized proteins were labelled with [³⁵S]-methionine and monitored by SDS–PAGE and autoradiography. The *in vitro* S1-deficient reactions were primed with *lacZ* mRNAs derivatives containing A CCGAT (WT) or GGGGGG (GGG *lacZ*), AGGAGG (AGG *lacZ*), AGAAGA (AGA *lacZ*), AAAAAA (AAA *lacZ*) or TTTTTT (TTT *lacZ*) at base positions 4–9 (Fig. 4A). As expected, S1 deficiency strongly decreased translation from all these constructs compared with wild type *in vitro* reactions. The *in vitro* reconstitution of S1 restored the translation from *lacZ* derivatives. Indeed, enhanced expression of β -galactosidase from the adenine- or uracil-containing constructs was observed, >6-fold compared with WT *lacZ*. β -galactosidase was not expressed from the GGG *lacZ* construct even when the reaction was supplemented with S1 protein (Fig. 4B and C). S1-deficient S30

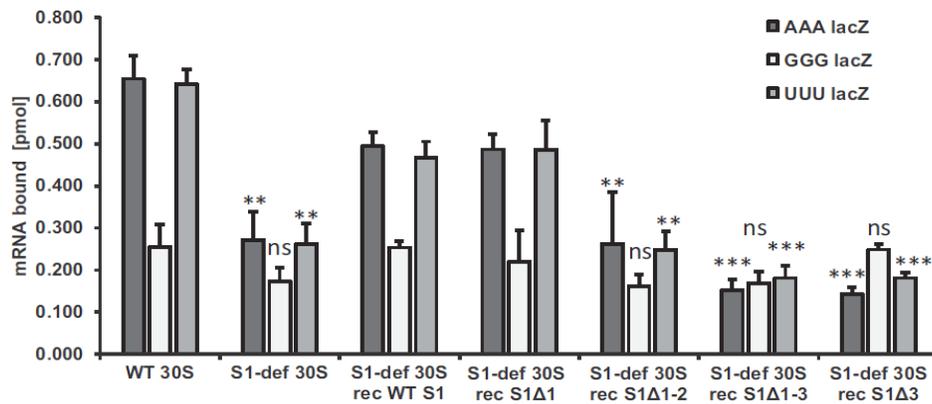


Fig. 3 S1 domains 2 and 3 are necessary for the binding of A/U-rich mRNAs to 30S ribosomal subunits. *lacZ* messengers containing adenines, uracils or guanines at 4–9 base positions were generated by *in vitro* transcription from *lacZ* constructs as indicated in the Materials and Methods section. P^{32} labelled *lacZ* transcripts were renaturated and incubated with WT 30S subunits, S1-deficient 30S subunits (S1-def 30S), S1-deficient 30S reconstituted with WT S1 (S1-def 30S rec WT S1) or variants of S1 lacking different domains S1Δ1, S1Δ1–2, S1Δ1–3 and S1Δ3 and initiator tRNA^{Met} for 15 min at 37°C to allow the formation of ternary complexes. The complexes formed were chilled quickly and analysed. Bar graphs show the mean of three experiments \pm standard deviation (sd). ** $P < 0.01$, *** $P \leq 0.001$ or ns, not significant.

extracts were reconstituted with variants of r-protein S1 to test the essentiality of the first three domains of S1 protein in the translation of downstream A/U-rich mRNAs, S1Δ1 mutant restored the translation from A/U-rich *lacZ* to a level comparable with WT S1 (Fig. 4D), however, the S1Δ1–2 and S1Δ1–3 mutants were not able to restore the translation from these mRNAs (Fig. 4E and F). These results corroborate that S1 promotes an efficient translation from A/U-rich mRNAs. In addition, our results also indicate that domains 2 and 3 of r-protein S1 are necessary for the translation of these messengers.

Domains 2 and 3 of S1 are essential for cell viability

The OB-fold domains of r-protein S1 show the same structure but are not functionally equivalent (4). S1 domains 4–6 are not essential for S1 function including the binding of structured mRNAs to 30S subunit and cell viability (4). To assess the essentiality of the first three domains of S1 in cell viability, WT *rpsA* and deletion mutants (*rpsA*Δ1, *rpsA*Δ1–2, *rpsA*Δ1–3 and *rpsA*Δ3) (Supplementary Fig. S2A and B) were cloned into the expression vector pProEx-1. The *rpsA*Δ2 mutant was also cloned into this vector (Supplementary Fig. S5A–D). However no signal of the corresponding mutant protein was detected by western blot (Supplementary Fig. S5E), even though *rpsA*Δ2 mRNA signal was detected by both northern blot (Supplementary Fig. S5F) and RT-PCR analysis (Supplementary Fig. S5G). The S1 conditional mutant *E. coli* 5699 *AraBp-rpsA* was transformed with the complementing plasmid pProEx-1, which carries either the WT *rpsA* gene or any of the variants (*rpsA*Δ1; *rpsA*Δ1–2, *rpsA*Δ1–3 and *rpsA*Δ3) under the control of an IPTG inducible promoter. In the absence of arabinose (non-permissive condition), S1 was not expressed in the *E. coli* strain 5699 *AraBp-rpsA*, affecting negatively cell growth (Fig. 5; open triangles)

compared with the strain 5699 *AraBp-rpsA* grown under permissive conditions (Fig. 5; closed triangles) or the WT parental strain C-1a (Fig. 5; open rhomboid). The lack of growth under non-permissive conditions was rescued in the IPTG-induced cells transformed with pProEx-1 carrying WT *rpsA* and induced with IPTG. Although not to the WT levels, S1Δ1 also restored cell growth (Fig. 5; closed squares and crosses, respectively), whereas cell growth was not rescued in the strains transformed with pProEx-1 carrying the larger deletions of *rpsA* gene (*rpsA*Δ1–2 and *rpsA*Δ1–3) (Fig. 5; open circles and closed circles, respectively). Interestingly, the single deletion of domain 3 was sufficient to abrogate cell growth (Fig. 5; squares open). These data indicate that domains 2 and 3 of the ribosomal protein S1 play an essential role in cell viability.

Discussion

S1 is an RNA-binding protein containing from one to six domains throughout several divergent organisms (20). This family of proteins contains a unique conserved domain, which adopts an OB-fold consisting of a five-stranded antiparallel beta barrel highly specific for binding single-stranded nucleic acids (18). Even though *E. coli* S1 r-protein contains six OB-fold domains (18), the third one has a highly conserved folded structure homologous to S1 domain from other proteins (20). Although the binding of S1 protein to upstream A/U-rich mRNAs has been reported (14), the role of specific domains in the interaction with mRNAs containing A/U-rich patches after the start codon had not been elucidated. Our data provide strong experimental support for S1 domain 3 being necessary for distinguishing A/U-rich from G-rich mRNAs. The deletion of domains 3 or 2 and 3 abrogates the binding to A/U-rich mRNAs, the formation

Domains 2 and 3 are key for S1 function

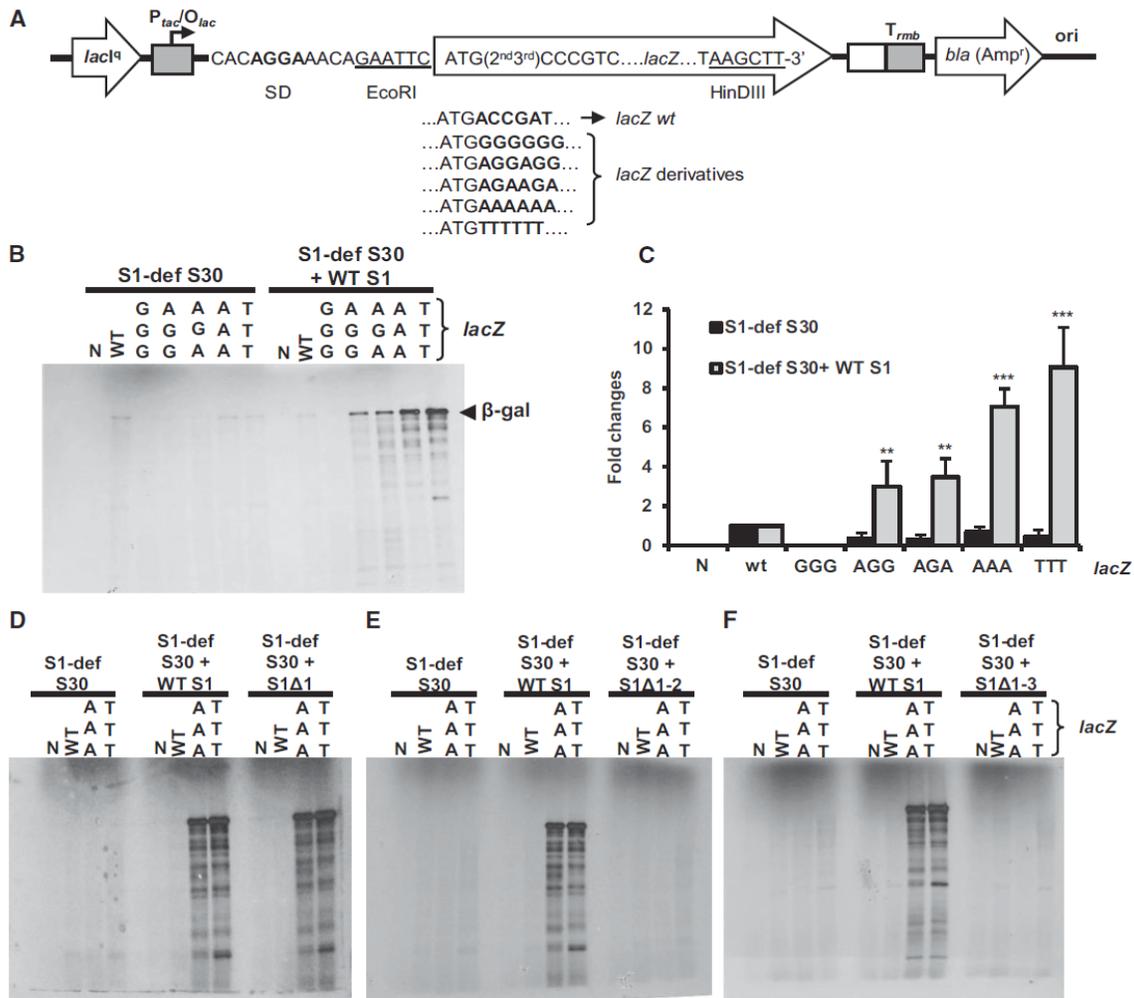


Fig. 4 Domains 2 and 3 of S1 protein are essential for the translation of downstream A- and U-rich mRNAs. (A) WT *lacZ* and derivatives containing tandems of GGGGGG (GGG *lacZ*), AGGAGG (AGG *lacZ*), AGAAGA (AGA *lacZ*), AAAAAA (AAA *lacZ*) or TTTTTT (TTT *lacZ*) at the base positions +4 to +9 were obtained by site-directed mutagenesis and cloned in the pKQV4 vector as indicated in the Materials and Methods section. The transcription ($P_{lac/Olac}$, T_{rmb}) and translation (SD, AUG) signals are indicated. (B) WT *lacZ* or derivatives were used to prime the *in vitro* transcription–translation reactions containing WT, S1-deficient S30 extracts (S1-def 30S) or S1-deficient S30 extracts reconstituted with WT S1 (S1-def 30S rec WT S1). *De novo* [35 S]-methionine labelled proteins were analysed on a 10% SDS–PAGE and the gel was dried and exposed to autoradiography. N, no DNA; β -galactosidase migration is indicated (β -gal). (C) Densitometric analysis of the upper band from three-independent experiments. Bar graphs represent the mean of three experiments (fold changes respect to WT *lacZ*) \pm sd. ** $P < 0.01$, *** $P \leq 0.001$ or ns, not significant. (D–F) The *in vitro* transcription–translation reactions containing S1-deficient or S-deficient S30 extracts plus WT S1 or the indicated S1 mutants were primed with WT, AAA and TTT *lacZ* derivatives and resolved in a 10% SDS–PAGE, the gel was dried and exposed to autoradiography.

of ternary complexes, the *in vitro* translation and cell viability. Although domains 3 or 2 and 3 seem to be necessary for S1 functions, the participation of the adjacent domains should not be discarded.

Two sets of weakly structured synthetic mRNAs were tested to make sure that it is the nature of the nucleotides what accounts for the binding differences of the A/U-rich mRNAs to S1 (Fig. 1A and B). For both sets, S1 binding correlated with the downstream A/U composition and no correlation was observed with the T_m and free energies. Thus, for both sets of

mRNAs (Fig. 1A), the binding strength observed A-rich > U-rich mRNAs, and no binding with downstream G-rich mRNAs (Fig. 2A–C) did not correlate with their relative low structure stabilities ($\Delta G = 1$ kcal/mol, $\Delta G = -3.4$ kcal/mol and $\Delta G = -1.9$ kcal/mol, respectively). This means that the observed binding differences should be attributable to the nature of the nucleotides. Although these binding differences are also compatible with the idea that A/U-rich regions are less structured than G-rich regions, our results reveal that S1 protein does not bind to G-rich mRNAs (rbs-

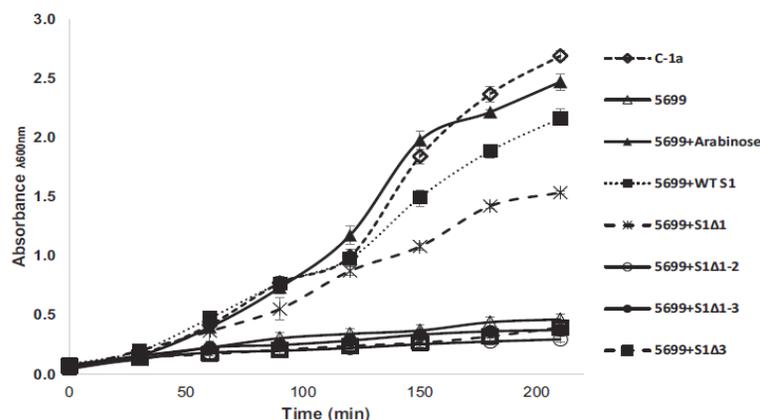


Fig. 5 S1 variant capacity to restore cell growth of S1 conditional mutants. The effect of WT and truncated S1 variants on the growth of *E. coli* 5699 *ArapB-rpsA* S1 conditional mutant cells was tested by growing the cells transformed with the constructs containing WT S1 or the indicated mutants at 37°C in LB medium with arabinose up to $OD_{600} = 0.2$ and then diluted 1:4 (time = 0 in the plot) with prewarmed LB with arabinose (S1 basal, permissive condition) or glucose (S1 deficient, not permissive condition) and inducing the expression of WT or S1 mutants (S1 Δ 1, S1 Δ 1-2, S1 Δ 1-3 and S1 Δ 3). Bacterial growth was monitored spectrophotometrically by measuring the OD_{600} . Data points show the mean of three experiments \pm sd.

G; $\Delta G = 2.5$ kcal/mol) regardless that these mRNAs show a structural stability similar to A-rich (rbs-A; $\Delta G = 2.6$ kcal/mol) mRNAs (Fig. 2Di and iii).

It is interesting to compare our results with those of Duval *et al.* (4) who found that domains 1–3 of S1 are essential for the recognition of the structured *rpsO* mRNA indicating that the first three domains are necessary to melt mRNA structure, however, for the low structured A/U-rich mRNAs tested in this work, only domains 2 and 3 are required. It is well known that mRNAs with an unpaired A/U-rich region near the start codon are better expressed than those with an unpaired GC-rich region (13, 15). Single-stranded regions may constitute a standby site, to which the 30S subunit can attach non-specifically (7). To be formed, the standby complex requires the 30S subunit to be capable of attaching with reasonable affinity to a single-stranded mRNA region. It could, therefore, be hypothesized that the unstructured region downstream of AUG of *prfA* is a ribosomal standby site, where the ribosome can bind and ‘wait’ for the SD-region to be accessible. mRNAs may initially bind to the small subunit through S1 r-protein, which has been proposed to play an important role during translation initiation by interacting with mRNA (28, 29). Nevertheless, the participation of A/U-rich sequences downstream of the start codon as S1 binding sites has remained elusive. A suggested explanation for these findings is that A/U-rich regions keep the RBS unstructured. These unstructured regions could serve as a docking site for 30S ribosomal subunit as A/U-rich regions upstream do (15). However, the results presented in this work suggest that nucleotide composition at 4–9 base positions may be as relevant as a weak structure to facilitate S1 binding and association with the 30S ribosomal subunit. These results are in agreement with those of Loh *et al.* (30), who reported that the first 20 bases downstream of the AUG start codon containing a

single-stranded region, are required by the ribosome for efficient binding and translation initiation. Thus, higher levels of ternary complexes are formed with the weakly structured A/U-rich *lacZ* derivative mRNAs suggesting that S1 in the context of the 30S subunit facilitates A/U-rich *lacZ* mRNA docking to the subunit (Fig. 3), and the participation of domains 2 and 3 is necessary for this interaction. Duval *et al.* (4), showed that domains 1–3 are essential for docking and accommodation of highly 5'-structured mRNA on the 30S. This result is reasonable since these domains should be necessary to melt the secondary structure of *rpsO* mRNA unlike the low structured mRNAs tested in this work. Surprisingly, our filter binding assays show that the r-protein S1 lacking only domain 1 restores the mRNA–30S binding, although not to WT levels. Indeed, the r-protein S1 lacking only domain 1, although less efficiently, restored cell growth. This result contrast with a previous report where the N-terminal domain 1 alone binds indirectly to the ribosome inhibiting the binding of S1 native protein (17) and for this interaction S2 is necessary, however, the behaviour of domain 1 alone and the protein lacking domain 1 (S1 Δ 1 mutant) is not the same as our results indicate. In this work, we find that S1 Δ 1 mutant, is still able to bind to 30S in agreement with Duval’s findings (4), where S1 Δ 1 mutant binds weakly to 30S *in vitro*. This could explain why S1 Δ 1 mutant restores the ternary complex formation (Fig. 3). Taken together, our data indicate that, although poorly, domains 2 and 3 of r-protein S1 still allow necessary the ternary complex formation with low structured downstream A/U-rich mRNAs (Fig. 3).

The effect of deleting domains 1 and 2 or 1–3 in the ternary complex formation can be explained by the inability of these truncated proteins to bind the ribosome since the first two S1 domains have been involved in the interaction with 30S subunit (18). Although the

deletion of domain 3 (S1 Δ 3) abrogates the direct interaction with A/U-rich mRNAs (Fig. 3) in the formation of ternary complexes, this mutant should still keep the ability to bind to the 30S subunit. Unexpectedly, this mutant acquires the ability to bind G-rich mRNAs; however, this is not reflected in the binding to 30S subunits in the formation of ternary complexes (Fig. 3). These differences are reasonable because in the binary complex formation between S1 and mRNA all S1 domains are likely to interact, a scenery different from the S1 domains exposed on the surface of the 30S subunit. Thus, S1 protein confers 30S subunit the ability to discriminate mRNAs by sequence.

Several reports have associated the presence of adenine or uracil nucleotides near the start codon with enhanced translation (*11–13*). The essentiality of domains 2 and 3 in the interaction of 30S subunits with A/U-rich mRNAs suggested that this may be reflected in the translation of the same messengers. As expected, the translation of *lacZ* derivatives is strongly dependent on S1 as assessed by an S1-deficient transcription–translation cell-free system assay, where a low translational activity is still detectable in the S1-deficient system (Supplementary Fig. S4B), plausibly due to a residual concentration of r-protein S1 (Fig. 4B). In addition, *lacZ* derivatives containing either adenines or uracils near the start codon are efficiently translated (UUU > AAA > AGA > AGG), and protein synthesis is markedly reduced under S1 deficiency (Fig. 4B). Protein synthesis is only restored upon addition of WT S1 or S1 Δ 1 but not by S1 Δ 1–2 or S1 Δ 1–3 (Fig. 4D–F). It could be argued that the low translation of GGG *lacZ* is provoked by its higher structural stability ($\Delta G = -6.3$ kcal/mol). However, it is comparable to that of AAA, AGA and AGG *lacZ* (each one with a $\Delta G = -4.1$ kcal/mol), which suggests that it is the nature of the nucleotides what accounts for the translational differences. We interpret our results as evidence of a translational effect because the transcription rates and stability of WT and mutant *lacZ* derivative mRNAs detected by northern blot are similar (data not shown). Although the transcription rates are equivalent, the RNA species observed are different depending on the binding affinities of the mRNAs (*13*). Thus, full-length or larger mRNAs are observed from A-rich mRNAs. Since these mRNAs have a higher binding affinity to 30S subunits and show better translation rates, they should be forming polyribosomes and therefore protect longer mRNA regions.

The results show the requirement of S1 domains 2 and 3 for the translation of A/U-rich mRNAs. Being domains 2 and 3 necessary for both the *in vitro* translation and the interaction with the 30S, it became necessary to assess whether these domains are also essential for cell viability. In the system used in this work, (an S1 conditional mutant *E. coli* 5699 *AraBp-rpsA*), only WT S1 and S1 Δ 1 allows cell growth but not S1 Δ 1–2, S1 Δ 1–3 or S1 Δ 3 (Fig. 5) under not permissive conditions (S1 deficiency) indicating that domains 2 and 3 are essential for cell viability. This result agrees partially with the essentiality of the first three domains proposed by Duval *et al.* (*4*). However, cells with the chromosomal copy of *rpsA* with the first

domain deleted (*rpsA* Δ 1) was not included in their system. They found that *rpsA* Δ 4–6, though less efficiently, can grow but not mutants *rpsA* Δ 2–6 and *rpsA* Δ 3–6. An S1 mutant lacking domain 2 alone may retain the activity considering that domains 1 and 2 allow the binding of S1 protein to the ribosome and domains 3–5 the interaction with single-stranded RNA. Although we obtained the construct containing *rpsA* Δ 2 mutant and its mRNA was detected, it was not feasible to detect the S1 Δ 2 mutant protein indicating that the protein may be promptly degraded (Supplementary Fig. S5E). Together, our results and those of Duval indicate that domains 4–6 are dispensable and that only domains 2 and 3 are essential for cell viability. All in all, data presented in this work show that S1 domains 2 and 3 are critical for mRNA–30S interaction, for the translation of A/U-rich mRNAs (AAA and UUU *lacZ*) and cell viability, however a marginal or synergistic role for domains 1 and 4–6 should not be discarded.

Supplementary Data

Supplementary Data are available at *JB* Online.

Acknowledgements

The authors thank Federica Briani for providing bacterial strains C-1a and 5699, M. del Rosario Salinas-Tobón for her technical assistance in the production anti-S1 and anti-L4 antibodies and G. Aguilar-Gonzalez for skillful technical support. J.C.C.-G. was granted a scholarship from CONACYT.

Funding

This work was supported by CONACYT México (Grant 27975 to J.H.S.).

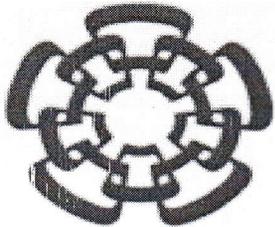
Conflict of Interest

None declared.

References

1. Shine, J. and 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* **71**, 1342–1346
2. Gold, L. (1988) Posttranscriptional regulatory mechanisms in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 199–233
3. Yarchuk, O., Iost, I., and Dreyfus, M. (1991) The relation between translation and mRNA degradation in the *lacZ* gene. *Biochimie* **73**, 1533–1541
4. Duval, M., Korepanov, A., Fuchsbaauer, O., Fechter, P., Haller, A., Fabbretti, A., Choulier, L., Micura, R., Klaholz, B.P., Romby, P., Springer, M., and Marzi, S. (2013) *Escherichia coli* ribosomal protein S1 unfolds structured mRNAs onto the ribosome for active translation initiation. *PLoS Biol.* **11**, 12–14
5. Breaker, R.R. (2010) RNA switches out in the cold. *Mol. Cell* **37**, 1–2
6. Studer, S.M. and Joseph, S. (2006) Unfolding of mRNA secondary structure by the bacterial translation initiation complex. *Mol. Cell* **22**, 105–115

7. De Smit, M.H. and Van Duin, J. (2003) Translational standby sites: how ribosomes may deal with the rapid folding kinetics of mRNA. *J. Mol. Biol.* **331**, 737–743
8. Draper, D.E. and Reynaldo, L.P. (1999) RNA binding strategies of ribosomal proteins. *Nucleic Acids Res.* **27**, 381–388
9. Salah, P., Bisaglia, M., Aliprandi, P., Uzan, M., Sizun, C., and Bontems, F. (2009) Probing the relationship between Gram-negative and Gram-positive S1 proteins by sequence analysis. *Nucleic Acids Res.* **37**, 5578–5588
10. Komarova, A.V., Tchufistova, L.S., Dreyfus, M., and Boni, I.V. (2005) AU-rich sequences within 5' untranslated leaders enhance translation and stabilize mRNA in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **187**, 1344–1349
11. Brock, J.E., Paz, R.L., Cottle, P., and Janssen, G.R. (2007) Naturally occurring adenines within mRNA coding sequences affect ribosome binding and expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **189**, 501–510
12. Qing, G., Xia, B., and Inouye, M. (2003) Enhancement of translation initiation by A/T-rich sequences downstream of the initiation codon in *Escherichia coli*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **6**, 133–144
13. Castillo-Méndez, M.A., Jacinto-Loeza, E., Olivares-Trejo, J.J., Guarneros-Peña, G., and Hernández-Sánchez, J. (2012) Adenine-containing codons enhance protein synthesis by promoting mRNA binding to ribosomal 30S subunits provided that specific tRNAs are not exhausted. *Biochimie* **94**, 662–672
14. Boni, I.V., Lsaeva, D.M., Musychenko, M.L., and Tzareva, N.V. (1991) Ribosome-messenger recognition: mRNA target sites for ribosomal protein S1. *Nucleic Acids Res.* **19**, 155–162
15. Del Campo, C., Bartholomäus, A., Fedyunin, I., and Ignatova, Z. (2015) Secondary structure across the bacterial transcriptome reveals versatile roles in mRNA regulation and function. *PLoS Genet.* **11**, 1–23
16. Sato, T., Terabe, M., Watanabe, H., Gojobori, T., Hori-Takemoto, C., and Miura, K.I. (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
17. Byrgazov, K., Manoharadas, S., Kaberdina, A.C., Vesper, O., and Moll, I. (2012) Direct interaction of the N-terminal domain of ribosomal protein S1 with protein S2 in *Escherichia coli*. *PLoS One* **7**, 1–10
18. Bycroft, M., Hubbard, T.J., Proctor, M., Freund, S.M., and Murzin, A.G. (1997) The solution structure of the S1 RNA binding domain: a member of an ancient nucleic acid-binding fold. *Cell* **88**, 235–242
19. Draper, D.E. and von Hippel, P.H. (1978) Nucleic acid binding properties of *Escherichia coli* ribosomal protein S1. *J. Mol. Biol.* **122**, 321–338
20. Deriusheva, E.I., Machulin, A.V., Selivanova, O.M., and Serdiuk, I.N. (2010) [Family of ribosomal proteins S1 contains unique conservative domain]. *Mol. Biol.* **44**, 728–734
21. Gibson, D.G., Young, L., Chuang, R.Y., Venter, J.C., Hutchison, C.A., and Smith, H.O. (2009) Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods* **6**, 343–345
22. Feinberg, J.S. and Joseph, S. (2001) Identification of molecular interactions between P-site tRNA and the ribosome essential for translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 11120–11125
23. Cole, P.E., Yang, S.K., and Crothers, D.M. (1972) Conformational changes of transfer ribonucleic acid. Equilibrium phase diagrams. *Biochemistry* **11**, 4358–4368
24. Briani, F., Curti, S., Rossi, F., Carzaniga, T., Mauri, P., and Deho, G. (2008) Polynucleotide phosphorylase hinders mRNA degradation upon ribosomal protein S1 overexpression in *Escherichia coli*. *RNA* **14**, 2417–2429
25. Hernandez-Sanchez, J., Valadez, J.G., Herrera, J.V., Ontiveros, C., and Guarneros, G. (1998) Lambda bar minigene-mediated inhibition of protein synthesis involves accumulation of peptidyl-tRNA and starvation for tRNA. *EMBO J.* **17**, 3758–3765
26. Zuker, M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3406–3415
27. Holder, J.W. and Lingrel, J.B. (1975) Determination of secondary structure in rabbit globin messenger RNA by thermal denaturation. *Biochemistry* **14**, 4209–4215
28. Sørensen, M.A., Fricke, J., and 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.* **24**, 561–569
29. Subramanian, A.P. (1983) Structure and functions of ribosomal protein S1. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* **28**, 101–142
30. Loh, E., Memarpour, F., Vaitkevicius, K., Kallipolitis, B.H., Johansson, J., and Sonden, B. (2012) An unstructured 5'-coding region of the *prfA* mRNA is required for efficient translation. *Nucleic Acids Res.* **40**, 1818–1827



Cinvestav

Febrero 21, 2019.

Arq. Hugo Flores Félix
Subdirector de Posgrado
Presente.

Por medio del presente nos permitimos hacer de su conocimiento que la tesis de doctorado del **M. en C. Juan Carlos Cifuentes Goches** titulada: "**Papel de los dominios de la proteína S1 en la traducción de RNAs mensajeros ricos en adeninas o uracilos**", ha sido aprobada por su Comité Tutorial por lo que corresponde a la versión final de la misma.

Sin otro particular de momento.

Atentamente,

Dr. Javier Hernández Sánchez
Director de Tesis

Dr. Gabriel Guarneros Peña
Asesor de Tesis

Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe
Asesor de Tesis

Dr. Jesús Valdés Flores
Asesor de Tesis

Dra. Xóchitl Pérez Martínez
Asesor de Tesis

Vo. Bo.

Dr. Javier Hernández Sánchez
Coordinador Académico
Depto. de Genética y Biología Molecular