



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“TOXICIDAD DE MINIGENES DE DOS CODONES EN CEPAS DE Escherichia coli DEFICIENTES EN LA ACTIVIDAD DE peptidil-tRNA HIDROLASA”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

BERNARDO PEREZ ZAMORANO



DIRECTOR DE TESIS: DR. GABRIEL GUABNEROS PEÑA

FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"Toxicidad de minigenes de dos codones en cepas de Escherichia coli deficientes en la actividad de peptidil-tRNA hidrolasa."

realizado por Bernardo Pérez Zamorano

con número de cuenta 9650416-9 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Propietario	Dr. Gabriel Guarneros Peña
Propietario	Dr. Luis Rogelio Cruz Vera
Propietario	Dr. Víctor Manuel Valdés López
Suplente	Biol. Alfonso José Vilchis Peluyera
Suplente	M. en C. Juana Mabel Hernández Altamirano

Gabriel Guarneros
BPA
Victor Manuel
Alfonso
Juana Mabel

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

Luisa Alba Lois

Dr. Luisa Alba Lois



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

DEDICATORIA

Deseo dedicar no sólo ésta tesis, sino todo el trabajo realizado en mi carrera, principalmente a mis padres **María Isabel** y **Bernardo**. La razón principal por la cuál yo pude llegar a éste momento es el haber contado con su apoyo y amor incondicional; mi agradecimiento por tantos años de esfuerzos, preocupaciones, alegrías, cariño y enseñanzas no puede ser expresado con palabras solamente. Todo lo que soy se los debo a ustedes.

Los Quiero

A mi tía **María de Lourdes**, por brindarme su cariño y ser un soporte siempre disponible. Gracias también por ponerme el ejemplo de lo que significa ser una persona trabajadora.

A mi prima **Susana** por estar dispuesta a brindarme una mano o palabras de apoyo sin importar día u hora. Muchos de mis reportes los entregué bien gracias a ti; algún día yo también seré bueno para la mecanografía.

A mi prima **Ana Vilma** por siempre estar al frente para defenderme o "presumirme". También te agradezco tu gran hospitalidad y el hacerme tío de los niños más fregones que conozco.

A mi tío **Juan Rafael** por siempre compartir su experiencia y tener siempre el ánimo muy alto para ayudar a los demás. Pero más que nada te agradezco el que seas esa chispa de alegría en los días grises de la casa.

A mi tío **Miguel Angel** por haber sido como mi segundo padre en toda la extensión de la palabra. Te agradezco el haber estado **siempre** para mí cuando más te necesité, contigo nunca tuvo que aparecer un ángel guardián.

A mi abuela **Rosa** por quererme como pocas personas en el corto tiempo que la conocí. Nada me daría más alegría que verte ahora.

A mi primo **Carlos Rafael**, no sólo por tendernos la mano, sino por siempre hacerlo con una sonrisa.

A mis compañeros de facultad que con el tiempo se fueron convirtiendo en mis amigos. Gracias por dejarme aprender un poco de ustedes (no solo en lo referente a la escuela), particularmente **Carlos, Pablo y Mirielle**.

Al reportero **David** por ser tan buen cuate.

A la familia **Sauza Dones** por simplemente ser el ejemplo vivo de la amistad.

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer a las siguientes personas por apoyar de una u otra manera mi trabajo:

Al Dr. Gabriel Guarneros Peña por darme la oportunidad de integrarme a su grupo de investigación y tenerme la confianza para realizar el éste trabajo.

Al Dr. Luis Rogelio Cruz Vera por ser mi último maestro en ésta última etapa de la licenciatura.

A aquellos integrantes de los laboratorios 3 y 8 del departamento de genética y biología molecular del CINVESTAV que me ayudaron y tuvieron paciencia en mi estadía.

A los doctores Luis Y. Kameyama y Jaime García-Mena por apoyarme en el seguimiento de un sueño.

A mis sinodales: Dr. Víctor Manuel Valdés López, Biol. Alfonso José Vilchis (con una l) Peluyera y M. en C. Juana Mabel Hernández Altamirano.

A la Dr. Luisa Alba Lois por su oportuna ayuda en el último jalón de mi titulación.

A todos los maestros que contribuyeron para que nunca muriera en mí la pasión por la Biología.

ÍNDICE GENERAL

-Índice general	I
-Índice de tablas y figuras	III
-Resumen	1
1 Introducción.....	3
1.1 Síntesis proteica	4
1.2 El gen <i>pth</i> de <i>Escherichia coli</i>	14
1.3 Secuencias <i>bar</i> del fago lambda	17
2 Hipótesis y Objetivos	23
3 Material y métodos generales	24
3.1 Cepas bacterianas y plásmidos utilizados	24
3.2 Cepas de <i>Escherichia coli</i> utilizadas	24
3.3 Plásmidos utilizados	25
3.4 Medios de cultivo	26
3.5 Enzimas y condiciones para la clonación molecular	26
3.6 Construcción de minigenes sintéticos	27
3.7 Transformación	28
3.8 Valoración de toxicidad y cinéticas de crecimiento	30
3.9 Aislamiento de RNA total	30
3.10 Medición de peptidil-tRNA	31

4 Resultados	35
4.1 Obtención del banco de minigenes de dos codones	35
4.2 Toxicidad de los minigenes de dos codones	35
4.3 Relación entre la concentración de mRNA del minigen y la toxicidad que produce	44
4.4 Efecto de la sobreexpresión de la Pth en la concentración de mRNA y toxicidad de los minigenes	49
4.5 Efecto de la sobreexpresión del tRNA específico sobre la concentración de mRNA y toxicidad de los minigenes.....	49
4.6 Correlación de la concentración de peptidil-tRNA con la toxicidad de un minigen	57
4.7 Comparación de la composición de minigenes con más de dos codones	59
5 Discusión	64
5.1 Toxicidad debida al segundo codon	64
5.2 Relación de la concentración del mRNA y la generación de peptidil-tRNA	66
6 Conclusiones	68
- Glosario	69
- Referencias	71

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figuras

-Figura 1 Traducción	11
-Figura 2 Actividad de la Peptidil-tRNA hidrolasa	15
-Figura 3 Minigenes <i>bar</i> en el DNA de λ	20
-Figura 4 Estructura de los genes artificiales tipo <i>bar</i> portadores de los 63 posibles codones en la segunda posición	29
-Figura 5 Crecimiento de las cepas C600 y sus mutaciones en <i>pth</i> durante la sobreexpresión de minigenes con los codones CGA, CGC Y CGU.....	37
-Figura 6 Diferencias en áreas de inhibición del crecimiento de las cepas mutantes C600 <i>pth</i> (Ts) y C600 <i>pth</i> (rap) al expresarse en ellas minigenes tóxicos.....	41

-Figura 7 Inhibición del crecimiento de la cepa C600 <i>pth</i> (Ts) al ser transformada con diferentes minigenes.....	45
-Figura 8 Concentración de mRNA al expresarse distintos minigenes en la cepa C600 <i>pth</i> (Ts).....	46
-Figura 9 Concentración de mRNA al expresarse distintos minigenes en la cepa C600 <i>pth</i> (Ts) en un ambiente con fármacos bacteriostáticos.....	48
-Figura 10 Concentración de mRNA al expresarse distintos minigenes en las cepas C600 <i>pth</i> (Ts) y C600 <i>pth</i> (rap)	50
-Figura 11 Crecimiento de la cepa C600 <i>pth</i> (Ts) durante la sobreexpresión de minigenes y sus tRNAs.....	52
-Figura 12 Concentración de mRNA de los minigenes AAA, AGA y AUA al expresarse en una cepa C600 <i>pth</i> (Ts) solos o en conjunción de su tRNA específico.....	54
-Figura 13 Crecimiento de la cepa C600 <i>pth</i> (Ts) durante la sobreexpresión de minigenes y de Pth.....	55

-Figura 14 Concentración de mRNA en las cepas C600, C600 *pth*(Ts) y C600 *pth*(rap) al expresarse el minigen AUC solo y junto a *pth*56

-Figura 15 Curva de viabilidad de las cepas C600, C600 *pth*(Ts) y C600 *pth*(rap) al ser transformadas con los minigenes CGA y CGT, induciendo su expresión con IPTG58

-Figura 16 Concentraciones de tRNA y peptidil-tRNA en las cepas C600, C600 *pth*(Ts) y C600 *pth*(rap) al ser transformadas con los minigenes CGA, CGT y CGC61

Tablas

-Tabla I Clasificación de la toxicidad de los minigenes artificiales de dos codones tipo *bar* al expresarse en las cepas mutantes C600 *pth*(Ts) y C600 *pth*(rap) a diferentes temperaturas38

-Tabla II Agrupación de los minigenes artificiales tipo *bar* por colores según la intensidad de toxicidad que producen al expresarse.....43

-Tabla III Longitud de los radios de inhibición al expresarse minigenes tóxicos junto a tRNAs en cepas *pth* mutantes53

-Tabla IV Secuencia, composición y grados de toxicidad de minigenes con una longitud mayor de dos codones encontrados en una librería aleatoria.....63

RESUMEN

Los minigenes son secuencias con marcos de lectura abiertos característicos de genes. Cuando uno de estos minigenes, *bar*, se presenta naturalmente en el genoma del bacteriófago lambda y se expresa en células deficientes en la actividad de la enzima Pth, las células mueren. Diferentes cepas con mutaciones distintas en el gen *pth*, específicamente *Ts* y *rap*, muestran grados variables de resistencia a la toxicidad generada por la expresión del minigen *bar*, una situación donde la temperatura juega un papel importante. Esto indicó que el mecanismo del minigen *bar* para matar a las bacterias, está relacionado con la presencia de tRNA libre, ya que el papel de la enzima Pth es el de hidrolizar el peptidil-tRNA, con el fin de reciclar el tRNA que será posteriormente utilizado por la célula en la traducción. Mediante la medición de peptidil-tRNA ahora se sabe que el minigen *bar* causa la caída prematura, o "drop-off", de peptidil-tRNA del ribosoma, antes de que pueda ser hidrolizado y se genere la reacción de terminación. Al encontrarse mutantes del minigen *bar* que no presentan toxicidad (como es el caso de *bar* 101) se observó que la secuencia del minigen, así como el hecho de que esté completo (secuencia Shine-Dalgarno, codón de inicio, codón de paro, etc.) son elementos fundamentales en la determinación de la toxicidad. Con la finalidad de comprender el mecanismo por el cual los minigenes producen la caída de peptidil-tRNA, se construyeron minigenes artificiales basados en la estructura de *bar*, variando sólo el segundo de tres codones, teniendo después 63 variables del original. Se encontró que los minigenes varían entre sí en lo que se refiere a la toxicidad que generan al expresarse en un vector regulable y, con el uso de antibióticos, se corroboró que todos los minigenes, sin importar su letalidad, son traducibles (con excepción a los que tienen codones de paro en la segunda posición). Al medir la concentración del mRNA específico de los

minigenes, se vió que las bacterias transformadas con las construcciones portadoras de los más tóxicos, presentan una mayor concentración del RNA mensajero. Esto nos indicó que, al no existir una terminación correcta por parte de estos minigenes, el ribosoma quedó "estancado" en su posición, brindando estabilidad y protección al transcrito.

Introducción

Durante la infección los virus compiten con la célula huésped por la maquinaria de síntesis de macromoléculas. La síntesis de proteínas es uno de los mecanismos que los virus alteran para favorecer la síntesis de sus propias proteínas. En los virus animales se han descrito diversos mecanismos mediante los cuales se abate la traducción de la célula huésped. Entre estos mecanismos se tienen la degradación de mRNA celulares, la inactivación de factores de traducción, la producción de factores que específicamente inhiben la traducción celular o facilitan la traducción viral. Otros mecanismos incluyen el aumento en la síntesis de mRNA virales que por cantidad compiten por la maquinaria traduccional y cambios en el ambiente iónico intracelular que favorecen la traducción de mensajeros virales (Schneider, 1987). A pesar de que los virus de bacterias o bacteriófagos han sido ampliamente estudiados, poco se sabe acerca de cómo pueden apropiarse de la maquinaria de síntesis de proteínas de sus hospederos. En el caso del fago T4, se ha descrito la presencia de 8 nuevas especies de tRNA sintetizados por el fago, que optimizan la síntesis de sus proteínas, aunque los genes que codifican dichos tRNA no son esenciales para su desarrollo (Wilson y col., 1972).

En el caso del bacteriófago lambda, se sabe que durante la infección, existe inhibición parcial de la síntesis de proteínas del huésped, mientras que las proteínas del fago se sintetizan preferencialmente. El mecanismo de esta inhibición se desconoce. Existen reportes que sugieren que la expresión de la región del genoma del fago, entre los genes *exo* y *bet*, es importante para producir inhibición en la síntesis de proteínas, RNA y DNA del huésped (Cohen y Chang, 1970). El estudio de mutantes de *Escherichia coli* resistentes al crecimiento del fago lambda, ha resultado en un mejor entendimiento de los sistemas

de replicación del DNA, terminación de la transcripción, antiterminación y recombinación (Friedman y col., 1984).

Síntesis proteica

La síntesis proteica es uno de los procesos celulares más complejos hasta ahora conocidos que requiere de la participación de una compleja maquinaria molecular: el RNA mensajero, los ribosomas, los aminoacil-tRNA y varios factores proteicos de traducción. Para el inicio de la traducción, es necesaria la presencia de "señalamientos" en el mRNA, como el codón de iniciación que normalmente es AUG y la secuencia Shine-Dalgarno (SD), que es complementaria con el extremo 3' del RNA ribosomal 16S de la subunidad menor del ribosoma (Shine y Dalgarno, 1974; Jacob y col., 1987). La secuencia SD consiste de 3 a 9 bases contiguas en el mRNA que forma pares de base estándar (no incluyendo G-U) con algunas o todas las bases 1534 a 1542 (ACCUCCUUA) en el extremo 3' del rRNA 16S. Chen et al. (1994) han propuesto una manera de alinear mRNAs que interactúan con diferentes bases dentro de esta extensión de 9 nucleótidos, sus análisis indican un espaciamiento óptimo de 5 nucleótidos entre la secuencia SD y el codón de iniciación. La secuencia SD funciona, aunque con eficiencia reducida, cuando reside a un máximo de de 13 nucleótidos del codón AUG; pero existe evidencia que apoya la especulación de que una secuencia localizada considerablemente retirada "río arriba" puede servir como el elemento SD si es acercada al codón AUG por una estructura de tallo-asa.

Podría verse como sorprendente que los elementos SD en mRNAs naturales a menudo consisten de 3 o 4 bases, a pesar de la disponibilidad de 9 bases en el rRNA 16S. En algunos transcritos de prueba, la traducción mejoró cuando una secuencia SD corta fue alargada (Ringquist et al., 1992). Generalmente, una secuencia SD más larga que el promedio, aumenta la traducción sólo si el mRNA contiene estructura secundaria que

limite el acceso ribosomal al codón AUG (De Smit y van Duin., 1994a) o si un codón alternativo sustituye a AUG (Weyens et al., 1988). El requerimiento de una interacción SD de al menos 3 pares de bases es casi universal. En los casos raros donde el codón AUG está exactamente en el extremo 5' del mRNA, la iniciación es baja, pero detectable. La interacción SD podría no ser necesaria en tales casos, debido a que la localización 5' expone al codón AUG. A diferencia de AUG, un codón más débil como UUG o GUG no puede apoyar la iniciación cuando está posicionado exactamente en el extremo 5' del mRNA (Van Teten y Janssen, 1998). Existe un mecanismo, sin embargo, donde aún codones que no son AUG ,que carecen de una secuencia SD, pueden apoyar un nivel muy bajo de iniciación. Esto puede ser logrado mediante traducción pareada; por ejemplo, un cistron río arriba que termina cerca al codón de inicio UUG o GUG del cistron siguiente entrega ribosomas al sitio interno de inicio, el cual carece de un elemento SD y no puede reclutar ribosomas independientemente (Groeneveld et al., 1996). Como uno pudiera deducir, este mecanismo es usado para lograr una expresión limitada de proteínas que no deben ser sobreexpresadas.

Al promover la entrada del ribosoma mientras un mRNA está desplegado transitoriamente, la interacción SD también inhibe la reformación de estructuras secundarias que pudieran afectar el acceso al codón AUG (De Smit y van Duin, 1994a). Experimentos de sondeo químico sugieren que el rRNA permanece pareado con la secuencia SD aún después de la formación del primer enlace peptídico (Hüttenhofer y Noller, 1994). No se sabe exactamente cuándo se rompe el contacto. Tocando otro punto, es interesante que la secuencia anti-SD en el rRNA 16S ocasionalmente reemerge para estabilizar los complejos ribosoma/mRNA durante la elongación (Rettberg et al., 1999; Weiss et al., 1988). Con muchos mRNAs bacterianos, la iniciación depende simplemente

en la secuencia SD y que el codón AUG cercano sea accesible a los ribosomas (De Smit y van Duin, 1994b). En algunos casos, la iniciación es regulada por una proteína represora que atrapa al ribosoma en el sitio SD/AUG, en lugar de bloquear la entrada del ribosoma (Philippe et al., 1993; Spedding y Draper, 1993).

La traducción es a menudo regulada por pareo de bases entre el dominio SD/AUG de un cistron río abajo y parte de la secuencia codificadora precedente. El pareo es roto mientras los ribosomas avanzan a través del cistron río arriba, activando entonces el sitio de inicio río abajo (van Himbergen et al., 1993; Lesage et al., 1992). Esto implica que los ribosomas en fase de elongación pueden deshacer las estructuras secundarias que son inhibitorias para los ribosomas que entran; el pareo traduccional es un componente importante del mecanismo que coordina la síntesis de proteínas ribosomales (Keener y Nomura, 1996; Zengel y Lindahl, 1994).

En algunos casos, el pareo ocurre por un mecanismo de reiniciación en donde las subunidades ribosomales que han traducido el cistron río arriba son reutilizadas al comienzo del siguiente cistron (Blomberg et al., 1992; Govantes et al., 1998; Saito et al., 1994). Resultados de un estudio en *E. coli* sugieren que, siguiendo a la terminación, el ribosoma suelto puede "deslizarse" hacia delante o hacia atrás para localizar un sitio de reinicio (Adhin y van Duin, 1990). Estudios recientes apuntan hacia el papel potencial de los factores de terminación en el control de la reiniciación (Crawford et al., 1999; Janosi et al., 1998). Para iniciar la síntesis proteica es necesario que el mRNA esté alineado de tal forma que la síntesis comience en el codón correcto. Esto se logra mediante un complejo de iniciación 70S, formado por la subunidad 30S, la subunidad 50S, el mRNA y un metionil-tRNA específico, denominado tRNA iniciador ($tRNA_{i}^{Met}$). El tRNA iniciador se utiliza exclusivamente en el comienzo de la síntesis de proteínas. La formación del

complejo de inicio depende de la acción de tres factores de iniciación, denominados IF-1, IF-2 e IF-3. El primer factor que actúa es el IF-3, que tiene como función promover la disociación del ribosoma 70S en sus dos subunidades.

El IF-3 se une a la subunidad 30S y, aparentemente, provoca un cambio conformacional en la subunidad, de tal forma que esta ya no se puede asociar con la subunidad mayor 50S.

Los factores IF-1 e IF-2, también se unen a la subunidad 30S. El IF-2, que posee un sitio de unión para GTP, es capaz de distinguir específicamente el tRNA^{Met} de entre todas las otras moléculas de tRNA dentro del citoplasma de la célula.

Para que se una el tRNA^{Met} al IF-2 es necesario que se forme el complejo IF-2:GTP. El IF-1 facilita la acción de los factores IF-2 e IF-3. IF-3 contribuye a la fidelidad de la iniciación de una manera especial, desestabilizando complejos de iniciación que pudieran formarse transitoriamente en sitios débiles, tales como en los codones que no sean AUG (Butler et al., 1987; Sussman et al., 1996).

La subunidad 30S, junto con los otros factores de iniciación que están unidos a ella, es capaz de unir tanto el mRNA como el fMet-tRNA^{Met}. Una vez que están unidos el mRNA y el fMet-tRNA^{Met} se disocia el IF-3, completándose así la formación del complejo de iniciación 30S. A continuación la subunidad 50S se une al complejo de iniciación 30S, formándose un complejo de iniciación 70S activo, en el cual el mRNA y el fMet-tRNA^{Met} están unidos al ribosoma.

La proteína IF-2 (97 kDa, *E.coli* gen *infB*) es el principal factor involucrado en la selección y unión de fMet-tRNA a la subunidad ribosomal 30S. Esta proteína mantiene similitud estructural con el factor de elongación TU; IF-2 es una GTPasa latente que es activada cuando la subunidad 50S se une (Severini et al., 1991). La hidrólisis y consecuente

disociación del nucleótido de guanina activa la liberación de IF-2 del complejo ribosomal 70S, dejando atrás fMet-tRNA en el sitio P (Luchin et al., 1999; Maitra et al., 1982), y la liberación de IF-2 expone el sitio A para la entrada de aminoacil-tRNA.Tu.GTP.

La pregunta de que si la unión de IF-2 a la subunidad 30S precede o acompaña la unión de fMet-tRNA ha sido contestada de ambas maneras. Una hipótesis es que IF-2 se une a la subunidad 30S: la interacción entre IF-2 y fMet-tRNA podría entonces ocurrir , no en solución, sino sólo en la subunidad ribosomal. Esta idea fue apoyada por estudios de unión de tRNA (revisados por Gualerzi y Pon, 1990). Pero experimentos recientes in vivo, en donde la traducción de varios mRNAs fue hecha dependiente de formas mutantes de tRNA^{met} (Wu y RajBhandary, 1997), apoyan la idea de que IF-2 escolta activamente el tRNA iniciador a la subunidad 30S, similar a como Tu escolta otros tRNAs al ribosoma 70S.

La cuestión de que si la subunidad 30S se une al mRNA antes o después de unir IF-2.fMet-tRNA también ha sido contestada de ambas maneras. Experimentos in vitro han mostrado que el mRNA se puede unir débilmente a una subunidad ribosomal 30S que carece de fMet-tRNA (Hartz et al., 1991), pero experimentos in vivo recientes desafían la noción de que el mRNA se une primero (Wu et al., 1996). Este último estudio, que también hizo uso de tRNAs iniciadores mutantes, sugiere que las subunidades 30S usan un tRNA pre unido para seleccionar el sitio de inicio del mRNA.

Cuando se forma el complejo de iniciación 70S se hidroliza el GTP, se libera Pi y el IF-2:GTP y el IF-1 se disocian del complejo. El GDP se disocia del IF-2, de forma que el IF-2 está en disposición de unirse a otra molécula de GTP. Y el fMet-tRNA^{Met} se ubica en el sitio P del ribosoma, en donde puede reaccionar con el aminoacil-tRNA que ingresa, codificado por el segundo codón del mRNA en el sitio ribosomal A (Kosak, 1983).

El factor de elongación Tu (EF-Tu), el cual escolta a todos los otros tRNA al ribosoma 70S, no puede unirse eficientemente a la subunidad 30S aislada. IF-2 es el único factor de unión a tRNA capaz de actuar directamente sobre la subunidad 30S, y fMet-tRNA es el único tRNA reconocido por IF-2. Se observa que todas las cadenas polipeptídicas comienzan con metionina, conclusión que se mantiene aún cuando el codón de inicio es otro que AUG.

AUG es el codón de iniciación más común debido a que forma la interacción más estable con el anticodón CAU en fMet-tRNA, pero GUG y UUG son usados como codones de inicio en > 10% de genes bacterianos (Blattner et al., 1997). Una interacción de dos pares de bases con el anticodón aparentemente es suficiente con aquéllos codones que no son AUG. *Inf C* es el único gen de *E. coli* conocido que inicia con AUU. Dado que el exceso de IF-3 desfavorece la iniciación en sitios débiles, el uso de un codón no estándar para iniciar la traducción de IF-3 permite la autorregulación (Butler et al., 1987; La Teana et al., 1993). Es de notarse que, en todo el reino procarionte, un codón débil, que no es AUG, es usado para iniciar la traducción de IF-3 (Blattner et al., 1997), sugiriendo que la regulación estricta de niveles de IF-3 es importante.

Durante la fase de alargamiento de la cadena peptídica, se requiere del factor EF-Tu que lleva unido GTP. EF-Tu-GTP se une al aminoacil-tRNA para llevarlo al sitio A del ribosoma, el cual tiene unido el peptidil-tRNA en el sitio P. La liberación de EF-Tu del sitio A involucra la hidrólisis del GTP que está acoplada a la formación del enlace peptídico y que además requiere de la actividad de peptidil transferasa localizada en la subunidad ribosomal 70S. Para el funcionamiento del factor EF-Tu, se requiere del factor de alargamiento EF-Ts, que regenera la forma activa de EF-Tu, remplazando al GDP por GTP.

La fase final de un ciclo de alargamiento involucra la translocación del ribosoma que avanza tres nucleótidos sobre el mRNA dando como resultado la expulsión del tRNA no cargado del sitio P para remplazarlo por peptidil-tRNA que está siendo sintetizado. La translocación del ribosoma se lleva a cabo por el factor EF-G-GTP e implica la hidrólisis de GTP catalizada por el ribosoma (Lewin, 1990).

El evento de terminación de la síntesis de proteínas, ocurre cuando el codón que entra al sitio A del ribosoma es uno de los tres tripletes UAA, UAG o UGA. El reconocimiento de los codones de terminación no es mediado por moléculas de tRNA, sino que son reconocidos directamente por factores de terminación. En *E. coli* se han descrito dos factores de terminación, RF1 (Caskey y col., 1969) que reconoce a los codones UAA y UAG, y RF2 (Capecchi y Klein, 1969) que reconoce los codones UGA y UAA (Craig y Caskey, 1987).

Para la terminación de la síntesis de proteínas, se requiere la hidrólisis del polipéptido del peptidil-tRNA, localizado en el sitio P, la expulsión del tRNA final no cargado, la liberación del mRNA y el desensamblaje de las subunidades del ribosoma. (El mecanismo de la traducción se encuentra resumido en la Fig. 1).

Según estudios recientes (Karimi y col., 1998), los factores de iniciación IF1 e IF2 aceleran fuertemente la tasa de "drop-off" de peptidil-tRNAs con polipéptidos que contienen hasta siete residuos de aminoácidos; fenómeno que se vuelve más débil con polipéptidos más largos, y requiere GTP pero no su hidrólisis.

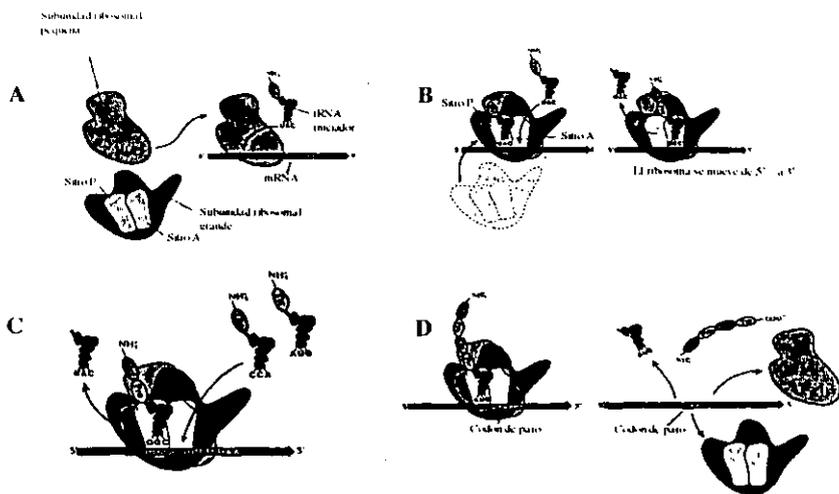


Fig. 1. Traducción.

Las 4 etapas básicas de la traducción: (A) En la iniciación, la subunidad ribosomal pequeña se une al mRNA, y el complejo de iniciación es completado después de que el tRNA iniciador (con metionina) se une. (B) La subunidad ribosomal mayor se une y el siguiente tRNA se une al sitio A; se forma el enlace peptídico y el complejo se mueve al sitio P. El ribosoma se mueve en dirección 5' a 3'. (C) Otro tRNA se mueve al sitio A en orden de añadir otro residuo a la cadena peptídica. (D) El ribosoma encuentra al codón de paro, ningún tRNA es atraído y el ribosoma se separa dejando al mRNA.

La caída de peptidil-tRNA Met pudo ser observada solamente en la presencia de tRNAMet deacilado, indicando una reunión rápida del peptidil-tRNA al sitio ribosomal P en este caso especial. Se sabe también que la sobreexpresión simultánea de IF1 e IF2 codificados en plásmidos inhibe el crecimiento de cepas bacterianas deficientes en la actividad de peptidil-tRNA hidrolasa, lo que sugiere que la caída de peptidil-tRNA dependiente de factores de iniciación puede ocurrir frecuentemente en la célula bacteriana. Surgieron dos razonamientos distintos acerca de esta inducción de "drop-off" por IF1 e IF2; el primero implica que el papel de los factores en la iniciación tiene el indeseable pero inevitable efecto secundario que también induce la caída del peptidil-tRNA, afectando por lo tanto los procesos celulares y la tasa de crecimiento. El segundo dice que posiblemente los dos factores de iniciación tienen funciones duales, lo que podría significar que fueron seleccionados positivamente por su habilidad de promover la iniciación de la traducción y catalizar la caída de peptidil-tRNA; podría ser que finaliza la síntesis de proteínas en etapas tempranas de la elongación bajo condiciones ligeras de "inanición". (limitación de tRNAs)

Existen sustancias con función antibiótica, cuya función básica es inhibir la síntesis de proteínas de los organismos sobre los cuales actúan; un efecto que tienen en común con la expresión de minigenes tipo *bar* en células deficientes en la enzima Pth.

La pactamicina es un potente inhibidor de la síntesis proteica, tanto en extractos como en células intactas de bacterias y eucariontes (Colombo et al. , 1966).

A 0° C la pactamicina se une rápidamente a un sólo sitio en la subunidad ribosomal 30S (ya sea que se encuentren con mRNA) y a ribosomas 70S libres, pero no a subunidades ribosomales 50S o a partículas 70S que porten mRNA (Stewart y Goldberg, 1973). Sin embargo hay una marcada diferencia en la unión con estas dos partículas; la unión con

las subunidades 30S ocurre con una alta afinidad, pero los ribosomas 70S se unen a la pactamicina sólo débilmente. La pactamicina estabiliza los polirribosomas bacterianos *in vivo* (Cundliffe y McQuillen, 1967), así como *in vitro* (Tai et al. , 1973), y deja peptidil-tRNA en los sitios ribosomales P, donde puede ser extraído con puromicina. En otros experimentos tratando a bacterias intactas (Cundliffe, 1972) con pactamicina, se previno la inhibición de la reacción con puromicina por la eritromicina.

En conjunto, estos datos indican que cuando la pactamicina inhibe la elongación de la cadena polipeptídica en bacterias, no lo hace mediante algún efecto sobre la reacción de peptidil transferasa o sobre la translocación. Lo que sugirieron Cundliffe y McQuillen, (1967) (Cundliffe, 1972) es que la pactamicina podría prevenir la unión funcional del aminoacil-tRNA al sitio ribosomal A, pero por falta de evidencia más directa se le considera una conclusión tentativa.

La eritromicina es un antibiótico que inhibe la síntesis de proteínas. Este compuesto se une a las subunidades ribosomales 50S (Taubman et al. , 1966) en la presencia de iones Mg^{2+} y K^{+} . El antibiótico no afecta las reacciones GTPasa ribosomales y tampoco inhibe la unión de aminoacil-tRNA a los ribosomas, con o sin el factor de elongación EF-Tu. Otros ensayos llevaron a la conclusión de que la formación del enlace peptídico no es el proceso principalmente afectado por este fármaco.

Se encontró que la eritromicina inhibe la translocación al observar que el fármaco no permite la liberación dependiente de translocación de tRNA deacilados de los ribosomas (Igarashi et al. , 1969), y la síntesis de tripéptidos ,pero no dipéptidos (Corcoran y Oleinick, 1969). La eritromicina no inhibe la reacción de la puromicina directamente *in vitro*, pero sí inhibe esa fase de la reacción dependiente de la presencia de los factores EF-G y GTP (Igarashi et al. , 1969). Se ha propuesto que la translocación abortiva, en

ribosomas con tRNA deacilado secuestrado en el sitio P, lleva a la pérdida de peptidil-tRNA en la presencia de eritromicina (Tanaka, 1973; Otaka y Kaji, 1975); entonces, muy posiblemente, este antibiótico inhibe la translocación, secuestrando tRNA deacilado en el sitio ribosomal P.

El cloramfenicol, un agente bacteriostático, fué el primer antibiótico de amplio espectro en ser usado clínicamente. Después de la observación de que el cloramfenicol inhibía la síntesis de proteínas en bacterias, se estableció pronto que en concentraciones bacteriostáticas no inhibía la síntesis de ácidos nucleicos, de peptidoglicanos de la pared celular o de polisacáridos. Este fármaco inhibe la síntesis de proteínas en extractos bacterianos con una potencia variable dependiente del templado usado (Gale y col., 1981). La primera demostración de que el cloramfenicol impide la reacción de formación del enlace peptídico fué hecha por Traut y Monro en 1964 (Gale y col., 1981); ensayos posteriores corroboraron que el cloramfenicol afectaba la función de peptidil transferasa.

El gen *pth* de *Escherichia coli*.

La enzima peptidil-tRNA hidrolasa es una hidrolasa específica que corta la unión éster entre el tRNA y residuos aminoacil N- sustituidos ya sea N-acetil o polipeptidil-tRNA (Cuzin y col. , 1967), y es incapaz de hidrolizar al N-formilmetionil-tRNA^{Met} aunque reconoce al N-acetilmetionil-tRNA_m^{met} (Kössef y RajBhandary, 1968). (Fig. 2)

Mutaciones en el gen que codifica a la enzima Pth afectan la traducción en la célula y su viabilidad. Así, una mutante llamada *pth*(Ts) muestra un crecimiento exponencial a los 30 °C, pero al cambiar a 43 °C, acumula peptidil-tRNA y sufre una inhibición en la síntesis de proteínas. (Atherly y Menninger, 1972; Hernández-Sánchez y col., 1998; Menninger, 1976).

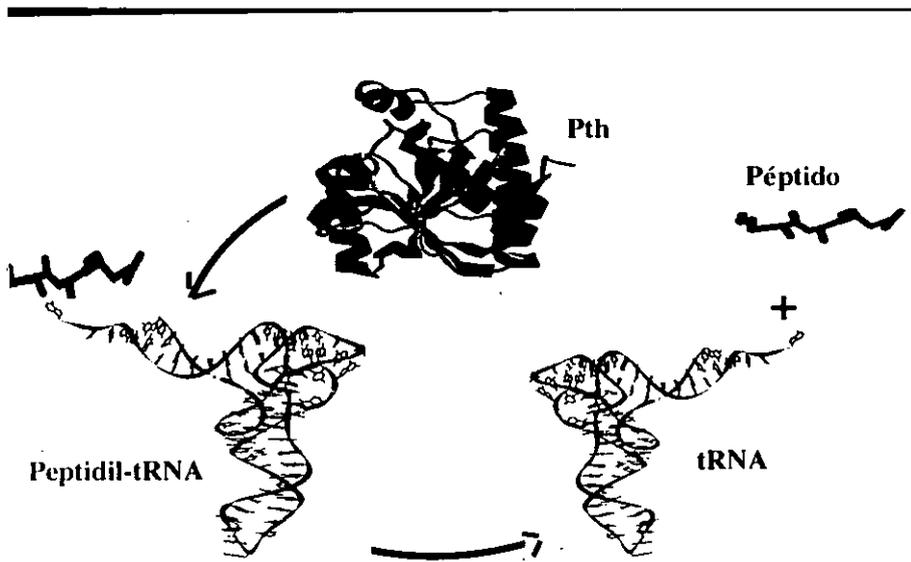


Fig. 2. Actividad de la Peptidil-tRNA hidrolasa (Pth).

La enzima peptidil-tRNA hidrolasa (Pth) tiene como función el hidrolizar al peptidil-tRNA, liberando así al péptido naciente y reciclando al tRNA para su reincorporación a las funciones celulares.

Por otra parte, se han aislado mutantes de *Escherichia coli* defectuosas en *pth*, denominadas *pth(rap)*, que impiden el crecimiento del fago lambda silvestre (Henderson y Weil, 1976; Guarneros y col. , 1987) . El aislamiento de mutantes del fago capaces de crecer sobre cepas rap y la ubicación de estas mutaciones definen 3 regiones en el genoma del fago denominadas *bar* (por blanco de acción de rap) . Las regiones descritas son: *barI* que se ubica sobre el sitio *attP*, *barII* localizada en la región *cIII-ssb* y *barIII* en la región de inmunidad (Guzmán y Guarneros, 1989). Una mutación en cualquiera de estas regiones permite al fago crecer en cepas rap. Un hecho que llama la atención es la similitud que existe entre la muerte bacteriana inducida por la transcripción de plásmidos *bar+* (Pérez-Morga y Guarneros, 1990) y la muerte de la mutante *pth^{ts}* descrita por Atherly y Menninger (1972). Cuando un cultivo de la mutante *pth^{ts}* creciendo en fase exponencial se incuba a 43° C, se observa que la síntesis de proteínas cesa entre los 6 y 8 minutos; sin embargo, la síntesis del RNA y DNA no se afectan. Esto sugiere que la deficiencia funcional de la mutante es a nivel traduccional, sin embargo, se han medido *in vitro* las fases de iniciación, elongación y terminación de la traducción en extractos de las mutantes termo sensibles sin encontrar alguna deficiencia funcional evidente más que en la actividad de la peptidil-tRNA hidrolasa, lo que sugiere que es una función esencial para la bacteria (Atherly y Menninger, 1972; Menninger y col. , 1973).

Se ha sugerido que los sustratos naturales de la enzima podrían ser los peptidil-tRNAs que se han separado prematuramente de los ribosomas. La mutación *pth(Ts)* es el cambio de Gly 101 por Asp, lo que causa una reducción considerable de su actividad en extractos celulares; la actividad es sensible a la incubación a altas temperaturas. (García-Villegas y col., 1991; Menninger y col., 1973)

A diferencia de la mutación *pth(rap)*, la mutación *pth(Ts)* no afecta la actividad específica de Pth pero genera una proteína altamente inestable in vivo; su concentración, ya disminuida a 32 °C, disminuye aún más a 43 °C. La sobreproducción de Pth(Ts) ayuda a las células mutantes a sobrevivir a temperaturas no permisivas; se ha propuesto que el exceso de enzima promueve la síntesis general de proteínas y, por lo tanto, su propia síntesis. (Cruz-Vera y col., 2000)

Secuencias *bar* del fago lambda

Los marcos de lectura abiertos de corto tamaño son relativamente abundantes en los genomas de todos los organismos hasta ahora estudiados. Algunos de estos mini-ORFs son potencialmente traducibles a péptidos pequeños funcionalmente activos, especialmente aquéllos encontrados en RNAs transcritos (mRNA, rRNA, etc).

Varios ejemplos estudiados muestran que la expresión de péptidos cortos específicos puede tener efectos dañinos para la célula. En estos casos el efecto fisiológico está mediado por la maquinaria de la síntesis proteica. Existe la evidencia contundente de que la expresión de minigenes de dos codones (*bar*), presentes de manera natural en el bacteriófago lambda, es tóxica en células con una actividad deficiente en peptidil-tRNA hidrolasa. La evidencia directa de la inhibición mediada por secuencias *bar* se obtuvo al construir plásmidos en donde se clonó un fragmento de 130 pb que contiene a la región *barI* bajo la transcripción iniciada en un promotor activo ya sea *pgal* o pL. Con el sistema de plásmidos se pudo ver que sólo cuando hay transcripción de la secuencia *bar* silvestre se observa el efecto letal, mientras que la transcripción de la secuencia con la mutación puntual *bar 101* o la transcripción de la región silvestre en sentido contrario al que ocurre in vivo en el fago no tiene ningún efecto letal (Guzmán y col., 1990). El hecho de que se

pueda reproducir en plásmidos el efecto inhibitorio de *bar* demuestra que no se requiere de la participación de otras funciones del fago para provocar la letalidad.

En la región *barI* se ha localizado una secuencia de repetidos invertidos, esta secuencia también está presente en la región *barII* en donde se encuentra un repetido invertido casi idéntico (12 de las 14 pb son iguales); se sabe que el repetido no es el único elemento que participa en el fenómeno, ya que por reconstrucción de la región *barI* con oligonucleótidos sintéticos se encontró que una secuencia de 21 pb (5'-TATATTGATATTTATATCATT-3') impide el mantenimiento de plásmidos en cepas *rap* (Guzmán y col., 1990). Al estudiar el mecanismo de la letalidad mediada por secuencias *bar* presentes en plásmidos, Pérez-Morga y Guarneros (1990) reportaron que durante la transcripción de secuencias *bar* silvestres en una bacteria *rap*, el RNA *bar* tiene una vida media 3.5 veces mayor que en la cepa bacteriana silvestre, además, se presenta una inhibición de la expresión de los genes contenidos en los plásmidos *bar* aunque el RNA mensajero está presente. Se observa también una inhibición general de la síntesis proteica de la bacteria medida como incorporación de [³⁵S]-metionina posterior a la inducción de transcripción de *bar*, así como en la obtención de un patrón bidimensional de proteínas alterado. Con base en esto se ha propuesto que la transcripción a través de las regiones *bar* o la acumulación del RNA *bar* provoque una inhibición generalizada en la síntesis de proteínas de la bacteria que culminaría en la muerte celular (Pérez - Morga y Guarneros, 1990).

Se ha propuesto que los transcritos de *bar* de alguna manera inhiben o depletan una función bacteriana en la mutante *rap* y que esta función pudiera ser la de la peptidil-tRNA hidrolasa, una enzima involucrada en la síntesis de proteínas (Guzmán y col., 1990; Pérez-Morga y Guarneros, 1990). La transcripción de las regiones *barI* y *barII*

produce moléculas de RNA que contienen secuencias del tipo Shine-Dalgarno (SD), seguidas por el codón de inicio de la traducción AUG, un segundo codón con sentido y la señal de paro traduccional. Existen experimentos que indican que los transcritos son traducidos, produciendo fMet-Ile-tRNA^{Ile}, pero la liberación del dipéptido dada por los factores de terminación RF1 y RF2 es parcialmente defectuosa, llevando a la caída de dipeptidil-tRNA^{Ile} y a la escasez letal de tRNA^{Ile} (Hernández-Sánchez y col., 1998).

Estudios recientes muestran que múltiples parámetros relacionados a la secuencia del transcrito del minigen contribuyen al efecto inhibitorio del crecimiento (Dinçbas y col., 1999). Entonces, cuando los sitios de unión al ribosoma relativamente débiles de las regiones naturales SD *bar* son reemplazadas por una secuencia SD que interactúa fuertemente con el rRNA 16S, la expresión de un minigen puede ser letal aún en células con Pth del tipo silvestre, lo que confirma las observaciones de Tenson y col., (1999). En parte, esto se debe al aumento de la probabilidad de que los ribosomas retraduzcan el mismo mini mRNA sin disociarse de él después de la liberación del péptido. Otros parámetros que parecen afectar la tasa de acumulación de peptidil-tRNA son: la eficiencia de la terminación, la tasa de "drop-off" y la tasa de hidrólisis del peptidil-tRNA resultante por la Pth; estos parámetros parecen variar (o sus efectos) de acuerdo al último codón traducible en el mini mRNA, al codón de paro presente y al nucleótido posterior al codón de paro (Dinçbas y col., 1999). Así, en la mutante *barII* (*bar* 205), la sustitución de una base que modifica el segundo codón del ORF de AUA a AUG fué tan poco tóxica como la mutación *bar* 101 (llamada después A704). (Fig 3)

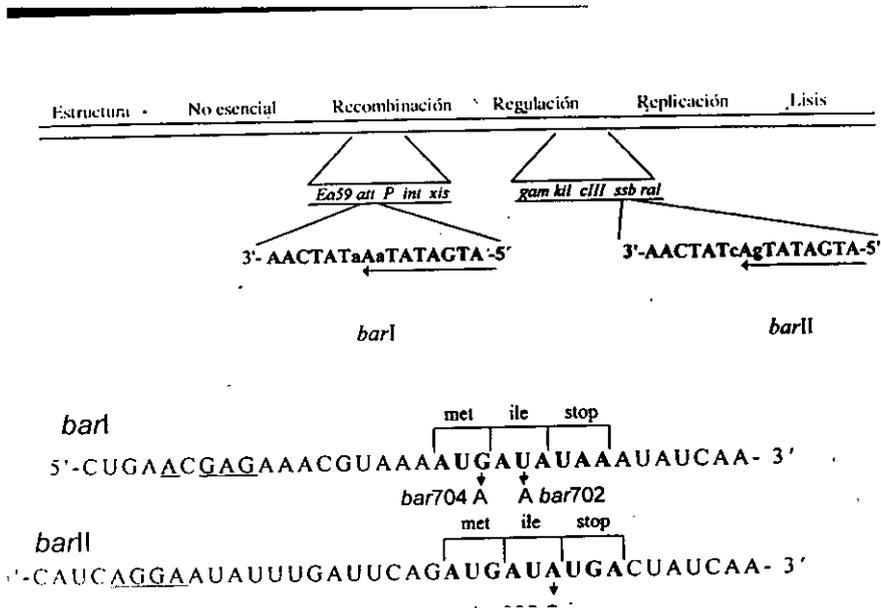


Fig. 3. Minigenes *bar* en el DNA de λ .

Los minigenes *barI* y *barII* son minigenes que ocurren naturalmente en el genoma del fago λ . (A) se muestran las regiones *barI* y *barII*, la primera se encuentra dentro del ciclo de replicación, y *barII* cerca del final del sitio de regulación del fago. (B) se observan las diferencias entre las secuencias de *barI* y *barII*, así como las mutaciones *bar 704*, *bar 702* y *bar 205*. En *bar 704* el codón de inicio es cambiado de met a ile; en *bar 702* el segundo codón es cambiado de ile a lys, y en *bar 205* el segundo codón es cambiado de ile a arg. Hernández, J., Ontiveros, C., Valadez, J. G., Buckingham, R. H. y Cuarneros, G. 1997. Regulation of protein synthesis by minigene expression. *Biochimie*. 79: 527-531.

Así, otras mutaciones como *bar1* 701 y G703; donde se cambia el segundo codón AUA (Ile) por AAA (Lys) y GUA (Val), respectivamente, resultaron débilmente tóxicas (Valadez et al., 2001).

Durante el proceso de la síntesis de proteínas existe una reacción que puede competir con la terminación normal (la liberación del péptido al citoplasma mediante la hidrólisis en el ribosoma de la unión éster entre el tRNA y el péptido en sí (Hershey, 1987; Buckingham y col., 1997)), donde el peptidil-tRNA se disocia del ribosoma antes de la hidrólisis de la unión éster (Menninger, 1976; Hernández y col., 1997; Heurgué-Hamard y col., 1998). Entonces el peptidil-tRNA es hidrolizado por la enzima peptidil-tRNA hidrolasa (Pth), permitiendo que el tRNA libre pueda volver a cargarse y ser reutilizado en la síntesis proteica. Esta disociación prematura de peptidil-tRNA del ribosoma es conocida como "drop-off", y es una acompañante normal de la síntesis de proteínas, lo que vuelve a la Pth una enzima esencial para el crecimiento y supervivencia de las células (Atherly y Menninger 1972; Schmitt y col., 1997).

Sin embargo, este fenómeno de "drop-off" no está asociado solamente a los componentes moleculares antes mencionados, ya que trabajos recientes han demostrado que existen dos grupos de proteínas que pueden catalizar este proceso. El primer grupo son tres factores involucrados en el reciclamiento ribosomal (Karimi y col., 1999): el factor de terminación RF3, el factor de reciclamiento ribosomal RRF y el factor de elongación EF-G, siendo este último el que cataliza principalmente la translocación de peptidil-tRNA del sitio A al sitio P (Haenni y Lucas-Lenard, 1968).

El segundo grupo de moléculas que estimulan el "drop-off" son los factores de iniciación IF1 e IF2 (Karimi y col., 1998). Se ha visto que las mutaciones que reducen los niveles de expresión de RRF, y otras que inactivan RF3, reducen el "drop-off" *in vivo* (Heurgué-

Hamard y col., 1998). En el caso de las 3 proteínas RF3, RRF y EF-G, se ha observado que en ensayos *in vitro* pueden estimular la disociación precoz de peptidil-tRNA, aumentándola al menos unas 30 veces (Dinçbas y col., 1999).

A pesar de que los experimentos *in vivo* ofrecen pruebas convincentes de la importancia fisiológica de RRF y RF3 en la reacción de "drop-off", todavía se desconoce si su papel en la estimulación de la caída de peptidil-tRNA se limita a péptidos cortos o a un mayor rango de longitudes de cadenas peptídicas.

Cuando la tasa de "drop-off" excede la capacidad de reciclamiento del tRNA secuestrado como peptidil-tRNA, ocurre un efecto de "inanición" en la célula al faltar tRNAs isoaceptores, lo que lleva a la inhibición traduccional.

En el siguiente trabajo se optó por el análisis de minigenes de dos codones, manejando en las construcciones una misma secuencia Shine-Dalgarno, un mismo codón de paro, así como un mismo promotor y terminador. Esto limitó todas las variables del problema a sólo una: la naturaleza del segundo, y en este caso, último codón del minigen.

Hipótesis

La toxicidad de un minigen depende del último codón traducible.

Objetivo general

Comparar la toxicidad de los minigenes de dos codones del tipo AUG NNN UAA.

Objetivos particulares.

- Usar las clonas de los 64 minigenes de dos codones en un vector con un promotor transcripcional regulable para evaluar la toxicidad en cepas *pth(Ts)* y *pth(rap)* de todas las secuencias.
- Cuantificar el mRNA de los minigenes producido en células transformadas con los plásmidos portadores de los diferentes minigenes.
- Valoración de la concentración de peptidil-tRNA en minigenes tóxicos y no tóxicos.
- Determinar si la toxicidad de un minigen en particular se altera al sobreexpresar en el mismo sistema el tRNA específico para ese minigen .

MATERIAL Y METODOS GENERALES.

Cepas bacterianas y plásmidos utilizados.

Cepas de *E. coli* utilizadas.

Cepa	Genotipo	origen
P90C	<i>F- ara Δ(gpt-lac)</i>	Guarneros y col., 1987.
P90Cϕth(rap)	<i>F- ara Δ(gpt-lac) pth(rap)</i> <i>zch::Tn10</i>	Tenson y col., 1999.
C600	<i>Thr1 leu6 thi1 supE44 tonA</i> <i>lacY1</i>	Colección del laboratorio de Gabriel Guarneros.
C600ϕth(rap)	<i>pth(rap) zch::Tn10</i>	García-Villegas y col., 1991
C600ϕth(Ts)	<i>pth(Ts) zch::Tn10</i>	García-Villegas y col., 1991.

Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmidos	Genotipo	Fuente
PI489	Se obtuvo clonando <i>ileX</i> en PDPT489	Del Tito y col., 1995.
PDC952	Un derivado de pACYC184 que contiene <i>argU</i> .	James Walker, University of Texas.
PY489	<i>Lys V</i> clonado en pDPT489.	Laboratorio del Dr. Gabriel Guarneros.
PDPT489	Cm^r	Del Tito y col., 1995.
PKQV4	$LacI^q$ Amp^r	Strauch y col., 1989.
PACYC	Cm^r Tet^r	New England Biolabs
PGREC	$Pth(silvestre)$ Cm^r Tet^r	Guillermina Rosas, comunicación personal. El fragmento de 750 pb BamHI-ScaI del plásmido pGI01 fué clonado en los sitios BamHI-EcoRV del plásmido pACYC.

Medios de cultivo. Los medios de cultivo y las soluciones que lo requieren fueron esterilizados en autoclave durante 20 minutos a 121°C y 15 libras de presión. Se les agregó, después de enfriarse a 50°C, el antibiótico de selección adecuado. Condiciones distintas a éstas serán señaladas.

Los medios de cultivo empleados fueron los siguientes:

-Medio Luria-Bertani (LB), por litro: 10 g de Triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl. Cuando se utilizó en placas se agregaron 15 g de agar.

-Medio SOB, por litro: 20 g de Triptona, 5 g de extracto de levadura. Posteriormente a la esterilización se adicionó 2 ml de una solución de $MgCl_2$ 2M.

-SM (Buffer de dilución para bacterias), por litro: 1.21 g de Tris base, 1.2 g de $MgSO_4$ y 0.1 g de gelatina. Se ajusta el pH a 7.4 con HCl concentrado.

-Medio S-100, se prepararon por separado las siguientes soluciones: Solución I: 10 g de peptona, 23.8 ml de glicerol, 33 mg de $CaCl_2$, 10 mg de gelatina, 1 g de NH_4Cl y 0.3 g de $MgSO_4$ en 50 ml de agua destilada. Solución II: 5 g de glucosa en 50 ml de agua destilada. Solución III: 9 g K_2HPO_4 y 3.45 g de KH_2PO_4 en 30 ml de agua destilada. Después de esterilizar las soluciones se mezclaron a una temperatura de 45°C aproximadamente y se aforó la solución combinada con agua estéril a la misma temperatura.

Enzimas y condiciones para la clonación molecular. Todas las enzimas de restricción y la DNA ligasa de T4 se adquirieron de New England Biolabs y Bethesda Research Laboratories. Las enzimas fueron utilizadas en las concentraciones y en los buffers de acuerdo a las temperaturas que establecen los fabricantes. Los fragmentos de DNA utilizados en las clonaciones se eluyeron de

geles de agarosa mediante electroelución en una cámara de marca BRL; se utilizó como buffer de corrida 0.5 X de TBE (5X: 54 g Tris base, 27.5 g ácido bórico y 20 ml de EDTA pH 8). Las muestras se recolectaron en 150 µl de una solución de acetato de amonio 7.5 M y se precipitaron con 2.5 volúmenes de etanol.

Construcción de minigenes sintéticos.

64 oligonucleótidos de cadena sencilla fueron sintetizados manteniendo constantes el primer codón (codón de inicio AUG), y el tercer codón (codón de paro UAA), variando únicamente la secuencia del segundo codón de manera que en esta posición se obtuvieran los 64 codones posibles. Estos oligonucleótidos contenían en sus extremos 5' y 3' las secuencias para las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII* respectivamente como sigue : 5'-AATTCATGNNNTAAATA-3'. Se sintetizaron también los 64 oligonucleótidos complementarios a los anteriormente descritos:

5'-AGCTTATTTANNNCATG-3'.

400 pmoles de cada uno de los oligonucleótidos fue hibridado con su complementario en 50 mM de MgCl₂ y 50 mM de Tris-HCl pH7 a 65°C por 10 minutos en un volumen de 100µl, dejando enfriar a temperatura ambiente por una hora. 80 fmoles del vector de expresión PKQV4 fueron ligados con 225 fmoles de oligos hibridados, con 1U de DNA ligasa de T4 (Gibco BRL), incubando a 16 °C a lo largo de una noche. Las células P90C fueron transformadas con estas ligaciones. Las transformantes fueron aisladas y crecidas en medio LB por una noche y el DNA fue extraído con el Concert Rapid Plasmid Miniprep System (Gibco BRL) para su secuenciación. La secuenciación se realizó utilizando el Big Dye Sequencing Kit de Perkin Elmer, con 1 µg de DNA, utilizando el oligonucleótido 510 (5'-GACATAACGGTCTGGC-3', PKQV4) con el siguiente ciclaje: 96 °C 30" (1 ciclo), (96

°C 30", 53 °C 20", 60 °C 4") 30 ciclos. Estas reacciones fueron purificadas con las columnas Centrisep (Perkin Elmer) y analizadas en el ABI PRISM 310. La construcción fué iniciada por Benito Aguilar Carrillo y posteriormente la labor continuó a manos de Helena Hernández Ramón. (Comunicación personal) (Fig. 4)

Transformación.

Utilizamos el método descrito por Hanahan (1983). Inicialmente las células se hicieron competentes para la transformación a partir de cultivos crecidos en medio SOB con una O. D. de 0.5 a 600 nm. A partir de 30 ml del cultivo se recolectaron las células por centrifugación y se resuspendieron en 10 ml del buffer TFB I (30 mM de acetato de potasio, 100 mM de RbCl₂, 10 mM de CaCl₂, 50 mM de MnCl₂, glicerol al 15% y 3 mM de hexacloruro de cobalto; pH 5.8), después de 10 minutos de incubación a 0°C se recolectaron nuevamente. Las células se resuspendieron en 4 ml del buffer TFB II (10 mM de MOPS o PIPES, 75 mM de CaCl₂, 10 mM de RbCl₂, glicerol al 15% y 3 mM de hexacloruro de cobalto; pH 6.5). Las células se alicuotaron y se guardaron a -20°C. De la suspensión en TFB II, se tomaron 100 µl y se incubaron junto con el plásmido de interés durante 30 minutos a 0°C, posteriormente se pasó la mezcla a 37°C durante 5 minutos regresando dicha mezcla a los 0°C; se le adicionó después de 5 minutos 1 ml de LB o LB con Ampicilina [LB-Amp (50 µg/ml)] y se dejó incubar a 37°C con agitación durante 1 hora. Los tubos se centrifugaron a 10000 rpm en una centrifuga Eppendorf, se eliminó la mayor parte del sobrenadante y con el remanente se resuspendieron para espátularse en las cajas de medio adecuado.

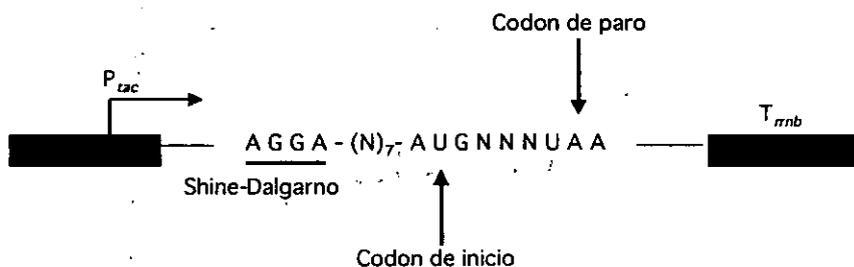


Fig. 4. Estructura de los genes artificiales tipo *bar* portadores de los 64 posibles codones en la segunda posición.

La estructura de los 64 minigenes artificiales tipo *bar* es la misma en todos los casos, varía solamente el segundo codón del gen (marcado en negritas). La construcción cuenta con el promotor *P_{tac}*, el cual es inducible por la presencia de IPTG. La secuencia Shine-Dalgarno fué la misma en todos los casos (AGGA), encontrándose siempre a una distancia de 7 bases del codón de inicio. El codón de paro fué UAA, ya que es el que se encuentra en el minigen *bar*.

Valoración de la toxicidad y cinéticas de crecimiento.

Para valorar la toxicidad de los minigenes en las cepas deficientes en Pth se estrió una colonia en cajas de LB-Amp en las cuales previamente se espatularon 200 μ l de Luria con IPTG (100 mM). Las cajas fueron incubadas durante 48 horas a temperatura ambiente y durante 24 horas a 32°C y 34°C.

Para evaluar la cinética de crecimiento, la cepa problema se cultivó usando una dilución 1:50 del cultivo inicial hasta una O.D. de 0.4 (600 nm). De los cultivos se tomaron muestras de 0.1 ml cada 30 minutos hasta completar 3 horas (Se consideró el tiempo 0 minutos cuando el cultivo llegó a una $O.D._{600} = 0.4$ en donde se adicionó el IPTG). Se hicieron diluciones en medio SM y de éstas se tomaron 0.1 ml y se espatularon sobre cajas de medio LB y LB - ampicilina (50 μ g/ml), por duplicado. Las cajas se incubaron a 32 °C durante toda la noche y las colonias se contaron con el cuenta colonias (Miller, 1972).

Aislamiento de RNA total.

El RNA fue preparado a partir de 10 ml del cultivo por el método de fenol caliente descrito por Portier y col.(1987). Se tomaron 10 ml de cultivo con una OD. de 0.5 a 600 nm y se recolectaron las células por centrifugación, posteriormente se resuspendieron en 3 ml de la solución de rompimiento (0.15 M de sacarosa, 0.02 de acetato de sodio y SDS al 1%) y 3 ml de fenol ácido pH 5. La mezcla se incubó a 65°C con agitación durante 10 minutos, se separaron las fases y se extrajo nuevamente con 3 ml de fenol. Posteriormente se adicionaron 3 ml de cloroformo y después de separar las fases, la solución final se precipitó con 0.6 volúmenes de isopropanol. Los precipitados obtenidos se resuspendieron en agua y se reprecipitaron con 2.5 volúmenes de etanol. El precipitado se resuspendió en 100 μ l de agua (\approx 100 μ g de RNA).

Northern Blots. El RNA total fue separado por electroforesis en un gel al 1.5% de agarosa/2.2 M de formaldehído, y posteriormente transferido a una membrana de nylon (Hybond-N, Amersham) como recomienda el fabricante (Manson y Williams, 1985). Las membranas fueron hibridadas a 55°C usando 5X de SSPE (0.9M de NaCl, 0.05M de fosfato de sodio y 0.004M de EDTA pH 7.7), 0.5% de dodecil-sulfato de sodio (SDS), 100 µg/ml de DNA de espermatozoos de salmón, 40% de formamida y 5X de solución de Denhart's (2% de albúmina de suero bovino (BSA), 2% de Ficoll y 2% de Polyvinyl-Pyrrolidona). Después de 16 horas de incubación, las membranas fueron lavadas dos veces a 55°C con 2X de SSPE/0.1% de SDS, un lavado a 65°C con 1X de SSPE/0.1% SDS y por último un lavado a 65°C con 0.1% de SSPE/0.1% de SDS. Después, la membrana fue expuesta a una película de rayos X (Hyperfilm-MP, Amersham).

Medición de peptidil-tRNA.

La extracción y procesamiento del tRNA fueron realizados según los métodos de Umesh Varshney et al., 1991.

Aislamiento de tRNA de E. coli bajo condiciones ácidas- Se inoculó medio 2YT (4 ml), conteniendo 50µg/ml de ampicilina y 25µg/ml de kanamicina, con 0.2 ml de un cultivo fresco, dejado crecer una noche, de transformantes CA274 de *E. coli*. Se incubó por 3 horas a 37 °C en rotación, y se enfrió en hielo. Todos los pasos subsecuentes se realizaron en frío. Las células fueron centrifugadas a 4°C, resuspendidas en 0.3 ml de acetato de sodio 0.3 M (pH 4.5) y Na₂EDTA 10mM, transferidas a tubos Eppendorf de 1.5 ml, y se sometieron a 2 extracciones con volúmenes iguales de fenol equilibrado con el mismo buffer. Durante la primera extracción, las células fueron agitadas mediante un "vortex" 3 veces por períodos de 30, 60 y 60 segundos, con intervalos de 60 segundos entre cada agitación. Después de centrifugar por 10-15 minutos en una microcentrífuga

Eppendorf, la fase acuosa fué transferida a nuevos tubos con 0.3 ml de fenol, se agitaron mediante un "vortex" por 60 segundos y centrifugaron posteriormente por 10 minutos. La fase acuosa fué transferida a nuevos tubos, se mezcló con 2.5 volúmenes de etanol y se dejó en hielo por 1-2 horas. Se recuperaron ácidos nucleicos totales mediante centrifugación por 15 minutos. La pastilla fué disuelta en 60µl de acetato de sodio 0.3M (pH 4.5). Los ácidos nucleicos fueron reprecipitados con 2.5 volúmenes de etanol, se dejaron en hielo por 2-3 horas y se recuperaron mediante centrifugación por 15 minutos. La pastilla fué disuelta e 20µl de acetato de sodio 10mM (pH 4.5) y Na₂EDTA. Una alícuota (1.5µl) fué utilizada para medir absorbancia a 260nm, y otra alícuota (1µl) fué usada para estimar la calidad de la preparación de tRNA mediante electroforésis en un gel de agarosa al 1.2% con bromuro de etidio (1µg/ml). El material restante fué dividido en alícuotas, congelado rápidamente en hielo seco y almacenado a - 80°C. La obtención de tRNA total de un cultivo de 4ml fué de aproximadamente 0.25 A₂₆₀ unidades.

Electroforésis de tRNA en geles ácido/urea y electrotransferencia a una membrana de Nitran- Se adaptaron las condiciones para la electroforésis según lo descrito por Ho y Kan (1987). Ya que se introdujeron varias modificaciones al protocolo sugerido, se describe a continuación el procedimiento modificado en detalle. Se mezcló tRNA (1.0 µl, ~0.01 A₂₆₀ unidades) con 1.5 µl de buffer de prueba (acetato de sodio 0.1 M (pH 5.0), urea 8M, azul de bromofenol al 0.05% y xilen cianol al 0.05%) y se fraccionó en gel de poliacrilamida al 6.5% con 0.4mm de espesor (19:1 acrilamida:bisacrilamida) conteniendo urea 8M en buffer de acetato de sodio 0.1M (pH 5.0). La electroforésis a 500V (~12V/cm) fué realizada en un cuarto frío hasta que el colorante del azul de bromofenol alcanzó el fondo del gel (20-24 h). La porción del gel entre el xilen cianol y los colorantes del azul

de bromofenol, que contenía los tRNAs de interés, fué electrotransferida a una membrana de Nitran (Schleicher & Schuell) usando un aparato de electrotransferencia Hoefer a 20 V por 90 minutos con trisacetato 40mM, Na₂EDTA (pH 8.1) 2mM como buffer de transferencia. La membrana fué enjuagada brevemente con 4 X SET (1 X SET = NaCl 0.15M, Tris.HCl 0.03M y Na₂EDTA 2mM (pH 8.0)) y después horneada a 70°C por 2-3 horas.

Detección de tRNA^{Met}_{CUA} mutante mediante hibridación northern Blot- tRNAs mutantes fueron detectados mediante hibridación a una sonda de oligodeoxiribonucleótido marcada con 5'-³²P (~1-2 x 10⁶ cpm/ml) complementaria a los nucleótidos 29-47 de los tRNAs mutantes. Ya que los tRNAs mutantes con el anticodón CUA difieren del anticodón silvestre (CAU) en dos posiciones, la sonda de 19 nucleótidos de largo es específica para la detección de tRNAs mutantes. En algunos experimentos, una sonda de DNA, marcada con 5'-³²P, complementaria a los nucleótidos 2-44 del tRNA supresor ámbar de tirosina en *E. coli* fué usado como control interno y para la normalización de la cantidad total de tRNAs mutantes relativa al tRNA de tirosina. Debido a que esta sonda es de 48 nucleótidos y tiene una sólo variación ("mismatch") con el tRNA^{Tyr} silvestre, hibrida con los tRNAs silvestres de tirosina de *E. coli*.

Las membranas fueron prehibridadas a 42°C por ~4h en una solución (15 ml/17 x 13-cm de membrana) que consistía de 4 x SET, 250 µg/ml de DNA de esperma de salmón desnaturalizado y cortado, dodecil sulfato de sodio al 0.1% y solución de Denhardt 10X (Solución de Denhardt 1X= albúmina de suero bovino al 0.02%, polivinilpirrolidona 40 al 0.02% y Ficoll al 0.02%). La hibridación se llevó a cabo durante toda una noche a 42°C en la misma solución (10ml) con las sondas mencionadas anteriormente. Las membranas

fueron lavadas 4 veces por 30 minutos a temperatura ambiente con SET 3x y dodecil sulfato de sodio al 0.1 % y se autorradiografiaron.

RESULTADOS

Obtención del banco de minigenes de dos codones.

Inicialmente se propuso obtener el banco por medio de la clonación de oligonucleótidos sintetizados al azar, modificando el segundo codón (ver material y métodos). La ligación fue transformada directamente a la cepa C600 *pth(rap)* y posteriormente las clonas individuales fueron evaluadas en su crecimiento en presencia de IPTG. Con esta técnica se obtuvieron sólo 43 clonas diferentes de las cuales sólo diez fueron poco letales o no tóxicas para la cepa *pth(rap)*: todos los codones de Gly; UCC y UCG; UGC, UGA, UAA y GCG, los 20 codones restantes fueron sintetizados individualmente y de ellos cinco clonas fueron poco letales o no tóxicas para la cepa *pth(rap)*: GCU, GCC, GCA y UGU. Con estos resultados creemos que la selección no fue preferente a ningún tipo de toxicidad. Sin embargo sólo el 25% de las clonas fueron poco letales.

Toxicidad de los minigenes de dos codones.

Para poder clasificar mejor a los minigenes de dos codones por su grado de toxicidad utilizamos además de la cepas C600 *pth(rap)* a la cepa C600 *pth(Ts)*, debido a que ambas son sensibles a la producción de peptidil-tRNA, pero, la *pth(Ts)* tiene una mayor actividad de Pth (Cruz-Vera, et al., 2000). Tanto la cepa C600 como sus mutantes en *pth* fueron transformadas con las 64 construcciones portadoras de los minigenes; se indujo la expresión de estos con IPTG y se valoró el crecimiento de las cepas a tres diferentes temperaturas (material y métodos). Observamos que existían tres fenotipos cuando las células crecieron a 32°C (Fig. 5): a) algunos minigenes eran

letales para las cepas mutantes pero no para la cepa silvestre en Pth (codón CGA); b) otros sólo eran letales para la cepa +*pth(rap)* (codón CGT) y otros no eran tóxicos aun en la cepa *pth(rap)* (codón CGC). En base a diferencias como estas se clasificaron los 64 minigenes en seis grupos según el grado de inhibición que conferían al crecimiento bacteriano (Tabla I); el primer grupo abarca a los minigenes que son tóxicos para las cepas *pth(rap)* y *pth(Ts)* a cualquier temperatura; el grupo dos son aquéllos minigenes que no son tóxicos para la cepa *pth(Ts)* a temperatura ambiente y tóxicos para los demás casos; aquéllos minigenes que resultan medianamente tóxicos para la *pth(Ts)* y tóxicos para *pth(rap)* se encuentran en el grupo tres; el grupo cuatro son aquéllos minigenes que resultan ser no tóxicos para la cepa *pth(Ts)* y tóxicos en los demás casos; los que resultan ser sólo medianamente tóxicos para la cepa *pth(rap)* están en el grupo cinco; y el grupo seis son los minigenes que no muestran toxicidad alguna.

En el caso de los minigenes del grupo 1 se usó otra metodología para diferenciar la toxicidad entre ellos, midiendo halos de inhibición de crecimiento en cajas de petri (ver material y métodos, Figura 6). Tanto el minigen AUA como el minigen AAA muestran halos de similar tamaño en la cepa *pth(rap)*, sin embargo en la cepa C600 *pth(Ts)* el halo de inhibición provocado por el minigen AUA es más reducido que el de AAA. Usando esta metodología observamos que el minigen cuyo segundo codón es AAA (Lys), es el más tóxico de todos los del grupo 1.

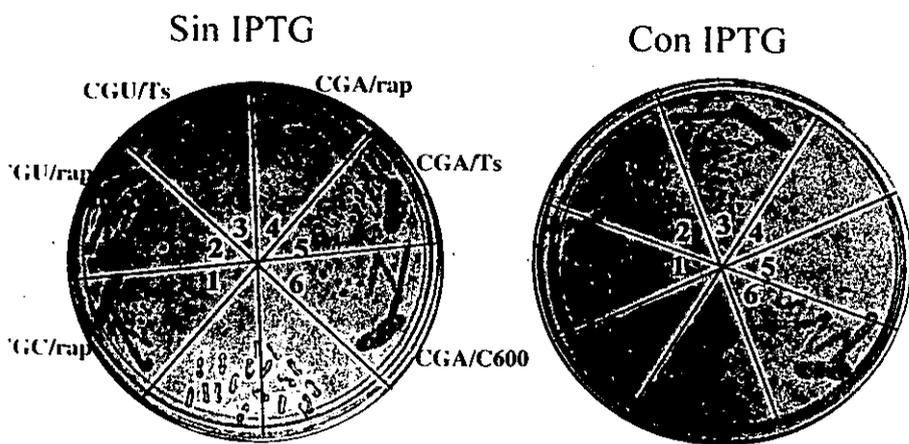


Fig.5. Crecimiento de las cepas C600 y sus mutantes en *pth* durante la sobreexpresión de minigenes con los codones CGA, CGC y CGU. Los cultivos bacterianos de las cepas C600/CGA(6), C600 *pth*(Ts)/CGA(5), C600 *pth*(rap)/CGA(4), C600 *pth*(Ts)/CGU(3), C600 *pth*(rap)/CGU(2) y C600 *pth*(rap)/CGC(1) se crecieron durante 16hrs. a 32°C en presencia de 1mM de IPTG.

Tabla. 1. Clasificación de la toxicidad de los minigenes artificiales de dos codones tipo *bar* al expresarse en las cepas mutantes C600 *pth*(Ts) y C600 *pth*(rap) a diferentes temperaturas.

GRUPO 1

CODÓN	ANTICO DÓN	AMINO ACIDO	rap 32° C	Ts 34°C	Ts 32°C	Ts T.A.
AAA	U*UU	Lys	-	-	-	-
CGA	ICG	Arg	-	-	-	-
AGA	U*CU	Arg	-	-	-	-
AGG	CCU/ U*CU	Arg	-	-	-	-
AUA	LAU	Iso	-	-	-	-

GRUPO 2

CODÓN	ANTICO DÓN	AMINO ACIDO	rap 32° C	Ts 34°C	Ts 32°C	Ts T.A.
ACA	U*GU	Thr	-	-	-	+/-
ACU	GGU	Thr	-	-	-	+/-
ACC	GGU	Thr	-	-	-	+/-
ACG	CGU	Thr	-	-	-	+/-
AAU	QUU	Asn	-	-	-	+/-
AAC	QUU	Asn	-	-	-	+/-
AAG	U*UU	Lys	-	-	-	+/-
AUC	GAU	Iso	-	-	-	+/-
AUU	GAU	Iso	-	-	-	+/-
AGU	GCU	Ser	-	-	-	+/-
GUG	U*AC	Val	-	-	-	+/-
GUA	U*AC	Val	-	-	-	+/-
UAC	QUA	Tyr	-	-	-	+/-
UAU	QUA	Tyr	-	-	-	+/-
UGG	CCA	Trp	-	-	-	+/-
CGG	CCG	Arg	-	-	-	+/-
CAU	QUG	His	-	-	-	+/-
CAC	QUG	His	-	-	-	+/-
GUU	GAC	Val	-	-	-	+/-
CAA	U*UG	Gln	-	-	-	+/-
CAG	CUG	Gln	-	-	-	+/-
AUG	CAU	Met	-	-	-	+

GRUPO 3

CODÓN	ANTICO DÓN	AMINO ACIDO	rap 32° C	Ts 34°C	Ts 32°C	Ts T.A.
GAU	CUC	Asp	-	-	+/-	+
GAC	GAA	Asp	-	-	+/-	+
UUU	GAA	Phe	-	-	+/-	+
UUC	CAA	Phe	-	-	+/-	+
UUG	UAA	Leu	-	-	+/-	+
UUA	GAC	Leu	-	-	+/-	+/-
GUC	ICG	Val	-	-	+/-	+/-
CGU	UUC	Arg	-	-	+/-	+/-
GAA	GGA/ UGA	Glu	-	+/-	+/-	+/-
UCU		Ser	-	+/-	+/-	+/-
CCG	CGG	Pro	-	+/-	+/-	+/-

GRUPO 4

CODÓN	ANTICO DÓN	AMINO ACIDO	rap 32° C	Ts 34°C	Ts 32°C	Ts T.A.
AGC	GCU	Ser	-	+/-	+/-	+/-
UCA	U*GA	Ser	-	+/-	+/-	+/-
CCU	GGG	Pro	-	+/-	+/-	+/-
CCC	GGG	Pro	-	+/-	+/-	+/-
GAG	U*UC	Glu	-	+/-	+/-	+/-
CCA	U*GU	Pro	-	+/-	+/-	+/-
CUG	CAG	Leu	-	+/-	+/-	+/-

GRUPO 5

CODÓN	ANTICO DÓN	AMINO ACIDO	rap 32° C	Ts 34°C	Ts 32°C	Ts T.A.
GGU	GCC	Gly	+/-	+/-	+/-	+/-
CUU	GAG	Leu	+/-	+/-	+/-	+/-
CUC	GAG	Leu	+/-	+/-	+/-	+/-
CUA	U*AG	Leu	+/-	+/-	+/-	+/-
UCC	GGA	Ser	+/-	+/-	+/-	+/-
UCG	CGA/ U*GA	Ser	+/-	+/-	+/-	+/-

GRUPO 6

CODÓN	ANTICO DÓN	AMINO ACIDO	rap 32° C	Ts 34°C	Ts 32°C	Ts T.A.
GGC	GCC	Gly	+/-	+/-	+/-	+/-
GGA	U*CC	Gly	+/-	+/-	+/-	+/-
GGG	CCC	Gly	+/-	+/-	+/-	+/-
GCC	GGC	Ala	+/-	+/-	+/-	+/-
GCG	U*GC	Ala	+/-	+/-	+/-	+/-
UGU	GCA	Cys	+/-	+/-	+/-	+/-
UGC	GCA	Cys	+/-	+/-	+/-	+/-
GCA	U*GC	Ala	+/-	+/-	+/-	+/-
GCG	U*GC	Ala	+/-	+/-	+/-	+/-
CGC	ICG	Arg	+/-	+/-	+/-	+/-

En la primera columna está representado el segundo codón del minigen en cuestión, la segunda columna muestra el anticodón del tRNA que codifica para ése minigen, la tercera columna indica el residuo de aminoácido resultante del codón, la cuarta columna registra la calidad del crecimiento de la cepa C600 *pth*(rap) a 32°C cuando es transformada con el minigen indicado, la quinta columna es la calidad del crecimiento de la cepa C600 *pth*(Ts) a 3 diferentes temperaturas (34°C, 32°C y temperatura ambiente) cuando es transformada con el minigen que se indica. + indica un buen crecimiento por parte de la bacteria, - indica que la bacteria no pudo crecer en esas condiciones, +/- indica un crecimiento deficiente o alterado, * indica una modificación postranscripcional.

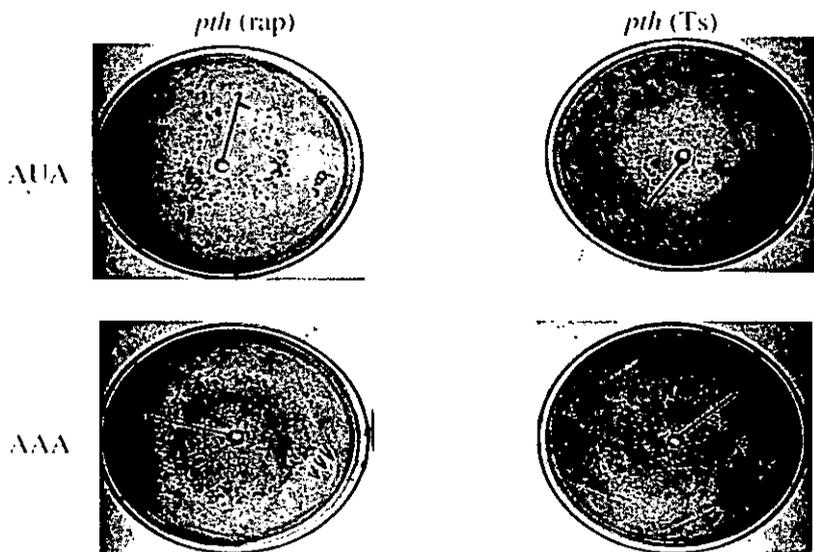


Fig. 6. Diferencias en áreas de inhibición del crecimiento de las cepas mutantes C600 *pth*(Ts) y C600 *pth*(rap) al expresarse en ellas diferentes minigenes tóxicos.

Los cultivos de las cepas C600 *pth*(Ts) y C600 *pth*(rap) transformadas ambas con los minigenes AUA y AAA fueron esparcidos en cajas con medio LB/amp, donde se dejó difundir IPTG 10mM (ver material y métodos). Se crecieron a 32°C durante 16 horas.

Para facilitar el manejo de estos resultados diferenciamos tres tendencias en la toxicidad las cuales se resumen en la **tabla II**; se nota que existen coincidencias de toxicidad entre los minigenes expresados en la cepa *pth*(Ts) y las familias asignadas por Menninger (1978). La tabla está basada en el código genético y se les asignó un color a cada codón según el grado de toxicidad: se les dió el color rojo a los tóxicos para ambas cepas mutantes en *pth*, el color azul para las clonas medianamente tóxicas o no tóxicas en la *pth*(Ts) pero tóxicas en la *pth*(rap); y el verde fue asignado a las clonas no tóxicas en *pth*(Ts) y medianamente, o no tóxicas, en *pth*(rap). En la tabla se puede observar que la toxicidad tiende a depender principalmente de la posición de una sola base, la adenina. Así, todos los codones que tienen una adenina en la primera posición son de los más tóxicos exceptuando el codón AGC. Si existe una adenina en la segunda posición, en general los codones también son de los más tóxicos, siempre y cuando no exista en la primera posición una guanina (obsérvese los codones de Asp y Glu). Por otra parte, los codones que tienen una adenina en la tercera posición muestran variación en su toxicidad, por ejemplo obsérvese el caso de los codones GCA, GUA, y GAA; o CUA, CCA y CAA; en ambos casos se pueden apreciar los tres grados de toxicidad. Al parecer las dos primeras bases de los codones están relacionadas con el grado de toxicidad de estos minigenes. Por otro lado, parece que el tipo de aminoácido está también relacionado con la toxicidad, ya que parece existir una tendencia a que los codones que codifican para un aminoácido en particular comparten el mismo grado de letalidad, como Pro, Thr y Ala.

P ₁ UUU UUC L ₁ UUA UUG	Ser UGU UGC UGA UGG	Tyr UAU UAC UAA UAG	Cys UGU UGC UGA UGG
L ₂ GUU GUC GUA GUG	P ₂ GGU GGC GGA GGG	His GAU GAC GAA GAG	Arg CGU CGC CGA CGG
L ₃ AUU AUC AUA AUG	Thr AGU AGC AGA AGG	Asn AAU AAC AAA AAG	Ser AGU AGC AGA AGG
Val GUU GUC GUA GUG	Ala GGU GGC GGA GGG	Asp GAU GAC GAA GAG	Gly GGU GGC GGA GGG

Tabla. II. Agrupación de los minigenes artificiales tipo *bar* por colores según la intensidad de toxicidad que producen al expresarse.

A los 64 minigenes artificiales tipo *bar* se les asignó un color dependiendo del grupo de toxicidad al cual pertenecen. A los más tóxicos, grupos 1 y 2, se les asignó el color rojo; a los medianamente tóxicos, grupos 3 y 4, les fué otorgado el color azul; y el color verde fué para los minigenes con menor toxicidad, los grupos 5 y 6. Entre llaves están marcados los codones que son codificados por un mismo tRNA.

Existe otra condición donde la toxicidad varía sin importar el tipo de aminoácido ni el codón, como Arg y Ser, donde se aprecia la gama completa de toxicidad. Al parecer, por lo general, el tRNA que decodifica cada residuo no interviene en la letalidad que presenta la construcción.

Se ha observado que la toxicidad de construcciones que generan peptidil-tRNA se incrementa cuando se sube la temperatura de crecimiento de la cepa *pth(Ts)* (Menez et al., 2000), dependiendo la toxicidad total de la construcción en cuestión. Por esta razón probamos las diferentes construcciones sobre la cepa *pth(Ts)* a temperaturas menores y mayores de 32°C (Fig. 7); si observamos el caso de las muestras 1 y 3 (CGA y GUU respectivamente) se aprecia que existen diferencias de crecimiento a temperatura ambiente, siendo que estos dos codones fueron clasificados como rojos (los más tóxicos).

Relación entre la concentración de mRNA del minigen y la toxicidad que produce.

Existe evidencia que muestra una relación directa entre la toxicidad del minigen *bar* y la concentración de su mRNA. Valadez y cols., 2001 y Dinçbas y cols., 1999, han propuesto que la tasa de formación de peptidil-tRNA libre es proporcional a la concentración de los transcritos de los minigenes. Por lo tanto, mediante ensayos de *northern blot* (ver material y métodos) nosotros determinamos la concentración del mRNA de nuestras construcciones (Ver Material y Métodos). Se observó que el nivel de mRNA de los minigenes al expresarse varía con la toxicidad de cada minigen (Fig. 8). La concentración de los mRNAs de los minigenes que son tóxicos para la cepa *pth(Ts)* es mayor que la observada por los minigenes no tóxicos, mientras los no tóxicos no presentan altas concentraciones de RNA (Ver CGC, UGC y GCU).

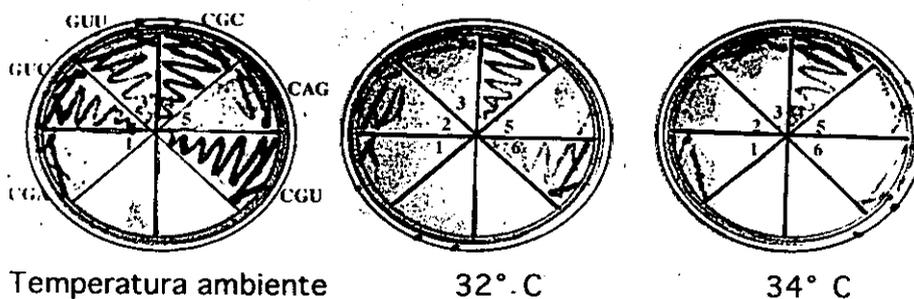


Fig.7. Inhibición del crecimiento de la cepa C600 *pth*(Ts) al ser transformada con diferentes minigenes.

Los cultivos de las cepas C600 *pth*(Ts)/CGA(1), C600 *pth*(Ts)/GUC(2), C600 *pth*(Ts)/GUU(3), C600 *pth*(Ts)/CGC(4), C600 *pth*(Ts)/CAG(5) y C600 *pth*(Ts)/CGU(6) se crecieron a temperatura ambiente durante dos días; a 32°C y 34°C durante 16 hrs. En presencia de 1mM de IPTG.

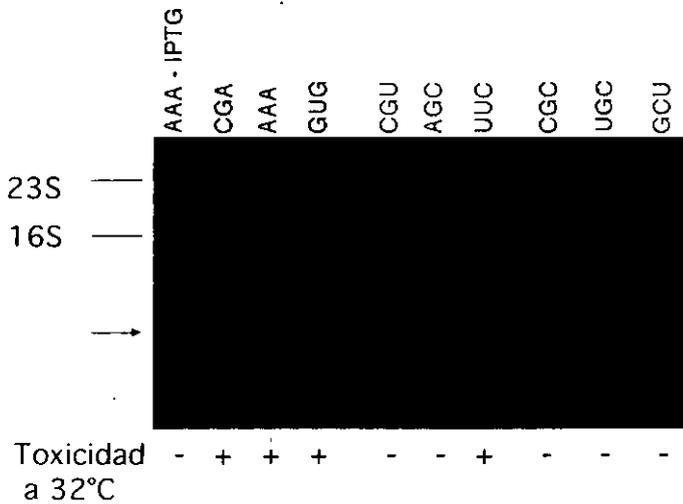


Fig. 8. Concentración de mRNA al expresarse distintos minigenes en la cepa C600 *pth(Ts)*.

La cepa bacteriana C600 *pth(Ts)* fué transformada con algunas de las construcciones que portan los minigenes, se cultivaron a 32°C induciendo la expresión de los minigenes con IPTG y se extrajo el RNA para su posterior análisis mediante la técnica de *northern blot* (Ver material y métodos).

En la imagen se observan los niveles de mRNA (marcados con una flecha) producidos al expresarse los minigenes. El orden de los carriles de izquierda a derecha: AAA sin IPTG, CGA, AAA, GUG, CGU, AGC, UUC, CGC, UGC y GCU.

Con la finalidad de ver si los minigenes que no presentan mRNA son traducibles nosotros evaluamos la concentración de sus mRNAs en presencia de inhibidores traduccionales. Se utilizó cloramfenicol, que es un inhibidor de la elongación de la traducción (Pestka, 1970), pactamicina, que es un inhibidor de la elongación de la traducción y que se ha demostrado que tiene efecto sobre los primeros codones además de ser un inhibidor de la iniciación de la traducción (Goldberg et al., 1973), y además utilizamos eritromicina que es un inhibidor de la elongación de la traducción el cual produce "drop-off" del peptidil-tRNA. Como se observa en la **Figura 9** ninguno de los tres fármacos tiene efecto en la concentración de los mensajeros de codones tóxicos (CGA y AGA). Por otra parte la concentración de los mRNAs de los minigenes no tóxicos varía dependiendo del fármaco, así la pactamicina aumenta la concentración de mensajero a niveles similares a los de un mRNA de minigen tóxico, eritromicina produce un aumento discreto y cloramfenicol no produce cambios. Estos resultados indican que todos los minigenes son potencialmente traducibles sin importar su grado de toxicidad, ya que la pactamicina inhibe el inicio de la elongación, "congelando" al ribosoma después de sólo dos bases; si el ribosoma se encuentra ya montado sobre el mRNA la posibilidad de su traducción es obvia.

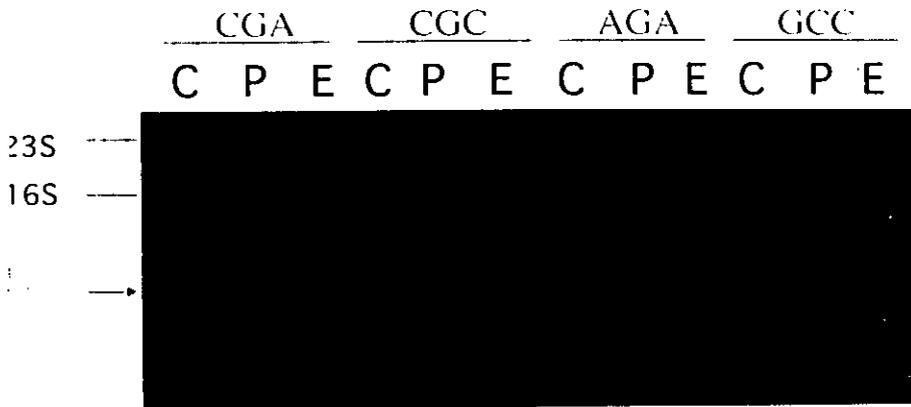


Fig. 9. Concentración de mRNA al expresarse distintos minigenes en la cepa C600 *pth*(Ts) en un ambiente con fármacos bacteriostáticos.

La cepa C600 *pth*(Ts) fué transformada con algunos de los minigenes, se cultivaron a 32°C en presencia de cloramfenicol, pactamicina y eritromicina, induciendo la expresión de los minigenes con IPTG; se extrajo RNA para su análisis mediante la técnica de *northern blot* (Ver material y métodos). En la imagen se aprecian las concentraciones de mRNA de la cepa C600 *pth*(Ts) al ser transformada con 4 minigenes: CGA, CGC, AGA y GCC. El orden de los cultivos para cada caso es el siguiente: el primero es en presencia de cloramfenicol (C), el segundo con pactamicina (P) y el tercero con eritromicina (E).

Efecto de la sobreexpresión de la Pth en la concentración de mRNA y toxicidad de los minigenes.

Debido a que algunos minigenes son tóxicos para una cepa *pth(rap)* y no para una *pth(Ts)* se decidió analizar el nivel de mRNA de algunos minigenes en estas cepas deficientes en Pth (Fig. 10). Los minigenes tóxicos muestran una mayor concentración de mRNA en las cepas *pth(rap)* con respecto a las cepas *pth(Ts)* (Ver CGA y AUA). Sin embargo, aquéllos minigenes los cuales sólo son tóxicos para la cepa *pth(rap)* no muestran un incremento aparente (Ver CGU y GAA). Además, el minigen AUA, el cual es más tóxico que CGA en una cepa *pth(rap)*, mostró una diferencia substancial en la concentración de su mRNA, aumentando significativamente en la cepa *pth(rap)* con respecto a *pth(Ts)*. Con estos resultados concluimos que en general la toxicidad de un minigen es directamente proporcional a la concentración de su mRNA.

Efecto de la sobreexpresión del tRNA específico sobre la concentración de mRNA y toxicidad de los minigenes.

Conociendo que la expresión de los minigenes tóxicos provoca la caída de peptidil-tRNA, las cepas portadoras de minigenes se cotransformaron con un plásmido portador del tRNA específico para el minigen (ver material y métodos) con la finalidad de conocer las condiciones con las que se pueden suprimir la toxicidad de estos minigenes y con ello poder determinar el comportamiento de su mRNA. Si el mecanismo de toxicidad propuesto para los minigenes es correcto (Ontiveros, 1996), al sobreexpresar el tRNA específico del segundo codón, la célula tendrá acceso al tRNA, contrarrestando el efecto del secuestro y evitando finalmente la inanición.

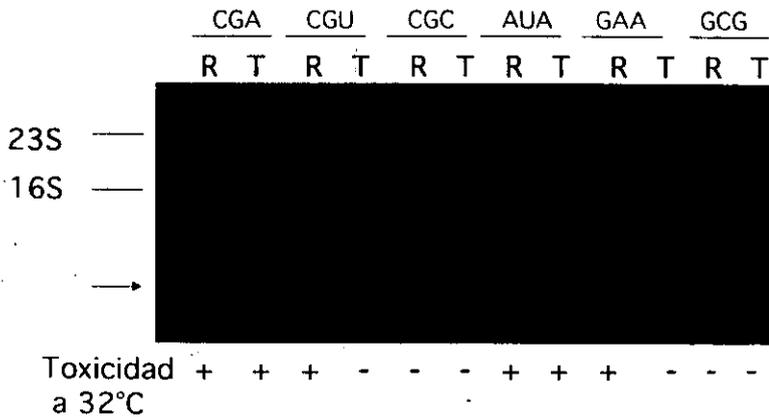


Fig. 10. Concentración de mRNA al expresarse distintos minigenes en las cepas C600 *pth*(Ts) y C600 *pth*(rap).

Las cepas C600 *pth*(Ts) y C600 *pth*(rap) fueron transformadas con algunos de los minigenes, se cultivaron a 32°C induciendo la expresión de los minigenes con IPTG; se extrajo el RNA para su estudio mediante la técnica de *northern blot* (Ver material y métodos). En la imagen se ven los niveles de mRNA de las cepas transformadas; el orden es CGA, CGU, CGC, AUA, GAA y GCG. Están acomodadas por pares, siendo en todos los casos el primer carril la cepa C600 *pth*(rap) y el segundo C600 *pth*(Ts).

Lo que observamos fué que la sobreexpresión del tRNA específico no parece restaurar en un 100% el crecimiento de la bacteria, sólo en una cepa C600 *pth*(Ts) a temperatura ambiente se logra apreciar una restauración del crecimiento bacteriano (Fig. 11). Con la sobreexpresión del tRNA que decodifica al codón AGA se vió claramente que la bacteria crece, sin embargo cuando se sobreexpresó el tRNA que decodifica al codón AAA la supresión es mucho menor. Sin embargo, cuando las cepas C600 *pth*(Ts) y C600 *pth*(rap) con los minigenes tóxicos y los plásmidos portadores del tRNA específico fueron evaluadas mediante la formación de halos de inhibición (Ver Introducción pág. 29) se pudo observar un efecto de disminución del halo de inhibición de crecimiento (Tabla III). Conociendo las condiciones de supresión utilizando el tRNA evaluamos ahora la concentración de sus mRNAs (Figura 12). Los ensayos mostraron que al expresarse el minigen con su tRNA específico el nivel del mRNA de tres minigenes tóxicos específicos (Arg, Lys e Ile) no cambia, sólo se aprecia en el caso de Lys un aumento del mensajero cuando se expresa junto con su tRNA. Lo que indica que la concentración de tRNA no influye en el tiempo de estadia del ribosoma sobre el mRNA.

Por otra parte, al cotransformar las bacterias portadoras de minigenes con un plásmido que expresa el gen *pth* silvestre se aprecia que tanto en la cepa C600 *pth*(rap), como en la cepa *pth*(Ts) las bacterias crecen normalmente a pesar de la presencia del minigen tóxico (Fig. 13). Nosotros realizamos ensayos de *northern blot* (ver material y métodos) del minigen durante la sobreexpresión de la Pth (Fig. 14). Utilizamos el minigen tóxico AUC; en el caso de la cepa C600 no se aprecia diferencia alguna del mRNA al expresarse o no la Pth dado que no hay una gran cantidad de mensajero; sin embargo, en las cepas deficientes en Pth el mensajero está altamente concentrado, no así cuando la Pth se sobreexpresa en estas células.

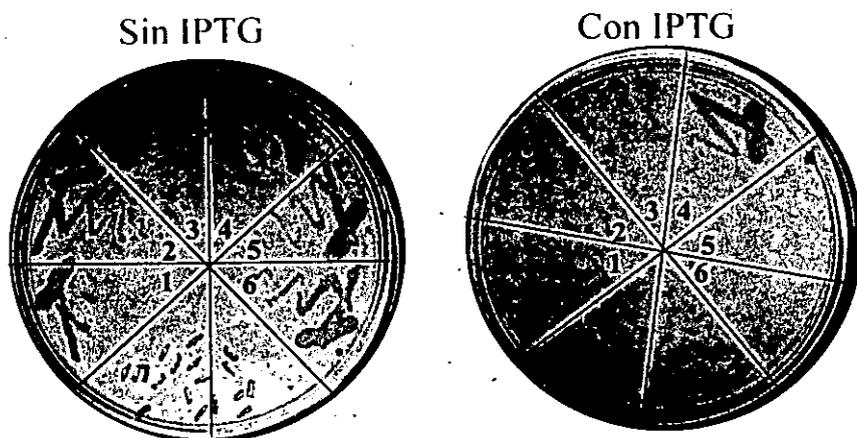


Fig. 11. Crecimiento de la cepa C600 *pth(Ts)* durante la sobreexpresión de minigenes y sus tRNAs.

La cepa C600 *pth(Ts)* fué transformada con los minigenes AAA y AGA, a su vez se cotransformaron un vector vacío, un tRNA de Lys y un tRNA de Arg; se dejaron crecer a 32°C por 16 horas (Ver material y métodos). El orden de las muestras es el siguiente:

- | | | |
|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| 1. AAA/tRNA ^{LysV} | 3. AAA/tRNA ^{Arg4} | 5. AGA/ Vector |
| 2. AAA/ Vector | 4. AGA/tRNA ^{Arg4} | 6. AGA/ tRNA ^{LysV} |

<u>Minigen/tRNA</u>	<i>pth</i> (rap)	<i>pth</i> (Ts)
<u>AAA/V2</u>	3.2	2.0
<u>AAA/Y2</u>	2.7	1.7
<u>AGA/V2</u>	2.6	2.2
<u>AGA/Y2</u>	2.7	2.5
<u>AGA/PDC952</u>	2.3	1.5*
<u>bar/V2</u>	2.7	2.3
<u>bar/Y2</u>	-----	2.4
<u>bar/Pl489</u>	2.7	1.9
<u>UGC/V2</u>	0.0	0.0
<u>UGC/Y2</u>	0.0	0.0

Tabla. III. Longitud de los radios de inhibición al expresarse minigenes tóxicos junto a tRNAs en cepas *pth* mutantes.

Las cepas C600 *pth*(Ts) y C600*pth*(rap) fueron transformadas con los minigenes *bar*, AAA, AGA y UGC; y cotransformadas con los vectores V2, Y2, PDC952 y Pl489. Se crecieron a 32°C durante 16 horas en cajas de cultivo donde se dejó difundir IPTG 1 mM (ver material y métodos). Se registran en cm los radios de los halos de inhibición resultantes.

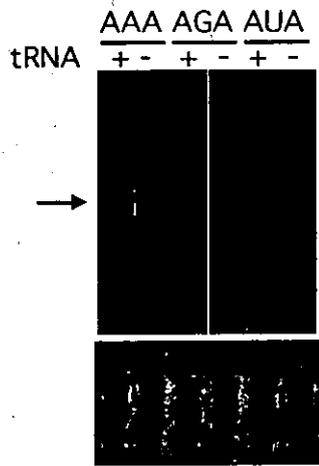


Fig. 12. Concentración de mRNA de los minigenes AAA, AGA y AUA al expresarse en una cepa C600 *pth*(Ts) sólo o en conjunción de su tRNA específico.

La imagen superior muestra los niveles de mRNA (En un ensayo *northern blot*, ver material y métodos.) de los minigenes AAA, AGA y AUA al ser transformados en la cepa C600*pth*(Ts) sólo o en conjunción de sus tRNA específicos. La imagen inferior indica las concentraciones de RNA total de las muestras de la imagen superior, en el mismo orden.

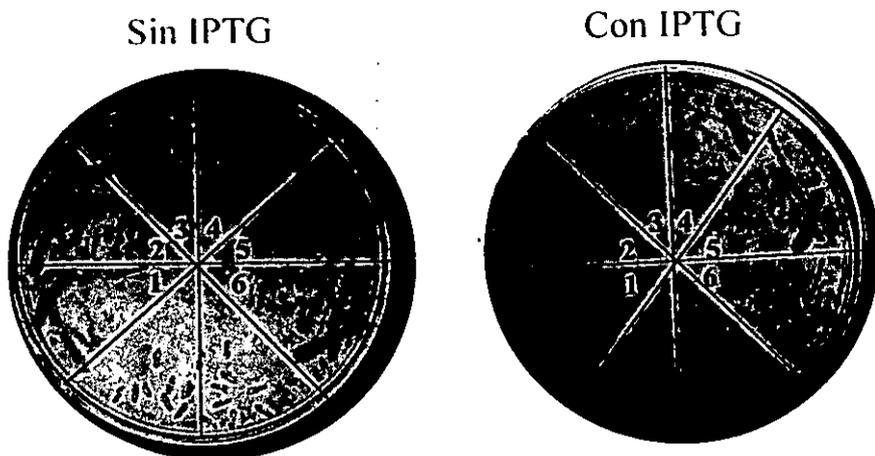


Fig. 13. Crecimiento de las cepa C600 *pth*(Ts) durante la sobreexpresión de minigenes y de Pth.

La cepa C600 *pth*(Ts) fué transformada con tres distintos minigenes (AAA, AGA y *bar 101*) así como un plásmido inducible con IPTG (pACYC) vacío o con una copia del gen *pth* silvestre; los cultivos se dejaron crecer a 32°C por 16 horas en presencia de IPTG 1mM (Ver material y métodos). El orden de la figura es el siguiente:

- | | | |
|--------------|---------------|---------------|
| 1. AAA/pACYC | 3. AGA/ pACYC | 5. 101/ pACYC |
| 2. AAA/Pth | 4. AGA/ Pth | 6. 101/ Pth |

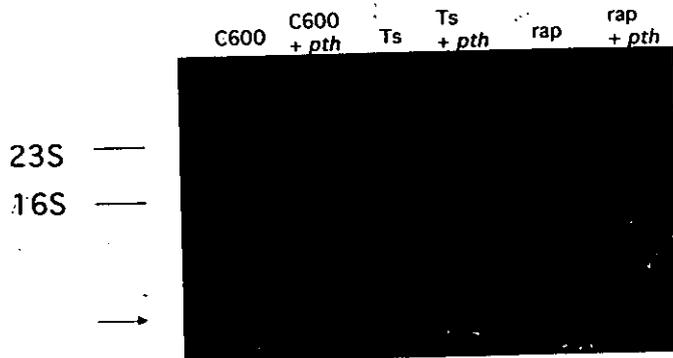


Fig. 14. Concentración de mRNA en las cepas C600, C600 *pth*(Ts) y C600 *pth*(rap) al expresarse el minigén AUC sólo y con *pth*.

En la imagen se observan los niveles de mRNA (en un ensayo *northern blot*) del minigén AUC en tres cepas de *Escherichia coli* al expresarse sólo o en conjunción con el gen *pth* silvestre. (Ver material y métodos)

- 1.- AUC/C600 2.-AUC/C600/*pth* 3.-AUC/Ts 4.-AUC/Ts/*pth*
 5.- AUC/rap 6.- AUC/rap/*pth*

De estos resultados concluimos que la concentración del mensajero de un minigen depende principalmente de la actividad Pth. La función de la Pth es la de hidrolizar el peptidil-tRNA, dejando libre al RNA de transferencia; en el caso de un minigen tóxico parece que al no hidrolizarse el peptidil-tRNA en el último codón (en el caso de ausencia de actividad de Pth), el ribosoma se queda atascado en su posición, protegiendo y estabilizando al mRNA.

Correlación de la concentración de peptidil-tRNA con la toxicidad de un minigen.

Con la finalidad de medir *in vivo* la acumulación de peptidil-tRNA por la expresión de los minigenes inicialmente decidimos averiguar la cinética del crecimiento bacteriano al ser afectado por la expresión de minigenes, tanto tóxicos como medianamente tóxicos, ésto para averiguar el mejor punto de crecimiento para extraer el peptidil-tRNA. Como se aprecia en la **Figura 15** el tiempo de extracción de la muestra, marcado por una flecha, es uno donde se pueden apreciar ligeras diferencias en el patrón de crecimiento sin que lleguen a ser radicales; en el caso del minigen tóxico CGA es cuando se manifiesta la caída de crecimiento en la cepa C600 *pth(rap)*, mientras que el crecimiento con el minigen medianamente tóxico CGT se encuentra estable en esos momentos.

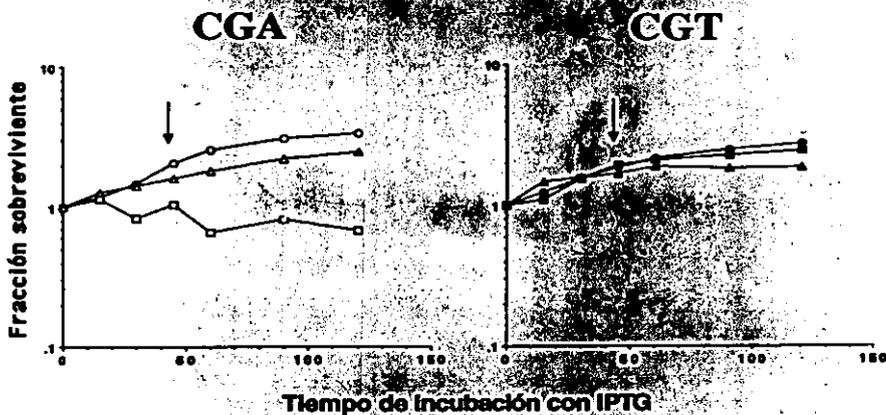


Fig. 15. Curva de viabilidad de la cepas C600, C600 *pth*(Ts) y C600 *pth*(rap) al ser transformadas con los minigenes CGA y CGT, induciendo su expresión con IPTG.

La gráfica de la izquierda muestra el cambio de las fracciones sobrevivientes en relación a los minutos de crecimiento de los cultivos: □ C600 *pth*(rap)/CGA, △ C600 *pth*(Ts)/CGA, ○ C600/CGA. El gráfico de la derecha es similar al primero, siendo los cultivos los siguientes: ▲ C600 *pth*(rap)/CGT, ■ C600 *pth*(Ts)/CGT, ● C600/CGT. Ambas series de cultivos fueron tratadas con IPTG 1mM. (Ver material y métodos)

A las muestras obtenidas tanto del minigen tóxico como del minigen medianamente tóxico les practicamos un ensayo de *northern blot* en geles ácidos (Ver material y métodos), agregando una muestra obtenida con la sobreexpresión del minigen CGC, con la finalidad de apreciar las concentraciones de peptidil-tRNA generadas en cada caso (Fig. 16). Algunas muestras fueron tratadas con sulfato de cobre para distinguir la presencia del aminoacil-tRNA de la del peptidil-tRNA, para evidenciar los niveles reales de peptidil-tRNA. Se ve claramente cómo al expresarse un minigen muy tóxico (CGA) los niveles de peptidil-tRNA son mayores en la cepa C600 *pth(Ts)* con respecto a la C600, así como es mayor en la cepa C600 *pth(rap)* en relación a la cepa C600 *pth(Ts)*. Al expresarse un minigen medianamente tóxico no puede apreciarse una diferencia en la concentración de peptidil-tRNA en ambas cepas deficientes en *pth*, siendo sin embargo más baja que la de un minigen tóxico. La expresión de un minigen no tóxico (CGC) produce la concentración de peptidil-tRNA más baja con respecto a las demás, al expresarse en la cepa C600 *pth(rap)*. Por ende se puede decir que los minigenes tóxicos propician una mayor caída de peptidil-tRNA que los medianamente tóxicos y los no tóxicos; peptidil-tRNA que puede ser hidrolizado de manera más eficiente por las cepas con una mejor actividad de Pth.

Comparación de la composición de minigenes con más de dos codones.

En el caso de los minigenes de dos codones tipo *bar* la toxicidad indudablemente depende del segundo codón, siendo este la única variante; sin embargo, en la naturaleza el mecanismo puede diferir ya que muchos minigenes poseen más de dos codones. Para tratar de resolver esta cuestión seleccionamos minigenes tóxicos aleatorios, de entre uno a

cinco codones de la biblioteca de Alexander Mankin (Ver material y métodos), probándolos tanto en la cepa C600 como en la C600 *pth(rap)*. En la Tabla 4 se aprecian los minigenes obtenidos, con su secuencia identificada con los colores usados en caso de que cada codón fuera el segundo codón de un minigen tipo *bar*.

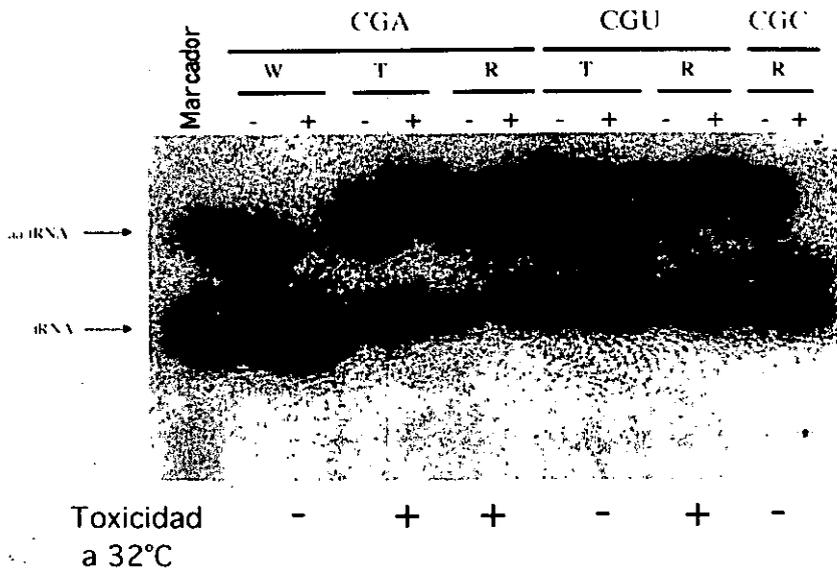


Fig. 16. Concentraciones de tRNA y pep-tRNA en las cepas C600, C600 *pth(Ts)* y C600 *pth(rap)* al ser transformadas con los minigenes CGA, CGT y CGC.

La figura muestra un ensayo de *northern blot* donde se sondeó para registrar el tRNA (ver material y métodos). A la izquierda se indican las distancias de migración de aa-tRNA o pep-tRNA y tRNA. Unas muestras fueron tratadas con sulfato de cobre (ver material y métodos), el orden de las muestras es el siguiente: (1) tRNA, (2) tRNA+aa-tRNA, (3) CGA/C600- Cu⁺⁺, (4) CGA/C600 + Cu⁺⁺, (5) CGA/Ts + Cu⁺⁺, (6) CGA/rap + Cu⁺⁺, (7) CGT/ Ts + Cu⁺⁺, (8) CGT/rap + Cu⁺⁺, (9) CGC/ rap + Cu⁺⁺. W=C600, T=C600 *pth(Ts)* y R=C600 *pth(rap)*.

Se puede ver que los minigenes tóxicos para la cepa C600 varían en longitud, observamos que existían de entre tres a cinco codones; siendo igual para los que sólo fueron tóxicos para la cepa C600 *pth(rap)*. El último codón en todos los minigenes resultó ser azul o rojo, pero nunca verde; además en tres de los seis minigenes tóxicos para la C600 *pth(rap)* la penúltima posición corresponde a un codón verde. El minigen MKNT, tóxico para la C600, es similar al minigen MKKNT, sin embargo este último es sólo tóxico para la C600 *pth(rap)*; este último minigen es el único caso en el que su último codón es treonina y no es tóxico para la cepa silvestre. Otro caso similar es cuando el minigen termina en fenilalanina ya que estos minigenes son tóxicos o medianamente tóxicos en la cepa silvestre.

Minigenes	Residuos	Toxicidad
AUG GUA ACA UAA	MVT	<u>Silvestre</u>
AUG CAA UUA UAA	MQL	Silvestre*
AUG AAG AAC ACC UAA	MKNT	Silvestre
AUG CCG CCA AUG UAA	MPPM	Silvestre
AUG CGA AGA AGA UAA	MRRR	Silvestre
AUG GUG UUU AGU UGA	MVFS	Silvestre
AUG AAC AAU GAU AGC UAA	MNND	Silvestre
AUG CAC GCA UUA ACA UAA	MHALT	Silvestre
AUG UAU AAA CGG UUC UAA	MYKRF	Silvestre
AUG CCC GGU ACA ACG UAA	MPGTT	Silvestre*
AUG CAA CAA AUU CAC UAA	MQQIH	Silvestre*
AUG CAG CCU AUA UUC UAA	MQPIF	Rap ¹
AUG GAU GAC UAA	MDD	Rap
AUG AGC AAA GGC UUA UAA	MSKGL	Rap
AUG AAA GAA CUA AAA UAA	MKELK	Rap
AUG AAA GAA UCU AAA UAA	MKESK	Rap
AUG AGG GGG GGU GUG UAA	MRGGV	Rap
AUG AAA AAA AAC ACU UAA	MKKNT	Rap

Tabla. 4. Secuencia, composición y grados de toxicidad de minigenes más largos de dos codones encontrados en una librería aleatoria.

En una librería aleatoria de minigenes de hasta 5 codones, expresada en P90C se aislaron minigenes tóxicos para las cepas C600 silvestre y C600 *pth(rap)*. El color representa el grupo de toxicidad al cual pertenece el residuo si fuera el segundo codon de un minigen tipo *bar* (ver Tabla 3). * indica que su toxicidad fue encontrada primero en la cepa C600 *pth(rap)*; 1 indica que el minigen es medianamente tóxico al expresarse en la cepa *pth* silvestre.

Discusión

Toxicidad debida al segundo codón

Se ha reportado que cambios en la secuencia del segundo codón de un minigen de dos codones, como *bar*, afectan la toxicidad (Valadez et al., 2001). Por otra parte es importante la naturaleza del último codón con sentido para que se lleve a cabo una buena terminación (Menez et al., 2000). Debido a que la toxicidad de un minigen es generada por una ineficiente terminación que lleva al "drop-off" del correspondiente peptidil-tRNA creemos que las secuencias del minigen cercanas a su codón de paro determinan su toxicidad. Por esta razón, en este trabajo se decidió estudiar el efecto de la naturaleza del segundo codón sobre la toxicidad producida por un minigen de dos codones en cepas de *Escherichia coli* deficientes en su actividad de Pth.

Con la metodología utilizada en la obtención de los minigenes nosotros no obtuvimos los 64 codones en un inicio, sin embargo esto aparentemente no está relacionado con algún factor de la secuencia o toxicidad del minigen debido a que los minigenes no obtenidos se encuentran dispersos en la gama de uso de codones, y además el porcentaje de tóxicos y no tóxicos entre los obtenidos al azar y los no obtenidos es similar.

Utilizando la cepa *pth(rap)* se observó que el 75% de las clonas son tóxicas, sin embargo se sabe que la actividad de Pth en esta cepa corresponde sólo al 1% de la actividad silvestre; debido a esto decidimos utilizar a la *pth(Ts)* ya que su actividad enzimática a 32°C es mucho mayor (Cruz-Vera et al., 2000), además se conoce por Dinçbas et al. (1999) que la acumulación de peptidil-tRNA depende principalmente de la baja velocidad de hidrólisis del peptidil-tRNA por Pth. Con esta metodología nosotros pudimos diferenciar a minigenes semitóxicos, los cuáles además de su toxicidad

también se diferencian de los tóxicos por su nivel de mRNA. (Ver Fig. 8) Lo que valida el uso de la *pth*(Ts) como un factor de diferenciación por su distinta eficacia en la actividad de Pth.

En los resultados observados de la **Tabla II** se revela que las adeninas localizadas en la primera y segunda base del codón están relacionadas con una toxicidad alta. Se ha demostrado que la fuerza de unión del codón-anticodón está soportada en el primer apareamiento de bases (Lim et al., 1992). Así, por ejemplo, creemos que la generación de peptidil-tRNA de los minigenes con los codones de fenilalanina y lisina debe ser igual y tal vez la diferencia en sus toxicidades se debe a que el tRNA que decodifica a los codones de fenilalanina es mejor sustrato que el tRNA que decodifica a lisina (Dinçbas et al., 1999). Otro ejemplo es el de los codones de asparagina y ácido aspártico cuyos tRNAs, similarmente abundantes, tienen una susceptibilidad a la hidrólisis por Pth semejante (Kössel, 1968), sin embargo los codones de asparagina son más tóxicos. En los casos de histidina y glutamina, que poseen en su primera posición una C se podría creer que su interacción fuese similar a los de codones de ácido aspártico y ácido glutámico, y sin embargo, tienen diferencias, ya que los dos primeros son considerablemente más bajos en su concentración de tRNA, tan parecidos a la concentración de tRNAs raros como el que codifica al codón AGA. Por lo que creemos de que si los tRNAs que decodifican a estos 4 pares de codones se liberan a la misma velocidad, y sabiendo que sus velocidades de hidrólisis son similares (Menninger, 1978), creemos que su diferencia radica en su concentración de tRNA. Se observa entonces que al parecer la toxicidad está determinada por las dos primeras bases del segundo codón de los minigenes, y tiene relación con el aminoácido que decodifica. Por otra parte, los grupos

de codones que codifican Serina (UCX y AGX) y los codones de arginina CGU, CGC y CGA muestran que la toxicidad se relaciona con la base en la tercera posición.

En resumen, parece que por lo general, las dos primeras bases del codón son las que juegan el papel principal en la atribución de distintos grados de toxicidad en los diferentes minigenes.

Relación de la concentración del mRNA y la generación de peptidil-tRNA.

Al evaluar la concentración de RNA mensajero en minigenes tóxicos y no tóxicos (Figura 8), es claro que en las bacterias *pth* portadoras de minigenes tóxicos la concentración es mayor que en las portadoras de minigenes no tóxicos. Esto coincide con la idea de que el RNA mensajero es estabilizado y protegido por el ribosoma; ésto se observa claramente al aumentar la concentración de mRNAs de minigenes no tóxicos cuando se adiciona a la célula un inhibidor traduccional, como la pactamicina (Figura 9). Se ha demostrado que la pactamicina, un inhibidor de la iniciación de la traducción, inhibe por medio de dos mecanismos, uno impidiendo la asociación de la subunidad de 50S al complejo de iniciación y el otro no permitiendo la elongación del primer dipéptido formado, lo cual detiene y fija al ribosoma en el mensajero. En la misma Figura 9 observamos que el cloramfenicol, un inhibidor de la unión del peptidil-tRNA al sitio de la peptidil-tRNA transferasa durante la elongación de la traducción, no tiene efectos sobre la concentración del mensajero de los minigenes tóxicos y no tóxicos. Creemos que ésto se debe a que no afecta a la reacción de transferencia del formil-metionil al aminoacil-tRNA del segundo codón así como tampoco afectaría la reacción de terminación, ya que se ha observado que la inhibición del cloramfenicol no afecta a

peptidil-tRNAs que estén fuertemente unidos al ribosoma, como en el caso del formil-metionil-tRNA (Pestka, 1970). Por otra parte utilizando eritromicina, el cual es un fármaco que induce la caída de peptidil-tRNA, aumenta ligeramente la concentración de mensajero de los minigenes no tóxicos. Con estos resultados mostramos que existe una correlación entre la acumulación de peptidil-tRNA y la acumulación de mensajero. Tomando en cuenta que algunos minigenes son tóxicos para la cepa rap y no para la Ts, se analizó el nivel de mRNA de algunos minigenes en las dos distintas cepas (**Figura 10**). Existe una mayor cantidad de mRNA en la cepa *pth(rap)* con respecto a la cepa *pth(Ts)*; ésto podría indicar que la escasez de Pth funcional está directamente relacionada con la cantidad de mRNA producido, supuestamente el aumento de mensajero se debe a que éste es protegido por el ribosoma estancado, entonces la falta de Pth está relacionada con el estancamiento, lo que podría ocasionar que, al no disociarse el peptidil-tRNA, el ribosoma se detenga.

En los experimentos posteriores se cotransformaron las células portadoras de minigenes con el tRNA específico al segundo codón del minigen en particular; el hecho de que sólo creciera la cepa *pth(Ts)* indica que debe de existir algún tipo de equilibrio en lo que respecta a la concentración de enzima activa. Se observó también que el aumento del RNA de transferencia, en particular el correspondiente al segundo codón del minigen expresado, no cambia la concentración de mensajero (**Figura 12**), lo que indica que el tamaño de la reserva de tRNA no está directamente relacionado con el estancamiento del ribosoma. Por lo tanto el estancamiento del ribosoma se debe sólo al exceso de peptidil-tRNA en la célula, tal como se explica arriba.

Conclusiones

En resumen, los datos obtenidos en este estudio pueden conducir a las siguientes conclusiones:

- 1.- La cepa *pth(Ts)* de *Escherichia coli* resiste mejor que la cepa *pth(rap)* la expresión de las construcciones portadoras de minigenes.
- 2.- La toxicidad causada por la expresión de un minigen de dos codones no es la misma para todos los minigenes, ya que esta varía dependiendo del codón que ocupe la segunda posición del gen.
- 3.- En general existe una relación directamente proporcional entre la concentración del mensajero y la toxicidad del minigen.
- 4.- Los transcritos de los minigenes no tóxicos son traducidos, ya que al inhibir el tráfico ribosomal se observó un aumento de estos.
- 5.- El aumentar la concentración de los tRNA específicos para cada minigen en las células transformadas no afecta en nada la concentración del mRNA producido.
- 6.- La actividad de Pth reduce los niveles de mensajero en los minigenes tóxicos.

GLOSARIO

30S: Subunidad ribosomal pequeña con coeficiente de sedimentación de 30S

50S: Subunidad ribosomal mayor con coeficiente de sedimentación de 50S

70S: Unidad ribosomal conjuntada por las dos subunidades, coeficiente de sedimentación de 70S

aminoacil-tRNA: Complejo formado de una molécula de tRNA unida a un aminoacil

bar : Blanco de acción de rap , sitio en el genoma de lambda que contrarresta la mutación rap

cistrón: Gen

DNA: Acido desoxiribonucleico

E. coli: *Escherichia coli*

fMet-tRNA: Formil-Metionil-tRNA, el tRNA iniciador de la traducción

GDP: Guanosín difosfato

GTP: Guanosín trifosfato

IF-1: Factor de inicio de la traducción 1

IF-2: Factor de inicio de la traducción 2

IF-3: Factor de inicio de la traducción 3

IPTG: Isopropil- β -D-tiogalactosido

mRNA: RNA mensajero

pb: Pares de bases

peptidil-tRNA: Complejo formado de una molécula de tRNA unida a un peptidil

pTAC: Promotor del gen *tac*

pth: Gen que codifica para la enzima Pth

Pth: Peptidil tRNA hidrolasa, enzima que hidroliza el peptidil-tRNA dando como resultado péptidos y tRNA libres

rap: Mutación de *E. coli* que no permite la propagación del bacteriófago lambda

RF1: Factor de liberación ribosomal 1

RF2: Factor de liberación ribosomal 2

RF3: Factor de liberación ribosomal 3

RNA: Acido ribonucleico

RRF: Factor de reciclamiento ribosomal

rRNA: RNA ribosomal

SD: Secuencia Shine-Dalgarno, señal de inicio de la traducción; involucrada en la unión del ribosoma al mRNA

sitio A: Sitio aminoacil del ribosoma

sitio P: Sitio peptidil del ribosoma

tRNA: RNA de transferencia

Ts: Mutación de *E. coli* que presenta termosensibilidad

Tu: Factor de elongación TU

Referencias

- Atherly, A. G. y Menninger, J. R. 1972. Mutant *E. coli* strain with temperature sensitive peptidyl-transfer RNA hydrolase. *Nat. New. Biol.* **240**: 245-246.
- Buckingham, R. H., Grentzmann G., Kisselev, L. 1997. Polypeptide chain release factors. *Mol. Microbiol.* **24**: 449-456.
- Blattner F.R., Plunkett G. 3rd, Bloch C.A., Perna N.T., Burland V., Riley M., Collado-Vides J., Glasner J.D., Rode C.K., Mayhew G.F., Gregor J., Davis N.W., Kirkpatrick H.A., Goeden M.A., Rose D.J., Mau B. y Shao Y.1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K12. *Science.* **277**:1453-74.
- Capecci, M. R. y Klein, H. A. 1969. Characterization of three proteins involved in polypeptide chain termination. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **34**: 469-477.
- Caskey, T., Scolnick, E., Tompkins, R., Goldstein, J. y Milman, G. 1969. Peptide chain termination, codón, protein factor and ribosomal requirements. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **34**: 479-488.

- Cohen, S. N. y A. C. Chang. 1970. Genetic expression in bacteriophage lambda. 3. Inhibition of *Escherichia coli* nucleic acid and protein synthesis during lambda development. *J. Mol Biol.* **49**: 557-575.
- Colombo, B., Felicetti, L. y Baglioni, C. 1966. Inhibition of protein synthesis in reticulocytes by antibiotics. I. Effects on polysomes. *Biochim. Biophys. Acta.* **119**: 109-119.
- Craigen, W. J. y Caskey, C.T. 1987. The function, structure and regulation of *E. coli* peptide chain release factors. *Biochimie.* **69**: 1031-1041.
- Cruz-Vera, L. R., Toledo, I., Hernández-Sánchez, J. y Guarneros, G. 2000. Molecular basis for the temperature sensitivity of *Escherichia coli* *pth*(Ts). *J. bacteriol.* **182**: 1523-1528.
- Cundliffe, E. 1972. The mode of action of fusidic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **46**: 1794-1801.
- Cundliffe, E. y McQuillen, K. 1967. Bacterial protein synthesis: the effects of antibiotics. *J. Mol. Biol.* **30**: 137-146.
- Cuzin, F., Kretchmer, N., Greenberg, R. E., Hurwitz, R. y Chapeville, F. 1967. Enzymatic hydrolysis of N-substituted aminoacyl-tRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **58**: 2079-2086.

-Del Tito, B. J. 1995. Effects of a minor Isoleucyl tRNA on heterologous protein translation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **24**: 7086-7091.

-Dinçbas, V., Heurgué-Hamard, V., Buckingham, R. H., Karimi, R. y Ehrenberg, M. 1999. Shutdown in protein synthesis due to the expression of mini-genes in bacteria. *J. Mol. Biol.* **291**: 745-759.

-Friedman, D. I., Olson, E. R., Georgopoulos, C., Tilly, K., Herskowitz, I. y Banuett, F., 1984. Interactions of bacteriophage and host macromolecules in the growth of bacteriophage lambda. *Microbiol. Rev.* **48**: 299-325.

-Gale, E.F., Cundliffe, E., Reynolds, P. E., Richmond, M. H. y Waring, M. J. 1981. The molecular basis of antibiotic action. John Wiley & Sons. Great Britain.

-García, Espitia, M. Tesis de licenciatura. Inhibición de la síntesis de proteínas en mutantes de *Escherichia coli*, defectivas en Peptidil-tRNA-Hidrolasa (Pth). 1996. Facultad de Estudios Superiores, Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México.

- García Villegas, M. R., De la Vega, F. M., Galindo, J. M., Segura, M., Buckingham, R. H. y Guarneros, G. 1991. Peptidil-tRNA hydrolase is involved in λ inhibition of host protein synthesis. *EMBO J.* **10**: 3549-3555.
- Goldberg, I. H., Stewart, M. L., Ayuso, M. y Kappen, L.S. 1973. On the mechanisms of inhibition of polypeptide synthesis by the antibiotics sparsomycin and pactamycin. *Fed. Proc.* **32**: 1688-1697.
- Guarneros, G., Machado, G., Guzmán, P. y Garay E. 1987. Genetic and physical location of the *Escherichia coli rap* locus, which is essential for growth of bacteriophage lambda. *J. Bacteriol.* **169**: 5188-5192.
- Guzmán, P., y Guarneros, G. 1989. Phage genetic sites involved in lambda growth inhibition by the *Escherichia coli rap* mutant. *Genetics.* **121**: 401-409.
- Guzmán, P., Rivera Chavira, B. E., Court D. L., Gottesman M. E. y Guarneros, G. 1990. Transcription of a bacteriophage lambda DNA site blocks growth of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**: 1030-1034.
- Haenni, A. L. y Lucas-Lenard, J. 1968. Stepwise synthesis of a tripeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **61**: 1363-1369.

-Henderson, D. y Weil, J. 1976. A mutant of *Escherichia coli* that prevents growth of phage lambda and is bypassed by lambda mutants in a nonessential region of the genome. *Virology*. **71**: 546-559.

-Henderson, D. y Weil, J. 1976. A mutant of *Escherichia coli* that prevents growth of phage lambda and is bypassed by lambda mutants in a nonessential region of the genome. *Virology*. **71**: 546-559.

-Hernández, J., Ontiveros, C., Valadéz, J. G., Buckingham, R. H. y Guarneros, G. 1997. Regulation of protein synthesis by minigene expression. *Biochimie*. **79**: 527-531.

-Hernández-Sánchez, J., Valadéz, J. G., Herrera, J. V., Ontiveros, C. y Guarneros, G. 1998. λ bar minigene-mediated inhibition of protein synthesis involves accumulation of of peptidyl-tRNA and starvation for tRNA. *EMBO J*. **17**: 3758-3765.

-Hershey, J. W. B. 1987. Protein synthesis. In Neidhardt, F. G. (ed.), *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*. ASM Press, Washington, DC, pp. 613-647.

-Heurgué-Hamard, V., Karimi, R., Mora, L., MacDougall, J., Leboeuf, C., Gréntzmann, G., Ehrenberg, M. y Buckingham, R. H. 1998. Ribosome release

factor RF4 and termination factor RF3 are involved in dissociation of peptidyl-tRNA from the ribosome. *EMBO J.* 17: 808-816.

-Ho, Y. S. y Kan, Y. W. 1987. In vivo aminoacylation of human and *Xenopus* suppressor tRNAs constructed by site-specific mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84: 2185-2188.

-Igarashi, K., Ishitsuka, H. y Kaji, A. 1969. Comparative studies on the mechanism of action of lincomycin, streptomycin and erythromycin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37: 499-504.

-Jacob, W. F., Santer, M. y Dahlberg, A. E. 1987. A single base change in the Shine-Dalgarno region of 16S rRNA of *Escherichia coli* affects translation of many proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 84: 4757-4761.

-Karimi, R., Pavlov, M. Y., Buckingham, R. H. y Ehrenberg, M. 1999. Novel roles for classical factors at the interface between translation termination and initiation. *Mol. Cell.* 3: 601-609.

-Karimi, R., Pavlov, M. Y., Heurgué-Hamard, V., Buckingham, R. H. y Ehrenberg, M. 1998. Initiation factors IF1 and IF2 synergistically remove peptidyl-tRNAs with short polypeptides from the P-site of translating *Escherichia coli* ribosomes. *J. Mol. Biol.* 281: 241-252.

- Kosak, M. 1983. Comparison of initiation of protein synthesis in procaryotes, eucaryotes and organelles. *Microbiol. Rev.* **47**: 145.
- Kössel, H. 1969. Purification of Peptidyl-tRNA hydrolase from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* **204**: 191-202.
- Kössel, H. y RajBhandary, U. L. 1968. Studies on polynucleotides. LXXXVI. Enzimic hydrolysis of N-acylaminoacyl-transfer RNA. *J. Mol. Biol.* **35**: 539-560.
- Lewin, B. 1990. Genes IV. Oxford University Press and Cell Press. New York.
- Lim, V., Veslovas, V., Spirin, A., Brimacombe, R., Mitchell, P. y Muller, F. 1992. How are tRNAs and mRNA arranged in the ribosome? An attempt to correlate the stereochemistry of the tRNA-mRNA interaction with constraints imposed by the ribosomal topography. *Nucleic Acids Res.* **20**: 2627-2637.
- Menez, J., Heurgue-Hamard, V. y Buckingham, R. H. 2000. Sequestration of specific tRNA species cognate to the last sense codón of an overproduced gratuitous protein. *Nucleic Acids Res.* **28**: 4725-4732.
- Menninger, J. R. 1976. Peptidyl transfer RNA dissociates during protein synthesis from ribosomes of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **251**: 3392-3398.

-Menninger, J. R. 1978. The accumulation as peptidyl-transfer RNA of isoaccepting transfer RNA families in *Escherichia coli* with temperature-sensitive peptidyl-transfer RNA hydrolase. *J. Biol. Chem.* **253**: 6808-13.

-Menninger, J. R., Walker, C. y Tan, P. F. 1973. Studies on the metabolic role of peptidyl-tRNA hydrolase. I. Properties of a mutant *E. Coli* with temperature-sensitive peptidyl-tRNA hydrolase. *Mol. Gen. Genet.* **121**: 307-324.

-Oleinick, N. L. y Corcoran, J. W. 1969. Two types of binding of erythromycin to ribosomes from antibiotic-sensitive and -resistant *Bacillus subtilis* 168. *J. Biol. Chem.* **244**: 727-735.

-Otaka, T. y Kaji, A. 1975. Release of (oligo) peptidyl-tRNA from ribosomes by erythromycin A. *Proc. Natl.Acad. Sci. U S A.* **72**: 2649-2652.

-Pérez-Morga, D. y Guarneros, G. 1990. A short DNA sequence from lambda phage inhibits protein synthesis in *Escherichia coli* rap. *J. Mol. Biol.* **216**: 243-250.

-Pestka, S. 1970. VIII Survey of the effect of antibiotics on N-acetyl-Phenylalanyl-Puromycin formation: Possible mechanism of chloramphenicol action. *Arch. Biochem.* **136**: 80-88.

- Schmitt, E., Mechulam, Y., Fromant, M., Plateu, P. y Blanquet, S. 1997. Cristal structure at 1.2 Å resolution and active site mapping of *Escherichia coli* peptidyl-tRNA hydrolase. *EMBO J.* **16**: 4760-4769.
- Schneider, R. J. 1987. Impact of virus infection on host cell protein synthesis. *Ann. Rev. Biochem.* **56**: 317-332.
- Shine, J. y Dalgarno, L. 1974. The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **71**: 1342-1346.
- Tai, P. C., Wallace, B. J. y Davis, B. D. 1973. Actions of aurintricarboxylate, kasugamycin and pactamycin on *Escherichia coli* polysomes. *Biochemistry.* **12**: 616-620.
- Tanaka, S., Otaka, T. y Kaji, A. 1973. Further studies on the mechanism of erythromycin actino. *Biochim. Biophys. Acta.* **331**: 128-140.
- Taubman, S. B., Jones, N. R., Young, F. E. y Corcoran, J. W. 1966. Sensitivity and resistance to erythromycin in *Bacillus subtilis* 168: the ribosomal binding of erythromycin and chloramphenicol. *Biochim. Biophys. Acta.* **123**: 438-440.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

- Tenson, T., Herrera, J. V., Kloss, P., Guarneros, G. y Mankin, A. S. 1999. Inhibition of translation and cell growth by minigene expression. *J. Bacteriol.* **181**: 1617-1622.
- Valadez, J. G., Hernández-Sánchez, J., Magos, M. A., Ontiveros, C. y Guarneros G. 2001. Increased *bar* minigene mRNA stability during cell growth inhibition. *Mol. Microbiol.* **39**: 361-370.
- Vázquez, D. 1966. Binding of chloramphenicol to ribosomes. The effect of a number of antibiotics. *Biochim. Biophys. Acta.* **114**: 277-288.
- Wilson, J. H., J. Kim y J. Abelson. 1972. Bacteriophage T4 transfer RNA. 3. Clustering of the genes for T4 transfer RNA's. *J. Mol. Biol.* **71**: 547-556.