



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA CONTEXTO DEL CODÓN AUG
INICIADOR EN mRNAs DE DIVERSOS EUKARIONTES**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias**

**PRESENTA:
VINCENT GONZÁLEZ OSNAYA**

TUTOR PRINCIPAL

**Dr. Greco Hernández Ramírez
Instituto Nacional de Cancerología**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova
Facultad de Química, UNAM**

**Dra. Marcela Lizano Soberón
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM**

MÉXICO, D. F. Febrero, 2016



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.

“La science, mon garçon, est faite d’erreurs, mais d’erreurs qu’il est bon de commettre, car elles mènent peu à peu à la vérité.”

Jules Verne.

Agradecimientos

Al programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP), por haberme permitido asistir al Congreso Internacional *Translational Control* en Cold Spring Harbor, *New York*, en el cual tuve la oportunidad de exponer mi trabajo.

CONTENIDO

	Página
ABREVIATURAS.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
ÍNDICE DE TABLAS	7
1. RESUMEN	8
2. INTRODUCCIÓN	9
Traducción	9
Los lisados celulares	13
Descubrimiento de la síntesis de proteínas usando lisados celulares	14
Componentes de una reacción de traducción <i>in vitro</i>	17
El inicio de la síntesis de proteínas en eucariontes. La traducción dependiente de cap.	24
Regulación en la síntesis de proteínas. El contexto del codón de inicio.	27
El mecanismo de <i>scanning</i> y el reconocimiento del AUG iniciador	29
3. JUSTIFICACIÓN.....	32
4. OBJETIVOS.....	33
Objetivo general.....	33
Objetivos específicos	33
5. ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL.....	33
6. MATERIALES Y MÉTODOS	34
Síntesis de mRNAs.....	34
Transformación de las células competentes DH5 α de <i>E. coli</i> por choque térmico.....	34
Obtención de plásmidos	34
Restricción / Linealización del plásmido	34
Purificación del DNA a partir de un gel de agarosa.....	35
Transcripción <i>in vitro</i>	35
Purificación de los mRNAs	36
Cuantificación de mRNAs	36
Determinación de la integridad de los mRNAs	36
Preparación de lisados competentes en traducción	37
De <i>S. pombe</i>	37
De <i>U. maydis</i>	38
Cuantificación de la concentración de proteína	39
mRNA reportero.....	39
Ensayo de traducción <i>in vitro</i>	39
De reticulocitos de conejo	39
De <i>S. pombe</i>	40

De <i>U. maydis</i>	40
Análisis estadístico de las secuencias	41
7. RESULTADOS	41
Estandarización de lisados	41
Comparación de la eficiencia traduccional de mRNAs con secuencias Kozak y no Kozak.	52
8. DISCUSIÓN.....	61
Desarrollo de nuevos lisados de traducción	61
Evaluación de los nucleótidos alrededor del codón AUG.....	63
La secuencia de inicio en <i>S. pombe</i> y <i>U. maydis</i> no es Kozak	63
Uracilo en -3 y citosina en +4 atenúan la traducción	65
9. CONCLUSIONES.....	66
10. PERSPECTIVAS	67
11. REFERENCIAS	67
12. ANEXO	72

ABREVIATURAS

Términos

AMP	Monofosfato de adenosina/ <i>Adenosine monophosphate</i>
ATP	Trifosfato de adenosina/ <i>Adenosine triphosphate</i>
AUG	Codón iniciador, codifica para el aminoácido metionina
Cap	7-metilguanosina / m ⁷ GpppN
Cola Poli(A)	Secuencia adeninas en la región 3'-UTR de ciertos mRNA
DEPC	Dietyl pirocarbonato/ <i>Diethylpyrocarbonate</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico/ <i>Deoxyribonucleic acid</i>
DTT	Dithiothreitol.
eIF-	Factor de inicio en eucariotes
FLuc	Cistrón de luciferasa de luciérnaga
GDP	Guanosina difosfato/ <i>Guanosine diphosphate</i>
GTP	Guanosina trifosfato/ <i>Guanosine triphosphate</i>
IRES	Sitio interno de entrada al ribosoma/ <i>Internal ribosome entry site</i>
mRNA	RNA mensajero
met-tRNAi ^{met}	RNA de transferencia iniciador
ORF	Marco abierto de lectura/ <i>Open reading frame</i>
PABP	Proteína de unión a la cola Poli(A)/ <i>Poly(A) Binding protein</i>
Rluc	Cistrón de luciferasa de renilla
RNA	Ácido ribonucleico/ <i>Ribonucleic acid</i>
rRNA	RNA ribosomal
tRNA	RNA de transferencia
T7	Promotor de la RNA polimerasa del bacteriofago T7
UTR	Región no traducida del mRNA/ <i>Untranslated region</i>
5'-UTR	Región no traducida del mRNA del extremo 5'
3'-UTR	Región no traducida del mRNA del extremo 3'

Unidades

Abs	Absorbancia
D.O.	Densidad óptica
g	gramos
h	Horas
kDa	kiloDaltón
kg	kilogramo
L	Litro
M	Molar
mM	milimolar
mg	miligramo
µg	microgramo
min	minuto
mL	mililitro
µL	microlitro
ng	nanogramo
°C	grado Celsius
p/v	Relación peso-volumen
pH	potencial de hidrógeno
rpm	revoluciones por minuto
s	segundos
S	Unidades de tasa de sedimentación
U.A.	unidades arbitrarias de luz
V	volts

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Sistema de reacciones acopladas para la regeneración de ATP	19
Figura 2. Reacción bioluminiscente catalizada por la luciferasa	23
Figura 3. El inicio de la traducción en eucariontes	26
Figura 4. El mRNA con mutaciones alrededor del codón AUG iniciador.	39
Figura 5. Actividad de FLuc (<i>en unidades arbitrarias, U.A.</i>) usando lisados competentes de <i>S. pombe</i> .	43
Figura 6. Actividad de FLuc (<i>en unidades arbitrarias, U.A.</i>) dependiente de la temperatura usando lisados competentes de <i>S. pombe</i> .	45
Figura 7. Efecto del magnesio en lisados competentes en traducción de <i>S. pombe</i> .	46
Figura 8. Efecto del potasio en lisados competentes en traducción de <i>S. pombe</i> .	47
Figura 9. Actividad de FLuc (<i>en unidades arbitrarias, U.A.</i>) usando lisados competentes de <i>U. maydis</i> .	48
Figura 10. Actividad de FLuc (<i>en unidades arbitrarias, U.A.</i>) dependiente de la temperatura usando lisados competentes de <i>U. maydis</i> .	49
Figura 11. Efecto del Magnesio en lisados competentes en traducción de <i>U. maydis</i> .	50
Figura 12. Efecto del Potasio en lisados competentes en traducción de <i>U. maydis</i> .	51
Figura 13. mRNAs utilizados para los ensayos de traducción <i>in vitro</i> .	52
Figura 14. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes para RNA.	54
Figura 15. Actividad de FLuc (<i>en unidades arbitrarias, U.A.</i>) usando lisados de <i>S. pombe</i> para la traducción de mRNAs cuya secuencia alrededor del AUG se muestra en la parte superior de cada barra.	55
Figura 16. Actividad de FLuc (<i>en unidades arbitrarias, U.A.</i>) usando lisados de <i>S. pombe</i> para la traducción de mRNAs cuya secuencia alrededor del AUG se muestra en la parte superior de cada barra.	56
Figura 17. Actividad de FLuc (<i>en unidades arbitrarias, U.A.</i>) usando lisados de <i>U. maydis</i> para la traducción de mRNAs cuya secuencia alrededor del AUG se muestra en la parte superior de cada barra.	57
Figura 18. Actividad de FLuc (<i>en unidades arbitrarias, U.A.</i>) usando lisados de <i>U. maydis</i> para la traducción de mRNAs cuya secuencia alrededor del AUG se muestra en la parte superior de cada barra.	58
Figura 19. Actividad de FLuc (<i>en unidades arbitrarias, U.A.</i>) usando lisados de reticulocitos de conejo para la traducción de mRNAs cuya secuencia alrededor del AUG se muestra en la parte superior de cada barra.	59
Figura 20. Análisis de las secuencias preferidas.	60
Figura 21. Análisis de las secuencias que atenúan la traducción	61

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Lisados competentes de traducción <i>in vitro</i> de diversos organismos	12
Tabla 2. Análisis <i>in silico</i> de nucleótidos consenso alrededor del codón AUG iniciador para diversos grupos taxonómicos.	30
Tabla 3. Validación experimental de la secuencia alrededor del AUG iniciador en diversos organismos	33
Tabla 4. Condiciones óptimas encontradas en esta tesis.	53
Tabla 5. Condiciones de estandarización de los lisados de traducción.	62
Tabla 6. Frecuencias en los nucleótidos alrededor del codón AUG de inicio para los mRNAs con una tasa de traducción óptima.	64
Tabla 7. Frecuencias en los nucleótidos alrededor del codón AUG de inicio para los mRNAs con una tasa de traducción más baja.	65

1. RESUMEN

Las síntesis de proteínas o “Traducción” es un proceso altamente sofisticado que se divide en cuatro etapas: iniciación, elongación, terminación y reciclamiento. El proceso global de la traducción es básicamente regulado en el paso de iniciación. En eucariontes consiste en el reclutamiento de la subunidad ribosomal 40S por el extremo 5' del mRNA que va a ser traducido; de esta manera, la subunidad ribosomal recorre el 5'-UTR del mRNA en un proceso denominado *scanning*, hasta encontrar el codón AUG de inicio. Subsecuentemente la subunidad ribosomal 60S se une y da inicio el paso de elongación.

La traducción de los mRNAs es fuertemente controlada por el reconocimiento del codón iniciador AUG por el ribosoma. Este proceso fue descrito por vez primera en la década de los 80's por Marilyn Kozak, quien encontró que en mRNAs de vertebrados el codón iniciador, para una traducción óptima, está localizado dentro de una secuencia específica, ahora conocida como la “*secuencia Kozak*” y cuyo consenso es (A/G)CCAAUGG. Ella demostró experimentalmente que A o G en posición -3 (en relación a la A del AUG iniciador), y G en posición +4 son las bases funcionalmente más importantes de esta secuencia.

Análisis *in silico* de genomas completos en diversas especies, han establecido que existe diversidad en la secuencia alrededor del AUG en diferentes eucariontes. Aunque carecen de validación experimental, estos datos sugieren que los mRNAs de organismos morfológicamente complejos como los metazoarios mantienen la secuencia consenso Kozak, a diferencia de especies menos complejas como hongos unicelulares y protistas que presentan secuencias diferentes. Por estas razones, en el presente trabajo se estudió experimentalmente la importancia de la secuencia contexto del codón iniciador AUG de dos organismos filogenéticamente lejanos de vertebrados, el hongo unicelular *Schizosaccharomyces pombe* y el hongo multicelular *Ustilago maydis*. Para ello, se desarrollaron nuevos protocolos para preparar lisados competentes en traducción, no existentes para estas especies. Con las herramientas desarrolladas en esta tesis, demostramos que la secuencia Kozak no es la óptima para la síntesis de proteínas en los hongos analizados. Para ello, se utilizaron

diversos mRNAs con mutaciones en los nucleótidos alrededor del AUG, mismo que contiene el gen reportero FLuc (codifica para la enzima luciferasa), siendo ANAAUGA el contexto para ambos organismos (donde N es cualquier nucleótido). Así mismo se encontró que la secuencia UN(A/C)AUGC atenúa la traducción en los dos hongos de estudio y un vertebrado.

Por lo anterior, estudiar los mecanismos que regulan la traducción en especies de diversos *phyla* es crucial para adquirir un conocimiento profundo y real de este proceso en los eucariontes, pues ésta perspectiva es imprescindible para entender su importancia en el funcionamiento y evolución de la vida.

2. INTRODUCCIÓN

Traducción

La traducción o síntesis de proteínas es uno de los procesos fundamentales de la vida. Consiste en decodificar un mRNA para sintetizar un polipéptido o proteína por el ribosoma asistido por un conjunto de factores de traducción. Por lo tanto, es un proceso fundamental en la expresión genética (Browning & Bailey-Serres 2015).

Las células necesitan en cada instante miles de proteínas diferentes, que son sintetizadas en respuesta a las necesidades metabólicas del momento, transportadas o dirigidas hasta la localización celular adecuada y degradadas cuando no son necesarias; así, traducir la información de los ácidos nucleicos en polipéptidos, representa el paso final de la ruta en la expresión génica de la mayor parte de los transcritos (Gebauer & Hentze 2004).

No es sorprendente que la síntesis de proteínas sea un proceso sumamente complejo, con una multitud de reacciones altamente coordinadas e interconectadas que incluso, la mínima alteración resulte en cambios de alto impacto. La maquinaria de traducción en todos los reinos de la vida contiene componentes básicos muy conservados, como son los ribosomas, mRNAs, tRNAs, tRNA sintetasas y factores proteicos (Spirin & Swartz 2007). A su vez, el proceso de la traducción globalmente está muy conservado en todos los

eucariontes. Se estima que la síntesis requiere de la participación de por lo menos 70 proteínas ribosómicas diferentes y en células eucariontes, poco más de 20 factores específicos para el inicio, elongación y terminación de los polipéptidos (Jackson, *et al.* 2010).

Los ribosomas, universalmente conservados, son el complejo molecular central de la síntesis, que consisten en dos subunidades (llamados 40S y 60S en eucariontes) que contienen los sitios de unión para el peptidil-tRNA, el aminoacil-tRNA y el mRNA. Por otro lado, el mRNA es una copia de la información genética que ha de ser traducida; toda la información contenida es descifrada por el código genético, un diccionario biológico que cumple con la extraordinaria tarea de traducir un lenguaje escrito en un alfabeto de cuatro nucleótidos (adenina, guanina, timina y citosina) en un segundo lenguaje escrito en un alfabeto de 20 aminoácidos (Liljas 2013; Sonenberg & Hinnebusch 2009). Por esta razón, la importancia del tRNA radica en ser la molécula traductora, ya que para una secuencia específica de nucleótidos une un aminoácido determinado.

El codón iniciador AUG no solo define el inicio, sino que establece el marco de lectura de un mRNA. La traducción tiene lugar de tal manera que, tripletes de nucleótidos o codones, son leídos sucesivamente y sin sobreposición. No existe puntuación entre los codones; de hecho, la secuencia de aminoácidos de una proteína está definida por una secuencia lineal de tripletes contiguos (Liljas 2013).

Por lo anterior, pensando en la analogía de un nuevo lenguaje, imaginando a los nucleótidos como letras y que su combinación puede formar palabras, ¿Qué palabras definen a los aminoácidos? Al respecto, en 1961, Marshall Nirenberg y Heinrich Matthaei realizaron el primer avance significativo descifrando una de las 64 palabras del código genético. Al usar una molécula de RNA consistente exclusivamente de poliuracilo, lograron sintetizar una proteína formada por un solo tipo de aminoácido: la fenilalanina. Aunque en la reacción estaban presentes los 19 aminoácidos restantes, el mRNA sintético dio origen a una cadena de un único aminoácido. No había duda de que UUU correspondía a la fenilalanina, primer palabra del diccionario genético en ser decodificada (Nirenberg & Matthaei 1961b; Nirenberg & Matthaei 1961a). El uso del poli(U) fue el precursor en el desciframiento de las palabras del código genético, el significado de todos los

tripletes fue finalmente establecido en la década de los 70's. Por ello, el descifrado del código genético está considerado como uno de los mayores descubrimientos científicos del siglo XX.

Desde los trabajos de Nirenberg, los lisados usados en traducción *in vitro* han sido una herramienta importante en la biología molecular hasta nuestros días (Chong 2014b). Distintas generaciones de científicos han mejorado los lisados de traducción *in vitro*, haciéndolos cada vez más robustos y más eficientes (Spirin & Swartz 2007; Chong 2014b; Katzen et al. 2005); en cuanto a los lisados de organismos eucariontes, los más usados son los de reticulocitos de conejo y de trigo, actualmente comerciales. Sin embargo, el estudio de la traducción se ha limitado al uso de solo unas pocas especies modelo, por lo que, desarrollar y optimizar lisados de organismos de los diferentes reinos de la vida nos permitirá expresar *in vitro* una infinidad de proteínas, en diversas condiciones y en diferentes ambientes, pero sobretodo nos permitirá entender el proceso de traducción de manera más profunda. En la Tabla 1 se describen todos los lisados para realizar traducción *in vitro* que a la fecha se han desarrollado. Como se ve, la gran mayoría son animales o plantas superiores, por lo que hoy en día es necesario desarrollar nuevos sistemas de otras especies más allá de los organismos modelo. Esto nos permitirá producir biomoléculas que tengan impacto en diversos campos como el biotecnológico, la biología sintética y el diagnóstico clínico, y además nos permitirán comprender nuevos aspectos de la evolución de la vida (Katzen *et al.* 2005).

La traducción *in vitro* nos ha permitido usar diversos organismos para responder diversas preguntas en el campo de la regulación traduccional. Por lo anterior, en este trabajo se revisarán los aspectos importantes de la síntesis de proteínas, enfatizando en los mecanismos moleculares, la historia del campo de la traducción, los avances más recientes y sus aplicaciones. Así mismo, se detalla el desarrollo experimental de nuevos protocolos para realizar traducción *in vitro* en organismos no modelo. Esto nos ha permitido responder una pregunta fundamental, que es, determinar cual es el papel en la regulación del inicio de la traducción de la secuencia contexto alrededor del codón AUG iniciador.

Tabla 1. Lisados competentes de traducción *in vitro* de organismos. Se ordenan cronológicamente.

Grupo taxonómico	Organismo	Autores	Año
Planta monocotiledónea	Maíz <i>Zea mays</i>	R. Rabson, G. Novelli	1960
Planta monocotiledónea	Trigo <i>Triticum aestivum</i>	A. Marcus, B. Luginbill	1968
Animal artropodo	Crustáceo <i>Artemia salina</i>	J. Sierra, S. Ochoa	1974
Animal vertebrado	Reticulocitos de Conejo <i>Oryctolagus cuniculus</i>	T. Hunt, R. Jackson	1974
Planta monocotiledónea	Centeno <i>Secale cereale</i>	A. Carlier, W. Peumans	1976
Animal artropodo	Mosca <i>Drosophila melanogaster</i>	M. Scott, M. Pardue	1979
Planta dicotiledónea	Guisante <i>Pisum sativum</i>	W. Peumans, J. Schreurs	1980
Hongos ascomicete	Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	M. Tuite, J. Plesset	1980
Animal Echinodermo	Erizo de mar <i>Lytechinus pictus</i>	M. Winkler, R. Steinhardt	1981
Protista Dinoflagelado	Dinoflagelados <i>Gonyaulax polyedra</i>	A. Schröder-Lorenz	1987
Animal vertebrado	Rana <i>Xenopus laevis</i>	T. Patrick, C. Lewer, V. Pain	1989
Animal vertebrado	Humano <i>Homo sapiens</i> (células HeLa)	A. Molla, A. Paul, E. Wimmer	1991
Hongos ascomicete	Levadura <i>Candida albicans</i>	D. Colthurst M. Tuite	1991
Hongos ascomicete	Hongo filamentoso <i>Neurospora crassa</i>	Z. Wang	1997
Animal artropodo	Palomilla <i>Spodoptera frugiperda</i>	S. Kubick	2003
Planta dicotiledónea	Tabaco <i>Nicotiana tabacum</i>	K. Komoda, S. Naito	2004
Animal nemátodo	Gusano redondo <i>Ascaris suum</i>	S. Lall, C. Friedman	2004
Protista kinetoplástido	Leishmania <i>Leishmania tarentolae</i>	S. Mureev, K. Alexandrov	2009
Planta dicotiledónea	Arabidopsis <i>Arabidopsis thaliana</i>	K. Murota, K. Komoda	2011

Los lisados celulares

Los lisados competentes en traducción *in vitro* son sistemas provenientes de extractos crudos de tejidos u organismos, simulan un ambiente celular que favorece la traducción pero están libres de DNA genómico y membranas, por lo que nos permiten trabajar con los componentes citosólicos relevantes para realizar este proceso, como son los ribosomas, factores de inicio, elongación y terminación, tRNAs, aminoácidos, ATP, GTP, mRNAs y un amortiguador de pH adecuado (Carlson *et al.* 2012). A su vez, nos permiten adicionar sustratos, remover productos y monitorear al sistema para llevar a cabo una síntesis eficiente de proteínas (Spirin & Swartz 2007).

La gran utilidad de los sistemas *in vitro* se ha hecho presente desde hace poco más de un siglo, cuando en 1897 Eduard Buchner usaba extractos de levadura para realizar experimentos de fermentación (Buchner 1897); a partir de entonces, su uso ha desempeñado un papel importante en el entendimiento de las bases de la biología molecular hasta nuestros días. El ejemplo más emblemático es quizá el deciframiento del código genético por Nirenberg, al ser uno de los hallazgos más importantes en la historia de la ciencia y que lo hizo merecedor del premio Nobel en 1968.

Dentro de la variedad de las aplicaciones de los lisados competentes en traducción se encuentra el estudio en el plegamiento de las proteínas, la incorporación de aminoácidos marcados para análisis específicos, la expresión de genes que dan origen a elementos tóxicos para la célula, proteínas que son difícil de expresar *in vivo* o cuando son blanco de proteasas intracelulares (Hodgman & Jewett 2012; Carlson *et al.* 2012; Hodgman & Jewett 2013).

Por otro lado, los lisados celulares también han desempeñado un papel importante en la industria biotecnológica, pues desde hace más de 30 años la traducción *in vitro* de enzimas, proteínas recombinantes, péptidos específicos, y compuestos de interés farmacéutico ha revolucionado la biotecnología moderna (Hodgman & Jewett 2012; Whittaker 2013).

Descubrimiento de la síntesis de proteínas usando lisados celulares

Finalizada la segunda guerra mundial, isótopos de baja energía como ^{35}S , ^{32}P , ^{14}C y el ^3H llegaron a estar disponibles en muchos centros de investigación dedicados al cáncer. Así, la Comisión de Energía Atómica de Estados Unidos fomentaba el uso controlado de elementos radiactivos con fines científicos y de innovación terapéutica. El interés desde entonces, estaba en el cáncer, que a su vez estaba íntimamente relacionado con el metabolismo de las proteínas. Para la década de 1950, la atención de los biólogos estaba sobre el mecanismo de la síntesis de proteínas, por lo que la incorporación de aminoácidos marcados radioactivamente eran las investigaciones más frecuentes de la época (Rheinberger 2004).

Los primeros estudios se realizaban administrando aminoácidos radioactivos a animales y demostrando su incorporación en las proteínas de diversos tejidos. Sin embargo, los aminoácidos marcados no estaban disponibles comercialmente y solo estaban limitados a ser usados en cantidades pequeñas. El intento por realizar trabajos *in vivo* optimizando el uso de isótopos, los llevo a trabajar con órganos aislados y fragmentos de tejidos.

Los trabajos de Jacklyn Melchior, Theodore Winnick y Felix Friedberg utilizando diversos elementos radiactivos fueron realmente importantes; sin embargo, las innovaciones del grupo de Paul Zamecnik son considerados de mayor relevancia, debido a que relacionaron por primera vez a los elementos denominados *microsomas* (hoy conocidos como ribosomas) con la biogénesis de proteínas (Rheinberger 2004; Siekevitz & Zamecnik 1981).

Zamecnik comenzó a trabajar con la síntesis de proteínas en 1945; como médico, estaba interesado en los agentes carcinogénicos y en el metabolismo de las proteínas entre el tejido sano y el neoplásico, utilizando como modelo hepatocarcinomas de rata. En 1948 Robert Lofffielm, químico orgánico del Centro de Radiactividad del Instituto Tecnológico de Massachusetts, en los Estados Unidos, en colaboración con Zamecnik introducen ^{14}C -alanina y glicina en hígado de rata, demostrando mayor incorporación en tejido de cáncer que en tejido sano, en función directa del tiempo, a una temperatura constante y en presencia de oxígeno (Zamecnik 2005). Por aquella época, Fritz Lipmann había demostrado que el dinitrofenol (DNP) interfería con el proceso de fosforilización. Así, cuando

Zamecnik incorporó DNP en sus experimentos, observó que la incorporación de los aminoácidos se detenía. Esto lo llevó a establecer que el DNP inhibe la síntesis de ATP; esta relación sugería que la fosforilación de los aminoácidos ocurre como paso inicial para la síntesis de proteínas. Pasaron tres años para demostrar que la incorporación de los aminoácidos marcados se llevaba a cabo por la formación de un enlace peptídico (Rheinberger 2004). Los avances en la síntesis de proteínas eran el tema de interés y estaba claro que los científicos necesitaban lisar células, aislar y caracterizar los componentes involucrados en la síntesis de proteínas, por lo que, el esfuerzo por encontrar un sistema de traducción *in vitro* capaz de sintetizar proteínas, ocupaba la atención de diversos laboratorios entre los años 1948 y 1952 (Chong 2014a; Spirin & Swartz 2007).

En 1952 Zamecnik en colaboración con Philip Siekevitz, homogenizaron tejido de rata y lo fraccionaron por centrifugación (Siekevitz 1952). El resultado fue “un pantano bioquímico”, como lo denominó Zamecnik; es decir, una fracción sobrenadante enriquecida con *microsomas* capaces de sintetizar proteínas *in vitro*, separada de los restos celulares. Estos lisados de tejido incorporaban pocos aminoácidos marcados, pero significativo para demostrar que sus lisados eran competentes. Los esfuerzos por mejorar sus extractos, combinando la metodologías de radiación y de centrifugación diferencial, los llevaron, tan solo un año después a sedimentar eficientemente los microsomas, al mismo tiempo que adicionaron ATP y sistemas regeneradores de energía lograron optimizar en gran medida sus experimentos.

En esa época, los sistemas en bacterias eran particularmente más difíciles que los eucariontes; la lisis no era eficiente, por lo que un pequeño porcentaje de células vivas podría interferir con la actividad de síntesis en esos lisados (Zamecnik 2005). Por ello, los sistemas eucariontes como los de reticulocitos de conejo, han sido desde entonces, los más usados.

Por otro lado, en 1955 el grupo de Severo Ochoa, en Nueva York, había identificado una enzima capaz de sintetizar RNA a partir de nucleótidos difosfato y por primera vez una enzima “sintetizadora de RNA” había sido aislada. Zamecnik, relacionó al RNA con los aminoácidos, proponiendo un elemento intermediario capaz de formar cadenas de aminoácidos; debido a que se encontraba en las

fracciones solubles, lo denominó RNA soluble (sRNA). Así, este elemento que hoy se conoce como RNA de transferencia (tRNA), fue el nuevo foco de atención para los investigadores, y la primera evidencia experimental de su existencia fue hecha por Robert Holley en la década de 1960, en la Universidad de Cornell (Holley *et al.* 1965). Sin embargo la suposición fue establecida por Francis Crick quien propuso la “hipótesis del adaptador” basándose en la idea de que existe una molécula capaz de mediar la traducción de un alfabeto de RNA en un nuevo código de proteínas.

Para finales de 1950, los lisados celulares eran una herramienta de gran utilidad con aplicaciones biotecnológicas. Así, era posible analizar los componentes de un sistema de traducción, estableciendo solo cinco elementos principales para la síntesis de proteínas *in vitro*: 1) aminoácidos, 2) “donadores de ATP”, 3) fracciones enzimáticas 4) fracción microsomal y 5) el RNA soluble. La denominada fracción microsomal era el corazón de la síntesis de las proteínas ya que era la parte rica en ribonucleoproteínas así como el sitio de polimerización de los péptidos. Hasta este punto de la historia, la participación del ácido ribonucleico en la síntesis de proteínas no estaba claro y era convenientemente llamado *elemento ribonucleoproteico*.

Por otro lado y respetando el orden cronológico, en 1958 se celebró el primer Simposio de un grupo llamado Sociedad Biofísica, donde fueron publicados artículos e investigaciones sobre el RNA y la síntesis de proteínas. Aquí, R. B Roberts, propone por vez primera el nombre de *Ribosomas* para llamar a aquellas partículas (los microsomas) que contienen una tercera parte de RNA y dos de proteína. Se estimaba que medían entre 10 y 15 μm de diámetro y su valor de sedimentación, según diversos reportes se encontraba en 100S. Roberts mejoró la técnica de asilamiento utilizando diversos gradientes de sacarosa, lo que permitió la separación física y el asilamiento de macromoléculas en diversas tasas de sedimentación. Por ello, finalmente logró la caracterización de ribosomas de diversos organismos.

Los primeros sistemas de traducción eran poco eficientes. Los componentes eran purificados con periodos de centrifugación a 30,000 rpm, por lo que fueron denominados S30. Así, suplementados con aminoácidos y ATP producían poca

pero significativa cantidad de proteína. Los periodos de incubación eran muy cortos, y el método para cuantificar el péptido era determinando la descarboxilación de los aminoácidos, un técnica poco eficiente (Siekevitz & Zamecnik 1981). Pero en 1956 con el descubrimiento del guanosin trifosfato (GTP) como un cofactor esencial para la aminoacilación del tRNA y en la formación de enlaces peptídicos en el ribosoma, los lisados se hicieron por mucho, más robustos. Tan solo un año después, Zamecnick en colaboración de Marvin Lamborg, optimizaban extractos de *Escherichia coli*.

En estos sistemas, sin embargo, los ribosomas seguían traduciendo mRNAs endógenos, por lo que en 1961 Nirenberg y Matthaei en su intento de decifrar el código genético adicionaron nucleasa micrococcal para destruir mRNAs endógenos sin dañar a los ribosomas y al resto de las proteínas propias de la maquinaria traduccional (Nirenberg & Matthaei 1961a).

Componentes de una reacción de traducción *in vitro*

En principio, es posible preparar lisados competentes en traducción de cualquier tipo de células y de cualquier organismo. En la práctica, solo unos pocos lisados han sido estandarizados con éxito (ver Tabla 1). Los más frecuentemente utilizados consisten en extractos de reticulocitos de conejo y de trigo, como sistemas eucariontes; y de *E. coli* como sistema procarionte. Todos son preparados como extractos crudos que contienen los elementos macromoleculares requeridos para la traducción de mRNA exógenos, como las subunidades ribosomales, tRNAs, aminoacil tRNA sintetasas, y los diversos factores de inicio, elongación y terminación. Para mejorar la eficiencia de la traducción *in vitro* de un lisado, es necesario suplementar la reacción con aminoácidos, fuentes de energía (ATP, GTP), sistemas regeneradores de energía (creatin fosfato y creatin fosfocinasa) así como elementos estabilizantes y cofactores. En esta sección, se presentan los elementos indispensables para una eficiente traducción de proteínas *in vitro* usando lisados de organismos eucariontes.

El lisado celular

En esta tesis usamos la palabra “sistema” de traducción como el conjunto de componentes que contiene una reacción de traducción *in vitro*, preparado a partir de un lisado celular de un organismo determinado.

Un error común en las reacciones de traducción *in vitro* es adicionar cantidades excesivas de lisado crudo para obtener rendimientos mayores. Dado que los lisados contienen todos los factores involucrados en la síntesis de proteínas y otros componentes de la maquinaria de síntesis, éstos podrían inhibir la traducción si no están en su concentración óptima. Los valores estándar para preparar una reacción de traducción, oscilan entre el 20 y 60% v/v de la reacción. El paso por columna de exclusión molecular como la Sephadex, que se usa en la preparación de algunos lisados para eliminar proteínas que inhiben la traducción, o los diversos pasos de obtención y/o purificación del lisado son aspectos que influyen en la concentración del mismo. Por lo anterior, se recomienda optimizar el porcentaje de lisado para cada sistema de traducción debido a la disponibilidad de los componentes, las enzimas propias y la maquinaria ribosomal intrínsecas de cada organismo (Spirin & Swartz 2007).

Magnesio y fosfato

El magnesio es el segundo catión más abundante en las células, después del potasio. Está implicado en una variedad de funciones biológicas que van desde un papel estructural, estabilizando grupos cargados negativamente como los fosfatos en los ácidos nucleicos, hasta la activación o inhibición de enzimas, la modulación de la proliferación y diferenciación celular, entre otras funciones (Hartwig 2001). Así, los iones de magnesio son esenciales para diversas reacciones biológicas, particularmente para aquellas enzimas que utilizan nucleótidos como cofactores o sustratos.

En las reacciones de traducción *in vitro*, la concentración de magnesio libre cambia cuando se usa la creatin cinasa, enzima implicada en el abastecimiento de ATP a partir de ADP; el verdadero sustrato de esta enzima es el ion formando un complejo con ADP denominado quelato, en el cual el magnesio neutraliza la densidad de cargas del ADP y facilita su fijación en la enzima. Los complejos

ternarios de esta configuración se conocen como complejos ligados por el sustrato (Burgers & Eckstein 1980).

El magnesio también está implicado en el reciclamiento de los complejos ribosomales una vez terminada la elongación y liberación de los péptidos: el complejo 80S se disocia en las subunidades 40S y 60S a bajas concentraciones de este ion (Jackson, *et al.* 2010). Del mismo modo, a bajas concentraciones, el mecanismo de *scanning* se lleva a cabo adecuadamente, facilitando el reclutamiento del mRNA por la subunidad 40S (Kozak 1979). De este modo, la concentración total de magnesio añadida es un factor muy influyente en las reacciones de traducción. Debido a que el ion Mg^{2+} puede interactuar con muchos componentes, es recomendable optimizar la concentración para cada reacción. Los sistemas actuales de síntesis de proteínas, utilizan intervalos estándares de concentración que van de 8 a 20 mM (Spirin & Swartz 2007).

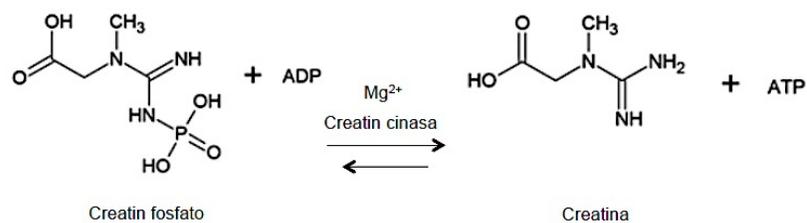


Figura1. Sistema de reacciones acopladas para la regeneración de ATP.

Fosfato

El creatin fosfato es de singular importancia en el suministro de energía al servir como principal donador de grupos fosfato utilizados para producir ATP. Una característica común en estos componentes es la hidrólisis de uno de los enlaces fosfodíester de los grupos fosfato bajo condiciones “favorables” energeticamente dentro de la célula, que puede ser usado para la formación de ATP con ayuda de la enzima creatin cinasa. La concentración intracelular de creatin fosfato en las células musculares es cerca de 25 mM, por lo que en sistemas de traducción se adiciona la misma concentración (Spirin & Swartz 2007; Bray 2001). En la Figura 1

se muestra el mecanismo enzimático de generación de ATP a partir de creatin fosfato, catalizado por la creatin cinasa.

Potasio

La síntesis de proteínas depende en gran medida del ion K^+ . Anteriormente era común el uso de KCl, pero los iones cloruro se unen a las subunidades ribosomales cuando es usado por encima de 50 mM, disminuyendo drásticamente la tasa de elongación. Por esto, la optimización de las reacciones de traducción *in vitro* han llevado a usar acetato de potasio, pues se pueden obtener concentraciones fisiológicamente representativas a los niveles intracelulares. A pesar de que el acetato no es un ion fisiológico, esta sal es aceptada para los sistemas de traducción actuales. Una alternativa es el uso de glutamato de potasio, que tampoco afecta la elongación, pero es usado principalmente en sistemas procariontes, donde el ion glutamato es el principal anión intracelular (Jackson 1991).

Los iones monovalentes como el K^+ desempeñan un papel secundario en el plegamiento, previniendo la repulsión de cargas. No obstante, la función del magnesio en la traducción es tan importante como la del potasio, pues trabajan de manera conjunta y cooperativa para estabilizar las subunidades ribosomales (Allen & Wong 1986). De esta forma, es conveniente estandarizar las condiciones ideales de este monocación, dado que, en diversos sistemas el intervalo de concentración abarca de 100 hasta 700 mM (Spirin & Swartz 2007).

Nucleótidos y aminoácidos

Para los sistemas procariontes de traducción, los nucleótidos trifosfatados sirven como sustratos de la transcripción y de la traducción. Sin embargo, en sistemas eucariontes son de utilidad como fuentes de energía. Por ejemplo, el ATP es requerido para el funcionamiento de la helicasa eIF4A, que elimina estructuras secundarias en la porción 5'-UTR, siendo proporcional la cantidad de ATP usado al grado de enrollamiento del mRNA (Jackson, *et al.* 2010). Del mismo modo la adenilación de los aminoácidos para ser cargados al tRNA requiere de ATP.

Por otra parte, el GTP es requerido en el paso de iniciación para formar el complejo ternario (tRNA^{Met}- eIF2- GTP), que servirá de sustrato para el factor de inicio eIF5, hidrolizando y estableciendo interacción del codón con el anticodón en la subunidad 40S. Así mismo, el mecanismo de elongación lo necesita para trasladar y dar continuidad a la formación del péptido (Watson *et al.* 2013).

Las proteínas están constituidas por los aminoácidos. Los extractos crudos de cada organismo contienen cantidades reducidas de éstos, por lo que es necesario suplementar las reacciones de traducción *in vitro* con mezclas comerciales en concentraciones entre 0.5 y 2 mM (Watson *et al.* 2013; Lehninger *et al.* 2005; Spirin & Swartz 2007).

Agentes estabilizantes

Los principales agentes estabilizantes son aquellos que controlan el pH. El HEPES-KOH y Bis-Tris proveen ambientes óptimos para la función de muchas enzimas. Confieren un pH de entre 6.5 y 7.9 y son utilizados para sistemas que tienden a acumular ácidos débiles, principalmente aquellos sistemas que, por ser lisados totales, liberan glucosa, piruvato o glutamato al medio (Spirin & Swartz 2007).

La espermidina es una triamina, una amina policatiónica que ayuda a estabilizar el pH y tiene capacidad de unión a los ácidos nucleicos. Incrementa la tasa de síntesis de proteínas al favorecer la cohesión del rRNA y las proteínas ribosomales, componentes esenciales del ribosoma (Takemoto *et al.* 1983).

El DTT (Dithiothreitol) como un agente reductor, es adicionado para evitar la formación de puentes disulfuro en las proteínas y principalmente para prevenir las reacciones intra e intermoleculares entre residuos de cisteínas. Estabiliza proteínas que poseen grupos sulfhídrico, manteniendo en estado reducido los grupos monothiol. Es importante considerar concentraciones bajas (1-3 mM), dado que puede desnaturalizar proteínas y disminuir la eficiencia de la reacción (Spirin & Swartz 2007; Cleland 1964).

tRNA y las aminoacil-tRNA sintetasas

En el lisado celular se encuentran presentes las enzimas aminoacil-tRNA sintetasas que dan fidelidad en la traducción de un mRNA, ya que son

responsables de la fijación del aminoácido correcto en una molécula específica de tRNA. Existe al menos una aminoacil-tRNA sintetasa para cada uno de los 20 aminoácidos del código genético (Hausmann & Ibba 2008). La unión o cargado del tRNA con el aminoácido se lleva a cabo en dos procesos enzimáticos. El primero es la adenilación, en el cual el aminoácido reacciona con una molécula de ATP, formando un aminoacil-AMP (formación de un éster entre el grupo carboxil del aminoácido y el grupo fosforilo del AMP) y liberando pirofosfato. El segundo paso es el cargado del tRNA, en el que el aminoacil-AMP, que permanece fuertemente unido a la sintetasa, reacciona con el tRNA en la posición 2' o 3' hidroxilo y libera el AMP.

Existen dos clases de tRNA sintetatas. En las de Clase I, las enzimas favorecen que el aminoácido ataque en la posición 2'-OH del tRNA y son monoméricas. Las enzimas de Clase II atacan al 3'-OH del tRNA y son típicamente diméricas o tetraméricas (Watson *et al.* 2013; Rheinberger 2004). Existen muchos tipos de tRNA, cada uno reconoce un codón particular y un aminoácido específico. Tienen entre 75 y 95 ribonucleótidos de longitud y aunque la secuencia exacta es distinta, todos comparten elementos en común. Por ejemplo, en la porción 3' se encuentra la secuencia 5'-CCA-3', conservada en todos los tRNAs (que sirve de reconocimiento y unión del aminoácido). Otra característica, es la presencia de bases poco usuales que han sido modificadas post-transcripcionalmente como son la pseudouridina, dihidrouridina, hipoxantina y la metilguanina. Evidentemente también contienen la región anticodón, secuencia de tres nucleótidos complementaria al codón del mRNA (Watson *et al.* 2013; Lehninger *et al.* 2005).

Los tRNAs también se encuentran presentes en el lisado crudo, sin embargo, lo recomendable es proporcionar al sistema una mezcla comercial purificada de cada uno de ellos para favorecer la traducción. Los valores promedio van de los 170 a los 300 µg/mL. La importancia de los tRNAs radica en que son las moléculas que sirven de adaptadores entre los codones y el aminoácido específico (Spirin & Swartz 2007).

El RNA mensajero y los sistemas de reporteros

La mayor parte de los sistemas eucariontes utilizan mRNAs exógenos para la síntesis de proteínas. Es importante adicionarlos una vez procesados, es decir, que posean *cap*, cola poli(A) y que carezcan de intrones, dado que son elementos necesarios para una síntesis de proteínas eficiente (Browning & Bailey-Serres 2015). Los sistemas comerciales de transcripción pueden incorporar estos elementos a partir de un molde de DNA (plásmido), adicionando análogos de *cap* a la reacción y sintetizándose a partir de promotores virales (SP6, T7, etc.).

Los mRNAs utilizados contienen marcos de lectura que dan lugar a proteínas de rápida y eficiente detección, por ello son denominados sistemas reporteros; los ampliamente usados CAT (cloranfenicol acetiltransferasa), GFP (proteína verde fluorescente), RFP (proteína roja fluorescente), β -gal (β -galactosidasa), y las de mayor sensibilidad son las luciferasas de luciérnaga (Fluc) o renilla (RLuc). Gracias a que son compatibles con sistemas eucariontes y procariontes, sirven de comparación y pueden ser cuantificados. Estos sistemas han sido usados para estudiar la expresión de genes, el procesamiento de mRNAs y el plegamiento e interacciones entre proteínas (Alam & Cook 1990).

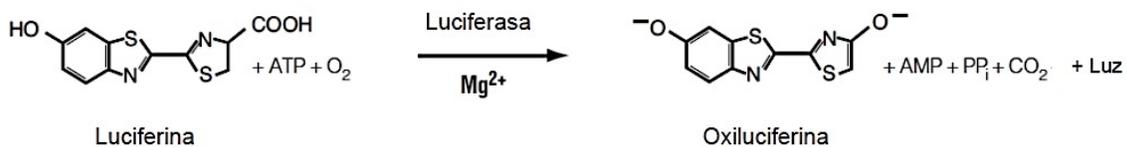


Figura 2. Reacción bioluminiscente catalizada por la luciferasa.

La luciferasa es enzimáticamente más activa y puede ser cuantificada cuando se producen de 1 a 5 pg/mL. Otra ventaja es que puede ser monitoreada en presencia de otros mRNAs sin obtener interferencias significantes, por lo que no es necesario adicionar nucleasas (nucleasa micrococcal). No requiere un procesamiento post-traducciona l y, su uso es un método rápido y simple de cuantificar en reacciones de traducción. Como se observa en la Figura 2, en una

reacción, la emisión luz es producida por la oxidación de luciferina en oxiluciferina a una longitud de onda de 562 nm, catalizada por la luciferasa, una proteína de 61 kDa codificada en el cistron de los mRNAs (Promega).

Temperatura

La temperatura de la reacción para la síntesis de proteínas es uno de los principales parámetros para la eficiencia de la traducción. El intervalo promedio es entre los 25 y 35 °C, sin embargo, es un parámetro que se debe estandarizar para cada organismo debido a su ambiente óptimo de crecimiento y de acuerdo con las características intrínsecas de las proteínas producidas (Spirin & Swartz 2007). Normalmente la temperatura de la reacción debe ser de 3 a 5°C por debajo de la temperatura de crecimiento del organismo, a partir de la cual se prepara el sistema de traducción. Por ejemplo en levaduras se incubaba a 25°C y en la línea celular HeLa a 30°C.

El inicio de la síntesis de proteínas en eucariontes. La traducción dependiente de cap.

El proceso de la traducción puede ser dividido en cuatro fases: iniciación, elongación, terminación y reciclamiento, siendo un proceso cíclico que requiere la participación de unidades separadas del ribosoma. El proceso involucra por lo menos 12 factores de inicio (*eIFs*, *eukaryotic initiation factors*), no obstante la elongación, terminación y reciclamiento son asistidos por un número reducido de factores (Jackson, *et al.* 2010). De manera general, la iniciación es el paso limitante de todo el proceso y es el más regulado. Este paso tiene por objetivo ensamblar la subunidad 80S para dar inicio a la síntesis de las proteínas. Así, la subunidad 40S inicialmente se une al mRNA, recorriéndolo en la dirección 5' a 3' hasta encontrar el codón de inicio, AUG. Sólo así, la subunidad 60S puede unirse y formar el ribosoma competente 80S. A continuación se describe de manera breve la iniciación, sin embargo, en la Figura 3 se muestra un esquema global que resume el proceso.

La subunidad 40S se encuentra dividida en plataforma, cabeza y cuello, formando un canal de entrada para el mRNA en la última segmentación. Por lo

que la unión del eIF1 y eIF1A desencadenan un cambio conformacional que involucra un estado “abierto”, apto para la entrada del mRNA (Hussain *et al.* 2014). La subunidad 40S unida a los factores eIF3, eIF1 y eIF1A (que proporcionan estabilidad y evitan su reasociación con la subunidad 60S) se une al complejo ternario eIF2/GTP/Met-tRNA^{Met} para dar lugar al complejo de preiniciación denominado 43S (Jackson, *et al.* 2010; Sonenberg & Hinnebusch 2009).

Aunque el complejo 43S puede unirse directamente al mRNA, es necesario “activarlo” mediante la participación cooperativa de tres factores: eIF4E, eIF4A y eIF4G, denominados conjuntamente como eIF4F (Jackson, *et al.* 2010). La mayor parte de los mRNAs eucarióticos tienen en la región 5' terminal un 7-metilguanosa (m⁷G) denominada *cap* que es reconocido por eIF4E a través de residuos de aminoácidos aromáticos conservados (Trp 56 y 102 en humanos) (Joshi *et al.* 2005). Sin embargo, la región 5'-UTR a menudo contiene estructuras secundarias en forma de tallo y asa, que son “desenrolladas” por eIF4A, una helicasa de RNA que contiene un motivo DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp). Este factor es dependiente de ATP y es asistido por dos helicasas adicionales: eIF4B y en humanos también por eIF4H. Por otra parte, eIF4G es una proteína de andamiaje que interacciona con eIF4E mejorando la afinidad por *cap*, al mismo tiempo que se encuentra unida al eIF4A y a la proteína de unión a la cola Poli(A) (PABP). La interacción eIF4G-PABP promueve la circularización del mRNA, conformación que aumenta la eficiencia de la traducción (Jackson, *et al.* 2010; Sonenberg & Hinnebusch 2009; Shatsky *et al.* 2014).

Una vez establecida la interacción del complejo 43S con el mRNA mediante el complejo eIF4F, se lleva a cabo el *scanning*, un mecanismo propuesto por Marilyn Kozak en 1978 y que consiste en el movimiento de la subunidad ribosomal en la dirección 5'-3' desde el 5'-UTR del mRNA hasta encontrar el AUG de inicio en contexto (Kozak 1978). Para asegurar la fidelidad de la traducción, es importante la participación de eIF1 y eIF1A, que mantienen una conformación abierta de la subunidad 43S y que permiten la entrada del tRNA al sitio P del ribosoma y es indispensable para un *scanning* correcto (Hussain *et al.* 2014).

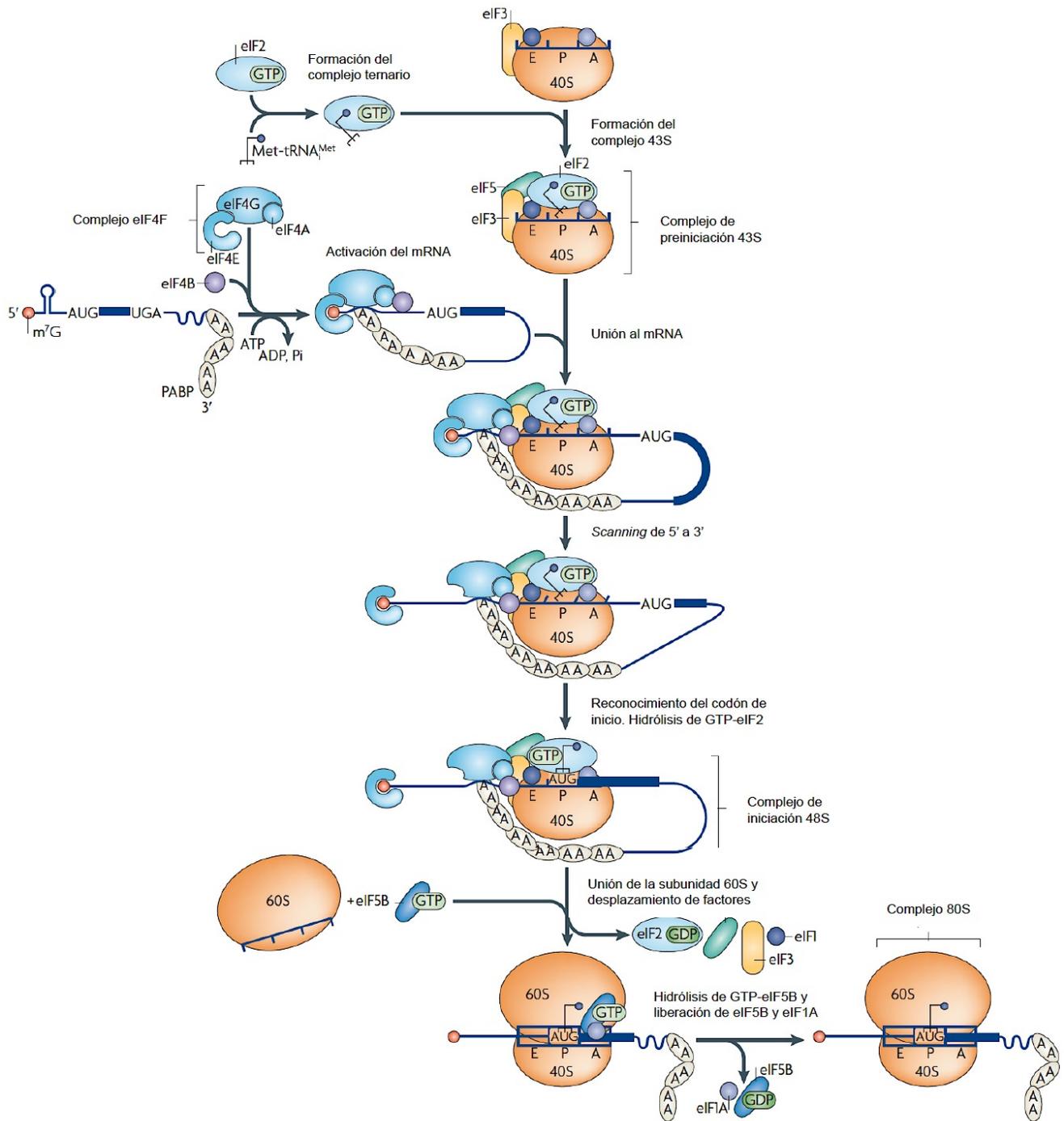


Figura 3. El inicio de la traducción en eucariotes. La formación del complejo de preiniciación 43S comprende la subunidad 40S, eIF1, eIF1A, eIF3 y el complejo ternario (eIF2,GTP y met-tRNA^{Met}). Durante la activación del mRNA, el factor eIF4E se une al cap (m7GpppG); la región 5'-UTR es “desenrollada” por la helicasa eIF4A, dependiente de ATP, asistida por eIF4B; y eIF4G sirve como proteína de andamiaje, interaccionando también con la proteína de unión a la cola poli(A) (PABP) para circularizar y dar estabilidad al mRNA. Subsecuentemente el complejo 43S se une al mRNA, recorriéndolo en la dirección 5' a 3' en un proceso denominado *scanning* hasta el reconocimiento del codón de inicio AUG y que se encuentra en contexto apropiado, formando el complejo de iniciación 48S. Una vez posicionado el AUG en el sitio P del ribosoma, la hidrólisis del

GTP unido al eIF2 (catalizada por eIF5), permite la liberación de diversos factores (eIF1, eIF2-GDP, eIF3, eIF4B, eIF4F y eIF5) y la unión de la subunidad 60S ribosomal; proceso asistido por eIF5B-GTP. Finalmente la hidrólisis del GTP-eIF5B permite la liberación de eIF5B-GDP y eIF1A, dejando al complejo ribosomal 80S preparado para el inicio de la elongación (tomado y modificado de R. Jackson *et al.* 2010).

Los análisis experimentales suprimiendo la actividad de estos factores han demostrado que el reconocimiento de un AUG fuera de contexto puede llevar a utilizar cualquier codón para iniciar la traducción con interacciones débiles del codón- anticodón en el sitio P del ribosoma (Pestova & Kolupaeva 2002). El mRNA en asociación con el complejo 43S forma el denominado complejo de inicio 48S. Posteriormente, eIF5 promueve la hidrólisis del GTP asociado al eIF2, sin embargo los productos (GDP+ Pi) permanecen asociados al complejo ternario y son liberados hasta que el codón del mRNA se aparee con el anticodón del tRNA.

Finalmente, el factor eIF5B, una GTPasa dependiente de la interacción con el ribosoma, se une a la subunidad 48S y promueve la unión de la subunidad 60S, así como la disociación (por impedimento estérico) de los factores eIF1, eIF1A, eIF3 y del complejo ternario (Asano 2014; Jackson, Christopher U T Hellen, *et al.* 2010). De esta manera, el ribosoma completo, con el mRNA y el tRNA colocados en el sitio P ribosomal, son competentes para dar inicio a la elongación, proceso donde los codones del mRNA son decodificados y el péptido es formado por la adición subsecuente de residuos de aminoácidos (Hernández 2012; Hinnebusch 2014).

Regulación en la síntesis de proteínas. El contexto del codón de inicio.

La traducción de mRNA en proteínas representa el paso final en la expresión de genes que media la formación del proteoma a partir de la información genética. La regulación de la traducción es un mecanismo usado para modular la expresión de transcritos en un amplia gama de situaciones biológicas, desde etapas tempranas del desarrollo embrionario, hasta la diferenciación celular y procesos metabólicos, cuando la transcripción está apagada o la célula necesita responder a súbitos cambios del medio ambiente. Así, la traducción puede ser regulada en un tiempo

y espacio preciso y determinado (Gebauer & Hentze 2004). La síntesis de las proteínas es regulada principalmente en el paso de iniciación, algunos ejemplos de ello son:

1. La presencia de estructuras secundarias en las regiones 5'-UTR (denominadas IRE, *Iron-Responsive Element*), son blanco de las IRP (*Iron Regulatory Proteins*) que regulan el control homeostático del hierro. Es decir, cuando la concentración celular de hierro es baja, la interacción de las IRPs con los elementos IRE de los mRNA que codifican a la ferritina, bloquean por impedimento estérico la unión del complejo 43S ribosomal; así, la ferritina no es sintetizada y la concentración de Fe^{2+} libre aumenta (Muckenthaler *et al.* 1998).
2. El secuestro de eIF4E por proteínas de unión denominadas 4E-IPs (*eIF4E Interacting Proteins*). Algunas de ellas, como las presentes en maníferos y *Drosophila melanogaster* en estado hipofosforilado se unen a eIF4E, previniendo la unión con eIF4G y evitando la formación de eIF4F (Hernández *et al.* 2010).
3. La represión traduccional por microRNAs (moléculas de RNA de 22 nucleótidos), que hibridan parcialmente la región 3'-UTR de los mRNAs inhibiendo la elongación y provocando la degradación de los mRNAs (Ambros & Chen 2007).
4. Elementos en la región 3'-UTR como los CPE (*Cytoplasmic Polyadenylation Elements*) que regulan mRNA involucrados en el desarrollo y maduración de oocitos en vertebrados al ser blanco de proteínas denominadas CPEB (*Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding Protein*), que en conjunto con Maskin, se unen a eIF4E, impidiendo la formación de eIF4F (Méndez & Richter 2001).
5. La fosforilación de eIF2 α bloquea traducción. El factor eIF2, constituido por tres subunidades (α , β y γ), forma parte del complejo ternario (GTP, eIF2, met-tRNA^{met}) que se unen a la subunidad 40S ribosomal. El GTP es hidrolizado cuando el AUG es reconocido durante el mecanismo de *scanning*, produciendo GDP unido a eIF2; de esta manera, el intercambio de GDP por GTP es catalizado por el factor eIF2B. La fosforilación de la

subunidad α en la Ser51 bloquea el intercambio de GDP/GTP, por lo que el proceso global de la traducción es inhibido. Diversas cinasas pueden fosforilar la Ser51 como son GCN2 que es activada en carencia de aminoácidos; PKR que es activa en infecciones virales y PERK, una cinasa transmembranal del retículo endoplasmico que es activa en circunstancias de estrés por falta de glucosa (Gebauer & Hentze 2004).

6. La regulación a nivel de secuencia contexto, un mecanismo ampliamente estudiado *in silico* pero analizado experimentalmente casi exclusivamente en vertebrados (Kozak 1986b; Kozak 2002).

El mecanismo de *scanning* y el reconocimiento del AUG iniciador

De acuerdo con el mecanismo de *scanning* (Kozak 1978), el complejo de preiniciación 43S se une al 7-metil guanósina (*cap*) en el extremo 5' del mRNA y se mueve en dirección 5'-3', recorriendo hasta encontrar el codón de inicio. Sin embargo, es probable encontrar múltiples codones AUG. Para encontrar un mecanismo por el cual el ribosoma reconoce el codón iniciador auténtico, en 1984 Marilyn Kozak analizó el 5'-UTR de 211 mRNAs de eucariontes. Ella encontró que hay una secuencia consenso CC(A/G)CCAUGG y estableció puntos importantes, hasta ahora válidos, como una purina (A/G) conservada en el posición -3, y una guanina en la posición +4 (Kozak 1984), validados experimentalmente un par de años más tarde por mutaciones puntuales (Kozak 1986b). Sin embargo, en 1987 analizó detalladamente 699 mRNAs de vertebrados, y estableció una secuencia más amplia: GCCGCC(A/G)CCATGG (Kozak 1987).

Tan solo unos años después, estudios estadísticos y análisis *in silico* de otros grupos taxonómicos realizados por Douglas Cavener, demostraron que hay cierta divergencia en la secuencia alrededor del AUG iniciador (Cavener & Ray 1991). Sin embargo, los trabajos *in silico* revelan secuencias consenso y no las secuencias óptimas para promover traducción, de tal manera que no deben considerarse términos sinónimos; “consenso” es estrictamente un término estadístico mientras que “óptimo” es un término funcional y experimentalmente validado (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis *in silico* de nucleótidos consenso alrededor del codón AUG iniciador realizado para diversos grupos taxonómicos. El codón iniciador se encuentra subrayado. La estrella (★) indica una secuencia Kozak (A/G)XXAUGG.

Año	Autor	Organismo	Grupo Taxonómico	Secuencia
1987	Kozak	Vertebrados		(GCC)GCC(A/G)CC <u>AUG</u> ★
1991	Cavener/Ray			CGCCGCC(A/G)CC <u>AUG</u> GC★
2000	Pesole			CAAGCCGCCA(A/C)CA <u>AUG</u> ★
2008	Nakagawa			GCCGCCA(A/C)CA <u>AUG</u> GCG★
2014	Grzegorski			Pez cebra <i>Danio rerio</i>
2014		Pez del arroz <i>Oryzias latipes</i>	CAACA <u>AUG</u> GCG ★	
2014		Rana <i>Xenopus laevis</i>	CAACA <u>AUG</u> GC ★	
2014		Gallo <i>Gallus gallus</i>	GGCGCCGCC <u>AUG</u> GCG ★	
2014		Ratón <i>Mus musculus</i>	GCCACCA <u>AUG</u> GCG ★	
1987	Lütcke	Animales		CACCA <u>AUG</u>
2000	Pesole	Humano <i>Homo sapiens</i>		CAAGCCGCCA(A/C)CA <u>AUG</u> ★
2014	Grzegorski			GCCACCA <u>AUG</u> GCG ★
1991	Cavener/Ray	Invertebrados		AUAAAU(A/C)AAC <u>AUG</u> (A/G)C ★
2000	Pesole			AAAACC(A/G)CCAA(A/C) <u>AUG</u> ★
2008	Nakagawa			ACAGUCAAA <u>AUG</u> UCU
1999	Chang	Gusano de seda <i>Bombyx mori</i>		ANCAAA <u>AUG</u>
2014	Tatematsu			A/U)AN(A/U)AUCAAA <u>AUG</u> N
2002	Sano	Palomilla <i>Spodoptera frugiperda</i>		(A/G)NC(C/U)N(A/C)CA(A/C)(C/G) <u>AUG</u> (G/A) ★
1987	Cavener	Mosca <i>Drosophila melanogaster</i>		AAAAAU(C/A)AA(A/C) <u>AUG</u> ACC ★
1991	Cavener/Ray			CACAACCAAA <u>AUG</u> GC ★
2014	Grzegorski			CAAA <u>AUG</u> GC ★
1987	Hamilton	Levadura <i>S. cerevisiae</i>		(A/U)A(A/C)A(A/C)AA <u>AUG</u> UC(U/C)
1991	Cavener/Ray			AAAAAAAAAA <u>AUG</u> UC
2000	Pesole			AAAACAGGCAAA <u>AUG</u> ★
2008	Nakagawa			A(A/C)AACCAAA <u>AUG</u> UCU
2013	Wei	Hongo filamentoso <i>Neurospora crassa</i>		GCC(A/G)CC <u>AUG</u> ★
1991	Cavener/Ray	Protistas	Protistas dinoflagelados	UUUAUAAAAA <u>AUG</u> AC
1991	Yamauchi			(A/U)(A/U)(A/U)(A/U)(A/U)A(A/U)(A/U)(A/U)AAAA <u>AUG</u> AN(A/U)
2008	Nakagawa			GAAGAAAAA <u>AUG</u> NNN
1987	Lütcke	Plantas		AACA <u>AUG</u> GC ★
1997	Joshi			AAAAACAA(A/C)AA <u>AUG</u> GCGACCACUA ★
1997	Joshi			AAAAACAA(A/C)AA <u>AUG</u> GCGACCACUA ★
1991	Cavener/Ray	Monocotiledóneas	Plantas monocotiledóneas	AGC(A/G)GCA(A/G)CC <u>AUG</u> GC ★
1997	Joshi			(G/C)GCGGC(A/C)(A/G)(A/C)CA <u>AUG</u> GCG(A/G)C(C/G)(A/G)CCG ★
2000	Pesole			GGGGAGGCA(A/G)C(C/G) <u>AUG</u> ★

2000	Lukaszewicz			C(A/G)CC <u>AUG</u> (G/C)C ★
2008	Nakagawa			GA(A/G)GCA(A/G)CG <u>AUG</u> GCG ★
2009	Sugio	Arroz <i>Oryza sativa</i>		(A/G)(U/C)(G/C) <u>AUG</u>
1991	Cavener/Ray	Dicotiledoneas	Plantas dicotiledóneas	AAAAAAAA(A/C) <u>AUG</u> GC ★
1997	Joshi			AAAAAAAA(A/C) <u>AAUG</u> GCUACUA(C/U)UA ★
2000	Pesole			AAAGAA(A/G)CAAAA <u>AUG</u> G ★
2000	Lukaszewicz			AAAA <u>AUG</u> GC ★
2008	Nakagawa			AAAANAAAA <u>AUG</u> GCG ★
2005	Kawaguchi			AAAAAA(A/G)AA <u>AUG</u> GC ★
2009	Sugio			(A/G)(A/C)(A/G) <u>AUG</u>
2013	Kim	<i>Arabidopsis thaliana</i>		Secuencias ricas en A
2000	Lukaszewicz	Pino	Plantas coníferas	AAAC <u>AUG</u> GC ★
1991	Cavener/Ray	Virus de vertebrados	Virus	AACU(G/U)CC(A/G)ACA <u>AUG</u> GA ★
1994	Ranjan	AcNPV (Polyhedrosis virus)		AA(G/T)(A/U)A(A/U)(A/C)AAAA <u>AUG</u> A(A/C)(U/A)(G/A)AAN

Posteriormente, se han ido realizando numerosos estudios computacionales en otros organismos. La Tabla 2 muestra los trabajos publicados con los análisis de la secuencia consenso alrededor del AUG iniciador en diversos organismos. El estudio más completo es el de Nakagawa, quien en 2008 realiza un análisis de genomas completos de 47 especies, de animales, plantas, hongos y protistas para encontrar la secuencia preferida de nucleótidos alrededor del codón de inicio (Nakagawa et al. 2008). Nakagawa confirma que hay divergencia en la secuencia consenso alrededor del AUG iniciador en los eucariontes. Sin embargo, es importante mencionar que aún es necesario validar experimentalmente estos datos encontrados *in silico*.

La validación experimental de las secuencias que rodean al AUG de inicio solo se han realizado con algunos organismos como el pez cebra (*Danio rerio*) y el gusano de seda (*Bombyx mori*), por mencionar algunos. La Tabla 3 muestra los autores y los organismos que han sido objeto de estudio experimental en la secuencia contexto del AUG. Como se ve, a pesar de la importancia de la secuencia alrededor del AUG en la regulación de la traducción, al día de hoy sólo se han estudiado experimentalmente escasos grupos taxonómicos, es decir, metazoarios y plantas superiores y se han analizado muy pocas secuencias. Sin embargo, el reducido número de mRNAs usados, hace de estos trabajos una aproximación débil para entender la importancia de la secuencia contexto del AUG iniciador y hallar una secuencia preferida para cada especie estudiada.

Tabla 3. Validación experimental de la secuencia alrededor del AUG iniciador en diversos organismos.

Año	Autor	organismo	Grupo taxonómico	mRNAs analizados
1987	Lutcke	<i>O. cuniculus</i>	Animales vertebrados	4
2014	Grzegorski	<i>D. rerio</i>		5
1991	Lee	<i>D. melanogaster</i>	Animales artrópodos	2
2014	Tatematsu	<i>B. mori</i>		14
1988	Baim	<i>S. cerevisiae</i>	Hongos ascomicetes	15
2013	Wei	<i>N. crassa</i>		10
2009	Sugio	<i>O. sativa</i>	Plantas monocotiledóneas	64
2000	Lukaszewicz	<i>Z. mays</i>		16
1987	Lütcke	<i>T. aestivum</i>		4
2005	Kawaguchi	<i>A. thaliana</i>		10
2009	Sugio		Plantas dicotiledóneas	64
2013	Kim			25
2000	Lukaszewicz	<i>N. tabacum</i>		16
2000	Lukaszewicz	<i>P. cembra</i>	Plantas coníferas	16

3. JUSTIFICACIÓN

La diversidad es una de las características más importantes de la vida en nuestro planeta. Su poderosa capacidad de diversificación se manifiesta en todos los aspectos de la vida, es decir, en los nichos ecológicos, patrones de comportamiento, programas de desarrollo, composición genética, así como procesos metabólicos y bioquímicos de todos los organismos vivos. Un proceso tan fundamental, conservado, sofisticado y universal como es la síntesis de proteínas también muestra diversidad en sus mecanismos y componentes en la Biósfera (Hernández *et al.* 2012).

Hoy en día, la secuencia contexto alrededor del AUG iniciador se ha estudiado experimentalmente casi exclusivamente en vertebrados, por otro lado, existen diversos estudios *in silico* que muestran la diversidad de secuencias contexto alrededor del codón iniciador AUG que varían pero carecen de validez experimental. Por estas razones, estudiar experimentalmente nuevas especies, de *taxa* nunca antes estudiados a nivel de la traducción, optimizando las condiciones para una eficiente traducción y dilucidar sus mecanismos de regulación a nivel del

contexto del AUG iniciador, nos permitirá conocer si existe una relación entre la complejidad morfológica y la necesidad de una secuencia específica para el inicio en la síntesis de proteínas. Contrastar organismos unicelulares con pluricelulares, relacionando su complejidad morfológica con el tamaño de su proteoma, son perspectivas hasta ahora no estudiadas.

4. OBJETIVOS

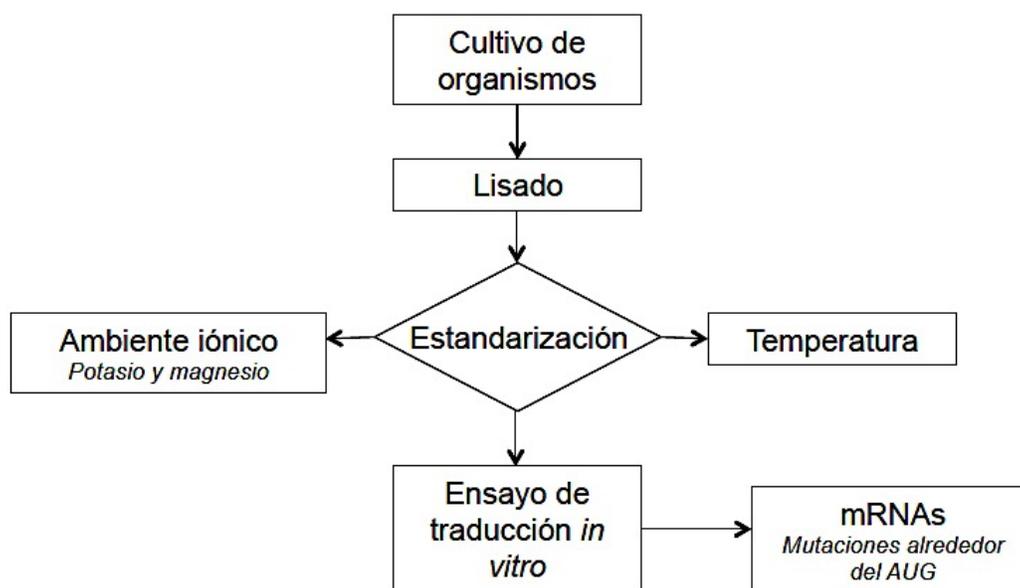
Objetivo general

Analizar experimentalmente la importancia de la secuencia contexto del codón iniciador AUG sobre la traducción de una especie unicelular y una pluricelular filogenéticamente distantes de los vertebrados.

Objetivos específicos

- Desarrollar experimentalmente nuevos sistemas de traducción *in vitro* de *Schizosaccharomyces pombe* y *Ustilago maydis*.
- Analizar la eficiencia traduccional del gen reportero de luciferasa (FLuc) con mRNAs que contienen mutaciones puntuales alrededor del codón AUG iniciador.

5. ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL



6. MATERIALES Y MÉTODOS

En sección Anexo se encuentra la preparación de buffers, medios de crecimiento, antibióticos, células competentes y otros reactivos utilizados en ésta tesis.

Síntesis de mRNAs

Transformación de las células competentes DH5 α de *E. coli* por choque

térmico

Se tomó un vial de células competentes, guardado a -70°C y se descongeló en hielo alrededor de 10 min. En condiciones de esterilidad, se adicionaron 10 ng de plásmido. Se mezcló cuidadosamente por pipeteo y se incubó en hielo por 20 min. Una vez transcurrido el tiempo, se procedió a dar el choque térmico a 42°C por 30 segundos y se incubó nuevamente en hielo por 3 min. Se adicionaron 300 μL de medio LB y se incubó durante 1h a 37°C a 400 rpm. Finalmente, se plaqueó el contenido en una placa con medio LB y el antibiótico ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para la selección de las células resistentes. Se dejó incubar a 37°C por 16 h.

Obtención de plásmidos

A partir de las colonias en la placa LB o de los stocks en glicerol, se tomó una asada y se dejó crecer en tubos de cultivo con 5 mL de medio líquido LB/ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se dejó crecer toda la noche o un máximo de 16 h. La extracción de los plásmidos se realizó usando el kit comercial QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN no. Cat. 27106), siguiendo las especificaciones del fabricante. Los plásmidos fueron eluidos en agua bidestilada, cuantificados y almacenados a -20°C .

Restricción / Linealización del plásmido

A partir de 4 μg de DNA plasmídico, se realizó el ensayo de restricción con la enzima XhoI de Thermo Scientific (no. Cat. FD0694) de acuerdo con la siguiente reacción:

Para una reacción, 10 μL

Buffer 10X	1 μL
Enzima XhoI	0.3 μL
DNA (4 μg)	--
H ₂ O	llevar a 10 μL

Digerir por un periodo de 3 h a 37°C y posteriormente correr en un gel de agarosa.

Gel de agarosa

Los geles (15x15 cm/150 mL) utilizados en este trabajo fueron realizados al 1.0% p/v en *buffer* TBE 0.5X, con bromuro de etidio (10 mg/mL); la agarosa usada fue de la marca *Bio-Rad* (no. Cat. 161-3102). Las muestras se prepararon adicionando *buffer* de carga de *Thermo Scientific*, *6X DNA Loading Buffer* (no. Cat. R0611). El marcador de peso molecular fue de *Fermentas GeneRuler 1 kb Plus Ladder* (no. Cat. SM1331). Se corrió a 100 V por 60 min.

Purificación del DNA a partir de un gel de agarosa

La purificación del DNA fue realizada con el sistema *Agarose Gel Extraction Kit* de *Jena Bioscience* (no. Cat. PP-202L). Para ello, la banda de interés fue cortada con una navaja aséptica tras una breve visualización en el transiluminador UV, reduciendo al máximo la exposición. El DNA fue eluído en agua libre de RNasas y cuantificado en un espectrofotómetro *Epoch (Biotek)* con la opción de guardarlo a -20°C o proceder con la transcripción *in vitro*.

Transcripción *in vitro*

La síntesis de los diversos mRNA se realizó con el kit *mMESSAGE mMACHINE T7* de *Ambion, Life Technologies* (no. Cat. AM1344). El kit incorpora un análogo de *cap* en el extremo 5' del transcrito [$m^7G(5')ppp(5')G$] y es óptimo para las reacciones de traducción *in vitro*; así mismo, contiene el reactivo 2X NTP/CAP que incluye rATP, rCTP, rUTP 15 mM, GTP 3 mM y análogo de *cap* 12 mM. Incluye el *buffer* 10X (DTT, Mg^{2+}) y la enzima RNA polimerasa T7. Una vez purificado y linearizado el plásmido se puede continuar con la siguiente reacción, de acuerdo con los componentes del kit:

Para una reacción de 10 µL

2X NTP/CAP	5 µL
10X Buffer	1 µL
DNA(2 µg)	---
RNApol T7	1 µL
Agua	llevar a 10 µL

Los componentes fueron incorporados y mezclados suavemente por pipeteo. La reacción se incubó 4 h a 37°C. Posteriormente se adicionó 0.5 µL de *TURBO DNase* (2U/µL Ambion, incluida en el kit) que permite remover el molde de DNA. Se incubó 15 min a 37°C.

Purificación de los mRNAs

La purificación de los mRNAs se realizó utilizando el kit *RNeasy Minielute Cleanup* de *Qiagen* (no. Cat 74204) con base en columnas que permiten concentrar y purificar al RNA, eliminando las sales, los nucleótidos y demás componentes contaminantes de la reacción.. Permite eliminar impurezas e inhibidores enzimáticos, alcoholes, etc., a partir de la unión en una columna de sílice. El procedimiento se realizó con base en las instrucciones establecidas por el fabricante. El mRNA se eluyó con 28 µL totales con agua libre de RNAsas.

Cuantificación de mRNAs

La cuantificación de RNAs se llevó a cabo por su absorbancia a 260 nm. Con base en los resultados, se adicionó la cantidad de agua necesaria para obtener alícuotas de 50 ng/µL y que fueron guardadas a -80°C.

Determinación de la integridad de los mRNAs

Se llevó a cabo la electroforesis en condiciones desnaturizantes en agarosa utilizando formaldehído, pues contiene un grupo carbonil que reacciona para formar bases de Schiff con los grupos imino o amino de la guanina y adenina. Estos enlaces covalentes previenen el apareamiento interno, manteniendo el RNA estable y desnaturizado (Rio 2015). Para ello, se preparó un gel de agarosa al 1 % p/v (15x15 cm/ 150 mL), calentando en 109.5 mL de agua DEPC y disolviendo

completamente. Se dejó enfriar a una temperatura aproximada de 60°C y se adicionó 15 mL de *buffer* MOPS 10X y 25.5 mL de formaldehído al 37% v/v. El gel se dejó solidificar en su molde y con su peine correspondiente. Es importante usar campana de extracción para su preparación pues el formaldehído es altamente peligroso y tóxico.

Por otro lado, se preparó el *buffer* desnaturalizante fresco, mezclando 660 µL de formamida, 200 µL de MOPS 10X y 270µL de formaldehído al 37% v/v para obtener un volumen final de 1.13 mL.

Para preparar las muestras, se mezclaron 400 ng de mRNA y 11 µL de *buffer* desnaturalizante en un tubo de 1.5 mL; se calentó a 60°C por 5 min y se enfrió inmediatamente en hielo. Se adicionaron 5 µL de *buffer* de carga y 0.5 µL de bromuro de etidio (1 µg/µL), se mezcló por pipeteo y depositó en los pozos del gel. Las muestras se corrieron a 50 V, a temperatura ambiente por aproximadamente 4 h usando *buffer* de corrida MOPS 1X.

Preparación de lisados competentes en traducción

De *S. pombe*

Las soluciones usadas en este protocolo se detallan en la sección de Anexo. Para ello medio litro de medio YPD fue inoculado con la levadura y puesto en incubación a 30°C con agitación de 200 rpm. Las células fueron cosechadas por centrifugación a 1800 X g, 5 min, a 4°C, cuando la densidad óptica se encuentra entre 1.0 y 2.0 a una longitud de onda de 600nm. El paquete celular obtenido fue resuspendido en agua destilada para realizar el lavado, y centrifugado bajo las mismas condiciones. Un segundo lavado se realizó con el *buffer* de resuspensión y centrifugado nuevamente.

El botón (aproximadamente 2g en peso húmedo) fue disuelto en 1.0 mL de *buffer* de resuspensión y vertido por goteo en nitrógeno líquido para formar pequeñas esferas congeladas, que fueron trituradas con ayuda de un pistilo y un mortero hasta formar un polvo fino. Es importante verter constantemente nitrógeno líquido para mantener la muestra congelada y evitar la degradación de proteínas. El homogenado fue depositado en tubos de 1.5 mL y centrifugado a 16,000 X g, 10 min a 4°C; el sobrenadante recuperado fue depositado en una columna de

exclusión molecular misma que se preparó con anticipación pesando 4g de Sephadex G-25 (SIGMA, no. Cat G2580) e hidratando con 30 mL de *buffer* de elución al menos 3 horas a 20°C y en agitación de 100 rpm. La columna fue empacada en un soporte de plástico de 20 cm³, depositando la resina hidratada y vertiendo constantemente *buffer* frío para evitar el secado de la misma. Así, el sobrenadante del extracto fue depositado en la columna, permitiendo su absorción para posteriormente adicionar 10 mL de *buffer* de elución frío. Se colectaron fracciones de 500 µL y se almacenaron a -80°C para su posterior análisis.

De *U. maydis*

Para ello medio litro de medio YPD fue inoculado con el hongo y puesto en incubación a 30°C con agitación de 200 rpm. Las células fueron cosechadas por centrifugación a 1800 X g, 5 min a 4°C, cuando la densidad óptica se encontró entre 1.0 y 2.0 a una longitud de onda de 600 nm. El paquete celular obtenido fue resuspendido en agua destilada para realizar el lavado, y centrifugado bajo las mismas condiciones. Un segundo lavado se realizó con el *buffer* de resuspensión y centrifugado nuevamente.

El botón (aproximadamente 2g en peso húmedo) fue disuelto en 1.0 mL de *buffer* de resuspensión y vertido por goteo en nitrógeno líquido para formar pequeñas esferas congeladas, que fueron trituradas con ayuda de un pistilo y un mortero, hasta formar un polvo fino. Es importante verter constantemente nitrógeno líquido para mantener la muestra congelada y evitar la degradación de proteínas. El homogenado fue depositado en tubos de 1.5 mL y centrifugado a 16,000 X g, 10 min a 4°C; el sobrenadante recuperado fue depositado en una columna de exclusión molecular misma que se preparó con anticipación pesando 4g de sephadex G-25 e hidratando con *buffer de elución* al menos 3 horas a 20°C y en agitación media. La columna fue empacada en un soporte de plástico de 20 cm³, depositando la resina hidratada y vertiendo constantemente *buffer de elución* frío para evitar el secado de la misma. Así, el sobrenadante del extracto fue depositado en la columna de sephadex, permitiendo su absorción para posteriormente adicionar 10 mL de *buffer de Elución*. Se colectaron fracciones de 500 µL y se almacenaron a -80°C para su posterior análisis.

Cuantificación de la concentración de proteína

Se realizó mediante el método colorimétrico, basado en el Bradford usando el reactivo de *Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (no. Cat. 500-0006) y cuantificando su absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm. Las cuantificaciones se realizaron por triplicado y se determinó la concentración a partir de una curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA Pierce, no. Cat. 23209). La curva se realizó por triplicado a partir de concentraciones conocidas de albumina (0, 10, 25, 50 y 80 µg).

mRNA reportero

Los mRNAs utilizados para la estandarización de los lisados se componen de un 7-metil guanosina (*cap*), un 5'-UTR de 100 nucleotidos, seguido del cistrón de luciferasa de 1653 nucleotidos y finalmente una región 3'-UTR de 98 nucleotidos, cuya cola poli(A) de 71 nucleotidos se encuentra incluida (Figura 4). Los mRNAs presentan mutaciones puntuales alrededor del AUG iniciador en una serie de combinatorias que han dado lugar a transcritos con características Kozak (purina en -3 y G en +4), ricos en A y otros (Gebauer *et al.* 1999).



Figura 4. El mRNA con mutaciones alrededor del codón AUG iniciador. El transcrito consta de 1851 nucleótidos.

Ensayo de traducción *in vitro*

De reticulocitos de conejo

Se utilizó el kit *Rabbit Reticulocyte Lysate System* de Promega (no. Cat L4960), un sistema comercial de síntesis de proteínas que contiene todos los elementos necesarios para la reacción de traducción *in vitro*. Se siguieron las

especificaciones establecidas, incubando las reacciones a 30°C por 90 minutos. Posteriormente se adicionaron 10 µL de *1X Passive lysis buffer* (Promega). Para la cuantificación de luciferasa se tomaron 50 µL de *sustrato de luciferasa* (Promega, no. Cat E152A) y se depositaron en tubos de 1.5 mL. El luminómetro (GloMax, Promega) fue programado para realizar lecturas cada 3 segundos. Se depositaron cuidadosamente 15 µL de la reacción dentro del equipo para su lectura.

De *S. pombe*

El protocolo desarrollado en esta tesis establece reacciones en un volumen total de 10 µL con las concentraciones de cada uno de los componentes citados: 13.2 mM HEPES-KOH pH 7.4, CH₃COOK, Mg(CH₃COO)₂, 4.5 mM ATP, 0.06 mM GTP, 15 mM creatin fosfato, 24 µM mezcla de aminoácidos, 1.02 mM DTT, 5 µL extracto, 2 mg/µL creatin fosfocinasa, 1.25 µg tRNA, rRNasin® (Promega, 40 U/µL, N° N2511), 25 ng de los diferentes mRNAs y agua para un volumen final de 10 µL.

Una vez homogenizada la reacción, se incubó por un periodo de 90 min en un rango de temperatura entre los 20 y 30°C. Posteriormente se adicionaron 10 µL de *1X Passive lysis buffer*. Para la cuantificación de luciferasa se tomaron 50 µL *sustrato de luciferasa* (FLuc, Promega E152A) y se depositaron en tubos de 1.5 mL. El luminómetro fue programado para realizar lecturas cada 3 segundos. Se depositaron cuidadosamente 10 µL de la reacción dentro del equipo para su lectura.

De *U. maydis*

El protocolo desarrollado en esta tesis establece reacciones en un volumen total de 10 µL con las concentraciones de cada uno de los componentes citados: 13.2 mM HEPES-KOH pH 7.4, CH₃COOK, Mg(CH₃COO)₂, 4.5 mM ATP, 0.06 mM GTP, 15 mM creatin fosfato, 24 µM mezcla de aminoácidos, 1.02 mM DTT, 5 µL extracto, 2 mg/µL creatin fosfocinasa, 1.25 µg tRNA, rRNasin® (Promega, 40 U/µL, N° N2511), 25 ng de cada uno de los diversos mRNAs y agua para un volumen final de 10 µL.

Una vez homogenizada la reacción, se incubó por un periodo de 90 min en un rango de temperatura entre los 20 y 30°C. Posteriormente se adicionaron 10 µL de

1X *Passive lysis buffer*. Para la cuantificación de luciferasa se tomaron 50 μ L del *sustrato de luciferasa* (FLuc, Promega E152A) y se depositaron en tubos de 1.5 mL. El luminómetro fue programado para realizar lecturas de 3 segundos. Cuidadosamente se depositaron 15 μ L de la reacción dentro del equipo para su lectura.

Análisis estadístico de las secuencias

El análisis de frecuencias de los nucleótidos alrededor del AUG se hizo con el programa WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu>), alineando 21 secuencias correspondientes a los mRNAs con mejor eficiencia de traducción y alineando 20 secuencias de los mRNAs con eficiencias más bajas. Las secuencias Logo son representaciones gráficas en patrones dentro de múltiples alineaciones de secuencias. Por ello, proveen una descripción precisa de similitud en secuencias consenso.

7. RESULTADOS

Estandarización de lisados

El método de lisis, fue un punto clave en la obtención de lisados. En este trabajo se ha realizado por acción mecánica con mortero, pistilo y nitrógeno líquido. Existen otros métodos, como cámaras de nitrógeno, soluciones hipertónicas o por choque térmico, sin embargo es importante considerar que de ello depende la disponibilidad de los factores que asisten la síntesis de proteínas (Kubick *et al.* 2003; Hodgman & Jewett 2012).

Para la estandarización de las concentraciones de los iones potasio y magnesio, así como de la temperatura de incubación de cada lisado, nos hemos basado principalmente en los trabajos de Thomas Tuschl, José Manuel Sierra, Greco Hernández, Michael Altman y Michael Tuite, los cuales, han sido referencias para otros componentes, como las concentraciones de creatin fosfato, tRNAs, creatin fosfoquinasa y el pH del medio, por mencionar algunos.

La Figura 5 muestra tres experimentos independientes, utilizando lisados competentes de *S. pombe*, que han sido obtenidos tras el paso por una columna de exclusión molecular (Sephadex G-25) en alícuotas de 500 μ L. Así mismo, se ha

cuantificado la proteína para cada fracción y fue determinada la actividad de la luciferasa usando dos mRNAs en donde la secuencia que rodea al AUG iniciador es GCAAUGG y AAAUAUGA, respectivamente. El uso de un mRNA típico Kozak y un mRNA rico en adeninas se realizó tomando en cuenta que el 5'-UTR de los mRNAs en hongos presenta secuencias ricas en A entre los nucleótidos -30 y -1 (Shabalina 2004).

De cada experimento se han tomado las tres alícuotas centrales, con mayor actividad para estandarizar las concentraciones iónicas de cada reacción. Es decir, de la Figura 5A se utilizaron las fracciones 3, 4 y 5; del panel B se tomaron las fracciones 5, 6 y 7 y del panel C se usaron las fracciones 5, 6 y 7.

Como se puede observar en los tres experimentos independientes, las unidades relativas de luz son diferentes, mostrando U. A máximas de 35000 en el panel B, en contraste con las unidades de 14000 del panel C. Sin embargo, la concentración de proteína evidentemente juega un papel importante, pues aquellas fracciones con mayor concentración (en $\mu\text{g/mL}$) presentan actividades mayores.

Los ensayos de traducción para *S. pombe*, detallados en la sección de materiales y métodos, se realizaron inicialmente bajo una concentración de 72 mM de acetato de potasio, 7 mM de acetato de magnesio, a una temperatura de 25°C por 90 min y con un pH de 7.4. Sin embargo, la Figura 6 muestra tres experimentos independientes y por triplicado cada uno de ellos, cambiando la temperatura de incubación, conservando las concentraciones de potasio y magnesio anteriormente mencionadas. Las temperaturas utilizadas (entre 21 y 29°C) muestran que mejor actividad de la luciferasa se lleva a cabo a 24°C.

Una vez establecida la temperatura de incubación, se llevó a cabo la estandarización del ion magnesio, conservando la concentración inicial de 72 mM de acetato de potasio. La Figura 7 muestra, en tres experimentos independientes, la actividad de FLuc utilizando un intervalo de concentración entre los 5 y 20 mM de $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$. Se puede observar que la mayor actividad se lleva a cabo entre 8 y 9 mM de este ion.

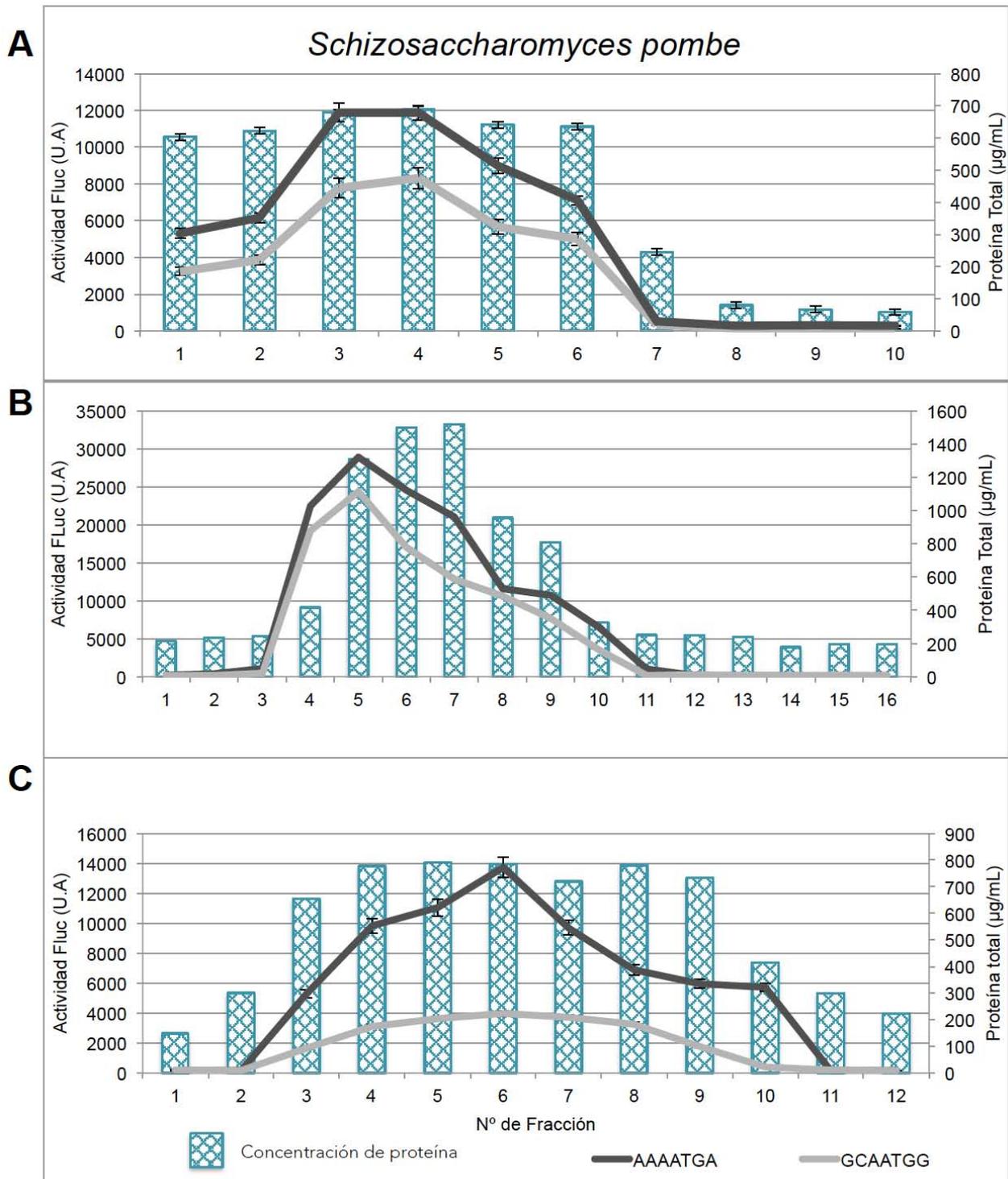


Figura 5. Actividad de FLuc (en unidades arbitrarias, U.A.) usando lisados competentes de *S. pombe*. Fracciones obtenidas tras el paso por la columna de exclusión molecular (Sephadex G-25), que han sido utilizadas para la traducción *in vitro* de mRNAs que contienen el gen de luciferasa y cuyas secuencias que rodean al AUG son AAAAUGA (en negro) y GCAAUGG (en gris). A), B) y C) son los resultados obtenidos en tres experimentos independientes, realizados por triplicado. Las barras en azul muestran la concentración de proteína para cada fracción obtenida en µg/mL.

Finalmente, utilizando una temperatura de 24°C de incubación y 9 mM de $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, se realizaron los ensayos de traducción *in vitro*, cambiando la concentración del ion potasio. La Figura 8, muestra las concentraciones ensayadas, donde 140 mM es la óptima para la síntesis de la luciferasa.

Es importante resaltar que en todos los experimentos se han utilizado los dos mRNAs cuya secuencia que rodea al AUG iniciador es GCAAUGG y AAAAUGA. El comportamiento indica que la luciferasa que lleva por contexto inicial, secuencias ricas en adenina, muestran mayor actividad.

La estandarización para lisados de *U. maydis* se llevó a cabo del mismo modo. En la Figura 9 se muestran en tres experimentos independientes y por triplicado, la actividad de FLuc (en U.A.) de cada fracción obtenida tras el paso por la columna de exclusión molecular. Del panel A se utilizaron las fracciones 9, 10 y 11 para la estandarización del medio iónico y temperatura. Del panel B, las fracciones 7, 8 y 9, y del panel C se usaron las fracciones 7, 8 y 9.

Los ensayos de traducción para *U. maydis*, se realizaron inicialmente bajo las mismas concentraciones iónicas y de temperatura usadas para *S. pombe* (72 mM de acetato de potasio, 7 mM de acetato de magnesio, 25°C por 90 min). Por lo que, la Figura 10 muestra tres experimentos independientes y por triplicado cada uno de ellos, cambiando la temperatura de incubación. Las temperaturas utilizadas (entre 13 y 29°C) muestran que mejor actividad de la luciferasa se lleva a cabo a 19°C. Curiosamente, este es un valor 11 grados por debajo de su temperatura de crecimiento.

Del mismo modo, siguiendo lo establecido para *S. pombe*, se ensayaron distintas concentraciones del ion potasio y magnesio, mostrando mayor actividad en un intervalo de 8 a 9 mM de $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ y 120 mM para CH_3COOK (Figura 11 y 12, respectivamente). Se utilizaron los mismos mRNAs con las dos secuencias contexto (GCAAUGG y AAAAUGA), sin embargo aquellos que presentan la secuencia Kozak mostraron mayor actividad.

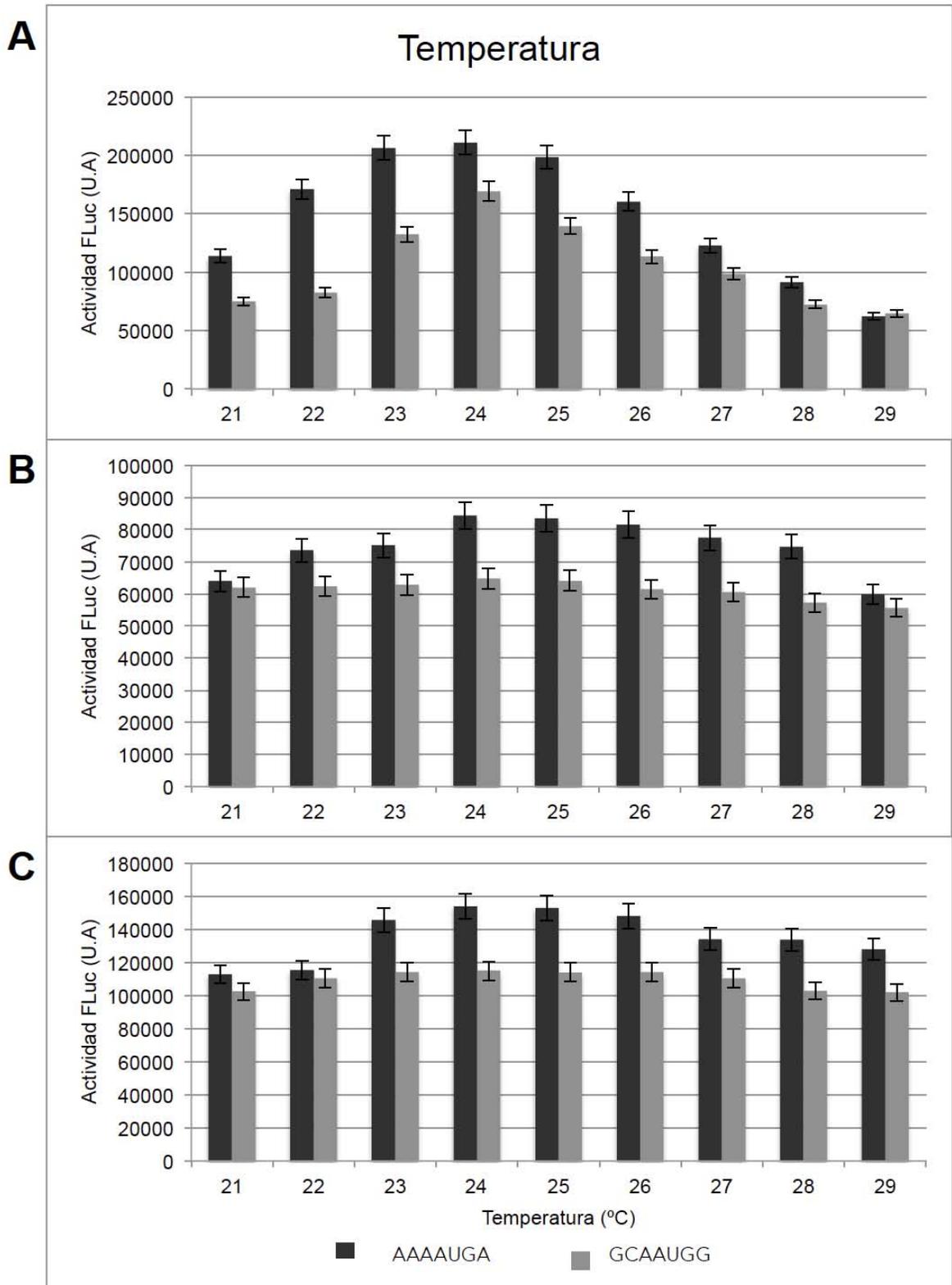


Figura 6. Actividad de FLuc dependiente de la temperatura usando lisados competentes de *S. pombe* (en unidades arbitrarias, U.A.). Se utilizaron dos mRNAs que contienen el gen de luciferasa y cuyas secuencias que rodean al AUG son AAAAUGA (en negro) y GCAAUGG (en gris). A), B) y C) son los resultados obtenidos en tres experimentos independientes.

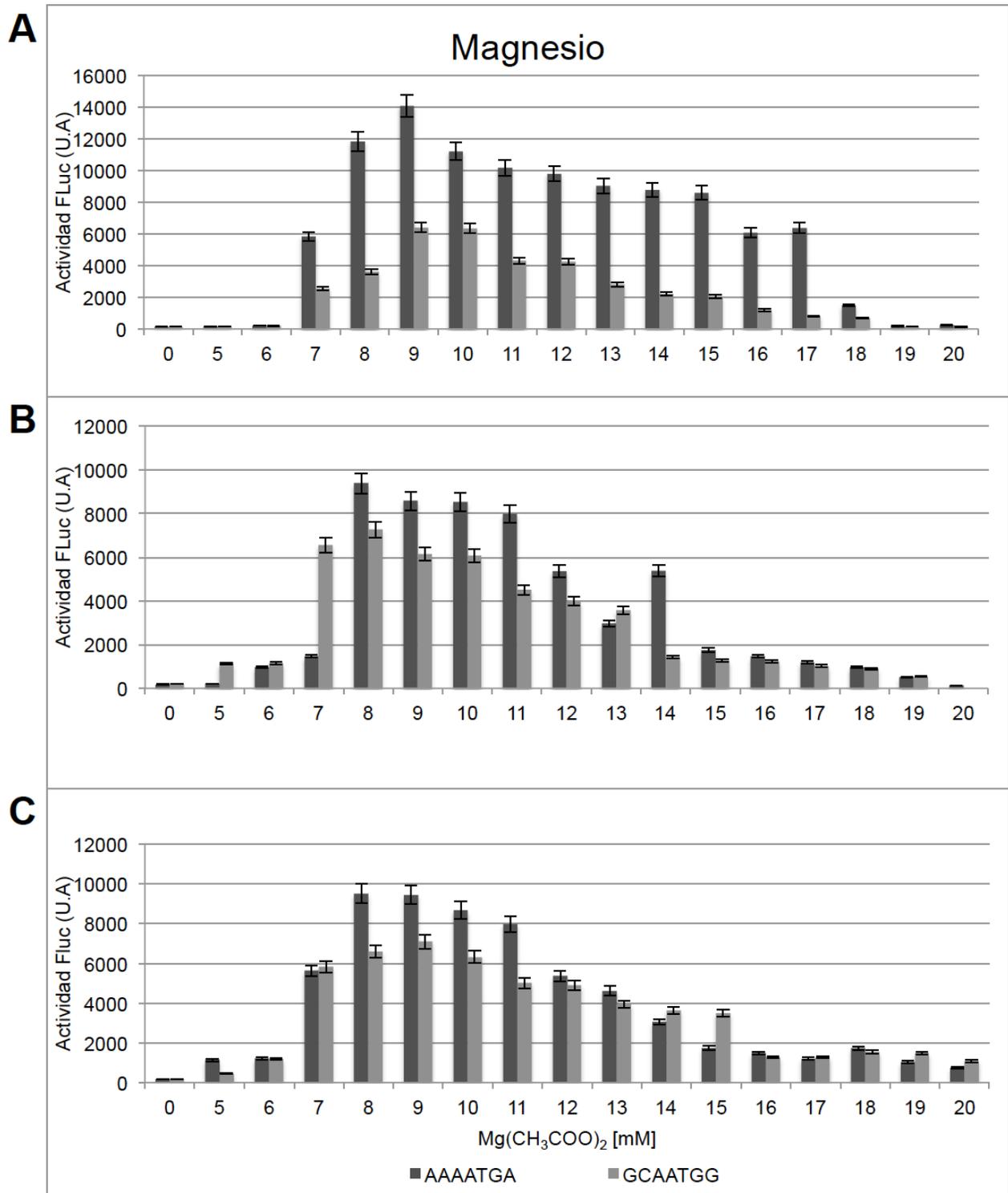


Figura 7. Efecto del magnesio en lisados competentes en traducción de *S. pombe*. La eficiencia en la traducción de luciferasa (en unidades arbitrarias, U.A.) es determinada en respuesta a concentraciones crecientes de Mg²⁺. Se utilizaron dos mRNAs cuyas secuencias que rodean al AUG son AAAAUGA (en negro) y GCAAUGG (en gris). A), B) y C) son los resultados obtenidos en tres experimentos independientes.

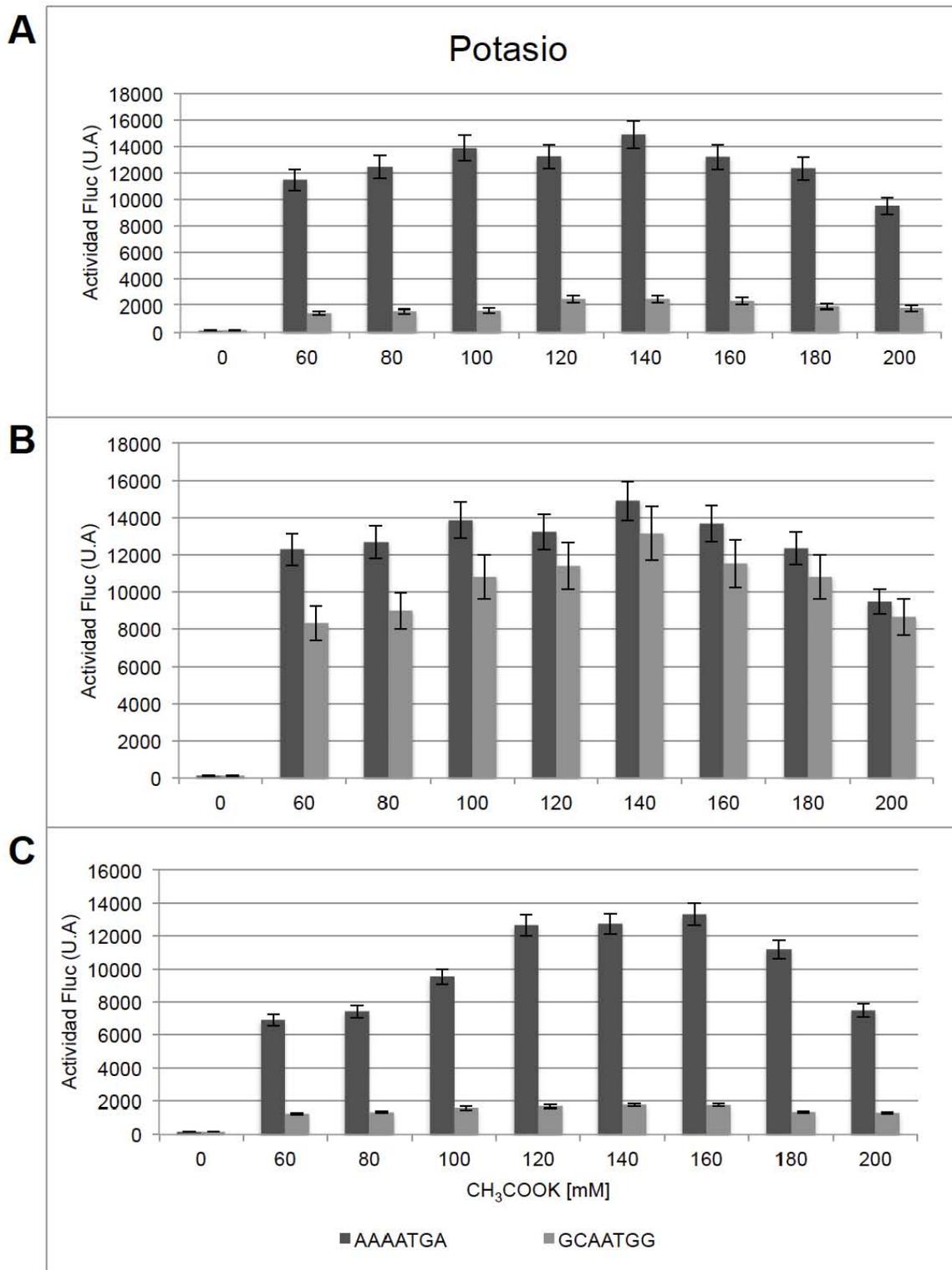


Figura 8. Efecto del potasio en lisados competentes en traducción de *S. pombe*. La eficiencia en la traducción de luciferasa (en unidades arbitrarias, U.A.) es determinada en respuesta a concentraciones crecientes del ion K^+ . Se utilizaron dos mRNAs cuyas secuencias que rodean al AUG son AAAAUGA (en negro) y GCAAUGG (en gris). A), B) y C) son los resultados obtenidos en tres experimentos independientes.

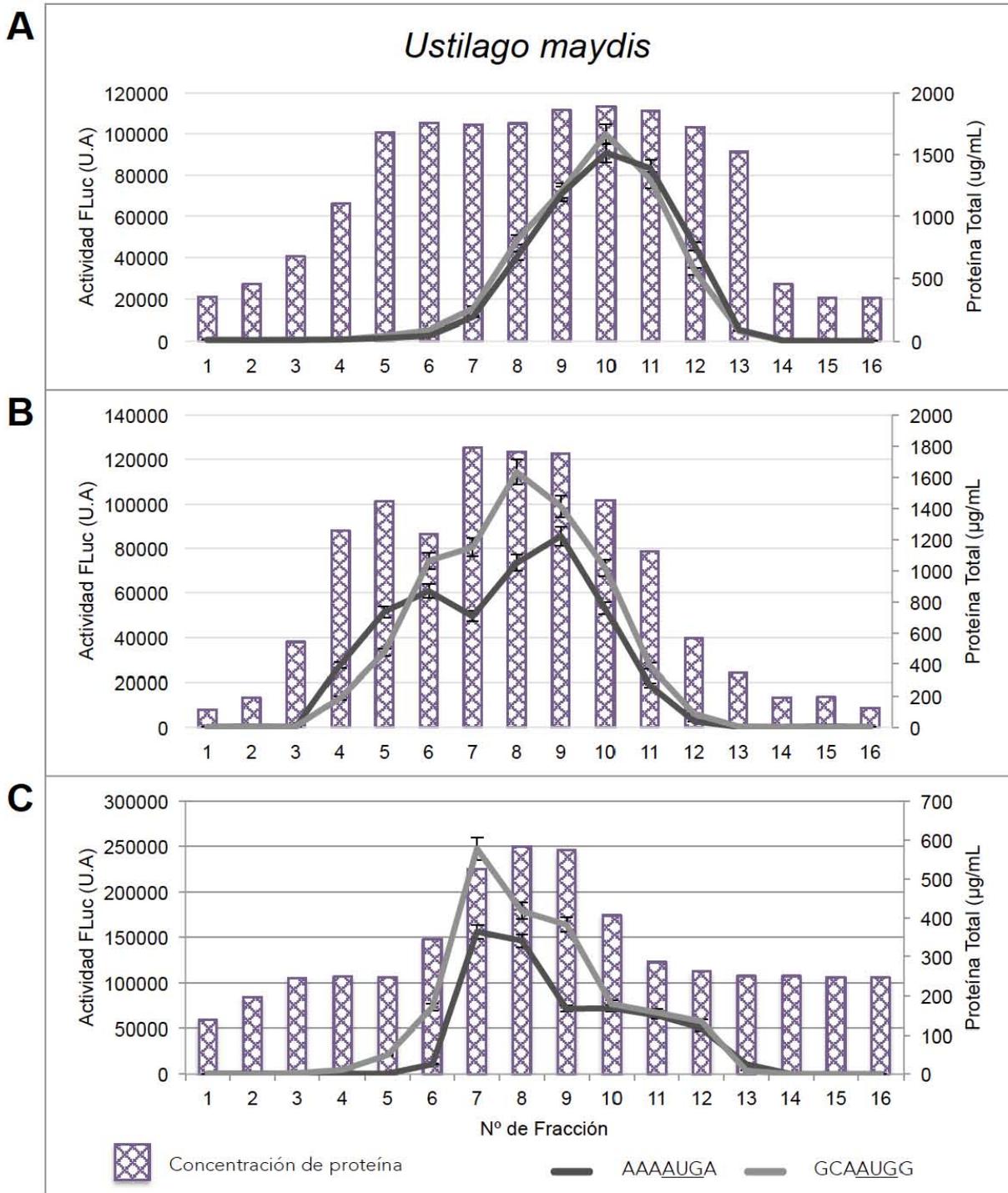


Figura 9. Actividad de FLuc usando lisados competentes de *U. maydis* (en unidades arbitrarias, U.A) . Fracciones obtenidas tras el paso por la columna de exclusión molecular (Sephadex G-25), que han sido utilizadas para la traducción *in vitro* de mRNAs que contienen el gen de luciferasa y cuyas secuencias que rodean al AUG son AAAAUGA (en negro) y GCAAUGG (en gris). A), B) y C) son los resultados obtenidos en tres experimentos independientes, realizados por triplicado. Las barras en color morado muestran la concentración de proteína para cada fracción (en µg/mL).

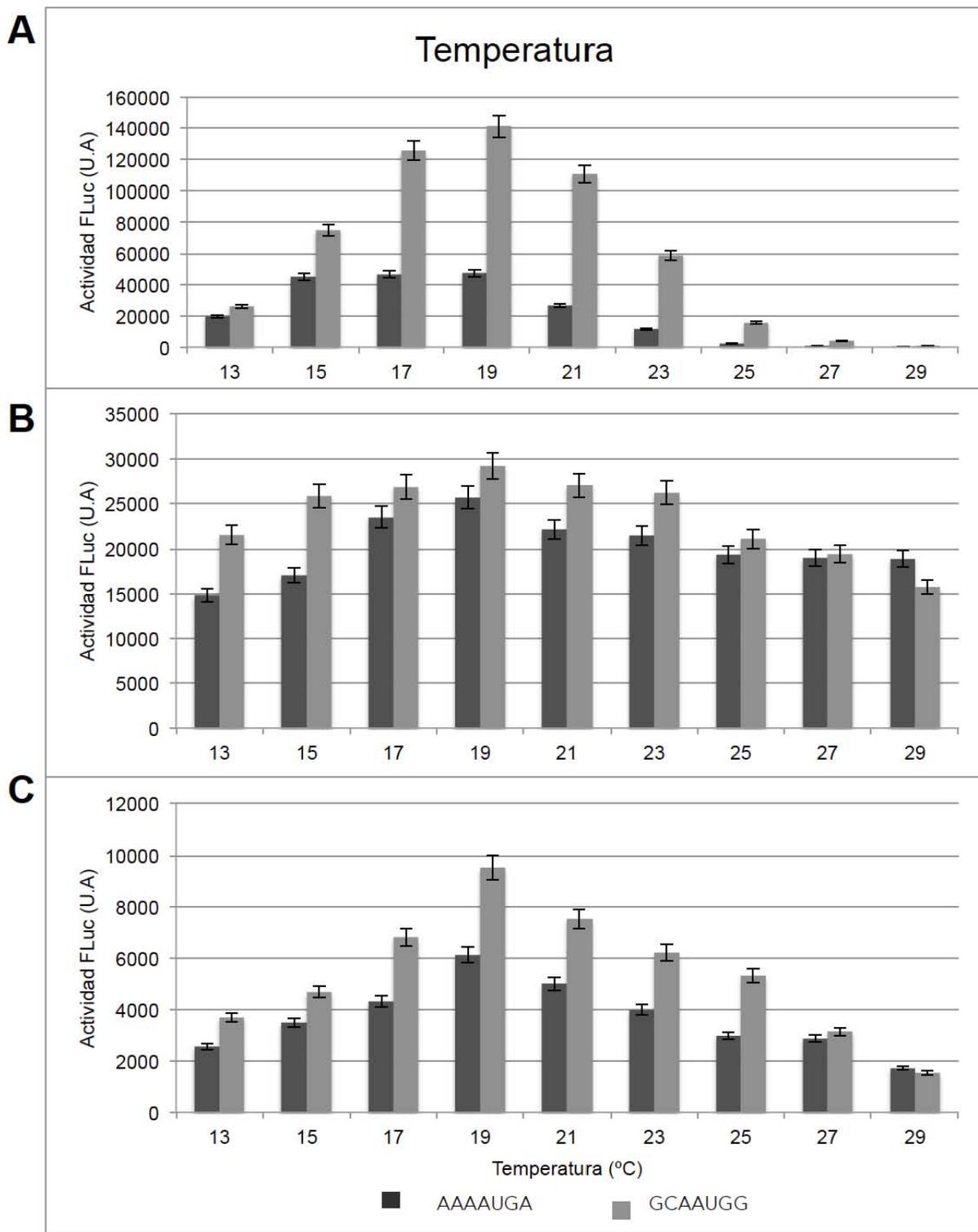


Figura 10. Actividad de FLuc (en unidades arbitrarias, U.A) dependiente de la temperatura usando lisados competentes de *U. maydis*. Se utilizaron dos mRNAs que contienen el gen de luciferasa y cuyas secuencias que rodean al AUG son AAAAUGA (en negro) y GCAAUGG (en gris). A), B) y C) son los resultados obtenidos en tres experimentos independientes.

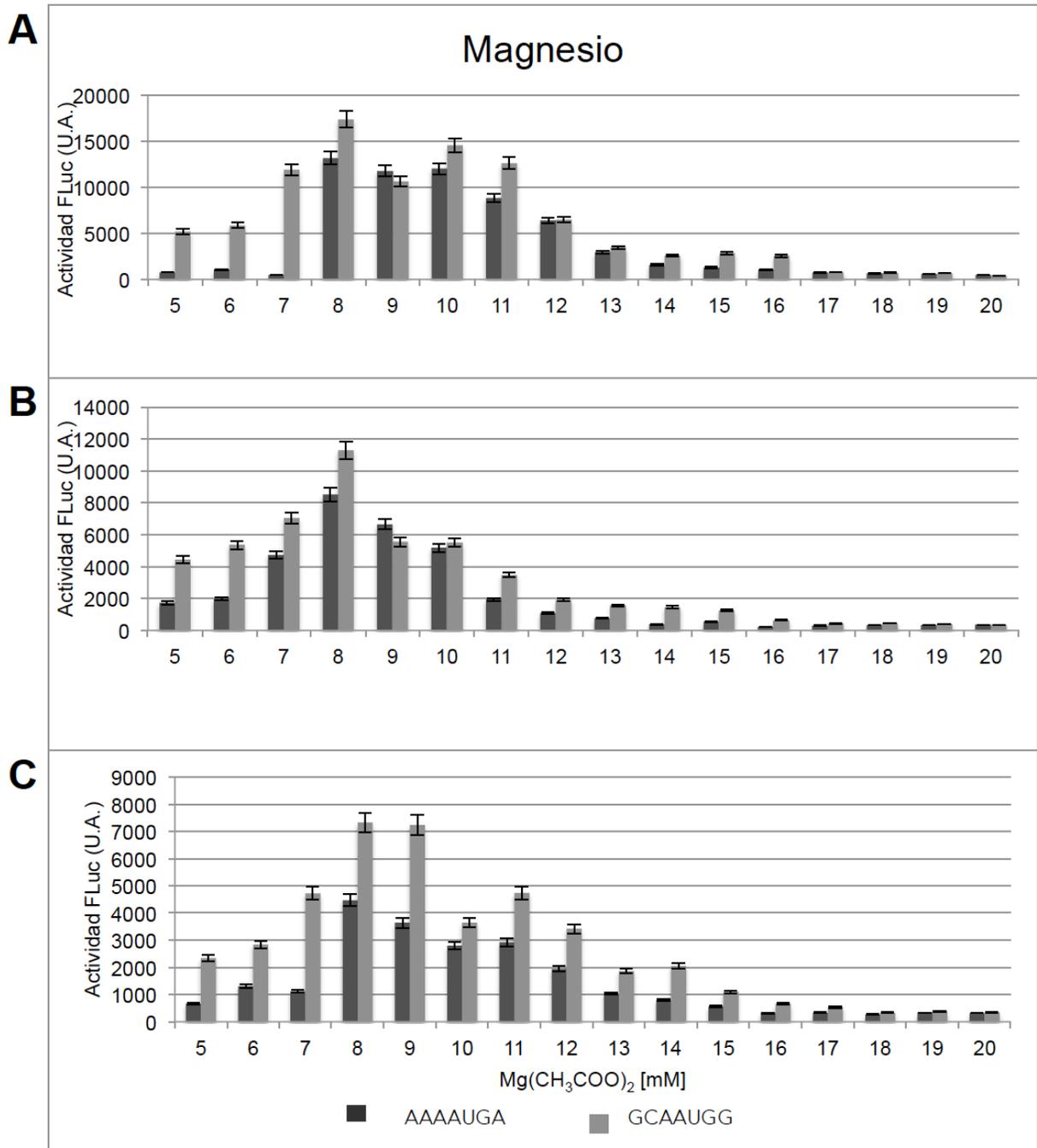


Figura 11. Efecto del magnesio en lisados competentes en traducción de *U. maydis*. La eficiencia en la traducción de luciferasa (en unidades arbitrarias, U.A) es determinada en respuesta a concentraciones crecientes del ion Mg^{2+} . Se utilizaron dos mRNAs cuyas secuencias que rodean al AUG son AAAAUGA (en negro) y GCAAUGG (en gris). A), B) y C) son los resultados obtenidos en tres experimentos independientes.

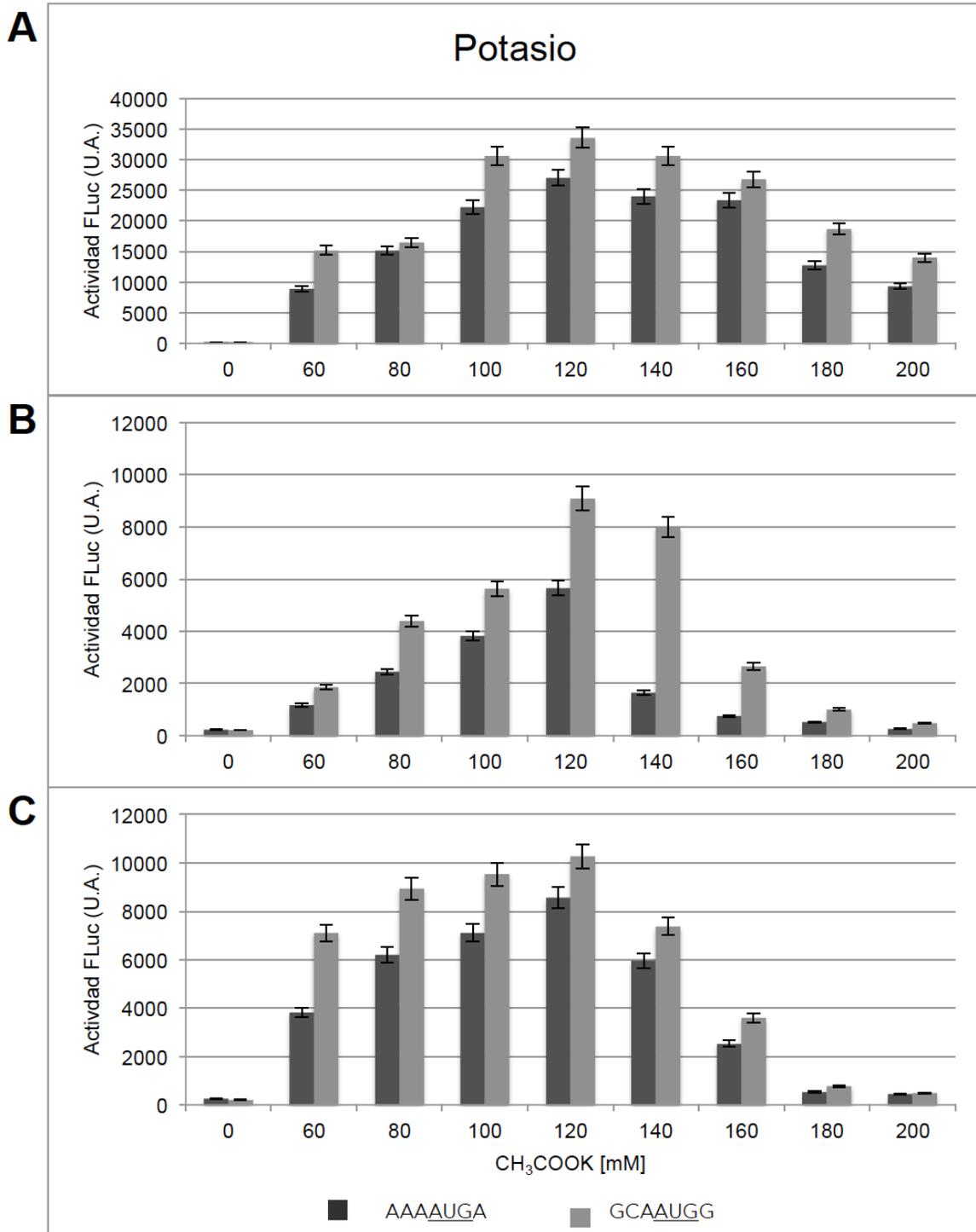


Figura 12. Efecto del potasio en lisados competentes en traducción de *U. maydis*. La eficiencia en la traducción de luciferasa (en unidades arbitrarias, U.A) es determinada en respuesta a concentraciones crecientes del ion K⁺. Se utilizaron dos mRNAs cuyas secuencias que rodean al AUG son AAAAUGA (en negro) y GCAAUGG (en gris). A), B) y C) son los resultados obtenidos en tres experimentos independientes.

Comparación de la eficiencia traduccional de mRNAs con secuencias Kozak y no Kozak.

Una vez estandarizadas las condiciones de cada lisado y probada su efectividad para una óptima síntesis de proteínas, se tradujeron una serie de mRNAs con mutaciones alrededor del codón AUG. Así, comparamos la eficiencia traduccional de 13 secuencias Kozak y 28 secuencias no Kozak. La tabla 4 muestra las condiciones usadas para las reacciones de traducción *in vitro* de cada organismo; en cambio la Figura 13 muestra los mRNAs utilizados con las diferentes secuencias que rodean al AUG, y que fueron generados por transcripción *in vitro* a partir de un plásmido que contiene el promotor T7. Una vez sintetizados, se comprobó su movilidad electroforética en condiciones desnaturizantes, comprobando que la banda del gel corresponde al transcrito de 1851 nucleótidos, del mismo tamaño al cistrón de luciferasa, mostrado en la Figura 14. Subsecuentemente se cuantificó y se llevó a cabo la reacción de traducción *in vitro* de cada organismo (por triplicado) utilizando los diversos mRNAs.

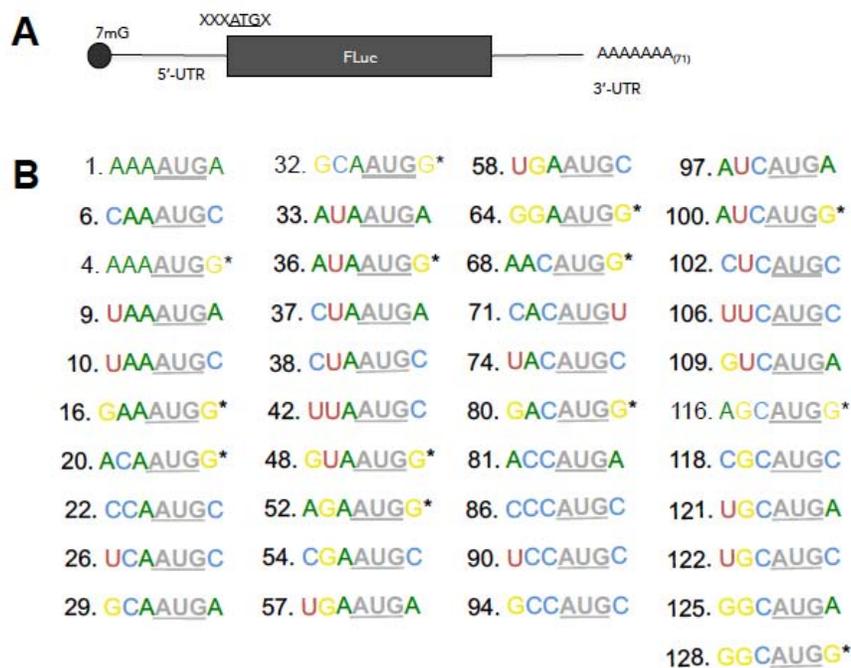


Figura 13. mRNAs utilizados para los ensayos de traducción *in vitro*. En (A) se muestra la estructura del transcrito, cuya secuencia contiene el cistrón de luciferasa. En (B) se muestran las secuencias alrededor del AUG iniciador de los mRNAs usados en este trabajo. Los números a la izquierda de cada secuencia representa un código de identificación en nuestro laboratorio. Las secuencias Kozak se encuentran señaladas con un asterisco (*).

Tabla 4. Condiciones óptimas encontradas en esta tesis. Elementos para un sistema de traducción de *S. pombe* y *U. maydis*.

Componente	Organismo	
	<i>S. pombe</i>	<i>U. maydis</i>
HEPES-KOH pH 7.4	13.2 mM	13.2 mM
CH ₃ COOK	140-160 mM	120 mM
Mg(CH ₃ COO) ₂	8-9 mM	8-9 mM
ATP	4.5 mM	4.5 mM
GTP	0.06 mM	0.06 mM
Creatin fosfato	15 mM	15 mM
Aminoácidos	24 µM	24 µM
DTT	1 mM	1 mM
Creatin fosfocinasa	2 mg/µL	2 mg/µL
tRNA	1.25 µg	1.25 µg
rRNasin	40 U	40 U
Lisado	50 % v/v	50 % v/v
mRNA	25 ng	25 ng
Volumen total	10 µL	10 µL
Temperatura de incubación	24-25 °C	19 °C
Tiempo de incubación	90 min	90 min

Es importante mencionar que, se han obtenido 13 mRNAs con características Kozak, es decir, con una purina (A/G) en la posición -3 y una guanina (G) en la posición +4; y 28 mRNAs con diversas características, entre ellos, aquellos con secuencias ricas en adeninas (A), con pirimidinas en la posición -3 y otros nucleótidos no guanina en la posición +4.

Las reacciones de traducción, detalladas en la metodología, usando lisados de *S. pombe* y *U. maydis*, se realizaron en dos experimentos independientes y por triplicado. Las Figuras 15 y 16 muestran la actividad de FLuc en U.A. de las combinatorias de la secuencia que rodea al AUG usando lisados de *S. pombe*. Observamos que los mRNAs mejor traducidos son aquellos que presentan una secuencia distinta a lo reportado por Kozak, con un predominio en las secuencias ricas en A alrededor del AUG. En cambio, aquellos marcados con una estrella (★) presentan una purina en la posición -3 y una guanina en la posición +4; se encuentran dispersos por toda la gráfica. Dado que, se han utilizado las concentraciones óptimas de iones magnesio, potasio y a una temperatura adecuada, se puede observar que las U.A. han incrementado hasta 7 veces con respecto al protocolo inicial sin estandarizar.

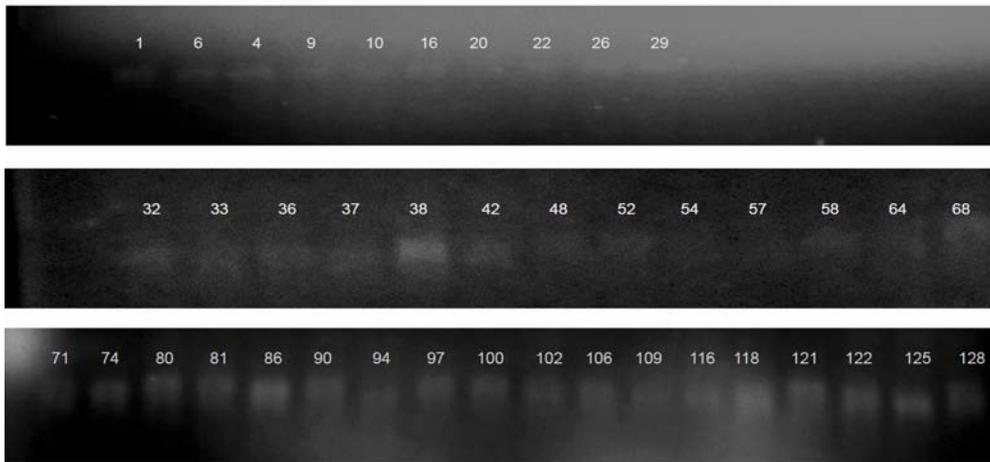


Figura 14. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes para RNA. Se muestran todos los mRNAs del estudio correspondiente como una banda única de 1851 nucleótidos. El número señalado corresponde a un código propio del laboratorio.

Del mismo modo, las Figuras 17 y 18 muestran los ensayos de traducción *in vitro* usando lisados de *U. maydis* con los valores optimizados del ambiente iónico, incrementando la actividad de FLuc hasta 8 veces con base en el protocolo sin estandarizar. Asimismo, los mRNAs mejor traducidos presentan secuencias distintas a lo reportado por Kozak.

Los mRNAs usados para estandarizar las condiciones iónicas, cuyas secuencias alrededor del AUG son GCAAUGG y AAAAUGA, muestran el mismo comportamiento; es decir, en lisados de *S. pombe* con la secuencia rica en A presenta mayor actividad; contrario a *U. maydis*, donde los mRNAs mejor traducidos son los que presentan la secuencia Kozak.

Por lo anterior y como control positivo de un organismo vertebrado, se realizaron ensayos de traducción *in vitro* de todos los mRNAs utilizando un lisado comercial de reticulocitos de conejo (Promega). Los resultados, mostrados en la Figura 19 muestran que los mRNAs mejor traducidos, como se esperaba, fueron aquellos que conservan los nucleótidos de la secuencia Kozak.

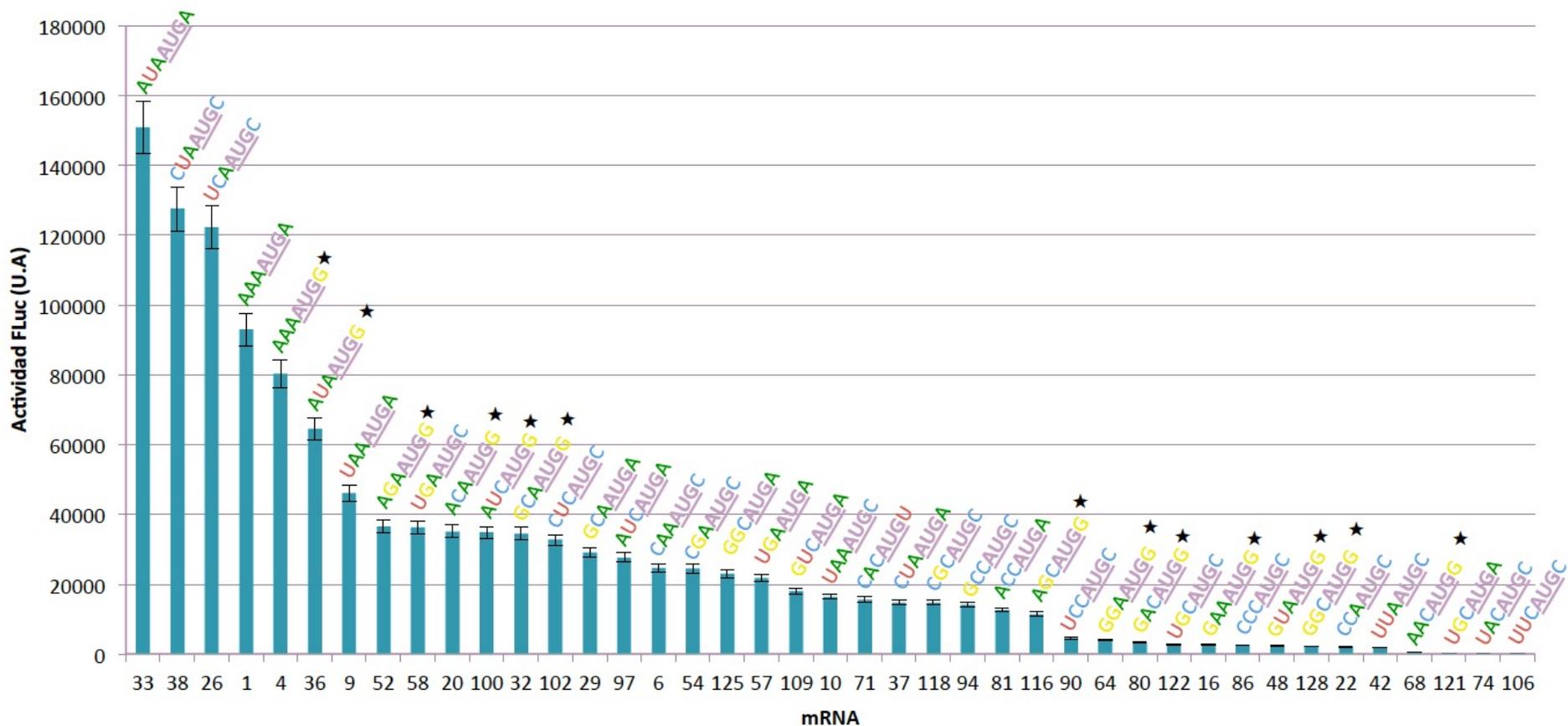


Figura 15. Actividad de FLuc (en unidades arbitrarias, U.A.) usando lisados de *S. pombe* para la traducción de mRNAs cuya secuencia alrededor del AUG se muestra en la parte superior de cada barra. Se emplearon las condiciones óptimas de temperatura y ambiente iónico encontradas en este trabajo (24 °C, 140 mM K⁺ y 8 mM Mg²⁺). Los mRNAs con una secuencia Kozak se señalan con estrellas (★).

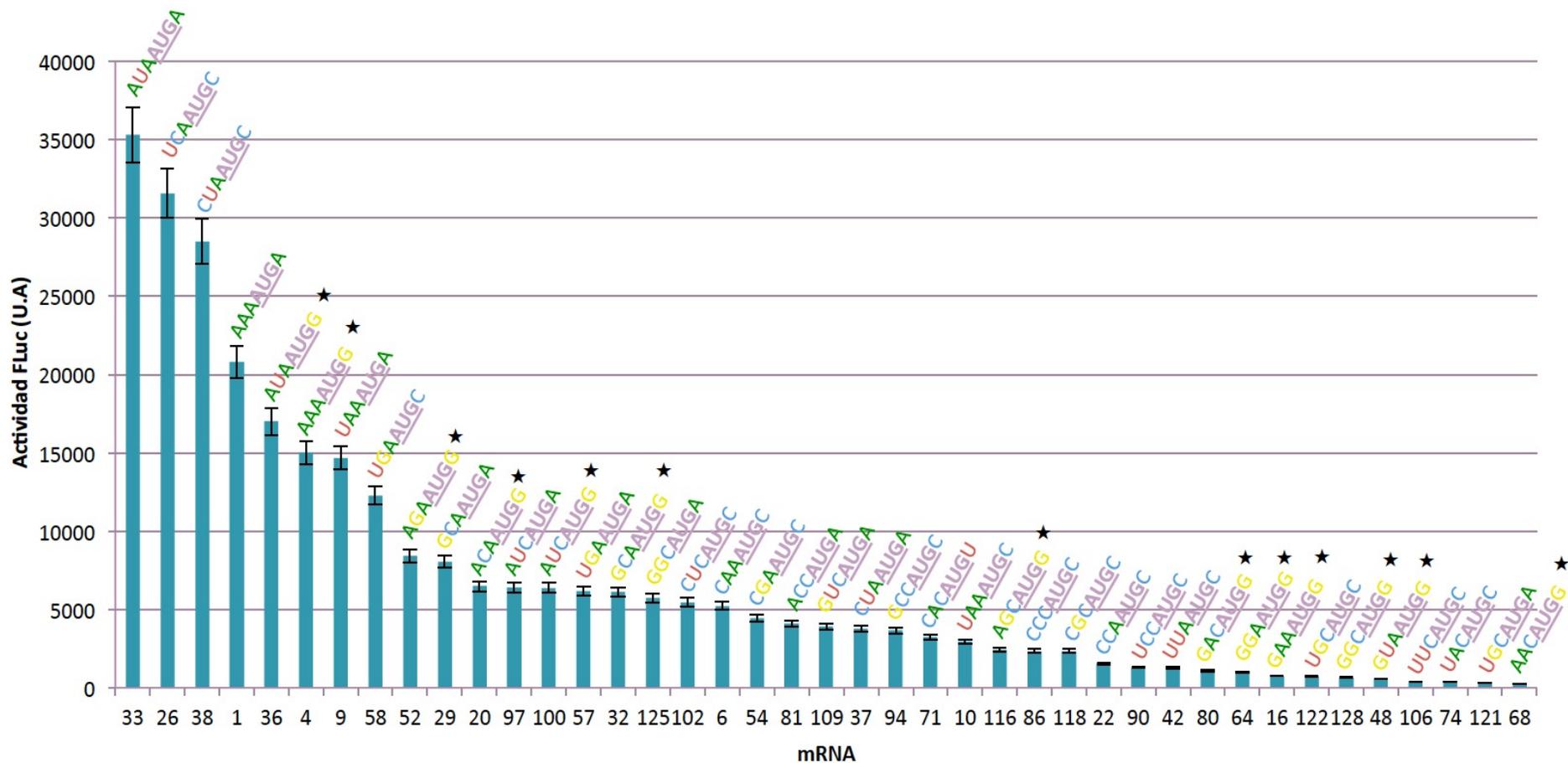


Figura 16. Actividad de FLuc (en unidades arbitrarias, U.A.) usando lisados de *S. pombe* para la traducción de mRNAs cuya secuencia alrededor del AUG se muestra en la parte superior de cada barra. Se emplearon las condiciones óptimas de temperatura y ambiente iónico encontradas en este trabajo (24 °C, 140 mM K⁺ y 9 mM Mg²⁺). Los mRNAs con una secuencia Kozak se señalan con estrellas (★).

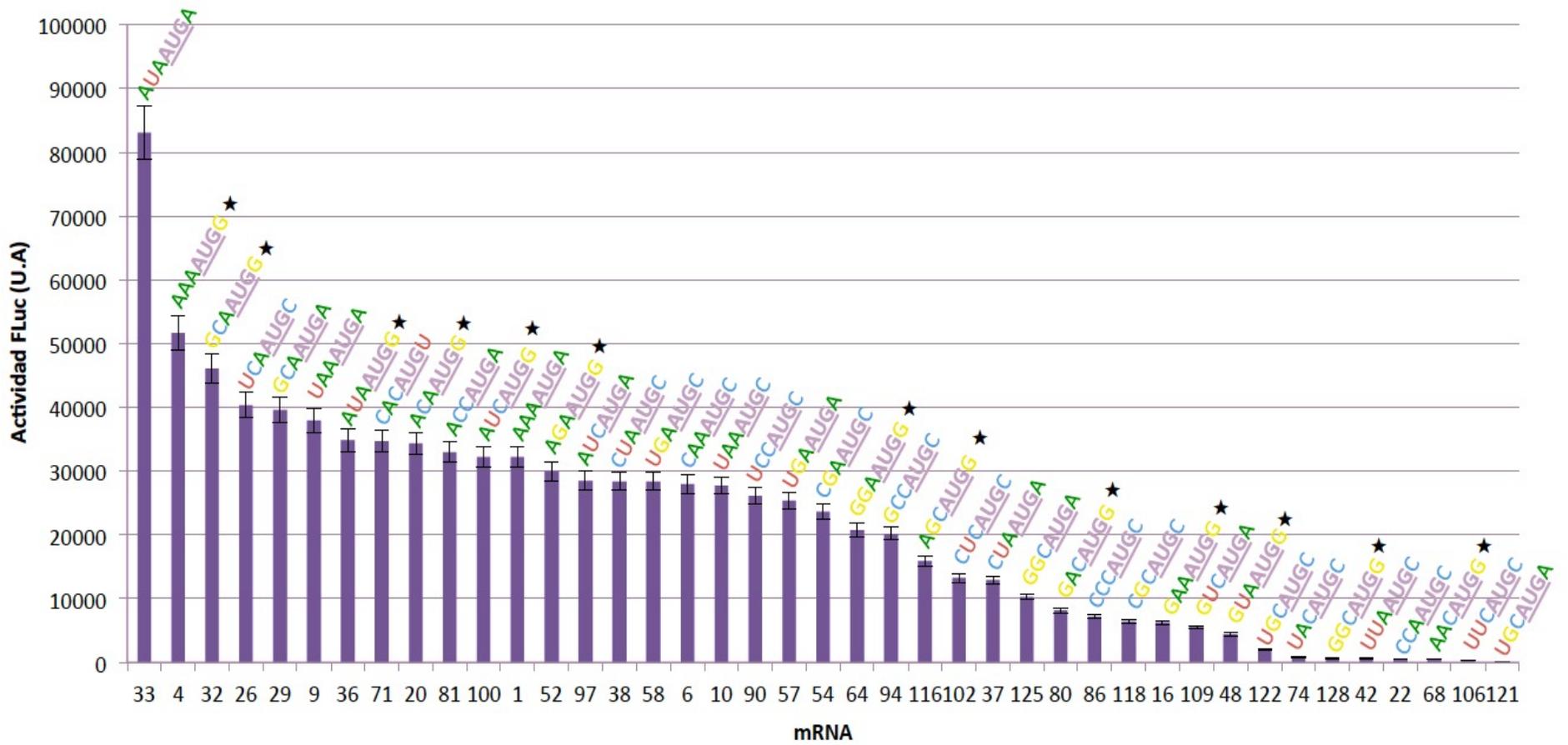


Figura 17. Actividad de FLuc (en unidades arbitrarias, U.A.) usando lisados de *U. maydis* para la traducción de mRNAs cuya secuencia alrededor del AUG se muestra en la parte superior de cada barra. Se emplearon las condiciones óptimas de temperatura y ambiente iónico encontradas en este trabajo (19 °C, 120 mM K⁺ y 9 mM Mg²⁺). Los mRNAs con una secuencia Kozak se señalan con estrellas (*).

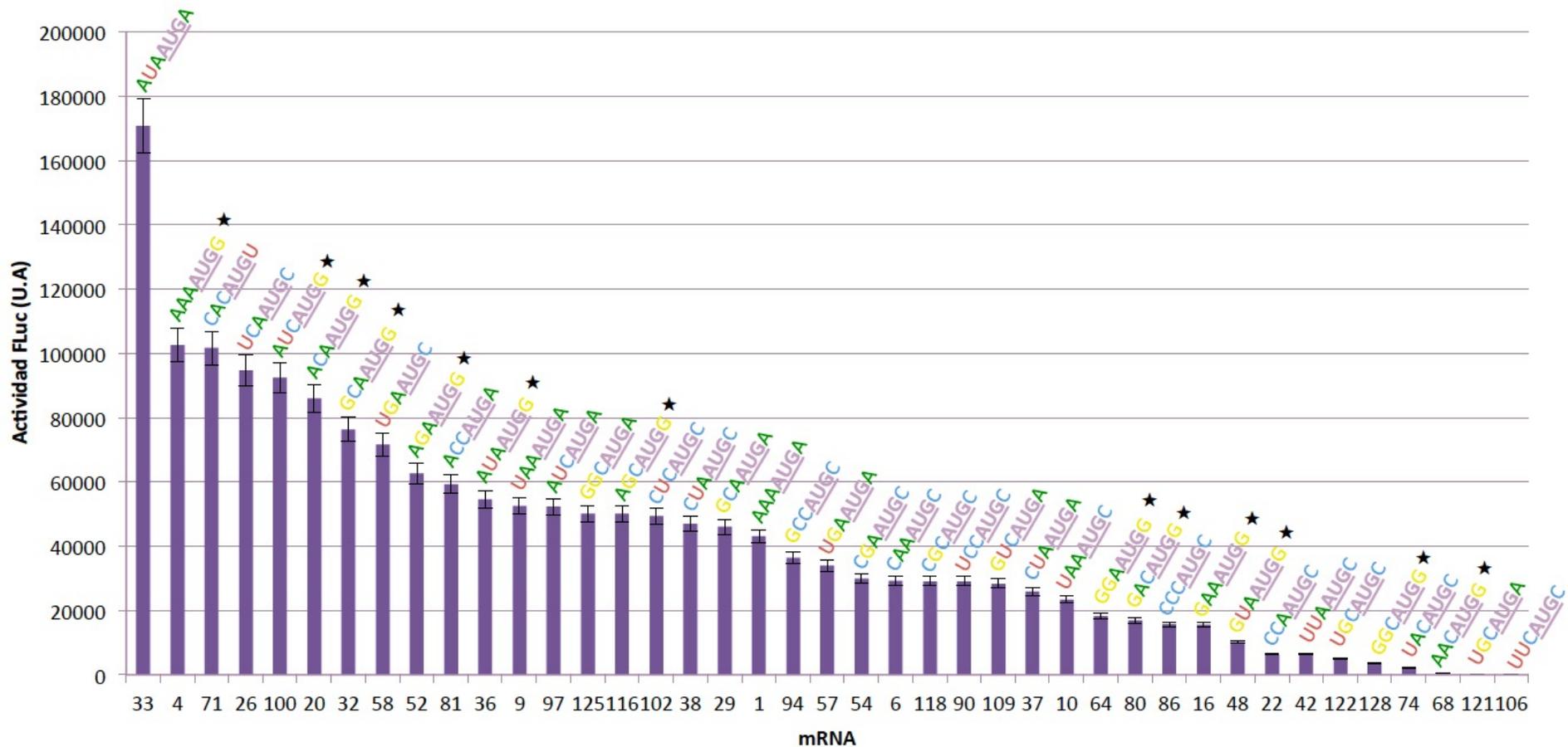


Figura 18. Actividad de FLuc (en unidades arbitrarias, U.A.) usando lisados de *U. maydis* para la traducción de mRNAs cuya secuencia alrededor del AUG se muestra en la parte superior de cada barra. Se emplearon las condiciones óptimas de temperatura y ambiente iónico encontradas en este trabajo (19 °C, 120 mM K⁺ y 9 mM Mg²⁺). Los mRNAs con una secuencia Kozak se señalan con estrellas (★).

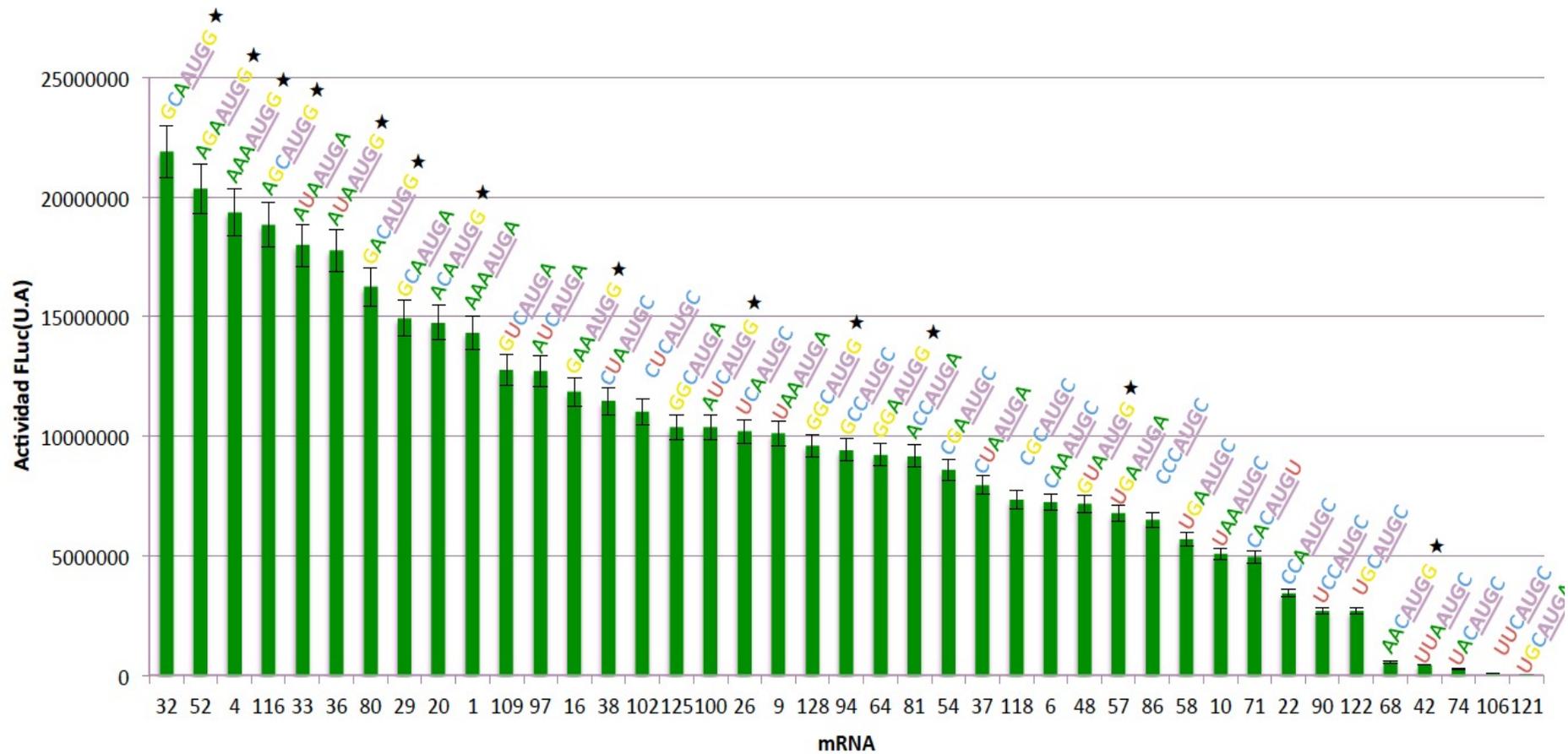


Figura 19. Actividad de FLuc (en unidades arbitrarias, U.A.) usando lisados de reticulocitos de conejo para la traducción de mRNAs cuya secuencia alrededor del AUG se muestra en la parte superior de cada barra. Los mRNAs con una secuencia Kozak se señalan con estrellas (★).

Con los resultados anteriores se propuso una secuencia contexto utilizando la combinatoria de mRNAs en todos los tres lisados. Para ello, se tomaron los primeros 21 mRNAs mejor traducidos y se realizó un análisis de frecuencias para cada nucleótido utilizando el software *WebLogo* (Figura 20). Se realizó un apilamiento de los mRNAs tomando como referencia el codón de inicio de todos los transcritos. Las posiciones circundantes muestran nucleótidos apilados en distintos tamaños, que corresponden a la frecuencia de aparición y de uso de los mRNAs mejor traducidos. El nucleótido superior representa la base mayormente usada. Los colores son los establecidos y usados comúnmente para representar en verde a las adeninas, en azul las citosinas, en amarillo las guaninas y en rojo los uracilos.

Del mismo modo, se realizó un análisis de los 20 mRNAs con baja tasa de traducción. La Figura 21 muestra las secuencias que atenúan la síntesis de proteínas.

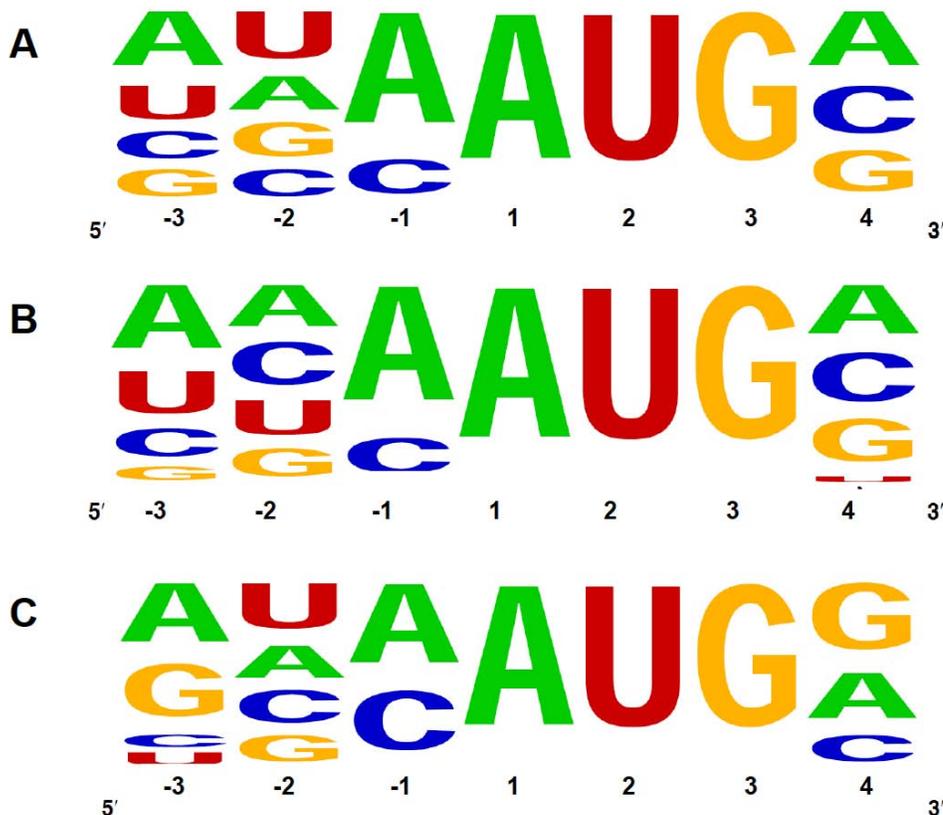


Figura 20. Análisis de las secuencias preferidas. Frecuencias alrededor del AUG en A) *S. pombe*; B) *U. maydis* y C) reticulocitos de conejo

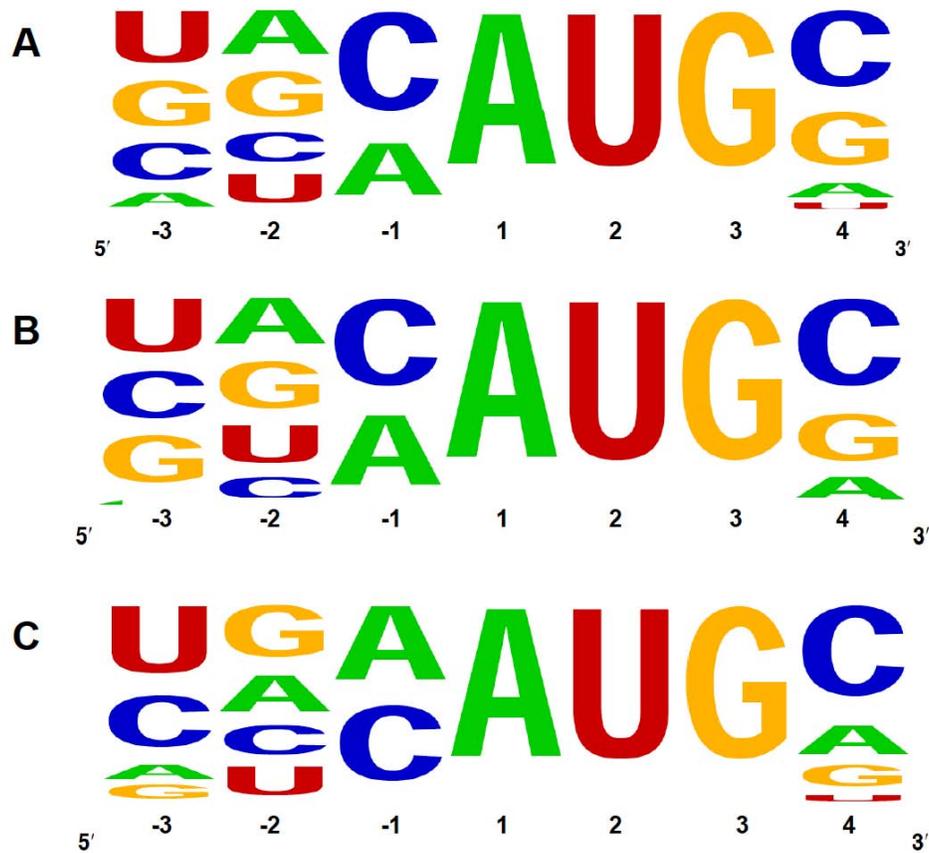


Figura 21. Análisis de las secuencias que atenúan traducción. Frecuencias alrededor del AUG en A) *S. pombe*; B) *U. maydis* y C) reticulocitos de conejo

8. DISCUSIÓN

Desarrollo de nuevos lisados de traducción

Los sistemas de traducción *in vitro* son una herramienta crucial en el estudio de la síntesis de proteínas. Los sistemas de traducción, particularmente de los eucariontes como los reticulocitos de conejo y los extractos de trigo, representan dos sistemas comúnmente usados para investigar mecanismos de control traduccional (Hunt & Jackson 1974; Marcus *et al.* 1968). Hoy en día existen numerosos trabajos que han desarrollado sistemas de traducción *in vitro* utilizando diversas líneas celulares, organismos o tejidos (Tabla 1).

En este trabajo se han preparado lisados de *S. pombe* y *U. maydis* con un alto potencial para la síntesis de proteínas; es decir, nuestros experimentos demuestran la habilidad de éstos extractos para producir proteínas a partir de mRNAs exógenos usando un sistema reportero de luciferasa. La Tabla 5 muestra en resumen las condiciones encontradas para los dos hongos de estudio,

Tabla 5. Condiciones de estandarización de los lisados de traducción. Se muestran los datos de *S. pombe* y *U. maydis*, objeto de estudio en este trabajo, contrastando con algunos sistemas publicados

Organismo	Temperatura óptima (°C)	[Mg(CH ₃ COO) ₂] (mM)	[KCH ₃ COO] (mM)	Autor
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	24-25	8-9	140-160	Esta tesis
<i>Ustilago maydis</i>	19	8-9	120	Esta tesis
<i>Drosophila melanogaster</i>	30	0.3	80	(Maroto & Sierra 1988)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20	3	160	(Tuite et al. 1980)
<i>Artemia salina</i>	30	3	80	(Sierra et al. 1974)
<i>Spodoptera frugiperda</i>	27	2.5	100	(Kubick et al. 2003)
<i>Neurospora crassa</i>	25	3.75	150	(Wang & Sachs 1997)

contrastando con los resultados de otros organismos reportados. Como puede observarse, la concentración de magnesio para ambas especies es alrededor de 8 o 9 mM, sin embargo, en otros organismos la concentración óptima es mucho menor.

Del mismo modo, el potasio se encuentra en el intervalo utilizado entre *N. crassa* y *S. cerevisiae*. Esto nos lleva a pensar, que en hongos el intervalo de potasio es superior a los 120 mM. La temperatura es otro factor crucial, como puede verse en la sección de Materiales y Métodos, los organismos aquí estudiados, crecen a 30°C; sin embargo la temperatura óptima de síntesis se encuentra de 5 a 11°C por debajo de la de crecimiento.

Con el desarrollo de nuevos sistemas de traducción se expanden las posibilidades para el estudio de proteínas en especies no estudiadas fuera de las establecidas como modelo. Del mismo modo, proponemos utilizar lisados

correspondientes a los organismos de interés (o filogenéticamente cercanos), en caso de estudiar o producir proteínas en ellos, pues los lisados intrínsecos de cada organismo proporciona chaperonas que sirven para el correcto plegamiento que dan funcionalidad y viabilidad a las proteínas.

Evaluación de los nucleótidos alrededor del codón AUG

Directamente relacionado con la producción de un lisado competente en traducción, en esta tesis se probaron diversos mRNAs para responder la pregunta científica sobre cual es la importancia en la eficiencia traduccional de una serie de mRNAs con diferentes secuencias contexto alrededor del codón AUG iniciador.

Los resultados de esta tesis utilizando lisados de *U. maydis* y *S. pombe* muestran un uso preferencial de la secuencia que rodea al AUG distinta a Kozak y que presenta mayoritariamente adeninas. Los mRNAs con la secuencia Kozak se encuentran dispersos por toda la gráfica. En contraste y como se esperaba, el ensayo de traducción en el sistema comercial de reticulocitos de conejo usando los mismos mRNAs muestra que los transcritos mejor traducidos son aquellos que contienen una purina (A/G) en la posición -3 y una G en la posición +4, cumpliendo lo establecido por Kozak en sistemas de vertebrados.

La secuencia de inicio en *S. pombe* y *U. maydis* no es Kozak

Escasos análisis experimentales, hechos por Kozak usando mRNAs de vertebrados, habían demostrado que la secuencia preferida alrededor del codón iniciador AUG para una síntesis eficiente de proteínas, corresponde al motivo Kozak (A/G)XXAUGG descrito desde 1984, analizando *in silico* diversas secuencias de genes vertebrados y de virus de vertebrados y validada experimentalmente años más tarde (Kozak 1986b; Kozak 1984; Kozak 1986a). Sin embargo, los análisis *in silico* más modernos señalan que la secuencia Kozak no está conservada en todos los organismos (Tabla 2). Es importante resaltar que Kozak estableció que cambios en las posiciones -3 y +4 tienen un efecto negativo en la síntesis de proteínas. Análisis bioquímicos, genéticos y estructurales demostraron que los nucleótidos en esas posiciones, interaccionan con factores de inicio de la traducción, principalmente con eIF1, eIF1a, eIF2 α y eIF5 (Pestova & Kolupaeva 2002; Hinnebusch 2014; Hussain *et al.* 2014).

Tabla 6. Frecuencias en los nucleótidos alrededor del codón AUG de inicio para los mRNAs con una tasa de traducción óptima.

Organismo	Nucleótido	Posición						
		-3	-2	-1	A	U	G	4
<i>S. pombe</i>	A	40%	21%	74%				40%
	G	19%	24%	0%				29%
	C	19%	21%	26%				31%
	U	22%	34%	0%				0%
<i>U. maydis</i>	A	45%	24%	69%				36%
	G	14%	21%	0%				31%
	C	17%	29%	31%				29%
	U	24%	26%	0%				4%
Reticulocitos de conejo	A	43%	24%	57%				33%
	G	37%	19%	0%				48%
	C	10%	24%	43%				19%
	U	10%	33%	0%				0%

Por otro lado, los análisis experimentales en esta tesis, usando pocas variaciones en la secuencia que rodea al AUG iniciador, mostraron que los hongos tienen preferencia por A en la posición -3 y A (y en menor grado G) en la posición +4, contrastando con lo establecido por Kozak (Figura 20). La Tabla 6 muestra de forma numérica lo descrito en la Figura 20, es decir, los porcentajes de frecuencia para cada base en los mRNAs utilizados en este trabajo. Así, en esta tesis establecemos experimentalmente una secuencia óptima para mRNAs en *S. pombe* y *U. maydis* siendo **ANAAUGA** en ambos casos, donde N es cualquier nucleótido. En cambio, en reticulocitos de conejo se encontró que la secuencia experimental es **(A/G)N(A/C)AUGG** cumpliendo totalmente lo establecido para vertebrados. La disimilitud en secuencias entre hongos y vertebrados hallada en esta tesis, podría deberse a que el genoma de los hongos estudiados es rico en A, por lo que, los transcritos son ricos en adeninas en su 5'-UTR (Shabalina 2004). Otra explicación podría ser que estas especies tienen cambios estructurales en las

factores y regiones de los ribosomas que tienen contacto con la secuencia alrededor del AUG iniciador, como los factores eIF1 y eIF1A.

Tabla 7. Frecuencias en los nucleótidos alrededor del codón AUG de inicio para los mRNAs con una tasa de traducción más baja

Organismo	Nucleótido	Posición						
		-3	-2	-1	A	U	G	4
<i>S. pombe</i>	A	12	28	33				13
	G	30	30	0				35
	C	25	22	67				48
	U	33	20	0				4
<i>U. maydis</i>	A	8	24	38				18
	G	34	33	0				32
	C	28	15	62				50
	U	30	28	0				0
Reticulocitos de conejo	A	10	25	50				20
	G	10	35	0				15
	C	35	20	50				60
	U	45	20	0				5

Uracilo en -3 y citosina en +4 atenúan la traducción

El análisis de la secuencia de los mRNAs con la eficiencia traduccional más baja (Figura 21) encontrada en esta tesis, establece que usando lisados de reticulocitos, *S. pombe* y *U. maydis*, en la posición -3 se encuentra mayoritariamente un uracilo, en -2 encontramos prácticamente cualquier nucleótido, en -1 tenemos A/C y en +4 tenemos C. Los datos sugieren que la secuencia **UN(A/C)AUGC**, común para los tres organismos, abate la síntesis de proteínas (Tabla 7). Este dato es crucial, ya que nunca se ha reportado en la literatura una secuencia consenso alrededor del AUG iniciador que inhiba traducción.

Con ello, el presente trabajo sugiere no solo considerar una secuencia óptima, pues analizando una secuencia que atenúa la síntesis de proteínas podría ser blanco de nuevos niveles de regulación. Los trabajos reportados utilizando lisados para la traducción *in vitro* de diversos organismos describen secuencias óptimas con fines biotecnológicos y de obtención de grandes rendimientos de proteína, sin embargo, la presencia de otras secuencias podría ser utilizada por transcritos que la célula necesita reprimir y que solo en ciertas condiciones (estrés, o diversos ambientes celulares) son necesarios expresar.

Este trabajo combina la estandarización de sistemas de traducción con el uso preferencial de mRNAs y contrasta con otros métodos para validar la regulación a nivel de secuencia contexto. Por ello, se presenta como un análisis más completo que otros trabajos publicados, donde la validación se ha hecho, por ejemplo, con solo 10 mRNAs (Tatematsu *et al.* 2014b).

Finalmente, sugerimos que el motivo Kozak, como una secuencia que regula el reconocimiento del codón de inicio, es propio de organismos multicelulares muy complejos como los vertebrados.

9. CONCLUSIONES

Se han estandarizado nuevos protocolos de ensayos de traducción para la levadura *S. pombe* y el hongo basidomiceto *U. maydis*, optimizando su ambiente iónico y estableciendo una temperatura adecuada para la síntesis eficiente de proteínas. Esta estandarización nos ha permitido encontrar experimentalmente secuencias contexto alrededor del codón AUG iniciador que promueve la traducción y una secuencia que la atenúa, obteniendo motivos preferidos, distintos a lo reportado por Kozak y que varían en relación a las características propias de cada genoma.

10. PERSPECTIVAS

Dentro de las perspectivas del presente trabajo, se proponen los siguientes puntos:

1. Analizar el mismo número de secuencias Kozak y no Kozak
2. Estandarizar nuevos lisados de especies filogenéticamente distantes de los vertebrados, y distintas a las estudiadas en este trabajo, para determinar la secuencia contexto preferida.
3. Realizar análisis *in silico* de los transcritos para *S. pombe* y *U. maydis* para establecer en cuales transcritos celulares se halla la secuencia óptima demostrada experimentalmente en esta tesis y en cuales se encuentra la secuencia que atea la síntesis de proteínas.

11. REFERENCIAS

- Alam, J. & Cook, J.L., 1990. Reporter genes: Application to the study of mammalian gene transcription. *Analytical Biochemistry*, 188(2), pp.245–254.
- Allen, S.H. & Wong, K.P., 1986. The role of magnesium and potassium ions in the molecular mechanism of ribosome assembly: hydrodynamic, conformational, and thermal stability studies of 16 S RNA from Escherichia coli ribosomes. *Archives of biochemistry and biophysics*, 249(1), pp.137–147.
- Ambros, V. & Chen, X., 2007. The regulation of genes and genomes by small RNAs. *Development (Cambridge, England)*, 134(9), pp.1635–1641.
- Asano, K., 2014. Why is start codon selection so precise in eukaryotes? *Translation*, 2(1), p.e28387.
- Bray, D., 2001. *Cell Movements: From Molecules to Motility*, Garland Pub.
- Browning, K.S. & Bailey-Serres, J., 2015. Mechanism of Cytoplasmic mRNA Translation. *The Arabidopsis Book*, 13, p.e0176.
- Buchner, E., 1897. Alcoholic yeast cells fermentation without. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 30, pp.117–124.
- Burgers, P.M. & Eckstein, F., 1980. Structure of metal x nucleotide complex in the creatine kinase reaction. A study with diastereomeric phosphorothioate analogs of adenosine di- and triphosphate. *The Journal of biological chemistry*, 255(17), pp.8229–33.

- Carlson, E.D. et al., 2012. Cell-free protein synthesis : Applications come of age. *Biotechnology Advances*, 30(5), pp.1185–1194.
- Cavener, D.R., 1987. Comparison of the consensus sequence flanking translational start sites in *Drosophila* and vertebrates. *Nucleic acids research*, 15(4), pp.1353–61.
- Cavener, D.R. & Ray, S.C., 1991. Eukaryotic start and stop translation sites. *Nucleic acids research*.
- Chang, M.J., Kuzio, J. & Blissard, G.W., 1999. Modulation of translational efficiency by contextual nucleotides flanking a baculovirus initiator AUG codon. *Virology*, 259(2), pp.369–83.
- Chong, S., 2014a. Overview of Cell-Free Protein Synthesis: Historic Landmarks, Commercial Systems, and Expanding Applications. *Current Protocols in Molecular Biology*, (October), pp.16.30.1–16.30.11.
- Cleland, W.W., 1964. Dithiothreitol, a New Protective Reagent for SH Groups*. *Biochemistry*, 3(4), pp.480–482.
- Gebauer, F. et al., 1999. Translational control of dosage compensation in *Drosophila* by Sex-lethal: Cooperative silencing via the 5' and 3' UTRs of msl-2 mRNA is independent of the poly(A) tail. *EMBO Journal*, 18(21), pp.6146–6154.
- Gebauer, F. & Hentze, M.W., 2004. Molecular mechanisms of translational control. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5(10), pp.827–835.
- Grzegorski, S.J. et al., 2014. Natural variability of Kozak sequences correlates with function in a zebrafish model. *PloS one*, 9(9), p.e108475.
- Hamilton, R., Watanabe, C.K. & de Boer, H. a., 1987. Compilation and comparison of the sequence context around the AUG startcodons in *Saccharomyces cerevisiae* mRNAs. *Nucleic Acids Research*, 15(8), pp.3581–3593.
- Hartwig, a, 2001. Role of magnesium in genomic stability. *Mutation research*, 475(1-2), pp.113–121.
- Hausmann, C.D. & Ibba, M., 2008. Aminoacyl-tRNA synthetase complexes: molecular multitasking revealed. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(4), pp.705–721.
- Hernandez, G., 2012. On the Emergence and Evolution of the Eukaryotic Translation Apparatus. In M. Biyani, ed. *Cell-Free Protein Synthesis*. InTech.
- Hernández, G. et al., 2004. Internal ribosome entry site drives cap-independent translation of reaper and heat shock protein 70 mRNAs in *Drosophila* embryos. *RNA (New York, N.Y.)*, 10, pp.1783–1797.
- Hernández, G. et al., 2012. On the diversification of the translation apparatus across eukaryotes. *Comparative and Functional Genomics*, 2012.
- Hernández, G., Altmann, M. & Lasko, P., 2010. Origins and evolution of the mechanisms regulating translation initiation in eukaryotes. *Trends in*

- biochemical sciences*, 35(2), pp.63–73.
- Hinnebusch, A.G., 2014. The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation. *Annual review of biochemistry*, 83(January), pp.779–812.
- Hodgman, C.E. & Jewett, M.C., 2012. Cell-free synthetic biology : Thinking outside the cell. *Metabolic Engineering*, 14(3), pp.261–269.
- Hodgman, C.E. & Jewett, M.C., 2013. Optimized Extract Preparation Methods and Reaction Conditions for Improved Yeast Cell-Free Protein Synthesis. , 110(10), pp.2643–2654.
- Holley, R.W. et al., 1965. Structure of a Ribonucleic Acid. *Science*, 147(3664), pp.1462–1465.
- Hunt, T. & Jackson, R.J., 1974. The rabbit reticulocyte lysate as a system for studying mRNA. *Hamatologie und Bluttransfusion*, 14, pp.300–307.
- Hussain, T. et al., 2014. Structural Changes Enable Start Codon Recognition by the Eukaryotic Translation Initiation Complex. *Cell*, pp.597–607.
- Jackson, R.J., 1991. Potassium salts influence the fidelity of mRNA translation initiation in rabbit reticulocyte lysates: Unique features of encephalomyocarditis virus RNA translation. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, 1088(3), pp.345–358.
- Jackson, R.J., Hellen, C.U.T. & Pestova, T. V, 2010. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(2), pp.113–127.
- Joshi, B. et al., 2005. Phylogenetic analysis of eIF4E-family members. , 20, pp.1–20.
- Joshi, C.P. et al., 1997. Context sequences of translation initiation codon in plants. *Plant Molecular Biology*, 35(6), pp.993–1001.
- Katzen, F., Chang, G. & Kudlicki, W., 2005. The past, present and future of cell-free protein synthesis. *Trends in Biotechnology*, 23(3), pp.150–156.
- Kawaguchi, R., 2005. mRNA sequence features that contribute to translational regulation in Arabidopsis. *Nucleic Acids Research*, 33(3), pp.955–965.
- Kim, Y. et al., 2014. The immediate upstream region of the 5'-UTR from the AUG start codon has a pronounced effect on the translational efficiency in Arabidopsis thaliana. *Nucleic Acids Research*, 42(1), pp.485–498.
- Kozak, M., 1987. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger rNAS. *Nucleic Acids Research*, 15(20), pp.8125–8148.
- Kozak, M., 1984. Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Research*, 12(2), pp.857–872.
- Kozak, M., 1978. How do eucaryotic ribosomes select initiation regions in messenger RNA? *Cell*, 15(4), pp.1109–1123.

- Kozak, M., 1986a. Influences of mRNA secondary structure on initiation by eukaryotic ribosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(9), pp.2850–2854.
- Kozak, M., 1979. Migration of 40 S ribosomal subunits on messenger RNA when initiation is perturbed by lowering magnesium or adding drugs. *The Journal of Biological Chemistry*, 254(11), pp.4731–4738.
- Kozak, M., 1986b. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell*, 44(2), pp.283–292.
- Kozak, M., 2002. Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene*, 299(1-2), pp.1–34.
- Kubick, S. et al., 2003. In Vitro Translation in an Insect-Based Cell-Free System. In *Cell-Free Protein Expression*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 209–217.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L. & Cox, M.M., 2005. *Lehninger Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman.
- Liljas, A., 2013. Translation. *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, 7, pp.127–129.
- Lukaszewicz, M. et al., 2000. In vivo evaluation of the context sequence of the translation initiation codon in plants. *Plant Science*, 154(1), pp.89–98.
- Lütcke, H. a et al., 1987. Selection of AUG initiation codons differs in plants and animals. *The EMBO journal*, 6(1), pp.43–48.
- Marcus, A., Luginbill, B. & Feeley, J., 1968. Polysome formation with tobacco mosaic virus RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 59(4), pp.1243–1250.
- Maroto, F.G. & Sierra, J.M., 1988. Translational control in heat-shocked *Drosophila* embryos. Evidence for the inactivation of initiation factor(s) involved in the recognition of mRNA cap structure. *The Journal of biological chemistry*, 263(30), pp.15720–5.
- Méndez, R. & Richter, J.D., 2001. Translational control by CPEB: a means to the end. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2(7), pp.521–529.
- Muckenthaler, M., Gray, N.K. & Hentze, M.W., 1998. IRP-1 binding to ferritin mRNA prevents the recruitment of the small ribosomal subunit by the cap-binding complex eIF4F. *Molecular cell*, 2(3), pp.383–388.
- Nakagawa, S. et al., 2008. Diversity of preferred nucleotide sequences around the translation initiation codon in eukaryote genomes. *Nucleic Acids Research*, 36(3), pp.861–871.
- Nirenberg, M.W. & Matthaei, J.H., 1961a. The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 47, pp.1588–602.

- Pesole, G. et al., 2000. Analysis of oligonucleotide AUG start codon context in eukaryotic mRNAs. *Gene*, 261(1), pp.85–91.
- Pestova, T. V & Kolupaeva, V.G., 2002. The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection. , 3, pp.2906–2922.
- Ranjan, a & Hasnain, S.E., 1995. Influence of codon usage and translational initiation codon context in the AcNPV-based expression system: computer analysis using homologous and heterologous genes. *Virus genes*, 9(2), pp.149–153.
- Rheinberger, H.-J., 2004. A History of Protein Biosynthesis and Ribosome Research. In *Protein Synthesis and Ribosome Structure*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 1–51.
- Rio, D.C., 2015. Denaturation and electrophoresis of RNA with formaldehyde. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2015(2), pp.219–222.
- Sano, K.-I. et al., 2002. Enhancement of protein expression in insect cells by a lobster tropomyosin cDNA leader sequence. *FEBS Letters*, 532(1-2), pp.143–146.
- Shabalina, S.A., 2004. Comparative analysis of orthologous eukaryotic mRNAs: potential hidden functional signals. *Nucleic Acids Research*, 32(5), pp.1774–1782.
- Shatsky, I.N. et al., 2014. Transcriptome-wide studies uncover the diversity of modes of mRNA recruitment to eukaryotic ribosomes. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 49(2), pp.164–77.
- Siekevitz, P., 1952. Uptake of radioactive alanine in vitro into the proteins of rat liver fractions. *The Journal of biological chemistry*, 195(2), pp.549–65.
- Siekevitz, P. & Zamecnik, P.C., 1981. Ribosomes and protein synthesis. *The Journal of Cell Biology* , 91 (3), p.53s–65s.
- Sierra, J.M., Meier, D. & Ochoa, S., 1974. Effect of development on the translation of messenger RNA in *Artemia salina* embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71(7), pp.2693–2697.
- Sonenberg, N. & Hinnebusch, A.G., 2009. Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets. *Cell*, 136(4), pp.731–745.
- Spirin, A.S. & Swartz, J.R., 2007. Cell-Free Protein Synthesis Systems: Historical Landmarks, Classification, and General Methods. In *Cell-Free Protein Synthesis*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 1–34.
- Sugio, T. et al., 2010. Effect of the sequence context of the AUG initiation codon on the rate of translation in dicotyledonous and monocotyledonous plant cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109(2), pp.170–173.
- Takemoto, T., Nagamatsu, Y. & Oka, T., 1983. The study of spermidine-stimulated polypeptide synthesis in cell-free translation of mRNA from lactating mouse

mammary gland. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 740(1), pp.73–79.

- Tatematsu, K. et al., 2014a. Effect of ATG initiation codon context motifs on the efficiency of translation of mRNA derived from exogenous genes in the transgenic silkworm, *Bombyx mori*. *SpringerPlus*, 3, p.136.
- Tuite, M.F. et al., 1980. Faithful and efficient translation of homologous and heterologous mRNAs in an mRNA-dependent cell-free system from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 255(18), pp.8761–8766.
- Tuite, M.F. & Plesset, J., 1986. mRNA-dependent yeast cell-free translation systems: Theory and practice. *Yeast*, 2(1), pp.35–52.
- Tuschl, T. et al., 1999. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes & development*, 13(24), pp.3191–7.
- Wang, Z. & Sachs, M.S., 1997. Arginine-specific regulation mediated by the *Neurospora crassa* arg-2 upstream open reading frame in a homologous, cell-free in vitro translation system. *Journal of Biological Chemistry*, 272(1), pp.255–261.
- Watson, J.D. et al., 2013. *Molecular Biology of the Gene*, Pearson Education.
- Wei, J. et al., 2013. The stringency of start codon selection in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Journal of Biological Chemistry*, 288(13), pp.9549–9562.
- Whittaker, J.W., 2013. Cell-free protein synthesis: The state of the art. *Biotechnology Letters*, 35(2), pp.143–152.
- Yamauchi, K., 1991. The sequence flanking translational initiation site in protozoa. *Nucleic acids research*, 19(10), pp.2715–2720.
- Zamecnik, P., 2005. From protein synthesis to genetic insertion. *Annual review of biochemistry*, 74, pp.1–28.

12. ANEXO

I. SÍNTESIS DE mRNAs

A) Medio LB

- ✓ Mezclar 10 g de bactotripton, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl en 900 mL de agua bidestilada.
- ✓ Ajustar el pH en 7.0 con 10 M de NaOH.
- ✓ Ajustar el volumen a 1 L con agua bidestilada.
- ✓ Esterilizar por autoclave y guardar a temperatura ambiente.

B) Placas de LB con antibiótico

- ✓ Preparar medio LB y adicionar 15 g de agar por litro de líquido.
- ✓ Esterilizar por autoclave y permitir enfriar a 50°C para agregar el antibiótico de interés.
- ✓ Agitar suavemente para evitar formar burbujas y depositar en cajas de Petri estériles.
- ✓ Dejar solidificar y guardar a 4°C en posición invertida. Son estables por un periodo menor a 6 meses.
- ✓ Antes de usar, incubar las placas a 37°C en posición invertida para evitar condensación de agua en la tapa.

C) Ampicilina (Amp)

- ✓ Preparar soluciones stock de 100 mg/mL, pesando 1 g por cada 10 mL de agua bidestilada.
- ✓ Esterilizar por filtración con membrana de 0.2 μm y guardar en alícuotas de 1 mL a -20°C.
- ✓ La concentración de trabajo se encuentra en el rango de 20 a 100 $\mu\text{g/mL}$, siendo la óptima 50 $\mu\text{g/mL}$.
- ✓ El modo de acción de la ampicilina es inhibiendo la síntesis de pared celular interfiriendo en la formación de redes de peptidoglicano.
- ✓ Las bacterias que contienen el gen de resistencia, codifican para la enzima β -lactamasa que rompe el anillo β -lactámico del antibiótico.

D) Solución RF1/ bacterias competentes

- ✓ La solución está compuesta de acetato de potasio (CH_3COOK) 30 mM, RbCl_2 100 mM, CaCl_2 10 mM, MnCl_2 50 mM, Glicerol 15%.
- ✓ Ajustar el pH a 5.8 con 0.2 M de ácido acético (H_3COOH).
- ✓ Esterilizar por filtración con membrana de 0.2 μm .

E) Solución RF2/ bacterias competentes

- ✓ La solución está compuesta de MOPS 10 mM, CaCl_2 75 mM, RbCl_2 10 mM, glicerol 15%.

- ✓ Ajustar el pH a 6.5 con KOH.
- ✓ Esterilizar por filtración con membrana de 0.2 μm .

F) Preparación de bacterias competentes

- ✓ A partir de una colonia de *E. coli* DH5 α se realiza un precultivo de 3 mL en medio LB líquido. Se incuba a 37°C 16 h con agitación constante de 300 rpm.
- ✓ A partir del precultivo, tomar 500 μL y adicionar a 50 mL de medio LB.
- ✓ Incubar a 37°C con agitación moderada (300 rpm) hasta alcanzar una D.O. de 0.5 a una longitud de onda de 600 nm (aproximadamente 4h de incubación).
- ✓ Una vez alcanzado el crecimiento deseado, transferir el cultivo en tubos de centrifuga estériles e incubar en hielo por 10 min.
- ✓ Centrifugar a 3000 rpm por 20 min a 4°C y eliminar el sobrenadante.
- ✓ Resuspender el pellet en 16 mL de la solución RF1, incubar 15 min en hielo y centrifugar a 3000 rpm, 20 min a 4°C.
- ✓ Eliminar el sobrenadante y resuspender por pipeteo, la pastilla en 4 mL de la solución RF2; incubar 15 min en hielo.
- ✓ Formar alícuotas de 50 μL en tubos de 1.5 mL estériles.
- ✓ Congelar inmediatamente en nitrógeno líquido para conservar su competencia. Almacenar a -70°C; es recomendable usarlas por un periodo menor a 12 meses.
- ✓ Recomendación: trabajar en condiciones de esterilidad usando mechero, usar guantes, tubos estériles y en un área aséptica.

G) Bromuro de etidio 100 mL

- ✓ Para preparar soluciones stock de 10 mg/mL, pesar 1 g de bromuro de etidio en 100 mL de agua bidestilada.
- ✓ Agitar vigorosamente hasta disolver completamente
- ✓ Preparar alícuotas, guardar en frascos o tubos ámbar, protegidos de la luz y a 4°C
- ✓ Para geles de agarosa, usar entre 0.5 y 1 μg por mL de solución de agarosa

- ✓ Nota: El bromuro de etidio es mutágeno y cancerígeno. Vista la ropa apropiada y la protección necesaria para su manipulación.

H) Buffer 10X TBE (Tris/ ácido bórico/ EDTA)

- ✓ Disolver 108 g de Tris y 55 g de ácido bórico en 900 mL de agua bidestilada
- ✓ Adicionar 40 mL de 0.5 M Na₂EDTA (pH 8.0) y ajustar el volumen a 1 L con agua bidestilada.
- ✓ Guardar a temperatura ambiente.

I) MOPS 10X

- ✓ Disolver en 800 mL de agua DEPC, 41.86 g de MOPS ultrapuro / ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico (concentración final 0.2 M), 4.1 g de acetato de sodio anhidro (Na₂CH₃COO, concentración final 50 mM), y 20 mL de EDTA 0.5 M pH 7.5 (concentración final 10 mM).
- ✓ Ajustar el pH a 7.0 con NaOH (Si se usa MOPS sódico, usar ácido acético glacial para ajustar el pH).
- ✓ Aforar a 1 L con agua DEPC.
- ✓ Guardar en alícuotas, protegido de la luz y a 4°C; la solución puede cambiar a un tono amarillo, que es totalmente normal. No usar por un periodo mayor a 6 meses a partir de su preparación.

J) 0.5 M Na₂EDTA pH 8.0 1 L

- ✓ Disolver 186.12 g de Na₂EDTA (PM. 372.24 g/mol) en 800 mL de agua bidestilada, agitando vigorosamente agitador magnético.
- ✓ Ajustar el pH a 8.0 con NaOH concentrado y ajustar el volumen a 1L con agua bidestilada.
- ✓ Dividir en alícuotas, esterilizar por autoclave.
- ✓ Guardar a temperatura ambiente.
- ✓ Nota: las sales de EDTA solo se disuelven cuando el pH de la solución está por arriba de 8.0

K) Formaldehído 37 % v/v

- ✓ A partir de 37 mL de formaldehído ultra puro grado analítico, aforar a 100 mL con agua DEPC.
- ✓ Guardar a temperatura ambiente, protegido de la luz.
- ✓ Manipularlo solo en campana de extracción o en un lugar ventilado.

L) Buffer desnaturalizante para muestras de RNA

- ✓ Mezclar 660 μ L de formamida pura, 200 μ L de MOPS 10X y 270 μ L de Formaldehído al 37% para obtener un volumen final de 1.13 mL.
- ✓ Preparar en fresco y desechar.
- ✓ Usar guantes y ropa protectora debido a la toxicidad de las sustancias.

M) Agua DEPC

- ✓ Adicionar 100 μ L de dietilpirocarbonato (DEPC) por cada 100 mL de agua bidestilada.
- ✓ Agitar vigorosamente con agitador magnético e incubar toda la noche
- ✓ Esterilizar dos veces por autoclave para inactivar el DEPC y eliminarlo por completo.
- ✓ Guardar a temperatura ambiente.
- ✓ Nota: Usar la ropa adecuada y la protección necesaria, pues es un compuesto irritante y con alto potencial cancerígeno.

II. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS COMPETENTES EN TRADUCCIÓN

N) DTT 1M, 3 mL

- ✓ Disolver 0.46 g de 1,4-ditio-DL-threitol (DTT, PM. 154.25 g/mol) en 3 mL de una solución 10 mM de acetato de sodio (pH 5.2).
- ✓ Esterilizar por filtración en membrana de 0.2 μ m.
- ✓ Dividir en alícuotas de 1 mL en tubos ámbar, protegidos de la luz y guardar a -20 °C.

O) Acetato de sodio 100 mM pH 5.2 , 100 mL

- ✓ Disolver 1.36 g de NaOAc-3H₂O (PM. 136.08 g/mol) en 80 mL de agua bidestilada.
- ✓ Ajustar el pH a 5.2 con ácido acético glacial 0.2 M.
- ✓ Aforar la solución a 100 mL con agua bidestilada.
- ✓ Guardar a temperatura ambiente.

P) HEPES- KOH 1 M pH 7.4, 500 mL

- ✓ Disolver 119.15 g de HEPES en 400 mL de agua bidestilada.
- ✓ Ajustar a pH 7.4 con KOH concentrado.
- ✓ Aforar a 500 mL; guardar a temperatura ambiente.

Q) Medio YPD

- ✓ Mezclar 20 g de peptona, 10 g de extracto de levadura y 20 g de Dextrosa en 1 L de agua bidestilada.
- ✓ Esterilizar por autoclave y guardar a temperatura ambiente.
- ✓ El medio presenta un color ámbar, transparente.

R) YPD placas

- ✓ Preparar medio YPD y adicionar 15 g de agar por litro de líquido.
- ✓ Esterilizar por autoclave y permitir enfriar a 50°C para agregar antibiótico de ser necesario.
- ✓ Agitar suavemente para evitar formar burbujas y depositar en cajas de petri estériles.
- ✓ Dejar solidificar y guardar a 4°C en posición invertida. Son estables por un periodo menor a 6 meses.
- ✓ Antes de usar, incubar las placas a 37°C en posición invertida para evitar condensación de agua en la tapa.

S) Buffer A 5X levaduras

- ✓ La solución contiene los siguientes elementos: 150 mM HEPES-KOH pH7.4, 0.5 M acetato de potasio, 10 mM de acetato de magnesio y agua bidestilada.
- ✓ Almacenar a temperatura ambiente.

T) Buffer de resuspensión de levaduras.

- ✓ Preparar lo necesario de una solución con: 1X *Buffer A 5X levaduras*, 2 mM DTT, 8.5 p/v manitol, inhibidores de proteasas y agua bidestilada.
- ✓ Usar frío y guardar a -20°C; es estable por un mes.

U) Buffer de elución de Sephadex-G25

- ✓ Preparar lo necesario de una solución con: 1X *Buffer A 5X Levaduras*, 2 mM DTT, inhibidores de proteasas y agua bidestilada.
- ✓ Usar frío y guardar a -20°C; es estable por un mes.
- ✓ El *buffer* de resuspensión y de elución contienen los mismos elementos, a diferencia del primero que contiene manitol como agente osmótico.

MARCA Y NUMÉRO DE CATALOGO DE KITS Y REACTIVOS UTILZADOS

1. QIAprep Spin Miniprep Kit. N° Cat. 27106, QIAGEN.
2. Agarose Gel Extraction Kit. N° Cat. PP-202L, Jena Bioscience.
3. mMessage mMachine T7. N° Cat AM1344, Ambion, Life Technologies.
4. RNeasy Minielute Clean up Kit. N° Cat 74204, QIAGEN.
5. Luciferase Assay System. N° Cat. E1501, Promega.
6. Inhibidores de proteasas. Complete, Mini EDTA-free. Protease Inhibitor Cocktail Tablets, N° Cat. 11836170001, ROCHE.
7. Aminoácidos. Amino Acid Mixture Complete, 1 mM each of the 20 essential amino acids, N° Cat. L4461, Promega.
8. Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor, 40 U/μL, N° Cat. N2511, Promega.
9. Protein Assay Dye Reagent Concentrate. N° cat. 500-0006, Bio-Rad.

10. Pierce Bovine Serum Albumin Standard Ampules, 2 mg/mL. N° cat 23209. Thermo Scientific.
11. Creatin Phosphate, Dipotassium Salt, N° cat. 237911, CALBIOCHEM.
12. Creatine Phosphokinase from rabbit muscle. N° cat. C3755, SIGMA.
13. tRNA. Ribonucleica cid, transfer from bovine liver, N° cat. R8759.
14. Espermidina. Spermidine 99% (GC), N° cat. S2626, SIGMA.