

ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE USO DE ANTICODONES Y DISTRIBUCIÓN DE CCA EN EL EXTREMO 3' DE LOS tRNAs BACTERIANOS.

Cruz Medina, J. A.⁽¹⁾; Alcaraz-Peraza, L. D.⁽²⁾; Campos Guillen J.⁽¹⁾; Olmedo Álvarez G.⁽²⁾.

⁽¹⁾Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro

⁽²⁾Ingeniería Genética de Plantas, CINVESTAV-IPN-Irapuato

RESUMEN

El tRNA es el encargado de transferir un aminoácido específico a la cadena polipeptídica creciente en el sitio aminoacil del ribosoma durante la traducción de RNAm a proteína. Tiene un extremo 3' que contiene la secuencia CCA en el sitio terminal que es esencial para la unión del aminoácido mediante la enzima aminoacil-tRNAsintetasa. Una zona esencial para la correcta traducción de RNAm a proteína es el anticodon que contiene una región complementaria de tres nucleótidos al código genético empleado por el RNAm. A partir de secuencias de tRNA bacteriano obtenidas de GenBank se analizaron con tNRAScan-SE y extrajeron los extremos 3' obteniéndose: 28733 tRNAs de los cuales 18834 contienen la secuencia CCA 3' codificada, sobresaliendo un uso del anticodon CAU de metionina, un uso alto de anticodones para Ácido glutámico, Valina, Alanina, Asparagina, Glicina e Isoleucina y un uso nulo de 15 anticodones.

INTRODUCCIÓN

El RNA de transferencia (tRNA), propuesto por Francis Crick, es una cadena de RNA de pequeña longitud (73 a 93 nucleótidos) este es el encargado de transferir un aminoácido específico a la cadena polipeptídica creciente en el sitio aminoacil del ribosoma durante la traducción de RNAm a proteína en la síntesis proteica. Tiene un extremo 3' que contiene la secuencia CCA en el sitio terminal que es esencial para la unión del aminoácido mediante la enzima aminoacil-tRNAsintetasa. El enlace entre el tRNA y el aminoácido es de tipo covalente. Una zona esencial para la correcta traducción de RNAm a proteína es el anticodon situado en el brazo inferior del tRNA que contiene una región complementaria de tres nucleótidos al código genético empleado por el RNAm. Cada tipo de molécula del tRNA puede unirse específicamente a un sólo un tipo de aminoácido, aunque el código genético contiene codones múltiples específicos para el mismo aminoácido, es decir tRNA que llevan anticodones diferente pueden llevar el mismo aminoácido en Bailly (2006), Clark (2006), McClain (2006), Saks (2007).

Todos los tRNAs tienen características comunes de secuencia y estructura que les permiten interactuar con las diferentes enzimas implicadas en la traducción, pero a la vez cada uno de los tRNAs posee características particulares que los dotan de especificidad. La estructura general de los tRNAs esta dada de acuerdo a la disposición y naturaleza de estos, donde los nucleótidos son numerados desde el extremo 5' al 3' según la secuencia estándar más común de los tRNAs que consta de 76 bases. El brazo aceptor contiene en su extremo 3' la secuencia CCA con un grupo -OH libre para interactuar con la enzima aminoacil-tRNAsintetasa; El brazo D contiene un anillo de nucleótidos donde se encuentra una base modificada en dihidrouridina, que es característica y conservada en todos los tRNAs en el brazo D; El brazo T contiene una base modificada en pseudouridina (TΨC) en su anillo, la cual es conservada en todos los tRNAs y solo se encuentra en el brazo T; El brazo del anticodon es uno de los dos brazos más estudiados del tRNA en las posiciones 34, 35 y 36. Se ubica el anticodon que es la zona del tRNA que reconocerá al codón del RNAm, en la posición 33 se encuentra siempre un Uracil. En la posición 37 se encuentra una base purica [Adenina (A) o Guanocina (G)] modificada. La posición 38 corresponde a una base pirimidínica [Citosina (C) o Uracil (U)] modificada. En la posición 34 del anticodon (posición "wobble") reconoce y se une a la tercera base del codón del mRNA y la posición 36 del anticodon reconoce la primera del

codon; El brazo extra o variable contiene de 3 a 21 nucleótidos, en Clark (2006), Dieter (1995) y Lewin (1997), como se muestra en la figura 1.

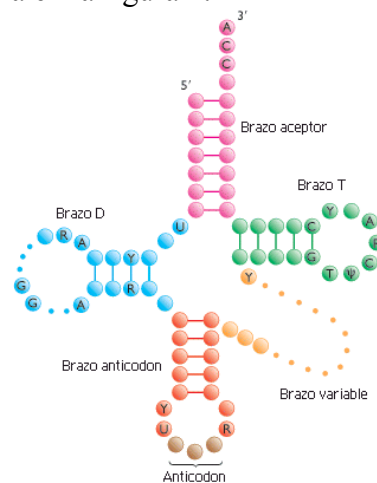


Figura 1. Estructura general de los tRNAs, donde se muestran las zonas más importantes.

Debido a que se conoce que la secuencia final CCA es esencial en los tRNAs para la interacción con la enzima aminoacil-tRNAsintetasa para la unión del aminoácido y la especificidad de los codones durante la traducción a proteínas. En este trabajo se realizó un estudio global de disponibilidad de anticodones en los genomas bacterianos así como la presencia de secuencias con CCA codificado en el extremo 3'.

MATERIALES Y METODO

Se empleó la base de datos disponible en GenBank del National Center for Biotechnology Information con 526 genomas bacterianos disponibles al día de 21 de julio de 2007, se extrajeron secuencias de genomas correspondientes a RNA donde se contiene las secuencias correspondientes a los tRNAs bacterianos (con extensión .frn). Posteriormente se hizo filtrado para obtener solamente secuencias de tRNA empleando el programa BioEdit en Hall (1999) en el cual ayudó a visualizar las secuencias de tRNA para obtener una base de datos con la cual se pudiera trabajar. Después la base de datos se analizó con el programa tRNAscan-SE en Lowe (1997), obteniendo una base con identificadores, anticodones y receptor para transporte de aminoácido. Posterior a esto con base a los identificadores de las secuencias se realizó una búsqueda de las secuencias que dieron positivo para tRNAscan-SE en la base de datos que obtuvimos a partir de los genomas con el fin de tener una base de datos que solo contuviera tRNAs positivos por software para poder extraer los fines de secuencia mediante un programa diseñado en Perl. Después se organizaron en una nueva base de datos y se extrajo información de interés como cantidad de fines CCA, frecuencia de aminoácidos, frecuencia de anticodones, mediante los comandos de EMBOSS en Rise (2000).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

De los tRNAs de genomas bacterianos se obtuvieron 28733 tRNAs bacterianos de los cuales 18834 contienen la secuencia CCA final codificada, a si como 743 tRNAs de Fenilalanina (Phe), 2863 de Leucina (Leu), 1158 de Isoleucina (Ile), 2146 de Metionina (Met), 1754 de Valina (Val), 2079 de Serina (Ser), 1328 de Prolina (Pro), 1676 de Treonina (Thr), 1992 de Alanina (Ala), 723 de Tirosina (Tyr), 589 de Histidina (His) 1013 de Glutamina (Gln), 987 de Asparagina (Asn), 1340 Lisina (Lys), 1074 de Ácido aspártico (Asp), 1336 de Ácido glutámico (Glu), 574 de Cisteina (Cys), 534 de Triptófano (Trp), 2451 de Arginina (Arg) y 2072 de Glicina (Gly). Además se obtuvo la frecuencia de uso de los anticodones mostrada en la tabla 2 y ejemplificada de forma gráfica en la figura 2.

Tabla 2. Frecuencia de uso de anticodones de tRNAs bacterianos.

Anticodon	Aminoácido	Cantidad	Anticodon	Aminoácido	Cantidad
U U U	Lys	997	U G U	Thr	756
C U U	Lys	347	C G U	Thr	349
U U C	Glu	1156	A G U	Thr	19
C U C	Glu	190	G G U	Thr	555
U U A	Asn	0	U G C	Ala	1293
G U U	Asn	989	C G C	Ala	206
U U G	Gln	786	G G C	Ala	498
C U G	Gln	239	U G A	Ser	681
U C U	Arg	573	C G A	Ser	320
U C G	Arg	124	A G C	Ser	0
C C U	Arg	430	A G A	Ser	1
C C G	Arg	439	A G G	Ser	0
A C G	Arg	845	G C U	Ser	563
G C G	Arg	64	G G A	Ser	544
U C C	Gly	706	C U A	Sup	1
C C C	Gly	304	U G G	Pro	700
G C C	Gly	1079	C G G	Pro	289
U C A	SeC	88	G G G	Pro	374
U A U	Ile	12	C C A	Trp	538
G A U	Ile	1148	A U A	Tyr	0
U A C	Val	1008	A U G	Tyr	0
G A C	Val	524	G U A	Tyr	732
C A C	Val	228	A U C	Asp	1
U A A	Leu	624	G U C	Asp	1077
U A G	Leu	663	G U G	His	595
A A U	Leu	0	A A A	Phe	0
A A C	Leu	2	G A A	Phe	746
A A G	Leu	58	A C A	Cys	0
G A G	Leu	495	G C A	Cys	595
C A A	Leu	501	A U U	stop	0
C A G	Leu	544	A C U	stop	0
C A U	Met	2156	A C C	stop	0

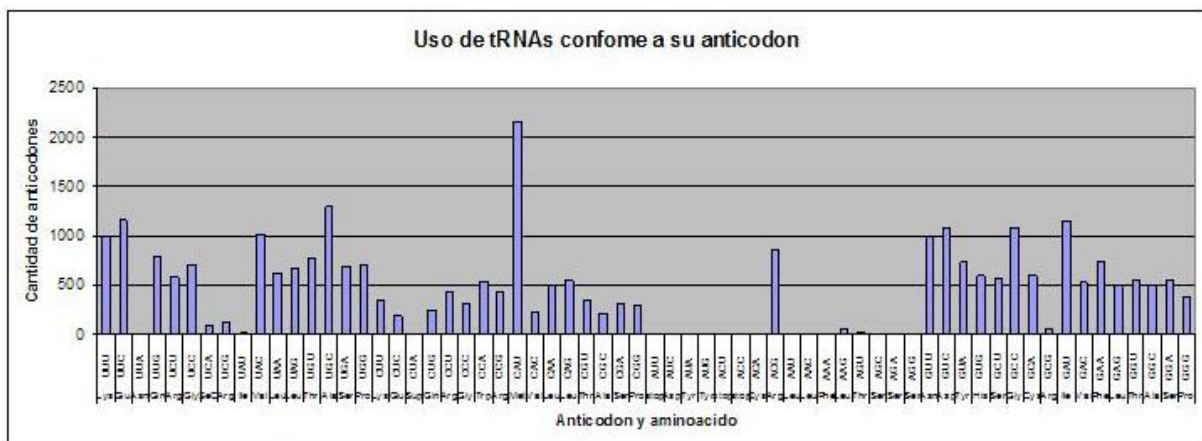


Figura 2. Uso de tRNAs en base a su anticodon, donde se observa la cantidad de tRNAs por cada anticodon en genomas bacterianos.

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede observar una preferencia de uso de algunos anticodones como el correspondiente a Metionina CAU el cual corresponde a un codon de inicio, siendo este el que tiene más secuencias. De los anticodones que presentan un uso

frecuente corresponden para los aminoácidos: Ácido glutámico, Valina, Alanina, Asparagina, Glicina e Isoleucina, Mientras que lo anticodones UCU, CCU, CCA, CCG, CAA, CAG, GCU, GCA, GAC, GGC, GGU, GGA Y GGG, tiene un numero de secuencias similar al numero de genomas analizados suponiendo aproximadamente una secuencia en cada en cada genoma. Mientras que los anticodones UCA, CCG, UAU, AAG, AGU, GCG tiene un uso bajo dentro de los tRNAs analizados. Los anticodones UUA, CUA, AUC, AUA, AUG, ACA, AAU, AAC, AAA, AGC, AGA, AGG tienen un uso nulo dentro de estos genomas, siendo estos para transporte de aminoácidos de uso frecuente de los demás anticodones. Mientras que los anticodones AUU, ACU y ACC son anticodones de paro de síntesis proteica. Quedando pendiente el análisis de relación de anticodones con CCA 3' terminal codificado, la distribución por tRNA de cada aminoácido y la distribución en cada genoma para un futuro análisis.

BIBLIOGRAFÍA

Bailly, M., Giannouli, S., Blaise, S., Stathopoulos, C., Kern, D. y Becker, H. D., “A single tRNA base pair mediates bacterial tRNA-dependent biosynthesis of asparagines” Nucleic Acids Research., Vol. 34, No. 21 6083–6094, **2006**.

Clark, B. F. “The crystal structure of tRNA”, J. Biosci., 31(4), 453–457, **2006**.

Dieter, S. y Uttam, L. R. , “tRNA Structure, biosíntesis, and Function”, ASM Press, Washington, D. C. **1995**.

Hall, T.A. “BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.” Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98, **1999**.

Lowe, T. M. y Eddy, S. R., “tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence”, Nucleic Acids Research, Vol. 25, No. 5 955–964, **1997**.

Lewin, B. “Genes 6^oed” Oxford University Press, EUA, **1997**.

McClain, W. H., “Surprising contribution to aminoacylation and translation of non-Watson–Crick pairs in tRNA”, PNAS, March 21, vol. 103, no. 12, 4571, **2006**.

Rice, P., Longden, I., Bleasby, “EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite.”, Trends Genet., 16, 276–277, **1999**.

Saks, M. E. y Conery, J. S., “Anticodon-dependent conservation of bacterial tRNA gene sequences”, RNA 13: 651-660. **2007**.