

UNIVERSIDAD



NOTA:

EL LECTOR SE OBLIGA A DEVOLVER ESTE LIBRO
COMO LIMITE EN LA FECHA INDICADA
EL ULTIMO SELLO.

U.N.A.M. CAMPUS
IZTACALA



U.N.A.M. CAMPUS
IZTACALA



U.N.A.M. CAMPUS
IZTACALA

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA

CARACTERIZACION DE CEPAS MUTANTES DE *Escherichia coli* QUE
AFECTAN LA EXPRESION DEL GEN *galk* DEPENDIENTE DEL
TERMINADOR *tI*.

TESIS PROFESIONAL

Que como un requisito para obtener
el título de Biólogo, presenta:

HAYDEE ROSAS VARGAS

México, D.F.

Febrero de 1994



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.

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Genética y

Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios

Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de

la Dra. Cecilia Montañez Ojeda y el Dr. Bulmaro Cisneros Vega.

INDICE

	Pag.
Indice de Figuras	IV
Indice de Tablas	V
Introducción	1
Objetivo	18
Materiales y Métodos	19
Resultados	29
CARACTERIZACION DE LAS CEPAS SGM Y S165	
- Resistencia a antibióticos	29
- Utilización de galactosa	32
- Morfología colonial	32
- Actividad de polimerización de la polinucleótido fosforilasa	35
OBTENCION DE REVERTANTES SGM CON EL FENOTIPO <u>sib1</u>.	
- Obtención de una cepa <u>pnp</u> ⁺ ::Tn10	39
- Transducción generalizada con las mutantes SGM	43
- Actividad enzimática de galactocinasa en revertantes SGM con el fenotipo <u>sib1</u>	45
Discusión	47
Conclusiones	51
Resumen	52
Bibliografía	53

IV

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
FIG.1. Tipos de terminadores transcripcionales	5
FIG.2. Mecanismos de degradación de RNA	9
FIG.3. Regulación de la expresión del gen <u>int</u>	12
FIG.4. Estructura de tI y <u>sib</u>	14
FIG.5. Modelo de procesamiento y degradación	15
FIG.6. Localización de las mutaciones <u>sib</u>	16
FIG.7. Plásmidos pKG1800, pMS1 y pUS6	30
FIG.8. Ruta enzimática del metabolismo de la galactosa	34
FIG.9. Actividad de polimerización de ADP <u>in situ</u> por la PNPasa	38
FIG.10. Actividad de polimerización de candidatos C600 transductantes de <u>pnp</u> ⁺	40
FIG.11. Selección de bacterias N99 transductantes de <u>pnp</u> ⁻	42
FIG.12. Selección de bacterias SGM71 transductantes de <u>pnp</u> ⁻	44

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Lista de Cepas Bacterianas	20
Tabla 2. Sensibilidad a antibióticos de las mutantes SGM	31
Tabla 3. Utilización de galactosa por las cepas SGM y S165	33
Tabla 4. Caracterización morfológica de las cepas SGM	36
Tabla 5. Expresión relativa de la actividad de galactocinasa	46

INTRODUCCION

El DNA es la molécula universal que constituye la base de la vida bajo todas sus manifestaciones. Para un desarrollo armónico de las funciones celulares y por ende de los organismos, es esencial una adecuada regulación de la expresión de los genes contenidos en esta molécula. En el caso de los organismos procariontes, la regulación de la expresión genética ocurre en gran parte durante el desarrollo de la transcripción.

Transcripción

La transcripción es el proceso en el que ocurre la síntesis de RNA a partir de la información contenida en una cadena molde de DNA (Lewin, 1990). Esta síntesis se lleva a cabo por acción de la enzima RNA polimerasa (RNAPol), que en el caso de *Escherichia coli* está compuesta por cinco subunidades: dos alfa, beta, beta prima y sigma con pesos moleculares de 70, 151, 155 y 36.5 kilodaltones(kDa), respectivamente (Watson et al., 1987). Cuando se encuentran ensambladas las cinco subunidades se le conoce a la molécula con el nombre de holoenzima, y juega un papel importante en la fase de iniciación de la transcripción (Hippel et al., 1984). Al separarse la subunidad sigma, permanecen unidos el resto de los polipéptidos formando el "core" o núcleo enzimático que es la parte que presenta la función catalítica.

El proceso de transcripción se ha dividido para su estudio en tres etapas fundamentales: iniciación, alargamiento y terminación.

Iniciación

La fase de iniciación se caracteriza por el reconocimiento específico de una secuencia promotora en el DNA que depende de la subunidad sigma. En este punto, la holoenzima se une al DNA sufriendo un cambio conformacional que tiene como consecuencia el rompimiento de las interacciones por puentes de hidrógeno de 13 pares de bases (Gill et al., 1990). Logrado este acoplamiento sucede la llamada "iniciación abortiva", durante la cual se sintetizan repetidamente fragmentos de RNA de 2-9 nucleótidos, mismos que se liberan antes de volver a iniciarse la síntesis sin haber desplazamiento alguno de la polimerasa. Una vez que sigma se separa del "core" se inicia la fase de alargamiento; la enzima se mueve a lo largo del molde y la cadena de RNA se extiende más allá de 10 bases (Hansen y McClure, 1980).

Alargamiento

Durante el alargamiento, la RNAPol se mueve a lo largo del DNA sintetizando transcritos de RNA complementarios a la cadena molde. Los ribonucleótidos se unen progresivamente a la cadena naciente de RNA por el extremo 3' mediante la formación de enlaces fosfodiéster. El tamaño de la burbuja de transcripción formada por la fracción de la doble cadena de DNA, separada al paso de la polimerasa, se mantiene constante en aproximadamente 17 pares de bases (pb). El híbrido de RNA-DNA tiene un tamaño constante de 12+ 1pb (Yager y von Hippel, 1991).

Sin embargo, se tienen evidencias de que el complejo intermedio de transcripción sufre modificaciones bioquímicas y conformacionales de acuerdo con la unidad transcripcional de que se trate y la posición en la que se encuentre a lo largo de ésta (Krummel y Chamberlin, 1992 a

y b).

Terminación

Por último, en la etapa de terminación, cesa por completo la incorporación de ribonucleótidos a la cadena de RNA en síntesis y el complejo ternario de transcripción (DNA, RNAPol, mRNA) se escinde en cada uno de sus componentes (Hippel et al., 1984). Para que se lleve a cabo la terminación, es necesario que la RNA polimerasa alcance una secuencia específica en la cadena molde de DNA que recibe el nombre genérico de terminador.

Tipos de terminadores

Los terminadores estudiados a la fecha se encuentran divididos en dos grandes grupos de acuerdo a su estructura y función: terminadores tipo I y terminadores tipo II (Friedman e Imperiale, 1987).

Los terminadores tipo I se caracterizan por su capacidad para dirigir la terminación de la transcripción en ausencia de cualquier otro factor proteico además de la RNAPol, mientras que los terminadores tipo II requieren de factores adicionales para ser funcionales.

Terminadores tipo I

Esta clase de terminadores se caracterizan por presentar una región de simetría invertida rica en G-C seguida por 4-8 residuos de timina (Brendel, 1986; Jeng et al., 1992). El RNA toma una estructura secundaria característica en forma de horquilla seguida por una secuencia de alrededor de 6 residuos de uridina (Lewin, 1990). Estos terminadores se encuentran flanqueados

por las secuencias consenso CGGG(C/G) precediéndoles y TCTG después del sitio de terminación (Friedman e Imperiale, 1987).

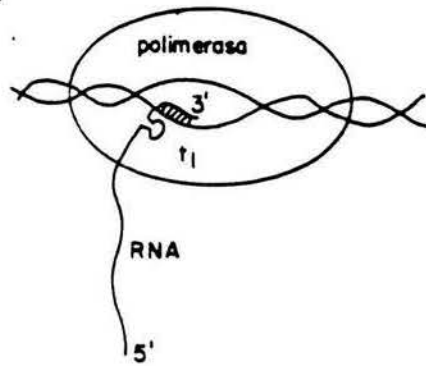
El modelo más aceptado para el funcionamiento de estos terminadores , propone que la estructura de horquilla promueve una pausa en el movimiento de la RNAPol (Fig.1), y que los residuos de uridina contienen la señal para que la RNAPol se disocie del molde debido a que las uniones existentes en el híbrido dA-rU son débiles, (Adhya y Gottesman, 1978; Hippel et al., 1984; Yager y von Hippel, 1991).

A pesar de que estos terminadores no requieren de factores adicionales para su funcionamiento *in vitro*, se ha comprobado su estimulación tanto *in vivo* como *in vitro* por algunos factores proteicos (Briat y Chamberlin, 1984; Briat et al., 1987; Bermudez,1991).

Terminadores tipo II

Los terminadores tipo II requieren de factores proteicos para una adecuada terminación (Platt, 1986), mismos que varían de acuerdo con el terminador. Estos terminadores no presentan una estructura primaria o secundaria característica (Adhya y Gottesman, 1978; Rosenberg y Court, 1979), sin embargo guardan ciertas homologías como: a) la presencia de sitios rut (Lau y Roberts, 1985), que son regiones que preceden al sitio terminador con bajo contenido en G-C e incapaces de formar estructuras secundarias, y b) la presencia de secuencias consenso como la caja (CA) ATAA y una secuencia rica en A-T en el extremo 3' (Friedman e Imperiale, 1987).

TERMINADORES TIPO I



TERMINADORES TIPO II

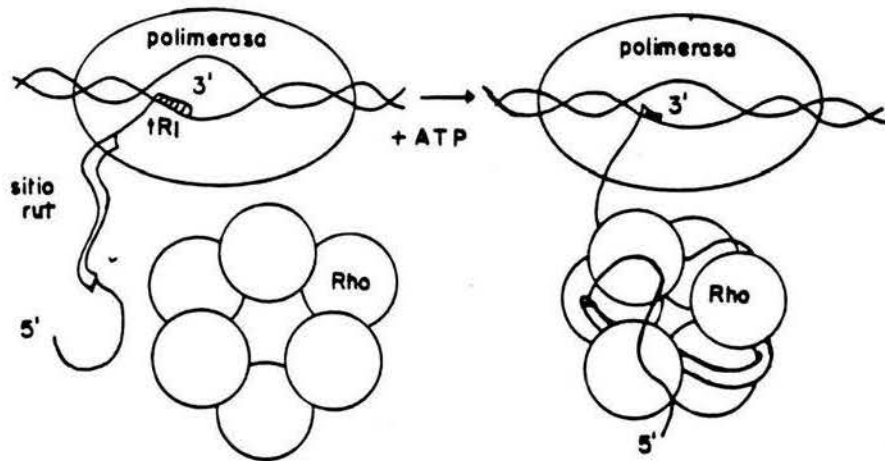


Figura 1. Tipos de terminadores transcripcionales. a) Los terminadores tipo I muestran una estructura secundaria típica de tallo y burbuja que promueve la terminación de la transcripción. b) Los terminadores tipo II no presentan una estructura primaria o secundaria característica y son dependientes de factores proteicos tales como los factores Nus y Rho.

Factores de Terminación de la Transcripción

Factores Nus

Los factores NusA, NusB, NusD, NusE y NusG han sido descritos como elementos funcionales en los fenómenos de terminación y antiterminación de la transcripción (Das y Wolska, 1984; Das, 1992). La participación directa de los factores NusA y NusB en la terminación de la transcripción se ha demostrado por medio del aislamiento y caracterización de mutaciones en estos productos (Ward y Gottesman, 1981).

El factor NusA de *E. coli* ha sido identificado como una proteína de 69kDa cuyas características fisicoquímicas corresponden ampliamente con aquellas observadas para la subunidad σ de la RNA polimerasa, sin embargo no existe homología entre sus secuencias. Mediante análisis moleculares se probó que NusA es la misma proteína que el factor L (Greenblatt et al., 1980) requerido para la síntesis de β -galactosidasa.

NusA se une al "core" de la RNAPol una vez que sigma se ha liberado del complejo durante la fase de alargamiento (Greenblatt y Li, 1981), sin embargo ambos eventos no están sincronizados, por lo que se llegó a la conclusión de que la incorporación de NusA no se debe directamente a un reemplazamiento de la subunidad sigma.

Este factor incrementa la eficiencia de terminación *in vitro* en el terminador tR2 de lambda (Greenblatt et al., 1981), en la región líder del operón *rrnB* (Kingston y Chamberlin, 1981), en el atenuador de *trp* (Kuroki et al., 1982) y el atenuador de la región líder del operón S10 de *E. coli* (Zengel y Lindhal, 1992).

La proteína NusB de *E. coli* tiene un peso aproximado de 14kDa (Das y Wolska, 1984). Este factor incrementa la eficiencia de terminación de la transcripción en el operón de *trp* de

acuerdo a estudios realizados *in vitro* (Ward y Gottesman, 1981; Kuroki et al., 1982).

A la fecha se desconoce el mecanismo preciso por el cual NusB modula la terminación. Existen evidencias tanto de que NusA y NusB interaccionan entre sí en la antiterminación (Ward et al., 1983) como de la interacción entre la proteína antiterminadora N del fago lambda y NusB (Friedman et al., 1981), sin embargo esto no se ha demostrado *in vitro*.

Factor Rho

El factor rho es una proteína de *E. coli* cuyo gen se localiza en el minuto 83 del cromosoma bacteriano (Bachmann, 1990). Esta proteína es considerada una ATPasa ya que hidroliza ATP preferencialmente sobre otros NTPs (Richardson y Conaway, 1980). Debido a su actividad de ATPasa, el factor Rho puede ejercer su función como catalizador de la terminación de la transcripción desenrollando un segmento de RNA-DNA. Se sabe que para su activación es esencial la interacción de rho con una secuencia particular del RNA naciente situada en la región 5' del mRNA (Fig.1) rica en residuos de citosina (Lau y Roberts, 1985; Zalatan y Platt, 1992).

Rho contiene dos sitios de unión a RNA: a y b, que funcionan en sucesión (Richardson y Caney, 1982), pero es únicamente por medio de la unión del sitio b a las secuencias **rut** (Chen, et al., 1986), localizadas en el extremo 5' del mRNA, como se puede activar la hidrólisis de ATP, proceso necesario para poder concretar su actividad como helicasa 5'-3' (Brennan, et al., 1987) en dirección 5'→3' a lo largo de la cadena de mRNA.

Factor Tau

Este factor incrementa la eficiencia de terminación *in vitro* de los terminadores tempranos

de los fagos T7 (T7Te) y T3 (T3Te) (Briat y Chamberlin, 1984; Briat et al., 1987), modificando en ambos casos los sitios de terminación, lo que se refleja en las secuencias terminales 3'OH de los mRNA comparables a las obtenidas *in vivo* y que difieren en caso de ausencia de Tau.

Despolimerización

A pesar de que la síntesis de mRNA se regula tanto positiva como negativamente, la cantidad de mRNA que es finalmente traducido a proteína depende también de otros mecanismos. El mRNA está sujeto a procesamiento postranscripcional antes de ser traducido. Uno de estos eventos de procesamiento es la despolimerización, que consiste en la degradación del RNA mediante la acción específica de ribonucleasas.

La vida media de un mRNA está determinada por su susceptibilidad a ser degradado por enzimas endonucleolíticas, lo cual finalmente está definido por la estructura secundaria de sus extremos 5' y 3' (Fig.2) (Belasco y Higgins, 1988). El extremo 3' de una molécula de RNA se define por la terminación de la transcripción o la digestión endonucleolítica. La actividad de exonucleasas 3' determina la rapidez de degradación del RNA.

En *E. coli* se han identificado dos exonucleasas y tres endonucleasas involucradas en la degradación del mRNA (Belasco y Higgins, 1988; Régnier y Grunberg-Manago, 1990). Las exonucleasas; RNasaII y polinucleótido fosforilasa (PNPasa), actúan sobre el extremo 3' de mRNAs a los cuales degradan progresivamente en mononucleótidos. *In vivo*, las dos enzimas pueden complementarse (Donovan y Kushner, 1986), sin embargo existe cierta especificidad de

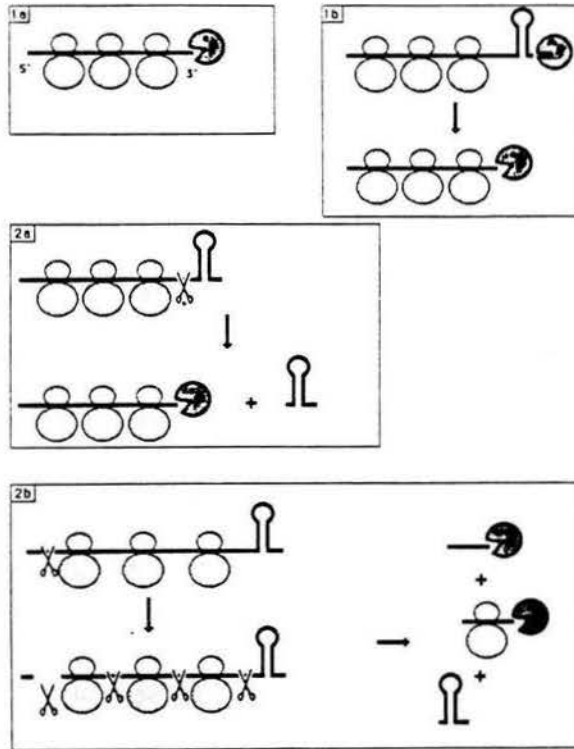


Figura 2. Mecanismos de degradación de RNA. En las figuras se muestra el proceso de degradación mediado por exonucleasas 3'. En ausencia de una estructura secundaria 3'terminal, la degradación exonucleolítica es rápida (1a); en caso de existir una estructura de tallo y burbuja que proteja el extremo 3' terminal, el RNA mensajero se torna más estable (1b). Las figuras 2 muestran el tipo de degradación mediada por endonucleasas. Una endonucleasa puede actuar cortando en el sitio inmediato anterior al extremo 3'terminal con estructura de horquilla (2a), permitiendo la posterior degradación del transcrito por exonucleasas. Alternativamente, el corte por endonucleasas puede darse a lo largo del segmento 5' de la molécula de RNA (2b), propiciando la intervención por parte de exonucleasas 3' que digieren los oligonucleótidos generados.

substratos para cada una de ellas (Guarneros y Portier, 1990).

La Ribonucleasa II es una proteína de peso molecular aproximado de 70-90kDa y cataliza la degradación de todo tipo de moléculas de RNA (Deutscher, 1990).

La PNPasa puede ser aislada de *E. coli* en dos formas activas (Littauer y Soreq, 1982): La forma A, un homotrímero de subunidades α de 86kDa; o la B, un complejo de aproximadamente 360kDa compuesto de tres subunidades α mas dos subunidades β de 48kDa cuya función se desconoce. Toda la actividad catalítica de la PNPasa reside en las subunidades α . Esta enzima degrada únicamente moléculas de mRNA con un extremo 3'-OH libre. Curiosamente, esta enzima también puede polimerizar *in vitro* en presencia de ribonucleósidos difosfato sin requerir de un molde (Sulewski et al., 1989). Hasta la fecha no se ha identificado alguna exonucleasa capaz de actuar por el extremo 5' del RNA.

Las tres endonucleasas involucradas en el metabolismo del mRNA son la RNasaIII, la RNasaE y la RNasaK. La RNasaIII es un homodímero de subunidades α de 25kDa (Watson y Apirión, 1985). Al parecer esta enzima es específica para RNA de doble cadena (Robertson et al., 1967). Todos los RNAs procesados por RNasaIII pueden formar potencialmente estructuras secundarias que son cortadas en una o ambas hebras de la hélice (Robertson, 1982). La delección del gen que codifica para esta enzima afecta el procesamiento de mRNAs y rRNAs sin que se pierda la viabilidad de la célula (Babitske et al., 1993).

La Ribonucleasa E es una enzima de aproximadamente 70kDa. Esta enzima corta específicamente en una secuencia consenso anterior a una estructura de horquilla (Tomcsanyi y Apirión, 1985). En una cepa deficiente en RNasaE, PNPasa y RNasaII, la vida media del mRNA total se incrementa tres veces y se observa una fuerte estabilización en mRNA intermedios en el

proceso de decaimiento (Arraiano et al., 1988).

La RNasa K tiene un peso aproximado de 55-60kDa y presenta la capacidad de degradar mRNA por la región 5', cortando preferentemente en secuencias ricas en AU (Lundberg et al., 1990).

El Terminador tI del Bacteriófago Lambda.

Dentro de los sistemas modelo que se han utilizado para el estudio del proceso de terminación, el bacteriófago lambda se encuentra entre los más importantes.

Siendo este un fago temperado es importante la regulación genética requerida para el establecimiento de los ciclos lítico o lisogénico, respectivamente. En ambos procesos, el control de la expresión del gen *int* es un aspecto clave. La integrasa (Int), producto de *int*, es la enzima que cataliza, junto con el factor de integración del hospedero (IHF), la integración del genoma del fago lambda al cromosoma bacteriano durante la lisogenia (Guarneros, 1988).

El terminador tI de lambda regula la expresión de la integrasa (Fig.3). Se localiza aproximadamente a -192 o -193pb del sitio *att* dentro de la región *sib*, que a su vez se sitúa 260pb después de *int*. tI retroregula positivamente la expresión de *int* cuando su síntesis se inicia a partir del promotor pI (Guarneros et al., 1982). Alternativamente, la transcripción de *int* puede iniciarse a partir del promotor pL, en cuyo caso y por efecto de la proteína antiterminadora N, en conjunción con otros factores de antiterminación (Das, 1992), la síntesis del mRNA se prolonga más allá de tI (Schmeissner et al., 1984) permitiendo la transcripción completa de *sib*.

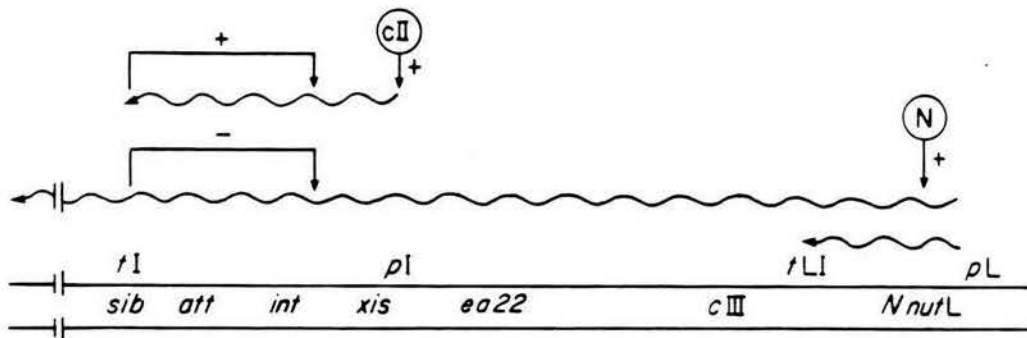


Figura 3. Regulación de la expresión del gen *int*. La proteína cII activa la transcripción a partir del promotor tI. Alternativamente, cuando la transcripción tiene inicio desde el promotor pL termina en el sitio tL1, sin embargo, cuando la proteína N está presente, ésta actúa promoviendo la antiterminación. El transcrito antiterminado contiene la región *sib*, con una estructura secundaria de tallo y burbuja que es el substrato óptimo para la enzima RNasa III.

La secuencia nucleotídica que constituye la región *sib* (Fig.4) incluye una estructura secundaria de tallo y burbuja, sustrato para la enzima de procesamiento endonucleolítico RNasaIII (Régnier y Grunberg-Manago, 1990). La acción de la RNasa III provoca una disminución en los niveles de Int, por lo que se dice que *sib* ejerce sobre *int* una retroregulación negativa (Guarneros et al., 1982).

El corte por RNasaIII en *sib* permite la degradación exonucleolítica procesiva en dirección 3'→ 5' de la molécula de mRNA hasta alcanzar una región de estructura secundaria dentro de la secuencia que codifica para Int (Plunkett y Echols, 1989), la cual protege de posterior degradación a la región subsecuente del transcrito.

A pesar de que no ha sido identificada la actividad de exonucleasa que degrada el mensajero de *int*, hay evidencias que involucran la actividad fosforolítica de PNPasa en esta degradación exonucleolítica (Guarneros, 1988; García-Mena, 1992).

La estructura de tallo y burbuja del terminador tI situada en el extremo 3' del transcrito pI-int, hace a este mRNA resistente al corte por RNasaIII y posterior degradación exonucleolítica (Fig.5). La estabilización del mensajero permite una producción eficiente de Int.

La eficiencia de terminación *in vivo* de tI es del 94%, mientras que en ausencia del factor Rho disminuye hasta el 70% (Oppenheim y Gottesman, 1982). Debido a ello se ha clasificado a tI como un terminador tipo I. Aún bajo estos términos, en experimentos realizados *in vitro* se demostró un incremento significativo en la eficiencia de terminación de tI de 30% en presencia de la proteína NusA (Bermudez, 1991).

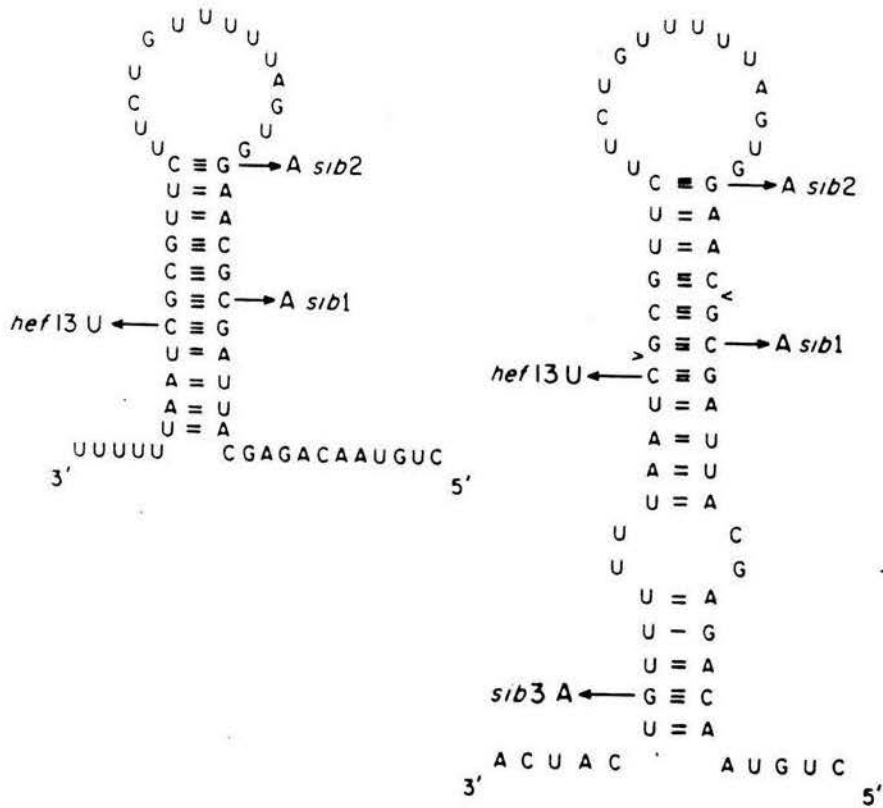


Figura 4. Estructura de *tI* y *sib*. a) Esta figura representa la estructura secundaria del terminador *tI* de lambda que se forma cuando la transcripción inicia en el promotor pI. b) Estructura secundaria de la región *sib*, que incluye dentro de ella misma a la secuencia de *tI*. Las puntas de flecha indican los sitios de corte por RNasa III.

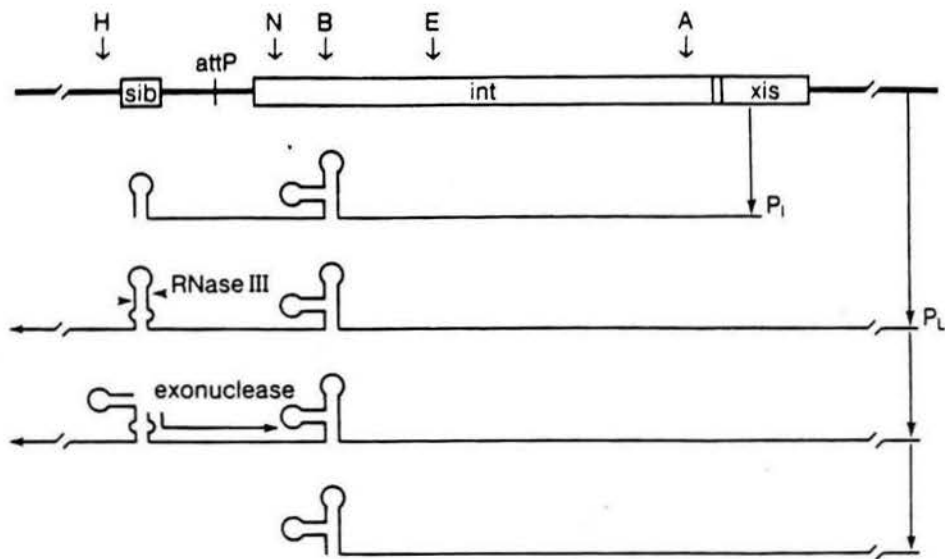


Figura 5. Modelo de procesamiento y degradación del gen *int*. El transcrito sintetizado a partir de p_I termina en tI. El transcrito de p_L pasa a través de tI hasta *sib*, que es sustrato para la RNasa III, lo cual genera un extremo 3' libre a partir del cual se inicia la degradación del transcrito en dirección 3'→5' por una exonucleasa hasta llegar a un sitio dentro de *int* que le protege de posterior degradación.

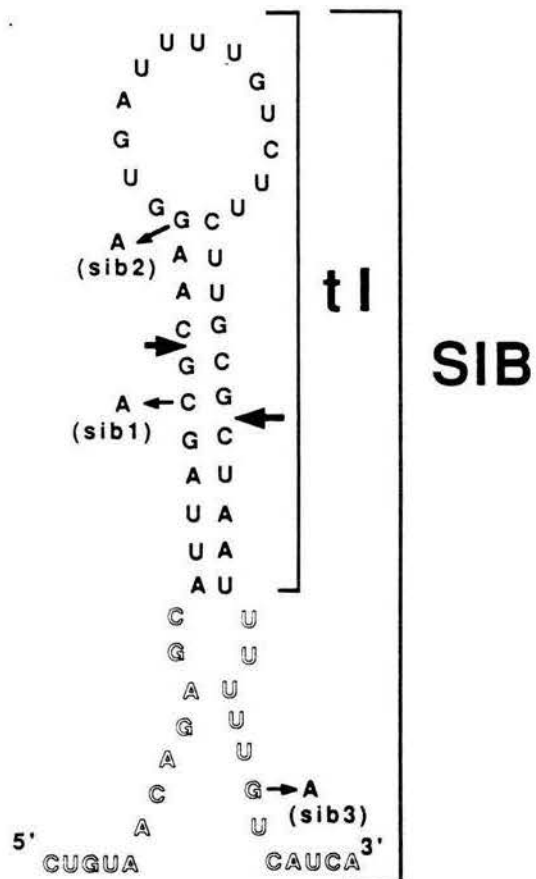


Figura 6. Localización de las mutaciones sib. En la figura se muestra la localización de las mutaciones sib dentro de la estructura potencial del mRNA de *sib*. Las flechas grandes indican los sitios de corte por RNasa III.

Como parte de los estudios que se han realizado en torno al fenómeno de retroregulación que involucra a la región *sib* y τI de lambda, se obtuvieron mutaciones puntuales en *sib* (Fig.6) (Montañez,1982; Montañez et al., 1986), de las cuales específicamente la mutación *sib1* afecta la retroregulación y disminuye la eficiencia de terminación de la transcripción a 95% (Montañez et al., 1986) mientras que *sib*⁺ permite que la terminación se de con una eficiencia de 99%.

Posteriormente, con el objeto de identificar factores proteicos que participen en la terminación de la transcripción, se aisló un grupo de mutantes derivadas de la cepa S165 que contiene una delección de los genes estructurales *galK*, *galT* y *galE*, y que por lo tanto es incapaz de metabolizar galactosa. Esta cepa fue sometida a mutagénesis por nitrosoguanidina y, mediante la introducción del plásmido pMS1 que contiene el reportador *galK* y la mutación *sib1* dentro del terminador τI , se seleccionaron una serie de candidatos que muestran una expresión más baja de *galK* (cepas SGM) que la observada para una cepa control S165 *sib1*, parámetro observable por un evidente decremento del efecto bacteriostático causado por la expresión de galactocinasa en ausencia de epimerasa y transferasa activas, lo que provoca un acumulamiento de galactosa-1-fosfato. Se estudió la expresión de mRNA de galactocinasa de 27 candidatos mediante la técnica de Northern-blot y los resultados mostraron una reducción en el mensaje de *galK* para las mutantes SGM9, SGM12, SGM66, SGM71 y SGM98, sin embargo, esto se ve acentuado para la cepa SGM71. Al caracterizar esta cepa se detectó que contiene una mutación (mutación *pnp71*) que afecta a la subunidad alfa de la polinucleótido fosforilasa. El resto de las mutantes SGM no se caracterizó en su totalidad, sin embargo el patrón de disminución de la expresión del mRNA de *galK* podría deberse a una alteración semejante a la detectada en la cepa SGM 71, siendo la comprobación de esta hipótesis el objetivo principal de este trabajo.

OBJETIVO

Caracterizar las cepas mutantes SGM9, SGM12, SGM66 y SGM98 de *Escherichia coli*, y determinar si las mutaciones que presentan y que provocan un decremento en la expresión de galk se localizan cerca de o en el gen pnp.

Materiales y Métodos

a) **Cepas bacterianas y bacteriófagos:** Se enlistan en la tabla 1.

b) **Medios de cultivo y soluciones:** i) **Medios de cultivo**

Para la realización de este trabajo se utilizaron los medios descritos a continuación: Medio Luria; por cada 950 ml de agua desionizada añadir 10g de triptona, 5g extracto de levadura, y 10g NaCl, agitar hasta que los solutos se hayan disuelto, ajustar el pH a 7 con NaOH y llevar el volumen a 1000ml con agua desionizada; esterilizar por autoclave durante 20min a 15lb/pulg². Para medio sólido, agregar 15g de agar. Mac Conkey Galactosa (MacC); añadir por litro: 40g base de agar de MacConkey, 960ml agua bidestilada; después de esterilizar por autoclave, agregar 10ml de galactosa al 20% y la mezcla de antibióticos requerida. Medio T ϕ ; añadir por litro: 10g triptona, 2.5g NaCl, 2ml NaOH al 2%, 10g agar. Medio T ϕ suave; añadir por litro: 10g triptona, 2.5g NaCl, 2ml NaOH 2%, 6g agar. Medio R; añadir por litro: 10g triptona, 1g extracto de levadura, 8g NaCl, 12g agar, después de esterilizar por autoclave, añadir 2ml de CaCl₂ 1M y 5ml de glucosa al 20%. Medio R suave; por litro añadir: 8g triptona, 1g extracto de levadura, 8g NaCl; después de esterilizar, agregar: 2ml CaCl₂ 1M y 5ml de glucosa 20% previamente esterilizadas por filtración. Medio triptona-galactosa; se disuelven 10g de triptona y 10g de NaCl, en 950ml de agua bidestilada, se ajusta el pH a 7.5 con NaOH y se afora a un litro con agua bidestilada. Para medio sólido, se agregaron 15g de agar. Se le adiciona galactosa a una concentración final de 8%.

TABLA 1

Lista de Cepas Bacterianas y Bacteriófagos

Cepa	Genotipo relevante	Origen
Bacterias		
SGM9 pMS1	S165 mutante	García-Mena, 1992
SGM12 pMS1	S165 mutante	García-Mena, 1992
SGM66 pMS1	S165 mutante	García-Mena, 1992
SGM71 pMS1	S165 mutante	García-Mena, 1992
SGM98 pMS1	S165 mutante	García-Mena, 1992
S165	<u>lac</u> ⁻ , <u>his</u> ⁻ , <u>gal165</u> (KTE), <u>str</u> ^r	Shapiro y Adhya, 1969
S165 pMS1	<u>lac</u> ⁻ , <u>his</u> ⁻ , <u>gal165</u> (KTE), <u>str</u> ^r , <u>amp</u> ^r	García-Mena, 1992
S165 pKG1800	<u>lac</u> ⁻ , <u>his</u> ⁻ , <u>gal165</u> (KTE), <u>str</u> ^r , <u>amp</u> ^r	García-Mena, 1992
S165 pUS6	<u>lac</u> ⁻ , <u>his</u> ⁻ , <u>gal165</u> (KTE), <u>str</u> ^r , <u>amp</u> ^r	García-Mena, 1992
SA1943 pKG1800	<u>galkam</u> , <u>amp</u> ^r	Guarneros et al., 1982
SA1943 pMS1	<u>galkam</u> , <u>amp</u> ^r , <u>sib1</u>	Montañez et al., 1986
SA1943 pUS6	<u>galkam</u> , <u>amp</u> ^r , <u>tl</u> ⁺	Guarneros et al., 1982
C600	<u>lac</u> ⁻	Appleyard, 1954
C600	<u>pnp</u> ⁺ ::Tn10	Este trabajo
YN2458	<u>nusAts11</u> ::Tn10	Nakamura et al., 1986

TABLA 1 (continuación)

Cepa	Genotipo relevante	Origen
N99	<u>sup</u> ⁰ , <u>strA</u> , <u>galk2</u>	Colección NIH
N99	<u>pnp</u> ::Tn5	Colección CINVESTAV
N7004	<u>nusA1</u> ::Tn10	Colección CINVESTAV
K95	N99 <u>nusA1</u>	Colección NIH
Bacteriófagos		
P1 <u>vir</u>		Colección CINVESTAV
λcI857		Sussman y Jacob, 1962
λpunA1 cI857		Friedman et al., 1983

ii) Soluciones**- Solución reguladora SM**

Para efectuar diluciones de los fagos y las bacterias, pesar por litro: 5.8g NaCl, 2g MgSO₄ 7H₂O y añadir 50ml Tris-Cl (pH 7.5) 1M y 5ml gelatina 20%.

- Soluciones de antibióticos

A excepción de la tetraciclina que se disuelve en una mezcla 1:1 de agua bidestilada y etanol absoluto, el diluyente de las soluciones es agua. Las concentraciones tanto de las soluciones patrón como las de trabajo son: ampicilina, 5mg/ml y 100µg/ml; tetraciclina, 12.5mg/ml y 15µg/ml; estreptomina, 12.5mg/ml y 25µg/ml.

- Soluciones para ensayo de galactocinasa

Mezcla 1 (M-1): 16mM NaF, 5mM DTT

Mezcla 2 (M-2): 3.2mMATP, 8.0mM MgCl₂, 200.0mM Tris-HCl pH8

Mezcla 3 (M-3): 100mM EDTA, 50mM Tris-HCl pH8, 100mM DTT Blanco: 40µl M-3,

1ml Triptona

Galactosa C¹⁴ (40-60 mM/mCi): 50µl galactosa, C¹⁴950µl galactosa

20mM

d) Métodos

-Prueba de sensibilidad a antibióticos

En tubos de cultivo con 3ml de medio Luria con el/los antibiótico(s) deseado(s), se inocula una colonia de cultivo fresco de las cepas que se desea analizar. Los tubos se incuban durante toda la noche a 37°C en agitación y se evalúa el crecimiento bacteriano. Esta misma prueba se realiza en cajas con medio sólido adicionado con antibiótico mediante la siembra por estría de cada cepa. Las cajas se incuban durante toda la noche a 37°C y se evalúa el crecimiento bacteriano.

-Determinación de la morfología colonial en medio Mac Conkey galactosa

Inocular las cepas bacterianas por estría cruzada en placas de agar MacConkey galactosa (0.2%) adicionado con los antibióticos para selección a las concentraciones ya mencionadas. Incubar las placas a 37°C durante 14h o a 42°C durante 10-12 horas, y observar el color de las colonias. Las colonias que adquieran una coloración roja serán aquellas capaces de fermentar galactosa, mientras que la coloración blanca de las colonias indica que se ha utilizado una fuente de carbono distinta a la galactosa. Bajo este razonamiento, se espera que coloraciones intermedias (rosa) correspondan de forma directamente proporcional al grado de fermentación de galactosa.

- Ensayo morfológico en medio Triptona-galactosa.

Una colonia recién aislada de la cepa a probar se siembra en 5ml de medio Luria líquido con el antibiotico correspondiente y se crece en agitación durante toda la noche a 37°C. Se toma una alícuota de 30µl del cultivo de toda la noche y se inocula en 3ml de Luria con antibiótico, incubándose en agitación a 37°C hasta alcanzar una D.O._{600nm} de 0.25-0.35. Se coloca el cultivo en hielo agua y se hacen diluciones decimales hasta 10⁻⁶ en medio SM. De la última dilución se

espatulan 100µl sobre medio Triptona-galactosa con antibiótico . Las cajas se incuban a 42°C durante 17h.

-Ensayo de polimerización *in situ*

Se toma 1ml de cultivo de toda la noche en medio Luria con antibiótico y se centrifuga por 5min a 12krpm, se seca cuidadosamente la pastilla y se resuspende en 200µl de Buffer I (100mM Tris.Cl pH 8.0, 100mM NaCl, 1mM -mercaptoetanol, 0.1mM EDTA y 5% glicerol), después de 15seg de sonicación, los restos celulares son removidos con 15min de centrifugación a 12krpm y se transfieren 100ml del extracto a un tubo limpio. 7µl de extracto son sometidos a electroforesis a 100 volts en acrilamida 7.5% hasta que el primer colorante alcance la mitad del gel. Los geles se incuban por al menos 4 horas a 37°C en Buffer II (100mM Tris.Cl pH 8.0, 10mM ADP, 10mM MgCl₂, 0.1mM EDTA). Después de ello se procede a fijar los geles con ácido acético 7%, y la síntesis *in situ* de poli(A) se revela tiñendo con naranja de acridina 30µg/ml en el buffer que se utilice para el corrimiento. Estos dos últimos tratamientos tienen una duración de 15min. Por último se destiñe con el buffer de uso durante 4 horas a 22°C en la oscuridad.

-Detección de mutantes *nusAts11*

Para la caracterización de bacterias *nusAts11* es necesario estriar por duplicado la cepa que se desea probar y un testigo *nusA*⁺ en cajas de Luria-NaCl 0.25% adicionadas con el antibiótico adecuado. Las réplicas se incuban a 32°C y 42°C, respectivamente durante toda la noche, y se procede a evaluar el crecimiento bacteriano. La cepa mutante y el control deben mostrar crecimiento normal a 32°C, mientras que a 42°C, únicamente se desarrolla la cepa silvestre, no así una mutante *nusAts11*.

-Detección por fago de mutantes nusA1

Para la caracterización de bacterias nusA1 se utilizaron los fagos λ cI857 y λ punA1 cI857. Las bacterias que contienen la mutación nusA1 no permiten el desarrollo del fago silvestre en condiciones restrictivas (42°C), no así en el caso de punA1, que se desarrolla normalmente bajo las mismas condiciones. El crecimiento de ambos fagos puede tener lugar si se les incuba a 32°C.

-Obtención de lisados fágicos

A 10ml de medio Luria contenidos en un matraz, añadir una dilución 1:100 de un cultivo de toda la noche de la cepa C600 y 100 μ l de CaCl₂ 1M. Tras incubar esta mezcla con agitación durante 30min, agregar una placa lítica del bacteriófago por propagar. La mezcla se incuba bajo las mismas condiciones durante 4 o 5 horas hasta observar lisis bacteriana. Una vez ocurrida la lisis añadir 6 gotas de cloroformo agitando el matraz con suavidad. Reposar 10min y centrifugar a 10krpm durante 5min. Decantar el sobrenadante en un tubo de ensaye y desechar la pastilla. El lisado de fago se almacena a 4°C.

-Obtención de lisados P1vir

Se prepara una dilución 1:10 un cultivo de toda la noche de la cepa que se desea lisar. El diluyente es medio Luria que debe llevar 0.2% de glucosa y CaCl₂ 5mM. Incubar a 37°C durante 30min con agitación. Posteriormente, añadir 100 μ l de lisado de fago P1vir con un título aproximado de 5×10^8 UFP. Agitar a 37°C de 2 a 3 horas hasta comenzar a observar lisis celular. En este punto añadir 3 gotas de cloroformo y agitar en el vórtex. Centrifugar a 4500g durante 10min y tomar el sobrenadante cuidadosamente. Añadir 3 gotas de cloroformo y conservar a 4°C.

-Titulación de lisados fágicos

Diluir los lisados (1:10, 1:100, 1:1000 veces), tomar 100µl de cada dilución y mezclar con 100µl de un cultivo fresco de *E. coli*C600; permitir la adsorción durante 15min a temperatura ambiente y añadir 2ml de medio T0 suave previamente fundido y verter la mezcla en cajas de medio T0. Incubar las cajas a 37°C durante toda la noche, cuantificar las placas obtenidas y expresar los títulos como unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/ml). Para el caso de los lisados P1_{vir}, emplear medio R (suave y en placa).

-Transducción generalizada con P1_{vir}

Cultivar en medio Luria la cepa que se va a transducir a 37°C toda la noche. Centrifugar 5ml de cultivo a 1500g por 10min, resuspender en 2.5 de MgSO₄ 10mM que contiene CaCl₂5mM y agitar a 37°C durante 15min.

Se preparan la siguiente serie de tubos:

Tubo	Células (ml)	Lisado de P1 _{vir}
1	0.1	---
2	0.1	10ul
3	0.1	50ul
4	0.1	100ul
5	---	100ul

Se incuban los tubos por 30min a 30°C sin agitación. Adicionar 100µl de citrato de sodio 1M a cada tubo y mezclar. Agregar 1ml de medio Luria y 150µl de citrato de sodio 20mM y sembrar con ese volumen la placa de medio selectivo.

-Purificación de candidatos transductantes

En tubos de cultivo con 1ml de medio líquido adicionado con los antibióticos a los que presente resistencia la cepa receptora y el marcador, se inocula una colonia tomada de las cajas espatuladas de transducción y se incuban a 37°C durante toda la noche. De estos cultivos se toma una alícuota de 10µl que se resiembran en las mismas condiciones. Los candidatos positivos se resiembran una vez más y, finalmente se rescatan en cajas de medio sólido con los mismos antibióticos de selección.

-Determinación de actividad de galactocinasa

Se inoculan con una colonia de cultivo reciente, 5ml de medio Triptona-galactosa con antibiótico y se mantiene en incubación a 37°C con agitación durante toda la noche. De este cultivo se prepara una dilución 1:100 en Triptona-galactosa con antibiótico y fucosa en una concentración final de 0.6%. Se incuba en agitación a 140 rpm y temperatura de 37°C hasta que el cultivo alcanza una D.O._{600nm} de 0.3-0.6. Se coloca el cultivo en hielo y, en un vial para centelleo, a 1ml de cultivo se le agregan 40µl de M-3 y 3 gotas de tolueno. Se mezcla en vórtex durante 30 segundos y se incuba a 37°C con agitación durante 40 min. Una vez que se evapora el tolueno, se colocan las muestras en hielo. En seguida se prepara la siguiente mezcla para cada ensayo: 10µl de lisado, 20µl de M-1, 50µl de M-2, 10µl de galactosa C¹⁴. Se mezcla en vórtex y se incuba a 32°C durante 20 min.. Se toman 50µl de la mezcla de reacción y se colocan en papel DE-81, se lava 10 veces con agua destilada, se secan los papeles y se determina el contenido de radiactividad en cada uno de ellos con ayuda de un contador de centelleo.

Para cuentas totales se agregan 25µl de 3 mezclas de reacción al azar en tres diferentes papeles DE-81, los cuales no deberán ser lavados. La fórmula para cálculos es la siguiente:

Unidades de galactocinasa: (cpm problema- cpm blanco) 5200

cpm totales (D.O.) tiempo

RESULTADOS

A. Caracterización de las cepas SGM y S165.

Con la finalidad de corroborar que las características fenotípicas de las cepas en estudio (Salazar-Sánchez, 1992), se procedió a realizar las pruebas pertinentes.

1. Resistencia a antibióticos.

Las cepas pertenecientes a las series S165 y SGM contienen dentro de su cromosoma una copia del gen que confiere resistencia a estreptomycin. Todas aquellas cepas transformadas con el plásmido pKG1800 o alguno de sus derivados (pMS1 y pUS6)(Fig.7) presentan resistencia a ampicilina por información codificada en el mismo vector. Por lo tanto, se realizó la determinación de sensibilidad a estos antibióticos de acuerdo a como se describe en materiales y métodos. Así mismo se determinó la sensibilidad de estas mismas cepas al antibiótico tetraciclina, que más tarde se utilizaría como marcador en los ensayos de transducción generalizada.

Para las pruebas con cada antibiótico, se utilizaron simultáneamente cepas control, tanto positivo como negativo. Los resultados obtenidos en este ensayo se muestran en la tabla 2, donde se puede observar que todas las cepas mutantes de las series SGM y S165 que fueron probadas son, efectivamente, resistentes a estreptomycin y a ampicilina, así como sensibles a tetraciclina.

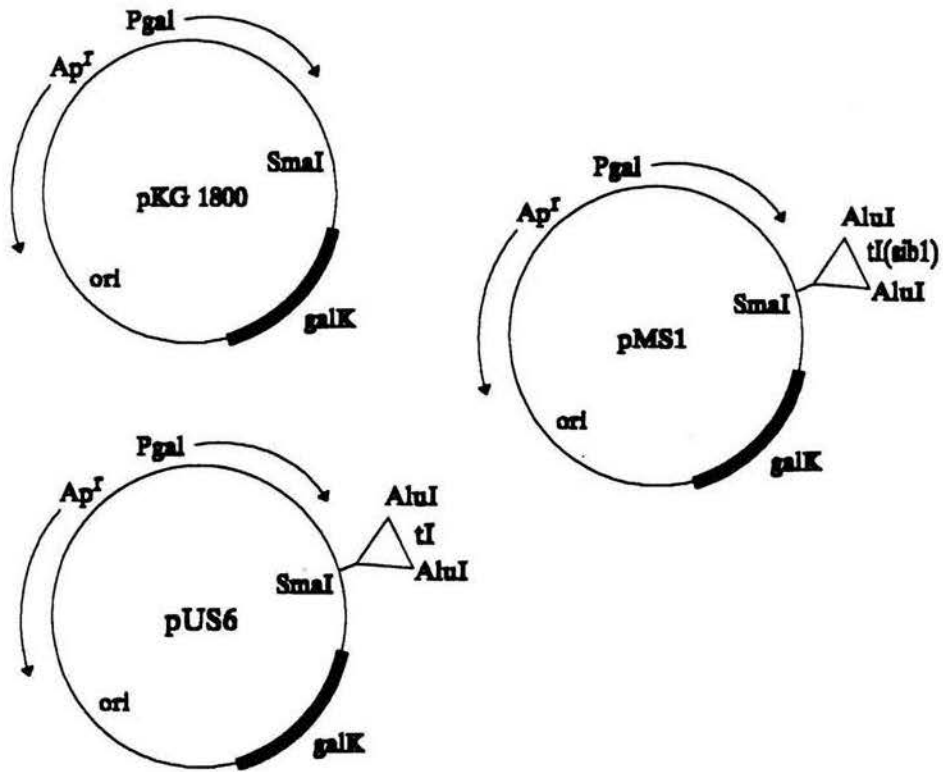


Figura 7. Plásmidos pKG1800, pMS1 y pUS6. El plásmido pKG1800 contiene un sitio de restricción SmaI flanqueado por el promotor pGal y el gen reportero *galK*. Los plásmidos pUS6 y pMS1 son derivados de este vector; llevan clonado un fragmento AluI-AluI que incluye a tI con la mutación *sib1* y tI, respectivamente.

TABLA 2

Sensibilidad a antibióticos de las mutantes SGM

Cepas	Str	Amp	Tc
SGM9 pMS1	R	R	S
SGM12 pMS1	R	R	S
SGM66 pMS1	R	R	S
SGM71 pMS1	R	R	S
SGM98 PMS1	R	R	S
S165 pUS6	R	R	S
S165 pMS1	R	R	S
S165 pKG1800	R	R	S
C600	S	S	S
S165	R	S	S
SA1943 pMS1	S	R	S
N7004	S	S	R

Todas las cepas fueron probadas en medio líquido y sólido. Las concentraciones de los antibióticos fueron: estreptomycin(str) 25µg/ml, ampicilina(amp) 50µg/ml, y tetraciclina(tc) 12.5µg/ml. Las incubaciones se realizaron a 37°C durante toda la noche. Para el crecimiento en líquido se incubó en baño de agitación a 120rpm. R=resistente, S=sensible.

2. Utilización de galactosa

La cepa S165 de *E. coli* contiene una delección del operón de galactosa ($\Delta galKTE$) (Shapiro y Adhya, 1969), por lo que no puede metabolizar este carbohidrato. Una vez que han sido transformadas con el plásmido pMS1, que contiene el gen reportero galk; las bacterias pueden llevar a cabo la reacción enzimática consistente en la forforilación de la galactosa (Fig. 8), sin embargo no pueden ser completadas las reacciones restantes para hacer posible la utilización de la galactosa como fuente de carbono por no contar con las enzimas transferasa y epimerasa. Esto fue evaluado mediante la siembra de las cepas mutantes en cajas de medio de cultivo MacConkey-galactosa 1%. Todas las cepas evaluadas y las utilizadas como controles fueron sembradas por duplicado e incubadas a 37°C y 42°C, respectivamente durante 14h, después de lo cual se analizó el color de las colonias.

Fue posible observar (tabla 3) que todas las cepas SGM y S165 aún cuando contienen un plásmido con el gen reportero galk permanecen blancas, es decir, que no metabolizan galactosa.

3. Morfología colonial

Como se mencionó anteriormente, la cepa S165 (Shapiro y Adhya, 1969) contiene una delección de los genes estructurales galK, galT, y galE, por lo que estas bacterias no metabolizan galactosa. Si las enzimas transferasa (producto de galT) y galactocinasa (producto de galK) se expresan en ausencia de epimerasa (producto de galE), las células mueren invariablemente cuando el medio de cultivo está adicionado con galactosa. En caso de que galK se encuentre funcional mientras no hay expresión de galT y galE, las células sufren bacteriostasis por acumulación

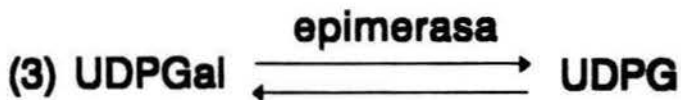


Figura 8. Ruta enzimática del metabolismo de la galactosa. El metabolismo endógeno de la galactosa se debe básicamente a tres reacciones enzimáticas específicas, la primera se lleva a cabo por la galactocinasa (1), enseguida actúa la galactosa-1-fosfato uridil transferasa (2), y por último la reacción es completada por la uridinadifosfoglucoosa pirofosforilasa (3). Glu-1-P es subsecuentemente convertida por la fosfoglucomutasa a Glu-6-P, intermediario glicolítico, para el catabolismo completo de la galactosa. Un defecto mutacional en el gen estructural para cualquiera de estas enzimas resulta en la pérdida de capacidad de utilización de galactosa como sustrato por parte de la bacteria.

TABLA 3

Utilización de galactosa por las cepas SGM y S165

Cepa	Color a 37°C	Color a 42°C
SGM9 pMS1	blanca	blanca
SGM12 pMS1	blanca	blanca
SGM66 pMS1	blanca	blanca
SGM71 pMS1	blanca	blanca
SGM98 pMS1	blanca	blanca
S165 pKG1800	blanca	blanca
S165 pMS1	blanca	blanca
S165 pUS6	blanca	blanca
S165	blanca	blanca
SA1943 pKG1800	roja	roja
SA1943 pMS1	rosa	rosa
SA1943 pUS6	blanca	blanca

Las cepas fueron incubadas durante 14h a 37°C o 12h a 42°C. Al medio utilizado se le adicionaron durante su preparación los antibióticos correspondientes a cada caso a las concentraciones indicadas en materiales y métodos. de galactosa 1-P. En base a esto se verificó la morfología colonial de las mutantes SGM transformadas con el plásmido pMS1 (elevada expresión de galK), y la cepa S165 transformada con los plásmidos pKG1800 (alta expresión de galK), pMS1 y pUS6 (baja expresión de galK), respectivamente. Para esto se espatularon alícuotas de una dilución de 10⁻⁶ de las cepas mutantes y controles en cajas de Triptona-galactosa. Los resultados de este ensayo se muestran en la tabla 4.

de galactosa 1-P. En base a esto se verificó la morfología colonial de las mutantes SGM transformadas con el plásmido pMS1 (elevada expresión de galK), y la cepa S165 transformada con los plásmidos pKG1800 (alta expresión de galK), pMS1 y pUS6 (baja expresión de galK), respectivamente. Para esto se espatularon alícuotas de una dilución de 10^{-6} de las cepas mutantes y controles en cajas de Triptona-galactosa. Los resultados de este ensayo se muestran en la tabla 4.

Fue posible observar claramente la diferencia morfológica entre las cepas control con los diferentes plásmidos (García-Mena, 1992; Salazar-Sánchez, 1992). La cepa S165 pKG1800 (Δ *sib*) no creció en presencia de galactosa debido a su alta expresión de galK. S165 pMS1 (*sib1*) muestra una marcada bacteriostasis, por lo que adopta una morfología colonial aplanada. Por otra parte, la cepa S165 pUS6 (*sib*⁺) crece normalmente con una morfología colonial convexa y brillante. Por último, las mutantes SGM, que fueron seleccionadas por un evidente decremento en la expresión de galK a partir del plásmido pMS1, y que se manifiesta como una disminución de bacteriostasis, mostraron una morfología colonial convexa.

4. Actividad de polimerización de la polinucleótido fosforilasa.

Se sabe que una de las mutantes de este grupo, la cepa SGM71, contiene una mutación que afecta a la subunidad alfa de la polinucleótido fosforilasa. Bajo esta referencia se analizó la actividad de polimerización de la PNPasa en extractos crudos de las células de las mutantes SGM9, SGM12, SGM66, SGM71 y SGM98. Estos extractos fueron sometidos a electroforesis en geles nativos de poli(acrilamida) y posteriormente se incubaron en presencia de ATP. La actividad de PNPasa se infirió a partir de la polimerización de poli(A) revelada por tinción con

TABLA 4

Caracterización morfológica de las cepas SGM

Cepa	Triptona	Triptona-galactosa
SGM9 pMS1	convexa	convexa
SGM12 pMS1	convexa	convexa
SGM66 pMS1	convexa	convexa
SGM71 pMS1	convexa	convexa
SGM98 pMS1	convexa	convexa
S165 pKG1800	convexa	no crece
S165 pMS1	convexa	plana
S165 pUS6	convexa	convexa

A los medios utilizados se les adicionó ampicilina y estreptomycinina a las concentraciones indicadas en materiales y métodos. La galactosa se agregó a una concentración final de 0.8%. La incubación se llevó a 42°C durante 21h.

naranja de acridina. En la figura 9, pueden observarse los patrones de polimerización característicos de cada cepa, los cuales corresponden a lo reportado anteriormente (García-Mena, 1992).

En el carril correspondiente a la mutante SGM71 se observa una doble banda y retardamiento de la actividad, así como un incremento en la cantidad de polimerización en comparación con el tipo silvestre (C600 pn^p). En cambio, las mutantes SGM9, SGM12, SGM66 y SGM98 muestran una actividad normal de PNPasa bajo este criterio.

B. Obtención de revertantes SGM con el fenotipo sib1

En base a los resultados obtenidos en el trabajo de García-Mena (1992) se esperaba que, al igual que la cepa SGM71, alguna de las mutantes SGM9, SGM12, SGM66 y SGM98 pudiera encontrarse alterada en el gen que codifica para la polinucleótido fosforilasa pues, como se mencionó anteriormente, los transcritos de RNA de mayor tamaño que se sintetizan en estas cepas se ven disminuidos en concentración, mientras que hay un incremento en las poblaciones de mRNA de menor tamaño. Esto podría atribuirse a un incremento en el procesamiento del mRNA por la PNPasa tal y como se ha sugerido en el caso de la mutante SGM71.

A pesar de que por ensayos de polimerización *in situ* se observa una actividad normal de la PNPasa en las mutantes SGM que en este caso nos ocupan se planteó analizar si las cepas en estudio presentan una mutación en el gen pn^p o cerca de éste. Siendo precisamente esto último el objetivo de este trabajo, se adoptó la estrategia consistente en transducir el gen pn^p a las mutantes SGM que contengan el plásmido pMS1(sib1). Finalmente, las mutantes alteradas en pn^p



Figura 9. Actividad de polimerización de ADP *in situ* por la PNPasa. Extractos crudos de las mutantes y controles silvestres fueron sometidos a electroforesis en un gel nativo de poliacrilamida al 7.5%. Este gel fue incubado en presencia de ADP y la polimerización poli(A) fue revelada por tinción con naranja de acridina. Carriles: 1,SGM9; 2,SGM12; 3,SGM71; 4,SGM66; 5,SGM98; 6,N99 pnp⁻; 7,C600 pnp⁺

fueron identificadas por su reversión al fenotipo aplanado característico de la cepa S165 pMS1 - de la cual se originaron - al ser espatuladas en cajas de medio adicionado con galactosa.

1. Obtención de una cepa pnp⁺::Tn10

Para poder introducir el gen pnp⁺ dentro de las mutantes SGM, fué necesario obtener la cepa donadora del gen pnp⁺ adecuada. En este caso se construyó a partir de la cepa YN2458 (nusAts11::Tn10), considerando que tanto Tn10 como pnp se encuentran dentro del minuto 48 del cromosoma de *E. coli* (Nakamura et al., 1983; Bachmann, 1990).

Se preparó un lisado P1_{vir} de la cepa YN2458. Con este lisado se llevó a cabo un ensayo de transducción generalizada utilizando la cepa C600 como receptora. Las bacterias transductantes se seleccionaron por crecimiento en medio adicionado con tetraciclina, obteniéndose una frecuencia de transducción de 6.1×10^{-7} transductantes/fago. Se purificaron diez candidatos de esta transducción y se sometieron a la prueba de detección de cepas nusAts11 incubándoles en medio selectivo Luria-NaCl al 25% en condiciones restrictivas. Bajo este criterio todos los candidatos obtenidos mostraron un fenotipo nusA⁺.

El siguiente paso fue corroborar que estas transductantes contuvieran el gen pnp⁺, para lo cual se realizó un nuevo ensayo de polimerización *in situ*. En la figura 10 se muestra el gel correspondiente a esta prueba. En él se observa que los extractos celulares de los tres candidatos probados presentan una actividad de polimerización de poli(A) de la PNPasa igual a la obtenida de un extracto crudo de una cepa pnp⁺.

Habiendo obtenido la cepa C600 pnp⁺ nusA⁺::Tn10, se infectó un cultivo de estas

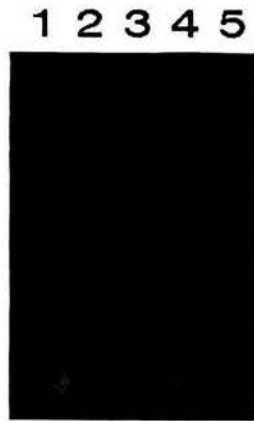


Figura 10. Actividad de polimerización de ADP de candidatos C600 transductantes de pnp⁺. Mediante un ensayo de polimerización *in situ* se corroboró que los candidatos C600 seleccionados de la transducción de pnp⁺ nusA⁺::Tn10 tuvieron una actividad normal de polimerización de la PNPasa. Carriles: 1-3, candidatos C600; 4, N99 pnp; 5, C600 pnp⁺.

bacterias con fago P1_{vir}, para obtener un lisado que permitiera transducir a la cepa K95 (nusA1) a fin de evaluar la frecuencia de cotransducción nusA⁺/Tn10.

De esta transducción se obtuvo una frecuencia de 2.6×10^{-7} transductantes/fago, de las que se purificaron quince candidatos, mismos que fueron analizados mediante la prueba para detección de mutantes nusA1 descrita en la sección de materiales y métodos. De los quince candidatos sometidos a esta prueba, únicamente uno conservó el fenotipo correspondiente a una mutante nusA1, mientras que el resto de los candidatos manifestaron uniformemente el fenotipo característico de cepas nusA⁺. En resumen, la frecuencia de cotransducción del marcador Tn10 y el gen nusA⁺ obtenida fue del 93.3%.

Con el mismo lisado obtenido del cultivo de C600 pnp⁺ nusA⁺::Tn10, fueron infectadas las cepas N99 (pnp::Tn5) y SGM71 (pnp71). De esta infección se seleccionaron transductantes en medio adicionado con antibióticos obteniendo frecuencias de 0.91×10^{-7} y 1.5×10^{-7} transductantes/fago, respectivamente. De las colonias obtenidas, se purificaron diez candidatos de cada cepa, mismos que fueron analizados por medio de ensayos de polimerización *in situ* a fin de conocer la eficiencia de cotransducción del gen pnp⁺ y el marcador Tn10 en las cepas con el genotipo antes mencionado.

Como puede observarse en la figura 11, de los diez candidatos N99 analizados, seis recuperaron el patrón de polimerización observado en una cepa silvestre. En el caso de los candidatos SGM71 al cual corresponde la figura 12a, dos de los diez candidatos muestran una reversión al fenotipo de polimerización silvestre. Estos dos candidatos fueron analizados nuevamente en un segundo gel junto con los controles correspondientes, tal como se muestra en la figura 12b. El resultado confirmó lo observado en el análisis anterior.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

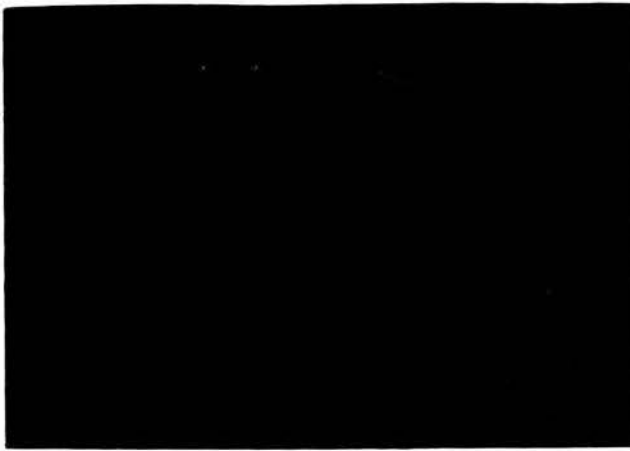


Figura 11. Selección de bacterias N99 transductantes de pnp⁺. Mediante un ensayo de polimerización *in situ* fueron analizados diez candidatos de la cepa N99 (originalmente pnp⁻) a fin de seleccionar transductantes de pnp⁺. Carriles: 1-5, candidatos N99; 6, N99 pnp⁺; 7, C600 pnp⁺; 8-12, candidatos N99.

Mediante estas pruebas pudo conocerse la eficiencia de cotransducción de pnp⁺ con Tn10, que con la cepa N99 fue de 60% y para SGM71 de 20%.

2. Transducción generalizada con las mutantes SGM.

Habiendo corroborado la eficiencia de cotransducción de Tn10 con los genes nusA⁺ y pnp⁺ con el lisado de la cepa que se utilizaría como donadora, se procedió a realizar finalmente el ensayo de transducción generalizada con las mutantes SGM9, SGM12, SGM66 y SGM98 (todas pMS1) como receptoras. Las bacterias transductantes se seleccionaron en medio Luria adicionado con ampicilina, estreptomicina y tetraciclina a las concentraciones usuales. Las frecuencias de transducción obtenidas para cada cepa en el orden mencionado fueron de 3.3×10^{-7} , 4.5×10^{-7} , 4.9×10^{-7} y 5.5×10^{-7} transductantes/fago, respectivamente. De cada cepa se purificaron veinticinco candidatos y se analizó la morfología colonial de cada uno de ellos en medio triptonagalactosa 0.8% adicionada con los mismos antibióticos de selección, teniendo como controles a las cepas S165 pKG1800(no crece), S165 pMS1(plana) y S165 pUS6(convexa).

De la mutante SGM9 no se obtuvo ningún candidato revertante de morfología plana. De la mutante SGM98 se obtuvieron once revertantes planas y de la mutante SGM12 se obtuvo únicamente un solo caso de reversión, por lo que se decidió incrementar el número de candidatos de prueba a 100, lo que condujo a contar con un número final de siete revertantes planas. Esto es, el 7% de los candidatos de la mutante SGM12 y el 44% de los candidatos de SGM98 que fueron analizados, recuperaron el fenotipo característico de la cepa S165 de la cual se originaron.

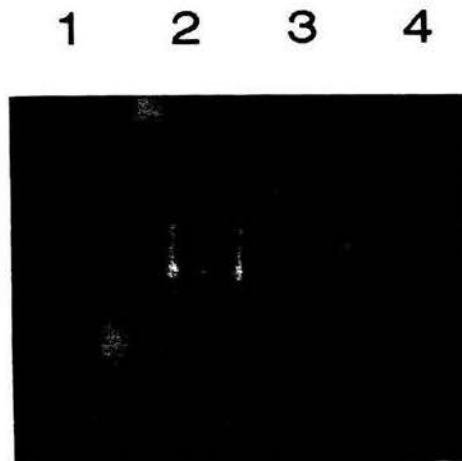
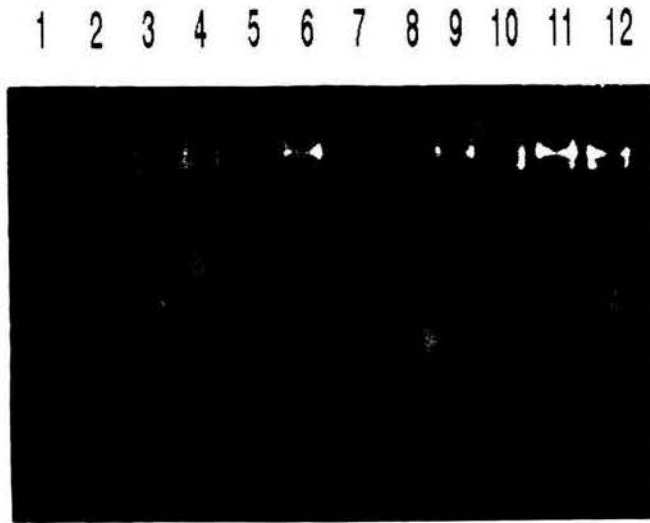


Figura 12. Selección de bacterias SGM71 transductantes de pnp^+ . a) Diez candidatos SGM71 posibles transductantes de pnp^+ fueron analizados mediante un análisis de polimerización *in situ* (carriles 1-5 y 8-12), de éstos únicamente dos recuperaron el patrón silvestre de actividad de PNPasa. b) Para corroborar este mismo experimento se repitió el ensayo con los candidatos positivos (carriles 1 y 4).

Los dos candidatos de la mutante SGM71 que se aislaron por análisis de polimerización por la PNPasa también mostraron morfología plana.

En lo que se refiere a los candidatos de la mutante SGM66 que se analizaron morfológicamente en medio triptona-galactosa, no fue posible establecer su morfología con respecto a los controles debido al reducido diámetro (<0.5mm) de las colonias en este medio. Por lo anterior, se repitió este mismo ensayo utilizando en esta ocasión medio Luria-galactosa 0.6% que es más rico, esperando obtener un mayor crecimiento colonial. De esta manera fue posible observar diferencias morfológicas entre los controles, sin embargo no se obtuvo ningún candidato plano, por lo que esta mutante se descartó, junto con la mutante SGM9 para experimentos posteriores.

2. Actividad enzimática de galactocinasa en revertantes SGM con el fenotipo sib1

Se estudió la expresión de galactocinasa en algunos de los candidatos positivos obtenidos por análisis de sensibilidad a la galactosa de cada una de las mutantes. En la tabla 5 se muestra la expresión relativa de la actividad de galactocinasa en donde los resultados concuerdan directamente con la morfología colonial descrita anteriormente.

TABLA 5

Expresión relativa de la actividad de galactocinasa

Cepa	Unidades de galk	Expresión relativa
S165 pKG1800	616.18	2.18
S165 pMS1	282.03	1.00
S165 pUS6	77.68	0.27
SGM12 pMS1	79.15	0.28
SGM71 pMS1	77.22	0.27
SGM98 pMS1	71.73	0.25
Candidatos		
SGM1203	238.00	0.84
SGM1230	177.27	0.62
SGM1266	107.85	0.38
SGM7108	168.94	0.59
SGM7130	121.11	0.42
SGM9808	202.81	0.71
SGM9812	207.66	0.73
SGM9830	264.37	0.93

La expresión relativa de la actividad de galactosa se calculó a partir de las unidades de galactocinasa obtenidas de ensayos enzimáticos realizados por duplicado, tomando como base la actividad de galk de la cepa S165 (sib1), a la que se le asignó el valor arbitrario de 1.

DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue el conocer si el decremento en la expresión de galk a partir del plásmido pMS1 en las mutantes SGM9, SGM12, SGM66 y SGM98 se debe a una mutación en el gen pnp. Para ello, fue necesario contar con cepas bien caracterizadas como un parámetro esencial en la obtención de resultados confiables. Dado que las mutantes SGM fueron caracterizadas en trabajos anteriores (García-Mena, 1992; Salazar-Sánchez, 1992), los datos obtenidos en este trabajo fueron confirmatorios de los anteriores.

En primer lugar se verificó la resistencia de las mutantes SGM a los antibióticos ampicilina y estreptomicina, así como la sensibilidad de éstas a tetraciclina.

Se verificó también que las cepas SGM no pudieran metabolizar galactosa. Esto se logró al determinar la morfología colonial al inducir su crecimiento en medio adicionado con galactosa, siendo conocido que la fermentación de azúcares por estas bacterias generan productos ácidos que provocan un cambio de color en un medio que contenga un colorante sensible a variaciones de pH, como es el caso del medio MacConkey.

Se verificó así mismo la morfología de estas cepas que contienen al plásmido pMS1 al crecer en un medio rico en galactosa, pudiendo observarse la pérdida del efecto bacteriostático por acumulación de Gal-1-P, efecto causado por la mutagénesis a la que fueron sometidas.

La última prueba en lo que se refiere a la caracterización de estas cepas correspondió a un ensayo de polimerización de poli(A) *in situ* con extractos crudos de cada cepa en el que se observó un patrón normal de actividad de la polinucleótido fosforilasa de las mutantes, a excepción de la cepa SGM71 que se sabe presenta una mutación en pnp (García-Mena, 1992) por

lo que se hace evidente un incremento en la polimerización y un retardo en la actividad debidas a una alteración en la subunidad α de la PNPasa.

A continuación, por manipulaciones genéticas se obtuvo la cepa C600 $\text{pnp}^+ \text{nusA}^+::\text{Tn10}$ como donadora del gen pnp^+ para transducirlo a las mutantes SGM y así poder analizar por criterios diferentes a la polimerización *in situ* si la pérdida del efecto bacteriostático es consecuencia de una mutación en este gen.

El lisado obtenido de la cepa C600 fue primero analizado por varios métodos y se verificó que fuera eficiente para la donación de pnp^+ (fig.10). Se obtuvo también la frecuencia de cotransducción de los genes nusA^+ y pnp^+ de este lisado con Tn10.

nusA^+ y Tn10 cotransducen con una frecuencia de 93.3%, mientras que pnp^+ y Tn10 lo hacen con frecuencia del 60% al ser introducidos dentro de la cepa N99 (originalmente pnp^-) y 20% cuando la cepa receptora es SGM71 (originalmente pnp^-). Ambos valores se encuentran dentro de límites aceptables para considerar este lisado y la cepa de donde se obtuvo como útiles. Estos resultados fueron obtenidos a partir de ensayos de polimerización *in situ* mediante los cuales se detectó la recuperación de la actividad de PNPasa característica de una cepa con pnp silvestre.

La desigualdad de frecuencias de cotransducción obtenidas en ambos casos puede deberse a diferencias en la localización de la(s) mutación(es) de cada cepa con respecto al marcador de selección.

Finalmente haciendo uso del lisado obtenido a partir de la cepa C600 introdujo pnp^+ dentro de las mutantes SGM consideradas en este trabajo. De cada cepa se tomaron veinticinco candidatos (calculados en base a las evaluaciones anteriores) que se analizaron morfológicamente

en medio rico en galactosa. Se obtuvieron revertantes al efecto bacteriostático de las cepas SGM12 y SGM98 en un porcentaje de 7% y 44%, respectivamente, del total de candidatos analizados. Estos resultados pueden tener relación con lo observado por Northern-blot con la sonda tI-DdeI (anti-*sib*)(García-Mena,1992) en el que se detecta una disminución de transcritos largos acompañada de un incremento en la cantidad de transcritos cortos de manera más acentuada para SGM98 que para SGM12, lo que hablaría de un incremento en el procesamiento del RNA debido probablemente a un incremento en la actividad de PNPasa, como parece suceder con la cepa SGM71.

Para finalizar se analizó la actividad de la enzima galactocinasa de algunos de los candidatos positivos al ensayo morfológico junto con las cepas control y se obtuvo el porcentaje de expresión relativa en cada caso. Las mutantes SGM tienen una expresión equiparable a la de S165 pUS6 y todos los candidatos si bien no recuperan totalmente la actividad de galactocinasa característica de S165 pMS1, sí muestran un incremento significativo con respecto a las mutantes, lo cual; se ve más acentuado para las cepas SGM12 y SGM98. Estos resultados nos permiten sugerir que las cepas SGM12 y SGM98 en donde ocurre un decremento en el efecto bacteriostático causado por el acumulamiento de Gal-1-P, producto del metabolismo incompleto de la galactosa, contienen una o más mutaciones que pueden afectar la expresión de la PNPasa, y que pueden localizarse en el gen pnp o muy cerca del mismo.

Estos estudios pueden ser complementados por pruebas de tipo Northern-blot para analizar los transcritos, así como la elaboración de geles de secuenciación con los que se podrá identificar la localización exacta de las mutaciones. Se sugiere también la realización de experimentos de

mapeo por conjugación para localizar la(s) mutación(es) de las cepas SGM9 y SGM66 de las que no se obtuvieron candidatos positivos en este trabajo.

CONCLUSIONES

Se obtuvo mediante manipulación genética la cepa C600 pnp⁺ nusA⁻::Tn10.

Las mutantes SGM12 y SGM98 contienen una mutación en pnp o muy cercana al gen altera la expresión de galactocinasa al provocar un mayor procesamiento del mRNA de galk de pMS1.

La disminución en el efecto bacteriostático causado por la acumulación de galactosa-1-P debida a expresión de galactocinasa en ausencia de epimerasa y transferasa activas en las mutantes SGM9 y SGM66 no se relaciona con una mutación en pnp.

RESUMEN

En este trabajo fueron caracterizadas y analizadas las mutantes SGM9, SGM12, SGM66 y SGM98 que muestran un decremento en la expresión del gen reportero galk a partir del plásmido pMS1.

Se determinó que las mutaciones contenidas en SGM12 y SGM98 que causan este decremento se encuentran en o cerca del gen pnp, y no se descarta la posibilidad de que contengan alguna otra mutación que modifique la expresión del gen reportador.

BIBLIOGRAFÍA

- Adhya,S., Gottesman,M. 1978. **Control of transcription termination.** Ann. Rev. Biochem. 47:967-996.
- Arraiano,C., Yancey,S. y S. Kushner. 1988. **Stabilization of discrete mRNA breakdown products in ams pnp rnb multiple mutants of *Escherichia coli* K-12.** J. Bacteriol. 170:4625-4633.
- Babitske,P., Granger,L., Olszewski,J. y S. Kushner. 1993. **Analysis of mRNA Decay and rRNA Processing in *Escherichia coli* Multiple Mutant Carrying a Deletion in RNaseIII.** J. Bacteriol. 175:229-239.
- Bachmann, B. 1990. **Linkage Map of *Escherichia coli* K-12,** Edition 8. Microbiol. Rev. 54:130-197.
- Belasco,J. y C. Higgins. 1988. **Mecanismos of mRNA decay in bacteria: a perspective.** Gene. 72:15-23.
- Bermudez-Cruz, Ma. del Refugio. 1991. **Identificación de factores que participan en el funcionamiento del terminador tJ de Lambda.**
Tesis doctoral. CINVESTAV. IPN. México.
- Brendel,V., Hamm,G., Trifonov,E. 1986. **Terminators of transcription with RNA polymerase for *Escherichia coli*: what they look like and how to find them.** J. Biomol. Struct. Dyn. 3:705-723.

- Brennan,C.A., Dombroski,A. y T.Platt. 1987. **Transcription Termination Factor Rho Is an RNA-DNA Helicase.** Cell. 48:945-952.
- Briat,J. y M.J. Chamberlin. 1984. **Identification and characterization of a new transcriptional termination factor from *Escherichia coli*.** Proc. Natl. Acad. Sci. 81:7373-7377.
- Briat,J., Bollag,G., Kearney,C., Molineaux,I. y M. Chamberlin. 1987. **Tau Factor from *Escherichia coli* Mediates Accurate and Efficient Termination of Transcription of the Bacteriophage T3 Early Termination Site *in vitro*** J. Mol. Biol. 198:43-49.
- Chen,C.-Y. A., Gallupi,G., Richardson,J. 1986. **Transcription termination at tRI is mediated by interaction of rho with specific single stranded domains near the 3' end of cro mRNA.** Cell. 46:1023-1028.
- Das,A. y K.Wolska. 1984. **Transcription Antitermination *in vitro* by Lambda N Gene Product: Requirement for a Phage nut Site and the Products of Host nusA, nusB, and nusE Genes.** Cell. 38:165-173.
- Das,A. 1992. **How the Phage Lambda N Gene Product Suppresses Transcription Termination: Communication of RNA Polymerase with Regulatory Proteins Mediated by Signals in Nascent RNA.** J. Bacteriol. 174:6711-6716.
- Deutsher,M.P. 1990. **Ribonucleases, tRNA Nucleotidyltransferase, and the 3' processing of tRNA.** Prog. Nucl. Acid Res. & Mol. Biol. 39:209-240.
- Donovan,W. y S. Kushner. 1986. **Polynucleotide phosphorylase and ribonuclease II are required for cell viability and mRNA turnover in *E. coli*, K-12.** Proc. Natl. Acad. Sci. 83:120-124.

- Friedman,D. Scauer,A, Baumann,M., Baron,L. y S.Adhya. 1981. **Evidence that ribosomal protein S10 participates in the control of transcription termination.** Proc. Natl. Acad. Sci. 78:115-119.
- Friedman, D. y M. Imperiale. 1987. **RNA3' end formation in the control of gene expression.** Ann. Rev. Genet. 21:453-488.
- García-Mena, J. 1992. **Polinucleótido fosforilasa, *sib* y expresión genética.** Tesis doctoral. CINVESTAV. IPN. México.
- Gill,S., Yager,T. y P.H. von Hippel. 1990. Biophys. Chem. 37:237-250.
- Greenblatt,J., Adhya,J., Friedman,D., Baron,L., Redfield,B., Kung,H. and H. Weissbach, 1980. **L Factor that is required for β - galactosidase synthesis is the nusA gene product involved in transcription termination.** Proc. Natl. Acad. Sci. 77:1991-1994.
- Greenblatt,J., McLimont,M. y S.Hanly. 1981. **Termination of transcription by nusA gene protein of *Escherichia coli*.** Nature. 292:215-220.
- Greenblatt,J. y J. Li. 1981. **Interaction of the Sigma Factor and the nusA Gene Protein of *E. coli* with RNA Polymerase in the Initiation-Termination Cycle of Transcription.** Cell. 24:421-428
- Guarneros,G., Montañez,C., Hernández,T., Court,D. 1982. **Posttranscriptional control of bacteriophage lambda int gene expression from a site distal to the gene.** Proc. Natl. Acad. Sci. 79:238-242.
- Guarneros,G. 1988. **Retroregulation of Bacteriophage Lambda int Gene Expression.** Curr. Top. Microbiol. & Imm. 136:1-19.
- Guarneros,G. y C. Portier. 1990. **Different specificities of ribonuclease II and polynucleotide phosphorylase in 3'mRNA decay.** Biochimie. 72:771-777.

- Hansen,U. y W.R. McClure. 1980. **Role of the σ subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase in initiation.II. Release of σ from ternary complexes.** J. Biol. Chem. 255:9564-9570.
- Hippel,P., Bear,D., Morgan,W., Siwiggen,J. 1984. **Protein nucleic acid interaction in transcription.** Ann. Rev. Biochem. 53:389-446.
- Jeng,S.-T, Gardner,J. y R.I. Gumport. 1992. **Transcription Termination *in vitro* by Bacteriophage T7 RNA Polymerase.** J. Biol. Chem. 267:19306-19312.
- Kingston,R. y M. Chamberlin. 1981. **Pausing and attenuation of *in vitro*transcription in the *rrnB* operon of *Escherichia coli*.** Cell. 27:523-531.
- Krummel,B. y M.J. Chamberlin. 1992,a. **Structural Analysis of Ternary Complexes of *Escherichia coli* RNA Polymerase: Individual Complexes Halted Along Different Transcription Units Have Distinct and Unexpected Biochemical Properties.** J. Mol. Biol. 225:221-237.
- Krummel,B. y M.J. Chamberlin, 1992,b. **Structural Analysis of Ternary Complexes of *Escherichia coli* RNA Polymerase: Deoxyribonuclease I footprinting of individual complexes along different transcription units.** J. Mol. Biol. 225:223-250.
- Kuroki,K., Ishii,S., Kano,Y., Miyashita,T., Nishi,K. y F. Imamoto. 1982. **Involvement of the nusA and nusB Gene Products in Transcription of *Escherichia coli* Tryptophan Operon *in vitro*.** Mol. Gen. Genet. 185:369-371.
- Lau,L. y J,Roberts. 1985. **Rho dependent transcription termination at lambda tRI requires upstream sequences.** J. Biol. Chem. 260:574-584.
- Lewin,B. 1990. **Genes IV.** 4a. edición. Eds. Willey & Sons. New York.

- Littauer,U. y H. Soreq. 1982. **Polynucleotide Phosphorylase**. In **the Enzymes** (Boyer P.D., ed.) vol.xv, Nucleic Acids part B. Academic Press. pp 517-553.
- Lundberg,U., von Gabain,A., y O. Melefors. 1990. **Cleavages in the 5' region of the ompA and bla mRNA control stability: studies with an *E. coli* mutant altering mRNA stability and a novel endoribonuclease**. EMBO J. 9:2731-2741.
- Montañez, C. 1982. **Aislamiento y caracterización de mutantes del bacteriófago lambda que carecen del retroinhibidor *sib***. Tesis doctoral. CINVESTAV. México.
- Montañez,C.; Bueno,J; Schmeissner,U., Court,D.; Guarneros,G. 1986. **Mutations of bacteriophage lambda that define independent but overlapping RNA processing and transcription termination sites**. J. Mol. Biol. 191:29-37.
- Nakamura,Y., Mizusawa,S., Court,D. y T. Akiko. 1986. **Regulatory Defects of a Conditionally Lethal nusA mutant of Escherichia coli**. J. Mol. Biol. 189:103-111.
- Oppenheim,A., Gottesman,M. 1982. **Regulation of bacteriophage lambda int gene expression**. J. Mol. Biol. 158:327-346.
- Platt,T. 1986. **Transcription Termination and the regulation of gene expression**. Ann. Rev. Biochem. 55:339-372.
- Plunkett G. y H. Echols. 1989. **Retroregulation of the bacteriophage lambda *int* gene: Limited secondary degradation of the RNAaseIII-processed transcript**. J. Bacteriol. 171:588-592.
- Régnier,P. y M.Grunberg-Manago. 1990. **RNase III cleavages in non-coding leaders of *Escherichia coli* transcripts control mRNA stability and genetic expression**. Biochimie. 72:825-834.

- Richardson,J. y R.Conaway. 1980. **Ribonucleic acid release activity of transcription termination protein rho is dependent on the hydrolysis of nucleosid triphosphates.** Biochemistry. 19:4293-4299.
- Richardson,J. y J.Corey. 1982. **Rho factor from polarity suppresor mutants with defects in their RNA interactions.** J. Biol. Chem. 257:5767-5771.
- Robertson,H., Webster,R., y N. Zinder. 1967. **A nuclease specific for double strands RNA.** Virology.32:718-719.
- Robertson,M.R. 1982. **Escherichia coli ribonuclease III cleavage sites.** Cell. 30:669-672.
- Rosenberg,M., Court,D. (1979) **Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription.** Ann. Rev. Genet. 13:319-353.
- Salazar-Sánchez, Ma.I. 1992. **Caracterización de Cepas Mutantes de Escherichia coli alteradas en la terminación de la transcripción.** Tesis Profesional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN. México.
- Shapiro,J.A. y S. Adhya. 1969. **The galactose operon of E. coli K-12 II. A deletion analysis of operon structure and polarity.** Genetics. 62:249-264.
- Schmeissner,U., McKenney,K., Rosenberg,M., Court,D. 1984. **Removal of a Terminator Structure by RNA Processing Regulates int Gene Expression.** J. Mol. Biol. 176:36-53.
- Sulewski,M., Marchese,S., Johnson,K. Benkovic,S. 1989. **Mechanism of polynucleotide phosphorylase.** Biochemistry. 28:5855-5864.
- Tomcsanyi,T. y D. Apirion. 1985. **Processing enzyme ribonuclease E specifically cleaves RNA 1 an inhibitor or primer formation in plasmid DNA synthesis.** J. Mol. Biol. 185:713-720.

- Ward,D y M.E.Gottesman. 1981. **The nus mutations affect transcription termination in *Escherichia coli***. Nature. 292:212-215.
- Ward,D., DeLong,A. y M.Gottesman. 1983. ***Escherichia coli* nusB mutations that supress nusA1 exhibit N specificity**. J. Mol. Biol. 168:73-85.
- Watson,J., Hopkins,V., Roberts,J., Stertz,J., Weiner,A. 1987. **Molecular Biology of the Gene**. 4th edition. Cummings Publishing Company Inc. California, USA.
- Watson,N. y D. Apirion. 1985. **Molecular cloning of the gene for the RNA-processing enzyme RNAsa III of *Escherichia coli***. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85:2494-2498.
- Yager,T. y P.H. von Hippel. 1991. **A Thermodynamic Analysis of RNA Transcript Elongation and Termination in Escherichia coli**. Biochemistry. 30:1097-1118.
- Zalatan,F. y T.Platt. 1992. **Effects of Decreased Cytosine Content on Rho Interaction with the Rho dependent Terminator trpt' in *Escherichia coli***. J. Biol. Chem. 267:19082-19088.
- Zengel,J. y L.Lindahl. 1992. **Ribosomal protein L4 and transcription factor nusA have separable roles in mediating termination of transcription within the leader of the S10 operon of *Escherichia coli***. Genes Develop. 6:2655-2662.