

56

2ej,

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA

**CARACTERIZACION PARCIAL DE LAS MUTANTES
DE *Escherichia coli* SGM 12 Y SGM 98.**

TESIS PROFESIONAL

Que como requisito para obtener el grado de

Biólogo

presenta:

RAMSÉS ILARRAZA LOMELÍ

México, D. F.

Abril de 1998

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

26 4730



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Agradecimientos

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio 4 del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N., bajo la dirección de la Dra. Silvia Cecilia Montañez Ojeda y el Dr. Jaime García Mena.

Indice general

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
La transcripción	2
Reconocimiento de la región promotora	
Separación de las cadenas de DNA	
Iniciación abortiva.	
Alargamiento	
Terminación	
Control de la expresión genética	14
Control positivo	15
Control positivo por antiterminación	
El bacteriófago lambda	
Control negativo	23
Control negativo por represión	
Control negativo por antiterminación	
Degradación del RNA mensajero.	27
PNPasa y <i>sib</i> .	34
Participación de la polinucleótido fosforilasa en la regulación del gen <i>int</i> del bacteriófago lambda.	
OBJETIVOS	38
MATERIALES Y MÉTODOS	39
A. Cepas y plásmidos	39
B. Medios de cultivo y soluciones.	40
1. Medios de cultivo	40
Medio Luria	
Medio McConkey Galactosa	
Medio triptona	
Antibióticos	
2. Transformación	41
Solución TSS	
Solución TSS Glucosa	
3. Extractos proteicos	41
Amortiguador Ia	
Colorante Bradford 5X	
Amortiguador de muestra para proteína 5X	

Colorante para muestra de proteina	
4. Ensayos enzimáticos	41
Amortiguador II	
Mezcla ³² P-UDP	
5. Ensayos de Quimioluminiscencia	42
Amortiguador TRIS-Glicina-Metanol (TGM)	
Amortiguador de fosfatos y NaCl (PBS)	
Amortiguador de bloqueo	
Amortiguador de lavado	
6. Extracción de DNA cromosomal	42
SSC 1X	
Amortiguador de lisis	
Amortiguador EcoRI (condiciones de reacción)	
C. Preparación de células competentes y transformación	42
Método de CaCl ₂	
Método de TSS	
D. Análisis fenotípico de las cepas	45
Resistencia a antibióticos	
Morfología colonial y utilización de galactosa	
E. Preparación de extractos proteicos en fase exponencial y en fase estacionaria	46
Determinación de la concentración proteica de los extractos mediante el método de Bradford en placas de ELISA.	
F. Análisis de proteina en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes	49
G. Ensayo de polimerización <i>in situ</i>	50
H. Ensayos de actividad de intercambio de fósforo de la PNPasa	52
I. Quimioluminiscencia de "Slot-blot" de los extractos proteicos	54
J. Preparación de DNA cromosomal de las cepas S165, SGM12, SGM71 y SGM98, para los ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen <i>pnp</i>	56
K. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el gen <i>pnp</i>	57
RESULTADOS	60
A. Transformación de las cepas bacterianas	60
B. Caracterización morfológica de las cepas: pruebas de resistencia a antibióticos, morfología colonial y utilización de galactosa	61
C. Extractos proteicos de las cepas S165, SGM12, SGM71 y SGM98	63
D. Análisis del patrón electroforético de los extractos proteicos	64

E. Actividad de polimerización <i>in situ</i>	67
F. Ensayo de intercambio de fósforo de la PNPasa	68
G. Cuantificación de la PNPasa de los extractos	69
H. PCR del gen <i>pnp</i> de las cepas	70
DISCUSION DE RESULTADOS	74
Caracterización de la PNPasa de las cepas mutantes	78
Genes localizados cerca de <i>pnp</i>	80
<i>nusA</i>	
<i>deaD</i>	
<i>greA</i>	
<i>rbfA</i>	
<i>nlp</i>	
<i>ftsH</i>	
<i>yhbU</i>	
CONCLUSIONES	86
BIBLIOGRAFIA	88

Índice de figuras

Figura 1. Dogma central de la biología molecular	3
Figura 2. Esquema general de la transcripción	5
Figura 3. Etapas de la transcripción	8
Figura 4. Esquema del modelo de movimiento de gusano de la RNA polimerasa	10
Figura 5. Terminadores intrínsecos	12
Figura 6. Terminadores dependientes de factores	13
Figura 7. Modelo de control positivo de la expresión genética	16
Figura 8. Control positivo por antiterminación del operón <i>bgI</i>	19
Figura 9. Regulación por atenuación	21
Figura 10. Mapa genético del fago λ	22
Figura 11. Antiterminación en el fago λ	24
Figura 12. Control negativo por represión	26
Figura 13. Retroregulación por <i>sib</i>	28
Figura 14. Endorribonucleasas y exorribonucleasas	30
Figura 15. Mapas de los plásmidos pKG1800, pUS6 y pMS1	36
Figura 16. Patrón electroforético de los extractos de las cepas S165, SGM12, SGM71 y SGM98	66
Figura 17. Ensayo de polimerización <i>in situ</i>	67

Figura 18. Autorradiografía del ensayo de quimioluminiscencia para la determinación de concentración de PNPasa de los extractos proteicos	71
Figura 19. Digestión de los DNA cromosomales con las enzimas EcoRI y HindIII	72
Figura 20. Corrimiento electroforético de los amplificados del gen <i>pnp</i>	73

Indice de tablas

Tabla 1. Cepas bacterianas	39
Tabla 2. Eficiencia de transformación	60
Tabla 3. Resistencia a antibióticos	61
Tabla 4. Morfología colonial en medio Triptona y Triptona Galactosa	62
Tabla 5. Concentración de proteína de los extractos crudos	64
Tabla 6. Ensayo de intercambio de fósforo de la PNPasa de las cepas S165, SGM12, SGM71 y SGM98	68
Tabla 7. Determinación de la concentración de PNPasa de los extractos proteicos	69
Tabla 8. Genes localizados cerca de <i>pnp</i> en <i>Escherichia coli</i> .	81

RESUMEN

En este trabajo se caracterizó a la enzima polinucleotido fosforilasa (PNPasa) de las cepas mutantes SGM12 y SGM98, con el objeto de determinar si su fenotipo de expresión del gen reportero *galk*, se debe a mutaciones que afecten la expresión o actividad de la PNPasa. Al llevar a cabo la caracterización de las cepas se encontraron niveles de concentración de proteína total por célula de SGM12 y SGM98 de 2.02 y 1.35 veces mayores a la presente en la cepa control S165, respectivamente. Además, los niveles de expresión de la PNPasa de las cepas SGM12 y la SGM98 son de 3.7 y 1.4 veces mayores a la expresada en la cepa S165. Se encontró una actividad de intercambio de fósforo muy similar a la de la cepa control S165 (1.1 veces para la SGM12 y 0.6 veces para la SGM98), y no hubo diferencias evidentes en la actividad de polimerización *in situ*. Los resultados sugieren que, al menos, en la cepa SGM98 no está afectada en la región del gen *pnp*.

Al analizar el patrón electroforético de los extractos crudos proteicos de las cepas S165, SGM12, SGM71 y SGM98, se observó una banda de aproximadamente 55 kDa cuya expresión disminuye en las mutantes SGM respecto a la S165, y que se presume podría ser el factor terminador de transcripción NusA; así mismo se identificó una segunda banda de aproximadamente 82 kDa que se incrementa notoriamente en la cepa SGM12, y que podría corresponder a la RNA helicasa deaD, o a la enzima ftsH, involucrada en la degradación del factor de transcripción σ^{32} . Se analizó la región cercana al gen *pnp* buscando alternativas que permitan explicar el fenotipo mutante de estas cepas y el hecho de que las mutaciones se localizaron previamente en la región genómica de *Escherichia coli* cercana a *pnp*.

CARACTERIZACION PARCIAL DE LAS MUTANTES DE Escherichia coli SGM 12 Y SGM 98

INTRODUCCION

La síntesis de proteínas es el resultado de una serie de eventos de entre los que destacan dos procesos principales: la transcripción y la traducción (fig.1). En la transcripción existe un control preciso que se lleva a cabo por una gran cantidad de factores como son la concentración de productos finales en el citoplasma celular, la existencia de inhibidores y estimuladores de la expresión genética, el control postranscripcional, y la tasa de síntesis-degradación de los RNAs mensajeros. La síntesis y degradación de RNAs mensajeros es un punto muy importante en la regulación de la expresión genética, debido a que mientras más rápido se sinteticen o mayor sea su permanencia en el citoplasma celular, se favorecerá la expresión de los mismos, y viceversa.

LA TRANSCRIPCION

La transcripción es el primero de los mecanismos encaminados a la síntesis de proteínas y presenta un sistema de regulación muy complejo. En la transcripción se produce un intermediario molecular -el ácido ribonucleico, o RNA- utilizando como molde al ácido

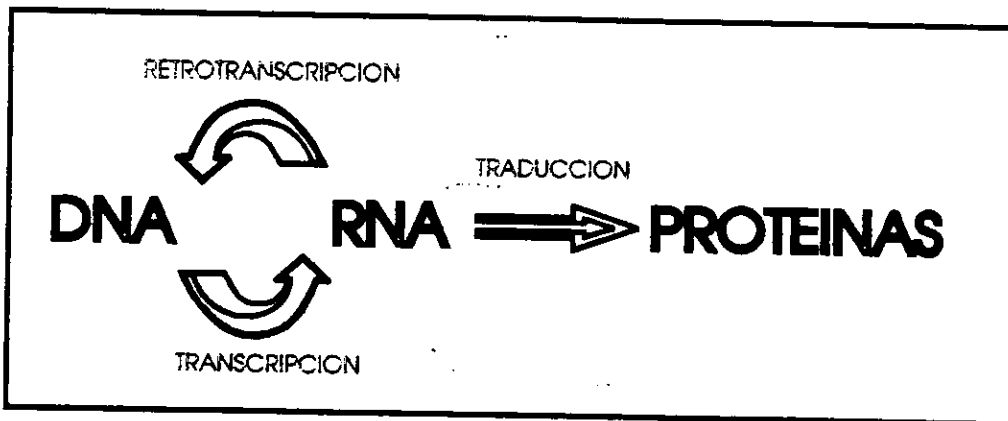


Fig. 1. Dogma central de la Biología Molecular. A partir de la información codificada en el DNA de los seres vivos se sintetiza un RNA con mensaje homólogo (transcripción), que sirve a su vez, como molde para la síntesis de proteínas (traducción). Se puede sintetizar DNA con mensaje homólogo a una cadena de RNA (retrotranscripción).

desoxirribonucleico, o DNA. Es en el DNA en donde se encuentra codificada la información genética necesaria para determinar todas las características de los organismos, ya sean procariontes o eucariontes, pasando desde el reino Monera hasta el Animalia. Dicha información se encuentra agrupada en entidades discretas conocidas como genes, que definen la estructura primaria de las proteínas, es decir, la secuencia de aminoácidos (Watson, 1987; Lewin, 1992) (fig. 2).

La transcripción de todos los genes de Escherichia coli se lleva a cabo por un sólo tipo de RNA polimerasa, de 389 kilodaltones (kDa) constituida por cuatro subunidades: dos subunidades α , de 37 kDa cada una, una β de 151 kDa y una β' de 155 kDa aproximadamente, codificadas por los genes *rpoA*, *rpoB* y *rpoC*, respectivamente (McClure, 1985). La RNA polimerasa, al inicio de la transcripción, se fija a una de las diferentes proteínas denominadas factores σ existentes en la célula, que sirven para el reconocimiento específico de la región promotora de los diferentes genes de E. coli (fig. 2).

Las mutaciones en el gen *rpoA*, que afectan a la subunidad α de la RNA polimerasa demuestran que dicha subunidad es necesaria para el control positivo de la iniciación de la transcripción (Kolb, *et al*, 1993, Russo y Silhavy, 1992, Ishihama, 1992). Mutaciones en la subunidad β afectan todos los niveles de la transcripción; sensibilidad a antibióticos, reconocimiento de promotores e interacción con σ , iniciación abortiva, cinética de alargamiento, terminación y antiterminación (Das, *et al*, 1978, Guarente y Beckwith, 1978, Jin y Gross, 1988, Kashlev *et al*, 1990, Landick *et al*, 1990, Lee *et al*, 1991, Atkinson y Gottesman, 1992, Sparkowski y Das, 1992). Las mutaciones que afectan a la subunidad β alteran, a su vez, la sensibilidad a rifampicina y a estreptolidigina (Zillig *et al*, 1976,

Krakow *et al.*, 1976), y la regulación del alargamiento controlado por proteínas (Gross *et al.*, 1976, Jin y Gross, 1989, Ito *et al.*, 1991).

En los procariontes, la transcripción se lleva a cabo en cinco etapas diferentes: reconocimiento de la región promotora, separación de las cadenas de DNA, iniciación abortiva, alargamiento y terminación (Yager & Von Hippel, 1991) (fig. 3).

RECONOCIMIENTO DE LA REGION PROMOTORA. La región promotora de un gen es una secuencia de bases presente en el DNA que se halla antes del sitio de inicio de la transcripción, y que es reconocida por un factor proteico que forma parte del complejo denominado RNA polimerasa: el factor σ . El factor σ^{70} , de 70 kDa, y que está codificado por el gen *rpoD*, es el más usado en *E. coli* para reconocer los promotores (Das, 1993), pero hay otros factores σ que también intervienen, como son σ^{32} , que se utiliza en los operones y genes que son inducidos por calor (Grossman *et al.*, 1984); σ^E , específico para transcribir el gen de σ^{32} y *htrA*, indispensables para la supervivencia celular a 42°C (Erickson y Gross, 1989); y σ^{54} , usado en la expresión de genes involucrados en la fijación de nitrógeno y asimilación (Hirschman *et al.*, 1985). Cuando *E. coli* es infectada por el bacteriófago T4, se sintetiza un factor σ^{gp55} que presenta mayor afinidad para los promotores de los genes tardíos del fago. En *Bacillus subtilis* son varios los factores σ identificados, como son σ^{43} , que se utiliza en la expresión de genes del estado vegetativos; σ^{37} , σ^{28} , σ^{32} , que reconocen los promotores de los genes de la cascada de esporulación; los factores σ^{30} , σ^{29} , σ^F , σ^G y σ^K , junto con los productos de la infección del fago SPO1 a *B. subtilis* σ^{gp28} y $\sigma^{gp33-34}$, son necesarios para la expresión de los genes de

dicho bacteriófago (Lewin, 1993, Helmann y Chamberlin, 1988, Roy y Wang, 1986, y Strangier P., 1991).

El factor σ es capaz de reconocer dos secuencias *consenso* ubicadas en las posiciones -10 (TATAAT), conocida como caja TATA, y en -35 (TTGACA), respecto a la posición de inicio de la transcripción; dicho reconocimiento es posible gracias a tres dominios proteicos de σ que están muy conservados, y que son capaces de unirse al DNA (Helmann y Chamberlin, 1988, Dombroski *et al*, 1992).

SEPARACIÓN DE LAS CADENAS DE DNA. La RNA polimerasa se une a la secuencia promotora del gen formando un complejo con el DNA que en última instancia sirve para que se forme una 'burbuja' de DNA de cadena sencilla, que comprende desde la base -12 a la +4 del gen. En éste punto se incorporan dos ribonucleótidos que sirven de inicio de la fase de alargamiento.

INICIACION ABORTIVA. El complejo DNA-RNA polimerasa-RNA es inestable al inicio, por lo cual los transcritos son liberados cuando tan sólo se ha sintetizado un RNA de unos 10 nucleótidos de largo; sin embargo, la enzima no es liberada del complejo y se reinicia la transcripción (Krummel y Chamberlin, 1989). El cambio al modo estable de alargamiento se da al liberarse el factor σ del complejo con lo que se pierde el contacto de la RNA polimerasa de la región promotora; la burbuja de DNA crece a 18 pares de bases, la cadena de RNA aumenta a 12 nucleótidos, y se establecen contactos de la RNA polimerasa con el DNA en secuencias ubicadas después del complejo de la RNA polimerasa. De ésta manera, la iniciación abortiva también puede servir para regular la síntesis de transcritos, y de hecho, así es: existen factores que promueven la disminución

En fechas recientes se ha propuesto un modelo denominado de *inchworm* (gusano medidor) para explicar la iniciación abortiva. En éste modelo se propone que la RNA polimerasa se mueve a lo largo del DNA, durante el alargamiento, con un movimiento similar al de un gusano, con dos sitios de interacción entre el RNA y la RNA polimerasa. Dichos sitios son el del producto líder, zona de 10 nucleótidos aproximadamente en la cual se ubica el centro catalítico de la RNA polimerasa y que es donde se van incorporando los nucleótidos del transcrito en síntesis, y el del producto rezagado. Una vez que se ha rellenado el sitio del producto líder se produce una translocación de la enzima a una posición 10 nucleótidos más adelante, con lo que dicho sitio se libera. En la fase inicial del alargamiento, para que dicha translocación se lleve a cabo, se requiere que la cadena de RNA sintetizada sea mayor de 9 nucleótidos. Como la interacción del RNA sintetizado con el sitio líder es débil, ésto puede favorecer la disociación prematura del transcrito, con lo que la RNA polimerasa requiere volver a iniciar la síntesis (modelo propuesto por Chamberlin, 1995) (fig. 4).

ALARGAMIENTO. Durante el alargamiento, la RNA polimerasa se va desplazando a lo largo del molde de DNA en una burbuja de 17 pares de bases y se forma un híbrido de DNA-RNA de 12 nucleótidos. Sin embargo, la tasa de incorporación de nucleótidos no es constante a lo largo de todo el alargamiento; existen dos tipos de secuencias del DNA en donde se frena el desplazamiento de la RNA polimerasa: los sitios de pausa y los terminadores de la transcripción. Dichos sitios se ubican generalmente al final de un gen,

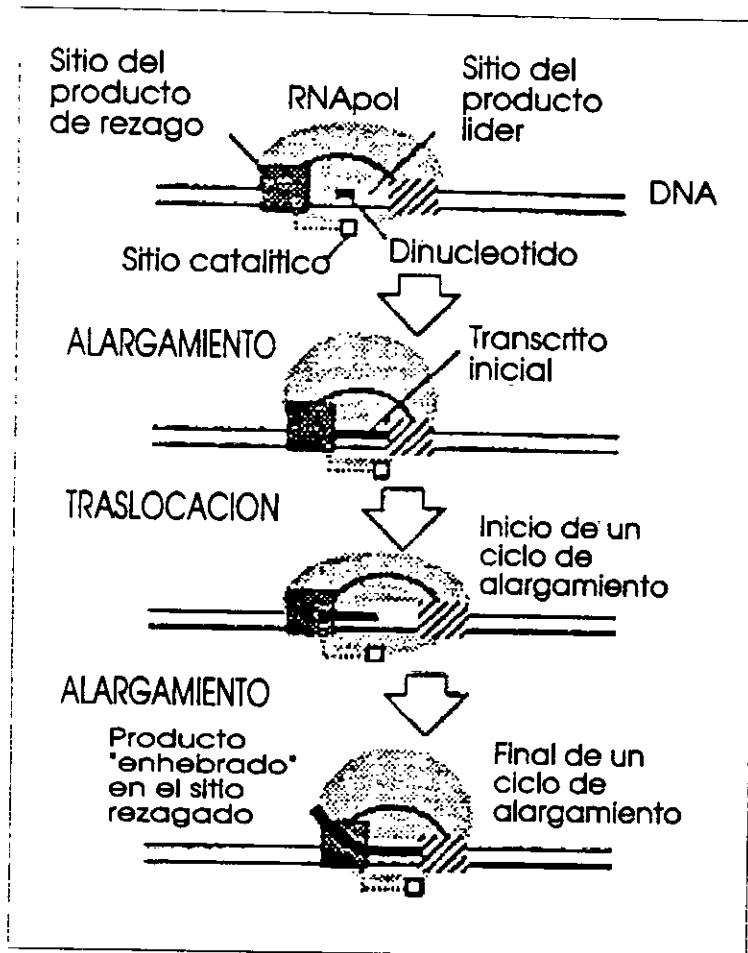


Fig. 4. Esquema del modelo de movimiento de gusano de la RNA polimerasa. La RNA polimerasa inicia la síntesis varias veces, hasta que el RNA es "enhebrado" por el sitio donde se ubica el producto de rezago.

o entre genes de un operón, aunque a veces se hallan en medio o al inicio de un gen con una función biológica aún no bien estudiada.

En los sitios de pausa, la síntesis del RNA se detiene de manera momentánea y reversible. En los terminadores se produce la liberación del RNA y/o de la RNA polimerasa, ya sea de manera intrínseca, o por acción de otros factores proteicos como son NusA, Rho o Tau (Richardson, 1993).

TERMINACION. En los terminadores de tipo intrínseco la liberación del RNA es un proceso que puede ser considerado como irreversible y que está determinado termodinámicamente. El proceso incluye la separación del híbrido RNA-DNA, el cierre de la burbuja del DNA y la disociación de la RNA polimerasa. Dichos terminadores son secuencias palindrómicas, es decir, que se leen igual en ambos sentidos, seguidas de una secuencia rica en adeninas; la secuencia del terminador permite que se forme una estructura de tallo-burbuja del RNA cuando se transcribe este sitio. La formación de dicha estructura secundaria en el RNA, junto con la secuencia rica en adenina, afectan la estabilidad del híbrido DNA-RNA del complejo de alargamiento, por lo que la burbuja del DNA termina por cerrarse y se libera el RNA y la RNA polimerasa (fig. 5).

En los terminadores dependientes de factores, es necesaria la intervención de ciertos complejos proteicos a fin de que la enzima y el RNA sean liberados, ya que en ausencia de dichos factores, los sitios de terminación se vuelven sitios de pausa. Al escindir el factor σ del complejo de la RNA polimerasa, se une al transcrito el factor NusA (Greenblatt y Li, 1981), factor proteico que sirve para acoplar factores de terminación y antiterminación a la RNA polimerasa. Además, NusA tiene capacidad intrínseca de promover pausas y terminación en sitios específicos (fig. 6).

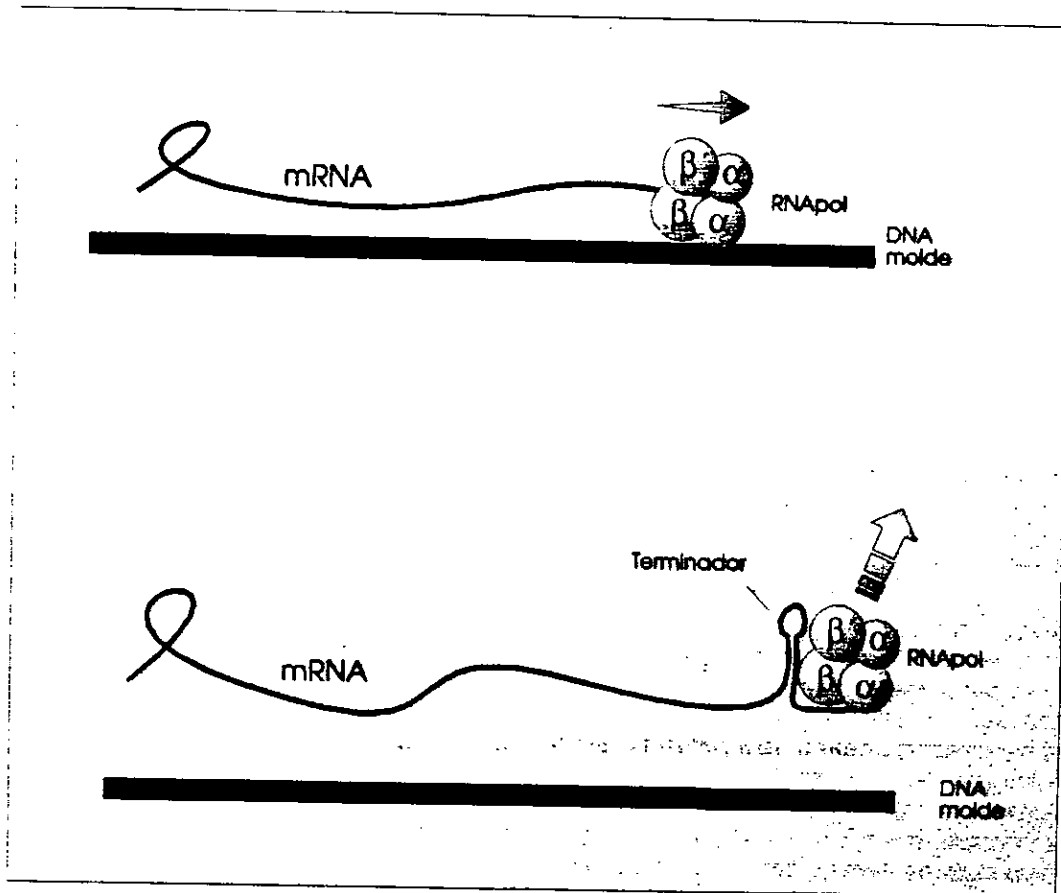


Fig. 5. Terminadores intrínsecos. En los terminadores de tipo intrínseco, la terminación ocurre debido a que se genera una estructura de tallo-burbuja en el mRNA, con lo que el complejo RNA polimerasa- DNA se desestabiliza y se libera la polimerasa y el mRNA.

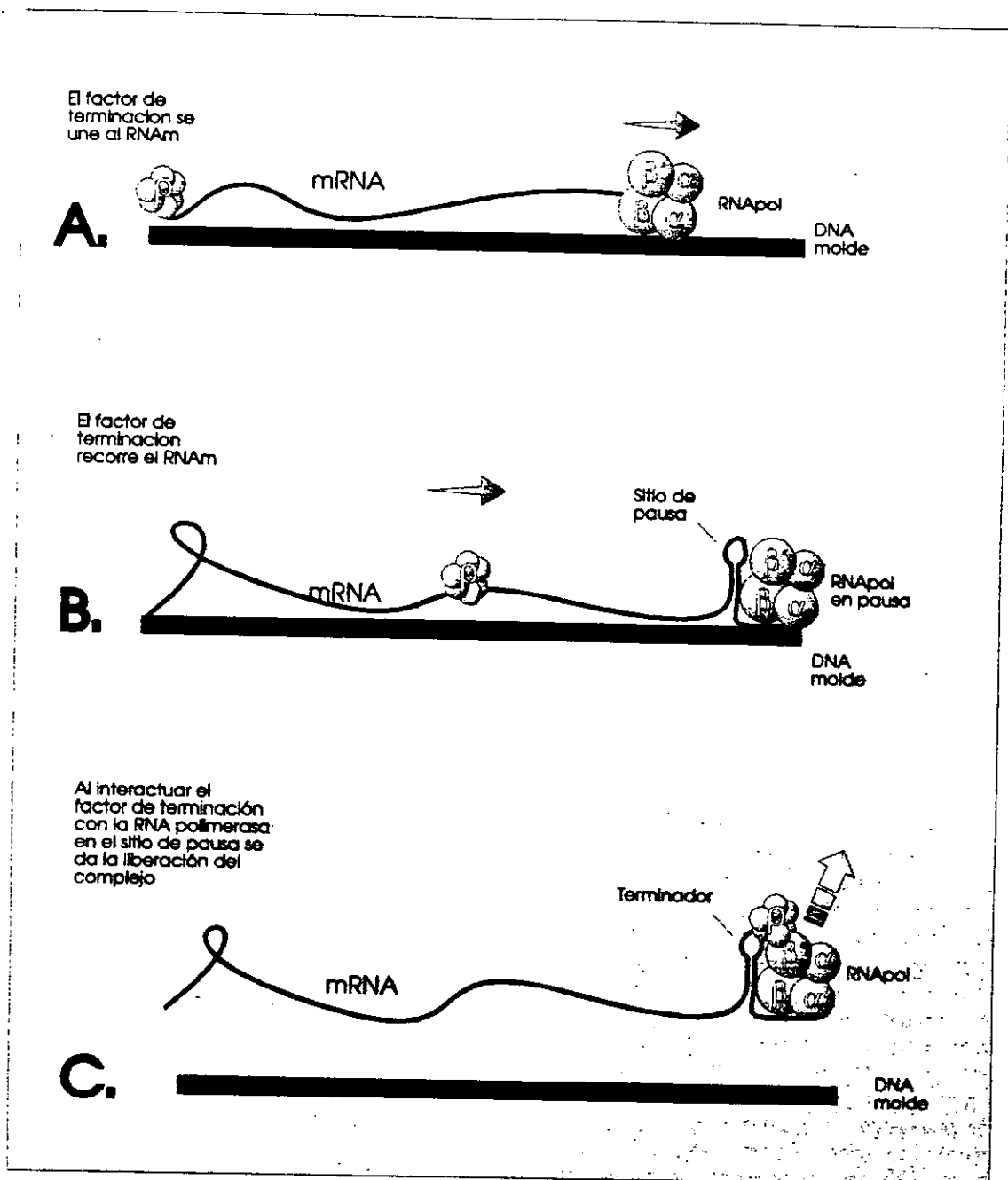


Fig. 6. Terminadores dependientes de factores. En los terminadores de tipo dependientes de factores, proteínas especializadas, como el factor ρ o Nus A, promueven la terminación de la transcripción. Estas proteínas interactúan con la RNA polimerasa, principalmente en los sitios conocidos como sitios de pausa, que son secuencias en que el mRNA adquiere una estructura secundaria que, si bien no es suficiente para que se de la terminación de la transcripción, si detiene el complejo RNA polimerasa hasta que es "alcanzado" por la proteína terminadora.

El factor proteico más común en la terminación de la transcripción en E. coli es el factor Rho. Rho es una proteína hexamérica compuesta por tres dímeros (Finger y Richardson, 1982, Gogol *et al*, 1991), con dos sitios activos, que se une al RNA. Esta proteína pertenece a la familia de las ribonucleoproteínas nucleares pequeñas, Rho es una ATPasa dependiente de RNA y presenta actividad de helicasa que le permite la liberación del RNA. En los terminadores Rho-dependientes, la liberación del RNA y la polimerasa dependen de una secuencia de RNA ubicada antes del sitio de terminación, la cual es rica en citosinas, pero pobre en guaninas, y posee poca o nula estructura secundaria.

CONTROL DE LA EXPRESION GENETICA

Toda célula, con el fin de responder a estímulos externos o internos, requiere 'saber' que genes se deben expresar y cuales no, por lo que la transcripción de dichos genes debe estar regulada por mecanismos de control específicos. Dicho control puede significar el aumento o activación de la expresión, o la represión de la misma, basándose siempre en las condiciones temporales que prevalecen en la célula.

Podemos considerar la función de los diferentes factores σ como el primer punto de control de la expresión génica, ya que, como vimos anteriormente, existen factores σ que reconocen específicamente los promotores de ciertos tipos de genes. Un ejemplo de éstos es el factor σ^{32} de E. coli, cuya expresión se halla regulada por el factor σ^E , que reconoce los promotores de genes relacionados con la supervivencia de la bacteria a temperaturas mayores a 37°C. La importancia de σ radica principalmente en la especificidad que le confiere a la unión de la RNA polimerasa con el DNA, ya que el

núcleo catalítico de la enzima, carente de σ , se puede unir al DNA pero de manera inespecífica (Burgess *et al.*, 1969); de ésta forma, σ confiere a la holoenzima el reconocimiento específico del promotor, e inhibe las uniones inespecíficas de la enzima con el DNA (Chamberlin, 1976).

CONTROL POSITIVO

Existen genes que no se expresan, o lo hacen en baja cantidad en ciertas condiciones; sin embargo, si las condiciones externas o internas cambian, puede ser necesaria la 'activación' o el aumento en la expresión de ciertos genes a fin de que la célula sobreviva o que pueda llevar a cabo funciones específicas destinadas a controlar la respuesta celular a dichos estímulos. Para que se lleve a cabo dicha respuesta ante el estímulo, es necesaria la función de una proteína reguladora 'activadora' , y el DNA, con lo que se activa o incrementa la expresión del gen al aumentar la iniciación de transcripción llevada. A éste proceso se le conoce como control positivo (revisado en Adhya y Garges, 1990) (fig. 7).

En el control positivo de la transcripción se requiere de una señal, que es generalmente la concentración intra o extracelular de alguna molécula, la cual es 'percibida' por un sensor. La señal es transmitida a la proteína reguladora activadora, con lo que ésta cambia su conformación, por modificación covalente o no covalente, y es ahora capaz de unirse a una secuencia específica en el DNA. El complejo proteína activadora-DNA activa o aumenta la transcripción a partir del promotor, ya sea facilitando la unión de la RNA polimerasa con dicha secuencia o modificando la actividad de la enzima. La proteína activadora puede realizar su función de dos maneras: puede contactar directamente a la

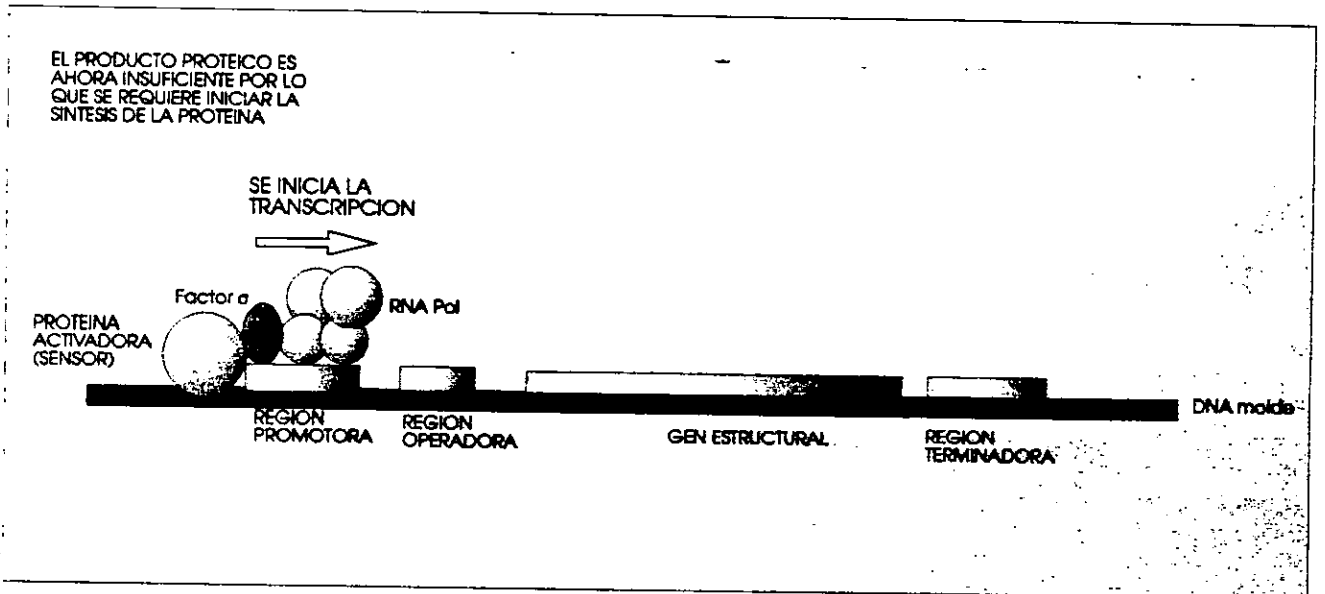
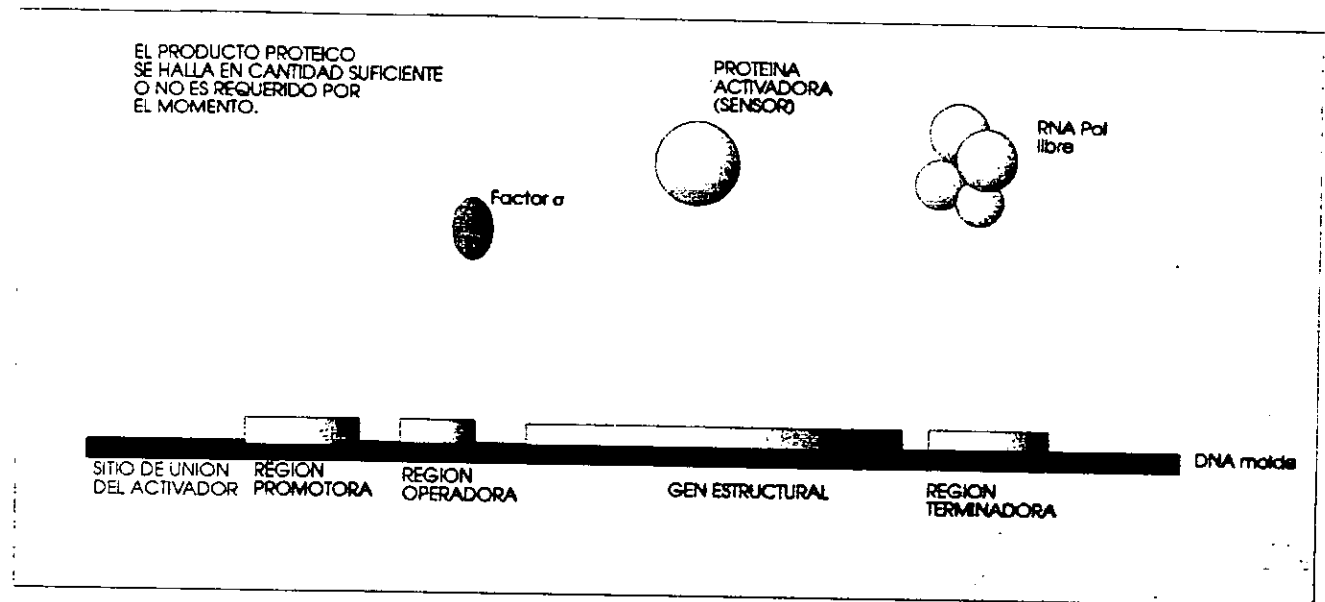


Figura 7. Modelo de control positivo de la expresión genética. En el citoplasma se hallan proteínas u otras moléculas (sensoras) que detectan las condiciones del medio. La molécula sensora participa directa o indirectamente en el control. Los genes que son controlados así se transcriben en bajas cantidades en ausencia del sustrato de su producto, generalmente (arriba) y en condiciones en que se requiere el producto del gen (abajo), por ejemplo, para una ruta metabólica determinada, la proteína activadora, que puede ser el mismo sensor, se une al DNA promoviendo la fijación del complejo RNA polimerasa.

RNA polimerasa, o puede causar un cambio en la conformación del DNA, a fin de que la enzima se una o funcione más eficientemente.

Un ejemplo interesante de control positivo de la transcripción es el de la utilización de fuentes de carbono diferentes a la glucosa por la bacteria E. coli. Cuando la bacteria crece en un medio con fuente de carbono diferente a la glucosa los niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) se hallan muy elevados en el interior celular; al añadir glucosa al medio, los niveles de AMPc disminuyen rápidamente. Cuando la concentración de AMPc es alta, éste se une a una proteína reguladora conocida como proteína receptora de AMPc (con siglas CRP); dicho complejo tiene una conformación nueva que le permite unirse al DNA específicamente en, o cerca de, la región promotora del regulón de la proteína CRP, el cual incluye al operón *lac*.

CONTROL POSITIVO POR ANTITERMINACION

Así como los terminadores pueden ser dependientes de factores proteicos para llevar a cabo eficientemente la terminación de la transcripción, dicha terminación también puede ser inhibida por otros factores. El proceso en que una proteína funciona como inhibidora de la terminación de la transcripción se conoce como antiterminación de la transcripción, y es importante para la expresión de ciertos genes que normalmente se hallan 'apagados' al existir terminadores situados en la región 5' de dichos genes.

Un ejemplo de control positivo por antiterminación lo encontramos en el operón *bgl* de E. coli, en donde puede ocurrir antiterminación en dos sitios distintos (revisado por Houman, Diaz-Torres y Wright, 1990). El operón *bgl* incluye los genes *bglG*, *bglF* y *bglB*, involucrados en la degradación de β -glucósidos aromáticos, se halla regulado por la

presencia de β -glucósidos y depende del AMPc y la proteína CRP. En ausencia de β -glucósidos, la terminación se da en un terminador Rho independiente ubicado antes del inicio del primer gen, *bglG*; además existe un segundo terminador entre el gen *bglG* y el *bglF*, con lo que se da baja producción de la proteína BglG y BglF. En presencia de β -glucósidos, la proteína BglG es desfosforilada por la BglF, con lo que BglG se puede unir al RNA en síntesis, impidiendo la formación de la estructura de tallo-burbuja, con lo que la terminación se inhibe en ambos terminadores, y la transcripción continúa hasta el fin del operón (fig. 8).

Otro caso de antiterminación es el efecto ejercido por la traducción realizada por los ribosomas. En procariontes, la transcripción y la traducción son dos procesos simultáneos, es decir, que el RNA mensajero (mRNA) es traducido conforme se va sintetizando, a diferencia de los eucariontes, que requieren que el mRNA sea madurado y liberado al citoplasma antes de que sea traducido. Se ha visto que al realizarse la traducción del mRNA en síntesis, se inhibe la actividad de los terminadores Rho dependientes al bloquear la interacción Rho-mRNA (Adhya y Gottesman, 1978), o al impedir que se forme la estructura de tallo-burbuja de los terminadores Rho independientes.

Existe otro proceso conocido como atenuación, en operones que codifican para enzimas utilizadas en rutas metabólicas de síntesis de aminoácidos, como el triptofano, en *E. coli* y *Salmonella thyphimurium*. En éstos casos, el mRNA tiene una estructura terminadora (Rho dependiente o Rho independiente) antes del primer gen estructural; dicho terminador es funcional cuando la concentración del aminoácido en cuestión se halla por encima de cierto nivel. Cuando la concentración del aminoácido disminuye, los ribosomas

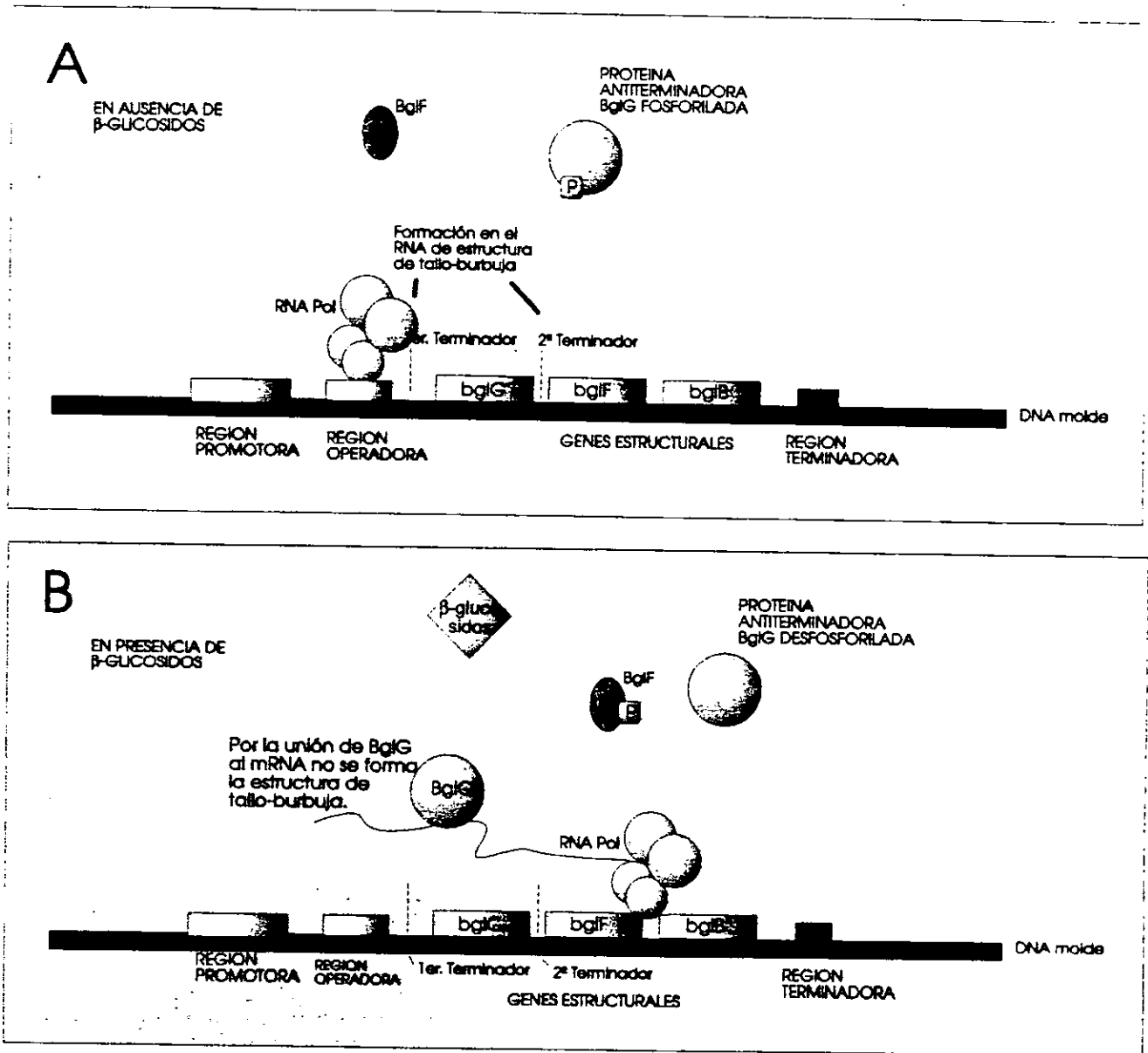


Figura 8. Control positivo por antiterminación en el operón *bgl*. En ausencia de β - glucósidos (arriba), se producen bajas cantidades de BglG (la cual es fosforilada) y BglF. La terminación de la transcripción se da en dos terminadores, ubicados, uno antes del gen *bgIG* y ,otro entre el gen *bgIG* y el *bgIF*. En presencia de β -glucósidos (abajo), la BglG es desfosforilada por la BglF, con lo que se une al mRNA, impidiendo se forme la estructura de tallo-burbuja, y evitando así que ocurra la terminación de la transcripción.

se detienen en la traducción del transcrito líder en el sitio donde se va a añadir dicho aminoácido a la cadena polipeptídica, impidiendo la formación de la estructura terminadora en ese lugar. De esta manera, la transcripción continúa y se sintetizan las enzimas de dicho operón (fig. 9).

EL BACTERIOFAGO LAMBDA. El fago lambda es un modelo notable en cuanto a regulación transcripcional+se refiere. Su ciclo de 'vida' incluye una fase lítica y una lisogénica, mediadas por las condiciones del medio intracelular de la célula hospedera. El fago inicia su ciclo de 'vida' al inyectar su DNA al interior de la célula hospedera. Una vez ahí, empieza la transcripción y traducción de los genes del fago, produciéndose las proteínas Cro y cI, piedras angulares de la decisión lisis-lisogenia del fago (fig. 10).

En el ciclo lítico de lambda, existen tres etapas: temprana (early), temprana retrasada (delayed early) y tardía (late). La fase temprana inicia con la transcripción de los genes de lambda a partir de los promotores p_L (promotor izquierdo) y p_R (promotor derecho). El transcrito que inicia en p_L termina en el terminador tL_1 y codifica para la proteína N; el 50% de los transcritos que inician en p_R terminan en el terminador tR_1 , codificando para la proteína Cro, y el otro 50% llega hasta el terminador tR_2 , con lo que el transcrito sintetizado incluye los genes cro, cII, O y P. La proteína cro es capaz de unirse a las regiones operadoras O_L (izquierda) y O_R (derecha), con lo que inhibe la transcripción a partir de p_L y p_R . En la fase temprana retrasada se acumula el factor proteico N, de 12.2 kDa que actúa como antiterminador de la transcripción. N se une al RNA en la secuencia del DNA del fago conocida como *nut* (N-utilización), y que se localiza cerca de los promotores p_L (*nutL*) y p_R (*nutR*), y modifica el aparato transcripcional al unirse a éste

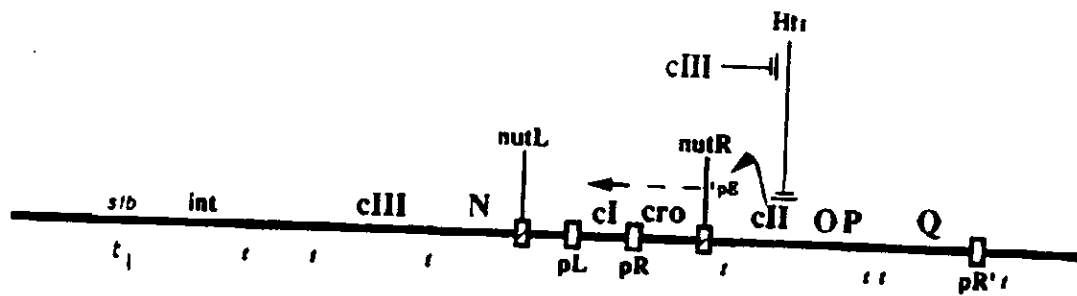


Figura 10. Mapa genético del fago λ . La transcripción inicia en los promotores izquierdo (p_L) y derecho (p_R) principalmente.

como una subunidad más ocasionando que la RNA polimerasa se vuelva resistente a la estructura secundaria de los terminadores, y además la velocidad de síntesis de RNA se incrementa, ya sea por una mayor afinidad del complejo transcripcional por el sustrato o por un aumento en la tasa de adición de nucleótidos. La actividad de N hace que la transcripción continúe a través de los terminadores tL_1 , tR_1 y tR_2 ; así, se transcriben los genes *cIII*, *Xis* e *Int*, además de la región *b* a partir de p_L . A partir de p_R se sintetiza un transcrito que codifica para la proteína Q, que también sirve como antiterminadora y que requiere sitios *qut* (Q-utilización) para unirse al DNA y llevar a cabo su actividad en la fase tardía del ciclo lítico de lambda, con lo que permite la síntesis de proteínas de cápside y enzimas líticas requeridas para la liberación del fago (Das, 1993, Das y Wolska, 1984, Hendrix, 1983, Friedman y Gottesman, 1983) (fig. 11).

La actividad de antiterminación por N se da tanto en terminadores Rho dependientes como Rho independientes, y requiere de varios componentes: la RNA polimerasa, la proteína N, factores proteicos del hospedero como son NusA, NusB, NusG, y la proteína ribosomal S10, además del sitio *nut*. La polimerasa sufre un cambio al pasar por el sitio *nut*, cuando la proteína N se le une como subunidad con auxilio de la proteína NusA, principalmente; así, el complejo transcripcional modificado es capaz de pasar por los terminadores originales y continuar la transcripción hacia los genes distales de cada operón. (Hendrix, 1983, Das y Wolska, 1984, Das, 1993)

CONTROL NEGATIVO

CONTROL NEGATIVO POR REPRESION

Cuando un gen se expresa en niveles mayores a lo que se requiere, la célula reprime la expresión de dicho gen, fenómeno conocido como control negativo por represión. Para

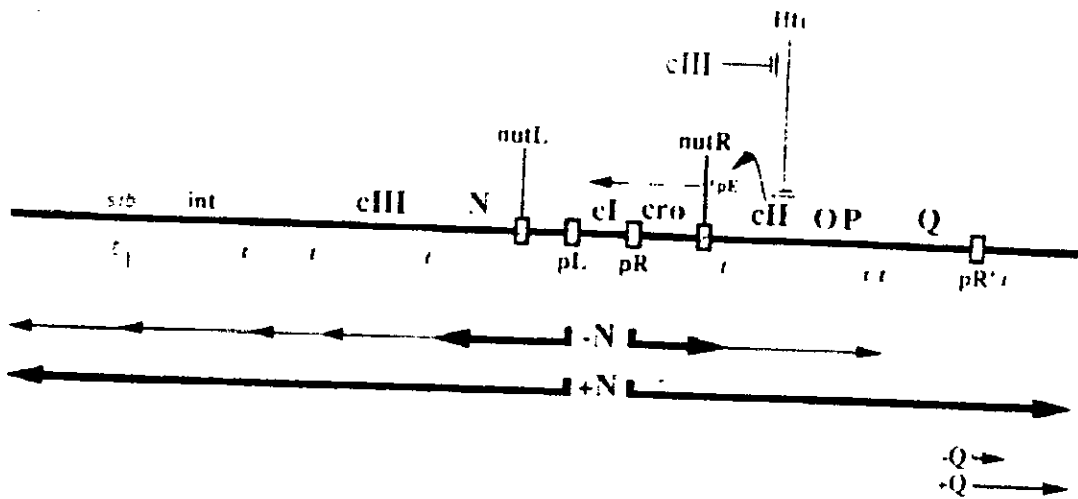


Figura 11. Antiterminación en el fago λ . La transcripción inicia en los promotores izquierdo (p_L) y derecho (p_R) hasta el primer terminador. Al producirse la proteína N ésta se une a los sitios *nutL* y *nutR*, con lo que la transcripción sigue a través de los terminadores. El factor Q también es factor de antiterminación, el cual se une a los sitios *qut*, cerca del promotor $p_{R'}$.

este fin, existen mecanismos celulares que pueden impedir que el complejo de la RNA polimerasa se una a la secuencia promotora del gen, o que una vez que el complejo enzimático de iniciación se halle en la región promotora, no pueda avanzar hacia los genes estructurales.

Un operón es un conjunto de genes estructurales relacionados entre sí en su función, junto con elementos que sirven para el control de la expresión de dichos genes. El operón *lac* posee en su estructura, en sentido 5'→3', la región promotora, la región operadora, los genes estructurales, y la región terminadora. La región operadora es donde se une la molécula represora impidiendo el paso del complejo de la RNA polimerasa hacia los genes estructurales. La transcripción de los genes del operón *lac* se da hasta que el represor, producto del gen *lac I*, ubicado fuera del operón, se une a la secuencia operadora; dicho represor se mantiene ahí hasta que es inactivado por una molécula inductora, con lo que se separa de la región operadora y permite la síntesis del RNA del operón. (Lewin, 1992) (fig. 12)

CONTROL NEGATIVO POR ANTITERMINACION

Para que el fago lambda se integre al genoma de la bacteria y se establezca la lisogenia, es necesario que se sintetice la enzima integrasa, producto del gen *int* del fago. El RNA del gen *int* puede ser sintetizado a partir de 2 promotores distintos: p_i y p_L . Cuando la síntesis inicia en p_i , el transcrito termina en el terminador t_i , pudiéndose expresar la integrasa. Sin embargo, cuando el gen se transcribe iniciando en p_L , por efecto de la proteína N la transcripción se prolonga mas allá de t_i , transcribiéndose también una secuencia ubicada en la región b del DNA del fago, conocida como *sib*, que significa sitio

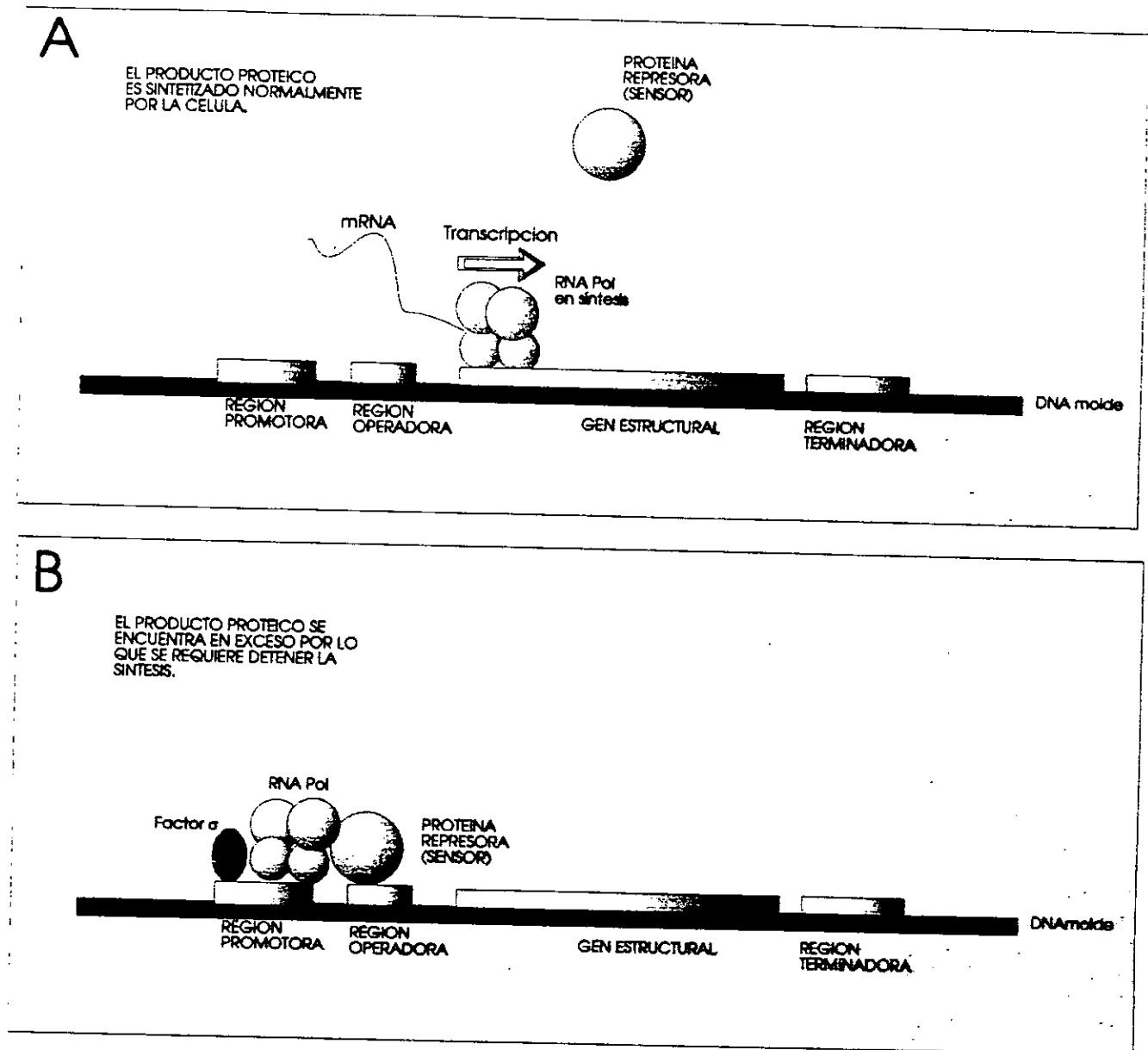


Figura 12. Control negativo por represión. Bajo ciertas condiciones el producto proteico es sintetizado normalmente por la célula en ausencia de represión (arriba). Cuando la molécula "sensora" o el mismo producto, se unen a la región operadora del operón (abajo), es decir, cuando el producto de la expresión del gen ya no es requerido, se reprime la expresión no permitiéndole el paso a la RNA polimerasa de la región promotora a los genes estructurales.

inhibidor en **b**. Al transcribirse la región **sib** se forma una estructura secundaria en el RNA que hace a dicho RNA susceptible de la degradación iniciada por la RNasa III y continuada por una exonucleasa, degradándose rápidamente el RNA y por tanto, no se sintetiza la proteína integrasa. Este fenómeno, conocido como **retroregulación** es un ejemplo de control negativo por antiterminación, ya que debido a la actividad de la proteína antiterminadora N el RNA es degradado más rápidamente debido a que se transcribe la secuencia **sib** (Guameros, et al 1982, Echols y Guameros, 1983). La secuencia **sib** es un mecanismo de control de la expresión del gen *int* que actúa en *cis*, debido a que al estar presente en el mRNA, se favorece la degradación del mismo (fig. 13).

DEGRADACION DEL RNA MENSAJERO

Como mecanismo de control de la expresión génica, debemos considerar también la importancia del decaimiento de los RNA mensajeros ya que, mientras mayor sea la vida media de éstos, puede existir una mayor traducción de ellos con el consecuente aumento en la síntesis de la proteína producto de dicho gen. Así, aunque la síntesis de RNA mensajeros sea la misma, si los mensajeros son más estables, habrá un aumento en la traducción, con mayor síntesis proteica; por el otro lado, si dichos mensajeros son degradados más rápidamente, los niveles de la proteína serán menores. Además, el aumento en la traducción de los mRNA por lo general incrementa su vida media, como por ejemplo, en el caso reportado por Rapaport y Mackie, 1994.

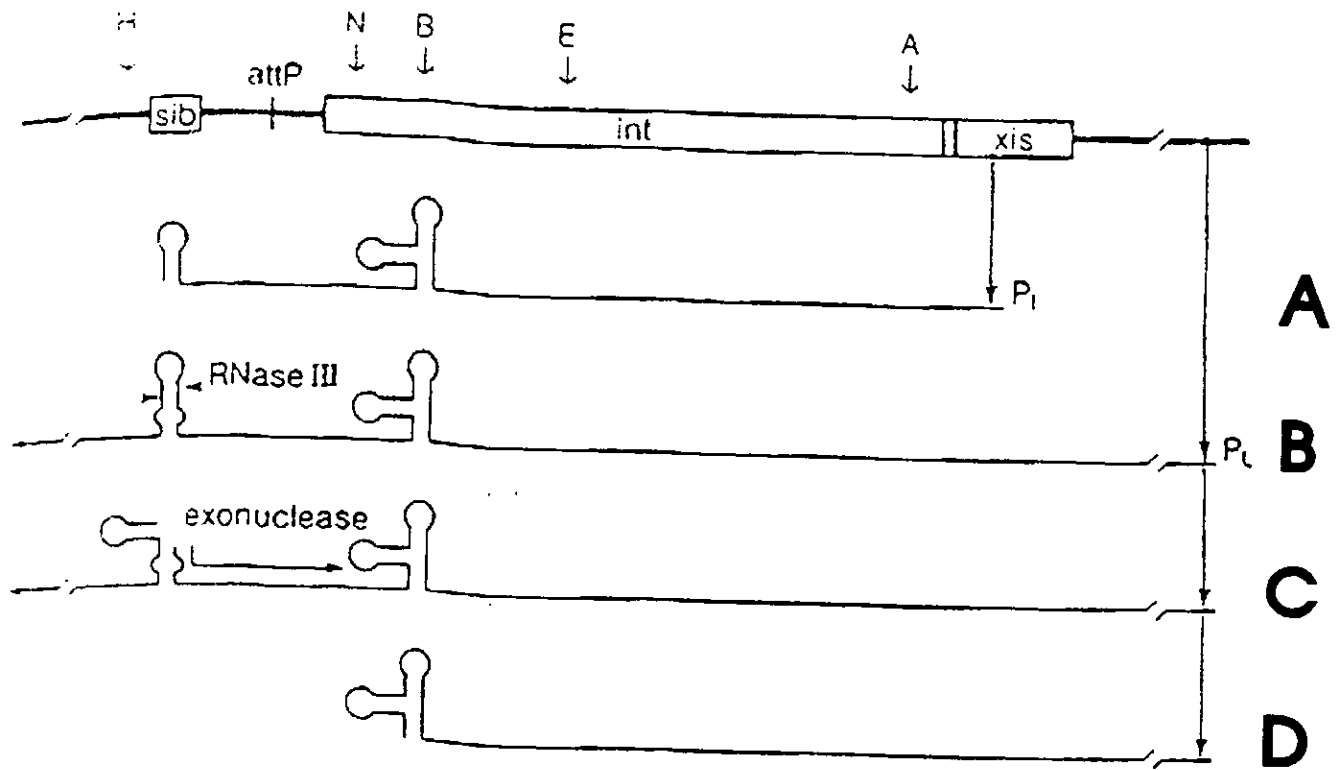


Figura 13. Retroregulación por *sib*. Cuando el gen *int* se transcribe a partir del promotor p_i , el transcrito termina en el terminador t_i , y el transcrito es estable (A). Si la transcripción sobrepasa al terminador, se forma la estructura *sib* que es sustrato de corte de la RNasa III (B), y se libera un extremo 3', que permite la degradación del mRNA desde ese sitio hasta una estructura de tallo-burbuja dentro del transcrito del gen *int* (C), quedando éste transcrito truncado (D).

Existen muchos factores que determinan la vida media de un mensajero, como la secuencia misma del RNA y las enzimas nucleolíticas. Se ha probado que ciertas secuencias del RNA lo vuelven más o menos sensible a la degradación, como son las secuencias que generan estructuras secundarias, o poliadenilación del RNA. Entre las estructuras secundarias, algunas confieren mayor estabilidad impidiendo la degradación por parte de enzimas nucleolíticas (por ejemplo, Plámann y Stauffer, 1990) mientras que otras promueven la degradación por ser sustrato de enzimas nucleolíticas (Guameros *et al*, 1982).

Respecto a la poliadenilación, éste es un fenómeno que se creía exclusivo de eucariontes, aunque en fechas recientes se ha reportado la existencia de secuencias de poli-adenina en el extremo 3' de mensajeros procariontes, y se les ha asociado, en algunos casos con una mayor degradación de los mensajeros al interactuar con la proteína pcnB (Hajnsdorf, *et al*, 1995, Xu y Cohen, 1995).

En la degradación del RNA intervienen enzimas denominadas **Ribonucleasas (RNAsas)**, las cuales pueden ser divididas en dos categorías diferentes: **endorribonucleasas** y **exorribonucleasas** (Belasco y Higgins, 1988) (fig. 14). Las **endorribonucleasas** son enzimas que pueden realizar cortes en el RNA en sitios internos del mismo y generan fragmentos discretos al hacer sus cortes; además, no requieren extremos 5' o 3' del RNA para realizar su actividad. Las **exorribonucleasas** son enzimas que remueven nucleótidos del RNA de manera secuencial a partir de su extremo 3'. De hecho, todas las **exorribonucleasas** conocidas hasta el momento tienen actividad en sentido 3'→5'.

Entre las **endorribonucleasas** que degradan mRNA de procariontes, se encuentra a la RNasa III, formada por dos subunidades α de 25 kDa cada una, cuyo sustrato se ha

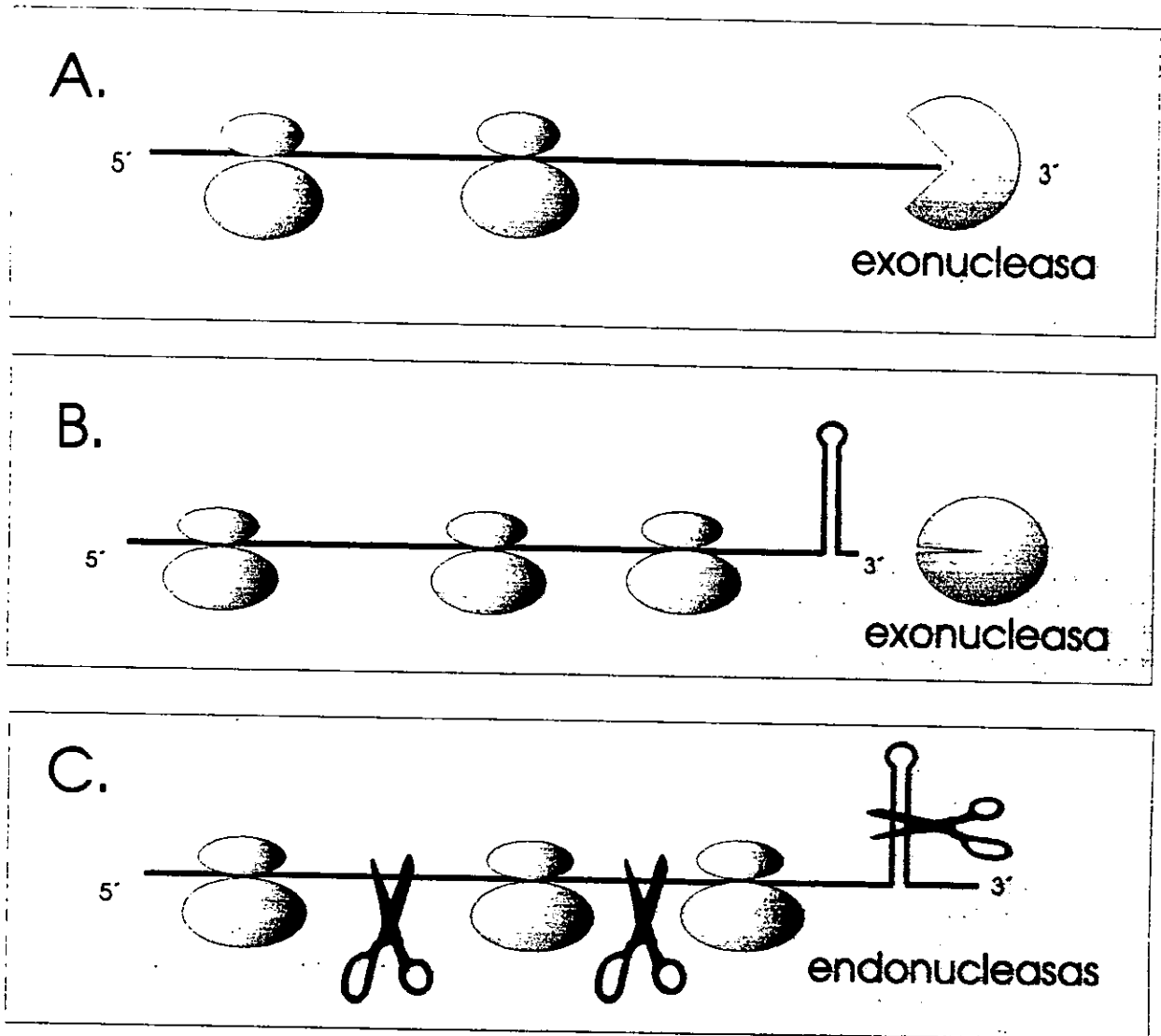


Figura 14. Endorribonucleasas y exorribonucleasas. Las exorribonucleasas son enzimas que degradan RNA usando como sustrato al extremo libre 3' (A), pero generalmente son sensibles a estructuras secundarias, como la formación de un tallo-burbuja (B). Las endorribonucleasas son enzimas que hacen cortes en sitios internos del RNA, y suelen ser resistentes a estructuras secundarias (C).

descrito como una estructura secundaria de tallo y burbuja, con un loop interno (Watson y Apirion, 1985, Robertson, 1982, Schweisguth, *et al*, 1994); la RNasa E, de 70 kDa, que corta mRNA en secuencias *consenso* localizadas cerca de estructuras de tallo-burbuja (Misra y Apirion, 1979, Regnier y Hajnsdorf, 1991, Hajnsdorf *et al*, 1994a) y que también participa en la regulación de su propia expresión (Mudd y Higgins, 1993); además de la RNasa K, de 55 kDa, que corta en zonas ricas en adenina y uracilo (Lundberg *et al*, 1990), y la RNasa M, un monómero de 26 kDa (Cannistraro y Kennell, 1989).

Las **exorribonucleasas** más importantes en procariontes son la RNasa II y la Polinucleótido fosforilasa (o PNPasa) (McLaren *et al*, 1991). La RNasa II, que varía entre 70 y 90 kDa, contribuye con el 90% de la degradación de los RNA, aunque es ligeramente sensible a la estructura secundaria del RNA (Deutscher, 1990, Deutscher y Racher-Reuven, 1991)

La PNPasa se encuentra en dos formas activas: la forma A, que es un trímero de subunidades α de 86 kDa cada una, y la forma B, que incluye además del trímero de la forma A, un dímero de subunidades β de 48 kDa cada una. El núcleo catalítico de la enzima se halla en las subunidades α (Littauer y Soreq, 1982). Las subunidades β de la PNPasa posee una actividad de enolasa y no se ha detectado que posea afinidad por el RNA, por lo que su función en el complejo denominado **degradosoma**, el cual está formado por la PNPasa, la helicasa RhlB, la polifosfato cinasa (PPK) I y la RNasa E, no ha sido establecida (Carpousis *et al*, 1994, Py *et al*, 1994, Py, *et al.*, 1996, Blum, *et al*, 1997). La PNPasa es más resistente que la RNasa II a la estructura secundaria en el extremo 3', aunque se ha demostrado que en ciertas estructuras de tallo-burbuja, se unen factores que inhiben la actividad de la PNPasa (Causton *et al*, 1994).

La PNPasa tuvo un papel histórico muy importante en la identificación del código genético debido a que posee la actividad única de polimerización de ribonucleótidos difosfato formando largos polímeros (Sulewski *et al*, 1989) Aprovechando ésta actividad, se le usó para formar mRNA quiméricos con secuencias determinadas por los investigadores, a fin de identificar para que aminoácido codifica cada codón del mRNA.

A pesar de que el 90% de la degradación de los mRNA se debe a la actividad de la RNasa II, resulta interesante el hecho que la ausencia de la RNasa II de la célula (mutantes RNasaII⁻) o la falta de la PNPasa (mutantes PNPasa⁻) no afecta la viabilidad de la bacteria o la tasa de degradación de los mRNA, mientras que la falta de ambas enzimas (cepas RNasaII⁻ PNPasa⁻) es letal ya que hay gran acumulación de los mRNA (Kinscherf y Apirion, 1975, Donovan y Kushner, 1986, Portier, 1980). Hay evidencias que indican que existe cierta especificidad de sustrato entre la RNasa II y la PNPasa (Mackie, 1989, Guameros y Portier, 1991).

El control de la expresión de la PNPasa es muy interesante, ya que se ha evidenciado que la enzima se autorregula post-transcripcionalmente (Takata *et al*, 1985, Takata *et al*, 1987, Portier *et al*, 1987, Takata *et al*, 1989, Robert-Le Meur y Portier, 1994). El mecanismo de autorregulación de la PNPasa requiere dos eventos forzosos: en primer lugar, la RNasa III corta una estructura de tallo-burbuja localizada en el extremo 5', 82 nucleótidos antes del codón de iniciación AUG (Hajnsdorf *et al*, 1994b); en segundo lugar, es necesaria la presencia de la PNPasa, probablemente uniéndose al mRNA cortado por RNasa III, o para degradar parcialmente, en sentido 3'→5', el mensajero a partir del corte hecho por RNasa III. Si uno de los dos factores no se halla presente, la traducción del mensajero prosigue, con lo que se produce un exceso de PNPasa. Al hacerse el corte por

Rnasa III en el mRNA, al parecer se induce un cambio conformacional, que puede permitir a la PNPasa unirse a el mRNA procesado, evitando su traducción. La degradación 3'→5' del mRNA por acción de la PNPasa no es el mecanismo mediante el cual se da el control de la expresión del mensajero, sino que es más probable que el control sea traduccional. El modelo propuesto por Robert-Le Meur y Portier describe que al hacer el corte la Rnasa III, el cambio conformacional del mRNA le permite a la PNPasa unirse, con lo que se impide la entrada de los ribosomas; al no haber ribosomas en el mRNA, éste se volvería más sensible a la acción de endonucleasas, con lo que se degrada el mRNA. La acción de exonucleasas sobre el mensajero no parece ser la causa de la degradación ya que en cepas que carecen de PNPasa (*pnp*⁻), los mRNA de un plásmido que posee una fusión del gen *pnp* con *lacZ* son estables, a pesar del corte hecho por RNasa III.

PNPasa y *sib*.

Participación de la polinucleótido fosforilasa en la regulación del gen *int* del bacteriófago lambda.

Al transcribirse la secuencia *sib*, ubicada en posición 3' del gen *int*, se produce un fenómeno denominado **retorregulación**. La retorregulación es un proceso que fue descrito para la expresión del gen *int* del fago lambda, y depende de *sib*: cuando el gen *int* se transcribe hasta el terminador t_1 se forma una estructura de tallo burbuja en el mRNA, y que es resistente a la degradación por la RNasa III; por efecto de la antiterminación producida por la proteína N, la transcripción que inicia en p_L continúa a través de t_1 , hasta la región *b*, incluyendo a *sib*. Una vez que la secuencia *sib* es transcrita en el mRNA se forma una estructura de tallo y burbuja que es sensible a la actividad de la RNasa III, generándose un sustrato para la actividad de una exonucleasa, muy probablemente, la PNPasa (Guameros, *et al*, 1988) (fig. 13). El efecto de *sib* es en *cis*, ya que la presencia de la secuencia *sib* en el mRNA promueve la degradación del mismo.

Al aislar mutantes en *sib* que revierten el efecto en *cis* de ésta región. se encontró la mutación denominada *sib 1*, que es un cambio de una citosina por una adenina, y modifica la secuencia reconocida por la RNasa III (Montañez *et al*, 1986).

Para conocer la manera en que la secuencia t_1 -*sib* afecta la expresión génica *in vivo*, se clonó la región t_1 -*sib* en el sitio Sma I del plásmido pKG1800, localizado entre el promotor *pgal* y el gen reportero *galK*, obteniéndose el plásmido pUS6, en el cual la expresión de la galactocinasa se reduce hasta en un 94%, *in vivo*. Esta reducción de la expresión se

debe principalmente a la terminación de la transcripción que se presenta en el terminador t_t : el transcrito que pasa el terminador t_t y que es traducido representa sólo el 6% con respecto al plásmido que no posee el terminador (pKG1800) (fig. 15).

Al clonar una secuencia que incluye a t_t , pero con la mutación **sib 1** (plásmido pMS1), la expresión de la galactocinasa se eleva a 36% respecto a la expresión de *galK* por pKG1800, lo que es un aumento de 6 veces con respecto a la que se presenta con pUS6. Este aumento en la expresión se debe en parte a que los transcritos que poseen **sib 1** son más estables que los que tienen a **sib** (García-Mena, 1992).

Con la finalidad de aislar bacterias que reviertan el efecto de la mutación **sib 1** se mutagenizó a la cepa S165 y se aislaron, entre otras, a las cepas denominadas SGM9, SGM12, SGM71 Y SGM98 cuya expresión del reportero *galK* del pMS1 se encuentra disminuida, siendo de 3, 4, 7 y 4%, respectivamente, de la expresión de galactocinasa de pKG1800 (García-Mena, 1992), siendo similar al 6% de expresión de *galK* a partir del pUS6. Se ha caracterizado a la cepa SGM71 y se sabe que la mutante se encuentra afectada a nivel de autorregulación de su expresión, con lo que presenta una actividad de PNPasa al menos 7 veces mayor que la cepa silvestre (García-Mena, *et al*, 1998b). Además, en ensayos de polimerización *in situ* se observó que la mutante presenta una migración electroforética alterada, bajo condiciones no desnaturalizantes, respecto a la silvestre. Al secuenciar el gen *pnp* de la mutante SGM71 se identificó que tiene una transición de una G por una A en la posición 2372 del gen, la cual causa un cambio del aminoácido 570 de la PNPasa, una glicina, por un ácido aspártico (García-Mena, *et al*, 1998a). La mutación se encuentra en el dominio más conservado de la PNPasa, el dominio KH, el cual parece estar involucrado en la unión al RNA y la formación de

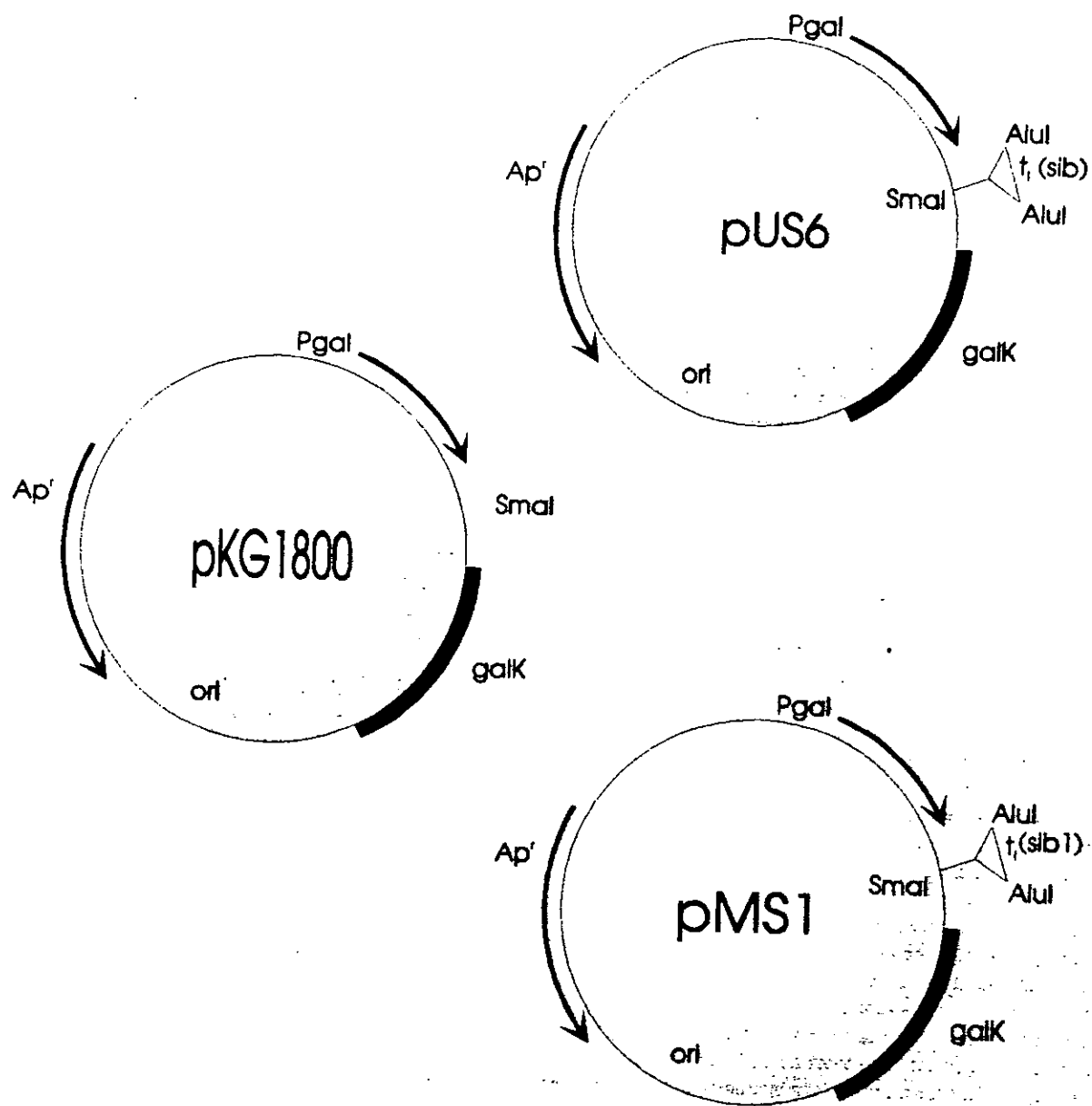


Figura 15. Mapas de los plásmidos pKG1800, pUS6 y pMS1. El plásmido pKG1800 es un plásmido que lleva al gen reportero *galK* clonado junto a su promotor *pgal*, y el marcador de selección de resistencia a ampicilina. pUS6 es un plásmido derivado del pKG1800 que tiene clonada la secuencia *t₁* del fago λ en el sitio *Sma* I entre el promotor *pgal* y el gen *galK*. El plásmido pMS1 es homólogo al pUS6, excepto que la secuencia *t₁-sib* clonada lleva la mutación *sib 1*.

complejos proteicos, y afecta la autorregulación de la expresión de la PNPasa, al parecer porque disminuye la afinidad de la PNPasa por su mRNA, con lo que la concentración de la PNPasa se incrementa (Robert-Le Meur y Portier, 1994). En ensayos realizados con fusiones traduccionales del gen reportero *lacZ* con la región 5' del operón *pnp*, en bacterias *pnp*⁻, se observó que la PNPasa silvestre inducida en *trans* regulaba la expresión de la fusión PNPasa-Galactocinasa, reprimiéndola hasta 13 veces respecto a la expresión en ausencia de PNPasa, mientras que la PNPasa⁷¹ sólo reprimía la expresión 3 veces (García-Mena, *et al*, 1998a).

De manera paralela, se trató de mapear, mediante ensayos de transducción generalizada, a las mutaciones de las cepas SGM9, SGM12 y SGM98, hallándose que en las dos últimas al parecer la mutación se halla cerca o en el gen *pnp*, ya que las mutaciones cotransducían con las regiones cercanas a *pnp* y *NusA* (Rosas, 1994).

En base a los resultados anteriores, el objetivo del presente estudio fue caracterizar parcialmente a la enzima PNPasa de las mutantes SGM12 y SGM98 para evaluar si la enzima está alterada en las mutantes.

Resulta de importancia conocer mejor la regulación de la expresión y actividad de la PNPasa tanto por el conocimiento de ésta enzima, como por los usos prácticos que se pueden dar a las cepas mutantes en *pnp*, como lo muestra el trabajo de Hautala, *et al*, 1979, en que la expresión de un gen eucarionte en *E. coli* se incrementó 100 veces al usar mutantes *pnp*⁻.

OBJETIVOS

GENERAL: Caracterizar parcialmente a las cepas mutantes de *E.coli* SGM12 y SGM98.

PARTICULARES: Caracterizar a las cepas SGM12 y SGM98 de acuerdo a su resistencia a antibióticos, su utilización de la galactosa, el patrón electroforético de sus extractos proteicos, sus actividades de polimerización *in situ* y de intercambio de fósforo de la PNPasa, comparativamente con la cepa silvestre S165 y la mutante SGM71.

Amplificar el gen *pnp* de las cepas mutantes SGM12, SGM71 y SGM98, y de la S165 (silvestre), por la técnica de PCR, a fin de que posteriormente sean secuenciados.

MATERIALES Y METODOS

A. Cepas y plásmidos.

	Fenotipo	Fuente
S165	<i>gal</i> KTE ⁻ str ^r	Shapiro y Adhya 1969
SGM 12	S165 mutante	García Mena, 1992
SGM 71	S165 mutante	García Mena, 1992
SGM 98	S165 mutante	García Mena, 1992
S165 pUS6	S165- <i>sib-galK</i> ⁺	Este trabajo
S165 pMS1	S165- <i>sib1-galK</i> ⁺⁺	Este trabajo
S165 pKG1800	S165- <i>galK</i> ⁺⁺⁺	Este trabajo
SGM12 pUS6	SGM12- <i>sib-galK</i> ⁺	Este trabajo
SGM12 pMS1	SGM12- <i>sib1-galK</i> ⁺	Este trabajo
SGM12 pKG1800	SGM12- <i>galK</i> ⁺⁺⁺	Este trabajo
SGM71 pUS6	SGM71- <i>sib-galK</i> ⁺	Este trabajo
SGM71 pMS1	SGM71- <i>sib1-galK</i> ⁺	Este trabajo
SGM71 pKG1800	SGM71- <i>galK</i> ⁺⁺⁺	Este trabajo
SGM98 pUS6	SGM98- <i>sib-galK</i> ⁺	Este trabajo
SGM98 pMS1	SGM98- <i>sib1-galK</i> ⁺	Este trabajo
SGM98 pKG1800	SGM98- <i>galK</i> ⁺⁺⁺	Este trabajo

⁺: baja expresión de *galK*; ⁺⁺: mediana expresión de *galK*; ⁺⁺⁺: alta expresión de *galK*

Las cepas bacterianas utilizadas se detallan en la tabla 1.

Tabla 1. Cepas bacterianas.

El plásmido pKG1800 (McKenney *et al*, 1981), el pUS6 (Schmeissner *et al*, 1984) y el pMS1 (Montañez *et al*, 1986) fueron obtenidos de la colección de la Dra. Cecilia Montañez, CINVESTAV-IPN. El plásmido pKG1800 es un plásmido de alto número de copias que posee el gen reportero *galK*, que codifica para la enzima galactocinasa, bajo el control del promotor *pgal*; como marcador de selección posee un gen de resistencia a ampicilina. pUS6 es un plásmido que posee clonada entre *pgal* y *galK* un fragmento de

242 pares de bases que comprenden a la secuencia **sib** del fago lambda (bases 27724 a 27482) (Daniels *et al*, 1983); como consecuencia de la presencia de esta secuencia entre el promotor y el gen la expresión de *galK* decrece hasta ser sólo el 6% de la expresión *in vivo* de *galK* del pKG1800. El plásmido pMS1 es análogo a pUS6, pero posee clonada la secuencia **sib** con la mutación **sib1** (Montañez *et al*, 1986); la expresión de *galK* en éste plásmido es del 36% de la expresión de pKG1800, es decir, 6 veces más que la expresión de galactocinasa de pUS6. (fig. 17).

B. Medios de cultivo y soluciones.

1. Medios de cultivo.

Medio Luria. Las cepas fueron cultivadas en medio de cultivo líquido y sólido Luria Broth (LB) consistente en NaCl 1% (peso/volumen), Triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0.5% (p/v), NaOH 1mM, disuelto en agua destilada y esterilizado por autoclave durante 20 minutos.

Medio McConkey-galactosa. El medio de cultivo para evaluar utilización de galactosa fue el McConkey-galactosa, consistente en base agar de McConkey al 4% (p/v) disuelto en agua, esterilizado por autoclave y suplementado con galactosa a una concentración final de 0.2% y esterilizado por filtración con filtros de 0.45 μ m.

Medio Triptona. El medio de cultivo Triptona fue preparado con Bactotriptona al 1%, NaCl al 1%, esterilizado mediante autoclave por 20 minutos; en el caso del medio Triptona-Galactosa se añadió 1 g de galactosa al medio Triptona y se esterilizó por filtración con filtros de 0.45 μ m.

Antibióticos. Según el caso, a los medios de cultivo se les adicionaron los siguientes antibióticos a una concentración final de 50 µg/ml: ampicilina, tetraciclina y estreptomina. La cepa S165 y sus derivadas son resistentes a estreptomina, por lo que en los cultivos de tales cepas se usó siempre este antibiótico. La ampicilina se usó para seleccionar las bacterias transformadas con los plásmidos pKG1800, pUS6 y pMS1. La tetraciclina fue utilizada como un control negativo ya que ninguna cepa debía ser resistente a éste antibiótico.

2. Transformación.

Solución TSS. Medio LB 1X, polietilenglicol (PEG 3350 u 8000) 10%, dimetilsulfóxido (DMSO) 5%, MgCl₂ 50mM, ajustado a pH 6.5 y esterilizado por filtración a través de filtros de 0.45 µm (Chung *et al*, 1989).

Solución TSS-glucosa. TSS 1X, glucosa 20mM, filtrado con filtros de 0.45 µm.

3. Extractos proteicos.

Amortiguador Ia. TRIS-Base 0.1M, NaCl 0.1M, EDTA 0.1mM, β-Mercaptoetanol 1 mM, ajustado a pH 8.0 y filtrado mediante filtros de 0.45 µm.

Colorante Bradford 5X. Metanol 25%, ácido fosfórico 50%, azul brillante Coomassie G250 25%.

Amortiguador de muestra para proteína 5X. TRIS.HCl 312.5 mM, SDS 10%, glicerol 50%, ajustado a pH 6.8.

Colorante para muestra de proteína. Azul de bromofenol 0.005% en agua.

4. Ensayos enzimáticos.

Amortiguador II. TRIS-Base 0.1M, ADP 10mM, MgCl₂ 10 mM, EDTA 0.1mM, a pH 8.0.

Mezcla ^{32}P -UDP. TRIS-Base 0.11M, MgCl_2 8.8mM, UDP 11mM, Na_2HPO_4 5.5mM, ^{32}P 0.275%, pH 8.0. El ^{32}P (370 Mbq 10 mCi) fue obtenido de la compañía ACCESOLAB (Cat. DuPont No. NEX-053H).

5. Ensayo de quimioluminiscencia.

Amortiguador TRIS-glicina-metanol (TGM). TRIS-Base 20mM, glicina 60mM, metanol 20%, a pH 8.0, en agua bidestilada estéril y filtrado a través de filtros de 0.45 μm .

Amortiguador de fosfatos y NaCl (PBS). Na_2HPO_4 58mM, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 17mM, NaCl 68mM, en agua bidestilada estéril.

Amortiguador de bloqueo. Reactivo I-Block (del Kit Western Light de la compañía TROPIX) 0.2%, PBS 1X, Tween-20 0.1%.

Amortiguador de lavado. PBS 1X, Tween-20 0.1%.

6. Extracción de DNA cromosomal

SSC 1X. NaCl 150mM, citrato de sodio 0.441%, e pH 7.0 en agua bidestilada estéril.

Amortiguador de lisis. SSC 1X, EDTA 10mM, sacarosa 27%, en agua bidestilada estéril.

Amortiguador EcoRI (condiciones de reacción). NaCl 50mM, TRIS.Hcl 100mM, MgCl_2 10mM, Tritón X-100 0.025%, a pH 7.5 en agua bidestilada estéril.

C. Preparación de células competentes y transformación.

Las cepas S165, SGM12, SGM71 y SGM98 fueron transformadas con los plásmidos pUS6, pMS1 y pKG1800 de acuerdo a dos protocolos diferentes: con CaCl_2 (modificado de Maniatis *et al*, 1989), y con el método de TSS (Chung, *et al*, 1989).

Método de CaCl_2

Se inocularon tubos con 3 ml de medio de cultivo líquido Luria Broth (LB) con una colonia de cada cepa por transformar y se incubaron en un baño de agitación durante toda la noche a 37°C . El cultivo se diluyó 1:100 en medio Luria y se incubó con agitación constante por aproximadamente 2 hr., hasta que la densidad óptica a 600 nm ($\text{DO}_{600 \text{ nm}}$) fuera cercana a 0.5. El cultivo se centrifugó a 6000 g durante 10 minutos para formar una pastilla de bacterias; se decantó el sobrenadante (SN) y se resuspendió con cuidado la pastilla en medio volumen de CaCl_2 100 mM a 4°C . La suspensión celular se incubó durante 30 minutos en hielo y se centrifugó a 6000 g durante 10 minutos; el SN se decantó y la pastilla se resuspendió en un décimo de volumen de CaCl_2 100 mM y se incubó de 12 a 18 hr a 4°C . Pasado éste tiempo, las células alcanzaron el máximo nivel de competencia y se procedió a colocar $200\mu\text{l}$ de bacterias competentes en un tubo de cultivo; ahí se añadió el DNA del plásmido (aproximadamente 50 ng); se incubó 15 minutos en hielo, tras los cuales, los tubos se colocaron en baño maría a 42°C durante 90 segundos incubando en hielo durante 15 minutos más; entonces se añadió 1 ml de LB y se incubó a 37°C durante 1 hr. De la mezcla de transformación se espatularon 10 y $100\mu\text{l}$ en cajas de Petri con medio LB suplementado con ampicilina, para seleccionar a las bacterias transformantes.

Las cajas se incubaron a 37°C durante toda la noche. Se contaron las colonias transformantes y se determinó el rendimiento de la transformación con la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia de transformación} = \frac{\text{No. colonias} \times 1100}{\mu\text{l espatulados} \times \mu\text{g ADN}}$$

Método de TSS.

Para transformar a las cepas se usó también el método de Chung, *et al*, 1989: 3 ml de medio líquido LB se inocularon con una colonia de la cepa a transformar y se incubó con agitación toda la noche a 37°C. Entonces, se hizo una dilución 1:100 del cultivo en LB y se incubó con agitación a 37°C hasta que la DO_{600 nm} fuera de 0.3-0.4. Las células se centrifugaron a 6000 g durante 10 minutos a 4°C.; se decantó el SN y la pastilla se resuspendió en un décimo de volumen de TSS a 4°C.

Alícuotas de 500 μl se separaron y congelaron a -70°C, conservándose a esa temperatura hasta que se utilizaron, sin que el tiempo de almacenamiento fuera mayor a 3 meses.

Para utilizar las células, se descongelaron en agua de hielo; una vez descongeladas las células, se pusieron 100 μl en un tubo de cultivo en hielo y se añadió el DNA (50 ng aproximadamente). Se incubaron las muestras 30 minutos en hielo y se adicionaron 900 μl de TSS-Glucosa; los tubos se incubaron con agitación moderada durante una hora.

Se espatularon 100 y 200 μl de la mezcla de transformación en cajas de Petri con medio selectivo, las cuales se incubaron toda la noche a 37°C. Pasado éste tiempo, se contaron las colonias y se obtuvo la eficiencia de transformación mediante la siguiente relación:

$$\text{Eficiencia de transformación} = \frac{\text{No. colonias} \times 1000}{\mu\text{l espatulados} \times \mu\text{g ADN}}$$

D. Análisis fenotípico de las cepas.

Resistencia a antibióticos. Las cepas S165 (silvestre), SGM12, SGM71 y SGM98 (mutantes), sin plásmido, así como las que fueron transformadas por los plásmidos pUS6, pMS1 y pKG1800, se sembraron en medios de cultivo LB (en caja de Petri y en líquido) suplementados con uno de tres diferentes antibióticos (estreptomicina, ampicilina o tetraciclina a 50 µg/ml), para determinar la resistencia de las cepas a los antibióticos. Las cajas de Petri y los tubos con medio de cultivo inoculados se incubaron a 37°C durante 15 hr y se evaluó la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano.

Morfología colonial y utilización de galactosa. Las cepas S165, SGM12, SGM71 y SGM98, sin plásmido, al igual que las que se habían transformado por los plásmidos pUS6, pMS1 y pKG1800, se sembraron en cajas con medios de cultivo LB estreptomicina y MacConkey-Galactosa-Estreptomicina, a fin de evaluar la capacidad de las cepas de utilizar galactosa como fuente de carbono. Como las cepas carecen de los genes *galK*, *galT* y *galE*, no pueden utilizar la galactosa como fuente de carbono. Se incubaron las cajas a 37°C durante 15 hr, y se analizó el diámetro y color de las colonias.

Las cepas antes mencionadas también se sembraron en cajas de Petri con medio Triptona y Triptona-Galactosa y se incubaron a 37°C durante 12 hr.

Debido a que las cepas son *galKTE*⁻, al ser transformadas con plásmidos que poseen el gen *galK*, son capaces de sintetizar la enzima galactocinasa, encargada de fosforilar a la galactosa; en presencia de galactosa, dichas cepas transformantes acumulan galactosa-

1-fosfato ya que no la pueden metabolizar, y en grandes cantidades causa bacteriostasis; así, las cepas que sintetizan poca galactocinasa (las que poseen el plásmido pUS6) crecen casi igual que las cepas sin plásmido, y las cepas con alta síntesis de galactocinasa (pKG1800) no crecen en medio con galactosa. En éste ensayo se evaluó el tamaño y forma de las colonias, a fin de identificar si hay disminución de la expresión del gen *galK* en las mutantes que poseen el plásmido pMS1, comparándolas con la cepa silvestre S165-pMS1.

E. Preparación de extractos proteicos en fase exponencial y en fase estacionaria.

Para obtener extractos crudos proteicos de las cepas se usó una modificación a la técnica de Thang, *et al*, 1967. Los extractos se obtuvieron mediante sonicación, tanto en fase de crecimiento exponencial como en fase estacionaria, para analizarlos por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, y en ensayos de polimerización *in situ*, así como para cinéticas enzimáticas de intercambio de fósforo y para la quimioluminiscencia de Slot-Blot.

Para obtener los extractos proteicos se inocularon 20 ml de LB con una colonia de la cepa a utilizar y se incubaron con agitación a 37°C durante toda la noche. Para obtener el extracto crudo de bacterias que se hallaran en fase exponencial de crecimiento, se hizo una dilución del cultivo en LB a fin de que la $DO_{600\text{ nm}}$ fuera aprox. 0.1, y se incubaron hasta que la $DO_{600\text{ nm}}$ fuera de 0.3-0.4. En el caso de los extractos de bacterias en fase estacionaria, se usaron directamente las bacterias incubadas toda la noche.

El cultivo se centrifugó a 7000 g durante 10 minutos y se decantó el SN; el tubo se dejó invertido sobre un trozo de papel durante un minuto, tras lo cual la pastilla se resuspendía en Amortiguador la ajustando la $DO_{600\text{ nm}}$ a 1.0.

La suspensión bacteriana se sonicó a 12 micrones, por 8 ciclos (para los cultivos de fase exponencial) o 12 ciclos (para los de fase estacionaria) de 15 segundos cada uno, con descansos de 10 segundos entre cada periodo de sonicación. Para eliminar los restos celulares se centrifugó el sonicado a 20000 g durante 15 minutos.

Se transferían alícuotas de 500 μ l a tubos eppendorf de 1.5 ml y se congelaron a -70°C . Para utilizar los extractos, se descongelaron y conservaron siempre en hielo.

Determinación de la concentración proteica de los extractos mediante el método de Bradford en placas de ELISA.

Se determinó la concentración proteica de los extractos crudos de las cepas en estudio mediante la técnica descrita por Bradford, 1976, usando el kit "Bio-Rad Protein Assay Kit II" de la compañía Bio-Rad (No. Cat. 500-0002).

Se preparó una curva patrón usando Albúmina Sérica Bovina (ASB), con las siguientes concentraciones de ASB: 21, 28, 42, 49, 54 y 69 $\mu\text{g/ml}$ en Amortiguador la. Se hicieron diluciones 1:5 (200 μ l de extracto con 800 μ l de Amortiguador la) de las muestras a analizar y se colocaron 800 μ l de cada dilución de la curva patrón, así como de las muestras de estudio, en tubos eppendorf de 1.5 ml. Se prepararon tubos blanco con 800 μ l de Amortiguador la. En éste punto se añadían 200 μ l de colorante Bradford 5X (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate) y se mezcló el contenido de cada tubo usando un vortex. A partir de éste momento se empezó a contar el tiempo, ya que el color

se desarrolla con respecto a éste. La lectura se realizó en un tiempo de media hora a partir del momento en que se mezclaron los tubos.

Se vaciaron 200 μ l de la mezcla en cada pozo de una placa de ELISA, y se leyó la densidad óptica de la placa en una lectora de ELISA con un filtro de longitud de onda de 570 nm. Los resultados se interpolaron contra la curva patrón de concentración de proteína para obtener la concentración de proteína de las muestras problema. Como la curva patrón y las muestras se analizaron al mismo tiempo no era necesario estandarizar los tiempos de reacción.

A fin de determinar si había mayor concentración proteica por célula, o variaciones en la eficiencia de sonicación, se hizo primero un conteo viable de células para definir el número de células de cada cepa que tienen una $DO_{600\text{ nm}}$ de 1.0. Se prepararon cultivos de las cepas S165, SGM12, SGM71 y SGM98, y se ajustó su $DO_{600\text{ nm}}$ a 1.0. De éstos cultivos se hicieron diluciones del orden de 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} en medio de cultivo LB y se espatularon 100 μ l en cajas de Petri con LB. Se incubaron las cajas toda la noche a 37°C y se contaron las colonias presentes en cada caja. El número de células por ml correspondientes a una $DO_{600\text{ nm}}$ de 1.0 para cada cepa se obtuvo de acuerdo a la siguiente relación:

$$\text{No. celulas por ml para } OD_{600\text{ nm}} \text{ de } 1.0 = \frac{\text{No.colonias}}{\text{Indice de la dilución} \times 0.1 \text{ mlespatulados}}$$

Además, se resuspendió la pastilla producto de la centrifugación posterior a la sonicación en el volumen original de Amortiguador la y se leyó su $DO_{600\text{ nm}}$ para determinar la

eficiencia de sonicación para cada cepa. Los datos así obtenidos fueron analizados por las siguientes relaciones:

$$DO_{600nm} \text{ células sonicadas} = DO_{600nm} \text{ cultivo inicial} - DO_{600nm} \text{ pastilla resuspendida}$$

$$\text{No. células sonicadas por ml} = DO_{600nm} \text{ células sonicadas} \times \text{No. células para } DO_{600nm} \text{ de } 1$$

$$\text{Concentración de proteína por célula} = \frac{\text{conc. de proteína del extracto } (\mu\text{g/ml})}{\text{No. células sonicadas por ml}}$$

F. Análisis de proteína en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes.

Se prepararon geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 10% con dodecil sulfato de sodio al 0.1% (PAGE-SDS, por sus siglas en inglés), de acuerdo a Laemmli, 1970. Esto se realizó para separar las diferentes proteínas de las muestras del extracto crudo de las cepas en análisis, a fin de identificar diferencias en la migración electroforética o en la intensidad de las bandas de proteína en el gel.

Las muestras se prepararon a fin de obtener una comparación entre las concentraciones relativas de las bandas de proteína de una cantidad total constante de proteína (30 μg) y de la cantidad de proteína total equivalente a la extracción de un número de células constante (1.5×10^8 células). Para los carriles de los geles que contenían una cantidad de proteína constante (35 μg), las muestras se prepararon de la siguiente manera: se usó el volumen de los extractos proteicos que contuviera 35 μg de proteína, y se completó a

166 μ l usando Amortiguador Ia; se añadieron a cada muestra 11.25 μ l de β -mercaptoetanol, 1 μ l de colorante, y 45 μ l de amortiguador de muestras 5X.

Cuando se ajustó la cantidad de proteína equivalente al extracto de un número de células constante (1.5×10^8 células), se prepararon las muestras usando el extracto proteico necesario para contener suficiente proteína (se usó la relación de concentración de proteína por célula de cada cepa) y se completó a 166 μ l con amortiguador Ia; se añadieron a cada muestra 11.25 μ l de β -mercaptoetanol, 1 μ l de colorante, y 45 μ l de amortiguador de muestras 5X. Los marcadores de peso molecular (MPM) se prepararon con 2 μ l de MPM (μ g), a los cuales se añadieron 164 μ l de Amortiguador Ia, 11.25 μ l de β -mercaptoetanol, 1 μ l de colorante, y 45 μ l de amortiguador de muestras 5X. Se usaron marcadores preteñidos de pesos moleculares correspondientes a 18, 28, 46, 70 y 105 kDa. En todos los casos las muestras se hierven durante 10 minutos.

La migración electroforética de las muestras se analizó corriendo los geles a 15 mA durante 12 horas. Una vez terminada la corrida, los geles se tiñieron con una solución de azul de Coomassie 0.25%, Metanol 45%, ácido acético glacial 10%, en agua bidestilada, durante 30 minutos, destiñiendo los geles con una solución Metanol 45%, ácido acético glacial 10% en agua durante 1 hr, con cambios de solución cada 15 minutos.

G. Ensayo de polimerización *in situ*.

Se evaluó la actividad que tiene la PNPasa para unir al azar ribonucleótidos difosfato *in vitro*, en ausencia de fósforo inorgánico (P_i), y formar así poliribonucleótidos, con la técnica de Thang *et al*, 1967. Se hicieron geles de poliacrilamida al 10% en condiciones

no desnaturalizantes, preparados de acuerdo a Laemmli, 1970, y se usaron para separar las proteínas de los extractos crudos de los cultivos en fase estacionaria. Igual que en los geles PAGE-SDS, se colocaron muestras para cantidad de proteína constante (35µg) y de extracto de número de células constante (1.5×10^8 células), para analizar diferencias en la actividad de polimerización entre las cepas mutantes respecto a la cepa silvestre.

Para los carriles de los geles que contenían una cantidad de proteína constante (35µg), las muestras se prepararon usando el volumen de los extractos proteicos que contuviera 35µg de proteína, y completando a 163µl usando Amortiguador Ia; se agregaron 40µl de glicerol al 5% y 1µl de colorante. Para la preparación de las muestras que contenían una cantidad de proteína equivalente al extracto de un número de células constante (1.5×10^8 células), se usó el extracto proteico necesario para contener suficiente proteína y se completó a 160µl con amortiguador Ia; se añadieron a cada muestra 40µl de glicerol al 5% y 1 µl del colorante.

El corrimiento electroforético se hizo a 15 mA durante 12 hr, tras lo cual se incubaron los geles en Amortiguador II a 37°C con agitación leve por 19 hr. Transcurrido el tiempo de incubación, se fijaron los geles con ácido acético al 7% durante 15 minutos. La síntesis *in situ* de poli-A se reveló al colocar el gel 30 minutos en una solución de naranja de acridina 30µg/ml en agua, lavando el exceso de colorante en agua bidestilada (McMaster y Camichael, 1977).

H. ENSAYOS DE ACTIVIDAD DE INTERCAMBIO DE FOSFORO DE LA PNPasa.

Se evaluó otra actividad específica de la PNPasa, que es la capacidad de la enzima PNPasa para intercambiar *in vitro* el fosfato β de nucleótidos difosfato por fósforo del medio en presencia de P_i , de acuerdo al protocolo de Portier, 1980. El método usado fue el siguiente: se preparó una solución de UDP usando aproximadamente 50 mg de UDP disuelto en agua bidestilada, y ajustando el pH a 7.0 con NaOH. La concentración exacta de la solución de UDP se determinó por medio del espectrofotómetro Beckman DU65, leyendo la $DO_{262 \text{ nm}}$, con base en la relación: una $DO_{262 \text{ nm}}$ de 10 equivale a una concentración 1mM. Una vez determinada la concentración del UDP, se realizó la mezcla de ^{32}P -UDP.

Se colocaron en un tubo de vidrio, por duplicado, 90 μl de la mezcla de UDP con 10 μl de los extractos proteicos de los cultivos de fase exponencial y se incubaron a 37°C durante dos tiempos diferentes: 15 y 30 minutos. Además, se incluía un control negativo usando 10 μl de Amortiguador la en lugar de extracto proteico, e incubándolo durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo, la reacción se detenía con 500 μl de ácido perclórico y se colocaron los tubos en hielo. Se colectaron 10 μl de tres tubos diferentes tomados al azar para usarlos como referencia (INPUT) de radiactividad adicionada en el ensayo, y se transfirieron 600 μl de la reacción a tubos eppendorf de 1.5 ml.

A fin de eliminar el ^{32}P que no había sido intercambiado por acción de la PNPasa, se centrifugaron los tubos a 12000 g durante 2 minutos y se transfirieron 400 μl del SN a un tubo cónico, donde se les añadían 700 μl de H_2SO_4 1.4N; entonces se agitaron los tubos en un vortex, se agregaron 500 μl de molibdato de amonio 5% ($(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$) y se mezcló

el contenido de los tubos usando un vortex, tras lo cual se adicionaron 2 ml de butanol; se colocaron los tubos en el vortex durante 10 segundos y se dejó que se separaran las fases; entonces, se descartó la fase superior, de color amarillo, y se añadieron 2 ml de éter etílico, se mezcló con el vortex, y nuevamente se descartó la fase superior; se repitió una vez más la extracción con éter etílico y por último se transfirió 1 ml de la fase acuosa a un vial de centelleo. A los 3 viales de INPUT se les adicionaron 200 μ l de agua bidestilada.

La radiactividad de los viales se midió en un contador de centelleo Beckman usando un programa de lectura para ^{32}P con conteos de un minuto. Los datos se procesaron en base al siguiente procedimiento:

1o. Las cuentas por minuto (CPM) del INPUT se multiplicaron por 60, ya que en los 10 μ l del INPUT iban 1.667 μ l de la reacción original de 100 μ l; a las CPM de las muestras problema y del control se les multiplicó por 2.4, ya que en el ml que contenía cada vial, había 41.67 μ l de los 100 μ l de la reacción original de intercambio, obteniendo así las cuentas por minuto de cada muestra (CPMi), y las cuentas por minuto del control (CPM Control).

$$\text{CPM por } \mu\text{mol de } P_i = \frac{\text{CPM de INPUT} - \text{CPM del control}}{0.5 \mu\text{moles de } P_i \text{ en los } 100 \mu\text{l de reacción}}$$

2o. Se aplicó la siguiente relación para determinar las CPM por μ mol de P_i :

3o. Basados en los resultados de CPM por μ mol de P_i , y de CPM de cada muestra (CPMi) se obtuvieron los resultados de μ moles de P_i intercambiados por ml de extracto proteico de la siguiente manera:

$$\mu\text{moles de } P_i \text{ intercambiados por ml de extracto} = \frac{(\text{CPMi} - \text{CPM Control}) \times 100}{\text{CPM por } \mu\text{mol de } P_i}$$

4o. A los resultados de $\mu\text{moles de } P_i$ intercambiados por ml de extracto proteico se les multiplicó por 4, cuando se trató de las muestras que fueron incubadas durante 15 minutos, y por 2, en el caso de los resultados de las muestras que fueron incubadas durante 30 minutos. De esta manera, se obtenían los $\mu\text{moles de } P_i$ intercambiados por ml de extracto proteico por cada hora de incubación.

5o. Por último, se obtuvo el resultado de $\mu\text{moles de } P_i$ intercambiados por mg de proteína de los extractos, por hora, al dividir el resultado anterior entre la concentración proteica de cada extracto expresada en mg/ml.

1. Quimioluminiscencia de Slot-Blot de los extractos proteicos.

Para determinar la concentración de PNPasa en las muestras proteicas, se hicieron ensayos de Slot-Blot usando membranas PVDF. Se hicieron diluciones de las muestras proteicas de las cepas, usadas para los ensayos de intercambio de fósforo, en amortiguador Tris-Glicina-Metanol (TGM) a fin de que quedaran aproximadamente. 1, 0.1 y 0.01 ng de extracto proteico por cada 200 μl de dilución. Como control positivo se hicieron diluciones análogas de PNPasa^{silvestre} purificada mediante HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia), cortesía del Dr. Jaime García Mena.

Para hidratar la membrana de PVDF de 120x33 mm, se humedeció ésta en metanol absoluto, y se le adicionó agua bidestilada hasta que el metanol llegó a una concentración de 5%. La membrana se colocó entonces en amortiguador TGM y posteriormente se puso

en la cámara para Slot-Blot modelo Hybri-Slot Manifold 1052 MM de la compañía GIBCO-BRL. En éste punto se vaciaron, por duplicado, 200 μ l de las diferentes diluciones a fin de que en los pozos del aparato de Slot-Blot se agregaran 1, 0.1 o 0.01 ng de los diferentes extractos proteicos, y se hizo la transferencia conectando la cámara a una línea de vacío hasta que el líquido de los pozos se agotó; se añadieron 700 μ l de amortiguador TGM y se repitió el proceso. Las membranas se enjuagaron con PBS 1X y se incubaron las membranas en amortiguador de bloqueo durante una hora.

El anticuerpo primario se diluyó a una concentración de 1:12500 en amortiguador de lavado; se filtró usando filtros de 0.45 μ m, y se diluyó a la concentración final de 1:25000, mezclando 1:1 con amortiguador de bloqueo. Se incubó la membrana 30 minutos con la dilución del anticuerpo. Como anticuerpo primario se usó un anticuerpo monoclonal IgG hecho en conejo contra la subunidad α de la PNP (α -PNP), cortesía del Dr. Jaime García Mena.

La membrana se lavó 2 veces durante 10 minutos con amortiguador de bloqueo, y se diluyó el segundo anticuerpo a una concentración de 1:5000 en amortiguador de lavado; se pasó a través de filtros de 0.45 μ M y se llevó a la concentración final de 1:10000 al diluirlo 1:1 con amortiguador de bloqueo. La membrana se incubó en ésta solución durante 30 minutos. El anticuerpo secundario ligado a fosfatasa alcalina fue el WL10-R Cat. No. AC11-R de TROPIX (Ab de carnero contra IgG de conejo).

Se lavó la membrana 3 veces con amortiguador de bloqueo y se procedió a hacer el ensayo de quimioluminiscencia de los filtros producto del Slot-Blot usando el kit Western-Light de la compañía TROPIX.

El protocolo para la detección de proteínas por quimioluminiscencia, usando membranas PVDF, fue el indicado por el fabricante. Los tiempos de exposición usados fueron de 10, 20, 30 y 40 segundos, y 1, 2, 3, 4, 7 y 10 minutos de exposición de la película ortocromática KODAK para rayos X, dentro del intervalo de los 45 y 70 minutos después de la incubación con el sustrato quimioluminescente CSPD (Cat. No. CD050 de TROPIX).

J. Preparación de DNA cromosomal de las cepas S165, SGM12, SGM71 y SGM98, para los ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen *pnp*.

Para amplificar el gen *pnp* de las cepas en estudio mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se extrajo DNA cromosomal de las cepas de acuerdo a la técnica usada por el Dr. Jaime García Mena en su tesis doctoral.

En ésta técnica se inoculó medio de cultivo LB con las células de interés y se incubó a 37°C, con agitación, durante toda la noche. Las células se empastillaron con agitación a 4000 g durante 10 minutos; se decantó el SN y se resuspendieron las células en una quinta parte del volumen de amortiguador SSCE (SSC 1X EDTA 1 mM). Se recentrifugaron las células 5 minutos a 4000 g, se decantó el SN, y se resuspendió la pastilla en $\frac{1}{50}$ parte de amortiguador de lisis. Se transfirió la suspensión a un tubo COREX.

Se añadió lisozima para una concentración final de 0.5 mg/ml, se incubó 10 minutos a 37°C y se agregó SDS para una concentración final de 1%. Posteriormente se incubó a 37°C durante 10 minutos, se adicionó proteinasa K a una concentración de 1.25 mg/ml,

incubando los tubos 30 minutos más a 37°C. Se agregó un volumen de fenol (el cual fue saturado añadiendo $\frac{1}{10}$ de volumen de TRIS.HCl 1M pH 7.5) y se agitó el contenido de los tubos durante 60 minutos, a temperatura ambiente, usando un agitador rotatorio. Los tubos se centrifugaron a 6000 g durante 10 minutos, después de lo cual se retiró la fase fenólica. Se añadió de nuevo un volumen de fenol y se agitaron los tubos 30 minutos más, tras lo cual se centrifugaron los tubos a 6000 g por 10 minutos y se descartó la fase fenólica. En éste punto, se agregó un volumen de éter etílico y se agitó por 30 minutos en el agitador rotatorio. Se centrifugaron los tubos a 4000 g durante 10 minutos. La fase acuosa se dializó contra SSC 1X, a 4°C, durante 40 hr.

Para aumentar la eficiencia de la técnica de PCR; los DNA así obtenidos se digirieron simultáneamente con las enzimas Eco RI y Hind III, durante 16 hr. a 37°C, usando como amortiguador de reacción el amortiguador Eco RI.

Las restricciones se limpiaron dos veces con un volumen de fenol:cloro-formo:alcohol isoamílico (25:24:1), mezclando por inversión durante 5 minutos, centrifugando 5 minutos y transfiriendo la fase acuosa a otro tubo. El DNA se precipitó usando $\frac{1}{10}$ de volumen de acetato de amonio 7.5 M y 4 volúmenes de etanol absoluto, por 20 minutos a -20°C. Se centrifugó la pastilla, se decantó el SN, y se lavó usando etanol al 70%. Posteriormente se secó la pastilla al vacío durante 15 minutos y se resuspendió en agua bidestilada estéril.

K. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el gen *pnp*.

Los DNAs cromosomales restringidos se sometieron por separado al proceso de reacción en cadena de la polimerasa (Saiki *et al*, 1985) para amplificar los 2462 pb del gen *pnp* de las cepas S165 (silvestre), SGM12, SGM71 y SGM98 (mutantes).

Para la amplificación se usaron 2 oligonucleótidos de 22 bases (García Mena, 1992), cortesía del Dr. Jaime García Mena. El oligo 1 es complementario a la cadena no codificante en la región 5' del gen *pnp*, correspondiente a las bases 400 a 421 del gen *pnp* del GenBank (Regnier *et al*, 1987), añadiendo un sitio artificial Sal I antes del terminador t_1 del gen *rpsO*, anterior a *pnp*. Su secuencia es 5'→CTG GGT CGA CGT CGC TAA TTC T →3'.

El oligo 2 es complementario a la región 3' de la cadena codificante del gen (bases 2855 a 2876 de la secuencia), agregando un sitio artificial de corte de la enzima Bam HI, después del gen *pnp*. Su secuencia es 5'→ CGT CCG GAT CCC GGT TGC TAA C →3'.

Usando estos oligos se obtiene un amplificado que contiene las secuencias en orden: 5'→ terminador t_1 -promotor p_2 (del gen *pnp*) los sitios de reconocimiento de RNasa III (Portier *et al*, 1987)-cistrón *pnp*- terminador t_2 →3'.

Las reacciones de amplificación fueron preparadas como sigue: 57.5 μ l de agua bidestilada estéril, 2 μ l de BSA (5mg/ml), 10 μ l Amortiguador Taq polimerasa 10X, 8 μ l de $MgCl_2$ 50mM, 2 μ l de los deoxinucleótidos trifosfato (dNTP 10mM cada uno), 200 ng en 1 μ l de DNA cromosomal digerido con EcoRI-HindIII, 10 μ l del Oligo1 5 μ M, 10 μ l del Oligo2 5 μ M y 0.4 μ l de Taq polimerasa 5000 U/ml (volumen final de reacción, 100 μ l). Se realizó el PCR utilizando un aparato Thermocycler modelo CETUS 480 de la compañía Perkin Elmer, utilizando los siguientes ciclos: un ciclo inicial con 5 minutos a 97°C para desnaturalizar el DNA, 2 minutos a 60°C para el alineamiento de los oligos y 2 minutos 30 segundos a 72°C para la polimerización de la cadena de DNA; después se dieron 30 ciclos de amplificación con 1 minuto a 95°, 2 minutos a 60°C y 2 min. 30 seg. a 72°C;

finalmente, se concluyó con un ciclo final de 1 min. a 95°C, 2 min. a 60°C y 5 min. a 72°C.

Al final los tubos se enfriaron a 4°C.

Los PCR fueron tratados con el kit GENE-CLEAN de la compañía BIO-101, de acuerdo a las instrucciones del fabricante con el objeto de eliminar nucleótidos, proteínas, etc

RESULTADOS

A. Transformación de las cepas bacterianas.

A fin de caracterizar fenotípicamente a las cepas bacterianas, se transformaron las cepas S165 (silvestre), SGM12, SGM71 y SGM98 (mutantes) con los plásmidos pUS6, pMS1 y pKG1800, obteniéndose las eficiencias de transformación mostradas en la tabla 2. Como se mencionó anteriormente, el plásmido pKG1800 posee el gen reportero *galK* con su promotor original y al gen marcador de resistencia a ampicilina (Ap^r); el pUS6 es un plásmido derivado del pKG1800, que tiene clonada la secuencia del terminador t_t entre el promotor y el gen *galK*; por último, el pMS1 es un plásmido análogo al pUS6, pero la secuencia de t_t clonada en él posee la mutación *sib1*.

CEPA	PLASMIDO		
	pUS6	pMS1	pKG1800
S165	2.3×10^4	2.1×10^4	5.7×10^3
SGM12	3.1×10^5	1.7×10^4	2.85×10^4
SGM71	7×10^4	2.4×10^3	6.48×10^3
SGM98	2.5×10^4	3.6×10^3	6.72×10^3

Tabla 2. Eficiencia de transformación. La eficiencia de transformación se midió en colonias transformantes por cada μg de DNA de plásmido (col μg DNA). La cepa S165 fue transformada por el método TSS y las SGM12, 71 y 98 por el método de CaCl_2

Estas transformantes, además de las cepas bacterianas sin transformar, fueron las bacterias utilizadas para todos los ensayos descritos en éste trabajo.

B. Caracterización morfológica de las cepas: pruebas de resistencia a antibióticos, morfología colonial y utilización de galactosa.

A fin de caracterizar fenotípicamente a las bacterias se realizaron experimentos de resistencia a antibióticos usando las bacterias sin transformar, las cuales son resistentes a estreptomycinina (str^r) y a las transformadas con los plásmidos, y que por tanto debían ser resistentes tanto a estreptomycinina como a ampicilina ($str^r Ap^r$). En ningún caso las bacterias debían ser resistentes a tetraciclina (Tc^r) ya que no poseen dicho genotipo. Los resultados de los ensayos de resistencia a antibióticos, en cajas de Petri y en medio líquido, se presentan en la tabla 3.

CEPAS	ANTIBIOTICOS					
	ESTREPTOMICINA		AMPICILINA		TETRACICLINA	
	LIQUIDO	CAJA	LIQUIDO	CAJA	LIQUIDO	CAJA
S165	R	R	S	S	S	S
S165 pUS6	R	R	R	R	S	S
S165 pMS1	R	R	R	R	S	S
S165 pKG1800	R	R	R	R	S	S
SGM12	R	R	S	S	S	S
SGM12 pUS6	R	R	R	R	S	S
SGM12 pMS1	R	R	R	R	S	S
SGM12 pKG1800	R	R	R	R	S	S
SGM71	R	R	S	S	S	S
SGM71 pUS6	R	R	R	R	S	S
SGM71 pMS1	R	R	R	R	S	S
SGM71 pKG1800	R	R	R	R	S	S
SGM98	R	R	S	S	S	S
SGM98 pUS6	R	R	R	R	S	S
SGM98 pMS1	R	R	R	R	S	S
SGM98 pKG1800	R	R	R	R	S	S

Tabla 3. Resistencia a antibióticos. R: resistente al antibiótico. S: sensible al antibiótico. Los antibióticos se usaron a una concentración de 50 µg/ml

Para evaluar la utilización de galactosa por parte de las cepas se hicieron ensayos de crecimiento bacteriano en cajas de medio McConkey-galactosa-estreptomycinina y se observó que todas las cepas sin excepción presentaron colonias de color blanco, lo que significa que no poseen el operón *gal* completo, como se esperaba.

Se analizó la capacidad de las cepas para convertir galactosa en galactosa-1-fosfato, por morfología colonial; para ello se consideró la forma y el diámetro de las colonias bacterianas de las diferentes cepas cultivadas en cajas de Petri con medios de cultivo mínimo (TRIPTONA), y medio mínimo suplementado con galactosa (T-GALACTOSA), y se verificó la resistencia de las cepas a ampicilina para garantizar la presencia de los plásmidos en las cepas transformadas (tabla 4).

CEPAS	MEDIO DE CULTIVO			
	TRIPTONA		T-GALACTOSA	
	FORMA	DIAMETRO	FORMA	DIAMETRO
S165	CONVEXA	1 mm	CONVEXA	1 mm
S165 pUS6	CONVEXA	0.9 mm	CONVEXA	0.6 mm
S165 pMS1	CONVEXA	0.9 mm	PLANA	0.1 mm
S165 pKG1800	CONVEXA	0.9 mm	NO CRECE	NO CRECE
SGM12	CONVEXA	1 mm	CONVEXA	1 mm
SGM12 pUS6	CONVEXA	1 mm	CONVEXA	1 mm
SGM12 pMS1	CONVEXA	1 mm	CONVEXA	1 mm
SGM12 pKG1800	CONVEXA	1 mm	NO CRECE	NO CRECE
SGM71	CONVEXA	0.9 mm	CONVEXA	0.9 mm
SGM71 pUS6	CONVEXA	0.9 mm	CONVEXA	0.9 mm
SGM71 pMS1	CONVEXA	0.9 mm	CONVEXA	0.9 mm
SGM71 pKG1800	CONVEXA	0.9 mm	NO CRECE	NO CRECE
SGM98	CONVEXA	1 mm	CONVEXA	1 mm
SGM98 pUS6	CONVEXA	1 mm	CONVEXA	1 mm
SGM98 pMS1	CONVEXA	1 mm	CONVEXA	0.9 mm
SGM98 pKG1800	CONVEXA	1 mm	NO CRECE	NO CRECE

Tabla 4. Morfología colonial en medio Triptona y Triptona galactosa. Los diámetros son aproximados. La forma de la colonia se refiere a la apariencia que tiene al ser vista lateralmente.

Las cepas que pueden fosforilar a la galactosa por tener un gen *galK* activo sufren de bacteriostasis al ser cultivadas en un medio con galactosa como fuente de carbono, por la acumulación de la galactosa-1-fosfato. Como se ve en la tabla,⁴ la cepa silvestre transformada se comporta como *galK*⁺, mientras que las mutantes SGM12, SGM71 y SGM98 se comportan como *galK* a excepción de cuando son transformadas con el pKG1800, el cual no posee la secuencia λ antes del gen *galK*. Lo anterior confirma que las mutantes presentan baja expresión de *galK* a partir de los plásmidos pMS1 y pUS6, es decir, que regulan negativamente la expresión de galactocinasa probablemente por la degradación del mRNA debida al elemento λ o λ -*sig* que llevan clonado pUS6 y pMS1, respectivamente.

C. Extractos proteicos de las cepas S165, SGM12, SGM71 Y SGM98.

Para analizar el patrón proteico y llevar a cabo ensayos enzimáticos como parte de la caracterización de las cepas, se obtuvieron extractos proteicos de las diferentes cepas, transformadas y sin transformar con pKG1800, pUS6 y pMS1, tanto en fase exponencial de crecimiento como en fase estacionaria. De los extractos proteicos obtenidos se determinó su concentración, así como el rendimiento proteico por célula de cada cepa. Los datos obtenidos se muestran en la tabla 5. La eficiencia de sonicación fue bastante alta (de 59 a 81%), pero ésta no fue total, por lo que para los ensayos subsecuentes se tuvo que tener en consideración esto para la corrección de los resultados. Se observó que las cepas mutantes presentaban un rendimiento proteico por célula mayor al de la cepa silvestre, lo que sugiere diferencias en la regulación de la expresión génica global de las

células, probablemente a causa de las mutaciones que presentan, aunque tales diferencias no son muy grandes.

CEPA	EFICIENCIA SONICACION (%)	CONCENTRACION PROTEICA (mg/ml)		No. cels. Por cada DO _{600nm} de 1.0	RENDIMIENTO mg prot./célula	Relación de proteína por célula
		Exponencial	Estacionaria		Exponencial	
S165	58.59	168.9	214.97	1.9×10^9	1.138×10^{-7}	1.00
SGM12	75.15	175.35	236.62	1.0×10^9	2.299×10^{-7}	2.02
SGM71	80.57	148.19	254.56	1.4×10^9	1.85×10^{-7}	1.63
SGM98	72.64	112.17	281.74	1.8×10^9	1.533×10^{-7}	1.347

Tabla 5. Concentración de proteína de los extractos crudos. La relación mostrada en la última columna corresponde a la cantidad de proteína por célula con respecto a la cepa silvestre S165.

D. Análisis del patrón electroforético de los extractos proteicos.

Con la finalidad de tratar de identificar proteínas asociadas al fenotipo mutante se analizó el patrón electroforético de los extractos proteicos de las cepas, considerando para esto 2 condiciones diferentes: una en que la cantidad de proteína colocada en los pozos del gel fuera constante ($35\mu\text{g}$), y otro en que se colocara el extracto proteico equivalente a aproximadamente el mismo número de células sonicadas (1.5×10^8). Lo anterior se hizo para tratar de determinar si las proporciones relativas de proteínas eran similares con respecto a la silvestre (usando cantidad de proteína constante) y si había diferencias en las cantidades o proporciones de proteína por célula (usando un número de células constante). Se usaron geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes, en los que simultáneamente se corrieron muestras con cantidad de proteína constante

(35 μ g), y con la cantidad de proteina correspondientes a un número constante de células (1.5 x 10⁸) (fig. 16). En ellos se identificaron 2 bandas que evidencian diferencias entre las cepas mutantes con respecto a la cepa silvestre. El número 1 indica una banda de una proteína de aproximadamente 55 kDa, que está presente en gran cantidad en los extractos de la S165 y disminuye visiblemente en todas las cepas mutantes. El número 2 indica una banda de aproximadamente 82 kDa, que se halla aumentada visiblemente en la SGM12 y levemente en la SGM98, respecto a la S165 y a la SGM71. Las bandas que corresponderían a las subunidades de la PNPasa están indicadas como α , de 86 kDa, y β , de 48 kDa. En la sección de discusión de resultados se plantean candidatos para posibles proteínas que den origen a las bandas mencionadas.

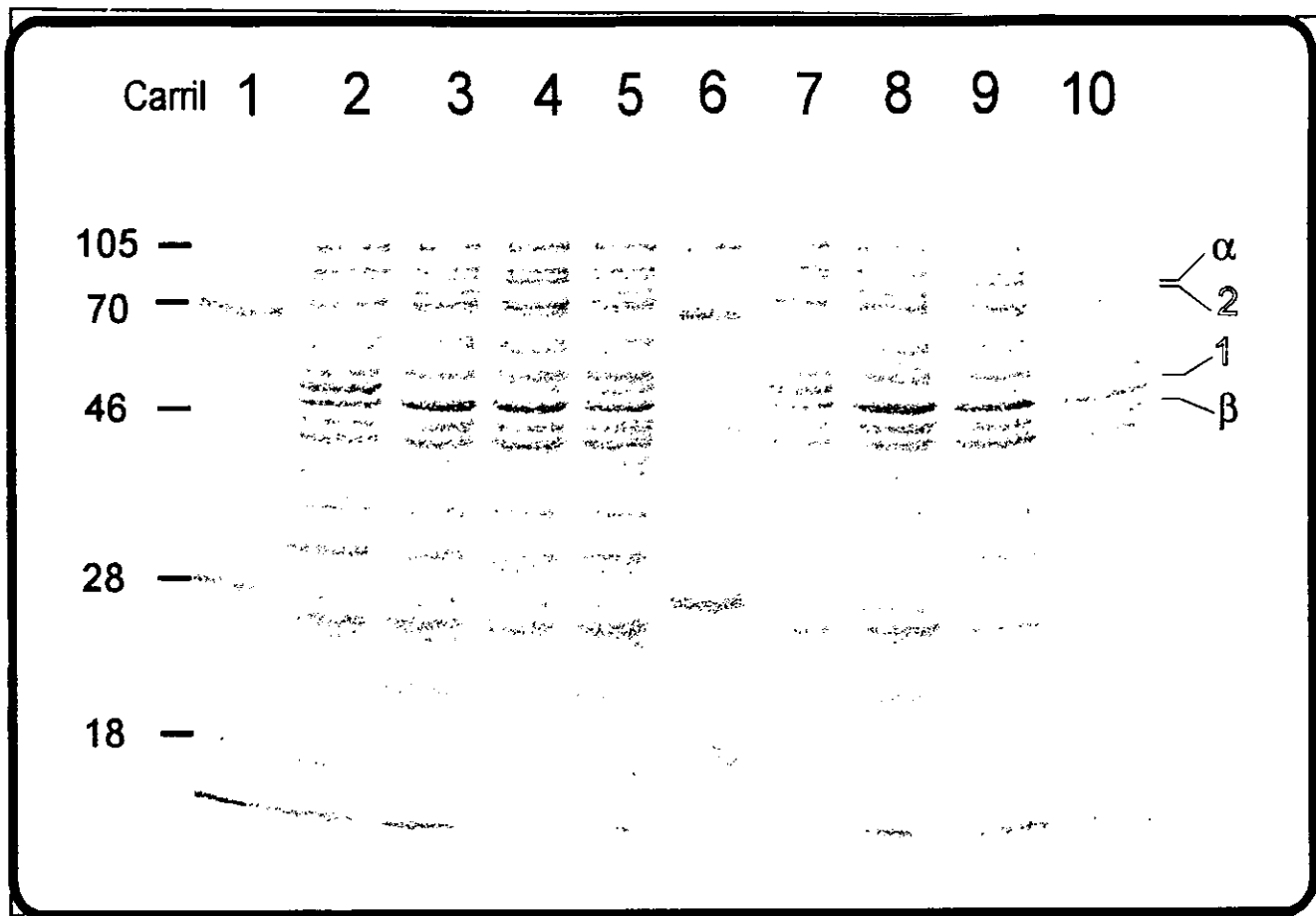


FIGURA 16. Patrón electroforético de los extractos proteicos de las cepas S165, SGM12, SGM71 y SGM98. Gel de poliacrilamida al 10% con SDS con los extractos de las cepas S165, SGM12, SGM71 y SGM98. En los carriles 2 al 5 se colocaron cantidades de proteína constante (35µg). En los carriles 7 al 10 se corrieron extractos de un número de células constante (1.5×10^8). Carriles 1 y 6 son marcadores de peso molecular de 18, 28, 46, 70 y 105 kDa. El número 1 indica una banda de una proteína de aproximadamente 55 kDa, y el número 2 indica una banda de aproximadamente 82 kDa, que presentan diferencias respecto a la S165. Las bandas que corresponderían a las subunidades de la PNPasa están indicadas como α , de 86 kDa, y β , de 48 kDa.

E. Actividad de polimerización *in situ*.

Se realizaron ensayos con la finalidad de identificar la actividad de polimerización de ADP *in situ* de la enzima PNPasa en los extractos celulares de las cepas. En la figura 18 se muestra un gel de poliacrilamida al 10%, en condiciones nativas, teñido con naranja de acridina para evidenciar la actividad de polimerización de ADP de la enzima PNPasa. Las muestras se colocaron como cantidad de proteína constante (35µg) y número de células constantes (1.5×10^8) células.

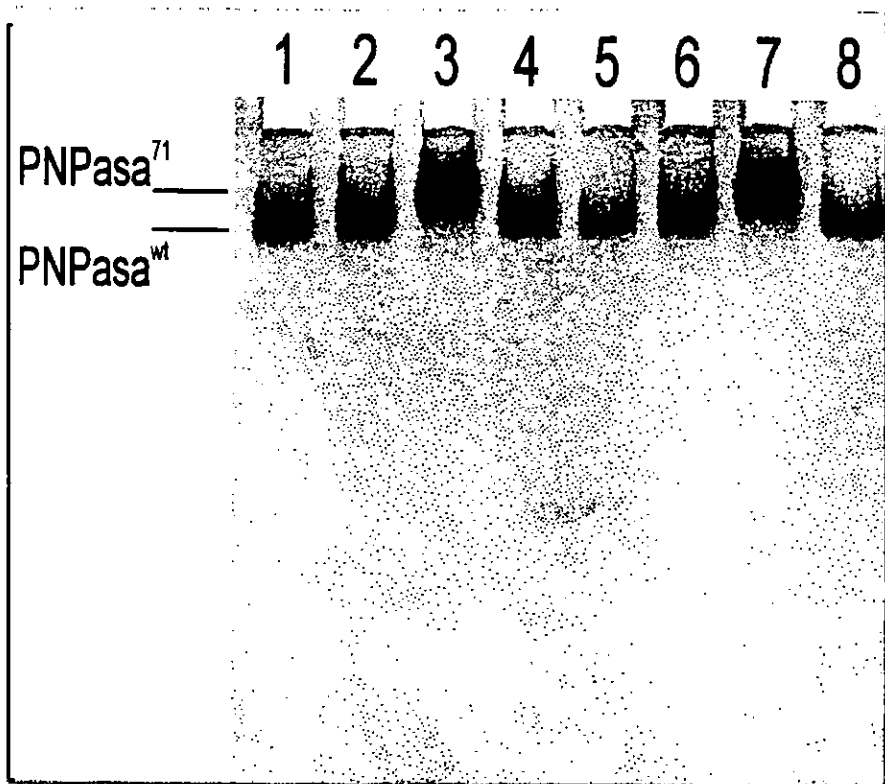


FIGURA 17. Ensayo de polimerización *in situ*. Análisis de la actividad de polimerización *in situ* de ADP de los extractos proteicos, en un gel de poliacrilamida al 10% en condiciones nativas teñido con naranja de acridina. Los carriles 1 a 4 contienen 35 µg de proteína, y los carriles 5 a 8 el extracto equivalente a 1.5×10^8 células. Carriles 1 y 5 corresponden a la S165; 2 y 6 a la SGM12; 3 y 7 a la SGM71; y, 4 y 8 a la SGM98. La banda inferior que se indica corresponde a la PNPasa tipo silvestre (PNPasa^{wt}), mientras que la banda superior corresponde a la mutante PNPasa 71 (PNPasa⁷¹).

En la figura 17 se observa que la actividad de polimerización *in situ* de los extractos proteicos de las cepas mutantes SGM12 y SGM98 son semejantes a la cepa silvestre S165, en contraste con la cepa SGM71 que, como fue reportado por García-Mena, presenta una doble banda de actividad, de mayor peso molecular y más intensa que la de la PNPasa silvestre.

F. Ensayo de intercambio de fósforo de la PNPasa.

Para continuar la caracterización de la enzima PNPasa de los extractos de las cepas mutantes, se analizó la actividad de intercambio de fósforo de la PNPasa como se describe en la sección de materiales y métodos. Tal actividad es específica de la PNPasa de *E.coli*. El promedio de los resultados de los 3 ensayos de intercambio de fósforo se muestra en la tabla 6.

CEPA	µmoles de Pi intercambiados*		Relación con la cepa S165
	Promedio	Desv. Standard	
S165	1.757	0.216	1.00
SGM12	1.937	0.118	1.103
SGM71	12.748	0.835	7.255
SGM98	1.093	0.214	0.622

Tabla 6. Ensayo de intercambio de fósforo de la PNPasa de las cepas S165, SGM12, SGM71 y SGM98. *Los valores indicados son de µmoles de Pi intercambiados por hora por mg de proteína del extracto

De esta tabla se desprende que la actividad específica de intercambio de fósforo de la PNPasa de las cepas mutantes SGM12 y SGM98 es muy similar a la de la cepa silvestre

S165, mientras que la PNPasa de la SGM71 es 7 veces más activa que la de la S165, como también lo había reportado García-Mena.

G. Cuantificación de la PNPasa de los extractos.

Se hicieron ensayos de quimioluminiscencia para determinar la concentración de la PNPasa de los extractos y conocer si existían diferencias en la expresión de la PNPasa de las cepas mutantes respecto a la silvestre; al compararlos con los de rendimiento proteico por célula la tabla 5, se realizó la tabla 7.

CEPA	ng PNPasa por μg extracto		Relación con la S165	ng PNPasa por célula ($\times 10^{-7}$)		Relación con la S165
	Promedio*	Desv. estándar		Promedio*	Desv. estándar	
S165	1.3904	0.376	1.00	1.5823	0.4271	1.00
SGM12	2.5475	0.802	1.832	5.857	1.844	3.70
SGM71	8.565	1.667	6.16	15.847	3.08	10.02
SGM98	1.457	0.61	1.048	2.234	0.935	1.412

Tabla 7. Determinación de la concentración de PNPasa de los extractos proteicos. Promedio de 2 ensayos de quimioluminiscencia.

La figura 18 es una autorradiografía de los ensayos de quimioluminiscencia, donde se observa que la concentración de PNPasa en las cepas no presenta diferencias evidentes, aunque tras cuantificarlos por densitometría se determinó que existían diferencias pequeñas entre ellas. Por una parte, la concentración relativa de la PNPasa en las células (ng de PNPasa por mg de extracto) es ligeramente mayor en la SGM12 (1.832) y SGM98 (1.08) con respecto a la S165 (1.0); la SGM71 fue un control ya que se conoce que en esta mutante, la concentración de PNPasa se encuentra elevada por lo menos 6 a 7

veces. De igual manera, al cuantificar la concentración neta por célula de PNPasa (ng de PNPasa por célula) se observa un aumento notorio en la SGM12 (3.70) y leve en la SGM98 (1.412), respecto a la S165 (1.0); nuevamente el control SGM71 presenta una elevada concentración de PNPasa (10.02).

H. PCR del gen *pnp* de las cepas.

Por último, a fin de determinar si existía alguna mutación en las cepas mutantes que pudiera alterar la expresión del gen *pnp*, se extrajeron DNAs cromosomales de las cepas para obtener el producto de PCR del gen *pnp*. La extracción se realizó mediante el método descrito, con concentraciones entre 240 y 268.5 µg de DNA por ml; los DNAs fueron digeridos con éxito por las enzimas Eco RI y Hind III a fin de favorecer las condiciones del PCR (fig. 19).

Tras efectuar las reacciones de PCR en todos los casos se observó la presencia de un amplificado de DNA del tamaño esperado de aproximadamente 2.5 kpb, por lo que se puede asumir que el producto es amplificado del gen *pnp*, aunque no se puede concluir esto hasta llevar a cabo la secuenciación del producto de PCR. En la figura 20 se presenta el corrimiento de los productos de PCR en un gel de agarosa al 1%. Tales productos de PCR serán clonados y secuenciados posteriormente para determinar si el fenotipo mutante de la cepa SGM12 o la SGM98 se debe a un cambio en el gen *pnp*

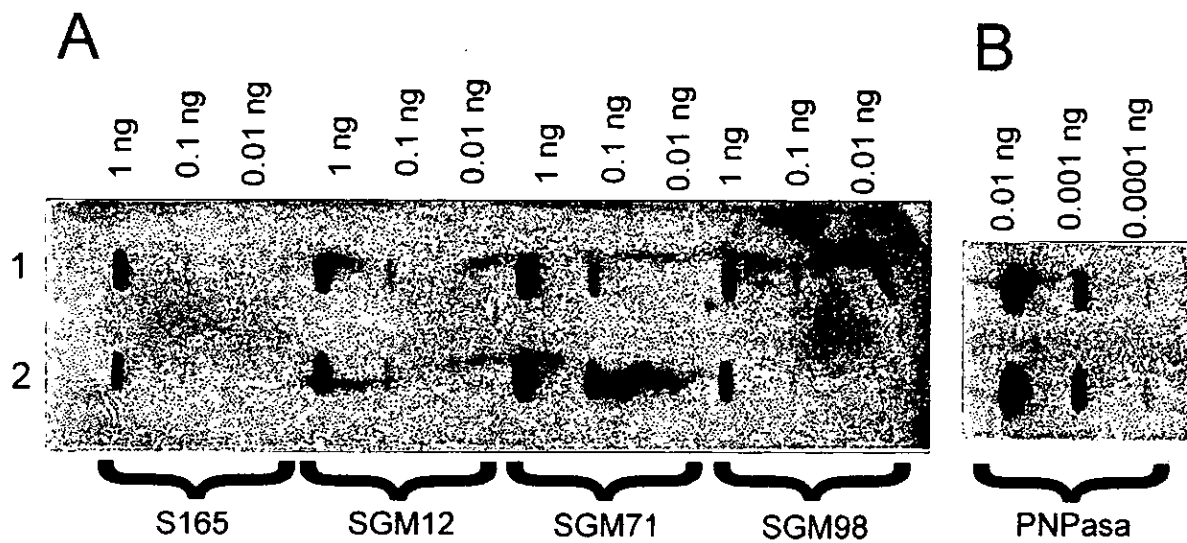


Figura 18. Autorradiografía de ensayo de quimioluminiscencia para la determinación de concentración de PNPasa en los extractos proteicos. La figura A muestra la autorradiografía de la quimioluminiscencia de los extractos crudos de las cepas S165, SGM12, SGM71 y SGM98, concentraciones de 1, 0.1 y 0.01 ng de proteína. La figura B presenta un control positivo para PNPasa™ con concentraciones de 0.01, 0.001 y 0.0001 ng de PNPasa purificada. Ambos ensayos se realizaron simultáneamente. El carril inferior (1) es duplicado del superior (2). La exposición de la película fue de 2 minutos.

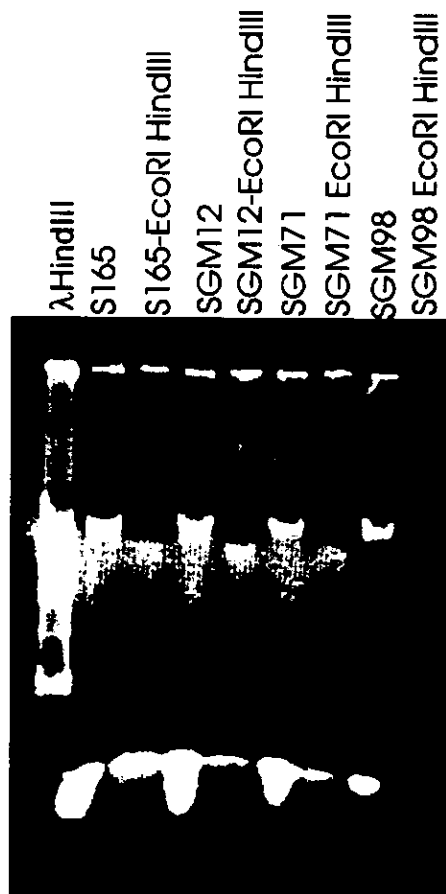


FIGURA 19 . Digestión de los DNA cromosomales con las enzimas Eco RI y Hind III. Los PCR se realizaron de acuerdo a lo descrito en la sección de Materiales y Métodos, obteniéndose amplificados de aproximadamente 2500 pb (2462 pb, de acuerdo a GenBank), y se pueden observar en la figura, con concentraciones dentro del rango de los 50 a los 70 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Los carriles 2, 4, 6 y 8 corresponden al DNA cromosomal de las cepas sin digerir. Los carriles 3, 5, 7 y 9, corresponden al DNA cromosomal de las cepas digerido con Eco RI y Hind III. Como marcador de peso molecular (carril 1) se usó λ -HindIII.

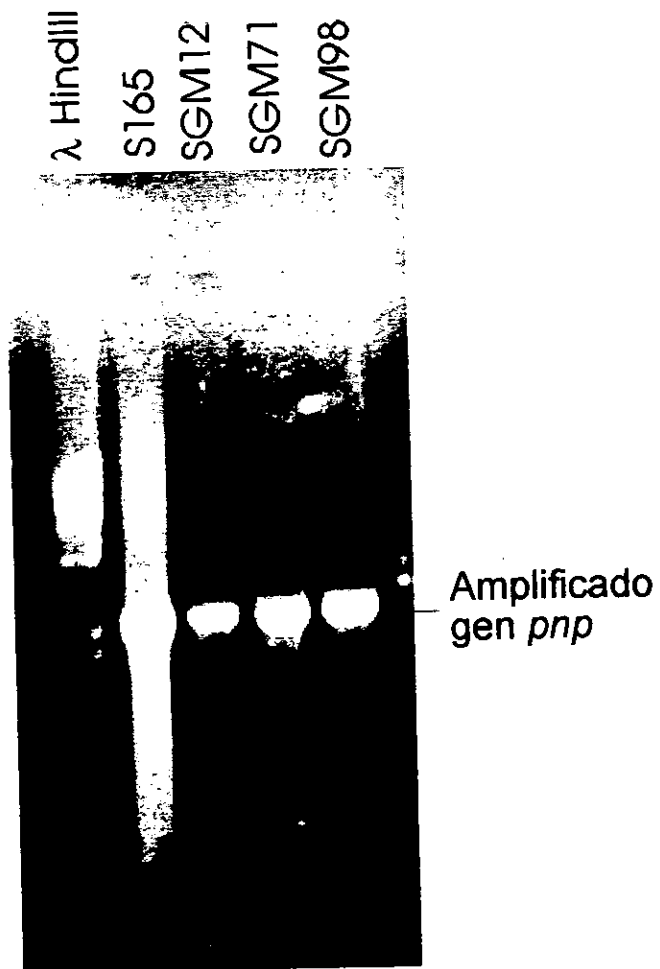


FIGURA 20. Corrimiento electroforético de los amplificados del gen *pnp* en gel de agarosa al 1%. Carriles 2, 3, 4 y 5 corresponden a 5 μ l de la reacción del PCR, siendo aprox. 300 ng de amplificado por carril. El marcador λ -HindIII se muestra en el carril 1.

DISCUSION DE RESULTADOS

En éste trabajo se llevó a cabo la caracterización parcial de cepas mutantes de *Escherichia coli* que presentan expresión disminuida de galactocinasa del plásmido pMS1. Cuando se aislaron las cepas SGM se buscaban mutaciones que revirtieran el efecto de la mutación *sib1* del plásmido pMS1, esto es, que la expresión de galactocinasa a partir del pMS1 disminuyera en dichas cepas, a fin de identificar factores que participen en el mecanismo de retroregulación del fago lambda mediado por *sib* o en la estabilidad de este mRNA (García Mena, *et al*, 1998b). Se aislaron las cepas SGM que poseen baja expresión de galactocinasa a partir de éste plásmido, a diferencia de la S165, cepa silvestre de la cual se originaron.

Al caracterizar a la mutante SGM71, en la cual la expresión de *galK* a partir de pMS1 se ve disminuida hasta el 7%, se identificó que dicha cepa presentaba una mayor degradación del mRNA de *galK* del plásmido pMS1 (García-Mena, 1992). En análisis posteriores de la SGM71 se identificó una mutación puntual que en la posición 2372 del gen *pnp*, cambiando al aminoácido 570 glicina por ácido aspártico, y a su vez, alteraba la autorregulación de la enzima polinucleótido fosforilasa, con lo que la concentración de esta enzima se incrementaba cuando menos 6 veces respecto a la silvestre, además de que existía una isoforma de la PNPasa con diferente estructura cuaternaria.

Al estudiar a las cepas mutantes SGM12 y SGM98, con una expresión disminuida de galactocinasa de pMS1, de manera similar a la SGM71, se encontró en ensayos de transducción generalizada que las mutaciones causantes del fenotipo se encontraban en

una región de 2 minutos cercana al gen *pnp*, por lo que fue necesario caracterizar a la PNPasa de estas cepas.

Para caracterizar las cepas fue necesario transformarlas con los plásmidos pMS1, pUS6 y pKG1800. Para esto, la cepa S165 fue transformada por el método de la solución TSS, mientras que las SGM12, SGM71 y SGM98 fueron transformadas mediante el procedimiento de cloruro de calcio. No se observaron diferencias apreciables en cuanto a la eficiencia de transformación obtenida en ambos casos, siendo más rápido y práctico el método donde se utiliza la solución TSS (Chung *et al*, 1989).

En las pruebas de resistencia a antibióticos, los resultados coinciden con la caracterización previa de las cepas, ya que todas fueron resistentes a la estreptomicina, tanto en medio líquido como en cajas de Petri, debido a que son derivadas de la cepa S165, que es *Str^r*. Asimismo, todas fueron sensibles a la tetraciclina, debido a que la cepa S165, de la que se originan, es sensible a la tetraciclina (*Tc^s*), y los plásmidos usados no confieren dicha resistencia.

Las cepas sin transformar fueron sensibles a la ampicilina (*Ap^s*) debido a que no poseen el gen que confiere la resistencia a este antibiótico, pero todas las transformantes fueron resistentes a ampicilina, ya que los plásmidos con los que fueron transformados tienen el gen que codifica para la resistencia a la ampicilina (*Ap^r*).

De los cultivos en medio McConkey-galactosa-estreptomicina se evidencia que ninguna de las cepas en estudio puede hacer uso de la galactosa. El operón necesario para que la galactosa pueda ser utilizada posee los genes *galK*, *galT* y *galE*, que codifican para la galactocinasa, galactosa-transferasa y galactosa-epimerasa, respectivamente. Si las cepas carecen del gen *galE* (*galE⁻*), las bacterias mueren en presencia de galactosa

(Nikaido, 1961). Si las bacterias sólo sintetizan la galactocinasa ($galK^+$, $galTE^-$), sufren bacteriostasis en presencia de galactosa, debido a la acumulación de galactosa-fosfato. El fenotipo de las cepas sin transformar es gal^- , ya que la cepa de la que se originan es $gal KTE^-$, por delección del operón *gal*. Las cepas transformadas con pKG1800, pUS6 y pMS1 son $gal K^+$, en diferentes niveles; sin embargo, al no poseer los genes *galT* y *gal E*, el fenotipo es gal^- . En las cajas de Petri con medio McConkey-galactosa se comprueba este fenotipo ya que todas las cepas producen colonias de color blanco, lo que indica que no pueden metabolizar la galactosa.

Como se describió en la sección de materiales y métodos, se usó el plásmido pKG1800, que tiene el gen *galK* y su promotor, por lo que presenta un alto nivel de expresión de galactocinasa. El plásmido pUS6 lleva clonada la secuencia λ del fago lambda entre el promotor y el gen *gal K*, por lo que la expresión se ve disminuida hasta el 6% de la expresión que se da con pKG1800. El plásmido pMS1 es análogo al pUS6, sólo que tiene clonada la secuencia λ con la mutación *sib1*, que hace que la represión de la expresión del gen reportero *gal K* debida a la presencia de λ esté disminuida, por lo que la expresión de *gal K* aumenta hasta ser 36% de la obtenida con el pKG1800.

Así, la expresión de galactocinasa de pMS1 se ve disminuida en las cepas mutantes, siendo el fenotipo muy semejante al de la cepa sin plásmidos, por lo que las colonias de las cepas mutantes con pMS1 que se producen en medio suplementado con galactosa son similares en forma y tamaño a las de la cepa sin plásmido (convexa y de un diámetro aproximado de 1 mm).

Como se ve, los resultados de los análisis de morfología y tamaño colonial son congruentes con el método de selección de las mutantes, y con los resultados del trabajo

de Rosas, 1994; la cepa silvestre no puede revertir el efecto de *sib1*, por lo que las colonias presentan bacteriostasis al producir colonias aplanadas y de diámetro pequeño. Las cepas mutantes revierten el efecto de la mutación *sib1* ya que la expresión de galactocinasa de las cepas mutantes transformadas con pUS6 respecto a las transformadas con pMS1 son muy similares. Además, ninguna cepa transformada con el pKG1800 creció en medio suplementado con galactosa, lo que coincide con el hecho que la selección de las mutantes se basó en su baja expresión de galactocinasa a partir de pMS1, y no a un mecanismo independiente que afecte la expresión de *gal K*.

En otras palabras, las mutantes presentan reversión del efecto de *sib 1* (pMS1) y además, disminuyen ligeramente la expresión de galactocinasa de pUS6, lo que se hace evidente por el tamaño colonial más pequeño de la S165-pUS6 respecto a las mutantes transformadas con pMS1, sin afectar visiblemente la expresión de *gal K* del pKG1800. En éste punto es difícil establecer si la mutación afecta la transcripción o la estabilidad del mRNA del pMS1; sin embargo, basados en los ensayos de Northern blot de García-Mena, 1992, se observa que la estabilidad del mRNA está disminuida en las cepas SGM12 y SGM98 respecto a la silvestre, aunque no se degrada tanto como en la SGM71. Por lo anterior, se podría asumir que la mutación presente en las cepas SGM12 y SGM98 pudieran alterar la estabilidad del mRNA de *sib 1* al incrementar la actividad de una RNasa, o probablemente aumentando la afinidad de una RNasa o el degradosoma hacia el mRNA de *sib 1*, como es el caso de la mutante SGM71, en que la actividad y concentración de la PNPasa se encuentra aumentada al menos 6 veces.

Los resultados de rendimiento proteico sugieren que las cepas mutantes tienen un metabolismo ligeramente mayor que la cepa silvestre ya que el menor rendimiento

proteico por célula lo presentó la cepa S165, y el mayor, la SGM12. Además, de acuerdo a las relaciones de las diferentes actividades enzimáticas medidas en las cepas SGM12, SGM71 y SGM98, con respecto a la silvestre, las mutantes siempre presentaron un mayor rendimiento.

Caracterización de la PNPasa de las cepas mutantes

Para caracterizar a la PNPasa de las cepas mutantes, se obtuvieron extractos proteicos de las cepas S165, SGM12, SGM71 y SGM98 que presentaron actividad específica de PNPasa en los ensayos enzimáticos. Con estos extractos, se midió la cantidad de PNPasa producida por célula en cada cepa, y su proporción relativa en los extractos proteicos totales, su corrimiento electroforético, la actividad de polimerización de ADP, y la actividad de intercambio de fósforo. Considerando a la mutante SGM71 como un control positivo de mutaciones en *pnp*, como lo muestra el trabajo de García-Mena, 1992, es claro que la reversión del fenotipo de expresión de *galK* por efecto de la mutación *sib1* (pMS1), los niveles de PNPasa aumentaron hasta más de 6 veces. Adicionalmente, la estructura cuaternaria de la PNPasa está alterada, ya que se forma un complejo con más de 3 subunidades α , produciendo dos formas enzimáticamente más activas (más de 7 veces, en los ensayos de intercambio de fósforo). Los cambios en los niveles de PNPasa se deben muy probablemente a que la PNPasa se autorregula al promover la degradación de su mRNA, de manera dependiente de RNasa III (Takata *et al*, 1985, Takata *et al*, 1987, Portier *et al*, 1987, Takata *et al*, 1989, Robert-Le Meur y Portier, 1992, Robert-Le Meur y Portier, 1994); por tanto, la PNPasa⁷¹ aumenta su concentración probablemente al perder afinidad por su mRNA, o porque la RNasa III puede tener menor afinidad por el mRNA de la PNP⁷¹.

De acuerdo a los parámetros observados, las mutaciones de las cepas SGM12 y SGM98 no parecen afectar drásticamente los niveles de expresión de la PNPasa, por célula (con relaciones 3.70 y 1.41, respectivamente, al comparárseles con la S165) y por concentración relativa en los extractos proteicos (1.83 y 1.048, respecto a la S165); hay que considerar también que los niveles de actividad de intercambio de fósforo son semejantes a los de la S165 (1.103 y 0.622, respectivamente), y los PCR generaron amplificadores de igual tamaño aparente (2462 pb). Reconsiderando lo anterior, probablemente el aumento que se presenta en la SGM12 pudiera ser biológicamente significativo, al aumentar la concentración de PNPasa por célula 3.7 veces, aunque se requieren mayores ensayos para determinarlo.

Con la evidencia de que el metabolismo general de las mutantes no se halla gravemente alterado, al no haber diferencias evidentes en la concentración de proteína por célula, es de esperar que la degradación de los mRNA no esté incrementada a niveles muy altos por un aumento de actividad o concentración de una RNasa, por lo que la explicación que se ha encontrado es que la actividad de RNA-exonucleasa de la PNPasa esté incrementada, y su detección escape a las metodologías usadas, o bien, que algún otro factor proteico de las mutantes SGM12 y SGM98 está modificando la estabilidad del mRNA que contiene a *sib 1*.

Por lo anterior, habría que considerar la posibilidad de que las mutaciones presentes en las cepas SGM12 y SGM98 no se hallen en el gen *pnp* ni afecten su regulación, aunque los resultados no son definitivos, por lo que para descartar que la mutación se halle en la PNPasa habría de determinarse la secuencia nucleotídica de los amplificadores de PCR del gen *pnp* de las cepas SGM12 y SGM98.

A fin de hallar otra respuesta probable que resuelva la incógnita respecto a la localización y función de las mutaciones, habría que analizar el método usado por Rosas para tratar de localizar las mutaciones. Los experimentos de transducción generalizada de su trabajo fueron hechos usando el bacteriófago P1_{vir} y a la cepa C600 *nusA*⁺ *pnp*⁺::Tn10 como donadora de la región cercana a *pnp* y *nusA* para revertir el fenotipo. En éste trabajo se encontró que el 7% de los candidatos de SGM12 y el 44% de los candidatos de SGM98 analizados por el ensayo de transducción generalizada con P1_{vir} presentaban reversión del fenotipo mutante al silvestre. Esto parece indicar que las mutaciones se hallan cerca o en la región *pnp-nusA*. Si consideramos que el bacteriófago P1_{vir} puede “empaquetar” aproximadamente 92 kpb, contendría muchos otros genes aparte de *pnp* y *nusA*, además del transposón ::Tn10. En la tabla 7, se enlistan los genes localizados del minuto 71 al 72 del mapa genómico de *Escherichia coli*, en donde se ubica *pnp*, de acuerdo a la base de datos GenBank (acceso N° U00096 AE000397, sección 287).

De la lista sobresalen 6 genes, acerca de los cuales se presenta una breve reseña.

Genes localizados cerca de *pnp*.

***nusA*.** Sería interesante evaluar si la proteína NusA (55 kDa), de las cepas mutantes posee alguna mutación. Como se describió previamente, NusA es un factor que se une directamente a la RNA polimerasa y funciona como factor de terminación, interactuando también con el factor ρ y la proteína N del fago lambda. Se ha demostrado *in vitro* que la proteína NusA participa en la terminación de la transcripción que ocurre en t_1 , ya que en presencia de NusA, la eficiencia de terminación en t_1 es de 80%, mientras que en su ausencia, la terminación disminuye a 50%, de manera similar a lo observado *in vivo*, en la

GEN	SwissProt	PESO MOL.	FUNCION
<i>yraN</i>	P45465	14798	Proteína hipotética
<i>yraP</i>	P45467	20028	Proteína hipotética.
<i>yraQ</i>	P45468	37256	Proteína hipotética
<i>yraR</i>	P45469	24805	Proteína hipotética
<i>yhbP</i>	P45471	16776	Proteína hipotética
<i>yhbO</i>	P45470	20324	Proteína hipotética
<i>yhbQ</i>	P45472	11270	Proteína hipotética
<i>yhbT</i>	P45474	19672	Proteína hipotética
<i>yhbU</i>	P45527	37047	Proteasa, hidrolasa
<i>yhbV</i>	P45475	33192	Proteína hipotética
<i>yhbW</i>	P45529	37129	Proteína hipotética
<i>mtr</i>	P22306	44332	Triptofano permeasa
<i>deaD</i>	P23304	72699	RNA helicasa ATP dependiente
<i>yhbM</i>	P39833	33620	Proteína hipotética
<i>pnp</i>	P05055	77101	<i>pnpasa</i>
<i>rpsO</i>			prot. ribosomal S10
<i>truB</i>	P09171	35087	tRNA pseudouridin 55 sintetasa liasa, tRNA processing
<i>rbfA</i>	P09170	15154	¿iniciación de traducción? ¿maduración de subunidad 30S?
<i>nusA</i>	P03003	54870	terminación y antiterminación
<i>yhbC</i>	P03843	16821	Proteína hipotética
<i>yhbX</i>	P42640	61559	Proteína hipotética; transmembranal
<i>secG</i>	P33582	11365	Exportación de proteínas
<i>mrsA</i>	P31120	47453	Fosforilasa
<i>ftsH</i>	P28691	70708	División cel., ATP-binding, hidrolasa, metaloproteasa. Degradación de σ^{32}
<i>ftsJ</i>	P28692	23335	Afecta división celular.
<i>greA</i>	P21346	17641	Regulación de transcr. DNA-binding. Factor de elongación necesario para que la transcr. pase los sitios de arresto. Corta 2 a 3 nt de ext. 3' del mRNA para que siga la transcripción.
<i>yhbZ</i>	P42641	43286	Proteína hipotética. GTP-binding.
<i>ispB</i>	P19641	35217	Síntesis isoprenoles. transferasa.
<i>yrbC</i>	P45390	23962	Proteína hipotética. Señal.
<i>nlp</i>	P18837	10495	Regulación positiva de transcripción de genes para metabolismo de azúcares. Activador DNA-binding.
<i>murA</i>	P28909	44817	Síntesis peptidoglicano (pared cel.) Objetivo de la fosfomicina.
<i>yrbA</i>	P43781	9452	Proteína hipotética
<i>yrbB</i>	P45389	14350	Proteína hipotética
<i>yrbD</i>	P45391	19576	Proteína hipotética. Señal.
<i>yrbE</i>	P45392	27863	Proteína hipotética. Transmembranal.
<i>yrbF</i>	P45393	29097	Proteína hipotética. une ATP; transporte.

Tabla 8. Genes localizados cerca de *pnp* en *Escherichia coli*.

mutante *nusA1* termosensible, en la cual disminuye la eficiencia de terminación de transcripción de este terminador de 80% a 60% (Bermúdez-Cruz, *et al.*, 1998).

Por otro lado, Rosas, 1994, utilizó como marcador de transducción al gen *nusA*, pero al haber usado como criterio de evaluación de las transductantes el que no fueran termosensibles, (en comparación con una cepa *nusA_{ts11}*, que es termosensible), no descarta la posibilidad de que las mutaciones se localicen en dicho gen, y no sean termosensibles. Adicionalmente, en los ensayos de Northern blot de García-Mena, 1992, se observó que la eficiencia de terminación de la transcripción en t_1 no era diferente entre las distintas cepas respecto a la silvestre.

deaD. La expresión del gen *deaD* produce una proteína de aproximadamente 72.7 kDa, que pertenece a una familia de RNA helicasas ATP dependientes (Iggo, *et al.*, 1990, Kalman, *et al.*, 1991, Toone, *et al.*, 1991, Py, *et al.*, 1996). Descrita en primera instancia por Toone, *et al.*, 1991, la DeaD es una helicasa con alta homología con respecto a la RhlB (Kalman, *et al.*, 1991, Py, *et al.*, 1996) helicasa de aprox. 50 kDa, la cual está presente en el **degradosoma**. Este tipo de proteínas se cree que son importantes para la degradación del RNA ya que pueden desestabilizar estructuras secundarias, con lo que el RNA es más susceptible a la actividad de exoribonucleasas, principalmente la PNPasa del **degradosoma**. La participación de ésta enzima puede ser importante ya que puede favorecer la traducción, pero a su vez, puede facilitar la degradación del mRNA al conferirle una estructura menos compleja. No se ha determinado si la DeaD es parte del **degradosoma**, pero por su alta homología con las proteínas de la familia de las DeaD, se podría esperar que realizara una función importante en la degradación de los RNA, como parte del **degradosoma**, o independientemente de este.

greA. GreA es una proteína de 17.6 kDa que ha demostrado ser necesaria para una transcripción eficiente en los "sitios de arresto", que son secuencias de DNA que tienen la propiedad de "atrapar" una fracción de la RNA polimerasa. La función de GreA y GreB es la de cortar el transcrito en dichos sitios a fin de que la transcripción continúe a partir del nuevo extremo 3'. Modificaciones en su actividad podrían generar reconocimientos de la enzima hacia *sib1*, con lo que los transcritos podrían ser truncados.

rbfA. El producto del gen *rbfA* es una proteína de 15 kDa que tiene la capacidad de unirse a la subunidad ribosomal 30S en estado libre, mas no en el ribosoma. Al parecer se halla involucrada en la maduración de la subunidad 30S o en la iniciación de la traducción.

nlp. El producto de este gen es una proteína pequeña de 10.5 kDa, que se halla involucrada en la regulación positiva de los genes del metabolismo de azúcares. Mutaciones que disminuyan su actividad, su expresión, o su especificidad, podrían hacer que la transcripción de los genes del operón *gal* disminuya. Para evaluarlo sería necesario determinar si existen diferencias en la cantidad de transcritos, no sólo en el tamaño, además de tratar de identificar la proteína por ensayos de Western blot.

ftsH. La proteína de 70.7 kDa producto de éste gen parece ser una metalopeptidasa dependiente de zinc, y se halla involucrada en la degradación del factor σ^{32} . Como se mencionó antes, el factor σ^{32} es un factor de iniciación de transcripción, por lo que mutaciones en la proteína FtsH podría, indirectamente, afectar la iniciación de la

mutaciones en la proteína FtsH podría, indirectamente, afectar la iniciación de la transcripción; sin embargo, el factor σ^{32} es específico para genes inducidos por calor y para la cascada de esporulación, por lo que sería poco probable la mutación en la FtsH.

yhbU. Este gen resulta interesante ya que se halla localizado muy cerca del gen *pnp*, y su producto, de 37 kDa, al parecer posee una actividad de proteasa. Existe la posibilidad de que mutaciones que hagan más activa o que afecten la actividad de ésta enzima, pudieran hacer que el producto de la traducción de los transcritos de *pMS1* (la galactocinasa) fuera degradado, aunque esto no sería muy probable ya que entonces se esperaría una disminución marcada de la concentración de proteína total, lo cual no ocurre.

Es importante mencionar que las mutaciones de las cepas SGM12 y SGM98 podrían no estar en *pnp*, además de que cada cepa puede tener una mutación diferente. Lo que si queda claro es que los resultados sugieren que las mutaciones tienen efecto sobre la secuencia *sib*, ya que cuando no está presente dicha secuencia, como por ejemplo, con el pKG1800, se comportan de manera muy similar a la cepa silvestre. Sin embargo, es conveniente hacer notar que las mutaciones pueden afectar otras funciones, como son la terminación en *t*, la degradación temprana de los transcritos, o la baja transcripción a partir de *pgal*, entre otros.

Resultan de particular interés las dos bandas observadas en el gel desnaturizante de los extractos proteicos (figura 16). Existe una banda de aproximadamente 55 kDa que es más intensa en la cepa S165, y disminuye de manera muy marcada en las mutantes

identificarla, ya que al parecer su expresión está afectada en las mutantes SGM y podría hallarse ligada al cambio en el fenotipo de las mutantes respecto a la cepa silvestre. Una proteína con un peso molecular similar al descrito sería NusA, de 54.9 kDa. ¿Podría tratarse de alguna mutación que altere la migración electroforética de NusA en condiciones desnaturalizantes?. ¿Podría una mutación en *nusA* ser la responsable del fenotipo de estas cepas al aumentar la eficiencia de terminación en $t\text{-sib1}$? Para resolver estas preguntas habría que diseñar experimentos de transducción en cepas *nusA*⁻ usando como cepa donadora a las mutantes SGM12 y SGM98.

La segunda banda, de aproximadamente 82 kDa, se encuentra aumentada visiblemente en la cepa SGM12 y levemente en la SGM98, comparándolas con la S165 y SGM71. De los productos proteicos antes mencionados, los más cercanos al peso molecular serían la DeaD, de 72.7 kDa y la FtsH, de 70.7 kDa. ¿Podría el mRNA del pMS1 estar siendo degradado por un proceso que involucre a la DeaD al estar ésta formando parte del **degradosoma** o paralelamente a éste?. Habría que analizar expresión de la DeaD y afinidad de ésta por el mRNA de pMS1. En cuanto a la FtsH, la acción de la mutación podría no ser directa, ya que como se explicó antes, es una metaloproteasa que modifica a σ^{32} , pero esto no afectaría directamente el reconocimiento de *pgal*.

La identificación del gen afectado en las mutantes SGM12 y 98 será de gran utilidad para la comprensión más amplia del fenómeno de terminación de la transcripción y procesamiento que presenta el gen *int* del bacteriófago λ , en la región $t\text{-sib}$.

CONCLUSIONES

Se llevó a cabo una caracterización parcial de la enzima polinucleótido fosforilasa de las cepas mutantes SGM12 y SGM98, a fin de determinar si se hallaban afectadas en la expresión de la enzima o en las actividades de polimerización *in situ* o de intercambio de fósforo. Los resultados obtenidos indican que no hay diferencias importantes en los niveles de expresión y de actividad específica de la enzima PNPasa en las cepas probadas, por lo que es posible que las mutaciones se hallen en otros genes de la región de *pnp* y *nusA*. Sin embargo, no es posible descartar la posibilidad de que las mutaciones pudieran hallarse en el gen *pnp* hasta que dicho gen no sea secuenciado.

En el análisis del patrón electroforético de los extractos de proteínas totales bajo condiciones desnaturalizantes, es clara la existencia de dos bandas, de 55 y 82 kDa, aproximadamente, cuyos niveles se ven alterados en las cepas mutantes respecto a la cepa S165. La banda de 55 kDa es muy evidente en el extracto de la cepa silvestre S165, mientras que no es muy clara en las cepas mutantes. De manera inversa, la banda de 82 kDa es muy notoria en el extracto de la cepa SGM12 y un poco en la SGM98, pero no así en la silvestre S165 ni en la SGM71.

Las mutaciones de las cepas SGM12 y SGM98 podrían encontrarse en algún gen ubicado cerca del gen *pnp*, en los minutos 71 y 72 del cromosoma de *E. coli*. Entre los candidatos más probables se encuentran el gen *nusA*, el gen de una RNA helicasa conocida como DeaD, y una metaloproteasa que modifica al factor σ^{32} , la FtsH.

Para conocer mejor el mecanismo de terminación de la transcripción y procesamiento que presenta el gen *int* del bacteriófago λ , en la región t_{-sib} , se requiere identificar a las mutaciones de las cepas SGM12 y SGM98.

BIBLIOGRAFIA

- Adhya, S. y M. Gottesman. 1978. Control of transcription termination. *Ann. Rev. Biochem.* 47: 967-996.
- Adhya, S. y S. Garges. 1990. Positive control. *J. Biol. Chem.* 265(19): 10797-10800.
- Atkinson, B. L. y M. E. Gottesman. 1992. The *Escherichia coli* rpoB60 mutation blocks antitermination by coliphage HK022 Q-function. *J. Mol. Biol.* 227: 29-37.
- Bardwell, J., P. Règnier, S. Chen, Y. Nakamura, M. Grunberg-Manago, y D. Court. 1989. Autorregulation of RNase III operon by mRNA processing. *EMBO J.* 8(11): 3401-3407.
- Belasco, J.G. y C.F. Higgins. 1988. Mechanisms of mRNA decay in bacteria: a perspective. *Gene* 72: 15-23.
- Bermúdez-Cruz, R., M. Chamberlín y C. Montañez. 1998. NusA is involved in transcriptional termination on λ t. Enviado a publicación.
- Blum, E., B. Py, A.J. Carpousis y C.F. Higgins. 1997. Polyphosphate kinase is a component of the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Mol. Microbiol.* 26(2): 387-398.
- Burgess, R., A. Travers, J. Dunn y E. Bautz. 1969. Factor stimulating transcription by RNA polymerase. *Nature (London)* 221: 43-46.
- Cannistraro, V. J. y D. Kennell. 1989. Purification and characterization of ribonuclease M and mRNA degradation in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 181: 363-370.

Carpoussis, A. J., G. van Houwe, C. Ehretsmann y H. M. Krisck. 1994. Copurification of *E. coli* RNase E and PNPase: evidence for a specific association between two enzymes important in RNA processing and degradation. *Cell* 76: 889-900.

Causton, H., B. Py, R. S. McLaren y C. F. Higgins. 1994. mRNA degradation in *Escherichia coli*: a novel factor which impedes the exonucleolytic activity of PNPase at stem-loop structures. *Mol. Microbiol.* 14: 731-741.

Chamberlin, M. J. 1976. Interaction of RNA polymerase with the DNA template. *En: RNA polymerase*. Ed. Losick, R. y M. J. Chamberlin. Cold Spring Harbor Lab., Nueva York, E.U.A. p. 159-192.

Chamberlin, M. J. 1995. New models for the mechanism of transcription elongation and its regulation. *The Harvey Lectures, Serie 88*. p. 1-21.

Chung, C., S. Niemela y R. Miller 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2172-2175.

Cisneros, B. 1990. Aislamiento y caracterización de mutantes de λ . Tesis doctoral. CINVESTAV, México.

Cisneros, B., D. Court, A. Sánchez y C. Montañez. 1996. Point mutations in a transcription, λ_t , that affect both transcription termination and RNA stability. *Gene* 181: 127-133.

Daniels, D. L., J. L. Schroeder, W. Szybalski, F. Sanger, A. R. Coulson, G. F. Hong, D. F. Hill, G. B. Petersen y F. R. Blattner. Complete annotated lambda sequence. *En: Lambda II*. Ed. Hendrix, R., J. Roberts, Stahl, F. y Weisberg, R. Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, E.U.A. p. 529-676.

Das, A., C. Merrill y S. Adhya. 1978. Interaction of RNA polymerase and rho in transcription termination: coupled ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 4828-4832.

- 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. 1993. Control of Transcription Termination by RNA-Binding Proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 62: 893-930.
- Deuschle, U., W. Kammerer, R. Gentz y H. Bujard. 1986. Promoters of *Escherichia coli*: a hierarchy of *in vivo* strength indicates alternate structures. *EMBO J.* 5: 2987-2994.
- Deutscher, M.P. 1990. Ribonucleases, tRNA Nucleotidyltransferase, and the 3' processing of tRNA. *Prog. Nucl. Acid. Res. and Mol. Biol.* 39: 209-240.
- Deutscher, M.P. y N. Racher-Reuven. 1991. Enzymatic basis for hydrolytic versus phosphorolytic mRNA degradation in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. 88: 3277-3280.
- Di Lauro, R., T. Taniguchi, R. Musso y B. deCrombrughe. 1979. Unusual location and function of the operator in the *Escherichia coli* galactose operon. *Nature* 279: 494-500.
- Dombroski, A. J., W. A. Walter, M. T. Jr. Record, D. Siegele y C. A. Gross. 1992. Polypeptides containing highly conserved regions of transcription initiation factor sigma 70 exhibit specificity of binding to promoter DNA. *Cell* 70: 501-512.
- Donovan, W. P. y S. R. Kushner. 1986. Polynucleotide phosphorylase and ribonuclease II are required for cell viability and mRNA turnover in *Escherichia coli* K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 120-124.
- Echols, H. y G. Guameros. 1983. Control of integration and excision. *En: Lambda II*. Ed. Hendrix, R., J. Roberts, Stahl, F. y Weisberg, R. Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, E.U.A. p. 75-92.

- Erickson, J. W. y C. A. Gross. 1989. Identification of the σ^E subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase: a second alternate σ factor involved in high-temperature gene expression. *Genes Dev.* 3: 1462-1471.
- Finger, L. R. y J. P. Richardson. 1982. Stabilization of the hexameric form of *Escherichia coli* protein rho under ATP hydrolysis conditions. *J. Mol. Biol.* 156: 203-219.
- Friedman, D. y M. Gottesman. 1983. Lytic mode of Lambda development. *En: Lambda II.* Ed. Hendrix, R., J. Roberts, Stahl, F. y Weisberg, R. Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, E.U.A. p. 75-92.
- García-Mena, J. 1992. Polynucleotide phosphorylase, *sib* and gene expression. Tesis Doctoral, CINVESTAV, México.
- García-Mena, J., C. Montañez, C. Portier y A. Das. 1998a. A missense mutation in a highly conserved motif of the KH domain, affects Polynucleotide Phosphorylase Autoregulation. Enviado a publicación.
- García-Mena, J., A. Sánchez-Trujillo, A. Das y C. Montañez. 1998b. A novel Polynucleotide Phosphorylase mutant that increases λ .*sib*1-dependent galactokinase mRNA Decay. Enviado a publicación.
- Gogol, E. P., S. E. Seifried y P. H. von Hippel. 1991. Structure and assembly of the *Escherichia coli* transcription termination factor rho and its interaction with RNA. I. Cryoelectron microscopic studies. *J. Mol. Biol.* 221: 1127-1138.
- 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.
- Gross, G., D. A. Fields y E. K. F. Bautz. 1976. Characterization of a ts Beta' mutant RNA polymerase of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 147: 337-341.

Grossman, A. D., J. W. Erickson y C. A. Gross. 1984. The *htpR* gene product of *E. coli* is sigma factor for heat-shock promoters. *Cell* 32: 151-159.

Guarente, L. P. y J. Beckwith. 1978. Mutant RNA polymerase of *Escherichia coli* terminates transcription in strains making defective rho factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75(1): 4828-4832.

Guameros, G., C. Montañez, T. Hernández, y D. Court. 1982. Posttranscriptional control of bacteriophage lambda *int* gene expression from a site distal to the gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 238-242.

Guameros, G. 1988. Retrorregulation of bacteriophage lambda *int* gene expression. *Curr. Top. Microbiol. & Imm.* 136: 1-19.

Guameros, G., L. Kameyama, L. Orozco y F. Velázquez. 1988. Retrorregulation of an *int-lacZ* gene in a plasmid system. *Gene* 72: 129-130.

Guameros, G. y C. Portier. 1991. Different specificities of ribonuclease II and polynucleotide phosphorylase in 3' mRNA decay. *Biochimie* 73: 543-549.

Hajnsdorf, E., O. Steier, L. Coscoy, L. Teyssset y P. Regnier. 1994a. Roles of RNase E, RNase II and PNPase in the degradation of the *rpsO* transcripts of *Escherichia coli*: stabilizing function of RNase II and evidence for efficient degradation in an *ams pnp mb* mutant. *EMBO J.* 13: 3368-3377.

Hajnsdorf, E., A. J. Carpoussis y P. Regnier. 1994b. Nucleolytic inactivation and degradation of the RNase III processed *pnp* message encoding polynucleotide phosphorylase in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 239: 439-454.

Hajnsdorf, E., F. Braun, J. Haugel-Nielsen y P. Regnier. 1995. Polyadenylation destabilizes the *rpsO* mRNA of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 3973-3977.

- Hautala, J. A., C. L. Bassett, N. H. Giles y S. R. Kushner. Increased expression of a eukaryotic gene in *Escherichia coli* through stabilization of its messenger RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 5774-5778.
- Helmann, J.D. y M.J. Chamberlin. 1988. Structure and function of bacterial sigma factors. Ann. Rev. Biochem. 57: 839-872.
- Hendrix, R. 1983. Progress since 1970. En: Lambda II. Ed. Hendrix, R., J. Roberts, Stahl, F. y Weisberg, R. Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, E.U.A. p. 13-19.
- Hirschman, J., P. K. Wong, K. Keener y J. Kustu. 1985. Products of nitrogen regulating genes *ntrA* and *ntrC* of enteric bacteria activate *glnA* transcription *in vitro*: evidence that *ntrA* product is a σ factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 7525-7529.
- Houman, F., M. R. Diaz-Torres y A. Wright. 1990. Transcriptional antitermination in the *bgt* operon of *E. coli* is modulated by a specific RNA binding protein. Cell 62: 1153-1163.
- Iggo, R., S. Picksley, J. Southgate, J. McPheat y D.P. Lane. 1990. Identification of a putative RNA helicase in *E. coli*. Nucleic Acids Research 18(18): 5413-5417.
- Ishihama, A. 1992. Role of the RNA polymerase alpha subunit in transcription activation. Mol. Microbiol. 6(22): 3283-3288.
- Ito, K., E. Kohji y Y. Nakamura. 1991. Genetic interaction between the beta subunit of RNA polymerase and the arginine-rich domain of *Escherichia coli* nusA protein. J. Bacteriol. 173(4): 1492-1501.
- Jin, D. J. y C. A. Gross. 1988. Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli* *rpoB* gene that lead to rifampicin resistance. J. Mol. Biol. 202(1): 45-58.

Kalman, M., H. Murphy y M. Cashel. 1991. *rhB*, a new *Escherichia coli* K-12 gene with an RNA helicase-like protein sequence motif, one of at least five such possible genes in a prokaryote. *New Biol.* 3(9): 886-895.

Kashlev, M., J. Lee, K. Zalenskaya, V. Nikiforov y A. Goldfarb. 1990. Blocking of the initiation-to-elongation transition by a transdominant RNA polymerase mutation. *Science* 248: 1006-1009.

Kinscherf, T. G. y D. Apirion. 1975. Polynucleotide phosphorylase can participate in decay of mRNA in *Escherichia coli* in the absence of ribonuclease II. *Mol. Gen. Genet.* 139: 357-362.

Kolb, A., S. Busby, H. Buc, S. Garges y S. Adhya. 1993. Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *Annu. Rev. Biochem.* 62: 749-795.

Krakov, J. S., G. Rhodes y T. M. Jovin. 1976. RNA polymerase: catalytic mechanisms and inhibitors. *En: RNA polymerase*. Ed. Losick, R. y M. J. Chamberlin. Cold Spring Harbor Lab., Nueva York, E.U.A. p. 127-157.

Krummel, B. y M.J. Chamberlin. 1989. RNA chain initiation by *Escherichia coli* RNA polymerase. Structural transitions of the enzyme in early ternary complexes. *Biochemistry* 28 (19): 7829-7842.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Landick, R., J. Stewart y D.N. Lee. 1990. Amino acid changes in conserved regions of the beta subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase alter transcription pausing and termination. *Genes Dev.* 4: 1623-1636.

Lee, J. Y., M. Kashlev, S. Borukhov y A. Goldfarb. 1991. A beta subunit mutation disrupting the catalytic function of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 6018-6022.

Lee, J. Y. y A. Goldfarb. 1991. *lac* repressor acts by modifying the initial transcribing complex so that it cannot leave the promoter. *Cell* 66: 793-798.

Lewin, B. 1992. Genes IV. 4a. ed., Ed. Oxford University Press, New York. 857 p.p.

Littauer, U. Z. y H. Soreq. 1982. Polynucleotide phosphorylase. En: The Enzymes (Boyer, P.D.) vol XV. Nucleic Acids parte B. Academic Press. p.p. 517-553.

Lundberg, U., A. vonGabain 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.

Mackie, G. A. 1989. Stabilization of the 3' one-third of *Escherichia coli* ribosomal protein S20 mRNA in mutants lacking polynucleotide phosphorylase. J. Bacteriol. 171: 4112-4120.

Maniatis, T., E. F. Fritsch y J. Sambrook. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Lab., Nueva York.

McClure, W.R. 1985. Mechanism and control of transcription initiation in prokaryotes. Ann. Rev. Biochem. 54: 171-204.

McKenney, K., H. Shimatake, D. Court, U. Schmeissner, C. Brady y M. Rosenberg. 1981. A system to study promoter and terminator signals recognized by *Escherichia coli* RNA polymerase. En: Ed. Chirikjian, J. C. y T. S. Papas. Gene amplification and analysis vol II: Analysis of nucleic acids by enzymatic methods. Elsevier, North Holland. p 383-415.

McLaren, R. S., S. F. Newbury, G. S. Dance, H. C. Causton y C. F. Higgins. 1991. mRNA degradation by processive 3'-5' exoribonucleases *in vitro* and the implications for prokaryotic mRNA decay *in vivo*. J. Mol. Biol. 221: 81-95.

McMaster, G. K. y G. G. Carmichael. 1977. Analysis of single- and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acrydine orange. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:4835-4838.

Misra, T.K. y D. Apirion. 1979. RNase E, an RNA processing enzyme from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 254: 11154-11159.

Montañez, C. 1982. Aislamiento y caracterización de mutantes del bacteriófago lambda que carecen del retroinhibidor *sib*. Tesis doctoral. CINVESTAV, México.

Montañez, C., J. Bueno, U. Schmeissner, D. Court y G. Guarneros. 1986. Mutations of bacteriophage lambda that define independent but overlapping RNA processing and transcription termination sites. *J. Biol. Mol.* 191: 29-37.

Mudd, E. A. y C. F. Higgins. 1993. *Escherichia coli* endoribonuclease RNase E: autorregulation of expression and site-specific cleavage of mRNA. *Mol. Microbiol.* 9: 557-568.

Plamann, M. D. y G. V. Stauffer. 1990. *Escherichia coli glyA* mRNA decay: the role of 3' secondary structure and the effects of the *pnp* and *mb* mutations. *Mol. Gen. Genet.* 220: 301-308.

Plunkett, G. y H. Echols. 1989. Retroregulation of the bacteriophage lambda *int* gene: Limited secondary degradation of the RNaseIII-processed transcript. *J. Bact.* 171: 588-592.

Portier, C. 1980. Isolation of a polynucleotide phosphorylase mutant using a kanamycin resistant determinant. *Mol. Gen. Genet.* 178: 343-349.

Portier, C. L. Dondon, M. Grunberg-Manago y P. Regnier. 1987. The first step in the functional inactivation of the *Escherichia coli* polynucleotide phosphorylase messenger is a ribonuclease III processing at the 5' end. *EMBO J.* 6: 2165-2170.

Py, B., H. Causton, E. A. Mudd y C. F. Higgins. 1994. A protein complex mediating mRNA degradation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 14: 717-729.

Py, B., C. F. Higgins, H. M. Kirsch y A. J. Carpousis. 1996. A DEAD-box RNA helicase in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Nature* 381(6758): 169-172.

Rapaport, L. R. y G. A. Mackie. 1994. Influence of translational efficiency on the stability of the mRNA for ribosomal protein S20 in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 176: 992-998.

Regnier, P., M. Grunberg-Manago y C. Portier. 1987. Nucleotide sequence of the *pnp* gene of *Escherichia coli* encoding polynucleotide phosphorylase. *J. Biol. Chem.* 262: 63-68.

Regnier, P. y E. Hajnsdorf. 1991. Decay of mRNA encoding ribosomal protein S15 of *Escherichia coli* is initiated by an RNase E-dependent endonucleolytic cleavage that removes the 3' stabilizing stem and loop structure. *J. Mol. Biol.* 217: 283-292.

Richardson, J. 1993. Transcription Termination. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.* 28(1): 1-30.

Robert-Le Meur, M. y C. Portier. 1992. *E. coli* polynucleotide phosphorylase expression is autorregulated through an RNase III-dependent mechanism. *EMBO J* 11(7): 2633-2641.

Robert-Le Meur, M. y C. Portier. 1994. Polynucleotide phosphorylase of *Escherichia coli* induces the degradation of its RNase III processed messenger by preventing its translation. *Nucleic Acids Research* 22(3): 297-403.

Rosas, H. 1994. Caracterización de cepas mutantes de *Escherichia coli* que afectan la expresión del gen *gal K* dependiente del terminador *t*. Tesis profesional, UNAM, México.

Roy, H. y L.F. Wang. 1986. Multiple Prokaryotic Ribonucleic Acid Polymerase Sigma factors. *Microbiol. Rev.* 50: 227-243.

Russo, F. D. y T. J. Silhavy. 1992. Alpha: the Cinderella subunit of RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 267(21): 14515-14518.

Saiki, R.K., S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich y N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anaemia. *Science* 230: 1350-1354.

Schmeissner, U., K. McKenney, M. Rosenberg y D. Court. 1984. Transcription terminator involved in the expression of the *int* gene of phage lambda. *Gene* 28: 343-350.

Schweisguth, D.C., B.S. Chelladurai, A.W. Nicholson y P. B. Moore. 1994. Structural characterization of a ribonuclease III processing signal. *Nucleic Acids Research* 22(4): 604-612.

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.

Sparkowski, J. y A. Das. 1992. Simultaneous gain and loss of functions caused by a single amino acid substitution in the beta subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase: suppression of nusA and rho mutation and conditional lethality. *Genetics* 130: 411-428.

Straney, S. B. y D. M. Crothers. 1987. Lac repressor is a transient gene-activating protein. *Cell* 51: 699-707.

Strangier, P. 1991. Dances with Sigmas. *EMBO J.* 10: 3559-3566.

Sulewski, M., S. P. Marchese-Ragona, K. A. Johnson y S. J. Benkovic. 1989. Mechanism of polynucleotide phosphorylase. *Biochemistry* 28: 5855-5864.

Takata, R., T. Mukai y K. Hori. 1985. Attenuation and processing of RNA from the *rpsO-pnp* transcription unit of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 13: 7289-7297.

Takata, R., T. Mukai y K. Hori. 1987. RNA processing by RNase III is involved in the synthesis of *Escherichia coli* polynucleotide phosphorylase. *Mol. Gen. Genet.* 209: 28-32.

Takata, R., M. Izuhara y K. Hori. 1989. Differential degradation of the *Escherichia coli* polynucleotide phosphorylase mRNA. *Nucleic Acids Res.* 17: 7441-7451.

Thang, M. N., W. Guschlbauer, H. G. Zachau y M. Grunberg-Manago. 1967. Degradation of transfer ribonucleic acid by polynucleotide phosphorylase. I. Mechanism of phosphorolysis and structure of tRNA. *J. Mol. Biol.* 26: 403-421.

Toone, W. M., K. Rudd y J. D. Friesen. 1991. *DeaD*, a new *Escherichia coli* gene encoding a presumed ATP-dependent RNA helicase, can suppress a mutation in *rpsB* gene encoding ribosomal protein S2. *J. Bacteriol.* 173(11): 3291-3302.

Watson, J.D., N.H. Hopkins, J.W. Roberts, J.A. Steitz, A.M. Weiner. *Molecular Biology of the Gene*. Benjamin Cummings, Inc., Menlo Park, CA. 1987.

Watson N. y D. Apirion. 1985. Molecular cloning of the gene for the RNA-processing enzyme RNase III of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 849-853.

Xu, F. y S. N. Cohen. 1995. RNA degradation in *Escherichia coli* regulated by 3' adenylation and 5' phosphorylation.

Yager, T. y P. H. Von Hippel. 1991. A thermodynamic analysis of RNA transcript elongation and termination in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 30: 1097-1118.

Yarnell, W. y J. Roberts. 1992. The phage λ gene Q transcription antiterminator binds DNA in the late gene promoter as it modifies RNA polymerase. *Cell* 69: 1181-1189.

Zillig, W., P. Palm y A. Heil. 1976. Function and reassembly of subunits of DNA-dependent RNA polymerase. *En: RNA polymerase*. Ed. Losick, R. y M. J. Chamberlin. Cold Spring Harbor Lab., Nueva York, E.U.A. p. 101-125.