



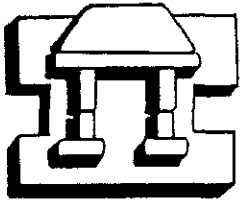
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
CAMPUS IZTACALA

DETERMINACION DE LAS SECUENCIAS MINIMAS
FUNCIONALES DEL TERMINADOR
TRANSCRIPCIONAL λ \dagger DEL FAGO *Lambda*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA
P R E S E N T A :
FEDERICO AVILA MORENO



IZTACALA

TUTOR DE TESIS: DRA. MARIA DEL REFUGIO BERMUDEZ CRUZ

CO-TUTOR: DRA. CECILIA IRENE MONTAÑEZ OJEDA

MEXICO, D. F.

JULIO 2000

263578



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO 4 DEL
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGIA MOLECULAR
CINVESTAV-IPN. A CARGO DE LA DRA. CECILIA I. MONTAÑEZ OJEDA.

BAJO LA TUTORIA DE LA DRA. MARÍA DEL REFUGIO BERMÚDEZ
CRUZ

El espíritu de la moderna investigación
ha dado al traste con las fantasías del alma
y ha introducido en su lugar
un método empírico exacto.
Todo aquel que medite en su fuero interior
tocará en las fronteras de lo inconsciente,
que es precisamente donde está
lo que ante todo
hace falta saber.

Carl Gustav Jung, 1916.

¡ Y mi noción del conocimiento es:
elevantoda profundidad - hacia mi altural

Federico Nietzsche.

ÍNDICE

Agradecimientos.....	II
Resumen.....	V
Introducción.....	1
Regulación de la transcripción.....	3
El bacteriófago λ	9
Regulación y expresión de Int.....	10
Degradación del RNAm.....	14
El terminador <i>tI</i>	16
Objetivos.....	26
Materiales y Métodos.....	27
Resultados.....	41
Construcciones.....	41
Transcripción <i>in vitro</i>	46
Predicción de estructuras secundarias.....	55
Procesamiento de <i>tI in vivo</i>	58
Discusión.....	66
Conclusiones.....	82
Bibliografía.....	83
Apéndice.....	93

AGRADECIMIENTOS

A la vida por todos esos pequeños y precisos momentos de mi inconsciente que en ocasiones se manifiesta consciente permitiéndome tomar mis decisiones a lo largo este maravilloso viaje.

A la memoria de mi padre que formo parte de este viaje.

A mi tutor de tesis Dra. Rosy Bermúdez Cruz, por su invaluable amistad, agradable forma de enseñar y de contagiar su pasión por la ciencia. Gracias por su paciencia y apoyo en todo momento. Felicidades por ser una excelente mama.

A la Dra. Cecilia I Montañez Ojeda, por la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo. Gracias por su amistad y apoyo.

A la Bióloga Alejandra Sánchez Trujillo por considerarme su “consentido”, por su gran ayuda, pero sobre todo por demostrar una formidable amistad y sencillez.

A mis compañeros de laboratorio Ramses por su amistad y ayuda técnica, un reconocimiento ya que presume ser muy “fiel”. A la Dra. Flor Marquez y su marido Pedro por su amistad, felicidades por el diseño de su bonita clona. A Ramiro por su oscuro pasado en Iztacala y su éxito como tratante de blancas. A Lulu, Victor, Francisco, Beto, por su amistad, experiencia y ayuda en el laboratorio, así como por sus cuotas que nunca pague.

Al Dr. Bulmaro Cisneros, Dr. Jaime García Mena, por sus ideas y apreciaciones en el ámbito científico, por su clara amistad. A Everardo, Mario, Pablo, Aidee, Rosalinda, Luis, Victor por contar con mucho de su atención, ayuda y amistad.

A mi amiga Claudia Carrasco Legleu por su amistad, sus ordenadas convicciones y sus desordenados sentimientos.

A mis amigos de la ENEP Iztacala Al globo “Luis” por empeñarse en ser un buen borracho y tener el valor de querer ser un buen mexicano; Al “Fabi” mejor conocido como el hijastro del Dr. Ismael Ledesma por sus churrigerescas y retorcidas reflexiones sobre la Filosofía de la ciencia y por que una mujer lo quito de una vida de excesos quien lo iba a creer!!!; A Penelope alias “Gasparin” por ser una buena amiga, y resistir largas semanas en altamar sin su hombre; Al Cesar-odonte por que a su edad no le da pena decir que no trabaja y su buen gusto por la musica; Al Greñas “Gerardo” por su persistencia, nobleza y porque quiere quemar al país invocador del diablo; Al muñeco diabolico ¡Chucky! “Israel” por su carisma, y sencillez además por que ya trabaja en el Cinves!; A su mujer Socorro por quererlo y gustarle que es peor!; Al Pancho por su aventurada y despreocupada forma de vivir con gusto y alegría rodeado de libros; Al latín lover de Neza, Cuauhtemoc “el costras” por su distinguida personalidad y refinados gustos con los autos y las mujeres; y a todo aquel con quien haya convivido en la Iztacala por los buenos momentos y los malos también.

A mis amigos del Hospital Nacional Homeopático A mi querido amigo Psicofisiólogo Ricardo Bismarck, Al Dr. Vázquez, Srita. Leo, Mónica Franco y Netzahualcoyotl, Jaime, Miguel, y mi querida Maru entre otros.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a la memoria de mi padre por su amor, quien me contagio de los sueños e ilusiones que brinda la lectura. Por su idea de ser libre y autosuficiente.

A mi madre por su coraje y particular forma de afrontar la vida, por todo su esfuerzo invertido en mi educación. Gracias por la confianza y por compartir juntos amor por la vida. A Don Carlos por su dedicación y apoyo a la Familia. Por que cada logro obtenido en cualquier circunstancia lo sientan suyo siempre.

A Paty por crecer juntos desde adentro y hacia fuera. Por lo que fuimos y ahora somos. Por tu éxito y el mío, por haberte conocido respirando anhelos y sueños de trascendencia embriagantes, por tu amor y profunda amistad.

A la memoria de mi padrino Luis Juárez, que siempre me apoyo y creyó en mi, por su mágico papel en mi vida.

A mi querido amigo Israel Guerrero y a su distinguida esposa por su empuje y determinación en mi formación profesional, sobre todo por ser como son.

A mi tía Alicia Moreno y Primo Luis Juárez Moreno por su incondicional apoyo que apreciare siempre. A mis sobrinos Jorge Luis, Alicia, Lourdes y Oscar por que logren sus más ambiciosos sueños.

A toda la familia ya que han formado parte de lo que soy, en algún momento.

RESUMEN

El primer paso en la expresión genética de un organismo, es la transcripción. La *iniciación*, *alargamiento* y *terminación* constituyen el proceso transcripcional. La terminación, delimita unidades de transcripción; en este evento la RNAPol se detiene con ó sin la ayuda de factores proteicos en el terminador transcripcional de la cadena molde del DNA. El terminador λ *tf* "rho-independiente", localizado a 280 pb posteriores al gen λ *int*, es capaz de formar una estructura de tallo-burbuja en el transcrito, la cual es necesaria para que ocurra una eficiente terminación de la transcripción. Por lo que en el presente trabajo se planteo determinar la secuencia mínima funcional de λ *tf*, analizando la eficiencia de terminación de la transcripción *in vitro*, mediante una serie de deleciones de λ *tf* en el extremo 5' y 3' generadas por degradación con Bal31, y clonadas en el vector pBluescribe+/- . Por ensayos de transcripción *in vitro* se obtuvieron transcritos de interés radiomarcados con UTP [α -³²P], y resueltos en geles de acrilamida 5%/7M urea, los cuales fueron cuantificados con un analizador de imágenes radiactivas AMBIS, obteniendo valores promedio en cuentas por minuto (CPM) previa normalización. Por otro lado se predijo y analizó la estructura secundaria de los transcritos generados para cada deleción con el programa "Mfold RNA/DNA". Los resultados obtenidos muestran una reducción en la eficiencia de terminación de 30% con respecto a λ *tf* silvestre cuando se conservan de 9 a 30 bases fuera del terminador hacia el extremo 3'; por otro lado en presencia de 25 a 53 bases fuera del terminador en dirección 5', la eficiencia de terminación desciende en un orden mayor de 50 a 85% respectivamente; concluyendo así, que las secuencias ubicadas en el extremo 5', poseen una mayor influencia sobre el proceso de terminación y que una secuencia mayor a 124 bases es necesaria para una eficiente terminación de la transcripción en λ *tf*. Adicionalmente mutaciones puntuales como *sib1* logran reducir la eficiencia de terminación en un 75%, con solo alterarse un apareamiento en el tallo. Por otro lado se demostró que el procesamiento *in vivo* de transcritos "pgal-*tf*" en cepas de *E. coli* SA1943 deficientes en RNAsa E y doble deficiente en RNAsa E, Polinucleótido fosforilasa, en el sistema pUS6 fue similar entre ellas a 37 °C, y ligeramente distinto comparado con el procesamiento silvestre en *E.coli* isogénica SA1943, sin embargo no se descarta la posibilidad de que los sitios hipotéticos 505, 510, 623, 643 y/o 770 de corte para RNAsa E, sean procesados por esta enzima.

INTRODUCCIÓN

Los procesos de transcripción y de traducción constituyen el dogma central en la biología, dando fundamento y respuesta a los fenómenos fisiológicos, fenotípicos y reproductivos en la materia viva. Para que los seres vivos garanticen su permanencia, es necesario que mantengan su capacidad de respuesta ante las exigencias ambientales, siendo para ello indispensable un adecuado equilibrio en los mecanismos de regulación de la expresión genética (Fig. 1).

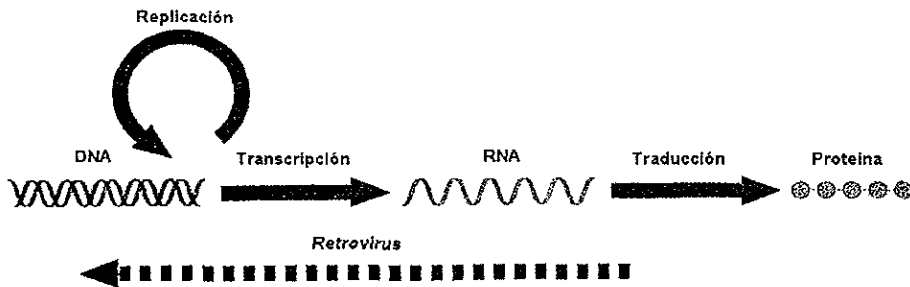


Figura. 1. Representación del dogma Central en la Biología.

La expresión genética en un organismo, en la cual la transcripción define un paso muy importante, consiste en la síntesis de RNAm por parte de una RNA polimerasa DNA-dependiente, basándose en la información contenida en la cadena templado del DNA. El genoma de un organismo integrado de secuencias nucleotídicas arregladas en cromosomas, es transcrito en unidades básicas de expresión (genes), mismos que poseen elementos regulatorios involucrados en la regulación de la expresión genética (Lodish, 1995). Siendo tres los elementos que regulan el proceso transcripcional (Fig.2).

1) Una secuencia adyacente al inicio del gen llamada *promotor* que es reconocido por la RNAPol uniéndose a él. Esta interacción determina el punto de inicio de la transcripción.

2) La *secuencia codificante*; que es la secuencia de pares de bases del DNA o marco de lectura abierto del gen transcrita, por la RNAPol en RNAm de cadena sencilla.

3) Una secuencia adyacente al extremo del gen específico donde la transcripción se detendrá, llamada *terminador* transcripcional.

GEN

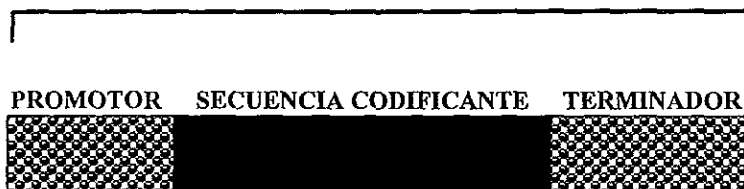


Figura. 2. Representación de los elementos regulatorios que integran un gen estructural.

La transcripción, constituida por un ciclo de reacciones individuales y controladas de tal manera que la síntesis de RNA puede modularse por señales presentes en el DNA, en el transcrito, o por la acción de factores proteicos (Chamberlin, 1974); es catalizada por una enzima RNA polimerasa (RNAPol). La doble hélice del DNA debe ser desenrollada en una región pequeña muy próxima y anterior al sitio de inicio de la transcripción. En procariontes, ocurre como parte del funcionamiento integral de la enzima, mientras en eucariontes se lleva a cabo con la ayuda de otras proteínas que se unen al DNA en el punto de inicio de la transcripción, donde generalmente solo una de las dos cadenas del DNA es “transcrita”, misma que posee dirección 3’ a 5’, siendo el RNAm sintetizado en dirección 5’ a 3’ (Lodish, 1995), (Fig. 3).

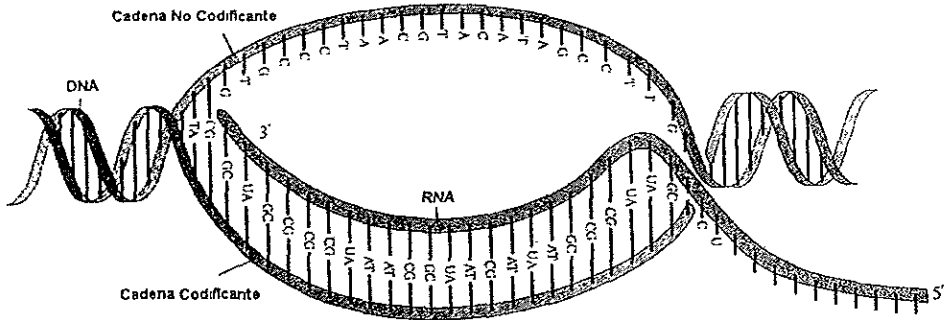


Figura. 3. Burbuja transcripcional y dirección de la síntesis del RNA.

Por otra parte, en Procariontes al igual que en Eucariontes el proceso de terminación de la transcripción juega un importante papel en la regulación de la expresión genética. Además de la complejidad que enmarca dicho proceso en un sistema *in vitro*; la RNA polimerasa puede involucrar diferentes factores proteicos modulando la terminación de la transcripción *in vivo* (Platt, 1986; Yager & von Hippel, 1987; Friedman et al., 1987, Das. A, 1993). Estos factores reguladores, pueden actuar en la secuencia templado del DNA y/o RNA, controlando el proceso de alargamiento, los sitios y eficiencia de terminación en la cadena naciente del RNA, definiendo unidades de transcripción. No obstante, a la inversa otras vías regulatorias pueden actuar para reducir o prevenir la terminación estimulando la transcripción en regiones genéticas previamente apagadas (Reynolds & Chamberlin, 1992).

REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN

De manera general son tres los eventos sobresalientes que constituyen al proceso transcripcional: La iniciación, elongación y terminación.

Iniciación: Dos secuencias en el promotor son esenciales para el inicio de la transcripción. Dichas secuencias se ubican en los sitios -10 y -35 cadena arriba del

sitio de inicio de la transcripción. La región -35 se aproxima a una secuencia consenso: 5'...TTGACA...3' y la -10 semejante a una secuencia: 5'...TATAAT...3' (Lodish, 1995). Aunque algunas veces la región -35 es dispensable (Elliot et al., 1984). Para que inicie la transcripción, es necesario que la RNAPol en su forma de holoenzima se una al promotor. Esta holoenzima consta de un núcleo enzimático que contiene cuatro subunidades polipeptídicas, 2 subunidades alfa (α), una beta (β), y una beta prima (β'), a quien se une otra subunidad llamada sigma (σ). El factor σ es esencial para el reconocimiento del promotor (Lodish, 1995), e interviene en la iniciación de la transcripción, mientras que el núcleo enzimático tiene un papel catalítico (von Hippel et al., 1984).

A medida en que los promotores difieren ligeramente de sus secuencias consenso -10 y -35, se altera la eficiencia de unión por parte de la RNAPol. Como resultado, la tasa con la cual se inicia la transcripción difiere de un gen a otro, esto explica las diferentes tasas de expresión (Lodish, 1995). Así las mutaciones que aumentan la homología con respecto a la secuencia consenso, incrementan la fuerza del promotor mientras que por el contrario, las mutaciones que disminuyen la homología reducen también la eficiencia de inicio de la transcripción (Rosenberg et al., 1979; Lewis, 1987). La RNAPol en ausencia de la subunidad sigma, tiene una alta afinidad por sitios inespecíficos y baja afinidad por sitios específicos (promotores), por lo que, cuando sigma se une a la RNAPol estas afinidades se invierten.

Alargamiento: La síntesis de RNA tiene lugar en una región del DNA que se desarrolla formando una burbuja de transcripción. Una vez que 8 a 9 nucleótidos del RNAm han sido sintetizados, el factor σ se disocia de la RNAPol o núcleo enzimático, y este factor puede ser usado nuevamente en otra reacción de inicio transcripcional. Mientras que el núcleo enzimático completa la transcripción del gen.

La enzima se mueve a lo largo de la cadena templado del DNA en la burbuja transcripcional formada aproximadamente de 17 pb, donde la transcripción es continua. La cadena naciente de RNA se une al DNA formándose temporalmente un híbrido DNA/RNA de 3-12 pb (Rice, Kane & Chamberlin., 1991; Gusarov & Nudler, 1999), mientras que el resto del RNA es desplazado por la cadena de DNA que se reenrolla. La velocidad de incorporación de ribonucleótidos por parte de la RNAPol es de 20 a 25 por segundo a 37 °C (Lewis et al., 1987). Aunque recientemente se ha mencionado que la transcripción procede en una tasa promedio de 30 a 50 nucleótidos por segundo (Lodish, 1995). Se sabe que la RNAPol durante el alargamiento tiene la capacidad de hacer pausas en regiones del DNA y/o RNA, las cuales potencialmente pueden formar estructuras secundarias. Existen evidencias bioquímicas y genéticas que demuestran que la RNAPol se une a varios factores (Chamberlin et al., 1985, Greenblatt et al., 1987), sugiriendo que pueden alterar las propiedades de la RNAPol, para reconocer con mayor o menor sensibilidad una señal de pausa o terminación. Se ha demostrado que la proteína bacteriana NusA provoca que dichas pausas se prolonguen (Friedman et al., 1987; Sigmund, C.D. et al., 1988). También ha sido reportada la participación de secuencias del DNA localizadas aproximadamente a 14pb adelante del sitio de pausa, que interactúan con la RNAPol participando en el fenómeno de terminación (Lee et al., 1990).

Estudios de “footprinting” -protección contra DNasas- de complejos binarios y ternarios (Krummel. B, 1989, 1990), han revelado que el movimiento de la RNAPol es completamente asincrónico, y particular para cada tipo de molde utilizado. Estos estudios han demostrado que el movimiento del dominio trasero y frontal de la RNAPol es asincrónico, es decir que, mientras el dominio trasero se desplaza, el frontal no presenta movimiento lo que se ha referido como movimiento de gusano o inchworming (Chamberlin, 1995) y recientemente interpretado en monotónico e inchworming (Gusarov & Nudler, 1999).

Terminación: La terminación de la transcripción en un gen procariota se encuentra indicada por elementos controladores llamados “terminadores”, y ocurre cuando la RNAPol llega a dicho sitio. En este punto cesa la incorporación de ribonucleótidos por la RNAPol, y el transcrito es liberado disociándose el híbrido DNA/RNA, así como la RNAPol del DNA templado recuperando su estructura de doble hélice (Platt, 1986; Gusarov & Nudler, 1999). La terminación de la transcripción sujeta a regulación por factores proteicos, modula de manera importante el metabolismo celular evitando la transcripción en regiones del genoma en forma innecesaria. Una de las proteínas más importantes involucradas en la terminación de la transcripción en algunos genes de *E. coli* es “rho” (ρ). Los terminadores llamados “rho-dependientes” también llamados terminadores tipo II, requieren forzosamente de esta proteína para una eficiente terminación *in vitro*. Por otro lado, para otros terminadores en un sistema *in vitro* la RNAPol es suficiente para llevar a cabo el evento de terminación. Estos terminadores son llamados “rho-independientes” (Lodish, 1995), o intrínsecos (Reynolds, Bermúdez & Chamberlin, 1992). Existen evidencias que sugieren, que la RNAPol adquiere una conformación durante la fase de alargamiento y otra en la liberación ya que el tipo de unión entre la RNAPol y el templado es diferente según la fase de transcripción. En la fase de alargamiento el tipo de unión que prevalece es “no iónica”, mientras que en la fase de liberación prevalece la “iónica” (Arndt et al., 1990). Esto explicaría porque el transcrito se libera con mayor facilidad en la fase propia de liberación que en la de alargamiento. Esta clasificación de terminadores dependientes e independientes de rho, se debe a que rho fue el primer factor descrito involucrado en la terminación de la transcripción (Roberts, 1969), interviniendo en la liberación del transcrito (Lau et al., 1983, Das et al., 1983, Lewis, 1987). Adicionalmente se han descrito otros factores involucrados en la terminación como NusA, NusB, NusC, NusE, NusG y la proteína Tau, los cuales también pueden modular la terminación que se presenta en los terminadores rho-independientes (Yanofsky, 1988).

Los terminadores rho-independientes llevan a cabo la terminación en un sistema mínimo *in vitro* conteniendo únicamente al DNA templado y la RNAPol. Estos definen a la mayoría de los genes en procariontes por su extremo 3'; aunque ellos también son usados como señales regulatorias situados previamente a genes estructurales, así como en un importante numero de operones para modular la transcripción de genes situados cadena abajo, como atenuadores o terminadores que afectan el índice relativo de expresión de ciertos genes (Y. d'Aubenton. Carafa et al., 1990; Landick R. et al., 1996). Una de las características más sobresalientes de las señales de terminación factor-independientes, es la presencia de una región de doble simetría antes del sitio de paro; que pueden formar estructuras de tallo y burbuja en el extremo 3' del transcrito (Roberts, 1976), (Fig 4).

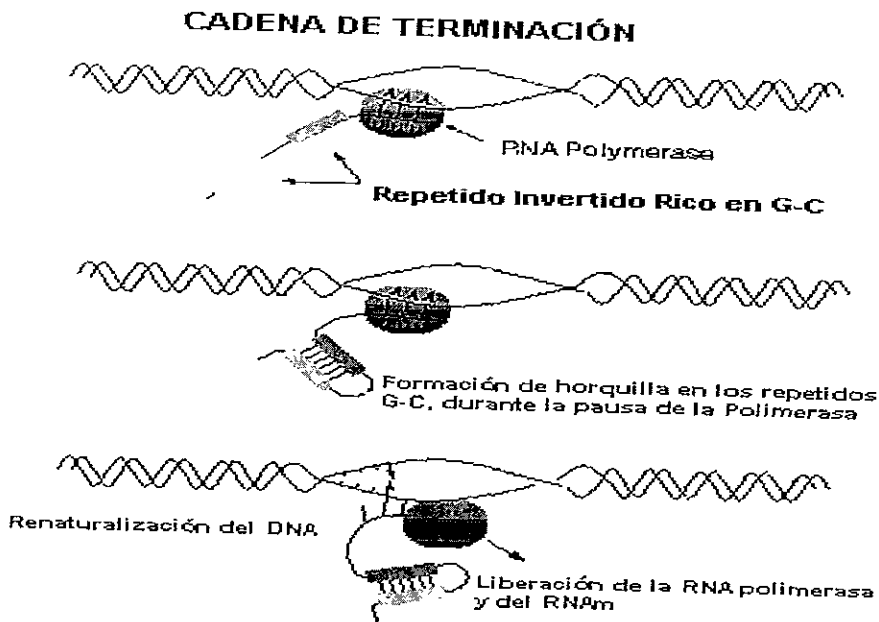


Figura. 4. Formación de la estructura de tallo-burbuja del RNA, en terminadores rho-independientes como resultado del proceso de pausa por parte de la RNAPol.

Los terminadores rho-independientes consisten de una secuencia de doble simetría (palíndromica) con un tamaño cercano de 16-20 pb. Esta secuencia es seguida por un segmento de 4 a 8 pares de Adenina (*A*) - Timina (*T*) en el DNA, que corresponde a una serie de uridinas en el transcrito, justo antes del punto de terminación de la transcripción. Debido precisamente a la capacidad de formar una estructura de tallo y burbuja, seguida por una secuencia de uridinas en el RNA, es que se logra generar la terminación transcripcional (Fig 5). Por otra parte algunos investigadores han considerado la existencia de probables secuencias consenso conservadas que rodean al sitio de terminación, sin embargo, hasta el momento no se han podido identificar elementos en común, ya que a menudo se ha mencionado que la información requerida para que la RNAPol cese la transcripción, no solo se encuentra en la estructura de tallo-burbuja, sino en secuencias situadas con anterioridad (promotores) y posteriores al sitio de terminación (Friedman et al., 1987; Telesnitsky A. & Chamberlin M. 1989a, 1989b; Goliger et al., 1989; Reynolds & Chamberlin, 1992).

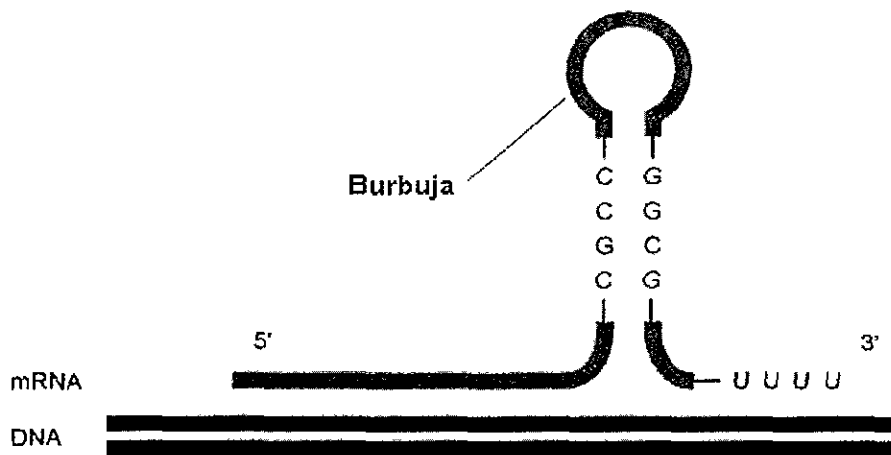


Figura. 5. Predicción y composición de la estructura en la señal de terminación rho-independiente en el RNA sintetizado.

Por otra parte además de proveer los límites de las unidades de transcripción, los terminadores rho-independientes brindan al RNA la capacidad de ser resistente a la degradación por acción de RNAsas, al transcribirse una estructura de tallo-burbuja termodinámicamente estable en el extremo 3' del transcrito. De esta manera la terminación de la transcripción en secuencias rho-independientes incrementa la expresión genética por la estabilidad que brinda al RNAm, ejemplo de ello es el terminador y atenuador del operon de triptofano (*trp*) en *E.coli*, y el gen integrasa (*Int*) del fago *lambda* con el terminador *tI* (Guarneros et al., 1982; Mott et al., 1985).

EL BACTERIOFAGO λ

El bacteriófago lambda " λ ", reconocido como un excelente formador de librerías genómicas, e importante vector de clonación al igual que los plásmidos, ha sido desde hace muchos años una herramienta útil y en ocasiones indispensable para la Biología molecular.

El bacteriófago λ se propaga por dos modos exclusivos el lítico y el lisogénico (Herskowits & Hagen, 1980). El ciclo lítico es la vía preferente cuando la multiplicidad en la infección del fago es baja, y se caracteriza por la dominancia en la función regulatoria positiva de lambda por la proteína "N", la supresión de la terminación por N permite a los transcritos originados en el promotor "*pL*" y "*pR*" el promover la transcripción más allá de la región temprana del fago (Roberts, 1969; Luzzati, 1970; Kourilsky et al., 1971; Lozeron et al., 1976). Eventualmente el genoma entero del fago es transcrito y los viriones son producidos. En el fenómeno lítico la célula infectada muere produciéndose muchas copias del fago. Por el contrario en la vía lisogénica la función lítica del fago es reprimida, y su DNA persiste en la célula, integrándose en el cromosoma hospedero como profago (Guarneros, 1988), requiriendo para la escisión e integración del DNA del fago, del producto viral *Int* y del factor hospedero de integración bacterial (*IHF*) por sus siglas en ingles (Guarneros, 1988).

El sitio de integración-especifica del fago λ , es considerado el puente de recombinación homóloga; eventos de recombinación sitio-especifica que son característicos tanto en células Eucariotas como en Procariotas. La recombinación sitio-especifica requiere el reconocimiento de la secuencia nucleotídica única, en ambas moléculas del DNA por las enzimas recombinasas, las cuales entonces catalizan la unión de las 2 moléculas. La integración del bacteriófago lambda, en un sitio particular del cromosoma de *E.coli*, es el mejor ejemplo de ello. La integración se puede llevar a cabo *in vitro* con la enzima viral integrasa purificada, quien hace un corte en el DNA de *E.coli* y resuelve la unión del genoma viral en dicho sitio por entrecruzamiento. Lambda contiene una región de 15pb, sitio de unión el cual tiene una secuencia núcleo de 7 pb idéntico para el sitio de integración en el DNA de la célula hospedera (Lodish, 1995).

REGULACIÓN Y EXPRESIÓN DE λInt

La expresión del gen *Int*, importante en el ciclo de vida del fago lambda, permite la integración de él mismo, en el genoma de su hospedero *E. coli*. Dos promotores, *pI* y *pL*, controlan el inicio de la transcripción del gen *Int*. El promotor *pL* se activa inmediatamente después de la infección y controla varios genes en el operon izquierdo (*oL*) del fago, incluyendo los genes *Xis* e *Int*. La proteína N, producto del primer gen o gen temprano de *oL*, interactúa con el complejo transcripcional, en el sitio *nutL*, y previene la terminación de la transcripción, en los terminadores *tL* y *tI*, (Friedman & Gottesman, 1983), (Fig. 6).

Después de la infección temprana, la transcripción del gen *Int* se origina en el promotor principal izquierdo *pL*, el cual se localiza a 8 Kb anterior a *Int* (Signer, 1970; Katzir et al., 1976). La expresión de *Int* es muy baja cuando es mediada por este largo RNAm policistronico (Court et al., 1977; Chung & Echols, 1977), como resultado de una

inhibición selectiva en un segmento del genoma llamado “región b”, localizada 240 a 270 pb más allá del gen *Int* referida como retroregulación (Ver, más adelante).

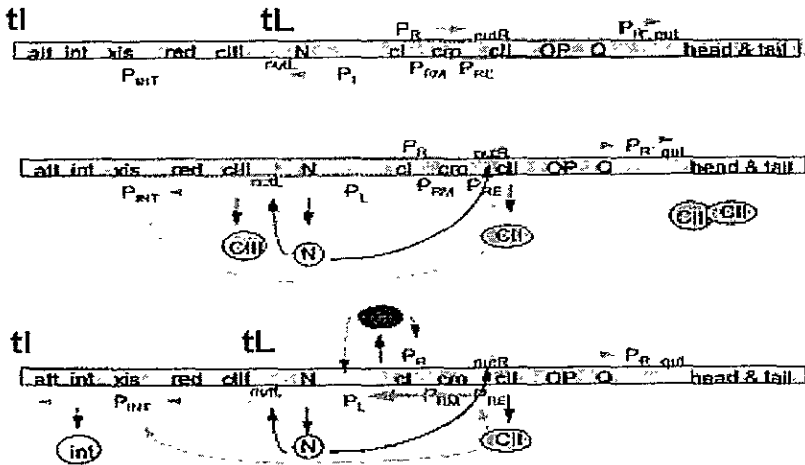


Figura. 6. Genoma del bacteriófago lambda, que representa la regulación de los eventos lisogénicos, que llevan a la síntesis de la proteína Integrasa.

La caracterización del sitio “Sib” (Sitio inhibidor en b) ha mostrado que ciertas mutaciones puntuales o deleciones en esta región reguladora permite una expresión más alta de *Int* (Guarneros & Galindo, 1979; Guarneros et al., 1982; Montañez et al., 1986). Por análisis de secuencia se ha determinado que las mutaciones puntuales realizadas en Sib como: Sib1, Sib2, Sib3 y hef13 han ayudado a definir este sitio retroregulador Sib, como un elemento independiente, pero al mismo tiempo que sobrelapa al terminador *tI* (Montañez et al., 1986; Guarneros et al., 1988). Este se localiza con mayor exactitud a 260 pb más allá del gen *Int*. Sin embargo la expresión eficiente de *Int* ocurre en el estadio tardío de desarrollo del fago, después de que la transcripción a partir de pL ha sido utilizada. La síntesis de *Int* es resultado del

transcrito que se inicia a 183 nucleótidos anterior a la secuencia codificante *Int* en el promotor *pI*. La transcripción de este promotor es regulado positivamente a nivel de la iniciación, por la proteína cII del fago (Schemeissner et al., 1981; Shimatake & Rosenberg, 1981). El promotor *pI*, activado por la proteína “cII” controla la transcripción de *Int*, superpuesto parcialmente con el codón de iniciación del gen “*Xis*” precedente (Abraham et al., 1980, Hoess et al., 1980). Cuando *pI* es activado, casi al mismo tiempo *pL* es reprimido. De esta manera solo el transcrito iniciado en *pI* termina en *tI*, 276 nucleótidos más allá del codón de paro de la traducción del gen *Int* (Oppenheim et al., 1982; Schmeissner et al., 1985). Por otro lado el transcrito iniciado en el promotor *pL*, no termina en *tI* como resultado de la actividad de antiterminación por la proteína N (Schmeissner et al., 1984). Esta diferencia determina el efecto opuesto sobre la expresión del gen *Int* para los dos transcritos. Así el transcrito antiterminado a partir de *pL* es deficiente en la expresión de *Int*, mientras que el transcrito generado a partir del promotor *pI*, cII-dependiente expresa *Int* eficientemente.

La señal Sib en el transcrito producto de la antiterminación a partir de *pL* reduce la expresión del transcrito *Int* debido a que Sib es un sitio blanco de degradación por RNAsas como la RNAsa III (Court et al., 1983), Polinucleótido fosforilasa “PNPasa” (Pnp) (Cisneros et al., 1996) y posiblemente “RNAsa E” (rnE) como lo ha sugerido Pastrana, (1997). Este sistema regulatorio, iniciado por un elemento transcripcionalmente distal al gen blanco, es nombrado “retroregulación” (Schindler & Echols, 1981). Las mutaciones puntuales en Sib, Montañez & cols (1986), situadas a la izquierda del sitio “att” no alteran este sitio de recombinación, pero muestran una falta de control en el fenómeno de retroregulación sobre la expresión de *Int*. En este mismo sentido Court & cols, (1983) generaron deleciones “ $\Delta 21$, $\Delta 112$, $\Delta 119$ y $\Delta 53$ ” que les permitió definir al sitio regulador Sib, hacia el extremo 3'. Adicionalmente en base a la síntesis de galactocinasa en el sistema plásmidico pKG1800 *in vivo* e *in vitro*, se ha demostrado que la deleción $\Delta 119$ físicamente ubicada a 3 pb fuera de la

estructura de *tI*, conserva la función de retroregulación mientras que las deleciones que involucran al tallo: como la $\Delta 21$, $\Delta 112$, y $\Delta 53$ pierden su capacidad de retroregulación (Court et al., 1983), sugiriendo que únicamente el área que abarca la estructura de tallo-burbuja son importantes en el proceso de retroregulación en Sib. Interesantemente el terminador *tI* posee parte de la secuencia que es usada por la RNAsa III en Sib. Este análisis funcional por deleciones en Sib han indicado que, 251 pb a la izquierda del centro att contienen toda la información requerida para la retroregulación negativa, del transcrito iniciado en *pL* (Epp et al., 1981; Guarneros et al., 1982), y para la terminación del transcrito iniciado en *pI*. Deleciones secuenciadas y reintroducidas en el fago λ midiendo el nivel de expresión de *Int* a partir del promotor *pL* (Court et al., 1983), muestran que las deleciones del extremo 3' que involucran la región inferior del tallo-burbuja en *tI* no alteran el fenómeno de retroregulación por Sib mientras que deleciones de la porción alta del tallo abaten el fenómeno de “retroregulación negativa” por Sib ya que en transcritos promovidos a partir de *pL* obtenidos de la actividad *in vivo* del fago se observan elevados niveles de Integrasa, (Guarneros et al., 1982; Court et al., 1983). Por lo que la caracterización de mutaciones puntuales en un segmento de 50 pb del DNA en Sib revelaron el tamaño mínimo estimado para la función del sitio Sib (Guarneros, 1982).

El transcrito antiterminado a partir del promotor *pL* es deficiente en la expresión de la proteína *Int* como una consecuencia del procesamiento inicial de degradación por RNAsa III en la región Sib (Guarneros et al., 1982). Por el contrario el terminador *tI*, ubicado en el extremo 3' del transcrito iniciado en *pI* estimulado por *cII*, provee la síntesis eficiente de la proteína *Int*. Esto es posible ya que el transcrito *pI-Int-tI* evita su degradación por RNAsas protegiendo al transcrito de ataque exonucleolítico, ya que la transcripción se detiene en *tI*, justo antes de que la región Sib sea transcrita y degradada (Schmeissner et al., 1981, 1984a). Guarneros & Cols (1988), propusieron los términos de “retroregulación negativa” para la inhibición en Sib y “retroregulación positiva” para la terminación en *tI*, para la expresión de *Int*. De esta manera además

de su función como terminador, *tl* puede determinar el decaimiento del RNAm. Adicionalmente se menciona que la región Sib puede ser controlada *in vivo* por el evento de recombinación en el sitio att.

DEGRADACIÓN DEL RNAm

La degradación del RNAm es uno de los mecanismos de regulación más importantes en la expresión genética de procariontes. La velocidad de degradación puede variar ampliamente. En *E. coli* la vida media de mensajeros individuales puede ser tan corta, 20-30 segundos o alargarse hasta 15 minutos (Pedersen et al., 1978, Nilsson et al., 1984, Donovan et al., 1986, Emory et al., 1990). Sin embargo generalmente la vida media del RNAm no excede el tiempo de división celular.

Han sido identificadas muchas ribonucleasas en *E. coli*, pero se ha demostrado que sólo un número pequeño de ellas, participan en la degradación del RNAm. Dentro de este número se incluyen unas cuantas endonucleasas como mE, RNasa K, RNasa III y exonucleasas 3' como RNasa II, Pnp. Sin haber identificado hasta la fecha una ribonucleasa que elimine nucleótidos secuencialmente a partir del extremo 5' del RNAm en procariontes (Belasco et al., 1993).

Los sitios de corte para las RNAsas E, K y III no han sido bien definidos (Belasco et al., 1993), sin embargo las ribonucleasas E y K, que parecen estar relacionadas procesan preferentemente secuencias cortas de cadena sencilla ricas en adeninas y uridinas, localizadas en un contexto estructural secundario-terciario apropiado. Adicionalmente al parecer los cortes realizados por mE son el paso determinante en la velocidad de degradación de muchos ácidos ribonucleicos mensajeros en *E. coli*. Por otra parte la RNasa III participa en la degradación de un número mucho más limitado de mRNAs, cortando en ciertos sitios de doble cadena. La mayoría de ácidos ribonucleicos de doble cadena de gran tamaño son sus substratos, los cuales están

perfectamente apareados formando estructuras de tallo-burbuja. Además de su papel en la degradación del RNAm, la mE y RNAsaIII también participan en el procesamiento de RNAs estables, como los ribosomales. Por el contrario las exonucleasas RNAsa II y Pnp, que degradan RNAm de cadena sencilla a partir del extremo 3', no logran la digestión del RNA cuando una estructura de tallo-burbuja se localiza en el extremo 3' del transcrito. Probablemente, la degradación de la mayoría de los mRNAs involucra la acción combinada de endonucleasas y exonucleasas, en la cual un corte endonucleolítico en uno o más sitios, inician el decaimiento (Belasco et al., 1988). Los productos de corte del extremo 5' resultantes, pueden entonces ser degradados rápidamente por exonucleasas 3', las cuales pueden proseguir la digestión hacia el extremo 5', a menos que una estructura de tallo-burbuja termodinámicamente muy estable interfiera en el camino de la exonucleasa. Adicionalmente la digestión por RNAsa II y Pnp finaliza cuando la cadena de RNA se ha reducido de 3-8 nucleótidos (Klee et al., 1968), consecuentemente la degradación completa a mononucleótidos puede requerir la participación de otra ribonucleasa como la RNAsaI (Cannistraro et al., 1991).

Se ha reportado que los cortes endonucleolíticos realizados por mE pueden ser influenciados por estructuras terminales presentes en el extremo 5' del RNA. A pesar de la aparente ausencia de una exoribonucleasa 5' bacteriana activa, elementos blanco del extremo 5' para RNAsas, podrían explicar la velocidad de degradación del RNAm (Bouvet, 1992). Por otra parte la ribonucleasa Pnp posee una capacidad de polimerizar ribonucleósidos difosfatos en grandes polímeros al azar sin requerir un templado. La Pnp también cataliza una reacción de intercambio de fosfatos entre el fosfato inorgánico y el β -fosfato de los nucleótidos difosfatos (Grungberg-Manago, 1963). El componente catalítico de la Pnp es un homotrímero de la subunidad- α compuesta de 711 aminoácidos. Conforman un complejo multiproteico llamado "degradosoma" que contiene mE, EIF, Polifosfato Cinasa, DnaK, Enzima glucolítica Enolasa y la RhlB helicasa (Carpousis et al., 1994; Py et al., 1994; 1996; Miczak et al.,

1996; Blum et al., 1997). Este degradosoma posee una actividad ATP-dependiente que ayuda a la Pnp a degradar el RNA estructurado, adicionalmente la Pnp puede también estar asociada a la RNAsa III. Aunque la degradación del RNAm en *E. coli* es realizado predominantemente por la RNAsa II (Deustcher & Racher-Reuven, 1991), la Pnp participa en la degradación de algunos RNAs específicos (Higgins et al., 1993).

EL TERMINADOR *tI*

Lambda *tI* es un típico terminador intrínseco (*rho*-independiente), de doble simetría interrumpida por un segmento de uridinas. No obstante *tI* presenta una estructura inusual en donde el tallo del terminador consta aproximadamente de 50% de pares de bases tanto A-T como G-C respectivamente, con una secuencia de 4 uridinas en la horquilla. (Briat & Chamberlin, 1984). Adicionalmente mapeando los sitios de terminación de algunos terminadores intrínsecos, se sabe que usualmente muestran uno o dos sitios de terminación (Briat & Chamberlin, 1984), como ya se había sugerido para *tI* (Schmeissner, 1984a). Sin embargo los sitios de terminación sobre los transcritos en *tI* son múltiples a lo largo de los residuos de uridina en el RNA. Característica que resulta ser inusual en terminadores *rho*-independientes (Bermúdez et al., 1999), además puede ser visto que dos de los sitios de terminación encontrados, están localizados en el tallo del RNA, probablemente porque aquella parte del tallo esta constituida principalmente por A-U; heterogeneidad de terminación sugerida desde 1984 por Schmeissner & Cols. De acuerdo a Schmeissner et al, (1984) *tI* posee una eficiencia de terminación *in vitro* aproximada al 75 %, y hasta un 97 % (Luk C., et al 1982; Cisneros., et al 1996), mientras *in vivo* es de 95 - 99 % (Schmeissner et al., 1984; Montañez et al 1986), esto sugiere que algún factor *in vivo* puede favorecer a la terminación, adquiriendo la estructura secundaria con capacidad de favorecer la terminación transcripcional. Así, se ha comprobado que *tI* puede funcionar igual de eficiente tanto en ausencia de *rho* en un sistema *in vitro* (Bermúdez et al., 1999), como *in vivo* ya que como se esperaba por ser *rho*-independiente no se incrementa la terminación en presencia de *rho*, sin embargo la presencia de la proteína purificada

NusA sí eleva la eficiencia de terminación *in vitro* (Bermúdez et al., 1999). El factor NusA es capaz de incrementar la eficiencia de terminación en un sistema plásmidico cercanamente a la eficiencia encontrada *in vivo*, incrementando la eficiencia de terminación de la transcripción en *tI*, de un 50% a un 80% *in vitro* en el sistema plásmidico pD124 (Bermúdez et al., 1999). Es importante señalar que la eficiencia de terminación de la transcripción de *tI* *in vivo* es de aproximadamente 80%, en este sentido se ha mostrado que *in vitro* y en presencia de NusA se obtiene el porcentaje de terminación observado *in vivo* además de que NusA es la responsable de definir los extremos 3' y el sitio preciso de terminación generados *in vivo* (Bermúdez et al., 1991). Sugiriendo que los sitios de terminación identificados son consecuencia de la interacción de NusA y la RNAPol, estas evidencias han apoyado la idea de que las señales de terminación no solo comprenden la estructura del terminador, en particular los de tipo rho-independientes, sino que requieren de secuencias adicionales para el funcionamiento adecuado de estas estructuras. De esta manera la participación de factores proteicos como el mencionado NusA hace pensar que el proceso de terminación transcripcional está regulado por mecanismos sumamente finos. Observándose además que en terminadores rho-independientes el porcentaje de terminación puede ser incrementado cuando la concentración de MgCl₂ decrece en una reacción *in vitro*, situación que también se cumple para *tI*.

El fenómeno de terminación en *tI*, ha sido estudiado medianamente para conocer las secuencias necesarias para su funcionamiento. En ello se ha utilizado al gen reportero galK en el plásmido pUS6, derivado de pKG1800, en el cual la expresión de galactocinasa se reduce hasta en un 94 % *in vivo*. Esta reducción que se debe en parte a que la transcripción se detiene en *tI*; la cual genera un transcrito que se extiende más allá del terminador *tI* y que es traducido, esto es solo el 6% con respecto a pKG1800 que no posee al terminador. Sin embargo al incluir a la mutación Sib1, la expresión de galactocinasa se eleva a 36 %. Esto ahora se explica porque la estructura de Sib1 incluida en el transcrito hace a este más sensible a procesamiento (García-Mena et al.,

1999). Por otra parte se sabe que las mutaciones Sib⁻ reducen la estabilidad termodinámica en su estructura, pudiendo afectar negativamente la tasa de terminación de la transcripción, y por ende el aumento en la expresión de galactocinasa en plásmidos derivados de pKG1800 portador de las mutantes.

Las mutaciones puntuales *Sib1*, *Sib2* y *Sib3* han mostrado mediante ensayos *in vivo* cuantificando unidades de galactocinasa, que la eficiencia de terminación no se ve alterada: 95%, 98%, y 99% respectivamente. Sin embargo la eficiencia de terminación *in vitro* de estas mutaciones se mostró considerablemente alterada: 15% *Sib1*, 60% *Sib2* y 70% *Sib3*, mostrando un 85% *tl silvestre* (Velásquez, 1992). Esta discrepancia se explica por la posibilidad de factores proteicos *in vivo* que estén compensando el efecto mutacional o que el procesamiento altere y/o enmascare los resultados. La reducción en la eficiencia de terminación *in vitro* ha sido observada durante la síntesis dirigida con la RNAPol de *E. Coli*, y la del fago "SP6". Sin embargo en comparación con la RNAPol de SP6, existe una menor eficiencia de terminación con la RNAPol de *E. Coli*.

Si bien las mutantes Sib⁻ alteran la estructura de tallo-burbuja, reduciendo la estabilidad termodinámica del tallo, no obstante la estructura del terminador se mantiene eficiente de acuerdo a Montañez & Cols, (1986). En consecuencia se ha pensado que los dos eventos: la terminación transcripcional y el procesamiento por RNAsas, dependen del apareamiento presente en la estructura del tallo, en parte por su especificidad. Usando la información anterior se ha intentado explicar el efecto diferencial que muestran las mutaciones en la región Sib sobre estas dos funciones; sabiendo que las mutaciones puntuales *Sib1*, *Sib2*, *Sib3* y *hef13*, por un lado reducen ampliamente el fenómeno de retroregulación de *Int*, sin tener un mayor efecto en la terminación. Se ha propuesto que la importancia de la complementariedad fuerte en la estructura del tallo, parece ser menos importante para la RNAPol en el proceso de terminación, y no así en el procesamiento por RNAsas en la retroregulación (Schemeissner et al., 1984). De

hecho otros terminadores silvestres son eficientes con tallos menos estables de los encontrados en las mutantes Sib⁻ (Rosenberg & Court, 1979). Otras explicaciones que incluyen importantes y diferentes sitios de reconocimiento para estas dos funciones podrían explicar el efecto diferencial observado. Ello ha mostrado que la retroinhibición y terminación transcripcional sobre esta región son procesos independientes. En este sentido ha sido importante no solo aislar mutaciones de la estructura del tallo que reduzcan específicamente la terminación sino obtener deleciones para determinar el efecto sobre las actividades de procesamiento y terminación, y así considerar la importancia que poseen las secuencias aledañas al terminador *tI* y/o región Sib, que estén definiendo los límites funcionales del terminador.

Por otro lado analizando la terminación *in vivo* en cepas SA1943 Pnp::Tn5 transformadas con plásmidos pUS6 (*tI*+) y pMS1 (Sib1) cuantificando por Northern Blotting la emisión radiactiva empleando una sonda del promotor de galactocinasa, han mostrado una diferencia en la eficiencia de terminación entre *tI* y Sib1 notablemente significativa: Sib1 24%, y *tI* 94% (Cisneros, 1991). Debido a que en Sib1 muchos de los transcritos pasan más allá de la señal de terminación y sufren procesamiento, sin observarse producto proteico de galactocinasa (García-Mena et al., 1999). Los niveles de galactocinasa para el caso de *tI* y Sib1 son diferentes. Una probable explicación a ello, sería que para *tI* no hay galactocinasa ya que el 80% de los transcritos se detienen en el terminador. Para Sib1 no hay galactocinasa porque no hay transcrito, esto es, que el 80% de los transcritos fueron más allá del sitio de terminación y consecuentemente degradados. Puesto que Sib1 fue aislada como una mutante resistente a RNAsaIII, se ha investigado el efecto de la enzima Pnp en Sib1 (Cisneros, 1991). Interesantemente se encontró que esta es la responsable de la degradación de los transcritos que logran pasar después de la mutación Sib1 en *tI* (García-Mena et al., 1999). Permaneciendo la subunidad catalítica de la Pnp en equilibrio con las subunidades libres y las asociadas al degradable. Las subunidades

ensambladas en el complejo participan en la vía “endo/exonucleolítica” combinada, responsable de la degradación del RNAm *pgal-Sib1-galK*, quien podría generar transcritos *pgal-tI (Sib1)* por ataque exonucleolítico más que por un procesamiento endonucleolítico. Adicionalmente se postula que las subunidades libres de la Pnp (o un complejo diferente) participan en la degradación exonucleolítica del RNAm *pgal-galK* desprovisto de la estructura Sib1. Además se ha determinado que la mutación *pnp-71* sobre el gen de la Pnp cambia el equilibrio dirigido hacia la formación del degradosoma (García-Mena et al., 1999).

Cisneros & Cols (1991), subclonaron en pKG1800 mutaciones puntuales de *tI*, que *in vivo* afectan la eficiencia del terminador. Observando que la proporción de unidades de galactocinasa aumentan de 3-17 veces con respecto al terminador silvestre, lo cual disminuye la eficiencia del terminador en un rango de 16 a 40 %. Mientras que en un sistema *in vitro* utilizando el promotor del fago T3, la RNAPol T3 y las mutaciones puntuales mencionadas, se encontró que la eficiencia de terminación disminuye de un 25% a un 40%. Esto demuestra una menor eficiencia de terminación *in vitro*, si se toma en cuenta que *in vivo* la RNAPol de *E.coli* es más susceptible a los cambios provocados por las mutaciones puntuales, que lo mostrado por la RNAPol de T3. Se llega a la conclusión de que una eficiente terminación en el sitio *tI* requiere además de una estabilidad de la estructura secundaria. Las mutaciones puntuales (*tI1*, *tI2*, y *tI3*) en *tI*, ubicadas en el tallo del terminador flanqueando a la mutación Sib1, provocan la degradación de los transcritos, terminados en *tI*. Siendo la exonucleasa Pnp la responsable de la degradación. Se sabe por otra parte que la endonucleasa RNAsa III procesa *in vivo* a los transcritos en *tI* silvestre, sin embargo degradando a estos transcritos *in vitro*, de acuerdo a las mutaciones puntuales *tI1*, *tI2*, y *tI3*, se ha demostrado que la estabilidad en la región Sib no es primordial para la acción de la RNAsa III *in vitro*, si no que se logren conservar los sitios de reconocimiento para la enzima en cuestión. Solamente las mutantes Sib1, Sib2 y Sib3 impiden que la RNAsaIII, actúe sobre la estructura Sib. Las mutantes *tI1*, *tI2*, y *tI3* no afectan a

ninguna base fundamental para el reconocimiento del sitio blanco para RNAsaIII, lo que permite explicar por que a pesar de que disminuyen la energía libre ΔG de Sib no afectan el procesamiento por RNAsa III y posteriormente Pnp. Con el objeto de analizar ampliamente el comportamiento de las mutantes en *tI*, Cisneros (1991), decidió emplear la RNAPol del fago T3 sobre las secuencias mutantes bajo ensayos de transcripción *in vitro* y comparar con la RNAPol de *E.coli*. Finalmente se observó que el porcentaje de terminación entre las dos polimerasas no difiere ya que el terminador silvestre y las mutaciones tIF1 y tIF2 mostraron una eficiencia de terminación que oscilo entre el $85 \pm 5\%$ mientras que las mutantes tI1, tI2, tI3 mostraron que la RNAPol de *E.coli* es más susceptible a los cambios en la secuencia, ya que en presencia de esta enzima se observa una marcada reducción en la eficiencia de terminación con valor promedio de $10 \pm 2\%$, comparada en la observada con la RNAPol T3 con un valor promedio de $53 \pm 7\%$, tal vez participando *in vivo* factores proteicos. De acuerdo a Pastrana (1997), la mutación puntual tIF2, en el plásmido pUS6 aumenta la estabilidad termodinámica de las estructuras secundarias que forman los transcritos con respecto al terminador silvestre, sin embargo sus transcritos son degradados diferente al terminador silvestre. Adicionalmente sugiere que en el transcrito “*pgal-tI-galK*” se localizan 12 sitios hipotéticos de corte para rNE y 3 sitios para RNAsa K, proponiendo estos sitios como el paso determinante en el decaimiento de los transcritos del extremo 5' del mensaje *pgal-tI-galK*. Por lo que se ha llegado a concluir que la regulación de la expresión genética del gen galactocinasa en pUS6 influenciada por *tI*, no involucra exclusivamente el evento de terminación sino que dicha regulación negativa es el resultado conjunto de terminación, eventos post-transcripcionales como el procesamiento y degradación del mensaje que sobrepasa dicha señal.

Para analizar a *tI*, este fue insertado posterior al promotor *pgal* y anterior al gen de galactocinasa, en el vector pKG1800 (Mckenney et al., 1981). Se ha cuantificado *in vivo* la expresión del gen reportero *galK* midiendo unidades de galactocinasa, en el

plásmido resultante pUS6, en cepas de *E.coli* galK⁻, e *in vitro* mostrando los productos esperados terminados en *tI* y los no terminados en *tI*. Demostrándose que *in vivo* *tI* funciona con una alta eficiencia (>95%) tanto en la posición silvestre del fago lambda como fusionado al promotor pgal de *E.coli* en el plásmido pUS6. Ello ha demostrado que el terminador *tI* es capaz de retener su capacidad de terminación fuera de su contexto natural en el plásmido, siendo evidente que la proteína cII quien activa al promotor *pI*, no juega un papel importante en el evento de terminación (Schmeissner et al., 1984). Con el propósito de obtener una secuencia mínima, se han generado deleciones de *tI* en el extremo 3' generadas por Court & Cols (1982). Se utilizó al plásmido pWR1 (Hsu et al., 1980), derivado de pBR322 que contiene un fragmento de 492 pb de lambda el cual incluye el extremo del gen *Int*, región att y una extensión de 252 pb más allá de att la región b, previamente secuenciadas (Hoess et al., 1980; Hsu et al., 1980). Las deleciones $\Delta 21$, $\Delta 112$, y $\Delta 119$ generadas por Court & Cols, (1983) para definir al sitio retroregulador Sib *in vivo*, han mostrado que la eficiencia de terminación en ellas es significativamente menor al terminador silvestre. En este sentido Martínez, (1989) genero eliminaciones menores, como las eliminaciones: $\Delta 11$ y $\Delta 28$ ubicadas a 29 y 19 pb de la eliminación $\Delta 119$ respectivamente, que han permitido sugerir al extremo 3' funcional en *tI*, mediante la expresión de galactocinasa y cuantificación de β -lactamasa *in vivo* (Martínez, 1989). Para ello Martínez, analizó las deleciones del extremo 3' generadas por Court (1983), y las generadas por el mismo, situadas a distancias variables una de otra, dentro y fuera del terminador. Considerando que los aumentos en la expresión relativa de galactocinasa indican una disminución en la eficiencia de terminación, ya que esta expresión relativa es considerablemente mayor respecto a la expresión unitaria del terminador silvestre, lo cual indica una disminución drástica de la terminación. Sugiriendo también que el extremo 3' funcional de *tI* se localiza entre los 3 y 22 bases después del sitio de terminación del transcrito.

Adicionalmente en nuestro laboratorio se han generado las deleciones $\Delta 325$, $\Delta 337$, $\Delta 634$, y $\Delta 635$ del extremo 5' en el plásmido pUS6 que contiene a *tI* en un fragmento HindIII-EcoRV de 413 pb (Schmeissner et al., 1984). Restringido por HindIII y degradando con la enzima Bal31 se han removido porciones variantes del extremo 5' (Zuber et al., 1987) ubicadas dentro y fuera del terminador (Fig. 7). Después de reparar los extremos con DNA polimerasa "Klenow", e insertando linkers HindIII se recircularizaron fragmentos de diferente tamaño con DNA ligasa amplificando en células competentes SA1943, siendo los fragmentos posteriormente reclonados en pKG1800, y por último secuenciados en el fago M13mp8. En ensayos preliminares -deleciones extremo 5'- donde se cuantificaron los niveles de galactocinasa mostraron una reducción en la eficiencia de terminación, aunque en menor escala con respecto a las deleciones del extremo 3'.

Cisneros (1991), midiendo cantidad de transcritos mostró que algunas deleciones del extremo 5' afectan en menor grado la eficiencia de terminación *in vitro* comparado con eliminaciones del extremo 3'. Sugiriendo que las secuencias posteriores a la señal de paro, son importantes en términos de eficiencia en *tI*, sin embargo en este sentido no existe un sistema de transcripción tanto *in vivo* e *in vitro* equivalente, que revele datos comparativos de lo que sucede en ambos sistemas. Luk & cols, (1982) clonaron y caracterizaron al terminador *tI* como un fragmento de 136 pb de estructura similar al terminador *tL3* del fago lambda, mostrando una eficiencia de terminación de 91% en base a la expresión del gen reportero de galactocinasa, en el plásmido pD124 (Luk et al., 1982). El análisis de ensayos de galactocinasa en las deleciones 5' y 3' sugieren una secuencia de 90 pb como la secuencia mínima funcional para *tI* *in vivo*, segmento comprendido entre las posiciones 27510 y 27600. Sin embargo se ha sugerido que el funcionamiento de *tI* es influenciado por secuencias aledañas, y dependiente del contexto que lo rodea. Sin embargo la funcionalidad del fragmento de 90 pb para *tI* y Sib1 en un sistema *in vitro*, no fue obtenida (Bermúdez, 1991).

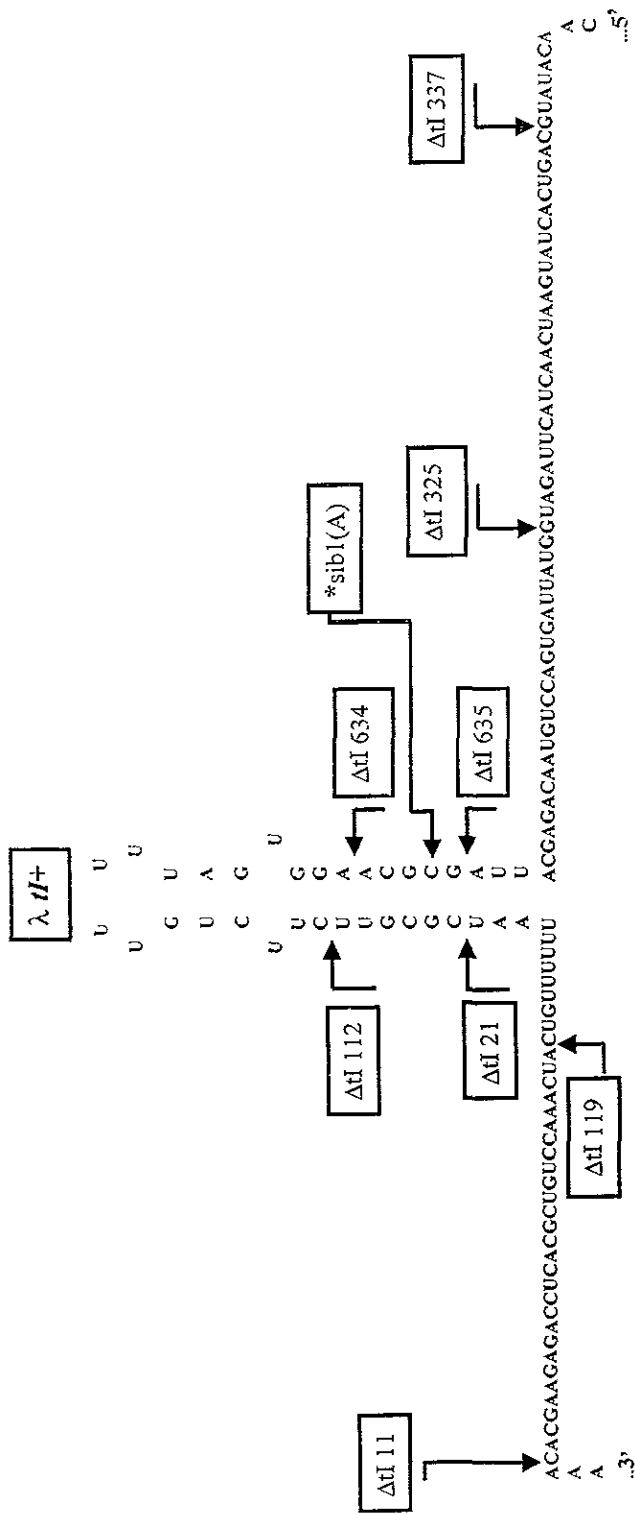


Figura 7. Segmento de 133 bases del fago λ , a partir de la base 27503 a la 27636 que contiene al terminador *tI* silvestre. Ubicación y dirección de los segmentos eliminados hacia los extremos 3' y 5'. *Sibl, corresponde a una mutación puntual por sustitución: citosina por adenina.

Aunque esta secuencia no es funcional no hay transcrito de galK, posiblemente debido al procesamiento del RNAm de galactocinasa. Este fragmento de 90 pb, solo posee 18 pb posteriores al sitio de terminación. Por otro lado un fragmento de 136 pb que contiene a *tI* tanto *in vivo* e *in vitro*, carece de una secuencia BoxTIV y una BoxTI. Comparándose con la secuencia AluI-*tI*-AluI de aproximadamente 250 pb, se ha planteado que en la secuencia de 136 pb, los segmentos BoxTIV y BoxTI (proximales al extremo 5' del RNA) no son esenciales para que la señal de paro lleve a cabo su función eficientemente. Sin embargo ha parecido pertinente analizar la influencia de las secuencias remanentes, en los segmentos de 136 pb (Luk et al., 1982) y 90 pb (Bermúdez, 1991), ya que podría determinarse la importancia de las mismas. A este respecto se sabe que en el extremo 3', se encuentra una región funcional del DNA no transcrita localizada entre los 3 y 20 pb posteriores al sitio de terminación (Martínez, 1989) Sugiriendo que las regiones tanto posteriores como anteriores al sitio de terminación son importantes en el evento de terminación (Telesnitzky A, & Chamberlin, 1989; Reynolds et al., 1991). Por todo lo anterior y debido a que hasta la fecha no existe un estudio *in vitro* completo utilizando la RNAPol T3 con deleciones en *tI*, en el extremo 5' con equivalentes en el extremo 3' que puedan definir una secuencia mínima funcional para el terminador *tI*, nos hemos planteado analizar el efecto de deleciones en el extremo 5' y 3' en la funcionalidad del terminador *tI in vitro*, para definir la secuencia mínima funcional para el terminador *tI* del fago lambda. Y dado que el proceso de terminación no se encuentra separado del procesamiento, también nos propusimos construir cepas de *E.coli* afectadas en las enzimas que participan en el procesamiento de transcritos "RNA" bacteriano, y analizar el procesamiento *in vivo* de los transcritos generados en el terminador silvestre (pUS6), y Sib1 (pMS1).

OBJETIVO GENERAL

- DETERMINAR LAS SECUENCIAS MÍNIMAS FUNCIONALES DEL TERMINADOR TRANSCRIPCIONAL *tI* DEL FAGO *Lambda*, ANALIZANDO LA FUNCIONALIDAD DEL TERMINADOR EN BASE A DELECCIONES DE *tI*, MEDIANTE ENSAYOS DE TRANSCRIPCIÓN *in vitro*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- DISEÑAR UN SISTEMA DE TRANSCRIPCIÓN *in vitro* CONFIABLE Y OPTIMO.
- CLONAR LAS DELECCIONES $\Delta 11$; $\Delta 119$; $\Delta 21$; $\Delta 112$; QUE CORRESPONDEN AL EXTREMO 3' DE *tI* EN EL VECTOR pBS⁺/. ASI COMO LAS DELECCIONES $\Delta 634$; $\Delta 635$; $\Delta 325$; $\Delta 337$; UBICADAS EN EL EXTREMO 5' DEL TERMINADOR.
- ANALIZAR LA EFICIENCIA DE TERMINACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN DEL TERMINADOR *tI* SILVESTRE Y LAS DELECCIONES DEL EXTREMO 5' Y 3', MEDIANTE ENSAYOS DE TERMINACIÓN *in vitro* EN BASE A LA RNA POLIMERASA DEL FAGO T3.
- ANALIZAR Y PREDECIR LA ESTRUCTURA Y ESTABILIDAD TERMODINÁMICA DE LOS SEGMENTOS DELETANTES Y SILVESTRES DE *tI*.
- CONSTRUCCIÓN DE LAS CEPAS DE *E. coli*, DEFICIENTES EN Pnp; rnE; y Pnp rnE PARA EL CORRESPONDIENTE ANÁLISIS DEL PROCESAMIENTO DE TRANSCRITOS QUE CONTENGAN A *tI*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Plásmidos.

Los plásmidos empleados en este trabajo se describen en la tabla 1.

Cepas bacterianas

Las células bacterianas derivadas de *E. Coli*, utilizadas en este trabajo se describen con su genotipo relevante en la tabla 4.

Medio LB [1L](Luria Bertain)

Bacto-triptona 10 g; extracto de levadura 5 g; NaCl 10g, ajustar pH a 7 con NaOH 5N y esterilizar por autoclave (Maniatis, 1989).

Medio SOB [1L]

Bacto-triptona 20 g; extracto de levadura 5 g; NaCl 0.5 g; ajustar el pH a 7.5 con KOH, y esterilizar por autoclave (Maniatis, 1989).

Medio SM [1L]

NaCl 5.8 g; MgSO₄ · 7 H₂O 2 g; 1 M Tris Cl (pH 7.5) 50 ml; solución de gelatina al 2 % 5 ml; aforar a un litro con agua y esterilizar por autoclave (Maniatis, 1989).

Medio SOC

Concentraciones finales: 10 mM de MgSO₄; 10 mM de MgCl₂; y 20 mM de glucosa aforar con medio SOB (Maniatis, 1989).

Solución TFB1 para preparar 50 ml.

<i>Solución Stock.</i>	<i>Cantidad.</i>	<i>Concentración final.</i>
------------------------	------------------	-----------------------------

500 mM KAc.	3ml	30 mM KAc
1 M KCl.	5 ml	100 mM KCl
1 M CaCl ₂	500 µl	10 mM CaCl ₂
MnCl ₂	0.3 g	50 mM MnCl ₂
Glicerol	7.5 ml	15% Glicerol

Aforar a 50 ml y ajustar pH 5.8 con 0.2 M de ácido acético, esterilizar por filtración.

Solución TFB2 para preparar 20 ml.

<i>Solución Stock.</i>		<i>Concentración final.</i>
100 mM MOPS	2 ml	10 mM MOPS
1 M KCl	100 µl	10 mM KCl
1 M CaCl ₂	1.5 ml	75 mM CaCl ₂
Glicerol	3 ml	15 % Glicerol

Aforar a 20 ml y ajustar pH 6.5 con KOH, esterilizar por filtración (Hanrahan, D., 1985).

Amortiguador para carga en gel 6X

0.25% de azul de bromofenol; 0.25% de Xilen Cianol FF; 15% de Ficoll (Tipo 400, Farmacia) en agua. Almacenar a temperatura ambiente. (Maniatis, 1989).

Marcador de DNA en escalera de 1 Kb

Sol. Trabajo: 10 µl de DNA Ladder *GibCO* [1 µg/µl]; 10 µl de amortiguador de carga 6X; y 40 µl de agua desionizada *Milli-Q*, -tomar 2 µl por corrida- en gel de agarosa o acrilamida.

Enzimas de restricción

Las enzimas de restricción empleadas y las condiciones de uso fueron las recomendadas por los proveedores “Biolabs New England” y “GibCO, BRL”.

Solución desnaturizante para transcritos radiomarcados

Buffer TBE 2X; Formaldehído (HCOH) 1.2 %; y Formamida (HCONH) 4.7 % concentraciones finales, adicionalmente se añadieron 5 µl de amortiguador de carga 6X. Se realizaron alícuotas de 1 ml, almacenándose a -20 °C (Maniatis, 1989).

Buffer Lisis “easy preps”

10 mM Tris-Hcl, 1 mM EDTA, 0.1 mg/ml BSA, 0.2 mg/ml RNAsa A, 15% peso volumen Sacarosa, 2 mg/ml Lisozima. Realizar alícuotas de 500 µl y almacenar a -20 °C (Heinrich B. & Bernhard A., 1993).

Solución 20X SSC

0.2 M de MOPS (N-Morpholino) Propane-Sulphonic Acid; 0.5 M Acetato de Sodio pH 7; 0.01 M EDTA, esterilizado “*Amersham and Hybond*”.

Geles de Agarosa Desnaturizantes

Disolver 1.5 gr de agarosa en 73 ml de Agua milli-Q, y 10 ml de MOPS 10X, enfriar aproximadamente a 50 °C-en este momento ajustar el volumen a 83 ml- y añadir 17 ml de Formaldehído 37% (v/v), mezclar inmediatamente y verter el gel. Estos geles se corren en amortiguador MOPS 1X de acuerdo a recomendaciones de *Amersham and Hybond*.

Extracción de DNA plásmidico por el método de easy-preps

Centrifugar a velocidad máxima 1.5 ml de un cultivo bacteriano fresco por 30 segundos en tubos eppendorf de 1.5 ml; se aspira el sobrenadante resuspendiendo la pastilla en 50 µl de *buffer de lisis*, se dejan los tubos a temperatura ambiente por 5

minutos. Posteriormente se hierve la suspensión por 60 segundos e inmediatamente se *enfrió sobre hielo por otros 60 segundos*. Los tubos se centrifugan a velocidad máxima en la centrifuga eppendorf por 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se recupera el sobrenadante sin tomar de la pastilla formada, quedando listo el DNA para usarse en restricción o secuenciación (Heinrich B. & Bernhard A., 1993).

Procedimiento-PEG de purificación midi-prep de DNA plasmidico

Se ha comparado la calidad del DNA purificado por este método con el DNA purificado por gradientes equilibrados de Cloruro de Cesio, en técnicas de transfección en células de mamífero. El crecimiento y lisis bacteriana fue realizada como lo describe esta técnica Goldberg & Lau (1993), con las siguientes modificaciones: Una colonia perfectamente aislada, preferentemente DH5 α (Ver, tabla 4) fue sembrada esperando su crecimiento por agitación a 37 °C durante toda la noche en 50 ml de medio LB con la cantidad del antibiótico que corresponda, en un matraz de 250 ml, para superficie de aereación. Posteriormente las células fueron cosechadas en tubos corex 30ml por centrifugación a 5,000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Inmediatamente después de decantar el sobrenadante las células fueron resuspendidas en 6 ml de una solución que contiene 50 mM de glucosa, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0 y 10 mM EDTA, pH 8.0 y se incubaron sobre hielo por 5 minutos. Posteriormente la suspensión se mezcló por inversión con 12 ml de una solución 0.2 N NaOH, 1% dodecyl-sulfato de sodio (SDS) incubando nuevamente por otros cinco minutos sobre hielo. Nuevamente se mezcló la preparación por inversión con 9 ml de una solución 3M Acetato de potasio, y 2 M de ácido acético incubando por otros 5 minutos sobre hielo, al cabo de los cuales el lisado es recuperado por centrifugación a 8,500 rpm por 15 minutos a 4°C transfiriéndolo a un tubo Falcón de 50 ml. Adicionalmente este lisado se incubó a 37°C con 2.4 μ g/ml RNAsa A por 20 minutos, posteriormente se realizó una doble extracción por Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamilico (25:24:1), y se precipitó con 0.6 volúmenes de Isopropanol por 30 minutos a temperatura ambiente, además en etanol y 0.1 M NaCl toda la noche a -20°C. Por último se centrifugó nuevamente a 15,000

rpm por 20 minutos a 4 °C. Adicionalmente las pastillas son lavadas con alcohol al 70% y resuspendidas en un volumen aproximado de 100 a 200 μ l de agua *milli-Q plus*. Por ultimo este DNA puede ser cuantificado en un espectrofotómetro y ser usado, o puede someterse a purificación por gradientes equilibrados de Cesio como se describe más adelante. Nota: Se omitió el paso por Polietilen-glicol “PEG”, ya que en nuestra experiencia fue innecesario.

Purificación de fragmentos de DNA por el método de electrolución

Después de resolver el DNA de interés mediante electroforesis en geles de agarosa. Se utilizó un electrolutor unidireccional modelo UEA “International Biotechnologies Inc”. (IBI). Se procedió a llenar sus 2 compartimentos con TBE 0.5X equilibrando sus niveles y verificando que los pozos de recuperación no tuviesen burbujas de aire, posteriormente los pozos-V a utilizar fueron ocupados en su fondo con 150 μ l de una solución 10M de NH_4Oac con azul de bromofenol, una vez hecho esto se corto la banda de DNA del gel de agarosa y se coloco en la cámara correspondiente al pozo-V de recuperación donde se deposito el fragmento a purificar en un lapso de aproximadamente 60 minutos a 90 Volts. La duración de electrolución depende del tamaño del fragmento, para fragmentos más grandes a 20Kb 50 minutos son suficientes, para fragmentos más pequeños IBI recomienda monitorear cada 10 minutos la muestra en cuestión visualizándola por luz ultravioleta ya que es posible que en un corrimiento mayor a 50 minutos un fragmento pequeño escape de la solución salina depositada en el pozo-V, y la recuperación del fragmento sea escaso, se puede recomendar utilizar un voltaje bajo para obtener un mayor control sobre la electrolución. Recomendaciones del proveedor: “International Biotechnologies Inc. IBI”.

Ensayos de ligación y clonación de fragmentos de DNA en vectores plasmidicos

Se utilizo la **T4 DNA ligasa** de *GibCO BRL*, la cual puede ser usada para unir fragmentos de DNA con extremos parejos o cohesivos, y para reparar rupturas en la

doble cadena del DNA teniendo extremos 3'-hidroxilo y 5'-fosfato. Se empleo el DNA vector con las enzimas de restricción apropiadas previamente aislado por electrolución en una cantidad de al menos 100 ng y en consecuencia una cantidad equimolar del inserto de DNA, el proveedor sugiere el Buffer de ligación Buffer 5X DNA ligasa, el cual se empleo a una concentración final de 1X, y 5 unidades de T4 DNA ligasa y se aforo a 25 μ l con agua desionizada por filtro *Milli-Q plus*. Las mezclas de ligación fueron sometidas a incubación a 16 °C aproximadamente por 18 Hrs, posterior a este tiempo esta mezcla de ligación pudo ser empleada para realizar transformación de células competentes.

Preparación de células competentes

Este método nos permite obtener una eficiencia de transformación de 10^7 colonias por μ g de DNA. La penetración del DNA es posible por la acción de ciertos iones catiónicos como el Ca^{++} , que debilitan la membrana bacteriana, por lo que se forman poros en esta con un choque térmico. Se cultivaron bacterias toda la noche a 37 °C (DH5 α -alta eficiencia de transformación para utilizar en ligaciones, C600 para mantenimiento de plásmidos), en medio Luria con o sin antibiótico según sea el caso. Al día siguiente se inocularon 50 ml de Luria con 500 μ l del cultivo crecido de la noche anterior incubándose nuevamente a la misma temperatura hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4-0.6 a OD₆₀₀- aproximadamente 2:30 – 3:00 hrs. Una vez alcanzada la densidad óptica mencionada las células se centrifugaron en frío a 3 Krpm durante 12 minutos, asegurándose de eliminar el sobrenadante, el botón celular se resuspendió suavemente en 16 ml de *TFBI*, se incubo por 15 minutos sobre hielo, posterior a ellos se centrifugó nuevamente la solución bacteriana a 3 Krpm por 12 minutos eliminando el sobrenadante y resuspendiendo el botón celular en 4 ml de la solución *TFB2* se incubo sobre hielo por 15 – 30 minutos. Las células se distribuyeron en alícuotas de 200 μ l en tubos eppendorf congelándose a -70 °C. Los reguladores utilizados contienen glicerol, lo que permite que las células puedan ser

congeladas y almacenadas por días a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. La eficiencia de transformación se reduce de acuerdo al tiempo de almacenaje (Hanrahan, 1985).

Transformación de células competentes

En 200 μl de células competentes se agregaron 20 μl (100 ng DNA) de la solución de transformación ya sea de producto de ligación o DNA superenrollado, adicionalmente fueron usados controles de DNA plasmidico (50-100 ng) para calcular la eficiencia de transformación. Las muestras se colocaron 10-60 minutos sobre hielo, se aplico un choque térmico a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 90 segundos, regresando las células sobre hielo nuevamente, se añadieron 800 μl de medio SOC -preparado al momento-, posteriormente se incubo la mezcla a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por espacio de 1 hora resuspendiendo ligeramente cada 10 minutos. Se espatularon 100 μl de las mezclas de transformación en cajas con medio Luria y antibiótico selectivo, incubándose a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 16- 20 hrs, al cabo de las cuales se aislaron transformantes (Hanrahan, 1985).

Purificación de DNA plásmidico circular por centrifugación equilibrada en gradientes de Cloruro de Cesio-Bromuro de Etidio

Por cada ml de DNA diluido en agua o en buffer TE, se adicionó 1 gr de CsCl y Bromuro de etidio a una concentración final aproximada de 800 $\mu\text{g/ml}$ (Maniatis, 1989). Se emplearon 400 μl de una solución de bromuro de etidio a una concentración [10 mg/ml], en un volumen total de mezcla de 5ml lo que resulto en una concentración final de 800 $\mu\text{g/ml}$, las mezclas obtenidas se transfirieron a tubos *Quick-Seal* Beckman de 5 ml, los cuales fueron sellados por calor, y sometidos a centrifugación en una ultracentrífuga "Optima XL Beckman" con un rotor "vTi90" a 90,000 rpm por espacio de 2:30 hrs a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, con un programa de frenado de 6 minutos al termino del tiempo de ultracentrifugación. Se formaron dos bandas en el centro del gradiente visibles con luz ultravioleta, se recupero la banda inferior por contener al DNA plasmidico circular con jeringas de 3cc y agujas de 21 X 32 mm, esta solución acuosa se depositó en un tubo

Falcón de 15 ml donde se removió el bromuro de etidio con una solución de isopropanol saturado con CsCl, tantas veces fue necesario hasta desaparecer el color rosado de la fase acuosa CsCl con el DNA, mismo que fue diluido con 3 volúmenes de agua y 2-3 veces más el volumen obtenido con etanol absoluto frío para precipitar a -20°C de 2 Hrs a toda la noche. Posteriormente se centrifugó a 8,500 rpm por 20 minutos a 4°C , la pastilla se lavó con etanol frío al 70%, liofilizada y resuspendida en 250 μl de agua desionizada por filtro *Milli-Q plus* o Buffer TE 1X. La concentración de los DNAs purificados fue determinada en un volumen de 500 μl de agua en una dilución 1:100, en un espectrofotómetro *GeneQuant* calculador RNA/DNA *Pharmacia Biotech*.

Transcripción *in vitro*

Los DNAs molde usados de la serie pBS⁺ Δ lI, fueron purificados por gradientes de Cloruro de Cesio (*Maniatis et al.*, 1989), y linearizados con la enzima EcoRI generando un fragmento truncado, la restricción total fue comprobada. Estas mezclas de restricción fueron extraídas 2 veces con un volumen igual de Fenol:Cloroformo:Alcohol isoamílico, precipitando posteriormente con dos volúmenes de etanol absoluto y 0.3M de acetato de Sodio, utilizando glucógeno como acarreador. Los DNAs templado se recuperaron por centrifugación a 4°C y se resuspendieron en agua a una concentración final de 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Se utilizó la RNAPol T3, DNA-dependiente (*GibCO BRL*), con especificidad extremadamente alta para secuencias promotoras de T3. La mezcla de reacción consistió de las siguientes condiciones funcionales de ensayo: [1X] de solución amortiguadora T3/T7; 0.2 μl de (α -³²P)UTP (280 mCi con actividad específica de 400 Ci/mmol); [2mM] de ATP, CTP, GTP y [0.1mM] para condición STD y [0.2mM] de UTP para otra condición de ensayo; [10mM] de DTT; [0.4 μg] de DNA linearizado; aproximadamente 2 unidades de inhibidor de RNAsas (*GibCO BRL*); y 15 unidades de RNAPol T3, en un volumen de 10 μl por reacción. La transcripción se incubó por 15 minutos a 37°C , al cabo de los cuales se adicionó acetato de amonio en una concentración final de 2.5 M; dos

volúmenes de etanol absoluto y 20 µg de glucógeno como acarreador para precipitar los transcritos. Los RNAs recuperados por centrifugación así como los marcadores de peso molecular (Gibco 0.3-1.77 Kb RNA Markers) y previamente lavados con alcohol al 70% fueron desnaturalizados por 7 minutos a 70 °C en 20 µl de solución desnaturalizante. Inmediatamente los transcritos desnaturalizados fueron sometidos a electroforesis vertical en geles de poli-acrilamida 5% 7M/Urea a 45 milliamps, se corto y tiño con bromuro de etidio el carril donde se cargaron los marcadores para su previa identificación. Enseguida los geles se fijaron en una solución de ácido acético 7%, 10% Metanol, 20% etanol, fueron transferidos y secados sobre papel Wattman marcando el peso molecular de RNA, exponiéndose posteriormente a placas autoradiográficas para la visualización de los transcritos. Las placas se revelaron y se analizó la incorporación de radioactividad en los mensajeros de interés sobre el gel, cuantificando la eficiencia de terminación en un analizador de imágenes radiactivas "AMBIS", normalizando los transcritos mediante la formula:

$$\frac{\text{CPM transcrito "T" en } tI \times 100}{\text{CPM transcrito "T" en } tI + \text{CPM "NT"}}$$

Donde (T) representa el transcrito que termina en *tI*, y (NT) la fracción de transcrito alargado más allá de la señal de paro, expresado en cuentas por minuto (CPM).

Preparación de lisados por fago P1Vir

Se inocularon 5 ml de medio Luria con una colonia aislada de la cepa bacteriana donadora, agitando a 37 °C toda la noche. Posteriormente se inocularon nuevamente 5 ml de medio Luria con una concentración final 0.2% de glucosa y 5 mM de CaCl₂, con 50 µl del cultivo de la noche anterior, se incubó a 37 °C con agitación por 30 minutos. Después se añadió 0.1 ml de lisado P1Vir con un título aproximado de 5X10⁸ UFP/ml, se agitó a 37 °C hasta lisis celular 3-4 Hrs, inmediatamente después a la lisis celular se adicionó 0.1 ml de cloroformo vortexeando, adicionalmente se

centrifugó por 10 minutos a 4.5 Krpm. Cuidadosamente se transfirió el sobrenadante a un tubo estéril y se añadió 100 µl de cloroformo, titulando posteriormente el lisado esperando un título aproximado del orden de 10^8 UFP/ml, almacenando el resto a 4 °C. Si las células no lisan al cabo de 4 Hrs es posible recuperar una producción modesta de lisado que puede ser utilizado. La adición de Ca^{++} se requiere para la absorción del fago P1Vir. El error más común, se comete cuando realizando lisados PI se comienza con un cultivo bacteriano demasiado denso, entonces el cultivo no lisara (Miller J.H. 1972; Silhavy T.J. et al., 1984)..

Titulación de lisados fágicos

Se realizaron diluciones 10^{-4} , 10^{-5} , y 10^{-6} en medio SM de los lisados fágicos obtenidos previamente. Se tomaron 100 µl de cada dilución y se infectaron 100 µl de un cultivo fresco de la cepa de *E. coli* C600, se permitió la absorción durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 2.5 ml de medio R precalentado a 45 °C aproximadamente vortexeando la mezcla se vertió lo más rápido posible en cajas con medio R homogeneizando la mezcla vertida sobre la superficie antes de que solidifique. Estas cajas se incubaron a 37 °C toda la noche y se cuantificaron las placas obtenidas de acuerdo a las diluciones realizadas, expresándose:

$$\frac{\text{No. de placas}}{\text{Volumen (ml)}} \times 10^6 (\text{dilución realizada}) = \text{UFP/ml}$$

El tamaño de las placas puede variar debido a diferentes tasas de absorción (Miller J.H., 1972; Silhavy T.J. et al., 1984).

Transducción genética mediante p1Vir

Se inocularon 5 ml de medio Luria con una colonia de la cepa bacteriana receptora incubando a 37 °C con agitación toda la noche, se centrifugó el cultivo a 3,000 rpm por 10 minutos eliminando el sobrenadante. Se resuspendió el paquete celular en 2.5 ml

de 10 mM MgSO₄ y 5 mM de CaCl₂ -concentraciones finales- previamente esterilizadas por filtración. Se prepararon 5 tubos eppendorf adicionando células receptoras y fago P1Vir crecido sobre la cepa donadora como sigue:

<i>Tubo de prueba</i>	<i>Células</i>	<i>Lisado P1Vir</i>
1.	100 µl	-----
2.	100 µl	10µl
3.	100 µl	50µl
4.	100 µl	100µl
5.	-----	100µl

Se incubaron los 5 tubos por 30 minutos a 30 °C sin agitación. Posteriormente se añadieron 100µl [1M] de citrato de Sodio -estéril- a cada tubo mezclando ligeramente por vortex. Adicionalmente se adicionó 1 ml de medio Luria a cada tubo, incubándose por 30 min. – 1 Hr a 30 °C, se centrifugaron ligeramente los tubos por 30 segundos en ultracentrífuga, posteriormente se resuspendieron en 200 µl de medio Luria, espatulando en su totalidad la resuspensión sobre cajas con el antibiótico de selección indicado por el marcador genético transducido, incubándose a 37 °C por espacio aproximado de 20 Hrs, al termino de las cuales se determino la eficiencia de transducción aislando las candidatas posibles en cajas nuevas. El citrato de Sodio se añade para quelar al Calcio y prevenir la reinfección de células por el fago. Las candidatas transductantes deben aparecer sobre las cajas preparadas de los tubos 2, 3, y 4. Los tubos control 1 y 5 son, para observar una posible reversión y contaminación, del lisado respectivamente (Miller J.H., 1972; Silhavy T.J. et al., 1984).

Aislamiento de RNA total

La extracción de RNA celular de las cepas bacterianas mutantes e isogénicas transformadas en los plásmidos correspondientes, fue realizada por extracción fenol:ácida (Maniatis, 1985) con las siguientes modificaciones sugeridas por Jackie Plambrige (Com. Per.). De las células bacterianas crecidas de una noche anterior se realizó una resiembra en una dilución 1:100 para cada cultivo en 10 ml de medio Luria con el antibiótico correspondiente hasta alcanzar una D.O. de 0.3 - 0.5 a 600 nm. Se añadieron 5 ml de etanol frío a los 10 ml de cada cultivo centrifugando en tubos Korex de 30ml a 8,500rpm, se lavaron las pastillas obtenidas por resuspensión con una solución TEN (0.1 M NaCl, 10 mM tris-HCl pH=8; y 1 mM EDTA) y se centrifugaron a 8,500rpm repitiendo el lavado 3 veces. Posteriormente eliminando el sobrenadante se resuspendió el paquete celular en 1.5 ml de solución lisis (0.15 M sacarosa, 1% SDS, 0.02 M acetato de sodio), y 1.5 ml de Fenol-ácido (fenol saturado en 50 mM de acetato de sodio pH=4.1), mezclándose por agitación a 65 °C por 5 minutos y adicionalmente otros 5 minutos sin agitación, al término de los cuales fueron centrifugadas las muestras a 5,000rpm por 15 minutos aproximadamente. Se tomó la fase acuosa y se añadieron 1.5 ml de fenol ácido vortexeando por 10 segundos, nuevamente se centrifugó por 15 minutos a 5,000 rpm, volviendo a tomar la fase acuosa se añadieron 1.5 ml de Cloroformo vortexeando volviendo a centrifugar a 5,000 rpm. Posteriormente se tomo nuevamente la fase acuosa y se añadieron 2 ml de Isopropanol por 20 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron centrifugadas a 12,000 rpm en tubos eppendorf 1.5 ml, y resuspendidas en 300 µl de Agua *Milli-Q* estéril, 150 µl de Acetato de Amonio y 1 ml de etanol incubando a -20 °C por 20 minutos. Se centrifugó nuevamente a 12,000 por 15 minutos lavando los paquetes de RNA con etanol al 70%, y resuspendiéndolos en 50 µl de Agua *Milli-Q* estéril. Se determino la cantidad de RNA por espectrofotometría, disolviendo finalmente las muestras en solución desnaturizante (47% Formamida desionizada; 2X MOPS; y 12% Formaldehído) a una concentración final de 5 µg/µl. **Nota:** Las

soluciones empleadas para esta extracción fenólica de RNA, fueron esterilizadas por Autoclave excepto la solución MOPS y el fenol.

Síntesis de Ribosondas Radioactivas

Transcripción *in vitro* con la RNA polimerasa de los fagos SP6 y T7, el DNA (plásmidos pAB y pAJKB) que sirvieron como molde para la síntesis de ribosondas fue restringido con la enzima apropiada para cada caso, las mezclas de reacción se llevaron en un volumen de 10 μ l. Las condiciones de reacción de transcripción *in vitro* fueron las siguientes: Agua DEPC 1.5 μ l, Amortiguador T7/SP6 1X, DTT 5mM, inhibidor de RNAsas 40 unidades, mezcla de nucleótidos Adenina 20mM, Citosina 13.7 mM, Guanina 33 mM y Uridina 1mM, , UTP [α -³²P], RNA polimerasa 10 unidades, y DNA templado "plásmido correspondiente". Incubar a 37 °C por 60 minutos, detener la reacción con 6 μ l de EDTA 25 mM incubar a 65 °C. Terminada la reacción se añadieron: 42.5 μ l agua DEPC, amortiguador/DNAsa 6 μ l, DNAsa 1.5 μ l, incubar a temperatura ambiente por 15 minutos. Al término de esta reacción se realizó precipitación con dos volúmenes de etanol, 0.3M de acetato de sodio y 2 μ l de glucógeno 25 mg/ml a -20 °C por 60 minutos, se colectaron y secaron las pastillas radioactivas por centrifugación. Se resuspendieron en 60 μ l de sol. Desnaturalizante y almacenaron a -70 °C listas para usarse.

Northern Blotting

El RNA (20-25 μ g) fue sometido a electroforesis en geles desnaturalizantes de Agarosa al 1.5%, Formaldehído 6%, y Amortiguador MOPS 1X, como lo recomienda HybondTM-N Amersham. La agarosa fue disuelta, en 10 ml de amortiguador MOPS 10X, y 73 ml de H₂O *milli-Q*. Enfriando posteriormente a 50°C se añadieron 17 ml de Formaldehído 37%, vertiéndose el gel inmediatamente. El RNA se incubó a 65 °C por 5 minutos en solución desnaturalizante, en presencia de 1 μ l de bromuro de etidio 1mg/ml; y enfriando sobre hielo se añadieron 2.5 μ l de glicerol (50% v/v, y 0.1

mg/ml) de azul de bromofenol. Utilizando amortiguador MOPS 1X, se realizó electroforesis a 40 volts aproximadamente 2 hrs, o hasta que colorante azul de bromofenol se encuentre a 5cm del borde del gel. Posteriormente se verificó la integridad del RNA bajo luz ultravioleta y se tomaron fotografías de los geles desnaturalizantes realizados. Después se realizó la transferencia del RNA a membranas de nitrocelulosa por capilaridad. La capilaridad se realizó en un sistema de transferencia como el descrito previamente (Maniatis, 1989). Se cortaron los fragmentos de la membrana de nitrocelulosa del tamaño exacto del gel (Evitando tocar la membrana con los dedos) y se marcó con lápiz la orientación de las muestras que fueron transferidas. Las condiciones de Northern e hibridación se llevaron a cabo como lo sugiere el proveedor Amersham Hybond excepto en la temperatura de hibridación que fue de 55 °C. Las exposiciones fueron realizadas en placas autoradiográficas Dupont Nemours film.

Predicción de estructura secundaria del RNA

La predicción de plegamiento del RNA correspondiente, fue realizada mediante el análisis de las secuencias de RNA correspondientes a los transcritos terminados y no terminados en *tI*. Para ello se utilizó el programa Mfold RNA/DNA Version 3.0 of Mfold, localizado en Washington University Medical School in St. Louis. T, accesible en: <http://mfold.mbcmr.unimelb.edu.au/> (copyright, 1996). The Macfarlane Burnet Centre for Medical Research es un instituto de investigación en enfermedades en el campo de la virología de Australia. Yarra Bend Road, Fairfield 3078, Victoria, AUSTRALIA. <http://www.burnet.edu.au>

RESULTADOS

En el presente trabajo, se analizó la funcionalidad y comportamiento del terminador transcripcional *tI* "rho-independiente" considerando la eficiencia de terminación de la transcripción de delecciones en los extremos 3' y 5' del terminador *tI*, en un sistema de transcripción *in vitro*. Se cuantificó la fracción de transcritos terminados y no terminados en la señal de terminación, los cuales bajo condiciones de ensayo controladas, permitieron la síntesis de transcritos de un tamaño esperado. Para tal efecto las secuencias: terminador *tI* silvestre, y sus deletantes tanto del extremo 3' (Court, 1983), como del extremo 5' (por: Alejandra Sánchez, 1991. Lab. Dra. Cecilia Montañez), se obtuvieron del plasmidario "Laboratorio 4, Genética y Biología Molecular" (Tabla. 1). Terminador *tI* silvestre, (segmento AluI-*tI*-AluI de 242 pb del fago lambda), Sib1 y delecciones del terminador silvestre tanto del extremo 5' como del 3', fueron clonados en el sitio SmaI del plásmido pKG1800 entre el promotor Pgal y el gen de *galactocinasa*, (McKenney et al., 1981; Schemeissner et al., 1984; Montañez et al., 1986; Bernardi. F, 1990) (Fig. 8.). Los fragmentos correspondientes que contiene a *tI*, Sib1 y delecciones de *tI*, fueron generados y obtenidos por restricción total HindIII-EcoRV, a partir de los plásmidos "pUS6" (terminador silvestre), "pMS1" (mutación puntual Sib1), y serie deletante "pKG1800 ΔtI " $\Delta 11$, $\Delta 119$, $\Delta 21$, y $\Delta 112$ correspondiente al extremo 3'; Así como $\Delta 634$, $\Delta 635$, $\Delta 325$, y $\Delta 337$, correspondiente al extremo 5'.

CONSTRUCCIONES

Uno de los primeros objetivos consistió en elegir al vector pBluescribe (PBS+/-) que posee el promotor que reconoce la RNAPol del fago T3 para el sistema de transcripción *in vitro*, siendo importante señalar que la RNAPol T3 es capaz de dirigir la iniciación, alargamiento y especialmente la terminación de la transcripción en secuencias del tipo rho-independientes, incluso presentes en el DNA silvestre del

mismo fago T3. *In vitro* esta RNAPol no requiere de factores adicionales para la transcripción, siendo un sistema optimo y de fácil manejo.

PLASMIDO	GENOTIPO RELEVANTE	ORIGEN
pBS +/-	Promotores de T3 y T7, AMP ^r .	Vector Cloning System.
pKG1800	Gen Reportero galK, Promotor pgal, AMP ^r .	McKenney, K; 1981.
pUS6	pKG1800, portando un fragmento de 242 AluI-tI ^r -AluI.	Schmeissner,U., et al. 1984.
pMM1	pKG1800, que porta la deleción Δ11.	Martínez, M; 1989.
pMM3	pKG1800, portando la deleción Δ21.	Martínez, M; 1989.
pVC1	pKG1800, portando la deleción Δ119.	Ceja, V. Lab. Montañez, C.
pVC2	pKG1800 portando la deleción Δ112.	Ceja, V. Lab. Montañez, C.
pAS1	pBS +/- Portando la deleción Δ325.	Sánchez, A. Lab. Montañez, C.
pAS2	pBS +/- Portando la deleción Δ337.	Sánchez, A. Lab. Montañez, C.
pAS3	pBS +/- Portando la deleción Δ634.	Sánchez, A. Lab. Montañez, C.
pAS4	pBS +/- Portando la deleción Δ635.	Sánchez, A. Lab. Montañez, C.
pMSI	pKG1800, que porta la mutación puntual Sib1, en tI.	Montañez, C., et al. 1986.
pAB	pBS +/-, con el fragmento AluI-tI-AluI de λ, amp ^R .	Pérez, 1989.
pAJKB	pSP72, con el fragmento EcoRV-galK-HpaI de M13mk118, amp ^R .	Sánchez, A. Lab. Montañez, C.

Tabla. 1. Características sobresalientes de los plásmidos utilizados en este trabajo.

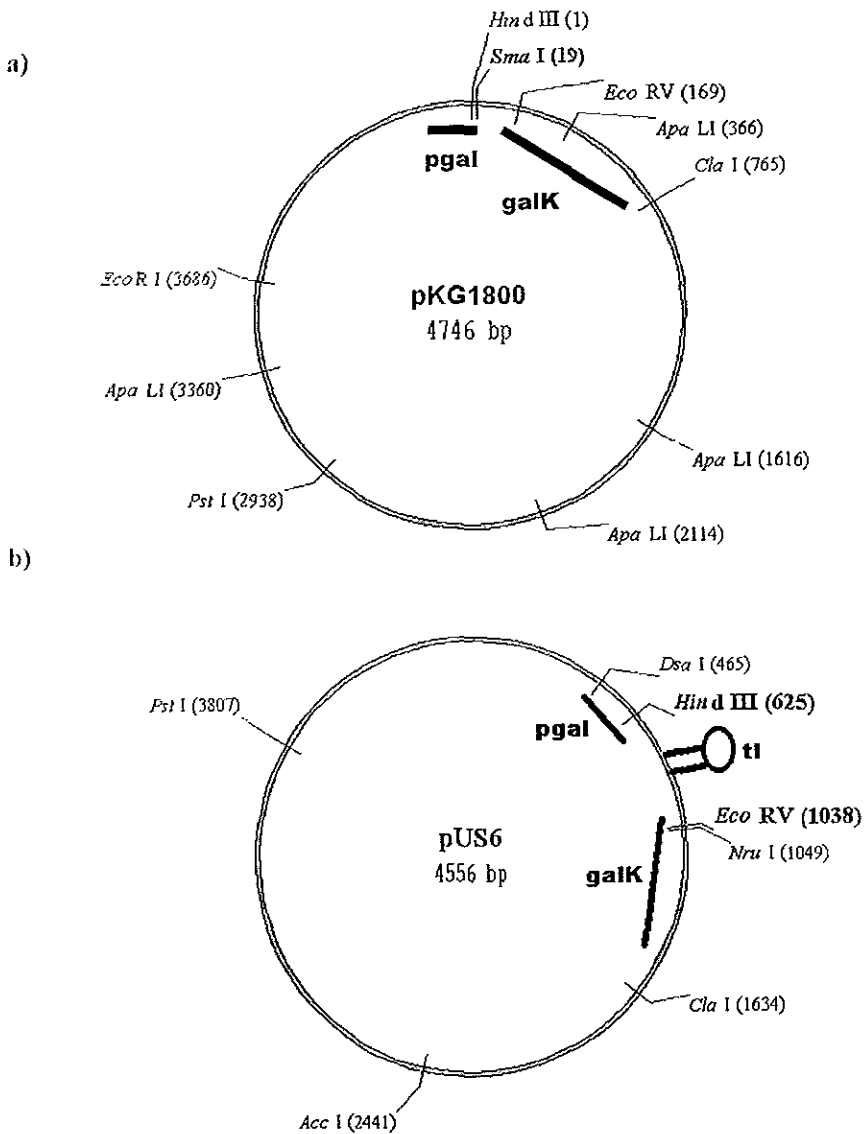


Figura. 8. Vector de clonación pKG1800 (a), para el terminador *tI* silvestre, dando origen al plásmido pUS6 (b); y a la serie pKG1800 ΔtI con las diferentes deleciones. En negritas se indican los sitios de restricción utilizados para clonación en pKG1800, así como los empleados en este trabajo para obtener los fragmentos silvestre, Sib1 y deletantes de *tI* en conteniéndose en pUS6, pMS1 y serie pKG1800 ΔtI respectivamente. Promotor de galactocidasa (*pgal*), gen de galactocidasa (*galk*).

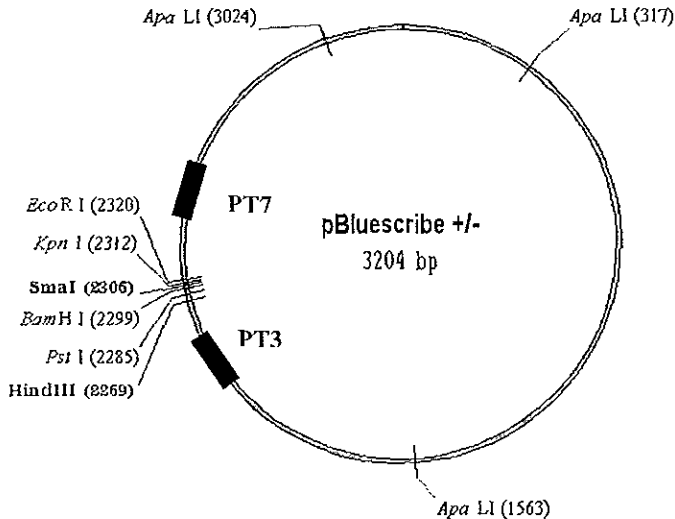


Figura. 9. Vector de clonación pBS+/- . En negritas de indican los sitios SmaI-HindIII donde se clonaron tanto el fragmento que contiene a *tI* silvestre, Sib1 y deletantes de *tI* como se describe en el texto. Se indican los Promotores T3 y T7 (PT3, PT7).

Los fragmentos HindIII-EcoRV purificados por *electrolución*, fueron correctamente orientados al momento de su clonación en los sitios de restricción HindIII-SmaI del sitio múltiple de clonación en pBS+/- (Fig. 9, 10). Se llevaron a cabo reacciones de ligación equimolar de los fragmentos en cuestión con respecto al vector mencionado como se describió en métodos. Posteriormente células de *E. coli* DH5 α (tabla 4) competentes, con una eficiencia de transformación del orden de 5×10^6 colonias transformantes por μg de DNA súper-enrollado, fueron transformadas con mezclas de ligación, obteniendo transformantes ampicilina resistentes, siendo en valor promedio de 4×10^2 colonias transformantes por μg de DNA producto de ligación, para $\Delta 11$, $\Delta 119$, $\Delta 21$, $\Delta 112$, Sib1 y terminador *tI* silvestre. A continuación se verificaron los fragmentos ligados HindIII-EcoRV, de solo seis colonias transformantes obtenidas por cada deleción, mutación Sib1 y terminador silvestre. Se extrajo DNA plasmídico por el método de Easy Preps (Heinrich B. & Bernhard A., 1993), se restringió con las

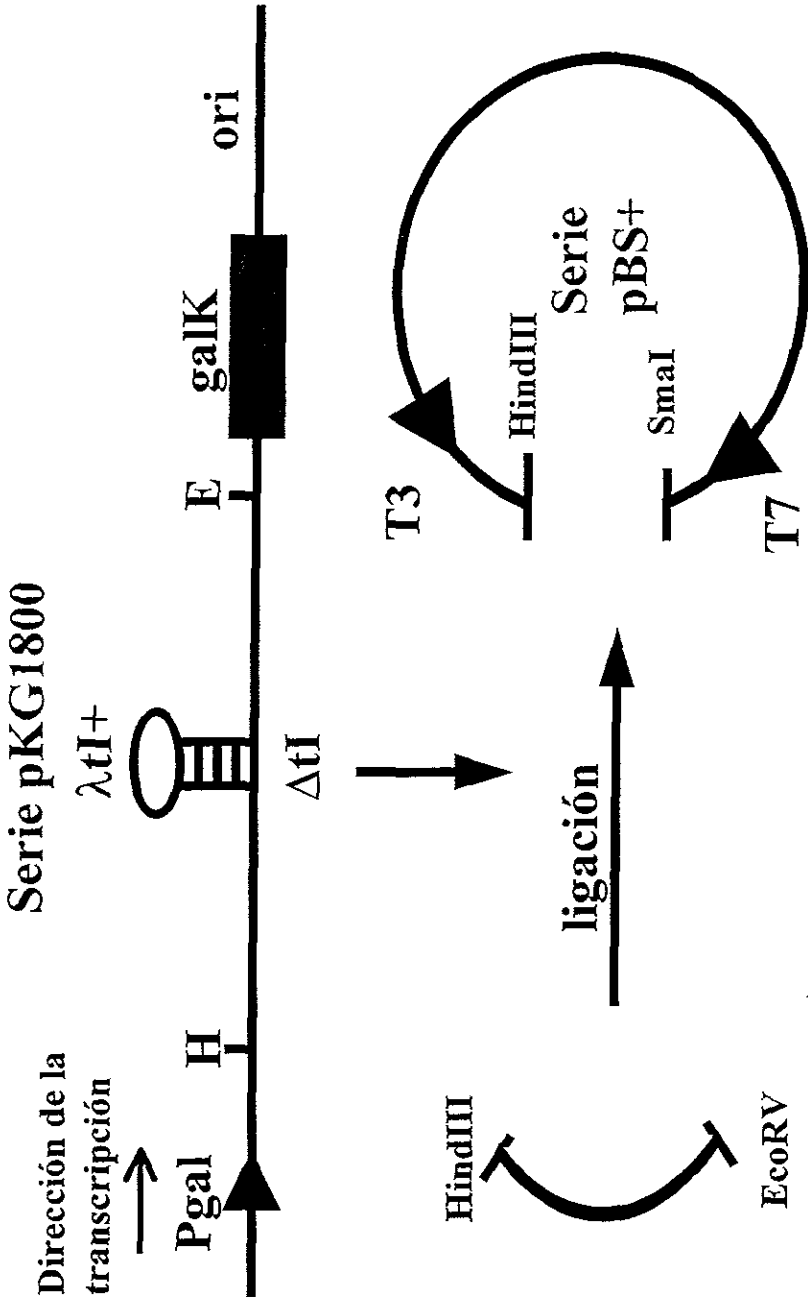


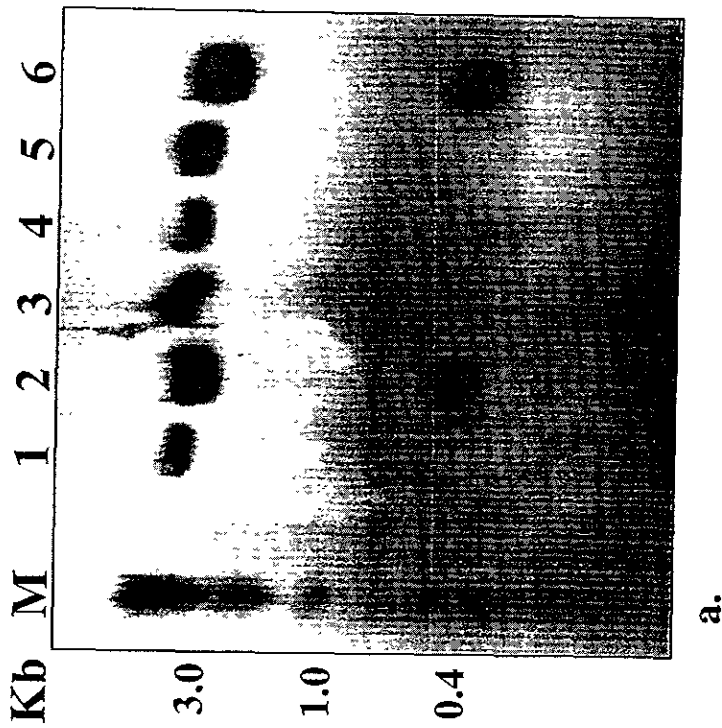
Figura. 10. Sub-clonación de los fragmentos HindIII (H) - EcoRV (E) deletantes y terminador silvestre *tI*, en el vector pBluescribe *+/-*, para ensayos de transcripción *in vitro* a partir del promotor T3.

enzimas HindIII-EcoRI esta nueva serie pBS^{+/−}Δ*tI*, y se comprobó la presencia de los segmentos clonados, además se verificó el peso molecular correspondiente para cada delección, mutación Sib1 y terminador silvestre, (Fig. 11, 12, 13). Toda vez demostrada la clonación de los segmentos deletantes y silvestre, los plásmidos pBS^{+/−} portadores fueron almacenados y amplificados en la cepa DH5α de *E. coli* (Ver, Tabla. 4).

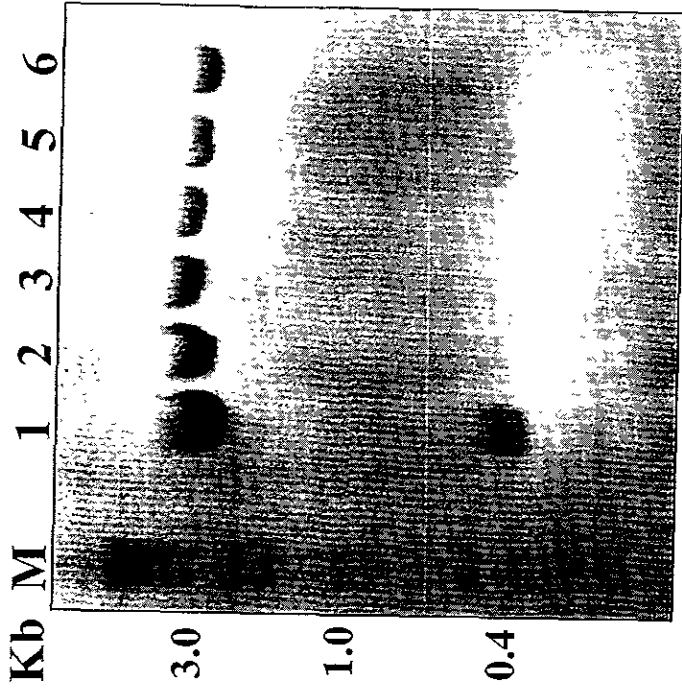
Una vez obtenidas las construcciones deseadas se procedió a la extracción midi-prep de DNA mediante la técnica “PEG” (Goldberg & Lau, 1993), y se sometieron a gradientes equilibrados de CsCl como se describió en métodos. Este DNA fue restringido enzimáticamente por EcoRI con el objeto de preparar los templados truncados en el sitio EcoRI, y así poder conocer el tamaño de los transcritos terminados y no terminados en *tI* (Fig. 14) que se generarían en los ensayos *in vitro*. De esta manera se pudo cuantificar la fracción de transcritos correspondientes al transcrito terminado y al no terminado durante el ensayo de transcripción. La digestión total e integridad del DNA templado se verificó por electroforesis agarosa 1% (Fig. 15), además de remover previamente las impurezas de restricción enzimática por lavados Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamilico.

TRANSCRIPCIÓN *in vitro*

Se realizaron ensayos de transcripción *in vitro*, en presencia de la RNAPol T3, como se describió en métodos. Los transcritos fueron resueltos en geles de poliacrilamida 5%/Urea 7M. Los tamaños de los transcritos para cada delección, mutación puntual y secuencia silvestre, tanto en los transcritos terminados en el terminador, como los no terminados (aquellos que van más allá de la señal de terminación) fueron determinados considerando el sitio 1+ del inicio de la transcripción después del promotor T3 (Ver, Fig. 14). La eficiencia de terminación se determinó mediante la cuantificación de la emisión de radiactividad de (α -³²P) UTP de los transcritos de interés, terminados en *tI* “T”, y no terminados “NT” (truncados en EcoRI), con la ayuda de un analizador de

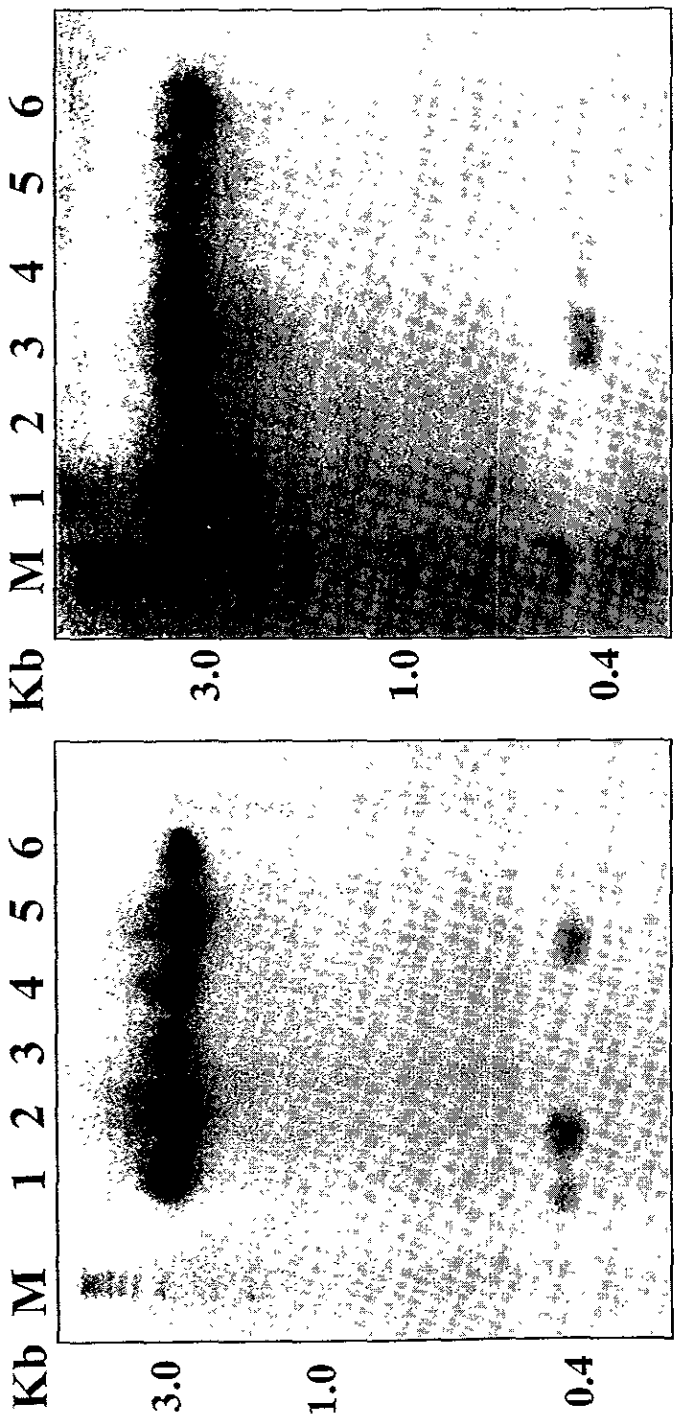


a.



b.

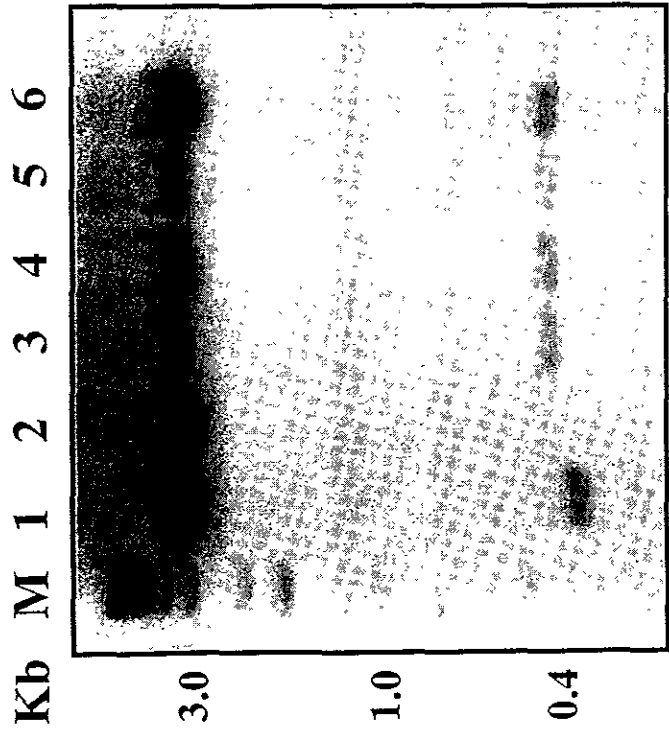
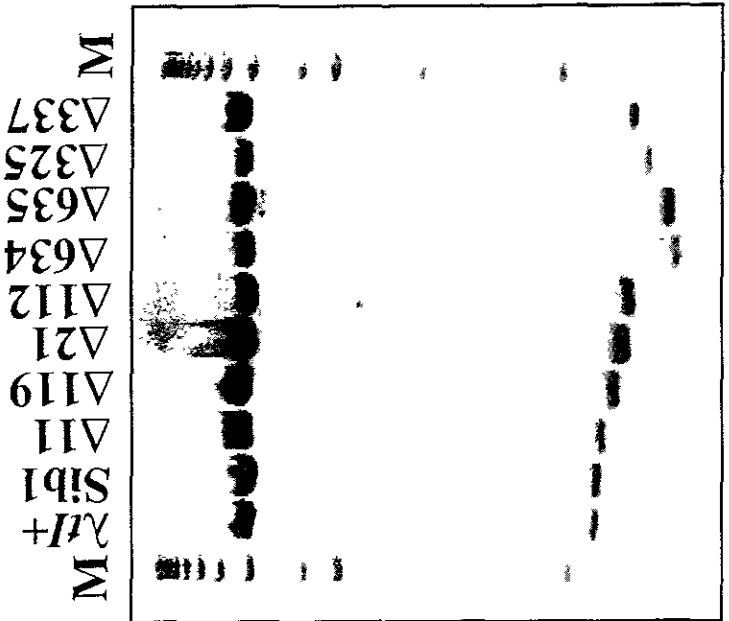
Figura. 11. Electroforesis Agarosa 1%. **a)** Plásmidos candidatos portadores de la delección 11, **b)** Plásmidos candidatos portadores de la delección 119. Restricción HindIII-EcoRI.



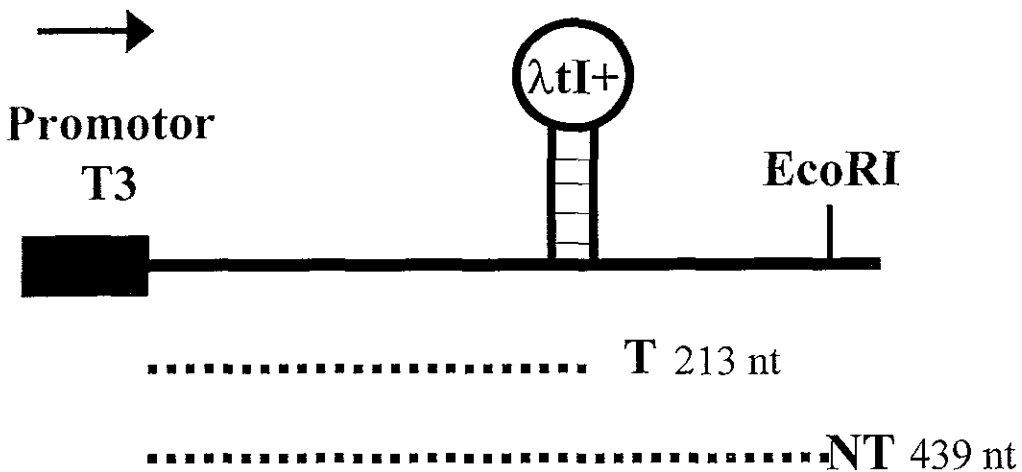
a.

b.

Figura. 12. Electroforesis Agarosa 1%. a) Plásmidos candidatos portadores de la deleción 21.
 b) Plásmidos Portadores de la deleción 112. Restricción HindIII-EcoRI.



a. **b.**
Figura. 13. a) Electroforesis Gel Agarosa 1%. Plasmidos candidatos portadores del terminador silvestre λI Restricción HindIII-EcoRI. b) Patrón de Restricción HindIII-EcoRI de la Serie pBS+/- que portan las diferentes deleciones, mutación, y terminador silvestre.



DELECCIONES 3':

11
119
21
112

TRANSCRITOS (nt)

T	NT
213	416
213	386
203	374
197	368

DELECCIONES 5':

634
635
325
337

58	284
63	289
90	316
118	345

Figura. 14 . Peso molecular esperado en nucleotidos para los transcritos terminados (T), y no terminados (NT) en *tI*.

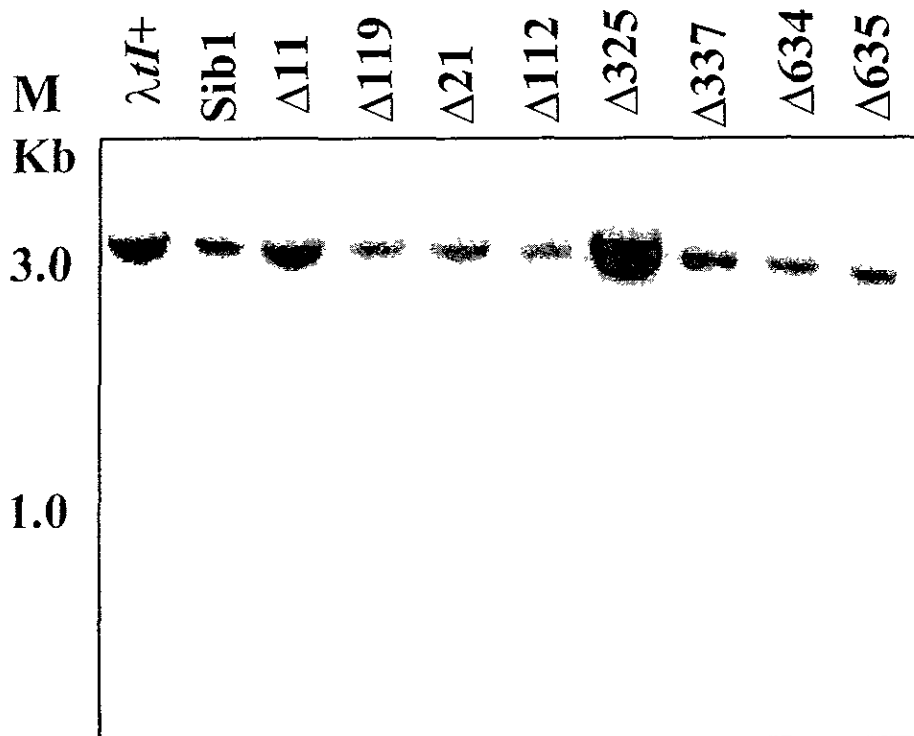


Figura. 15. Electroforesis Agarosa 1%. templates (DNA) linearizados con la endonucleasa EcoRI.

imágenes radiactivas "AMBIS". Previamente se normalizaron las cuentas totales obtenidas en los transcritos, para obtener la cantidad real de incorporación de UTP radiactivo tomando en cuenta la cantidad de uridinas presentes en cada RNA. Se empleo la formula siguiente para determinar el porcentaje de terminación:

$$\frac{\text{CPM transcrito "T" en } tI \times 100}{\text{CPM transcrito "T" en } tI + \text{CPM "NT"}}$$

Adicionalmente se analizó el comportamiento de la RNAPol al modificar la concentración de nucleótidos limitante. Se realizaron ensayos de transcripción *in vitro*, donde se elevó la concentración de UTP frío de [0.1 mM] a [0.2 mM] manteniendo constante el resto de los ribonucleótidos ATP, GTP, y CTP [2.0 mM]. Con anterioridad se reportó que la transcripción en *tI* silvestre exhibía una terminación de 85% (Cisneros, 1991) cuando se utilizaba una relación de 1:10 en términos Molares de UTP frío. siendo UTP el nucleótido limitante, es decir [0.05 mM] con respecto a [0.5 mM] de los demás ribonucleótidos ATP, GTP, y CTP. Respecto a ello, hemos observado que el comportamiento de la polimerasa T3 a una concentración de [0.1mM] UTP. comparado con la concentración de [0.2mM] de UTP, muestra un porcentaje de terminación que se abate de un 65% a 17% en *tI* silvestre, es decir casi por completo conservándose la misma tendencia en términos de eficiencia para cada delección o mutación puntual (Fig.16). Sin embargo hemos podido observar que una concentración limitante "relación 1:20" de UTP [0.1mM], mantiene una eficiencia de terminación de 65%, pudiendo tal vez alcanzar una eficiencia de terminación superior al 80% si se reducen las concentraciones de UTP frío a [0.05mM] en los ensayos de transcripción. Teniendo todo ello tal vez su explicación debido a que las condiciones de ensayo existe un exceso de ribonucleótidos en particular de UTP frío que favorece una continua y rápida incorporación de ribonucleótidos durante el alargamiento, es decir que la abundante disposición de ribonucleótidos pueda estar interfiriendo con el fenómeno de pausa y terminación dirigida por la RNAPol T3, los ensayos realizados corresponden a n=5 para [0.1mM] y n=2 para [0.2mM]. En resumen se obtuvo una

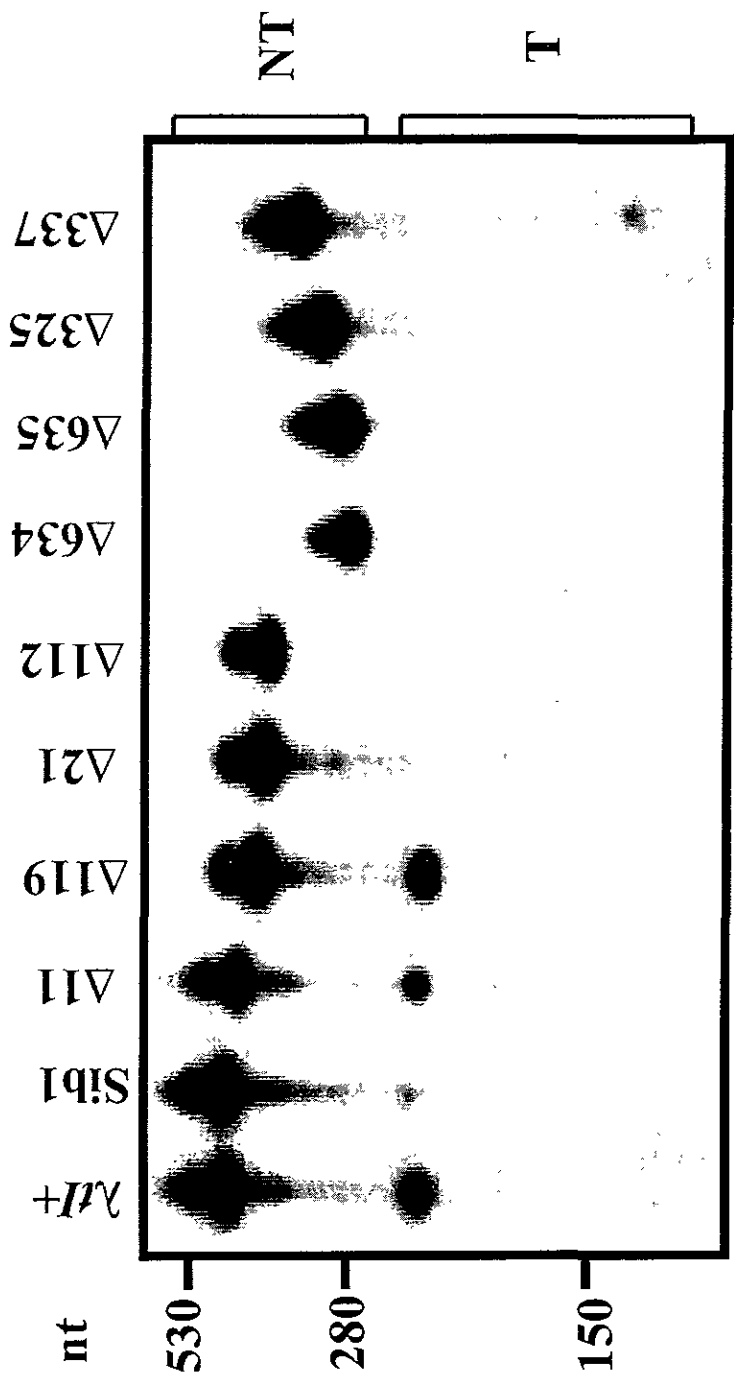


Figura . 16 . Ensayo de transcripción *in vitro*, utilizando concentraciones de 0.2 mM de UTP no radioactivo.

eficiencia de terminación de 65% para *tI* silvestre, 16.2% para Sib1, 44.7% en $\Delta 11$, 51% en $\Delta 119$, 17.7% en $\Delta 21$, 7.8% en $\Delta 112$, 2.5 en $\Delta 634$, 6.2% en $\Delta 635$, 10.4% en $\Delta 325$, y 32.4% en $\Delta 337$ bajo condiciones limitantes de [0.1mM] de UTP. La eficiencia de terminación en ensayos de transcripción bajo condiciones donde la concentración de UTP fue [0.2mM], mostró un 17% para *tI* silvestre, 4% en Sib1, 13% en $\Delta 11$, 21% en $\Delta 119$, 6.5 en $\Delta 21$, 2.2% en $\Delta 112$, 1.8% en $\Delta 634$, 2.0% en $\Delta 635$, 2.0% en $\Delta 325$, y 5% en $\Delta 337$ (Tabla. 2).

DELECIÓN	PORCENTAJE DE TERMINACIÓN 0.1 mM UTP	PORCENTAJE DE TERMINACIÓN 0.2 mM UTP
<i>tI</i> Silvestre	65.0 %	17.0%
Sib1	16.2 %	4.0%
$\Delta 11$	44.7 %	13.0%
$\Delta 119$	51.0 %	21.0%
$\Delta 21$	17.7 %	6.5%
$\Delta 112$	7.8 %	2.2%
$\Delta 634$	2.5 %	1.8%
$\Delta 635$	6.2 %	2.0%
$\Delta 325$	10.4 %	2.0%
$\Delta 337$	32.4 %	5.0%

Tabla. 2. Porcentaje de eficiencia de terminación, para *tI*, Sib1 y serie de deleciones en el extremo 5' y 3' a diferentes concentraciones del ribonucleótido UTP no radioactivo en ensayos de transcripción *in vitro*.

En base a los primeros ensayos de transcripción, se observó que las deleciones correspondientes al extremo 5' del transcrito ubicadas fuera del tallo del terminador a 18 y 46 pb de distancia, provocan una mayor reducción en la eficiencia de terminación transcripcional, comparado con las deleciones del extremo 3' ubicadas también fuera del terminador a una distancia de 3 y 32 pb, que si bien muestran una reducción en el porcentaje de terminación, la eficiencia mostrada en el extremo 3', es mayor con respecto a las deleciones del extremo 5'. Mientras que, las deleciones que involucran segmentos de la estructura propia del tallo tanto hacia el extremo 3' y 5' muestran una dramática reducción en la eficiencia de terminación en un rango de aproximadamente 80-90% con respecto al terminador silvestre. Sin embargo interesantemente la mutación puntual Sib1 muestra esa misma tendencia hacia una reducción en la eficiencia de terminación de aproximadamente 70%. (Fig. 17).

PREDICCIÓN DE PLEGAMIENTO Y ESTABILIDAD TERMODINÁMICA

La eficiencia de terminación podría estar dada por la energía de estabilidad termodinámica del transcrito (interrumpiendo el apareamiento estable entre las uniones C:G del tallo), las cuales representan solo un 50% de la estructura de tallo en *tI*. Debido a las diferencias y similitudes obtenidas del porcentaje de terminación en las deleciones, con respecto a *tI* silvestre, y Sib1, se procedió a investigar la predicción de la estructura secundaria de los transcritos terminados y no terminados, así como obtener la energía libre de formación de estas estructuras (Tabla. 3), con el fin de encontrar una posible correlación entre la estabilidad termodinámica y el porcentaje de terminación de cada estructura.

Para ello se utilizó el programa “mfold RNA/DNA” versión 3.0 descrito en métodos, para analizar las secuencias de los transcritos que contienen a *tI*, Sib1 y deleciones correspondientes en el vector de clonación pBS^{+/−} tanto para los transcritos terminados, como no terminados en *tI*.

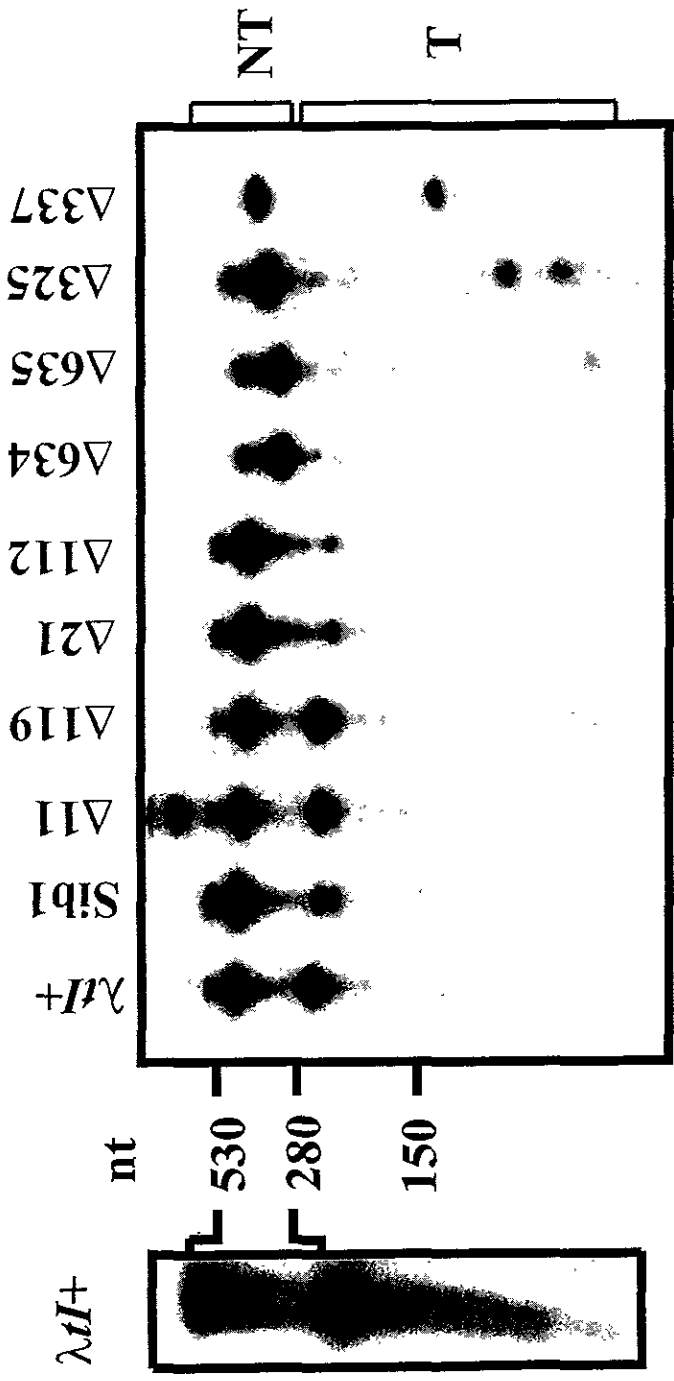


Figura. 17. Ensayos de transcripción *in vitro* utilizando concentración de 0.1 mM de UTP no radioactivo panel de la izquierda representa terminación de 85% en λI^+ (Cisneros, 1991), Panel derecha terminación de 65% en λI silvestre (este trabajo).

FRAGMENTO y/o DELECIÓN	TERMINADO ΔG°	NO TERMINADO ΔG°
λ <i>tI</i> Silvestre	- 42.2	- 109.6
Sib1	- 36	- 103.4
$\Delta 11$	- 42.2	- 102.8
$\Delta 119$	- 42.2	- 98.9
$\Delta 21$	- 36.4	- 91.7
$\Delta 112$	- 26.3	- 82.4
$\Delta 634$	- 7.4	- 73.3
$\Delta 635$	- 16.1	- 80.3
$\Delta 325$	- 21.8	- 89.9
$\Delta 337$	- 31.5	- 99.6

Tabla. 3. Muestra la energía libre estándar de formación ΔG° (Kcal/mol), tanto en los transcritos terminados como no terminados en *tI*, para cada delección, mutación y secuencia silvestre estudiada.

En nuestro análisis de Sib1 encontramos una relación directa entre la disminución de su estabilidad termodinámica ΔG° y la eficiencia de terminación ya que esta también disminuye como lo observó previamente Velásquez, (1992), aunque el único cambio observado en el plegamiento de su estructura secundaria, es un mal apareamiento "mismatch" de dos bases en la estructura del tallo con respecto al terminador silvestre. Siendo este cambio puntual, probablemente el único responsable en la reducción de la

estabilidad termodinámica y de una mala eficiencia de terminación (Ver, apéndice: Predicción de estructuras del RNA, y tabla 3).

Se registró una estabilidad termodinámica $-\Delta G^{\circ}$ (Kcal-mol) para los transcritos terminados en la secuencia preservada de *tI* que desciende a medida que es mayor el segmento eliminado en cada deleción: siendo para el terminador *tI* silvestre, $\Delta 11$ y $\Delta 119$ de -42.2, -36 para Sib1, -36.4 para $\Delta 21$, -26.3 para $\Delta 112$, -7.4 para $\Delta 634$, -16.1 para $\Delta 635$, -21.8 para $\Delta 325$, y -31.5 para $\Delta 337$ (Ver, Tabla 3). Por otro lado al analizarse la estructura de los transcritos no terminados, se encontró una tendencia similar aunque con valores $-\Delta G^{\circ}$ mayores ya que se incluye la secuencia completa: para *tI* silvestre de -109.6, -103.4 para Sib1, -102.8 para $\Delta 11$, -98.9 para $\Delta 119$, -91.7 para $\Delta 21$, -82.4 para $\Delta 112$, -73.3 para $\Delta 634$, -80.3 para $\Delta 635$, -89.9 para $\Delta 325$, y -99.6 para $\Delta 337$ (Ver, Tabla 3).

PROCESAMIENTO DE *tI* *in vivo*

Para analizar *in vivo* la terminación en *tI* es necesario caracterizar el procesamiento de los transcritos que lo contienen ya que este evento influye en la expresión final de estos. Para ello se estudio el procesamiento de los transcritos terminados en *tI* y Sib1, en cepas de *E. coli* deficientes en Pnp y rnE, ya que de acuerdo a lo reportado por Pastrana (1997), el transcrito *pgal-tI-galK* en este sistema podría ser procesado rnE, por sitios hipotéticos de corte para la endonucleasa rnE, y posteriormente degradado por Pnp. En este sentido se abordó el fenómeno de terminación en *tI* y Sib1, y el procesamiento analizando el nivel de su RNAm detectado por Northern Blotting *in vivo* con sondas que contienen a *tI* o una región del gen *galK*. Por lo anterior, se utilizaron cepas de *E. coli* deficientes en el procesamiento de RNAm *in vivo*, en base a la actividad de las ribonucleasas Pnp y rnE. Para ello se construyeron por transducción genética generalizada las mutantes: rnE3071, y doble mutante Pnp::Tn5, rnE3071. En ello se dispuso de la cepa mutante rnE3071 condicionalmente letal

receptora (SK7669), y una cepa *pyrC::Tn10* utilizada como cepa donadora (SK5664) esta última necesaria, ya que el gen *pyrC* mapea a menos de un minuto del gen *rnE* en el cromosoma de *E. coli*, cepas donadas amablemente por el doctor S.R.Kushner de la universidad de Georgia Athens, GA (Ver, Tabla 4). Se obtuvo un primer lisado mediante el fago P1Vir en la cepa donadora SK5664, con un título inicial aproximado de 2×10^7 UFP/ml, con este lisado se realizó transducción genética en la cepa receptora SK7669, obteniendo un total de 15 colonias transductantes (SK7669 *rnE3071*, *pyrC::Tn10*). Estas transductantes fueron comprobadas por ser tetraciclina resistentes y termosensibles a 44°C. A continuación se generó un nuevo lisado con un título de 5×10^7 UFP/ml, a partir de esta nueva cepa transductante donadora SK7669 *rnE3071*, *PyrC::Tn10*, para transducir el marcador *rnE3071* en las cepas de *E. coli* SA1943, y SA1943 *Pnp::Tn5*. De esta manera se obtuvieron 10 transductantes SA1943 *rnE3071-pyrC::Tn10*, y 13 transductantes doble mutante SA1943 *Pnp^r*, *rnE3071 pyrC::Tn10*, examinadas por su termosensibilidad a 44°C y resistencia a tetraciclina. En promedio la eficiencia de transducción fue de 0.03%, y se obtuvo una eficiencia de co-transducción aproximada de 60%.

Las cepas SA1943, SA1943 *Pnp::Tn5*, SA1943 *rnE3071* y SA1943 *Pnp::Tn5*, *rnE3071*, fueron transformadas con los plásmidos pUS6, pMS1, y pKG1800. Se aisló RNA total y se resolvió en geles de agarosa desnaturalizantes, se transfirió por capilaridad y fijó por luz UV en membranas de nylon (Fig. 18). Posteriormente se realizó Northern Blotting empleando ribosondas marcadas radiactivamente “anti-*tI*” y “anti-*galK*”. La sonda anti-*tI* (149 nt) se obtuvo transcribiendo con la RNAPol de T7 el plásmido linearizado pDP2401 con DdeI. La ribosonda anti-*galK* (148 nt) se obtuvo por transcripción con la RNAPol del fago SP6, utilizando como templado el plásmido pAJKB restringido con EcoRV. La sonda anti-*tI* híbrida con los transcritos iniciados en *pgal* que terminan en *tI*, además de los que pasan al terminador. Anti-*galK* híbrida con los transcritos iniciados en *pgal* que sobrepasan el terminador llegando al inicio del gen *galK* (sitio de inicio de la traducción) y los que pasan esta región (Fig.19).

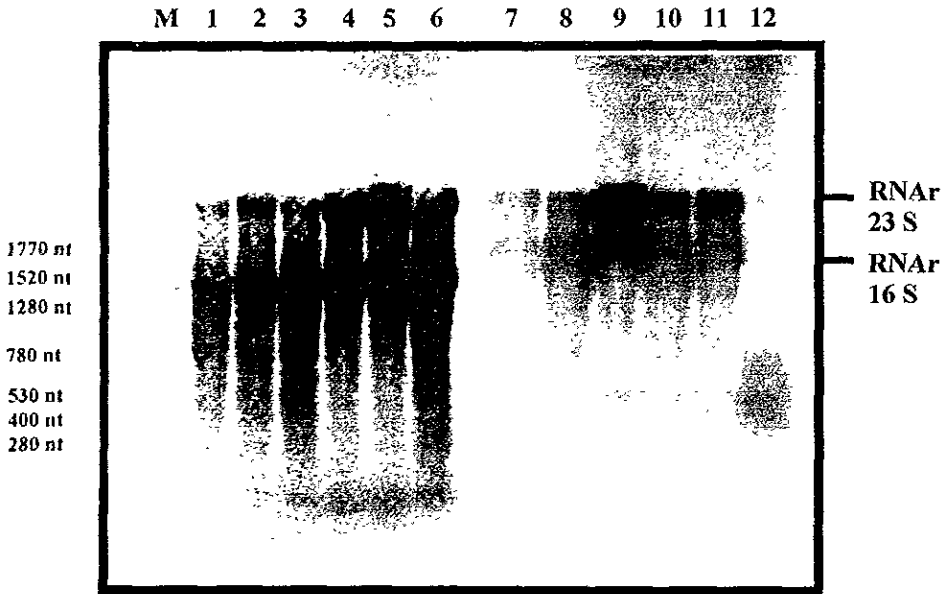


Figura. 18. Transferencia de aproximadamente 20 μ g de RNA total a membranas de nylon, de la cepa SA1943 mE3071 transformada con los plásmidos pKG1800, pUS6, pMS1 (carriles 1, 2 y 3 respectivamente); cepa doble mutante SA1943 rnE3071, Pnp::Tn5 transformada con pKG1800, pUS6, pMS1 (carriles 4, 5 y 6 respectivamente); cepa SA1943 transformada con pKG1800, pUS6, pMS1 (carriles 7, 8 y 9 respectivamente) y cepa SA1943 Pnp::Tn5 transformada con pKG1800, pUS6, pMS1 (carriles 10, 11 y 12 respectivamente). Todas las cepas fueron crecidas a 37 $^{\circ}$ C.

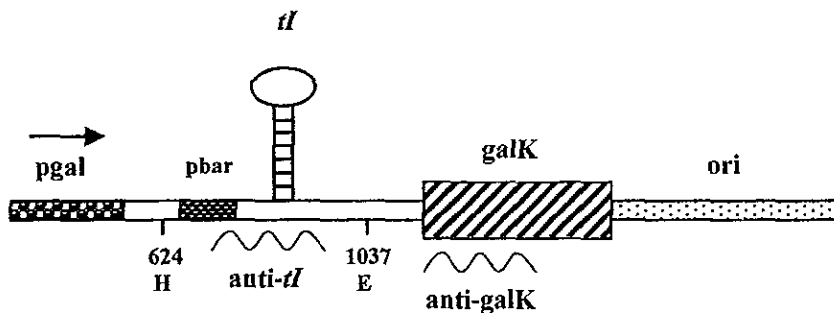


Figura. 19. Mapa lineal del plásmido pUS6. Se muestra el sitio de hibridación para las ribosondas anti-*tI* y anti-galK empleadas para detectar los transcritos generados a partir del promotor pgal. Además se indica la dirección de la transcripción (flecha), el promotor pbar, y los sitios de restricción HindIII (H) y EcoRV (E) que contienen a *tI*.

Hibridando con la sonda anti-*tI* se observaron 4 bandas de los siguientes tamaños aproximados: mayor a 2000 nt, 1600 nt, 600 nt, y 180 nt. Se observaron dos transcritos que corresponden, al transcrito *pgal-tI* terminado en *tI* de 600 nt y otro de 180 nt sugerido como *pbar-tI* (Cisneros, 1991), sin embargo ha quedado demostrado que este último de 180 nt, no es un producto de la actividad promotora “*pbar*”, sino un transcrito terminado en *tI*, procesado en sitios hipotéticos de corte para *mE*, “en la posición 352, 505, 510 y 770 (Pastrana, 1997) e incluso 623 y 643, del transcrito *pgal-tI-galK*” en *pUS6*. Para ello se analizó el procesamiento de este transcrito en cepas deficientes de las enzimas que realizan dicho procesamiento. Sin embargo en el presente trabajo al utilizar células SA1943 mutantes *mE3071* y doble mutante *mE3071, Pnp::Tn5*, no se encontró modificación en el procesamiento de los transcritos terminados en *tI*, ya que la presencia de la banda de 180 nt producto de procesamiento se mantiene para *pUS6* y *pMS1* (Fig. 20, carriles 8, 9, 11 y 12) así como en *Pnp::Tn5* que se muestra la especie de 180 nt (Fig. 20, carril 5, excepto carril 6, donde el RNA se degradó: Ver Fig. 18, carril 12), mientras que en *pKG1800* no se detectó señal debido a que *tI* está ausente (Fig. 20, carriles 4, 7 y 10). De esta forma el patrón de procesamiento de los transcritos terminados en *tI* y *Sib1*, en las tres cepas deficientes “*Pnp::Tn5, mE3071* y doble mutante *Pnp::Tn5, mE3071*” fue similar entre ellas, y ligeramente distinto comparado con la cepa silvestre SA1943 (Fig. 20, carriles 1, 2, y 3). Lo anterior se explica tal vez, debido a que las cepas bacterianas se crecieron a 37°C, y dado que la temperatura permisiva para la mutante “*mE3071*” es a 44°C, probablemente la mutación no se puso de manifiesto. La temperatura de crecimiento recomendada por el Dr. S.R. Kushner, para esta mutante *mE3071* es de 30 °C, la temperatura elegida para el crecimiento de las cepas mutantes y silvestres fue de 37 °C, donde el crecimiento se mostró lento y deficiente. Por ello se sugiere realizar una nueva extracción de RNA con inducción a 44°C para observar el probable efecto deficiente en la actividad de *mE*. Debido a lo anterior se sugiere que, a pesar de obtener el transcrito terminado en *tI* procesado como un fragmento de 180 nt en *E. coli* SA1943 *mE3071*, y en la doble mutante *Pnp::Tn5, mE3071*, transformadas con *pUS6*

y PMS1, no se puede descartar la presencia de los sitios hipotéticos de procesamiento para mE en el transcrito pgal-*tI*-galK.

Hibridando con la ribosonda anti-galK en RNA total de las cepas: silvestre SA1943 y correspondientes isogénicas Pnp::Tn5, mE3071, y doble mutante Pnp::Tn5, mE3071, se detectó un barrido que se extiende en un rango aproximado de 600 nt hasta 2000 nt (Fig. 21). Se observó una detección más intensa en todas las cepas estudiadas transformadas con pKG1800, que indican la presencia de los transcritos que corresponden al inicio del gen galK (Fig. 21, carriles 1, 4, 7, y 10), y menos intensa en la cepa silvestre SA1943 transformada con pUS6 que demuestra una capacidad de eficiente terminación en *tI* y más intensa es decir menos eficiente en Sib1 (Fig. 21, carriles 2, 3), llamando la atención que este patrón se repite para Pnp::Tn5, y mE3071, donde se observa que en la cepa Pnp::Tn5 se reduce la degradación de los transcritos terminados en *tI* y Sib1 como se observó previamente (García-Mena, 1999) (Fig. 21, carriles 5 y 6 este último no mostrado por degradación, sin embargo se sabe que preserva una mayor cantidad de transcrito no terminado en Sib1), procesamiento probablemente incrementado por Pnp en las cepas mutantes mE3071 (Fig. 21, carriles 8 y 9), excepto en la doble mutante Pnp::Tn5, mE3071 con pUS6 donde se muestra una mayor cantidad de transcrito, que corresponde a la estabilidad proporcionada por las mutantes en Pnp, de los pocos transcritos que ignoran la señal de terminación en *tI* (Fig. 21, carril 11) y una banda de aproximadamente 1200 nt más intensa de transcrito no degradado en pMS1 (Fig. 21, carril 12) que corresponde tal vez a transcritos en fase de alargamiento que no se detienen en Sib1. Esto mantiene la idea de que *tI* y Sib1, terminan y son procesadas de manera distinta. Un resultado importante obtenido con las ribosondas anti-*tI* y anti-pgal, fue detectar transcritos superiores a 1,000 nt en pUS6 y PMS1, que corresponden a los transcritos no terminados en *tI* que sobrepasan esta señal de terminación, demostrando que en ambos plásmidos la señal de terminación se ignora, en un porcentaje considerable de la actividad transcripcional total, que corresponden a las bandas ribosomales 16s y 23s de 1,600 y 2,000 nt respectivamente.

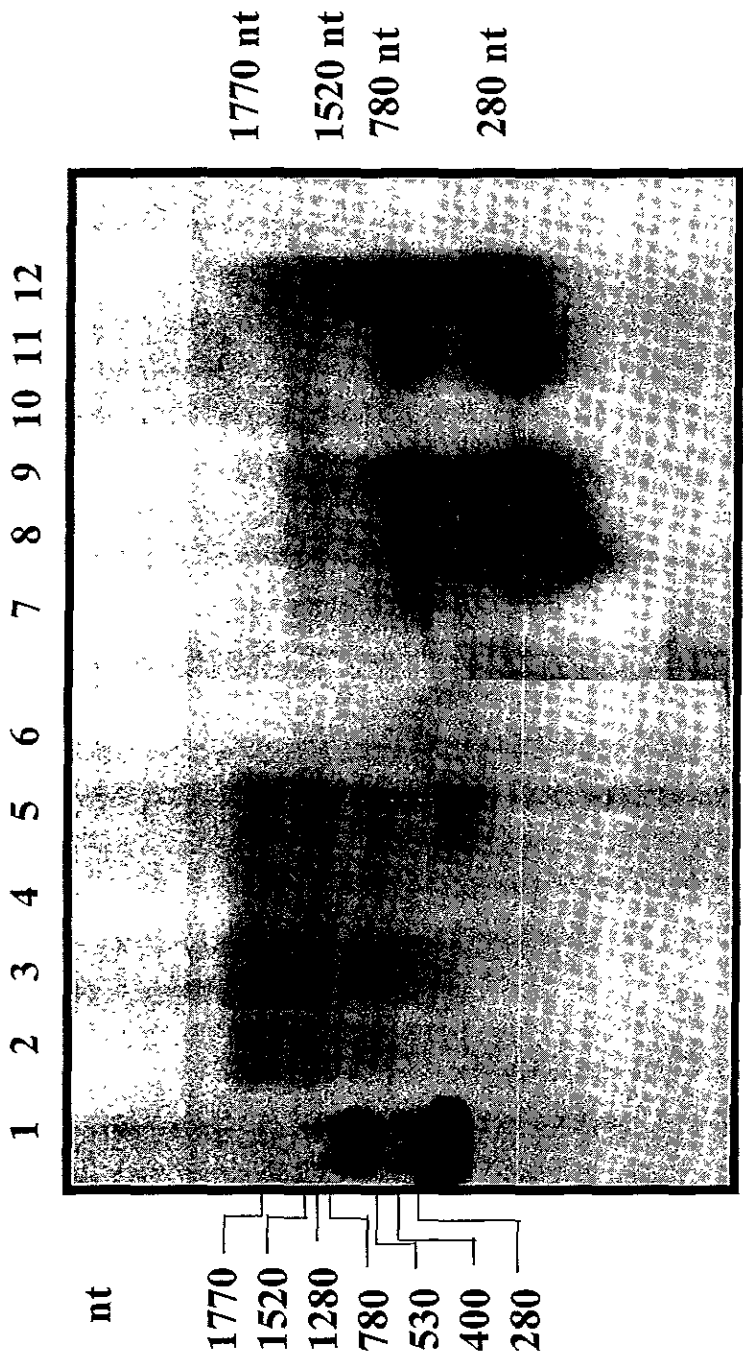


Figura. 20. Hibridación entre la ribosoma anti-*tI* y los transcritos detectados en las cepas: silvestre SA1943 (carriles 1 [Pastrana, 1997], 2, 3), SA1943 Pnp::Tn5 (carriles 4, 5, 6), SA1943 mE3071 (carriles 7, 8, 9) y doble mutante Pnp::Tn5, mE3071 (carriles 10, 11, 12). transformadas con los plásmidos pKG1800 (carriles 2, 4, 7, 10), pUS6 (carriles 1, 5, 8, 11) y pMS1 (carriles 3, 6, 9, 12) respectivamente.

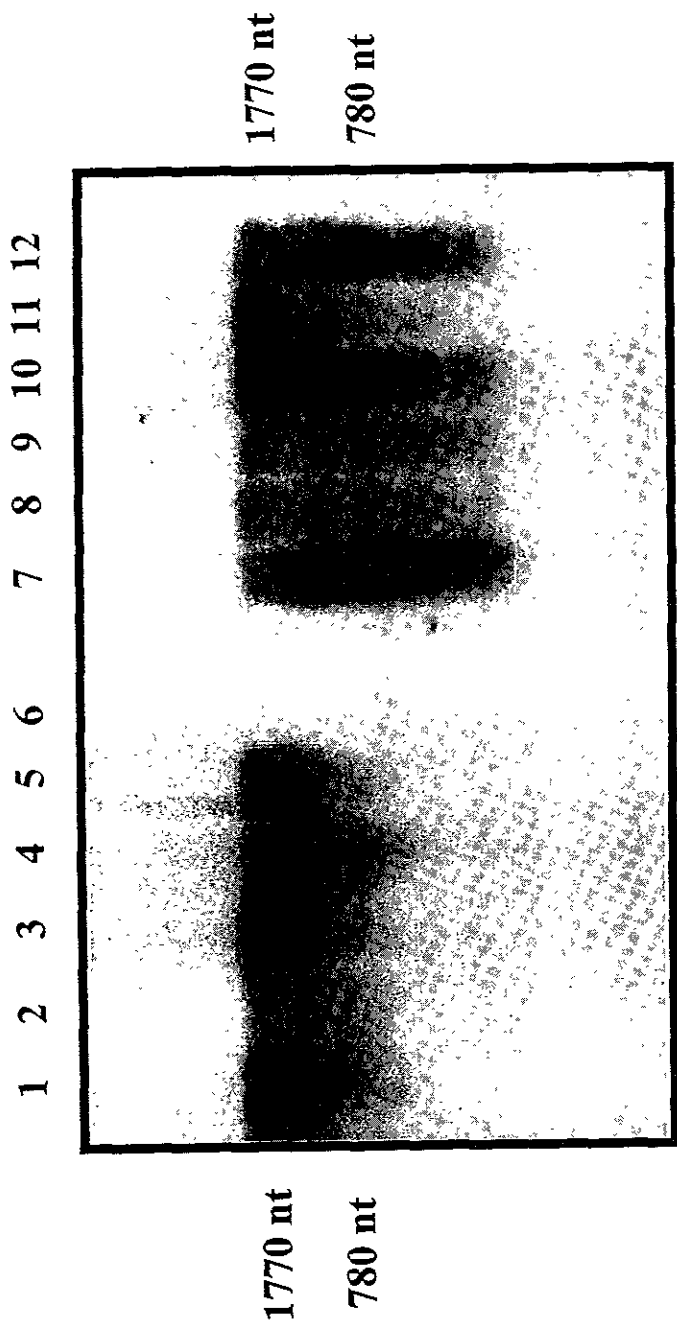


Figura. 21. Hibridación entre la ribosonda anti-galk y los transcritos detectados en las cepas: silvestre SA1943 (carriles 1,2,3), SA1943 Pnp::Tn5 (carriles 4,5,6), SA1943 mE3071 (carriles 7,8,9), y SA1943 Pnp::Tn5 mE3071 (carriles 10,11,12), transformadas con los plásmidos pKG1800 (carriles 1,4,7,10), pUS6 (carriles 2,5,8,11) y pMS1 (carriles 3,6,9,12) respectivamente.

CEPA BACTERIANA	GENOTIPO RELEVANTE	ORIGEN
DH5- α	Sex F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> .	Woodcock et al., 1989. Raleigh et al., 1989.
C600	<i>galK⁻</i> , <i>SupE 44</i> , <i>TonA</i> , <i>LacY1</i> , <i>Amp^s</i> .	Appleyard, 1954.
SK7669	Sex F ⁻ , <i>thyA715</i> , <i>rnE3071</i> , λ .	Kushner, S.R. 1993.
SK5664	Sex F ⁻ , <i>thyA715</i> , <i>TetR</i> , λ <i>pyrC::Tn10</i> .	Kushner, S.R. 1993.
SA1943	<i>galK⁻</i> , <i>recA⁺</i> , <i>endA⁺</i> , <i>nusA⁺</i> , <i>Amp^s</i> .	Adhya, S, 1968.
SA1943 Pnp ⁻	SA1943, Pnp::Tn5, Km ^R .	Guarneros. G, 1982.
FAM01	SK7669, <i>pyrC::Tn10</i> .	Este trabajo.
FAM02	SA1943, <i>rnE3071</i> , <i>pyrC::Tn10</i> .	Este trabajo.
FAM03	SA1943 Pnp::Tn5, <i>rnE3071</i> , <i>pyrC::Tn10</i> .	Este trabajo.

Tabla. 4. Descripción de las cepas derivadas de *E. Coli* empleadas y/o construidas en el presente trabajo.

DISCUSIÓN

Diversos estudios sobre eventos de terminación rho-independientes han confirmado características comunes en el DNA templado donde la transcripción termina. Estas incluyen una corta secuencia de Adeninas (dA) y una región palíndroma abundante en secuencias G:C justo cadena arriba del segmento dA en el templado. Sin embargo a pesar de que *tI* solo posee un 50% de secuencias G:C en el tallo, es un típico terminador rho-independiente. Adicionalmente se sabe que la eliminación completa o parcial de la secuencia dA, (Bertrand et al., 1977; Zuraesky & Yanofsky, 1980; Platt, 1981) o el cambio de una base en la región del tallo rica en G:C reduce la eficiencia de terminación (Lee & Yanofsky, 1977; Platt, 1981). El dogma de terminación clásico rho-independiente plantea que el híbrido DNA-RNA que se forma en la región próxima al tallo (Gilbert, 1976), o la misma estructura formada en el apareamiento G:C del RNA (Adhya & Gottesman, 1978; Gusarov & Nudler, 1999), alteran de algún modo el proceso de alargamiento, provocando la terminación en el segmento de uridinas donde los enlaces de hidrogeno entre el híbrido son débiles e inestables, permitiendo una rápida disociación del complejo ternario de alargamiento en sus componentes RNA, DNA y RNAPol. La formación de la estructura de tallo-burbuja como la generada en *tI*, se sabe esta restringida al momento en que el complejo ternario alcanza el punto de terminación en el segmento poli-U que siguen al tallo, que atrapa e inactiva, desestabilizando irreversiblemente a este complejo ternario, y conduciendo la separación del híbrido generando la terminación de la transcripción. Siendo a la fecha, tres sitios descritos (*Sitio de unión a la doble cadena de DNA*, *sitio de unión al híbrido RNA-DNA*, y *sitio de unión a la cadena sencilla del RNA*) como las secuencias importantes de interacción con la RNAPol durante el proceso de alargamiento y necesarias para la terminación de la transcripción (Gusarov & Nudler, 1999).

En el terreno transcripcional, una de las ideas atractivas ha sido por un lado entender como las señales de terminación son capaces de encender una transición del proceso de alargamiento al de terminación, y por otro como, estas señales pueden ser omitidas permitiendo la *antiterminación* (Reynolds, Bermúdez & Chamberlin, 1992). Con cierta frecuencia se ha mencionado que los estudios sobre terminación son particularmente atractivos en terminadores rho-independientes, ya que estos sitios son capaces de llevar a cabo una reacción de terminación completa en un sistema *in vitro*, sin requerir de factores adicionales (Reynolds, Bermúdez, & Chamberlin, 1992). Sin embargo no obstante su adecuado funcionamiento *in vitro*, la eficiencia de terminación *in vivo* es más alta, posiblemente por la acción de factores proteicos adicionales como rho. NusA, Tau,.. etc., (Briat & Chamberlin, 1984; Platt, 1986; Yager & von Hippel, 1987; Friedman et al., 1987; Schmidt & Chamberlin, 1987; Bermúdez et al., 1999). Con ello se menciona que, de cierta forma los dos tipos de terminación *dependiente* e *independiente* de rho, están superpuestos funcionalmente. A pesar de la heterogeneidad funcional de los terminadores rho-independientes con porcentajes de terminación distintos entre ellos, han logrado conservar una similitud estructural en común, como es la secuencia G:C palíndroma y la región dA en el templado (Y.d'Aubenton. Carafa et al., 1990). Aunque adicionalmente se han reportado casos, donde la región de terminación no exhibe tal estructura *in vitro*. Una de ellas en el extremo del transcrito que codifica para la RNA II de ColE1 (Tomizawa & Masukata, 1987), una más ubicada enseguida del gen LacI (Horowitz & Platt, 1982), otra en el gen LacZ (Ruteshouser & Richardson, 1989), además de conocerse una señal de terminación presente en la pequeña región codificante para la hormona preproparatiroidea (PTH) de humano donde existe la evidente ausencia de un tallo y una clara presencia poli-U en el extremo 3'. Esta señal de terminación es muy eficiente en un sistema plasmídico en procariontes (Mead et al., 1986). Existen otras señales de terminación que no siguen la generalidad, como son los terminadores intrínsecos de la región temprana lítica del actinofago ϕ C31, los cuales no poseen

evidentes segmentos poli-U (Ingham et al., 1995). Todos estos reportes a la fecha solo indican nuestra escasa comprensión del proceso de terminación.

Sin embargo excluyendo ejemplos como los anteriores, basándose en estudios mutacionales y de sustitución por bases análogas, existe un firme apoyo al modelo clásico rho-independiente, ya que sus características estructurales de tallo-burbuja y poli-U, permiten por excelencia la terminación de la transcripción (Martin & Tinoco, 1980; Ardnt & Chamberlin, 1988). En el desarrollo de este trabajo, demostramos la influencia de dichas secuencias en el proceso de terminación en *tI*, eliminando segmentos importantes del tallo, uridinas, y secuencias aledañas, así como interrumpiendo la capacidad de formación del tallo en secuencias G:C cuando la mutación puntual S1b1 esta presente, ya que reduce un 75% su funcionalidad *in vitro* tal vez debido al 50% de G:C en el tallo, mostrándose como indispensable la integridad del tallo, ya que tan solo una mutación puntual altera la capacidad de formación de este, al detenerse el complejo ternario de alargamiento en el segmento poli-U. Demostrando que la estructura de tallo-burbuja en *tI* es sumamente importante, ya que al estar ausente es incompatible con las propiedades intrínsecas de un eficiente terminador rho-independiente como lo es *tI*. Queda claro su papel de acuerdo al modelo clásico de terminación rho-independiente, ya que contribuye a la estabilidad relativa del DNA, horquilla del RNA, e interacciones químicas que se mantienen con la RNA polimerasa “con un supuesto rol pasivo”- a su paso, por la señal de paro (Yager & von Hippel, 1987, 1991). Ello se ha confirmado en estudios mutacionales sobre terminadores rho-independientes, revelando que ambos elementos estructurales, son necesarios para una eficiente terminación (Revisar: Platt, 1981; Lynn et al., 1988; Cheng S. et al., 1991; Wilson & von Hippel, 1995; Yang et al., 1995), sin embargo, no se ha comprendido totalmente como funcionan estos elementos. A este respecto, el papel que juega el segmento de uridinas ha llegado a ser controversial. Se ha pensado desde hace mucho tiempo que el extremo 3' del transcrito naciente, estimula la liberación del RNA debido a la baja estabilidad que existe en el híbrido dA-rU después

de la formación del tallo abundante en G+C (Platt, 1986; Yager & von Hippel, 1987). Sin embargo, a pesar de esta inestabilidad observada en el híbrido dA-rU, se ha cuestionado la importancia de la serie de uridinas, ya que no existe una sencilla y directa correlación entre la eficiencia de terminación con respecto a la longitud del segmento de uridinas (Reynolds, Bermúdez, & Chamberlin, 1992). Adicionalmente, deleciones en el atenuador de Triptofano *trpatt*⁺ de *E.coli* que disminuyen su número de uridinas de 8 a 4, reducen la eficiencia de terminación *in-vitro* en más de 50% (Bertrand et al., 1977; Farnham & Platt, 1980; Reynolds & Bermúdez, 1992). Mientras que el terminador temprano *T7Te* rho-independiente del fago T7, quien solo posee 4 uridinas interrumpidas “UUUCUGCG” (Briat & Chamberlin, 1984), muestra una alta eficiencia de terminación, como en *trpatt*⁺. De acuerdo al modelo clásico de terminación rho-independiente se esperaría que el terminador *T7Te* fuera marcadamente ineficiente. Sin embargo la secuencia dA en el templado, actúa probablemente como una señal de pausa para la RNAPol en fase de alargamiento, ya que se ha sugerido que la incorporación de uridinas muestra problemas y deficiencias durante el alargamiento (McDowell et al., 1994); no obstante en la actualidad se conoce que es la estructura de tallo-burbuja quien genera esta señal de pausa (Gusarov & Nudler et al., 1999). De modo que el alargamiento de transcritos en los sitios múltiples de incorporación de uridinas provee de tiempo adicional para la formación de tallo-burbuja en este sitio, justo antes de ser liberado el transcrito naciente, adicionalmente una reducción en la concentración de UTP complementa el evento catalítico incrementando la terminación (Hartvig, 1996).

Este efecto sobre la eficiencia de terminación, refuerza la importancia de la estructura del tallo, el segmento de uridinas, secuencia y tamaño de la horquilla en ensayos de transcripción con la enzima RNAPol T7 (Jeng et al., 1992). Debido a la secuencia de los transcritos, estos adquieren una estructura secundaria que posiblemente intervenga con la pausa y terminación de la RNAPol T3, ya que se sabe que la polimerasa mantiene contactos tanto con el RNA recién sintetizado que va adquiriendo una

conformación espacial, como con el DNA templado que se extiende mas allá de la burbuja transcripcional, de manera que estén influyendo diversos factores estructurales en el proceso de terminación entre ellos las secuencias tanto del contexto silvestre como del vector de clonación empleado en los ensayos *in vitro*, anteriores y posteriores al sitio de terminación. Sin embargo en este trabajo hemos observado que pese que la delección en el extremo 5' involucra fragmentos relativamente alejados del terminador a 18 y 46 pb, la eficiencia de terminación se ve afectada como es el caso de las delecciones $\Delta 325$ y $\Delta 337$ respectivamente a un 10% y 32% de reducción en la eficiencia de terminación. Principalmente las delecciones afectan la estructura del terminador y por ende la estabilidad el mismo. Adicionalmente, si bien la integridad de las secuencias próximas y distales a un terminador rho-independiente influyen en el funcionamiento del mismo, surgen controversias respecto a la conformación que va adquiriendo el transcrito naciente que no ha eliminado secuencias que lo rodean. Tal es el caso de mutaciones puntuales de un terminador como *tI* y la interacción que va manteniendo con la RNAPol T3, durante el alargamiento, ya que como lo hemos observado, al analizar el efecto de la mutación Sib1 sobre la eficiencia de terminación, ésta muestra un porcentaje de terminación muy semejante al representado por la delección $\Delta 21$ que ha eliminado 9 pb del terminador, la cual entra al tallo. Por lo cual es interesante conocer la influencia que posee tanto el transcrito naciente, como la secuencia templado (leída y/o transcrita) sobre la RNAPol T3, de manera que tan solo, una mutación puntual por sustitución -Citosina por Adenina- en el extremo 5' del tallo sea tan importante, como para reducir de manera tan espectacular la terminación en *tI*. Llama la atención que $\Delta 21$ logra mantener el plegamiento estructural de la región anterior a *tI*, con el tetranucleótido de uridinas en la burbuja y un tallo corto G:C, mientras que la estabilidad termodinámica para $\Delta 21$ y Sib1 es muy idéntica, a pesar de que son producto, de una eliminación y mutación, con un plegamiento de estructura diferentes, esto hablaría de la importancia que mantiene la presencia de una burbuja

con un tetranucleótido como en *tI* y en general todos los terminadores rho-independientes durante el proceso de terminación de la transcripción.

Se ha mencionado que la eficiencia de terminación se encuentra correlacionada con la longitud del tallo del terminador (Yager & von Hippel, 1987; Lynn et al., 1985, 1988), independientemente de la extensión del segmento dA en el templado (Stroynowski et al., 1983; Lynn et al., 1988). Se propone la existencia de la región de doble simetría rica en G+C seguida de dA como la condición única y necesaria suficiente para caracterizar por completo la terminación rho-independiente ha sido propuesto desde los estudios de Christie (1981). En hallazgos relativamente recientes se han podido conocer estructuras de tallo-burbuja en el RNA de idéntica estabilidad termodinámica con eficiencias de terminación diferentes; así como fuertes y eficaces terminadores que poseen escasos residuos de uridina en el RNA. Y d'Aubenton, (1990), analizando terminadores rho-independientes, para describir las características que comparten entre ellos, observo que más de un 50% de 183 terminadores analizados, poseen un característico tetranucleótido en la burbuja del terminador, siendo 2 los tipos más comunes: UUCG y GAAA; sencillo parámetro estructural que les permitió construir un algoritmo de predicción en terminadores rho-independientes, sumado a su ΔG° . Estos hallazgos han sugerido que la secuencia de la burbuja “tetranucleótido” interviene en la eficiencia de terminación y la incrementa cuando se invierte la dirección del tetranucleotido como en el atenuador de “thr” (Jeng et al., 1992), ello soporta el papel que juega este elemento y la interacción que mantiene con la polimerasa, durante el proceso de pausa y terminación. A este respecto para el terminador *tI* también se predice una burbuja con un “tetranucleótido” UUUU, que de acuerdo a lo anterior, este tetranucleótido es capaz posiblemente de brindar una eficiencia de terminación exitosa, al mantener los contactos necesarios con la RNA polimerasa al momento de pausar en el segmento poli-U, que aseguran un proceso de terminación eficiente. La ubicua presencia de estas burbujas apoya al modelo de formación tallo-burbuja en secuencias rho-independientes, donde G:C mantiene la

estabilidad del terminador, sumado a la presencia de uridinas (Sugimoto et al., 1987; Tuerk et al., 1988). De este modo el parámetro entrópico de energía libre de formación (ΔG°) para la estructura de tallo-burbuja en el transcrito, considerados como elementos independientes en términos funcionales, mantienen un poder limitado de predicción funcional sobre un terminador intrínseco (Y d' Aubenton. Carafa et al., 1990).

Así, la predicción de la estructura secundaria de los transcritos estudiados en nuestro sistema *in vitro*, nos indicó que generalmente existe una relación directa entre el porcentaje de terminación y el ΔG° calculado para cada transcrito, ya que mientras disminuye el ΔG° también disminuye el porcentaje de terminación. No obstante la correlación de estos parámetros, no conforman un parámetro definitivo de predicción y eficiencia de función, ya que no existe una relación evidente entre el ΔG° , la eficiencia de terminación y el tamaño del segmento eliminado. Es decir, no existe una relación proporcional entre la reducción del ΔG° para Sib1 que conserva bases silvestres que le rodean, con su contundente reducción de 16% en la eficiencia de terminación vista por Velásquez (1992), con un valor semejante de ΔG° en $\Delta 337$, sin embargo presentan porcentajes de terminación que difieren claramente. Por lo cual este parámetro entrópico no predice con claridad el comportamiento en el proceso de terminación, ya que es necesario el contexto en secuencias y la estructuración adecuada en el RNA al transcribirse llevando a cabo los pasos de terminación en *tI*. El valor de ΔG° esta calculado para la estructura secundaria obtenida por predicción, sin embargo la estabilidad de la estructura terciaria puede diferir aunque el ΔG° de esta secuencia sería el mismo.

No obstante, si consideramos la ubicación de las deleciones hacia los extremos 3' y 5', existe una clara reducción de la energía libre inversamente proporcional al tamaño del fragmento eliminado en *tI*, y se observa además que la estructura secundaria adquirida

por cada deleción altera la secuencia dentro del contexto que les rodea, principalmente se altera la estructura del terminador y por ende se afecta la terminación. Probablemente formándose otras estructuras con menor estabilidad e influyendo negativamente sobre la polimerasa, y en general sobre el complejo ternario de alargamiento, sin embargo no es posible afirmar que esta reducción en el ΔG° , sea la total responsable de la ineficiente terminación, ya que como se observa en la deleción $\Delta 21$ en el extremo 3' que ha eliminado 9 pb del terminador incluyendo el segmento de uridinas y parte del tallo, muestra un ΔG° muy semejante a la deleción $\Delta 325$ posicionada fuera del terminador a 18 pb pero en el extremo 5', sin embargo estas mismas poseen un porcentaje de terminación distinto. Incluso comparado con la deleción $\Delta 337$ a una distancia de 48 pb de *tI* en el 5'; en este sentido pese a las deleciones relativamente alejadas de *tI*, $\Delta 11$, $\Delta 119$, $\Delta 325$ y $\Delta 337$ que logran preservar íntegra la estructura del terminador muestran una reducción diferencial en la terminación, con valores ΔG° reducidos pero muy cercanos entre ellos, lo cual no muestra una clara relación, directamente proporcional entre el porcentaje de terminación respecto de la cantidad de energía que portan sus estructuras secundarias representada por su ΔG° .

Adicionalmente se ha demostrado que la eficiencia de terminación *in vitro* puede ser afectada por el contexto de la unidad transcripcional. En particular puede depender de la naturaleza del promotor (Goliger et al., 1989; Telenitsky & Chamberlin, 1989a, 1989b), de los elementos que componen a la señal terminadora (Reynolds & Chamberlin, 1992) y secuencias situadas posteriores al último nucleótido transcrito (Tomizawa & Mazukata, 1987). Además de la presencia de tallo-burbuja, con seguridad deben existir o presentar algunas características desconocidas hasta hoy en su contexto, que asociadas con segmentos poli-U son responsables de un proceso eficiente de terminación (Y d'Aubenton, 1990). Por otro lado, ha quedado demostrado por nuestro estudio y en otros por deleciones, que estas dos estructuras no son

suficientes en la terminación, y que las secuencias anteriores al terminador, tienen considerables efectos sobre el sitio y eficiencia de terminación dirigida por la RNAPol del fago T7 (Macdonald et al., 1994) homologa de RNAPol del fago T3, en terminadores rho-independientes, ya que las posiciones secuencia arriba, incrementan o disminuyen el patrón de pausamiento, sugiriendo incluso que la distancia y ubicación del promotor extiende sus efectos alterando la respuesta de la polimerasa no solo en el sitio primario de terminación, sino también en otros sitios de pausa y /o terminación localizados en la estructura de tallo-burbuja (Macdonald et al., 1994). Así hemos observado que las secuencias eliminadas del extremo 5', que se encuentran considerablemente alejadas de la estructura de *tI* y que preservan la estructura de tallo-burbuja, definen funcionalmente esta señal de terminación con mayor importancia comparado con las deleciones del extremo 3'. Esto podría sugerir la formación de estructuras que estabilizan a *tI* y que se encuentran contenidas en la región 5' mencionada. Estas secuencias previas al terminador pueden estar influyendo en el proceso de alargamiento y terminación, durante su paso de la RNAPol por el templado. Tal vez debido al sentido de la transcripción que va de 5' a 3', en ello estarían implicadas las secuencias que anteriores al terminador, alteran la interacción de la polimerasa, influyendo con el plegamiento que va adquiriendo el transcrito nascente, generado justo antes de ser sintetizado el terminador reflejando así una baja eficiencia de terminación. En base a estos datos podemos decir que en *tI* las secuencias del extremo 5' fuera de la estructura de tallo-burbuja reflejan una mayor importancia en el fenómeno de terminación *in vitro* dirigida con la RNAPol T3. Por lo tanto estas secuencias previas son necesarias para la eficiente función de *tI*. De acuerdo a estos resultados se deduce, que la secuencia mínima necesaria para *tI* es un segmento mayor a 121 pb.

Adicionalmente cabe la pena señalar que, para las secuencias de *tI* silvestre, Sib1 y las deletantes $\Delta 11$, $\Delta 119$ del extremo 3', los transcritos terminados muestran dos bandas muy cercanas, lo cual indica que se generan dos transcritos terminados uno que

corresponde a *tI* y otra dentro o cercana al mismo; en este sentido se puede mencionar que la RNAPol T3, posea una deficiencia o baja tasa de incorporación de uridinas en los transcritos que sintetiza, como lo menciona McDoWell & Col, (1994) para la RNAPol T7, deteniéndose durante su paso por estos sitios. Con esto, se puede sugerir que la RNAPol T3 genera un transcrito terminado en el segmento de 5 uridinas continuas de la burbuja en *tI*, y otro transcrito que corresponde al segmento poli-U del extremo 3'. Lo cual llama la atención, reforzando la idea de que para ciertas polimerasas que constan de un polipéptido como es el caso de la RNAPol T3, tanto la secuencia como la estructura son importantes para su libre funcionamiento en un momento y contexto determinado.

Se ha sugerido que la terminación *in vitro* es un proceso “multipasos” de complejidad insospechada donde, la RNAPol controla activamente la eficiencia de terminación (Reynolds, Bermúdez & Chamberlin, 1992), contrario a lo mencionado años atrás atribuyendo un rol pasivo a la RNAPol (von Hippel et al., 1991). Inicialmente se propuso un modelo donde la terminación transcripcional se encuentra acoplada a movimientos en forma de gusano “Inchworming” por parte de la polimerasa, pudiendo el segmento de poli-U actuar como una señal de movimiento *idem* para la enzima en el proceso de alargamiento (Chamberlin, 1995; Nudler et al., 1995).

Respecto a todo lo anterior, ha sido interesante observar como, las deleciones $\Delta 21$, $\Delta 112$, $\Delta 634$ y $\Delta 635$ del tallo en *tI*, afectadas en la terminación, generan un transcrito terminado de tamaño aproximado al sitio de deleción y/o cercano a la secuencia preservada del terminador silvestre (Ver, Fig. 14 y 16). Al analizar la predicción de estructuras del RNA transcrito *in vitro* (Ver, apéndice), es sorprendente como pese a que la estructura secundaria del tallo se encuentre alterada, inestable e incluso sin uridinas por los segmentos eliminados, en su extremo 3', se generen transcritos terminados de tamaño semejante al obtenido en *tI* silvestre. Una probable explicación al respecto, podría ser que se generen estructuras relativamente inestables que podrían

hacer las pases de terminador ya que puede observarse, la formación de tallos-burbuja con secuencias propias y cercanas a *II*, con apareamientos G:U que no son demasiado inestables o *mismatch* verdaderos (Tinoco, 1980), además de algunos G:C. Siendo probable que se favorezca la terminación aunque deficiente, liberándose transcritos en el sitio límite de eliminación o cercano a él. Esto se pudo observar en las deleciones $\Delta 21$ y $\Delta 112$ quienes han perdido secuencias internas del tallo, y que reordenándose con secuencias contiguas en el vector, generan nuevas estructuras de tallo-burbuja y uridinas dispersas entre los nucleótidos 170 y 220 como se observa en el transcrito silvestre (Ver, apéndice: estructuras $\Delta 21$ y $\Delta 112$). Para el caso de los segmentos eliminados del extremo 5'. que han preservado la secuencia poli-U, es factible pensar que al ser leída por la RNAPol, pause y libere los transcritos en esta secuencia conservada del terminador, como en $\Delta 635$, $\Delta 325$ y $\Delta 337$, siempre y cuando se llegue a formar una estructura mínima de cierta simetría de tallo y burbuja, ya que en el caso de $\Delta 634$ a pesar de poseer el segmento poli-U, el orden y estabilidad de plegamiento, así como el tamaño y contenido de su burbuja no permite llevar a cabo la terminación deficiente.

Por otro lado, se sabe que a diferencia de la RNAPol bacteriana, la polimerasa del bacteriófago T7, requiere de una estructura de tallo-burbuja más estable y perfecta en su estructura y de un segmento más largo de poli-A para terminar con un máximo de eficiencia *in vitro* (Jeng et al., 1990; 1992). La RNAPol T7 es capaz de reconocer dos tipos de señales de terminación reportadas por Macdonald & cols, (1994); el terminador rho-independiente *T7-t Φ* de la región tardía del fago, que lleva a cabo la terminación en el segmento de uridinas y un segundo tipo de señal que involucra una pequeña región codificante de la hormona "preparatiroidea" *PTH* en el humano (Mead et al., 1986), donde la formación de una estructura de tallo burbuja no se observa, sin embargo la presencia de un segmento rico en uridinas es el elemento importante de una terminación eficiente para la RNAPol T7, mostrando por deleciones

una secuencia mínima funcional de 31 pb para la terminación en *PTH* (Macdonald et al., 1994); Además se ha demostrado la alta capacidad de terminación de esta enzima en el terminador rho-independiente *TI* del operón *rrnB* de *E. coli*, en ausencia del elemento rico en uridinas ya que no se transcribe (Hartvig et al., 1996).

La RNAPol del fago T3 posee un peso aproximado a 98 KDa (Chamberlin, 1970), similar a la RNAPol T7 siendo cada una un polipéptido que presenta una homología de 82 % en su secuencia peptídica (Moffat et al., 1984; McGraw et al., 1985; Masters et al., 1987). Esto sugiere que ambas poseen un alto grado de homología estructural, y por ende un modo similar de interacción con sus promotores, sin embargo cada polimerasa exhibe una elevada especificidad para sus propios promotores (Golomb & Chamberlin, 1974; Jeng et al., 1997), altamente conservados con una longitud de 20-23 pb, difiriendo entre ellos por 6 pb (Dunn & Studier, 1983; Sengupta et al., 1989; Klement et al., 1990). Estos polipéptidos de T3 y T7, son capaces de realizar todas las funciones requeridas para la transcripción incluyendo el reconocimiento del promotor, iniciación, alargamiento y terminación (Chamberlin & Ryan, 1982). La capacidad de reconocimiento específico por su promotor esta conferida por el amino ácido "Asn" en la posición 748 de la polimerasa, de acuerdo a los análisis realizados sobre las enzimas del fago T3 y T7 (Curtis. A et al., 1992).

El polipéptido de la RNAPol DNA-dependiente, codificada por los bacteriófagos T7, T3 y SP6, es capaz de llevar a cabo todos los pasos de transcripción en ausencia de factores transcripcionales (McDonald et al., 1993). Señales de terminación rho-independientes para las RNAPol de los fagos T7 y T3 han sido identificadas y estudiadas en el propio DNA de estos bacteriófagos (*T7-Te*, *T3-Te* "tempranos"; *T7Φ* y *T3Φ* "tardíos"); que codifican un RNAm con estructura de tallo-burbuja invariablemente seguida por seis residuos de uridina (Dunn & Studier 1983; Sengupta et al., 1989), formando parte de las reminiscencias evolutivas derivadas de terminadores rho-independientes de *E. coli*. Los terminadores *T7Φ* y *T3Φ* poseen una

homología de 66% entre ellos, en cuanto al tipo y número de nucleótidos que integran su estructura de tallo, sin embargo presentan una diferencia en tamaño y secuencia en la burbuja, y conservan por otro lado una secuencia 5'TGAGGGGTTTTTTGCT 3', que indica una señal esencial de terminación para las RNAPol T3 y T7. El terminador *T3 Φ* muestra una eficiencia de terminación de 30% *in vitro* a todas luces ineficiente para la RNAPol de T3 (Sengupta et al., 1989). Siendo ambos terminadores *T7 Φ* y *T3 Φ* claramente ineficientes en su terminación (McAllister & McCarron, 1977; Carter et al., 1981; McAllister et al., 1981). Además los terminadores tardíos *T3-Te* y *T7-Te* igualmente similares, muestran una baja eficiencia de terminación bajo ensayos *in vitro* con la RNAPol T3, (Sengupta et al., 1989; Macdonald et al., 1993; Jeng et al., 1997). Sin estar bien caracterizada la función de *T3-Te in vivo* se sabe que la terminación ineficiente observada *in vivo* es necesaria para la producción de las proteínas, requeridas para la cola del bacteriófago T3 (Sengupta et al., 1989). Sin embargo, cada una de estas señales de terminación provenientes de T3 y T7, funcionan como una fuerte señal de terminación para la RNAPol de *E. coli*. (Macdonald et al., 1993); llamando notablemente la atención la señal de terminación *T7-Te*, utilizada por la RNAPol de *E. coli*, pero que no es utilizada por la RNAPol del bacteriófago (Dunn & Studier, 1980). Por otra parte la señal de terminación temprana correspondiente en T3, no es utilizada eficientemente por la RNAPol de *E. coli*, a menos que Tau este presente (Briat et al., 1987; Macdonald et al., 1993). Sin embargo pese a todo, la formación de una estable estructura de tallo-burbuja es claramente una función *sine quan non* de un terminador rho-independiente, necesaria para su funcionamiento constitutivo.

Respecto al procesamiento *in vivo* de los transcritos terminados pgal-*tl* y pgal-Sib1 la detección de transcritos superiores a 1000 nt, con las ribosondas anti-*tl* y anti-galK en prácticamente todas las cepas de *E. coli* estudiadas silvestre e isogénicas deficientes en Pnp y mE, puede explicarse ya que una proporción de la actividad transcripcional ignora la señal de terminación en *tl* y Sib1, continuando la síntesis del transcrito hacia

la región 3': Sin embargo es posible que un deficiente bloqueo durante la pre-hibridación, permitiera la detección de señal inespecífica de alto peso molecular como los RNAs ribosomales.

Por lo que, esta señal detectada con anti-*tI* para pKG1800 que no posee a *tI*, en la cepa silvestre fue escasa e inespecífica, al igual que para las demás cepas deficientes estudiadas transformadas con pKG1800. El análisis de los mensajeros con anti-*tI* para pUS6 y Sib1 reveló una diferencia en la eficiencia de terminación y procesamiento en la cepa SA1943 silvestre. Aunque el patrón de procesamiento observado en cepas deficientes en rNE y doble mutante en rNE, Pnp no cambio con respecto al observado en la cepa silvestre y deficiente solo en Pnp, no se descarta la posibilidad de que un corte endonucleolítico por rNE en los transcritos pgal-*tI* y pgal-Sib1 genere el producto de 180 nt. La probable explicación podría ser que la temperatura empleada de 37 °C tal vez no es suficiente para observar el efecto de termolabilidad de la enzima rNE, quien forma parte del degradosoma en *E.coli* (Py et al., 1996) ó como endonucleasa libre. Sin embargo es posible también como lo menciona el autor, la degradación de las estructuras adoptadas por el RNAm como en *tI*, no requieran del corte inicial por rNE, sino por las demás enzimas integrantes del degradosoma u otra enzima no descrita hasta el momento. Por lo anterior, se sugiere realizar un nuevo ensayo de hibridación sobre el RNAm total de las cepas estudiadas en este trabajo, deficientes rNE3071 y doble mutante Pnp::Tn5, rNE3071 induciendo la termolabilidad de la enzima rNE a 44°C al menos por 1 hora después de haberse alcanzado un crecimiento a una densidad óptica de 0.3. Lo anterior es necesario, ya que el procesamiento por rNE es el evento más probable, debido a los sitios hipotéticos de corte para rNE en los transcritos "pgal-*tI*" (Pastrana, 1997) y Sib1, aunque también podría sugerirse que, un porcentaje de los transcritos iniciados en pgal en el sistema pUS6 y pMS1 sean procesados por otra enzima como la exonucleasa 3' RNasa II hasta que encuentre una estructura lo suficientemente estable para detener a esta, así generar y conservar tal producto de 180 nt. transcrito que ha podido ser reproducido en el presente trabajo de acuerdo a lo

reportado (Cisneros, 1991; Pastrana, 1997). Aunque el efecto puede suceder como una actividad complementaria y redundante de exonucleasas y endonucleasas descritas y aun no descritas, ya que se menciona que conforme el mensaje del gen *galK* va siendo procesado por alguna exonucleasa como Pnp, los transcritos producto del procesamiento, adoptan una nueva estructura secundaria, de manera que exponen ahora sitios de corte para endonucleasas como rnE que permanecían ocultos para su corte. Es decir que si bien la secuencia es útil, la disposición de plegamiento estructural en el espacio es un determinante claro en el procesamiento del RNA de los fenómenos posttranscripcionales. En base a lo obtenido en el presente trabajo pese a las limitantes mencionadas, se puede sugerir que si bien el transcrito *pgal-tI-galK* puede ser procesado por rnE, su procesamiento tal vez se deba a otra endonucleasa como la RNAsa K u otra enzima del degradosoma incluso libre además de contar con la actividad conjunta de alguna exonucleasa como la Pnp. Si bien se ha demostrado que exonucleasas como la Pnp es la encargada de procesar de manera importante al transcrito mencionado en el sistema pUS6, reduciéndose el porcentaje de transcritos procesados, es muy posible que la actividad de procesamiento no dependa totalmente de Pnp, sino de otra exonucleasa como la RNAsa II ó alguna otra, de manera que el tamaño de los transcritos procesados *in vivo* se encuentra determinado por la acción combinada endonucleolítica y exonucleolítica, ya que analizando el mapa lineal del transcrito *pgal-tI-galK*, el corte por si solo de rnE muy probablemente no genera, solo un transcrito procesado de 180 nt o incluso de 260 nt en cepas deficientes en Pnp (Pastrana, 1997). Sino por el contrario un mosaico variado de transcritos procesados, pero detectado solo uno de 180 nt con la sonda anti-*tI*, muy probablemente por el corte en los sitios 505, 510, 623, 643 y/o 770. Si se toma en cuenta que siempre existe un porcentaje de transcritos que ignoran la señal en *tI* y Sib1, este transcrito extenso posee al menos 12 opciones hipotéticas de corte para rnE, es decir, un extenso número de productos procesados de tamaño diverso que a la par cambiaría su tamaño por la actividad de exonucleasa 3' como Pnp o RNAsa II en *E. coli*. Esto constituye un proceso dinámico complejo que requiere de diseccionar con claridad las vías de

procesamiento del RNAm en un momento dado que responden a las exigencias del ambiente celular externo e interno.

CONCLUSIONES

- La eficiencia de terminación de la transcripción en *tI in vitro* disminuye considerablemente en las eliminaciones del extremo 3' y con un mayor porcentaje en las eliminaciones del extremo 5', comparado con *tI* silvestre.
- Para el proceso de terminación transcripcional *in vitro* con la RNAPol T3, en el sistema pBS+/-, las secuencias anteriores al terminador *tI* hacia el extremo 5', son de mayor importancia respecto a las del extremo 3'.
- La mutación puntual Sib1 en el tallo de *tI*, es capaz de reducir la eficiencia de terminación de la transcripción, en un porcentaje mayor o igual al observado en las eliminaciones aquí estudiadas.
- Se sugiere que la secuencia mínima funcional para *tI* de *lambda in vitro* es un fragmento superior a 121 pb de DNA.
- Se propone que además de un segmento poli-U en el extremo 3' y una estructura de tallo-burbuja, el terminador rho-independiente *tI* requiere estar ubicado en una secuencia contexto apropiada asegurando el plegamiento estructural del terminador para su adecuada función.
- El análisis de la estructura secundaria mediante el programa "mfold RNA/DNA" reveló que la mutación puntual Sib1 y eliminación de secuencias en *tI* cambia la estructura secundaria alterando la estabilidad termodinámica de los transcritos y repercute con la eficiencia de terminación *in vitro*.
- Con la eliminación de secuencias hacia los extremos 3' y 5' surgen nuevas estructuras que hacen las pases de un terminador alterado con una reducida eficiencia de terminación.
- No se descarta que el procesamiento de *tI in vivo* en el sistema pUS6 y pMS1 depende de la actividad endonucleasa de mE sobre los transcritos pgal-*tI*-galK y pgal-Sib1-galK respectivamente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abraham J. Mascarenhas D, Fisher R, Benedik M, Campbell A, Echols H, (1980). DNA sequence of regulatory region for integration gene of bacteriophage lambda. Proc Natl Acad Sci USA 77:2477-2481.
2. Adhya, S. & Gottesman, M. (1978). Control of transcription termination. Annu. Rev. Biochem. 47: 967-996.
3. Arndt, K.M. & Chamberlin M.J. (1988). Transcription termination in *E.coli*. Measurement of the rate of enzyme release from Rho-independent terminators. J.Mol.Biol. 202:271-285.
4. Arndt, K.M. & Chamberlin M.J. (1990). RNA chain elongation by *E. coli*. RNA polymerase factors affecting the stability of elongating ternary complex. J. Mol. Biol. 213: 79
5. Belasco, J. G. & Higgins, C. F. (1988). Mechanism of mRNA decay in bacteria: A perspective. Gene. 72: 15-23.
6. Belasco, J. G. & Braverman, G. (1993). Control of messenger RNA stability. Academic Press, Inc. Harcourtbrace Jovanovich, Publishers.
7. Belfort M. (1980). The *cII*-independent expression of the phage lambda *int* gene in RNase III-defective *E. coli*. Gene. 11: 149-155.
8. Bermúdez-Cruz. R.M. (1991). Identificación de factores que participan en el funcionamiento del terminador λ de λ . Tesis Doctoral. CINVESTAV-IPN. México D.F.
9. Bermúdez-Cruz R.M., J. Chamberlin & C. Montañez. (1999). NusA is involved in transcriptional termination on λ tI. Biochimie. 81: 1-8.
10. Bernardi, F. & Bernardi, . (1990). A Completed sequence of pKG1800, a vector for determination of transcription terminators. DNA Seq. 1: 147-151.
11. Bertrand K., Korn L., Lee, F. & Yanofsky, C. (1977). The attenuator of the tryptophan operon of *E. Coli* Heterogeneous 3'-OH termini *in vivo* and deletion mapping of functions. J.Mol.Biol. 117: 227-247.
12. Blum. E., Py, B., Carpousis, A.J., & Higgins, C.F. (1997). Poliphosphate Kinase is a component of the *E. Coli* RNA degradosome. Mol Microbiol 26: 387-398.
13. Bouvet, P., & Belasco, J.G. (1992). Control of the RNase E mediated RNA degradation by 5' terminal base pairing in *E. coli*. Nature. (London). 360: 488-491.
14. Briat J.-F., & Chamberlin, M. J. (1984). Identification and characterization of a new transcriptional termination factor from *E.coli*. Proc.Nat.Acad.Sci., USA. 81:7373-7377.
15. Briat J.-F., Bollang G., Kearney, C. A., Molineux I. & Chamberlin, M. J. (1987). Tau factor from *E. Coli* mediates accurate and efficient termination of

- transcription at the bacteriophage T3 early termination site *in vitro*. *J.Mol.Biol.* 198:43-49.
16. Cannistraro, V. J. & Kennell, D. (1991). RNAsa Y, una forma de RNAsaI, y la degradación de RNAm en *E. coli*. *J. Bacteriol.* 173, 4653-4659.
 17. Carpousis, A.J., vanHouwe, G., Ehretsman, C., & Krisch, H.M. (1994). Copurification of *E. Coli* RNase E and PNPasa: evidence for a specific association between two enzymes important in RNA processing and degradation. *Cell* 76: 889-900.
 18. Carter A.D., Morris C.E. & McAllister, W. T. (1981). Revised transcription map of the late region of bacteriophage T7 DNA. *J. Virol.* 37: 636-642.
 19. Chamberlin, M.J., McGrath, J., & Waskell, L. (1970). New RNA polymerase from from *E. coli* infected with bacteriophage T7. *Nature (London)*. 228: 227-231.
 20. Chamberlin, M. J. (1974). The selectivity of transcription. *Ann. Rev. Biochem.* 43, 721-775.
 21. Chamberlin, M. J., Briat, J. F., Dedrich, R. L., Hanna, M., & Kane, C.M. (1985). In genetics, Cell differentiation and cancer, New York: Academic., 47-73.
 22. Chamberlin, M.J. (1995). New models for the mechanism of transcription elongation and its regulation.+ In the Harvey Lectures, pp. 1-21. Wiley-Liss, New York.
 23. Cheng S-WC, Lynch EC, Leason KR, Court DL, Shapiro BA, & Friedman DI. (1991). Functional importance of sequence in the stem-loop of a transcription terminator. *Science*. 254:1205-1207.
 24. Christie, G. E., Farnham, P.J. & Platt. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 4180-4184.
 25. Chung, S. & Echols, H. (1977). Positive regulation of integrative recombination by the *cII* and *cIII* genes of bacteriophage λ . *Virology*. 79. 312-319.
 26. Cisneros, B. (1991). Aislamiento de mutantes de *tI*. Tesis doctoral. CINVESTAV-IPN. Méx. D.F.
 27. Cisneros, B., Court, D., Sanchez, A. & Montañez C. (1996). Point mutation in a transcription terminator, λ *tI*, that affect both transcription termination and stability. *Gene*, 181:127-133.
 28. Court D., Adhya S., Nash, H. and Enquist, L. (1977). The phage λ integration protein *Int* is subject to control by the *cII* and *cIII* gene products. In Bukhari, A.I., Shapiro, J.A. and Adhya, S.L. (Eds), DNA insertion elements, plasmids and episomes. Cold Spring Harbor Laboratory. New York. 389-394.
 29. Court D, Huang TF, Oppenheim AB. (1983). Deletion analysis of the retroregulatory site for the λ *Int* gene. *J. Mol. Biol.* 166: 233-240.
 30. Court D, Schmeissner U, Bear S, Rosenberg M, Oppenheim AB, Montañez C, Guarneros G. (1983b). Control of *Int* gene expression by RNA processing. In: Hamer D, Rosenberg M (eds), Gene expression. Liss. New York. pp 311-326.

31. Court D, Sigmund, Morgan, E.A. (1988). NusA protein affects transcriptional pausing and termination *in vitro* by binding to different sites on the transcription complex. *Biochemistry*. 27: 5622.
32. Curtis A. Raskin, George Díaz, Keith Joho & William T. McAllister. (1992). Substitution of a single Bacteriophage T7 RNA polymerase at position 748 results in a switch in promoter specificity. *J. Mol. Biol.* 228. 2: 506-515.
33. Daniel Schindler & Harrison Echols. (1981). Retroregulation of the *int* gene of bacteriophage λ : Control of translation completion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 78. 7: 4475-4479.
34. Das, A., Gottesman, M. E., Wardwell, J., Trisler, P. & Gottesman, S. (1983). A mutation in the *E. coli* rho gene that inhibits the N protein activity of phage λ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 5530-5534.
35. Deutcher, M.p., & Racher-Reuven, N. (1991). Enzymatic basis for hydrolytic versus phosphorolytic mRNA degradation in *E. Coli* and *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88: 3277-3280.
36. Donovan W. P. & Krushner, S. R. (1986). Polynucleotide phosphorylase and ribonuclease II are required for cell viability and RNAm turnover in *E coli* K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 120-124.
37. Dunn J.J., & Studier F.W. (1983). Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and locations of T7 genetics elements. *J.Mol.Biol.* 166: 477-535.
38. Elliot. (1984). *Cell* 36: 211-219.
39. Emory, S.A., & Belasco J. G. (1990). The *ompA* 5' untranslated RNA segment functions in *E. coli* as a growth-rate-regulated Rnam stabilizer whose activity is unrelated to translational efficiency. *J. Bacteriol.* 172, (4472-4481).
40. Epp, C., Pearson, M. & Enquist, L.W. (1981). *Gene*. 13: 327-337.
41. Farnham, P.J. & Platt, T. (1980). A model for transcription termination suggested by studies on the *trp* attenuator *in vitro* using base analogs. *Cell*. 20:739-748.
42. Friedman, D.I., Gottesman, M.E., Hendrix, R.W., Roberts, J.W., Stahl R.W., Weisberg, R.A. (1983). Lytic mode of lambda development. *Lambda II*. In: (Eds). Cold Spring Harbor.
43. Friedman, D. I., Imperiale, M.J. & Adhya, S.L. (1987). RNA 3' end formation in the control of gene expression. *Annu. Rev. Genet.* 21, 453-488.
44. García, Mena, J., et al., (1999). A novel mutation in the KH domain of polynucleotide phosphorylase affects autoregulation and mRNA decay in *E. coli*. *Molecular Microbiology*. 33. 2: 235-248.
45. Gilbert, W., Backman K. & Ptashne M, (1976). Construction of plasmids carrying the *cl* gene of bacteriophage lambda. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 73. 11: 4174-8.
46. Greenblatt, J., Horowitz, R. J., & Li, J. (1987). In *RNA polymerase and regulation of transcription*. Elsevier, 357-366.
47. Goldberg, G.S., & Lau, A.F.. (1993). Transfection of Mammalian Cells with PEG-Purified Plasmid DNA. *Biotechniques*. 14: 548-550.

48. Goliger, J.A., Yang, X., Guo, H.-C. & Roberts, J.W. (1989). Early transcribe sequences affect termination efficiency of E.coli RNA polymerase. *J.Mol.Biol.* 205:331-341.
49. Grungberg-Manago, M., & Ochoa, S. (1963). Polynucleotide phosphorylase. In *Progress in Nucleic Acid Research*, Vol. 1. Davidson, J.N., and Cohn, W.E. (eds). San Diego: Academic Press, p.p. 93-133.
50. Guarneros, G & Galindo, J.M. (1979). The regulation of integrative recombination by the b2 region and the cII gene bacteriophage λ . *Virology.* 95: 119-126.
51. Guarneros G, Montañez C, Hernandez T, Court D. (1982). Posttranscriptional Control of Bacteriophage λ *int* Gene Expression from a Site Distal to the Phage. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 238-242.
52. Guarneros. (1988). Retroregulation of Bacteriophage λ Gene *int* Expression. *Current Topics in Microbiology and Immunology.* 136: 1-19.
53. Gusarov I. & Nudler E. (1999). The mechanism of intrinsic transcription termination. *Molecular Cell.* 3:495-504.
54. Hanrahan, D. (1985). Vol 1. A practical Approach. Techniques For Transformation of E. coli. In *DNA cloning.* Glover, D. M., ed. IRL Press, Oxford. pp. 109-135.
55. Hartvig L., & Christiansen J. (1996). Intrisec termination of T7 RNA polymerase mediated by either RNA or DNA. *EMBO J.* 17: 4767-4774.
56. Higgins, C.F., Causton, H.C., Dance, G.S.G., & Mudd, E.A. (1993). The rol of the 3' end in mRNA stability and decay. In *Control of Messenger RNA Stability.* Belasco, J.G., and Brawerman, G. (eds). San Diego: Academic Press, pp. 13-30.
57. Heinrich B, & Bernhard A. (1993). EasyPreps Procedure: Biotechniques. Vol.14. No.4.
58. Herskowitz, I. & Hagen, D. (1980). The lysis-lysogeny decision of phage λ : explicit programming and responsiveness. *Annu. Rev. Genet.* 14: 399-445.
59. Hoess, R.H., Foeller, C., Bidwell, K. & Landy, A. (1980). Site-specific recombination functions of bacteriophage λ : DNA sequence of regulatory regions and overlapping structural genes for *int* and *xis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 2482-2486.
60. Horowitz, H. & Platt, T. (1982). A termination site for LacI transcription is between the CAP site and the lac promoter. *J.Biol.Chem.* 257. 19: 11740-11746.
61. Hsu, P.L., Ross, W. and Landy, A. (1980). The λ phage att site: functional limits and interaction with Int protein. *Nature.* 285: 85-91.
62. Ingham C.J., Hunter L.S. & Smith Margaret C.M. (1995). Rho-independent terminators without 3' poly-U tails from the early region of actinophage ϕ C31. *Nucleic. Acids. Research.* 23. 3:370-376.

63. Jeng S.-T., Gardner, J.F., & Gumport, R.I. (1990). Transcription termination by bacteriophage T7 RNA polymerase at rho independent terminators. *J.Biol. Chem.* 265: 3823-3830.
64. Jeng S.-T., Gardener, J.F. & Gumport, R.I. (1992). Transcription termination *in vitro* by bacteriophage T7 RNA polymerase. The role of the sequence elements within and surrounding a Rho-independent transcription terminator. *J.Biol.Chem.* 267:19306-19312.
65. Jeng S.-T., Lay S.-H. & Lai H.-M. (1997). Transcription termination by bacteriophage T3 and SP6 RNA polymerases at Rho-independent terminators. *Can. J. Microbiol.* 43: 1147-1156.
66. Katzir, N., Oppenheim. A., Belfort, M. & Oppenheim, A.B. (1976). Activation of the lambda int gene by the cII and cIII gene products. *Virology.* 74: 324-331.
67. Klee, C. B. & Singer, M.F. (1968). The processive degradation of individual polyribonucleotide chain. *J.Biol.Chem.* 243:923-927.
68. Klement, J.F., Moorefield, M.B., Jorgensen, E., Brown, J.E., Risan, S. & McAllister, W.T. (1990). Discrimination between bacteriophages T3 and T7 promoters by the T3 and T7 RNA polymerases depends upon a three base-pair region located 10 to 12 base-pairs upstream from the start site. *J. Mol. Biol.* 215:21-29
69. Kourilsky, P., Bourguignon, M., Bouquet, M. & Gros, F. (1971). Early transcription control after induction of prophage λ . *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Boil.* 35: 305-314.
70. Krummel, B. Chamberlin. M.J. (1989). RNA chain initiation by *Escherichia coli* RNA polymerase. Structural transitions of the enzyme in early ternary complexes. *Biochemistry* 28: 7829-7842.
71. Krummel, B. (1990). Structural transitions of *E. coli* RNA polymerase during transcription initiation and elongation. Ph. D. Thesis, University of California, Berkeley CA.
72. Kushner, S.R. Arraiano C, Yancey SD, (1993). Identification of endonucleolytic cleavage sites involved in decay of *Escherichia coli* trxA mRNA. *J. Bacteriol.* 175. (4):1043-52.
73. Landick R, Wang D, & Chan C. (1996). Quantitative analysis of transcriptional pausing by RNA polymerase: the *his* leader pause site as a paradigm. *Methods enzymol.* 274, 334-352.
74. Lau, L.F., Roberts, F.W. & Wu, R. (1983). RNA polymerase pausing and transcript release at the λ tR1 terminator *in vitro*. *J.Biol.Chem.* 258:9391-9397.
75. Lee, F., Squires, C.L., Squires, C. & Yanofsky, C. (1976). Termination of transcription *in vitro* in the *E. Coli* tryptophan operon leader region. *J.Mol.Biol.* 103:383-393.
76. Lee F. And Yanofsky C. (1977). Transcription termination at the trp operon attenuators of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: RNA secondary structure and regulation of termination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74. 10: 4365-4369.

77. Lee D, Phung L, Stewart J, & Landick, R. (1990). Transcription pausing by E. coli RNA polymerase is modulated by downstream DNA sequences. *J. Biol. Chem.* 265: 15145-15153.
78. Lewis, B. (1987). RNA polymerase promoter interactions control initiation In *Genes* 183. Eds. John Wiley & Sons.
79. Lozeron H.A, Dahlberg J, & Szybalski W. Processing of the major leftward mRNA of coliphage lambda. *Virology.* 71 (1976) 262-277.
80. Lodish, H., Baltimore, D. Darnell, J. (1995). *Molecular Cell Biology.* Fifth Edition. Scientific American Books Inc. New York.
81. Luk, K.C., Dobrzansky, P. And Szybalsky. W. (1982). Cloning and Characterization of the termination site tI for the gene int transcript in phage λ . *Gene.* 17. 259-262.
82. Luzzati, D. (1970). Regulation of lambda exonuclease synthesis: role of the N gene product and lambda repressor. *J. Mol. Biol.* 28; 49. (2): 515-9.
83. Lynn, S.P., Bauer, C.E., Chapman, K. & Gardner, J.F. (1985). Identification and characterization of mutants affecting transcription termination at the threonine operon attenuator. *J. Mol. Biol.* 25; 183. (4): 529-41.
84. Lynn, S.P., Kasper, L.M. & Gardner, J. F. (1988). Contributions of RNA secondary structure and length of the thymidine tract to transcription termination at the thr operon attenuator. *J.Biol.Chem.* 263:472-479.
85. Macdonald L.E., Youwen Zhou & William T. McAllister. (1993). Termination and slippage by bacteriophage T7 RNA polymerase. *J.Mol.Biol.* 232:1030-1047.
86. Macdonald L.E., Durbin R.K., Dunn J.J., & McAllister W.T. (1994). Characterization of two types of termination signal for bacteriophage T7 RNA polymerase. *J.Mol. Biol.* 238: 145-158.
87. Maniatis T., Fritsch E.F., and Sambrook J. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Second Edition. Cold spring Harbor Laboratory Press.
88. Martin, F.H. & Tinoco, I. (1980). DNA:RNA hybrid containing oligo dA:rU sequences are exceptionally unstable and may facilitate termination of transcription. *Nucl. Acids. Res.* 8:2295-2299.
89. Martinez Trujillo, Miguel. (1989). *El terminador tI del bacteriofago lambda: Definición del extremo 3' funcional del DNA y mutagenesis dirigida.* Tesis de Maestría en Genética. CINVESTAV-IPN.
90. Masters, B.S., Stohl, L.L. & Clayton, D.A. (1987). Yeast mitochondrial RNA polymerase is homologous to those encoded by bacteriophages T3 and T7. *Cell.* 51:89-99.
91. McAllister, W. T. & McCarron, R. J. (1977). Hybridization of the *in vitro* products of bacteriophage T7 RNA polymerase to restriction fragments of T7 DNA. *Virology.* 82: 288-298.
92. McAllister, W. T., Morris C., Rosenberg A.H. & Studier F.W. (1981). Utilization of bacteriophage late promoters in recombinant plasmids during infection. *J.Mol.Biol.* 153: 527-543.

93. McDowell J.C., Roberts J.W., Jin D.J. & Gross C. (1994) Determination of intrinsic transcription termination efficiency by RNA polymerase elongation rate. *Science*. 266: 822-825.
94. McGraw, N.J., Bailey, J.N., Cleaves., G.R., Dembinski, D.R., & McAllister, W.T. (1985). Sequence and analysis of the gene for bacteriophage T3 RNA polymerase. *Nucleic. Acids. Res.* 13: 6753-6766.
95. McKenney, K., Shimatake, H., Court, D., Schmeissner, U., Brady, C. and Rosenberg, M. (1981). A system to study promoter and terminator signals recognized by *E. Coli* RNA polymerase. Chirikjian, J.C. and Papas, T.S. (Eds), *Gene Amplification and Analysis, Vol. II: Analysis of Nucleic Acids by Enzymatic Methods*. Elsevier/North Holland, Amsterdam, , pp. 382-415.
96. Mead D.A., Skorupa, E.S. & Kemper, B. (1986). Single-stranded DNA 'blue' promoter plasmids: a versatile tandem promoter system for cloning and protein engineering. *Protein Eng.* 1:67-74.
97. Miczak, A., Kaberdin, V.R., Wei, C.L., & Lin-Chao, S. (1996). Proteins associated with RNase E in a multicomponent ribonucleolytic complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 3865-3869.
98. Miller. J.H. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*. CSH. New York. Third edition. P.p. 201-205.
99. Moffat, B.A., Dunn, J.J. & Studier, F.W. (1984). Nucleotide sequence of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 173: 265-269.
100. Montañez C, Bueno J, Schmeissner U, Court DL, Guarneros. (1986). Mutations of bacteriophage lambda that define independent but overlapping RNA processing and transcription termination sites. *J Mol. Biol.* 191: 29-37.
101. Mott, J.E., Galloway, J.L. & Platt. (1985). Maturation of *E.coli* tryptophan operon mRNA. Evidence for 3' exonucleolytic processing after rho-dependent termination. *EMBO J.* 4: 1887-1891.
102. Nilsson, G., Belasco, J.G., Cohen, S.N., & von Gabain, A. (1984). Growth-rate dependent regulation of mRNA stability in *E. coli*. *Nature (London)* 312: 75-77.
103. Nudler, E., Goldfarb A, & Kashlev M. (1994). Discontinuous mechanism of transcription elongation. *Science*. 265: 793-796.
104. Nudler E., Kashlev M., Nikiforov V., & Goldfarb A. (1995). Coupling between transcription termination and RNA polymerase inchworming. *Cell*. 78: 317-324.
105. Oppenheim, A. B., Gottesman, S; Gottesman, M.E. (1982). Regulation of Bacteriophage λ int gene expression. *J.Mol.Biol.* 158: 327-
106. Pastrana. C. R. (1997). Tesis de licenciatura: Estudio de la participación de la mutación tIF2 sobre la expresión del gen reportero galK. Universidad Veracruzana. Fac. Cienc. Bio. y Agrop.
107. Pedersen, S., Reeh, S. & Friesen, J.D. (1978). Functional mRNA half-life in *E.coli*. *Mol. Gen. Genet.* 166: 329-336.
108. Pérez, M.D. (1989). Mecanismo de exclusión de plásmidos que portan una región *bar la* del fago λ en *E. Coli* rap. Tesis doctoral. CINVESTAV. México, D.F.

109. Platt, T. (1981). Termination of transcription and its regulation in the tryptophan operon of *E.coli*. *Cell*. 24:10-23.
110. Platt, T. (1986). Transcription termination and the regulation of gene expression. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 339-372.
111. Py B., Causton, H., Mudd, E.A., and Higgins, C.F. (1994). A protein complex mediating mRNA degradation in *E.coli*. *Mol. Microbiol.* 14: 717-729.
112. Py B; Higgins, C.F; Krisch, H.M. & Carpousis A.J. (1996). A dead-box RNA helicase in the *E.coli* RNA degradosome. *Nature*. 381: 169-172.
113. Raleigh, E.A., et al.(1989). In *Current Protocols in Molecular Biology* eds. Ausubel, F.M. et al. Publishing Associates and Wiley interscience; New York. Unit 1.4.
114. Reynolds, R. Bermúdez R.M. & Chamberlin, M. (1992). Parameters affecting transcription termination by *E. coli*. RNA polymerase. I. Analysis of 13 Rho-independent terminators. *J.Mol.Biol.* 224:31-51.
115. Reynolds, R. & Chamberlin, M. (1992). Parameters affecting transcription termination by *E. coli*. RNA polymerase. II. Construction and analysis of hybrid terminators. *J. Mol. Biol.* 224, 53-63.
116. Rice G.A., Kane C.M. & Chamberlin M.J. (1991). Footprinting analysis of mammalian RNA polymerase II along its transcript: an alternative view of transcription elongation. *Procedures National Academy of Sciences of USA*. 88: 4245-49.
117. Roberts, J. W. (1969). Termination factor for RNA synthesis. *Nature* 224(225): 1168-74.
118. Roberts J.W. (1976). Transcription termination and its control in *E.coli*. In *RNA polymerase*. Eds. Losick, R. and Camberlin, M. 247. Cold Spring Harbour Laboratory. USA.
119. Rosenberg, M. & Court D. (1979). Regulatory sequences involved in the promotion and termination. *Annu. Rev. Genet.* 13: 319-353.
120. Ruteshouser, E.C. & Richardson, J.P. (1989). Identification and characterization of transcription termination sites in the *E. coli lacZ* gene. *J.Mol.Biol.* 208 (1):23-43.
121. Schindler, D. & Echols, H. (1981). Retroregulation of the *int* gene of bacteriophage λ : Control of translation completion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 78. 4475-79.
122. Schmeissner, U., Court, D., McKenney, K and Rosenberg, M. (1981). Positively activated transcription of λ integrase genes initiates with UTP in vivo. *Nature*. 292:173-175.
123. Schmeissner, U., McKenney, K and Rosenberg, M. and Court, D. (1984a). Removal of a terminator structure by RNA processing regulates *int* gene expression. *J. Mol. Biol.* 176: 39-53.
124. Schmeissner, U., McKenney, K and Rosenberg, M. and Court, D. (1984b). Transcription terminator involved in the expression of the *int* gene of phage λ . *Gene* 28: 343-350.

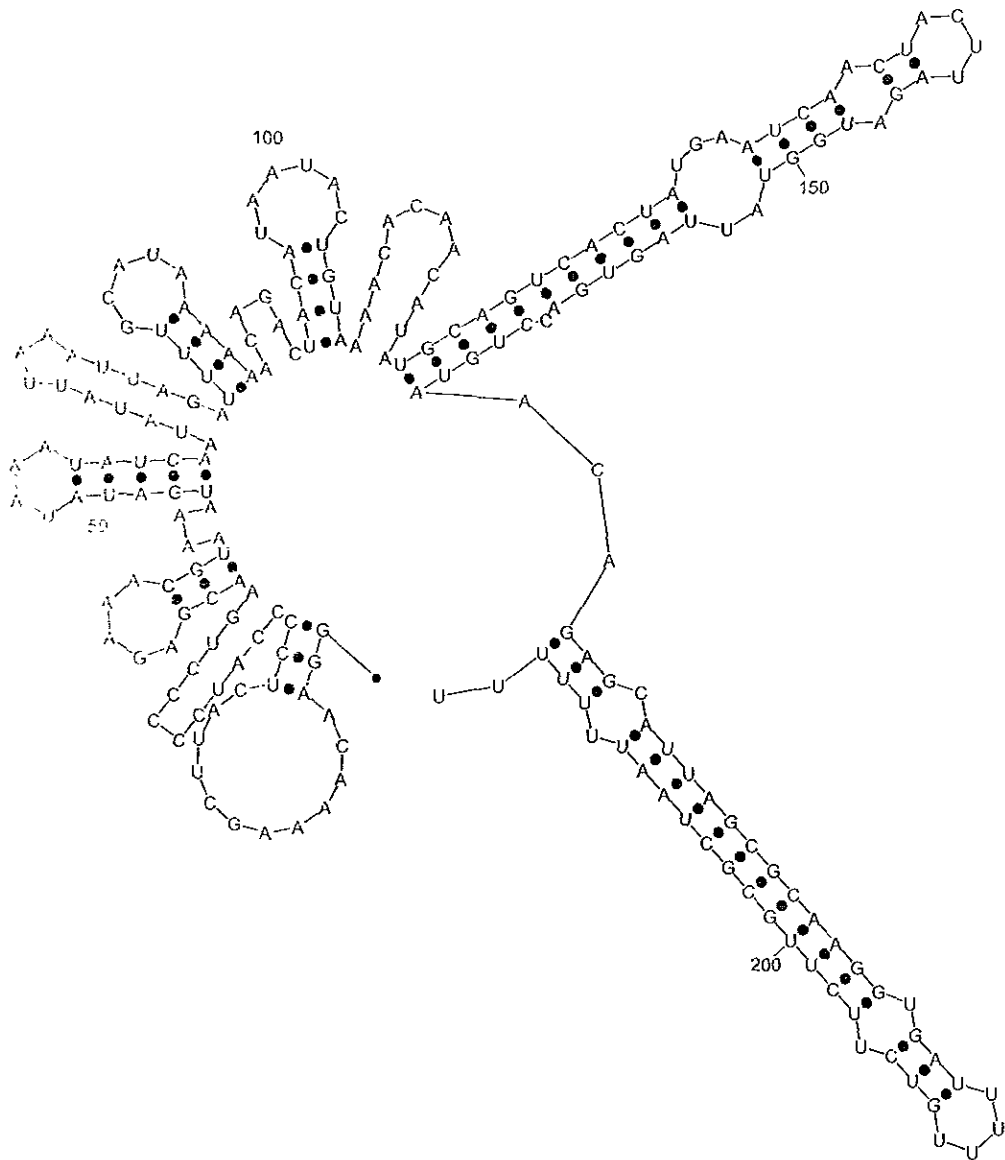
125. Schmidt M.C & Chamberlin M.J.(1987). NusA protein of E.coli is an efficient transcription termination factor for certain terminator sites. *J.Mol.Biol.* 195:809-818.
126. Shimatake, H. And Rosenberg, M. (1981). Purified regulatory protein cII positively activates promoters for lysogenic development. *Nature.* 292: 128-132.
127. Sengupta, D., Chakravarti, D. & Maitra U. (1989). Relative efficiency of utilization of promotor and termination sites by bacteriophage T3 RNA polymerase. *J.Mol.Chem.* 264. 24:14246-14255.
128. Sigmund C.D., & Morgan E.A. (1988). NusA protein affects transcriptional pausing and termination in vitro by binding to different sites on the transcription complex. *Biochemistry.* 27: 5622-5627.
129. Signer, E.R. (1970). On the control of lissogeny in phage λ . *Virology.* 40: 624-633.
130. Silhavy, T.J., Berman, M.L. and Enquist, L.W. (1984). Experiments with gene fusions. Cold spring harbor. N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
131. Stroynowsky, I., Kuroda, M. & Yanofsky, C. (1983). Transcription termination in vitro at the tryptophan operon attenuator is controlled by secondary structure in the leader transcript. *Proc.Nat. Acad. Sci. USA.* 80: 2206-2210.
132. Sugimoto, N., Kierzek, R. & Turner, D.H. (1987). Sequence dependence for the energetics of dangling ends and terminal base pairs in ribonucleic acid. *Biochemistry.* 26 (14):4554-4558.
133. Telesnitsky A.P., Chamberlin, M.J. (1989a). Sequences linked to prokaryotic promoters can affect the efficiency of downstream termination sites. *J. Mol. Biol.* 205: 315-330.
134. Telesnitsky A.P., Chamberlin, M.J. (1989b). Terminator distal sequences determine the in vitro efficiency of the early terminators of bacteriophages T3 and T7. *Biochemistry.* 28:5210-5218.
135. Tomizawa, J. & Mazukata, H. (1987). Factor independent termination of transcription in a stretch of deoxyadenosine residues in the template. *Cell.* 51:623-630.
136. Tuerk, C., Gauss, P., Thermes, C., Groebe, D., Gayle, M., Guilg, N., Stormo, G., d'Aubenton Carafa, Y., Uhlenbeck, O., Tinoco, I., Jr, Brody, E. & Gold, L. (1988). CUUCGG hairpins: extraordinarily stable RNA secondary structures associated with various biochemical processes. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA.* 85:1364-1368.
137. Yager, T.D. & von Hippel, P.H. (1987). Transcript elongation and termination in E. coli. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium* (Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Low, K.B., Magasanik, B., Schaechter, M. & Umberger, H.E., eds), pp. 1241-1275, Amer. Soc. for Microbiol. Washington, DC.
138. Yager, T.D. & von Hippel, P.H. (1991). A thermodynamic analysis of RNA transcript elongation and termination in E.coli. *Biochemistry.* 30: 1097-1118.
139. Yang M-T, Scott, Harlan. B. & Gardner Jeffrey, F. (1995). Transcription termination at the thr attenuator. Evidence that the adenine residues upstream of

the stem and loop structure are not required for termination. *The journal of biological chemical.* 270. 40:23330-23336.

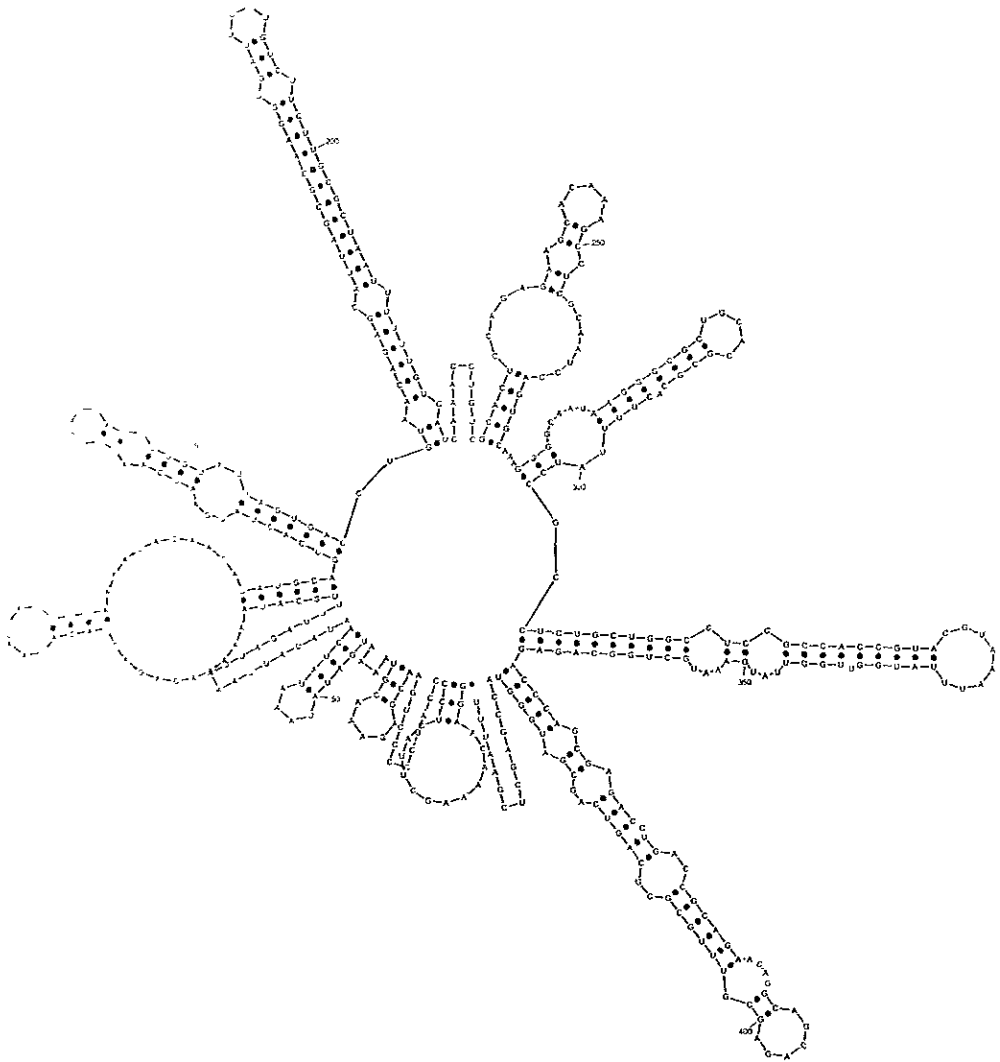
140. Yanofsky, C. (1988). Transcription attenuation. *J. Biol. Chem.* 263 (2): 609-612.
141. Y d'Aubenton Carafa, et al. (1990). Prediction of Rho-independent *Escherichia coli* transcription terminators. A statistical analysis of their RNA stem-loop structures. *J. Mol. Biol.* 216: 835-858.
142. Ursula Schmeissner, K. McKenney, M. Rosenberg, D. Court., (1984). Transcription terminator involved in the expression of the int gene of phage lambda. *Gene.* 28: 343-350.
143. Velásquez Vadillo J. Francisco. (1992). *Retroregulación Positiva del Gen Int del Bacteriófago Lambda por el Terminador de la Transcripción tI.* Tesis Doctoral. CINVESTAV-IPN.
144. von Hippel, P. H., Bear, D. G., Morgan, W. D., McSwiggen, J. A. (1984). Protein-nucleic acid interactions in transcription: a molecular analysis. *Annu. Rev. Biochem.* 53: 389-446.
145. von Hippel, P. H., Yager T.D., Bear, D. G., McSwiggen, J. A., Geiselman, J., Gill, S C., Linn, J.D., & morgan, W.D. (1987). In *RNA polymerase and the regulation of transcription.* (Reznikoff, W.S., Eds) pp. 325-334, Elsevier, New York.
146. von Hippel, P.H. & Thomas Yager. (1991). Transcript elongation and termination are competitive kinetic processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa.* 88: 2307-2311
147. Wang D, T. I. Meier, C. L. Chan, G. Feng, D. N. Lee, and R. Landick. (1995). Discontinuous Movements of DNA and RNA In RNA Polymerase Accompany Formation of a Paused Transcription Complex. *Cell.* 81: 341-350.
148. Wilson K.S. & von Hippel P.H. (1995). Transcription termination at intrinsic terminators: The rol of the RNA hairpin. *Biochemistry.* 92:8793-8797.
149. Woodcock, D.M. et al., (1989). *Nucleic Acids Res.* 17, 3469-3478.
150. Zuber, M., Patterson, T.A & Court, D.L. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 4514-4518.
151. Zurawsky, G. & Yanofsky, C. (1980). *E. coli.* Tryptophan operon leader mutations which relieve transcription termination are cis-dominant to trp leader mutations which increase transcription termination. *J. Mol. Biol* 142: 123-

APÉNDICE

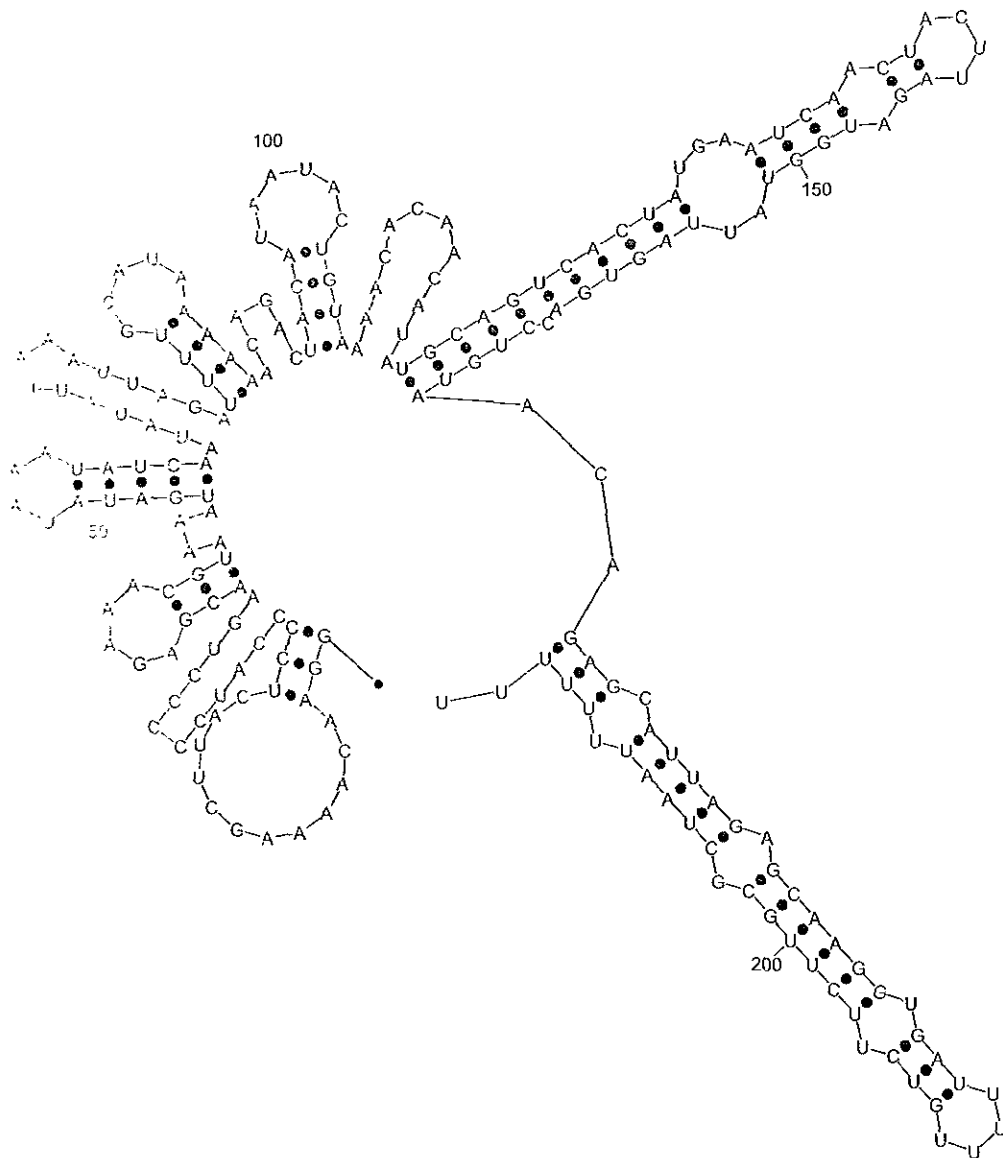
A continuación se muestra la predicción de la estructura secundaria de todos los transcritos terminados en *tI* y/o en el sitio de eliminación para cada deleción de *tI*, además de la estructura de los transcritos que pasan al terminador *tI*, liberados en el sitio truncado en EcoRI señaladas como (EcoRI), para cada deleción *in vitro*. En cada estructura (✦) Indica el sitio +1 del transcrito iniciado a partir del promotor T3 en pBS+/- . Con marcador, se indica la secuencia poli-U 3' del terminador *tI* o en su caso el extremo 3' conservado del terminador, haciendo las pases de un pseudo-terminador, también se indican segmentos poli-U del extremo 3' que favorecen la liberación del transcrito, al paso de la RNAPol T3.



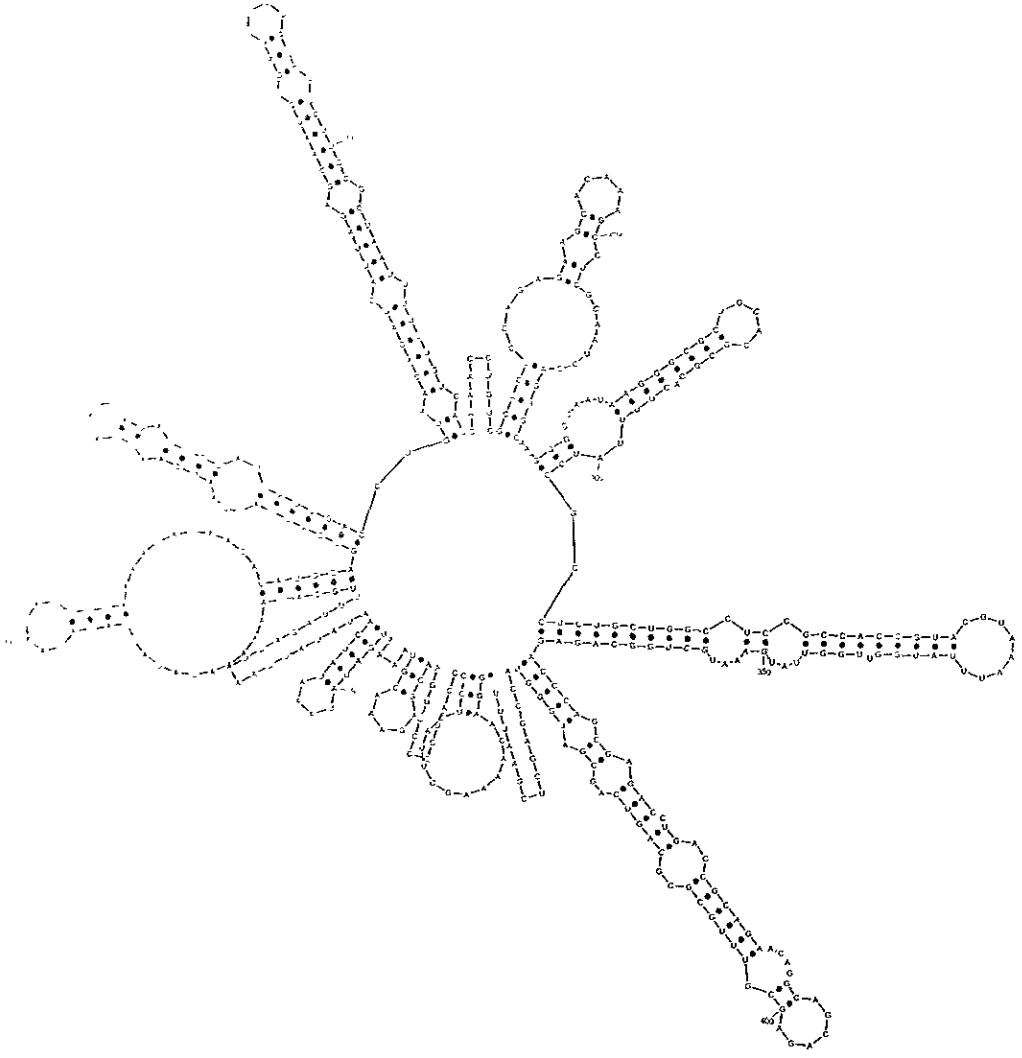
ENERGY = -42.2 tJ+



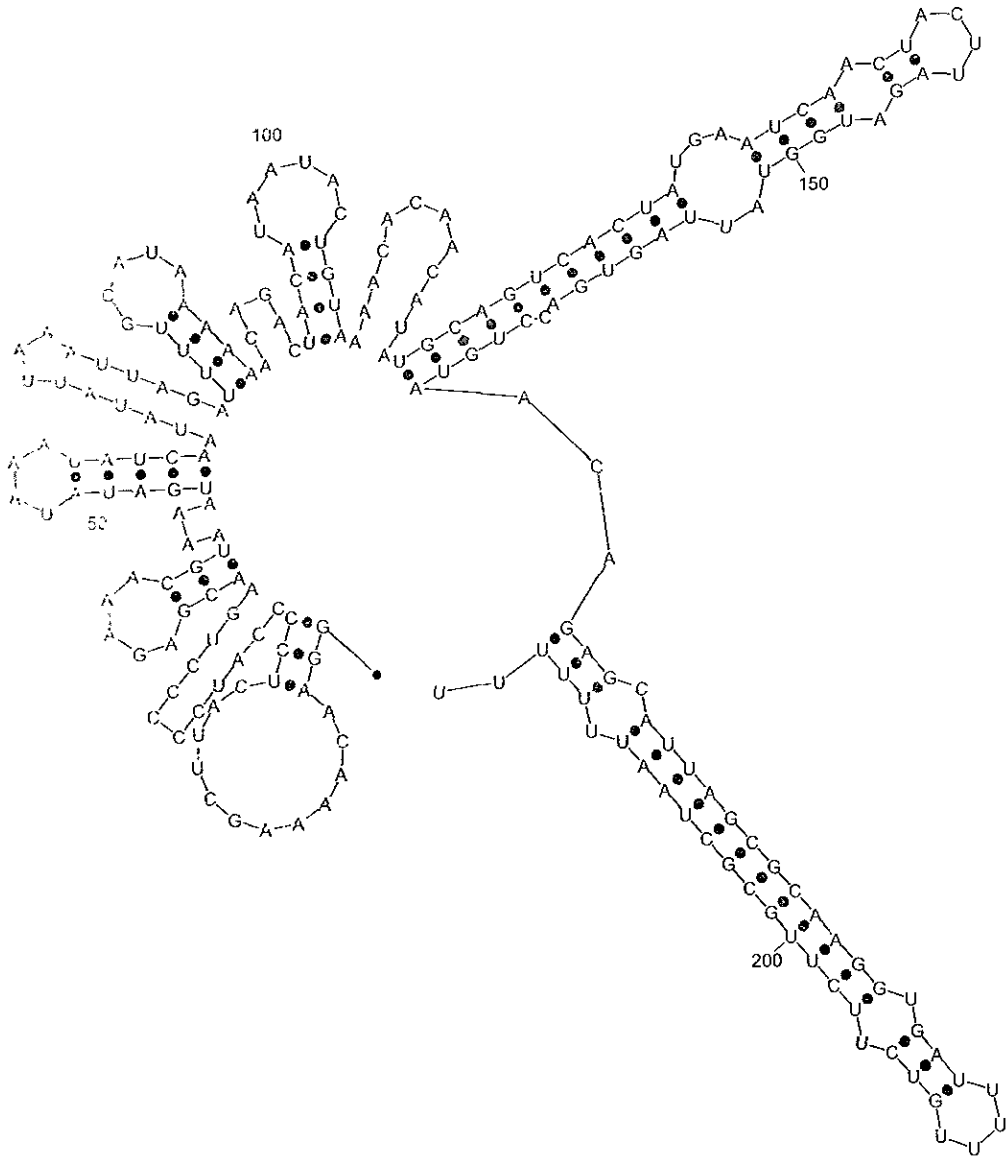
ENERGY = -109.6 tl_Silvestre_EcoRI



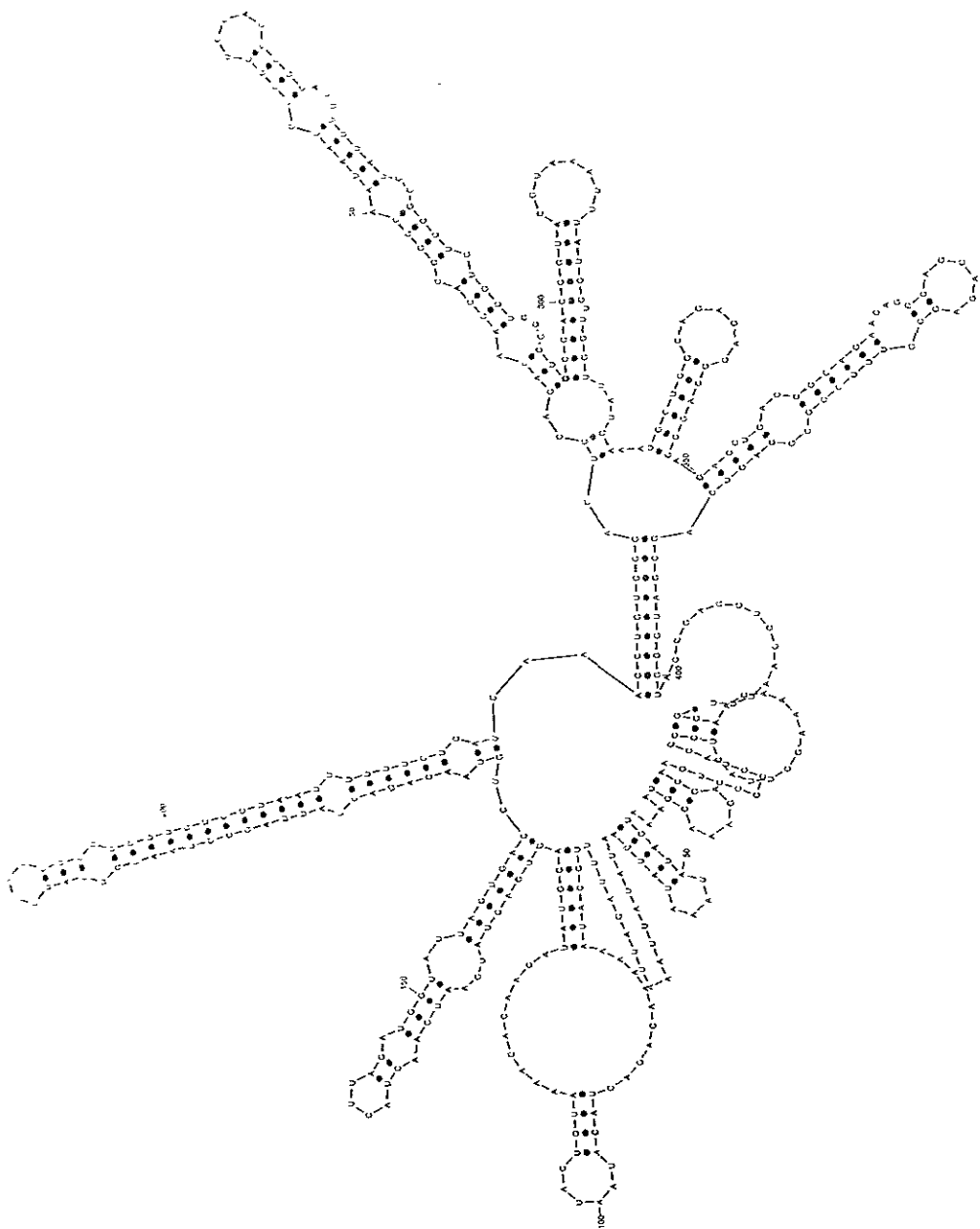
ENERGY = -36.0 Sib1_



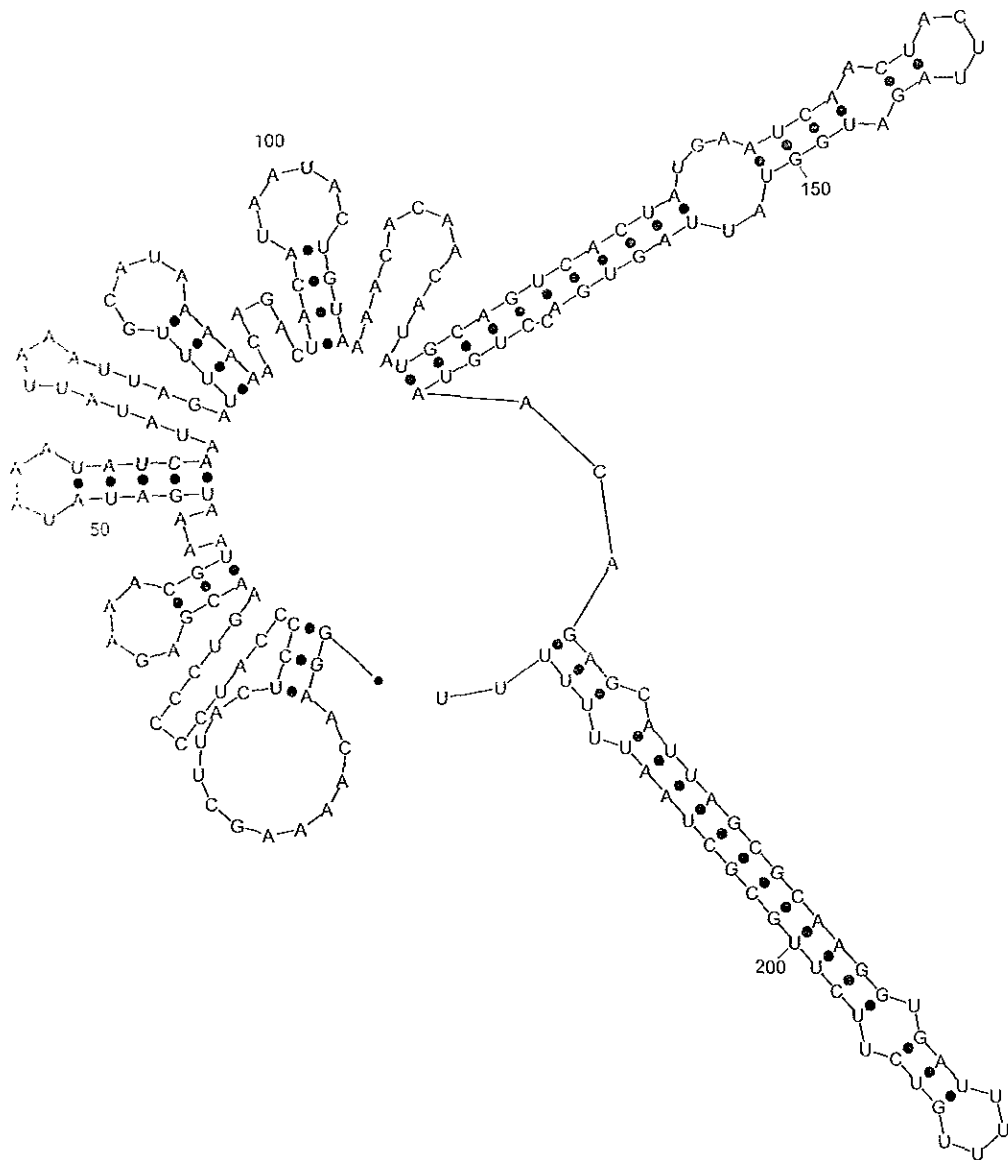
ENERGY = -103.4 Sib1_EcoRI



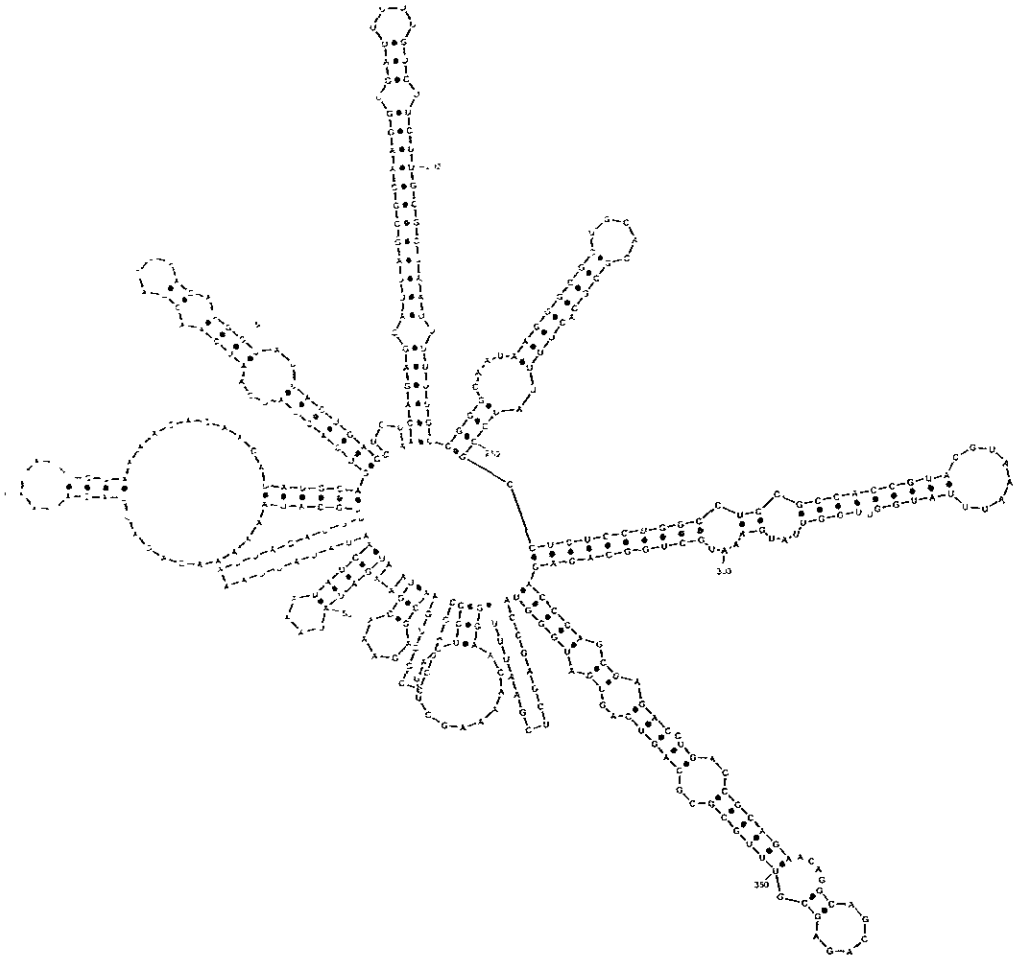
ENERGY = -42.2 tl_11



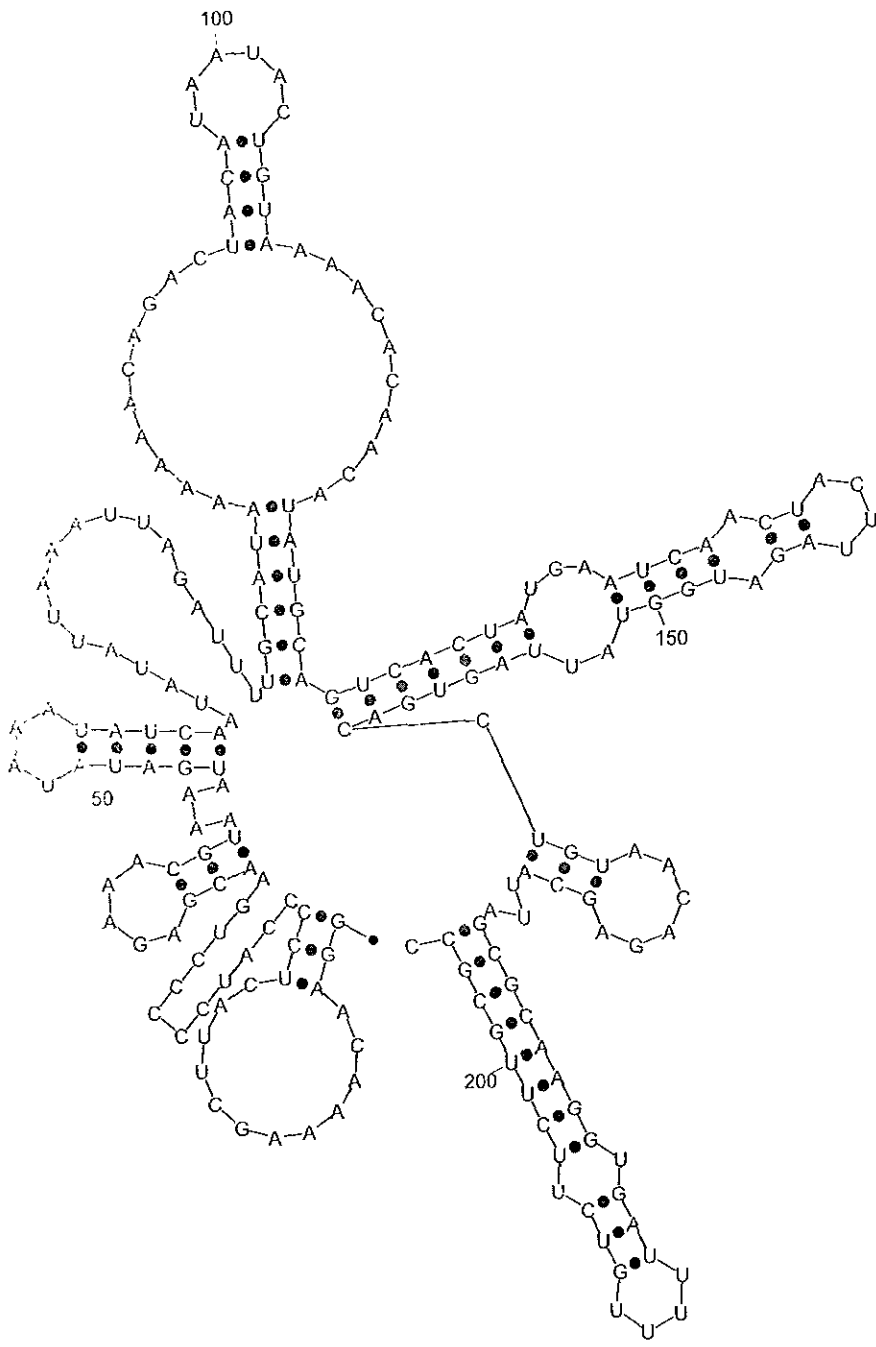
ENERGY = -102.8 11_EcoRI_



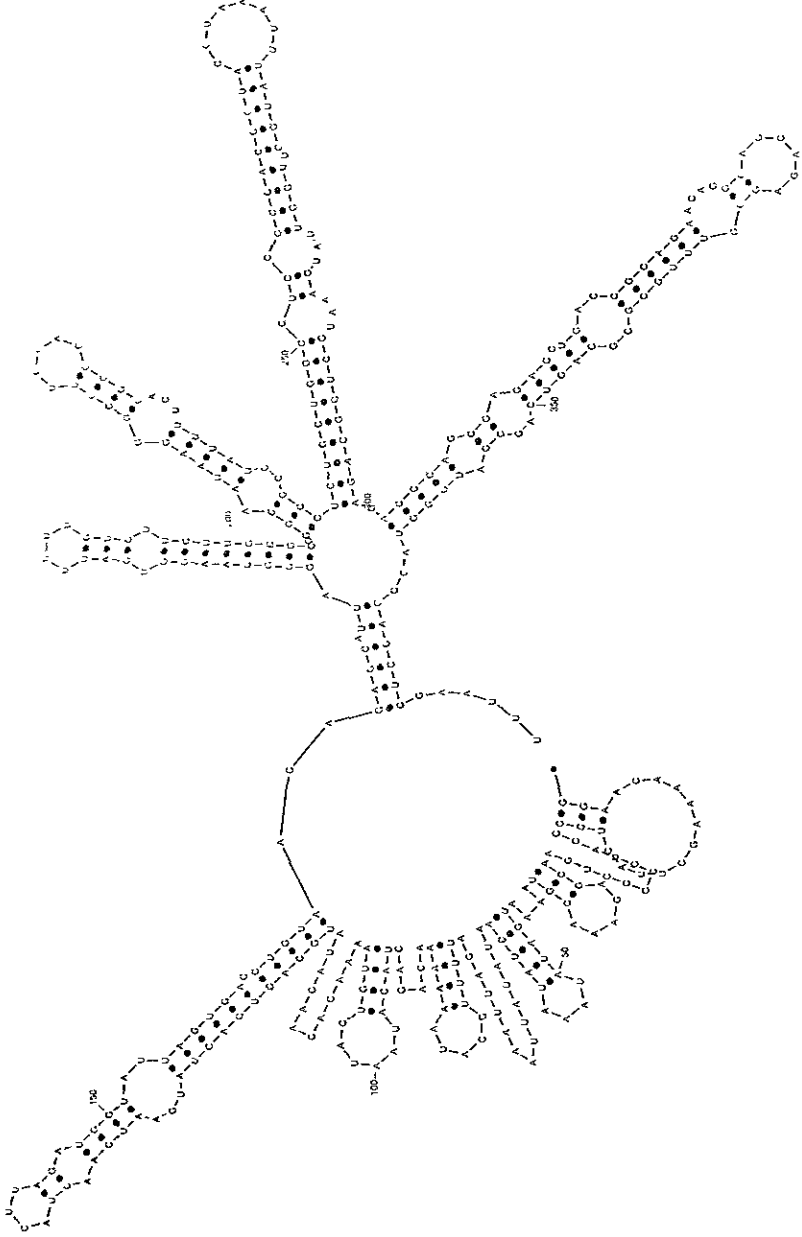
ENERGY = -42.2 tl_119



ENERGY = -98.9 119_EcoRI_

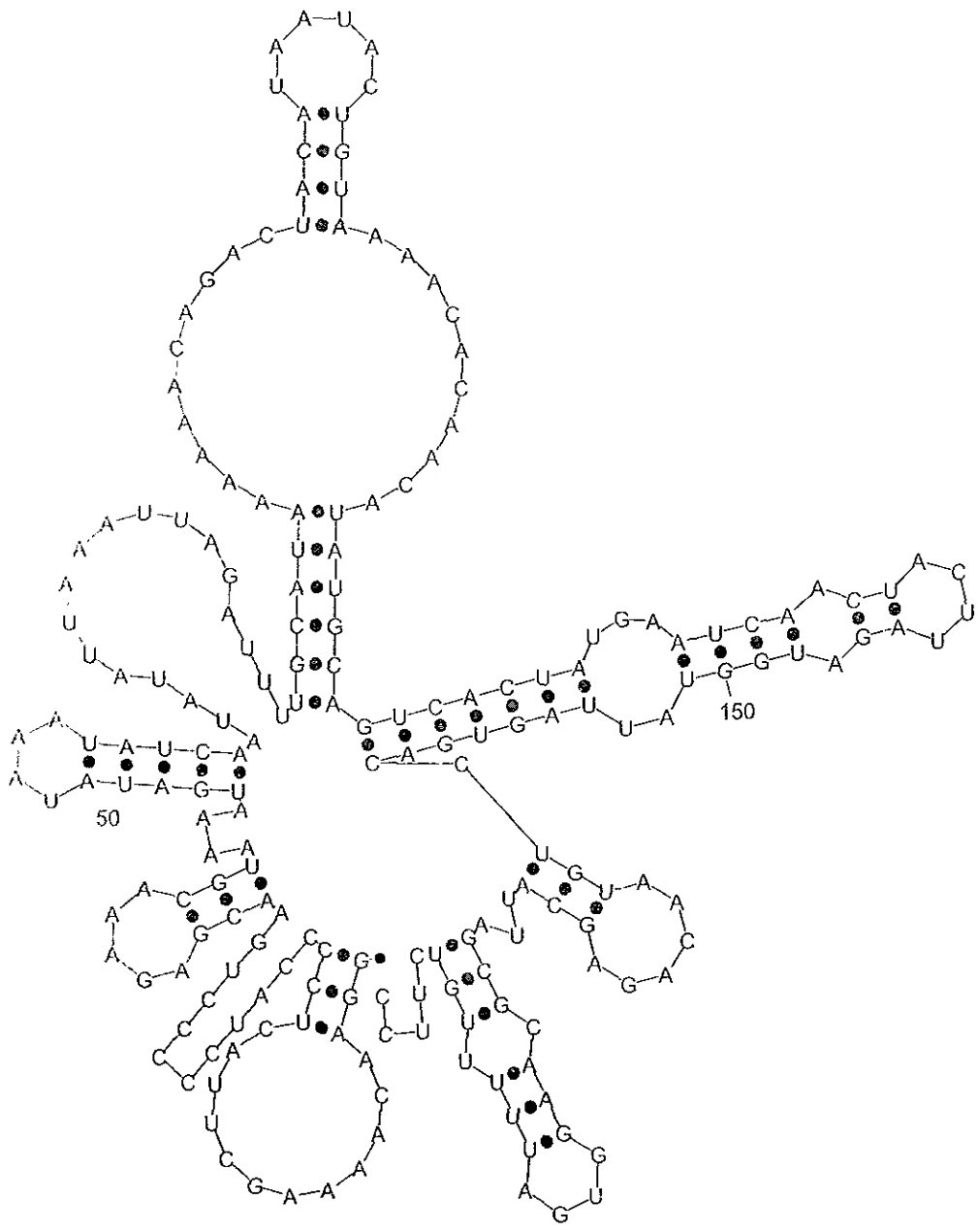


ENERGY = -36.4 tl_21

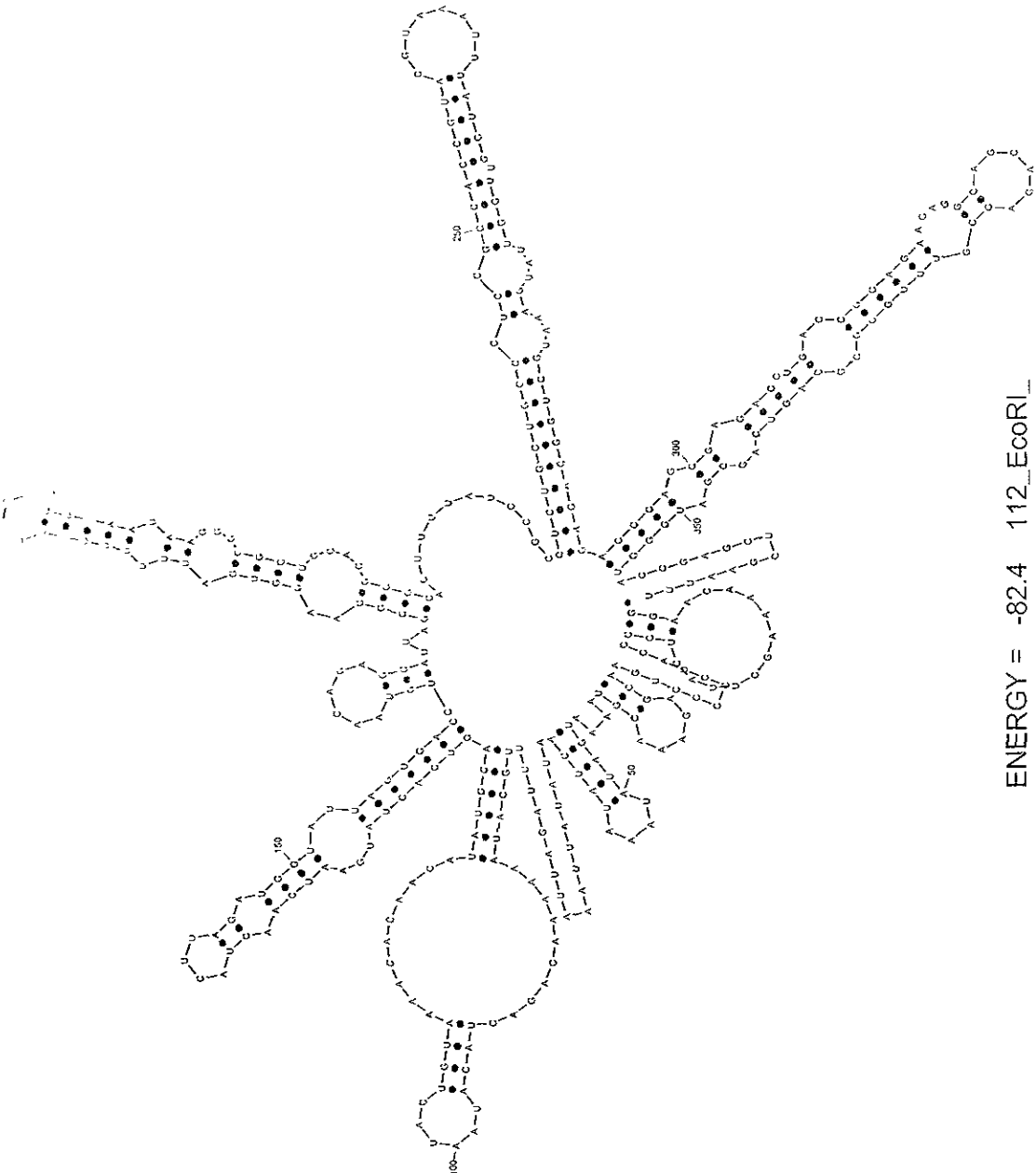


ENERGY = -91.7 21_EcoRI_

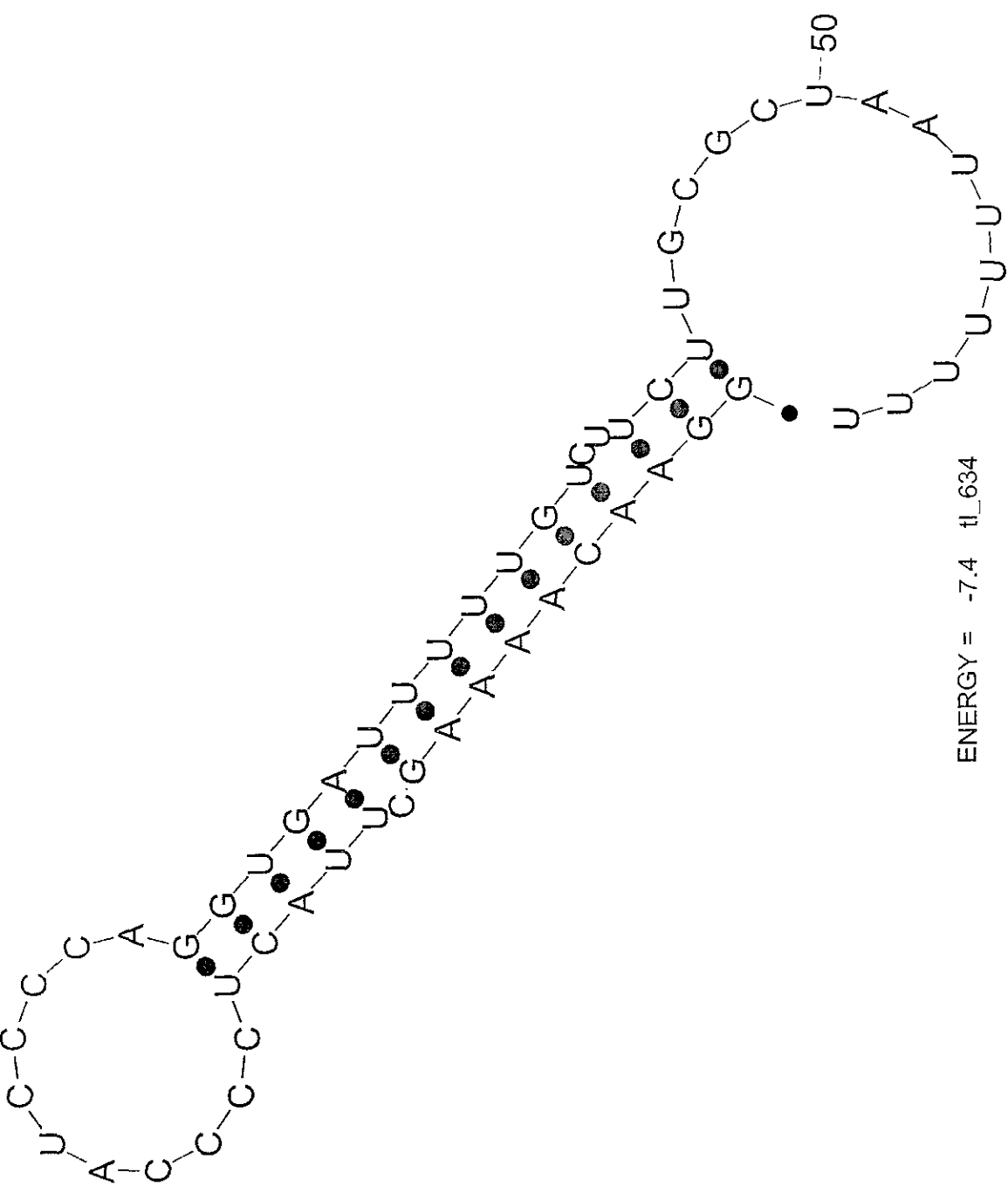
100



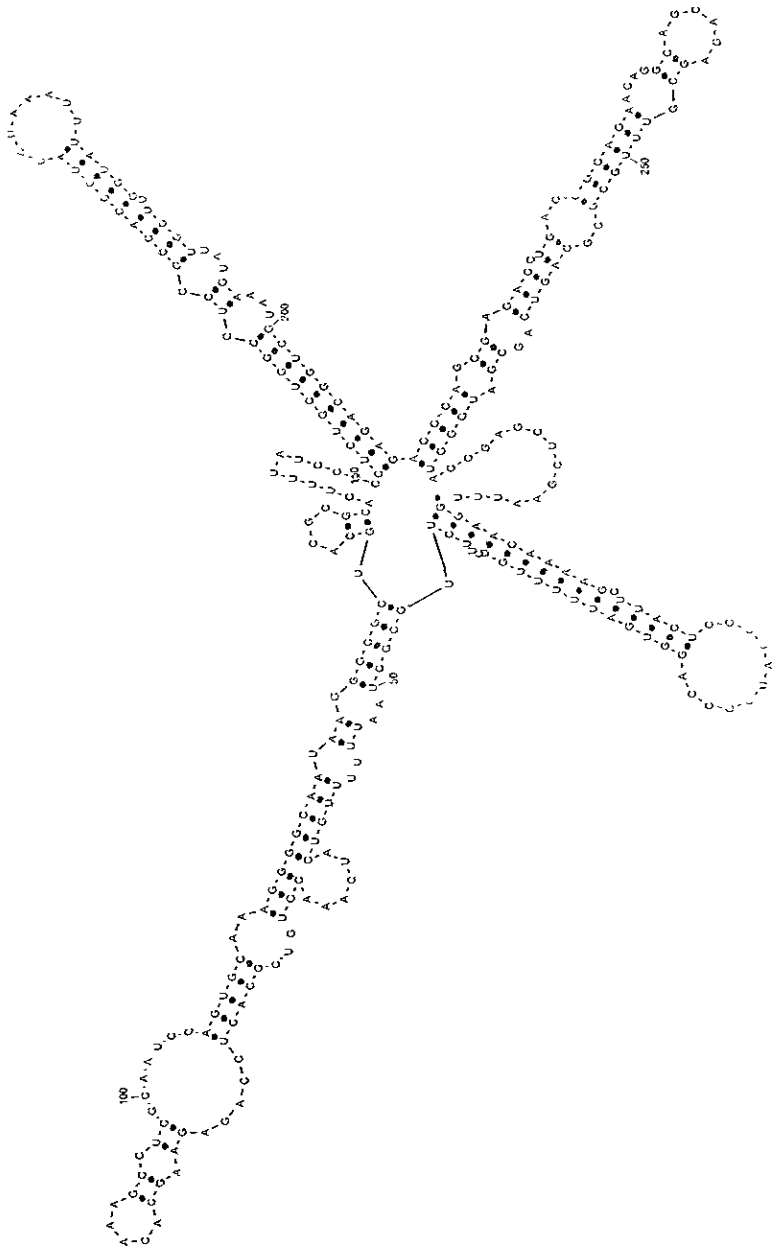
ENERGY = -26.3 tl_112



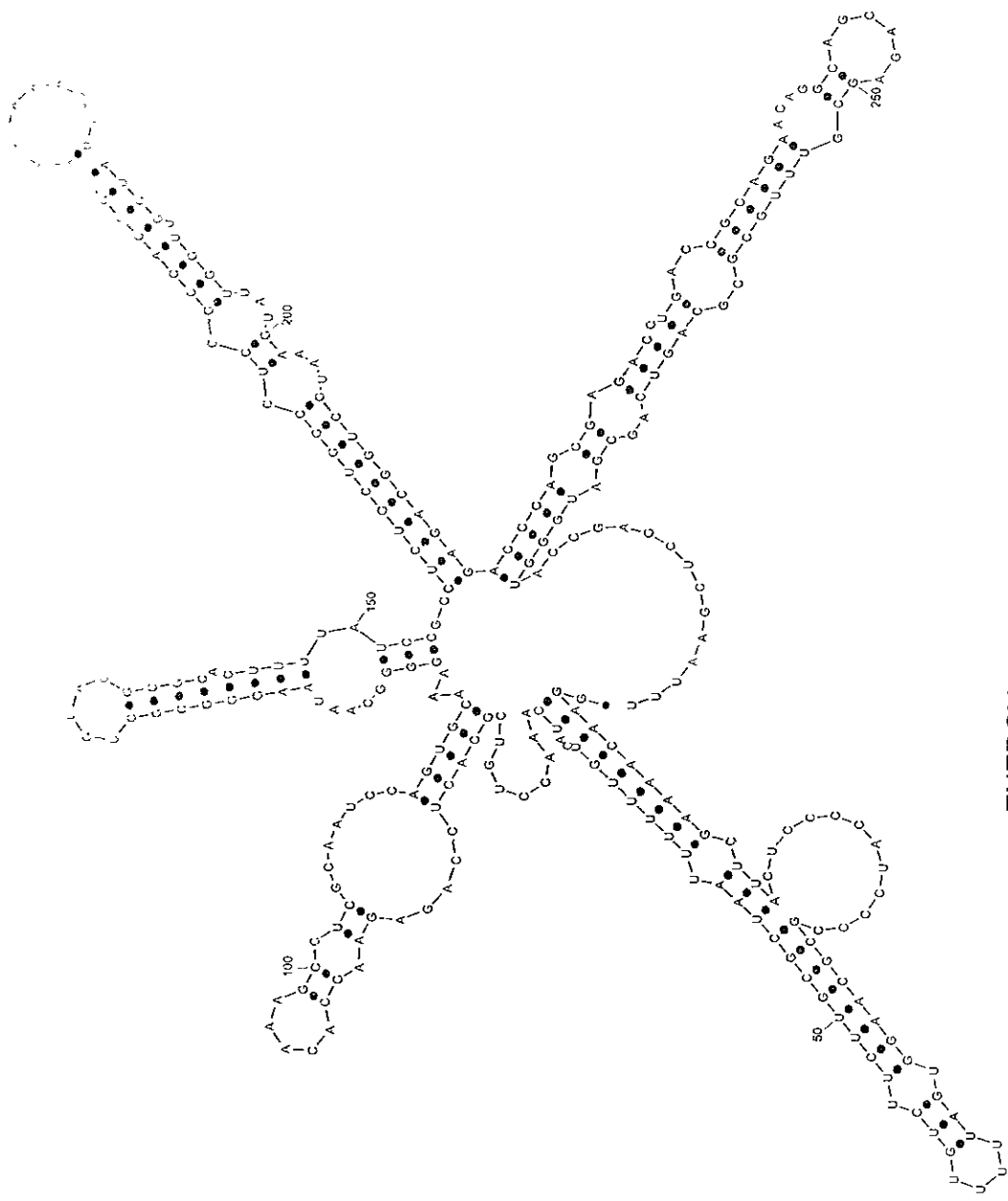
ENERGY = -82.4 112_EcoRI_



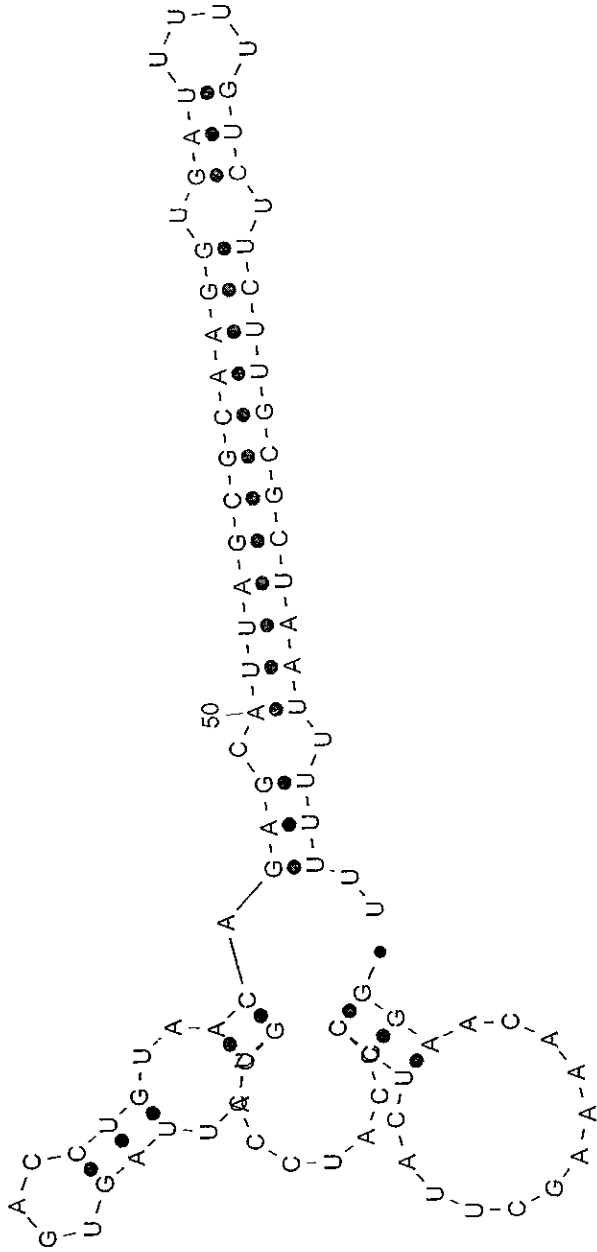
ENERGY = -7.4 tL_634



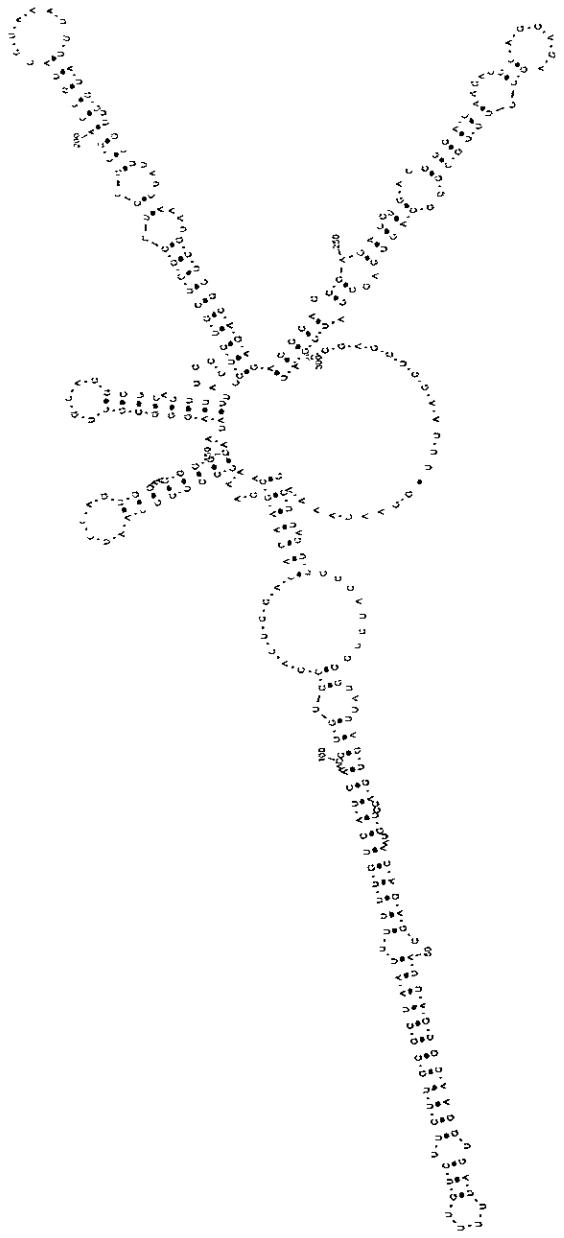
ENERGY = -73.3 634_EcoRI_



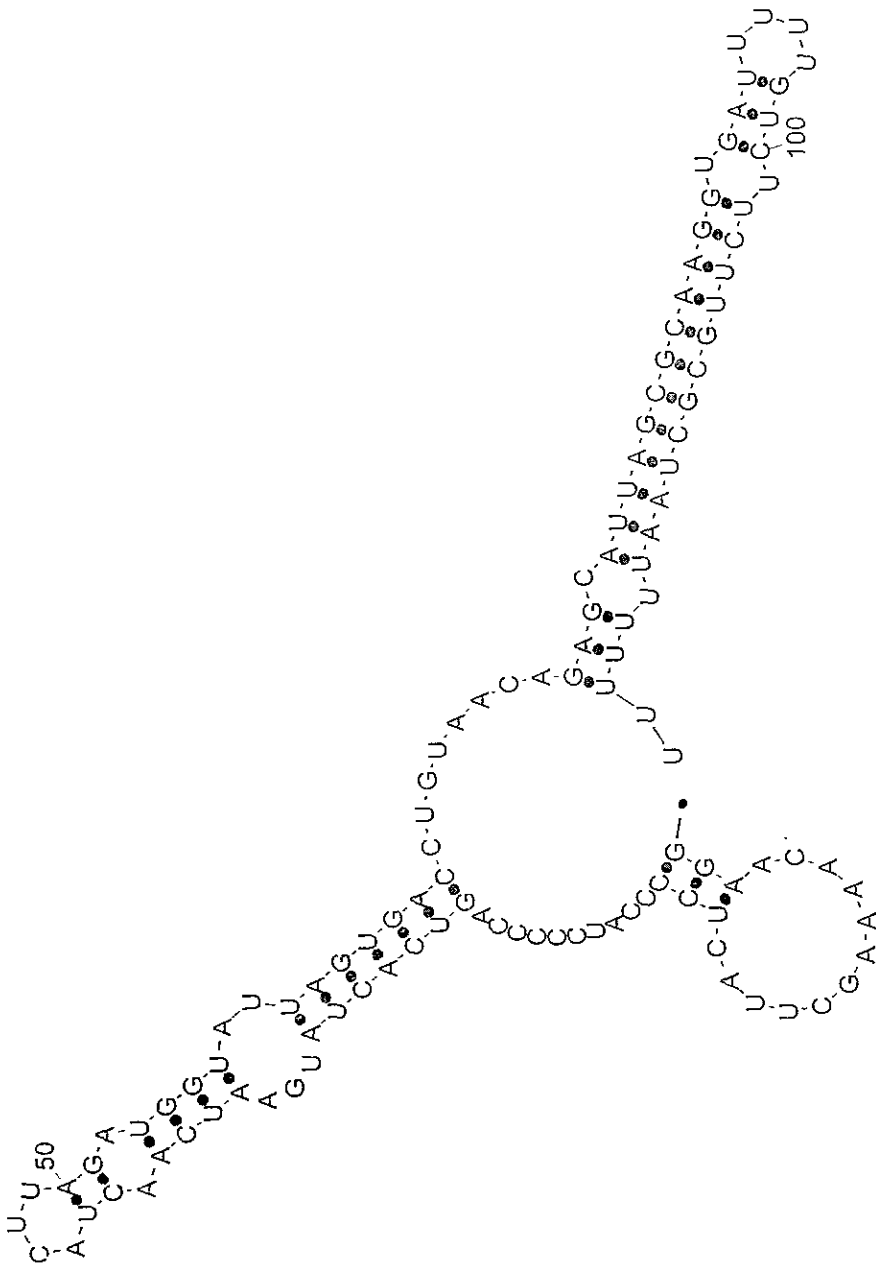
ENERGY = -80.3 635_EcoRI_



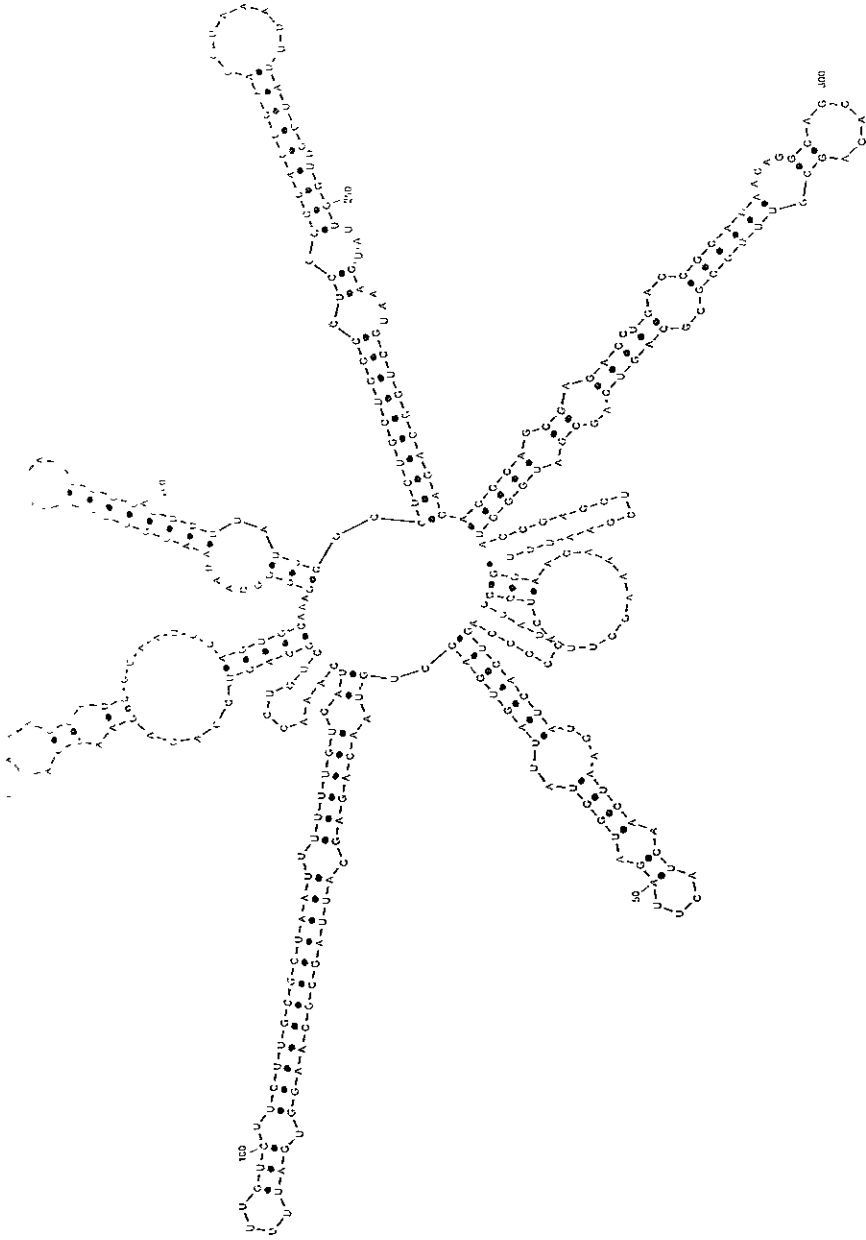
ENERGY = -21.8 tI_325



ENERGY = -89.9 325_EcoRI_



ENERGY = -31.5 tI_337



ENERGY = -99.6 337_EcoRI_