



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**CARACTERIZACIÓN DE LA REGULACIÓN
TRANSCRIPCIONAL DEL OPERÓN *LLDPRD* DE
*ESCHERICHIA COLI***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
**LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA BÁSICA**

P R E S E N T A:
BERNARDO FRANCO BÁRCENAS

DIRECTOR DE TESIS:
DR. DIMITRIS GEORGELLIS



MÉXICO, D.F

. 2005

m 345837



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.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México

A la Facultad de Medicina

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas

Al Instituto de Fisiología Celular

Al Dr. Dimitris Georgellis

Al Dr. Enrique Merino del Instituto de Biotecnología

Al Dr. Luis Servín

Al Dr. Roberto Coria

Al Dr. Roberto Hernández

Al Dr. Jesús Aguirre

Al Dr. Heliodoro Celis y Dra. Irma Romero

A la Biól. Claudia Rodríguez Rangel

Al Q. Francisco Javier de la Mora del laboratorio del Dr. Georges Dreyfus

Al Proyecto de DEGAPA IN218902-3

A mis amigos y colegas del laboratorio 226 norte

A mis padres

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el
contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: _____

FECHA: _____

FIRMA: _____

Índice

| | Página |
|---|--------|
| 1.- Resumen | 1 |
| 2.- Introducción | 3 |
| 2.1.- L-lactato deshidrogenasa | 4 |
| 2.2.- Regulación | 7 |
| 2.3.- Control por ArcB | 10 |
| 2.4.- La señal del sistema Arc | 12 |
| 2.5.- El operón <i>lldPRD</i> | 13 |
| 2.6.- La permeasa | 14 |
| 2.7.- El regulador | 15 |
| 2.8.- La deshidrogenasa | 15 |
| 2.9.- Arreglo genético | 16 |
| 2.10.- La transcripción | 17 |
| 2.11.- Regulación postranscripcional | 20 |
| 3.- Justificación | 22 |
| 4.- Objetivo | 24 |
| 5.- Hipótesis | 24 |
| 6.- Materiales y métodos | 25 |
| 6.1.- Condiciones de crecimiento | 25 |
| 6.2.- Cepas empleadas | 26 |
| 6.3.- Plásmidos empleados | 27 |
| 6.4.- Unidades de β -galactosidasa | 28 |
| 6.5.- Purificación del RNA | 28 |
| 6.6.- Obtención de las sondas para análisis tipo Northern | 29 |
| 6.7.- Hibridización tipo Northern | 30 |
| 6.8.- Construcción de las fusiones transcripcionales al gen <i>lacZ</i> e iniciadores empleados | 31 |
| 6.9.- Interrupción de <i>lldR</i> | 32 |
| 6.10.- Transducción por P1 de la interrupción de <i>lldR</i> en la cepa IFC400 | 32 |

| | |
|--|----|
| 7.- Resultados y discusión | 34 |
| 7.1.- Organización genética de los reguladores transcripcionales en el genoma de <i>Escherichia coli</i> . | 34 |
| 7.2.- En otros organismos, el operón <i>lldPRD</i> tiene el mismo arreglo | 38 |
| 7.3.- ¿Son iguales los niveles de inducción de <i>lldP</i> y <i>lldD</i> ? | 41 |
| 7.4.- Número de promotores en el operón <i>lldPRD</i> | 42 |
| 7.5.- ¿La RNasa E está involucrada en la modulación de los niveles de mRNA | 44 |
| 7.6.- Efecto de RNasa E sobre el control post-transcripcional del operón <i>lldPRD</i> | 46 |
| 7.7.- Otras mutantes de RNasas | 47 |
| 7.8.- Vida media de los mensajeros | 53 |
| 7.9.- ¿LldR activador o represor? | 55 |
| 8.- Comentarios finales | 58 |
| 9.- Perspectivas | 60 |
| 10.- Abreviaturas | 61 |
| 11.- Bibliografía | 62 |

Resumen.

La capacidad de *Escherichia coli* de crecer en L-lactato como única fuente de carbono, es posible gracias a la inducción de una deshidrogenasa (LldD) dependiente de flavin mononucleótido (FMN), que cataliza la oxidación de L-lactato en el metabolito central Piruvato. Ésta deshidrogenasa tiene 369 aminoácidos, cuyo sitio activo es, por homología en su secuencia, un barril de ocho hebras α/β para unir el sustrato unido a FMN.

El locus de *lldPRD*, que codifica para la deshidrogenasa *lldD*, está localizado en el minuto 80.1 del cromosoma de *E. coli*. La transcripción del operón es estimulada únicamente en aerobiosis por L-lactato, mientras que el D-lactato parece no tener ningún efecto.

El operón codifica además de la L-lactato deshidrogenasa, una permeasa (LldP) que permite la entrada del metabolito, utilizando la fuerza protón motriz, y es una proteína transmembranal de 551 aminoácidos, y es responsable de la entrada a la célula del enantiómero D-lactato y glicolato; y un regulador transcripcional (LldR), de 258 aminoácidos, perteneciente a la familia de GntR y con un dominio de unión a DNA hélice-vuelta-hélice. De los tres genes (*lldP*, *lldR* y *lldD*) destaca el hecho de que están traslapados, el regulador de la transcripción está entre los genes *lldP* y *lldD*.

En la mayoría de los operones, la región codificante del regulador transcripcional esta en una posición divergente a los genes que regula o en otra ubicación del genoma del organismo y generalmente su regulación es independiente a la que tienen sus genes blanco. Por otro lado, el operón *lldPRD* tiene una regulación adicional por el sistema de dos componentes ArcA/B, reprimiendo su transcripción durante la micro aerobiosis. Este sistema es activado en micro aerobiosis y regula la actividad de más de 100 operones, siendo lo mas sobresaliente la represión de numerosas enzimas del metabolismo aeróbico (destacan las enzimas encargadas del transporte de electrones, del ciclo de los

ácidos tricarbónicos y de regular la poza de glioxilato) y activa, a su vez, algunas de las enzimas del metabolismo fermentativo (como la piruvato formato liasa y la hidrogenasa I).

En este trabajo se describe el modo de regulación para el operón *lldPRD* de *Escherichia coli*. Destacan cuatro elementos importantes: el primero, es que es controlado por un único promotor río arriba del inicio de la transcripción de la L-lactato permeasa (el primer gen del operón). Segundo, se encontró que la Endoribonucleasa E inactiva el mRNA del regulador (*lldR*) e inicia el proceso de degradación; ello constituye el principal punto de control del operón. Tercero, el procesamiento post-transcripcional del mRNA determina la dosis de cada uno de los genes necesarios para llevar a cabo la internalización del L-lactato y llevar a cabo su conversión en Piruvato, ya que el mRNA de la L-lactato deshidrogenasa tiene una vida media más larga que el mRNA de *lldP*. Cuarto, el operón es autorregulado positivamente por *lldR*, activador transcripcional dependiente de L-lactato.

Introducción.

En organismos facultativos como *Escherichia coli*, los componentes de la red de transporte de electrones están organizados de tal forma que siempre sea utilizada aquella que resulte más favorables en términos energéticos, y para las condiciones de crecimiento en un momento determinado. Con esta base, el metabolismo de *E. coli* tiene tres niveles jerárquicos: el primero, corresponde a las vías respiratorias que conducen el flujo de electrones al oxígeno; el segundo, en ausencia de oxígeno pueden usarse nitrito o fumarato, y tercero, el uso de N-óxido de trimetilamina como aceptor de electrones, usando a la menaquinona como molécula adaptadora de la transferencia de electrones. Una de las principales razones por las cuales se sigue una vía u otra es la diferencia en los potenciales redox de las moléculas involucradas; el oxígeno es el que tiene el potencial más elevado (~800 mV), y después se encuentran los aceptores alternos, como son el nitrato (~420 mV), dimetilsulfóxido (~130 mV) y finalmente el fumarato (~30 mV).

La cadena respiratoria bacteriana puede oxidar un gran número de metabolitos. En el caso del crecimiento aeróbico de *E. coli*, se conocen diversas deshidrogenasas capaces de transferir electrones de esos sustratos a acarreadores de electrones adyacentes, y por consiguiente, la reducción de los citocromos disponibles. La transferencia de electrones se conoce ahora gracias a extensos estudios tanto bioquímicos como genéticos (Ingledey y Poole 1984).

Además, se sabe que ocurren grandes cambios en la composición de las proteínas que son parte de la membrana de *E. coli* que acompañan la transición de metabolismo aeróbico a anaeróbico, y el cambio más evidente es en cuanto al contenido de citocromos en la presencia de oxígeno, o bien, cuando están presentes aceptores alternos de electrones como son el fumarato, nitrato, nitrito, dimetilsulfóxido u óxido de trimetilamonio [1]. Los eventos de regulación genética y bioquímica permiten los cambios enzimáticos requeridos en dichas

transiciones y la adaptación a los cambios ambientales, en particular a los cambios en el contenido de nutrientes del medio circundante.

L-lactato deshidrogenasa.

El crecimiento de *E. coli* en un medio con L-lactato como fuente de carbono es posible gracias a la inducción de una enzima, la L-lactato deshidrogenasa (LldD), que es capaz de catalizar la oxidación del L-lactato en piruvato (Figura 1). Este proceso se llama “independiente de NAD⁺” pero dependiente de FMN. Para esa reacción en particular se desconoce el proceso reverso (caracterizado bioquímicamente), ya que existen dos enzimas (EC 1.1.1.27 y EC 1.1.1.28), también llamadas L y D- lactato deshidrogenasa, pero que la reacción que catalizan es la reducción del piruvato en L-(+) o D-(+) lactato (respectivamente) y es la principal vía para regenerar NAD⁺ ya que consume un NADH por reacción (Tarmy y Kaplan 1965; Tarmy y Kaplan 1968).

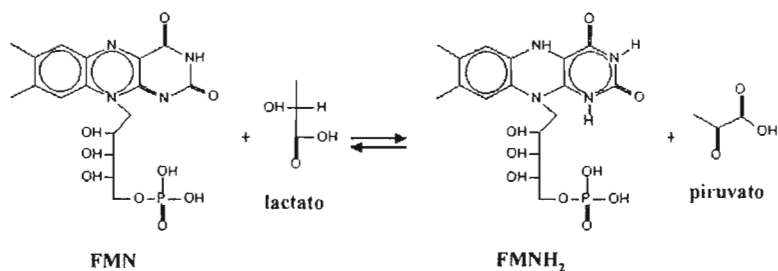


Figura 1. Reacción catalizada por la L-lactato deshidrogenasa de membrana, LldD.

Futai y Kimura demostraron que la actividad de L-lactato deshidrogenasa (LldD) en *E. coli* depende puramente de las condiciones de crecimiento, dando una inducción de 20 a 100 veces en presencia de D y L-lactato en aerobiosis, respecto al crecimiento en aerobiosis en presencia de glucosa o glicerol. El resto de las deshidrogenasas analizadas en ese trabajo, como la NADH deshidrogenasa, D-lactato deshidrogenasa y la succinato deshidrogenasa, no mostraron el mismo

comportamiento que LldD a excepción de la succinato deshidrogenasa, que también es regulable; esta última se encuentra ausente en anaerobiosis y su inductor es el succinato, lo cual implica que no son reguladas del mismo modo todas las enzimas respiratorias de las membranas de *E. coli* teniendo como principal diferencia entre ellas que unas son constitutivas mientras que otras son inducibles (Futai y Kimura 1977).

En otro reporte se describió que la enzima está totalmente ausente en crecimiento fermentativo aún en presencia del L-lactato, en contraste con la alta concentración que hay durante el crecimiento oxidativo (Nishimura 1983.). Todo ello apuntaba a que la LldD está sujeta a una estricta regulación y que su expresión es inducible en presencia de L-lactato, lo que constituye un componente adaptativo del metabolismo de *E. coli* y que posee una estricta regulación para llevar a cabo una función metabólica.

Otra cualidad que llama la atención de la LldD es la especificidad con la que ocurre su inducción, y es que la expresión es dependiente de L-lactato; otros metabolitos no tienen efecto en el aumento de su concentración en las membranas de *E. coli* (Futai y Kimura 1977; Nishimura 1983.).

Una característica también importante de LldD es que su inducción es rápida, ya que cuando un cultivo de *E. coli* se transfiere a un medio conteniendo D y L-lactato, en un tiempo de $\frac{1}{4}$ de generación, es posible detectar la actividad de la enzima. Si a esas células se le inhibe la síntesis de proteínas (usando un agente como el cloranfenicol), se bloquea por completo esa inducción.

Esto demuestra algo importante: la actividad enzimática detectada de LldD en preparaciones de membranas de *E. coli* no se debe a una modificación por el sustrato sobre la enzima, como un cambio conformacional; si no a su síntesis *de novo* por la presencia del inductor (Futai y Kimura 1977).

En ensayos de purificación y caracterización de la enzima (Futai y Kimura 1977), se pudieron determinar varias de sus propiedades y parámetros bioquímicos. Un elemento importante al hacer la purificación de la proteína, es que era necesario hacer una solubilización, lo cual se atribuye a que su localización es membranal, corroborando su papel en el transporte de electrones. Con esa purificación parcial de la enzima se pudieron determinar algunos de los principales parámetros catalíticos, entre los que destacan un pH óptimo en el intervalo de 8-9, tiene un punto isoeléctrico de 8.3 y es inhibida por el producto formado (piruvato).

Es interesante notar que el peso molecular estimado en estos primeros ensayos fue de 43 kDa, cuando se elimina el detergente de la preparación, la enzima oligomeriza. En contraste, la D-lactato deshidrogenasa (que lleva a cabo la conversión de D-lactato a piruvato), consiste en una enzima de 71 kDa, también localizada en la membrana. Las diferencias estructurales más importantes entre estas dos enzimas es que LldD contiene un Flavin Mononucleótido (FMN), mientras que la D-lactato deshidrogenasa contiene una molécula de Flavin Adenindinucleótido (FAD) acoplados ambos cofactores de modo no covalente (Tanaka, Anraku et al. 1976; Futai y Kimura 1977).

En los primeros estudios de LldD, fue posible determinar que se localiza en membrana. Esto se hizo empleando anticuerpos específicos contra la enzima purificada y así bloquear su actividad en membranas internas invertidas, lo cual sostenía que su principal localización es en membranas y mira viendo hacia el citoplasma (Futai y Kimura 1977).

Otra cualidad importante es que el metabolismo de L-lactato está acoplado al gradiente electroquímico. Cuando se bloquea la actividad de LldD, también inhibido el transporte de solutos dependiente de gradiente electroquímico, así como la respiración. Por lo tanto, LldD tiene un papel destacado durante la respiración de *E. coli*. Al tratar de localizar la enzima en preparaciones de membranas de células crecidas en ausencia de oxígeno o de L-lactato o de ambas,

no era posible encontrar ni la actividad ni la inhibición del consumo de oxígeno por estas membranas, lo cual confirma el control estricto de la enzima LldD, ya que cuando se determina el contenido total de enzima presente cuando es inducida por L-lactato, es aproximadamente el 3% de las proteínas totales en membranas de *E. coli* (Futai y Kimura 1977).

Junto con la inducción de LldD, aparentemente se incrementa también la síntesis de las enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, resultando en niveles elevados de hemos y protoporfirinas (Doss y Philipp-Dormston 1973; Doss y Philipp-Dormston 1974), lo que contribuye a la importancia que esta enzima tiene durante el metabolismo aeróbico y su relación con otros sistemas metabólicos.

Regulación.

Una de las primeras evidencias que involucraban una modulación de la expresión de la LldD por un regulador global, se describió por Iuchi S. y Lin E. C. C. (Iuchi y Lin 1988). En ese trabajo se demostró que una mutación en el gen ArcA (cuya localización en el genoma de *E. coli* es en el minuto cero) elevaba los niveles de expresión de numerosas enzimas del metabolismo aeróbico durante la anaerobiosis. A este gen también se le llamaba *dye* (colorante) por la sensibilidad que las mutantes presentan a ciertos colorantes que tienen un efecto oxidante, como es el caso del azul de toluidina (Iuchi y Lin 1988).

Es importante destacar el hecho de que todas aquellas enzimas reguladas por ArcA tienen como aceptor final de electrones la ubiquinona-8, forma de quinona sólo presente en la respiración, mientras que las formas más abundantes durante la anaerobiosis son la Menaquinona-8 y demetilmenaquinona-8 (Georgellis, Kwon et al. 2001). El modo de detectar mutaciones en ArcA fue a través de la construcción de un gen reportero, que consistió en unir el promotor de la succinato deshidrogenasa con la β -galactosidasa y monitorear los cambios en la actividad de esa enzima en las transiciones de aerobiosis-anaerobiosis. Con ese

sistema se pudo identificar una mutante que tenía mayor actividad (10 veces) en anaerobiosis, así como un número importante de enzimas del metabolismo aeróbico activadas cuando normalmente se encontraban reprimidas durante la anaerobiosis (Iuchi y Lin 1988).

De las enzimas cuyo aumento es considerable en la mutante de ArcA, se encuentran las relacionadas con el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, como son la citrato sintasa, aconitasa, isocitrato deshidrogenasa, 2-oxoglutarato deshidrogenasa y la malato deshidrogenasa (Liu y De Wulf 2004).

Existen enzimas que utilizan a la ubiquinona-8 como aceptor intermediario de electrones como son la LldD, sobre la cual cabe señalar que la represión en anaerobiosis es muy elevada, una diferencia de casi 10 veces respecto a la silvestre; la formato deshidrogenasa y la D-aminoácido deshidrogenasa; todas ellas son reprimidas en presencia de ArcA, pero en la mutante mostraban niveles muy elevados de expresión durante la anaerobiosis, incluso en algunos casos mayor al de la cepa silvestre.

Es importante mencionar que las enzimas que tienen un papel fundamental en el metabolismo anaeróbico, como son el caso de la fumarato, nitrato y N-óxido de trimetilamina reductasas, no fueron afectados los niveles de su actividad, lo cual sugiere que la principal función de ArcA es la de inactivar enzimas del metabolismo aeróbico durante la anaerobiosis y quizá activar un reducido número de enzimas importantes en el metabolismo anaeróbico (Iuchi y Lin 1988).

Por todas las enzimas del metabolismo aeróbico que se ven afectadas por la mutación en *dye* fue que se le asignó el nombre de ArcA, acrónimo de Aerobic Redox Control (control de redox aeróbico). Y así también se propuso llamarle modulón al control general que ejerce ArcA sobre los diferentes niveles del metabolismo celular de *E. coli*, ya que varias de las enzimas que regula ArcA no están sometidas al mismo estímulo, como es el caso de la LldD, la 3-hidroxiacil

CoA deshidrogenasa y la D-amino ácido deshidrogenasa, que son inducidas por el L-lactato, oleato y L-alanina respectivamente (Iuchi y Lin 1988).

Un argumento más para hablar del control mediado por ArcA es el hecho de que las mutantes en este gen ven afectadas múltiples proteínas de la membrana celular.

La secuencia del gen *arcA* reveló varias características importantes (Drury y Buxton 1985). La primera de ellas, es que el efecto pleiotrópico observado en las mutantes puede deberse a que la secuencia de aminoácidos de ArcA es muy similar a OmpR (28% de homología parcial, en particular con el dominio de unión a DNA), lo cual permite decir que se trata de un factor transcripcional.

OmpR es el factor transcripcional que se encarga de la expresión de dos proteínas importantes de la membrana externa, OmpC y OmpF. El primero, OmpC, codifica para una porina que transporta solutos hidrofílicos, mientras que OmpF permite el transporte de solutos menores a 600 Da, con cierta preferencia por los sustratos catiónicos (Hall y Silhavy 1981; Hall y Silhavy 1981).

Con la secuencia de nucleótidos obtenida, se dedujo que ArcA es una proteína de 27 346 Da (258 aa) y que además, su localización es citoplásmica, reforzando su papel a nivel transcripcional. Con todo ello, se tiene ahora una imagen clara del modo de control por el sistema Arc y la modulación de las enzimas del metabolismo aeróbico son reprimidas durante la anaerobiosis mediante la unión de ArcA al DNA.

Otros efectos observados en la mutante de ArcA son la pérdida de expresión del factor sexual F (para los eventos de conjugación), aumento en la resistencia a clorato, pérdida de la expresión de la fosfatasa alcalina y la sensibilidad a ciertos colorantes y antibióticos.

Por todo ello, es que en LldD la inducción observada es dependiente de la síntesis de proteína *de novo*. Y no solo los niveles de la LldD eran un indicio de esto, sino también por las variaciones en los niveles transcripcionales que se observaron en la fusión con la succinato deshidrogenasa. En conjunto, fue posible desarrollar una idea más clara de cómo es que ArcA funciona como un regulador pleiotrópico o modulón.

Control por ArcB.

ArcB es otro gen necesario para el control de las enzimas del metabolismo aeróbico, y que permite la transición al metabolismo anaeróbico. Analizando mutaciones adicionales que afectaran en *trans* respecto al fenotipo ya identificado con ArcA, se encontró una segunda mutación que una vez localizada en el genoma en el minuto 69.5, presentaba los mismos efectos generalizados en el crecimiento de *E. coli*, así como aquellos relacionados con las funciones de conjugación, control de la replicación de ciertos plásmidos, una sensibilidad a colorantes (azul de toluidina) y a antibióticos (Iuchi, Cameron et al. 1989). Las mismas enzimas que se observaron reguladas positivamente durante la anaerobiosis en la mutante en ArcA, también se observaron en la mutante de ArcB, destacando sobre todo la LldD y la ubiquinol oxidasa ambas con un mayor incremento respecto a la mutante en ArcA.

En ensayos de complementación se determinó que al igual que ArcA, ArcB tiene un efecto negativo sobre la activación de las enzimas del metabolismo aeróbico durante la anaerobiosis. Ello llevó a proponer al sistema ArcA/B como un sistema de dos componentes en el que ArcB tiene como papel percibir un estímulo y ArcA el de factor transcripcional que activa genes necesarios para responder a esa señal en particular (Iuchi, Cameron et al. 1989).

Toda la regulación observada en las mutantes del sistema ArcA/B es independiente de represión catabólica, lo cual hace una distinción importante entre el control por metabolitos y la transición de aerobiosis a anaerobiosis. Existen dos

casos en los que no se sobreponen las funciones: la succinato deshidrogenasa al igual que la citrato sintasa son dos enzimas que son reguladas por represión catabólica, además de la regulación negativa de la que son objeto durante la anaerobiosis. En células crecidas en presencia o ausencia de cAMP, pero en presencia de glucosa, la represión catabólica ocurría normalmente para la succinato deshidrogenasa, haciendo evidente que el sistema Arc opera de modo independiente de la represión catabólica.

Finalmente, se han caracterizado los elementos que comprenden este sistema. ArcB es una cinasa unida a la membrana por dos cruces transmembranales y un dominio periplásmico de 16 aminoácidos. Esto último es atípico, ya que el modelo general de cinasas presentan un dominio periplásmico mayor, donde se cree se recibe la señal, la cual estimula la autofosforilación dependiente de ATP. Es una proteína de 778 aa y tiene un dominio fosfotransmisor primario con una caja de unión a ATP y una histidina conservada en la posición 292 que cataliza la reacción de autofosforilación.

Tiene además un arreglo no ortodoxo, en el cual se encuentra un primer dominio fosfoaceptor (con un residuo de aspartato conservado en la posición 576) y un segundo dominio fosfotransmisor (con un residuo de histidina conservada en la posición 717). Este arreglo es atípico entre las cinasas, ya que generalmente tienen un solo dominio fosfotransmisor, y se ha llamado tripartita (Iuchi, Matsuda et al. 1990). El segundo dominio receptor se encuentra en el amino terminal de la proteína ArcA (donde es fosforilado en la posición 54, en un residuo de aspartato), el cual una vez fosforilado lleva a cabo su función efectora (Iuchi, Matsuda et al. 1990). Dos estudios posteriores demostraron que la vía fisiológica de transmisión del grupo fosforilo es a través del fosforelevo en los tres dominios de la cinasa ArcB hasta fosforilar al regulador de respuesta [17,18].

Se ha demostrado tanto *in vitro* (Georgellis, Lynch et al. 1997) como *in vivo* (Kwon, Georgellis et al. 2000) que la única ruta posible de la transmisión de la señal en el sistema de Arc es la siguiente: en condiciones reductoras, ArcB se

autofosforila (reacción que consume ATP), para luego transfosforilar por un fosforelevo de His²⁹²→Asp⁵⁷⁶→His⁷¹⁷→Asp⁵⁴ a ArcA y éste lleva a cabo su función como factor transcripcional reprimiendo enzimas requeridas en el metabolismo aeróbico o activando enzimas necesarias en el metabolismo anaeróbico.

La señal del sistema Arc.

Georgellis et al, describieron por primera vez cuál es el estímulo que controla el sistema Arc (Georgellis, Kwon et al. 2001). Demostraron que la actividad de cinasa de ArcB es silenciada por la forma oxidada de las quinonas (ubiquinona 8, que es la principal quinona presente durante el crecimiento aeróbico de *E. coli*). Cuando *E. coli* cambia de metabolismo aeróbico a anaeróbico, la forma reducida de las quinonas permite que ArcB active su capacidad de cinasa e inicie la activación de ArcA mediante el fosforelevo previamente mencionado, por lo que las quinonas actúan como una señal negativa que inhibe la función de cinasa de ArcB durante el crecimiento aeróbico, pero en la anaerobiosis, el principal metabolito que estimula la actividad de cinasa es el D-lactato, contribuyendo en la diferencia entre ambos metabolismos (Rodríguez, Kwon et al. 2004).

Adicionalmente, se demostró (Malpica, Franco et al. 2004) que la señal inhibitoria es recibida en la región “linker” de la cinasa ArcB y no en el dominio periplásmico que consta de sólo 17 aminoácidos (Kwon, Georgellis et al. 2000) como ocurre para otras cinasas.

La actividad de cinasa es silenciada por la formación de dos puentes bisulfuro citoplásmicos, los cuales obtienen el poder redox de las quinonas oxidadas para formarse; y el poder oxidante de otros agentes químicos no tienen efecto sobre la actividad de cinasa, lo que hace a ArcB sumamente específica para la señal a la que responde; a diferencia de otras proteínas que tienen mecanismos similares, pero pueden activarse o inhibirse en respuesta a distintos agentes

oxidantes, como es el caso de OxyR (Zheng, Aslund et al. 1998; Choi, Kim et al. 2001). Los enlaces bisulfuro se disocian rápidamente durante la anaerobiosis lo que lleva a una respuesta inmediata. Este es un mecanismo muy simple pero muy eficiente que hace el vínculo entre la respiración y el control transcripcional de las enzimas del metabolismo aeróbico y anaeróbico.

El operón lldPRD.

El operón *lldPRD* es parte del modulón controlado por el sistema ArcA/B en *E. coli*, y su estudio ha sido de suma importancia para entender el modo de control que tiene ArcA sobre sus genes blanco. La represión mediada por el sistema de ArcA/B resulta un excelente reportero de la actividad de cinasa de ArcB.

A partir de los datos genéticos resultaba de suma importancia conocer la secuencia del operón, lo que permitiría profundizar los estudios de los sitios de unión del regulador de respuesta ArcA-P y poder extender ese conocimiento en otros genes potencialmente regulados por este sistema.

Para obtener la secuencia del operón, se generó una mutante incapaz de crecer en L-lactato y que no estuviera afectada la regulación de otras enzimas, ya que probablemente se hubiese afectado al regulador ArcA o ArcB junto con la enzima de interés. Mediante un transposon se obtuvo una mutante que no fuera capaz de crecer en L-lactato como única fuente de carbono (Dong, Taylor et al. 1993). Además de interrumpir al operón usando un gen de resistencia a un antibiótico, el transposon contiene un gen de β galactosidasa, generando un modo de medir su expresión. Se encontró que esa mutante, denominada ECL 525, los niveles de β galactosidasa son incrementados en aerobiosis y en presencia de L-lactato confirmando la naturaleza inducible de esa enzima; adicionalmente, descartaron la inducción por D-lactato, ya que usando una forma pura de D-lactato no pudieron detectar niveles superiores a la basal de inducción en medio mínimo, lo cual sugiere además que es sumamente específica la respuesta al L-lactato.

En este estudio, la integración del transposon ocurrió en una región del genoma previamente caracterizada, en la que se encuentran los operones *xyl*, *mil* y *lct* en el minuto 80.8 del genoma de *E. coli* (Lin y Hill 1983; Dong, Taylor et al. 1993). Haciendo uso de un plásmido que contiene parte de una biblioteca de genes de *E. coli*, se pudo complementar la mutación causada por el transposon, recuperando el fenotipo silvestre tanto de transporte del metabolito L-lactato como de los niveles enzimáticos de la LldD. Esto, también permitió saber que en el plásmido se encontraban clonados al menos los dos genes estructurales tanto de la L-lactato permeasa como el de la L-lactato deshidrogenasa.

La secuencia reveló tres marcos de lectura abierta (ORF). El primero, corresponde a la L-lactato permeasa (*lldP*); el segundo, es un factor transcripcional (*lldR*) y el tercero, es la L-lactato deshidrogenasa (*lldD*). El operón completo fue clonado en un fragmento de 6,632 pares de bases, del cual *lldP* tiene 1,653 pares de bases, *lldR* 774 pb y finalmente *lldD* 1,107 pb.

La permeasa.

El producto de *lldP* es una proteína de 551 aa. El análisis de hidrofobicidad sugiere que es una proteína que cruza doce veces la membrana plasmática. En estudios posteriores (Nunez, Kwon et al. 2002), se determinó que el transporte de L-lactato, D-lactato y en menor grado de glicolato ocurre a través de *lldP* y *glcA*. Esta actividad depende del gradiente electroquímico, ya que en ensayos de transporte, es inhibida (cerca del 92%) en presencia de CCCP, el cual es un potente conductor de protones hidrofóbico y que es capaz de colapsar el gradiente electroquímico.

Un aspecto interesante, es que el transportador específico de glicolato y *lldP* tienen una afinidad por D y L-lactato y glicolato muy semejante, aunque en buena medida, cada uno de los transportadores tiene mayor eficiencia en

concentrar el sustrato que le es más afín. Quizá el origen ancestral es similar para ambas proteínas (GlcA y LldP son 65% idénticas y 80% similares).

No se conoce hasta ahora una proteína que sea capaz de transportar de modo específico al D-lactato, a pesar de que la enzima que lo metaboliza a piruvato esta presente en *E. coli* (Barnes y Kaback 1971; Rule, Pratt et al. 1985). En ensayos de transporte LldP cumple con la principal función de transporte tanto de L como de D-lactato.

El regulador.

El *lldR* codifica para una proteína de 258 aa y tiene como función la de regulador transcripcional de la súper familia GntR (Dong, Taylor et al. 1993). Perteneciente a la clase de factores hélice-vuelta-hélice (HTH), que en casi todos ellos es muy similar (Rigali, Derouaux et al. 2002). Se compone de 270 miembros, de los cuales el mejor caracterizado es FadR, que es el represor de la vía de degradación de ácidos grasos y es activador de la vía de síntesis de ácidos grasos no saturados en *E. coli* (Campbell y Cronan 2001). El dominio de unión al DNA que se encuentra en el amino terminal, es muy conservado, mientras que el extremo carboxilo terminal tiene la mayor divergencia y es donde se piensa se unen los ligandos específicos como inductores (para llevar a cabo la activación o represión); por ello, es que se han separado en diferentes subfamilias, ya que la secuencia operadora a la que se unen también tiene estructuras diferentes (Rigali, Derouaux et al. 2002). LldR tiene mayor semejanza con PdhR, el represor de la piruvato deshidrogenasa, incluso en la región río arriba del inicio de *lldP*, se han encontrado secuencias semejantes con las que interacciona PdhR.

La deshidrogenasa.

La deshidrogenasa consta de 369 aa. Tiene una homología significativa con diversas enzimas que tienen FMN unido como co-factor, como flavocitocromos, glicolato oxidasas y L-lactato 2-monooxigenasas (Dong, Taylor

et al. 1993). La característica que comparten todas ellas es el sitio activo, por análisis de la secuencia, es un barril de ocho hebras α/β que une el sustrato en coordinación con el FMN (Dong, Taylor et al. 1993). Es interesante mencionar que no tiene homología significativa con flavoproteínas de *E. coli*, como *dld* (D-lactato deshidrogenasa) y la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (tanto la enzima que opera en aerobiosis como en anaerobiosis); todas ellas también son dependientes de FMN.

Un elemento que es importante destacar, es que en su secuencia no se predicen cruces transmembranales y su perfil hidrofóbico no indica que sea una proteína membranal; esto, implica que su localización celular se debe a su interacción con otra proteína. Una posibilidad es que cuando esta ausente LldD el transporte de L-lactato dentro de la célula disminuye significativamente y quizá la cercanía de LldD a la membrana se deba a que interacciona con la permeasa.

Tanto por el análisis de la secuencia, las propiedades bioquímicas y estructurales de LldD indican que el operón *lldPRD* fue adquirido por transferencia horizontal.

Arreglo genético.

El arreglo genético es la característica más sobresaliente del operón *lldPRD*. En la Figura 2 se muestra un esquema de la secuencia del operón.

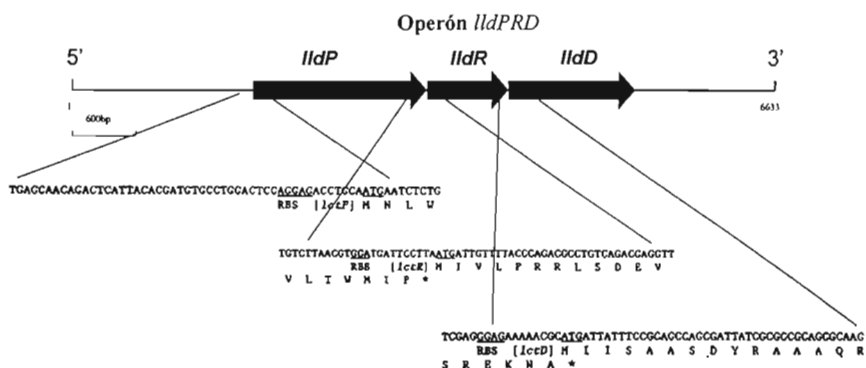


Figura 2. Disposición genética del operón *lldPRD*. Se muestran los inicios de cada uno de los ORF.

En la Figura 2 se destaca el arreglo genético. El codón de término del primer gen se traslapa con el codón de inicio del segundo gen, y el del segundo con el del tercer gen; esta disposición deja a las tres regiones codificantes en tres marcos de lectura diferentes. El arreglar a los tres genes así deja abierta la pregunta: ¿se produce un solo mRNA o bien cada gen tiene su propio promotor y son sintetizados independientemente?.

La transcripción.

Existe poca información acerca de la regulación del operón *lldPRD*. La información de las bases de datos como “Encyclopedia of *Escherichia coli*” (www.ecocyc.org) (Keseler, Collado-Vides et al. 2005) y “Regulon Database” (Salgado, Gama-Castro et al. 2004), predicen al menos dos unidades transcripcionales u operones. La primera, comprende a la permeasa (*lldP*) y la segunda a un bi-cistron que consiste en el regulador y la deshidrogenasa (*lldRD*). Pero esto representa un dato contradictorio, ya que en el trabajo de Dong *et al* (Dong, Taylor et al. 1993) se complementó a la mutante deficiente en la utilización de L-lactato con un plásmido que contenía a la deshidrogenasa solamente; logrando restituir la producción de la enzima en las membranas de la mutante, pero sin reestablecer el transporte del metabolito, lo que sugiere (como los autores dicen) que existe un elemento que estabiliza el mRNA de la permeasa

o bien, el producto de *lldR* se requiere para llevar a cabo la transcripción del operón. También, con ese trabajo, se determinó la abundancia del mRNA en presencia de L-lactato, sin inductor y de D-lactato. Este resultado se muestra en la Figura 3 (tomada de (Dong, Taylor et al. 1993))

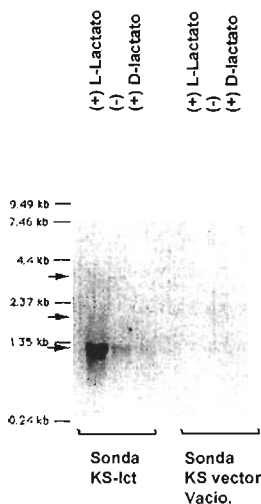


Figura 3. Hibridización tipo Northern de RNA total, inducido con L-lactato, sin inductor y con D-lactato. La sonda KS-Lct corresponde a un fragmento que contiene parte de *lldR* y de *lldD*. Como control usaron el plásmido vacío (sonda KS vector vacío) (Dong, Taylor et al. 1993).

Lo más importante de ese experimento es que, usando como sonda un fragmento de 1100 pb que comprende 200 pb de *lldR* y 900 pb de *lldD*, reveló una sola banda clara e intensa en presencia de L-lactato, mientras que en ausencia de L-lactato o en presencia de D-lactato no se observa una banda de inducción. Por el tamaño de la banda mayoritaria es probable que corresponda sólo al mRNA de la deshidrogenasa (Dong, Taylor et al. 1993). Ello significa que las otras bandas (marcadas en la Figura por tres flechas negras) corresponden quizá a la permeasa y una banda que corresponda al mRNA de los tres genes. No es claro en el autoradiograma la presencia de las bandas de mayor peso, sólo la banda que corresponde a la deshidrogenasa es clara.

Con la secuencia del operón, se logró identificar el sitio de unión de ArcA-P en una región río arriba del inicio de la transcripción de *lldP* (Lynch y Lin 1996). En ese estudio se determinaron varios elementos importantes para la regulación del operón y que se resumen en la Figura 4, tomada de la misma referencia.

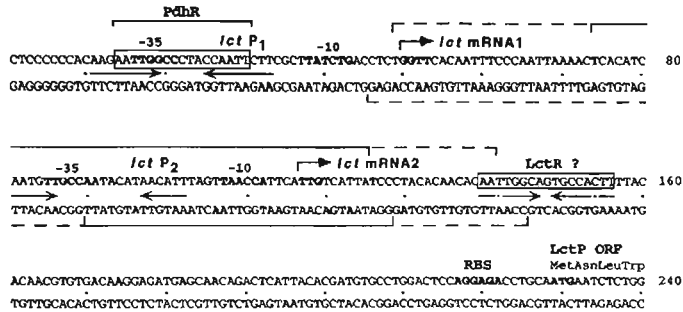


Figura 4. Región río arriba del inicio de *lldP*, se muestran los elementos identificados (sitio de unión de ArcA-P enmascarado con líneas continuas y discontinuas que abarcan el promotor *lctP2*), y los putativos (sitio de represión mediado por LldR y de activación por PdhR).

Por los datos que se muestran en la referencia (Lynch y Lin 1996) se establecen tres premisas importantes. La primera, es que solo existe una región en la que ArcA-P produjo retardos en ensayos de cambio en la movilidad electroforética (EMSA), y corresponde a la región río arriba del inicio de *lldP*. La segunda, en ensayos de protección a DNasa I se encontró que ArcA-P cubre una región máxima de 100 pb; ello lleva a confirmar el papel que tiene ArcA-p en la represión anaeróbica (que es cuando es activado por ArcB). En la tercera, se proponen elementos de regulación adicional. Inicialmente, el sitio putativo de unión de PdhR (Quail y Guest 1995), el represor de la piruvato deshidrogenasa, al cual por su posición se le propone como el activador del operón, mientras que un

palíndromo similar es posiblemente el sitio de unión de *lldR*. Adicionalmente, por ensayos de “primer extention”, se proponen dos posibles promotores, uno de ellos aparentemente activo solamente en presencia de L-lactato (lctP2 de la Figura 4).

Un elemento de suma importancia es el hecho de que si PdhR opera como un activado general del operón y significa que existe una interconexión entre ambos procesos metabólicos, en los que ambas reacciones están acopladas. El promotor lctP1 se propuso como un modo basal de mantener ciertos niveles de *lldP*, para permitir la entrada inicial del metabolito.

En resumen, el operón consta de dos niveles de regulación: por un lado es reprimido fuertemente durante la anaerobiosis, mientras que, por otro, es inducida su expresión en la aerobiosis en presencia de L-lactato.

Regulación postranscripcional.

Las endoribonucleasas juegan un papel fundamental en controlar los niveles de mRNA (Kushner 2002), iniciar su degradación y modificar el mRNA, lo que determina su tasa de traducción y de degradación, ya que modifican la accesibilidad a los ribosomas o bien de las exoribonucleasas.

La RNasa E es la principal endoribonucleasa encargada de iniciar el proceso de maduración de mensajeros, determinar su traducción o bien, modificar su vida media. Es una enzima que forma un complejo multiprotéico encargado de remover mRNA del citoplasma (Carpousis 2002). Se ha demostrado in vivo que el degradosoma se conforma por varias proteínas, de las cuales, las principales son: la PNPasa, una enolasa y una RNA helicasa (Liou, Jane et al. 2001; Morita, Kawamoto et al. 2004), y en niveles menores, DnaK, GroEL, Polifosfato cinasa (PPK) y algunas proteínas de choque térmico (Vanzo, Li et al. 1998).

La RNasa E es una enzima de 1061 aa, la cual cuenta con un dominio N-terminal catalítico y un domino C-terminal de interacción con el resto de los

componentes del degradosoma (Claverie-Martin, Diaz-Torres et al. 1989; Babitzke y Kushner 1991; Chauhan, Miczak et al. 1991; Vanzo, Li et al. 1998). La enzima purificada es dependiente de iones como Na^+ , K^+ o NH_4^+ y Mg^{++} o Mn^{++} (Misra y Apirion 1979). También se han caracterizado genéticamente los niveles de RNA celular en mutantes que son condicionales (se han descrito varias mutantes sensibles a temperatura (Aristarkhov, Mikulskis et al. 1996)). La letalidad de las mutantes en RNasa E atribuida a estar involucrada en procesar tRNA y genes vitales en la división celular (Cam, Rome et al. 1996; Ow y Kushner 2002). Existe en *E. coli* un ortólogo para el dominio N-terminal llamado *rng* (RNasa G), la cual se ha propuesto que su función se traslapa con la de la RNasa E (Lee, Bernstein et al. 2002).

La dirección en la que ocurre la degradación del mRNA en bacterias es de $3' \rightarrow 5'$, y es iniciada por un corte endoribonucleico; en la mayoría de los casos es la RNasa E quien realiza ese corte. La RNasa E depende también del extremo $5'$ para llevar a cabo su función (Mackie 1998), y es así como la mayoría de los mRNA son degradados, inclusive se ha observado la misma orientación en los procesos de degradación en eucariontes (Carpousis 2002).

Existen varios reportes en la literatura sobre las secuencias que preferentemente son blanco de la RNasa E, sobresalen dos trabajos en los que se hizo un perfil muy completo de cómo es que actúa la RNasa E. Es importante señalar que el análisis experimental para identificar los sitios de corte en el mRNA son complicados, ya que la enzima puede ser inhibida por varias razones, una de ella es presencia de trifosfatos en el extremo $5'$ (Jiang y Belasco 2004); la segunda, es que exista una estructura secundaria muy pronunciada en el sitio en el que se encuentra la secuencia de corte (Mackie, Genereaux et al. 1997); y por último, la secuencia puede ser cortada dependiendo de los nucleótidos vecinos al sitio preferente, existiendo combinaciones de posiciones que aumentan o disminuyen la frecuencia con la que es atacado el mRNA por la RNasa E (Kaberdin 2003).

Justificación.

Desde el punto de vista de organización genética bacteriana, el operón *lldPRD* presenta características que resaltan a la vista, como el hecho de que los genes están organizados de un modo atípico. Generalmente, el regulador se encuentra codificado en otra parte del genoma, o bien en una posición divergente a los genes que controla (teniendo una regulación independiente a ellos).

La organización que presenta el operón, ¿es una excepción o existen varios operones regulados del mismo modo? Uno de los principales mecanismos de diversidad en bacterias es la transferencia horizontal de genes. Una hipótesis de por qué la mayoría de las actividades metabólicas principales están organizadas en operones es para asegurar que si ocurre un evento de transferencia, sea toda la función transferida. El estatus solitario de la L-lactato deshidrogenasa en el genoma de *E. coli*, sugiere que se trata de un gen adquirido por este mecanismo, y si se toma en cuenta que dos genes adicionales necesarios para ello están traslapados, eso indica que efectivamente se adquirieron de ese modo.

¿Está el operon *lldPRD* organizado del mismo modo en otros organismos diferentes a *E. coli*? De ser así, se apoyaría la idea de que el operón haya sido adquirido por transferencia horizontal.

Por otro lado, el control de los niveles de cada gen no necesariamente es equivalente. De acuerdo a la función que cada gen desempeña, es posible que se requieren en cantidades diferentes, por ejemplo: *lldD>lldP>lldR*. A pesar de que su organización no es equivalente ni su función, un ejemplo de esto es el caso del operón *lac*, uno de los más estudiados en *E. coli*. EL operon *lac* presenta niveles distintos de cada mensajero: $lacZ \geq lacA > lacZYA = lacZY > lacYA > lacY$ donde además, la transcripción del represor ($lacI$) $5.0 \text{ mol mRNA}_{rep}/(\text{mol DNA min})$ contra $839.0 \text{ mol mRNA}_{ZYA}/(\text{mol DNA min})$ es 167.8 veces menor a la de el mRNA de *lacZYA*. Por otro lado, el nivel de traducción para el represor es también menor, ya que su constante de traducción es de $5.0 \text{ mol represor}/(\text{mol$

RNA_{repressor} min), contra 9.4 mol βgalactosidasa/(mol RNA_{ZYA} min), dando una diferencia de 1.88 veces (Murakawa, Kwan et al. 1991; Wong, Gladney et al. 1997). Estas diferencias de los niveles de expresión en un operón reflejan que los niveles de cada mensajero es importante para llevar a cabo la función a la que están destinados. Bajo ese principio, nos planteamos las siguientes preguntas:

¿Los niveles de cada mensajero son iguales? Es algo importante que resolver, ya que el antecedente más próximo (Dong, Taylor et al. 1993) indica que no es así, pero no se puede concluir de modo tajante, ya que sólo se hizo un análisis tipo Northern del mRNA con una sonda que corresponde solamente al gen *lldD*.

¿El operón *lldPRD* tiene un solo promotor o varios? Es una pregunta fundamental para el control de la dosis de cada uno de los genes, ya que si cada uno es modulado independientemente por un promotor, no existe conflicto en cómo se regula la dosis de cada uno, pero si están gobernado por un solo promotor, debe existir un mecanismo adicional que equilibre la cantidad de cada transcrito del operón.

Lynch et al, propuso que por la ubicación del sitio de ArcA y LldR (palíndromo río abajo de LctP2) se trata de dos reguladores negativos del operón. Basándose en la similitud que tiene un palíndromo en la región río arriba del promotor LctP2 y sobre puesto con LctP1 (Figura 4) corresponde al sitio de unión de PdhR (Quail y Guest 1995). Esa ubicación es ideal para un activador transcripcional típico bacteriano. El único experimento que apoya la noción de que *lldR* es un regulador negativo, se hizo transformando una cepa con una fusión *lldP-lacZ* con un plásmido que contiene la región promotora del operón. Lo que se observó fue un incremento en la actividad del gen reportero durante el crecimiento anaeróbico. Ello no implica que *lldR* sea un regulador negativo, sino que es un efecto de titulación de ArcA. Y no existe un vínculo directo que explique la inducción del operón por L-lactato. Por ello, ¿LldR es un regulador positivo o negativo?

Objetivo.

Determinar el modo de regulación del operón *lldPRD* a nivel transcripcional y postranscripcional.

Hipótesis.

El operón *lldPRD* es controlado por un único promotor y existe un mecanismo postranscripcional que module los niveles de los transcritos de cada gen.

Materiales y Métodos.

Condiciones de crecimiento.

Todas las cepas utilizadas son derivadas de *Escherichia coli* K-12. Las células se crecieron en medio Luria-Bertani (LB), el cual contiene por litro: 10gr de NaCl, 5g de extracto de levadura y 10 gr de bacto triptona. La concentración final empleada de L-lactato fue de 20 mM. En los ensayos de β -galactosidasa, se empleó medio mínimo M9 (Sales M9 10X [60g/L Na₂HPO₄, 30 g/L KH₂PO₄, 5 g/L NaCl, pH 7.4], para 500 ml de medio: 50mL de sales M9 10X, 1 mL de 1M MgSO₄, 50 μ L 1M CaCl₂, 2.5 mL de una solución esterilizada por filtración de NH₄Cl (0.2 g/mL) y 1 mg de tiamina y de biotina. La solución debe quedar a un pH de 7.3) usando xilosa como fuente de carbono.

Las concentraciones de los antibióticos utilizados fueron de: ampicilina (Amp) 200 μ g/ml; kanamicina (Kan) 50 μ g/ml, cloranfenicol (Cm) 33 μ g/ml y rifampicina (Rfp) 200 μ g/ml. La selección de lisogenas se realizó en placas de LB con 1.5% de agar, ampicilina y Xgal (20 μ g/ml) Los cultivos aeróbicos se crecieron con agitación orbital a 37° C, excepto las mutantes sensibles a temperatura, como la CH1828,SK2541 y la cepa N2020 (mpA49) (Aristarkhov, Mikulskis et al. 1996), (Ow, Perwez et al. 2003) y (Gurevitz, Jain et al. 1983) respectivamente.

Cepas empleadas.

En la tabla 1 se enlistan las cepas empleadas en este estudio.

Tabla 1

| Nombre | Características | Fuente |
|--------------------|--|----------------------------|
| MC4100 | <i>araD139Δ(argF-lacZ)U169 rpsL150 relA1 deoC1 fts-5301 ptsF15</i> | Colección del laboratorio. |
| IFC400 | MC4100 Φ(lldP-lacZ) Fusión transcripcional | Este trabajo |
| IFC401 | MC4100 Φ(lldD-lacZ) Fusión transcripcional | Este trabajo |
| IFC402 | MC4100 Φ(lldR-lacZ) Fusión transcripcional | Este trabajo |
| IFC403 | MC4100 Φ(lldPRD-lacZ) Fusión transcripcional | Este trabajo |
| DH5α | F- 80dlacZM15 (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 - thi-1 gyrA96 relA1 | Gibco BRL |
| CH1827 | <i>araD139Δ(araABC-leu) 7697 Δ(lac)X74 galU galK hsdR rpsL150 thi zce-726::Tn10</i> | [35] |
| CH1828 | Igual que CH1828 pero <i>ams-1</i> [es decir <i>rne</i> (TS)] | [35] |
| ECL2006 | MC4100 <i>rnc::Tn10</i> (Δ <i>Rnasa III</i>) | [35] |
| N2020 | <i>npA49</i> [es decir <i>mp</i> (TS)] | [37] |
| IFC404 | MC4100 (pLCT2) | Este trabajo |
| MG1693 | <i>rne⁺ rng⁺</i> | [36] |
| SK2538 | <i>rng::cat</i> | [36] |
| SK2541 | <i>rng::cat rne-1</i> | [36] |
| B548 | Contiene el plásmido pQE30(<i>lldR</i>), sobreexpresión <i>lldR</i> . | Colección del laboratorio. |
| KO5 | <i>ΔlldR::kan</i> | Este trabajo |
| <i>ΔlldR</i> | <i>ΔlldR::kan lldP-lacZ</i> (por P1 se hizo la transducción a la cepa IFC400) | Este trabajo |
| <i>ΔlldR+plldR</i> | Cepa <i>ΔlldR</i> transformada con el plásmido <i>pIldR</i> | Este trabajo |

Plásmidos empleados.

En la tabla 2 se enlistan los plásmidos empleados en este estudio. Se usó el protocolo de transformación de la referencia (Inoue, Nojima et al. 1990). La purificación se realizó con el Kit de Miniprep de Qiagen.

Tabla 2

| Plásmido | Inserto/función/resistencia | Fuente. |
|-----------------|---|----------------|
| pLCT2 | Operon IldPRD (<i>bla</i>) | [23] |
| pRS415 | Fusiones transcripcionales (<i>bla</i>) | [42] |
| pRS400 | pRS415 (IldP-lacZ) (<i>bla</i>) | Este trabajo |
| pRS401 | pRS415 (IldD-lacZ) (<i>bla</i>) | Este trabajo |
| pRS402 | pRS415 (IldR-lacZ) (<i>bla</i>) | Este trabajo |
| pRS403 | pRS415 (IldPRD-lacZ) (<i>bla</i>) | Este trabajo |
| pKO3 | Reemplazos cromosómicos (<i>cat</i>) | [43] |
| pKOIldR | Generar interrupción IldR (<i>cat/kan</i>) | Este trabajo |
| pUCBM21 | Vector de clonación. (<i>bla</i>) | Boheringer |
| pMX401 | Sonda IldP (1050 pb) (<i>bla</i>) | Este trabajo |
| pMX402 | Sonda IldD (950 pb) (<i>bla</i>) | Este trabajo |
| pUC4K | Vector fuente del gene de resistencia a kanamicina (<i>kan</i>) | Pharmacia |
| pACT3 | Vector de bajo número de copias (<i>cm</i>) | [44] |
| pIldR | pACT3(IldR) Inserto proviene del pQE30(IldR) (<i>cm</i>) | Este trabajo |

Unidades de β -galactosidasa.

Los ensayos de β -galactosidasa fueron realizados de acuerdo con la referencia (Miller 1972)

La fórmula para calcular las Unidades Miller de β -galactosidasa es:

$$\frac{(Abs_{420nm} - (1.75 * Abs_{550nm}))}{T * I * Abs_{600nm}}$$

donde la absorbencia a 420nm es la medición del producto de la actividad de β -galactosidasa. $1.75 * Abs_{550nm}$ es un factor de corrección por la absorbencia de las detritos celulares. T se refiere al tiempo de reacción (15 min); I al volumen en mililitros de cultivo de bacterias para cada reacción y por último, Abs_{600nm} es la medición de la densidad óptica del cultivo a 600 nm.

Se hicieron tres experimentos independientes para corroborar los patrones obtenidos en los ensayos de β -galactosidasa. Los ensayos se realizaron a una OD_{600nm} de ~ 0.4 . En los resultados se presenta el promedio con su desviación estándar.

Purificación del RNA.

El manejo del RNA se realizó con los cuidados sugeridos en el manual de Russell *et al* (Russell 2001).

La extracción se hizo de acuerdo al protocolo de fenol caliente (Georgellis, Arvidson et al. 1992) con ligeras modificaciones. Se crecieron las células en agitación a las temperaturas indicadas en cada experimento o bien de rutina a 37° C.

Las células se centrifugaron en tubos con hielo molido y se resuspendieron en la solución I (acetato de sodio 0.1 M, sacarosa 0.3 M, pH 4.5). Después se lisaron con la solución II (acetato de sodio 0.01 M, SDS 2%, pH 4.5). Las muestras se calentaron a 80° C por 1.5 minutos. Se adicionó un volumen de fenol caliente equilibrado en agua e incubado a 80° C por 3 minutos; este proceso se repitió una vez más pero incubando en hielo. Posteriormente, las muestras se extrajeron dos veces con un volumen de fenol-cloroformo-álcool isoamílico. La fase acuosa de la última extracción se precipitó con 1/10 de volumen de una solución 3M de acetato de sodio y 2.5 volúmenes de etanol. La pastilla se resuspendió en dH₂O tratada con dietil-pirocarbonato (DEPC).

Las muestras de RNA se trataron con desoxiribonucleasa I libre de ribonucleasas de acuerdo a las instrucciones del fabricante (“DNase I amplification grade” Invitrogen) y se extrajeron una vez más con un volumen de fenol-cloroformo-álcool isoamílico. El sobrenadante de la última extracción se precipitó con etanol y se resuspendió en dH₂O tratada con dietil-pirocarbonato (DEPC). Se guardó a -20° C hasta su uso.

Se confirmó la integridad del RNA en geles de agarosa-formaldehído. Se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm y 280 nm. La pureza se estimó calculando la relación de las mediciones a 260 nm y 280 nm de las muestras. Se utilizaron muestras cuya relación estaba en 1.9.

Obtención de las sondas para análisis tipo Northern.

Las sondas se obtuvieron mediante PCR, usando el plásmido pLCT2 como molde. Se emplearon los iniciadores lldD1 y lldD2 (en tabla 3 se encuentra la secuencia de ambos) para obtener una sonda de 950 pb de la región interna de *lldD*. En el caso de *lldP* los iniciadores lldP1 y lldP2 (ver tabla 3) amplifican una región interna de 1050 pb. Las sondas fueron clonadas en el vector pUCBM21 (Boheringer) en el sitio EcoRV. Para marcar las sondas, los fragmentos se purificaron de los plásmidos digeridos con EcoRI y HindIII y obtenidos de gel. Se

marcaron las sondas usando el Kit Rediprime II de Invitrogen de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, usando α -dCTP(32 P) 3000Ci/mmol. Una vez marcadas se purificaron con el Kit de purificación de productos de PCR de la marca Qiagen, se cuantificaron por contador de centelleo, para cada experimento se usaron 1×10^6 cpm de cada sonda.

Hibridización tipo Northern

El RNA se resolvió en geles desnaturalizantes al 0.8% de agarosa y formaldehído. Se transfirió por capilaridad como se describe en (Russell 2001). La membrana con el RNA fue entrecruzada por luz UV (usando el dispositivo Stratalinker de Stratagene). Se incubó la membrana por dos horas con la solución A (para 10ml: 1.8 ml de formamida destilada, 5 ml de Denhardt 100X, 2.5 ml de SSC 20X, 0.2 ml de SDS 10%, 0.2 ml de una solución 0.5 M de fosfato de sodio pH 6.5 y 0.1 ml de DNA no homólogo de esperma de salmón [solución de 10mg/ml]).

La sonda se añadió en la solución A denaturalizada a 90° C por diez minutos y por 5 minutos en hielo. Se incubaron las sondas toda la noche en agitación rotacional a 42° C. Se realizaron los siguientes lavados (volumen por lavado: 50ml).

- 1) SSC 2X SDS 0.1% (dos veces a 42° C)
- 2) SSC 0.2X y SDS 0.1% (dos veces a 42° C)

Una vez realizados los lavados, se revisó que el fondo fuese mínimo y se hizo la autoradiografía, exponiendo y usando placas intensificadoras a -80° C. El análisis densitométrico se realizó usando una placa sensible a P^{32} para Typhoon (Amersham).

Construcción de las fusiones transcripcionales al gen lacZ e iniciadores empleados.

Las fusiones transcripcionales se realizaron de acuerdo con la referencia (Simons, Houman et al. 1987). En breve, se clonaron los fragmentos descritos en la Figura 8 de acuerdo con los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 3 amplificados por PCR. También, en la Tabla 3 están representados los oligonucleótidos usados para obtener las sondas y hacer las hibridaciones tipo Northern.

| Nombre | Secuencia (5'→3') | Función |
|-----------------|---------------------------------|---------------------------------|
| (1) lacZrev | CGGGATCCAACAGGAACGGCGGCAAGAATGC | Reverso para fusiones lacZ |
| (2) FwIldPlllDR | CGAATTCGCCCGGGAATATCTGGC | Delantero para fusiones lacZ |
| (3) FwIldRlllDD | CGAATTCGCTATCCCTGTGCGGGC | Delantero fusiones lacZ |
| (4) FwIldD | CGGAATTCGAAGCAACGCTAAGTG | Delantero fusiones lacZ |
| (5)RvIldPlacZ | CGGGATCCACAGTCCGGAATAGTTC | Reverso para fusiones lacZ |
| (6) Promotor | GGAATTCGAATAATCATCCGCTGC | Delantero fusiones lacZ |
| (7) IldD1 | AGCCAGCGATATCG | Delantero sonda IldD |
| (8) IldD2 | CATACGCACGACATC | Reverso sonda IldD |
| (9) IldP1 | GTGAAAACCCGGGCAG | Delantero sonda IldP |
| (10) IldP2 | ACAGTCCGGAATAGTTC | Reverso sonda IldP |
| RS45Fw | GGA ATT GGG GAT CGG AAT TC | Delantero para el vector pRS415 |
| RS45Rv | CGA CGG CCA GTG AAT CCG G | Reverso para el vector pRS415 |

El vector en el que se clonaron fue el pRS415, que es usado para generar fusiones transcripcionales al gen *lacZ*. Para todos los fragmentos clonados se empearon los sitios *EcoRI* y *BamHI*, ambos presentes en los oligonucleótidos, *EcoRI* en los iniciadores delanteros y *BamHI* en los iniciadores reversos.

Las cepas portadoras de los plásmidos y portadoras de los vectores generados fueron infectadas con el fago λ RS45, el cual integra al vector en el sitio de unión de lambda (att). Los lisados y la obtención de lisógenas estables se hicieron como se describe en (Simons, Houman et al. 1987).

Una vez que se obtuvieron colonias azules en placas LB-ampicilina-xgal, se analizaron por PCR para detectar que se encontraban correctamente integradas, usando los iniciadores: RS45Fw y RS45Rv, específicos para el vector pRS415 (amplifican desde los sitios de clonación).

Interrupción de lldR.

El fragmento amplificado para las fusiones *lacZ* con los iniciadores FwllldRIID y el reverso lacZrev, fue clonado en el sitio EcoRV del vector pUCBM21. Ahí se clonó el gen de resistencia a kanamicina proveniente del vector comercial pUC4K (Pharmacia) con el sitio SalI. Se reamplificó el fragmento con los mismos iniciadores, para entonces clonar el fragmento en el vector pKO3 en el sitio SmaI [44]. Se seleccionaron las clonas resistentes a cloranfenicol y kanamicina. Después se siguió el protocolo sugerido para el pKO3 (Link, Phillips et al. 1997). Una vez obtenida una colonia resistente a kanamicina pero sensible a Cloranfenicol, fue comprobada por PCR usando los mismos iniciadores (detectando esta vez la presencia del fragmento empleado más el de resistencia a kanamicina).

Transducción por PI de la interrupción de lldR en la cepa IFC400.

Se siguió el protocolo sugerido en (Russell 2001). Con ello obtuvimos la cepa Δ lldR, la cual fue transformada con los plásmidos *plldR* y pACT3 (Dykxhoom, St Pierre et al. 1996). En breve, el vector pACT3 fue digerido con las enzimas de restricción EcoRI y HindIII, para clonar así el fragmento proveniente del plásmido pQE30lldR (cepa B548). Al obtener el fragmento EcoRI

y HindIII del pQE30, se obtiene la secuencia codificante de *lldR* además del sitio de unión a ribosomas y el epítipo de 6X Histidinas del pQE30. De ese modo se asegura que la traducción es correcta y que ese epítipo no estorba en la actividad de la proteína, lo cual es importante para subsecuentes estudios *in vitro* sobre *lldR*.

Resultados y Discusión.

Organización genética de los reguladores transcripcionales en el genoma de Escherichia coli.

Con la secuenciación del genoma de *E. coli* (Blattner, Plunkett et al. 1997) se han clasificado los marcos de lectura abierta, con un total de 4308 posibles genes que codifiquen para una proteína y mRNAs no traducidos (Hershberg, Yeger-Lotem et al. 2005). Del total de genes, se conocen al menos 3405 unidades transcripcionales. Existen 111 ORF asignados como genes que codifican para factores transcripcionales. El 16.6% del genoma está arreglado en operones que contienen al menos dos genes (4.6% tienen 3 o más genes) (Blattner, Plunkett et al. 1997).

De los operones conocidos, el 68% tienen un promotor, el 20% tiene dos y el 12% tiene tres o más promotores. De los operones que se predice o conoce una proteína reguladora, el 89.2% es controlado por una sola proteína, el 8.4% por dos y el 2.4% por tres o más proteínas. De los casos que son regulados por dos o más proteínas, se unen en el 81.2% de las veces a una sola secuencia en el DNA, el 12.2% tienen dos sitios de unión en el promotor y solamente el 6.6% tienen tres o más sitios.

Datos más refinados de la regulación-organización de los operones, indican que 737 unidades transcripcionales son moduladas directamente por un factor transcripcional. Se conocen 549 interacciones de regulación a nivel transcripcional (Hershberg, Yeger-Lotem et al. 2005). Todo esto fue analizado desde el punto de vista de organización: cuántos operones contienen, entre los genes de una unidad transcripcional, un gen regulador.

Para ello, se consultó al Dr. Enrique Merino del Instituto de Biotecnología, UNAM. El Dr. Merino generó un programa en lenguaje PERL que es capaz de catalogar posición y función de genes (usando como base la tabla de

traducción de proteínas del genoma de *E. coli* K-12). El Dr. Merino nos proporcionó una lista de operones en los que se tomó en cuenta el tipo de genes que están contenidos en el operón, si se trata de una función metabólica o reguladora (como por ejemplo las cinasas); con lo cual se sentó la base para catalogar por función y posición. También, se tomó en cuenta si se conoce o no un promotor y si los genes son co-transcritos. De la base de datos www.ecocyc.org (Keseler, Collado-Vides et al. 2005) se obtuvo parte de esa información, o bien de la literatura. En la Figura 5 se presentan los datos obtenidos.

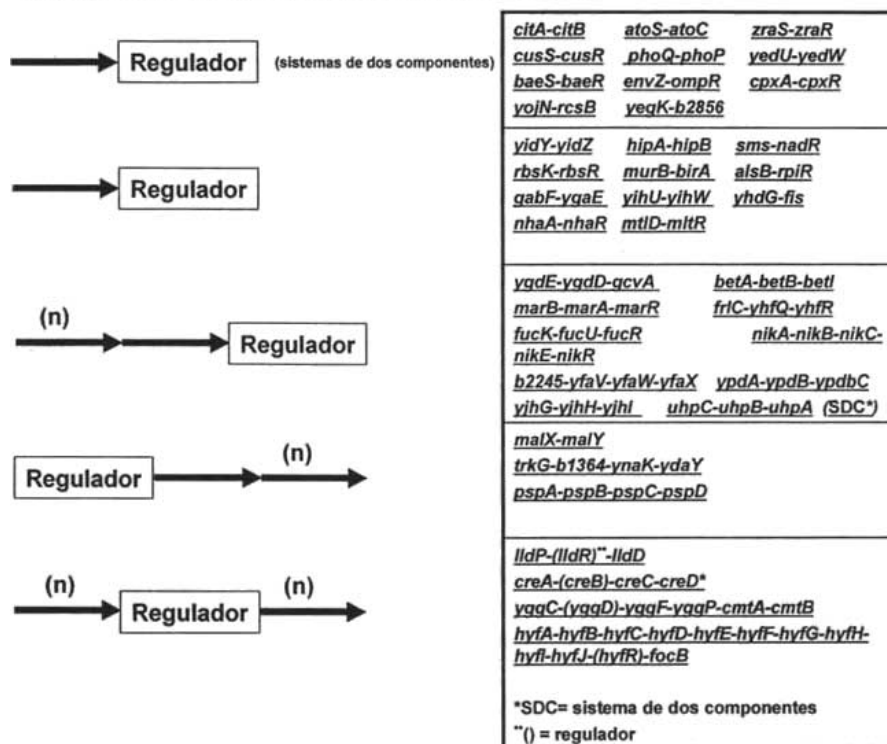


Figura 5. Organización de reguladores transcripcionales en el genoma de *E. coli* K-12. Se representan las posibilidades de arreglo y el operón en cuestión en forma de tabla. Para cada uno de ellos, se tomó como criterio que se tratara de una sola unidad transcripcional.

Leyenda: \longrightarrow = gen estructural
 (n) = dos o mas genes

Es importante señalar que la información es validada, ya que dentro de los operones identificados se encontró al operón *lldPRD*, que como se ha mencionado anteriormente, la principal característica es que tienen un arreglo atípico. En la tabla está clasificado en la última categoría.

Se obtuvieron 36 factores transcripcionales que están arreglados en operón. Un elemento a tomar en consideración es el hecho de que 12 de ellos corresponden a la pareja de cinasa sensora y regulador de respuesta de sistemas de dos componentes. Un caso particular es co-transcrito con un gen adicional al de la cinasa y regulador de respuesta, y es el caso de *uhpC-uhpB-uhpA*, donde *uhpB* y *uhpC* son parte del sistema de fosforelevo y *uhpA* es el regulador de respuesta que controla la captura de hexosas.

La organización cinasa/regulador de respuesta no es una sorpresa, ya que en ese caso, tanto los niveles de transcripción para la cinasa como para el regulador de respuesta deben ser semejantes; la dosis de ambos es muy similar y en otros casos se autorregula la transcripción. Lo que si llama la atención es que de un total de 30 cinasas sensoras y 34 reguladores de respuesta (Yamamoto, Hirao et al. 2005), 12 parejas estén organizadas en un operón.

Pero en el resto de los casos, se encontraron varios operones dispuestos con un regulador transcripcional co-transcrito con otros genes. También, se identificaron varios operones putativos en los cuales existe la posibilidad de que el factor transcripcional predicho lo sea en la realidad; de cualquier forma, el análisis computacional así lo indica, pero se requiere de experimentación para demostrarlo.

Un dato adicional tomado de la literatura (Hershberg, Yeger-Lotem et al. 2005), es que la mayoría de las unidades transcripcionales co-reguladas en *E. coli* son divergentes (73%), es decir, que la mayoría de los genes se encuentran orientados en direcciones opuestas; sólo el 18% del total están dispuestos de modo

unidireccional (en la misma orientación). Únicamente el 9% de las unidades transcripcionales tienen un arreglo convergente.

Por todo esto, lo que se obtuvo en la Figura anterior es un reflejo de que no sólo es poco frecuente encontrar arreglos contiguos en los genes de *E. coli*, sino que es muy raro encontrar co-regulado un gen estructural con un regulador transcripcional. Dentro de los modos más frecuentes de control encontrados en *E. coli*, destacan dos: el primero, en el que existe regulación en *trans*, un elemento actúa a distancia sobre otra unidad transcripcional (31 casos en el genoma de *E. coli*). Y segundo, regulación vecina, en la que un elemento actúa sobre la unidad transcripcional inmediatamente adyacente (29 casos descritos en *E. coli*). Este último caso es una característica importante en procariontes. Hasta ahora no han sido reportados en levadura organizaciones genéticas que regulen una actividad de este modo. Podemos predecir de modo general que es una particularidad en procariontes el control genético organizado de ese modo.

Una discusión amplia respecto de cómo ocurre el agrupamiento en unidades transcripcionales es la transferencia horizontal de genes (Lawrence 1997). Es quizá el principal modo en el que las bacterias transfieren genes. En varios casos la transferencia horizontal es necesaria para la supervivencia del organismo en cuestión, como en el caso de genes que confieren resistencia a antibióticos o que permiten colonizar nuevos nichos ecológicos, es decir, que dan lugar a un evento de especiación.

Cuando una función metabólica requiere de más de un gen, tienden a encontrarse juntos en el genoma, y la razón es que cuando son movilizados, si sólo se transfiere una parte de los genes, éstos son insuficientes para llevar a cabo la función si no se encuentran todos juntos, lo que puede llevar a perderlos. Se sabe que en el genoma de *E. coli*, alrededor de 618 kb se han adquirido por el modo de transferencia horizontal [50]. De ser ese el caso, es probable encontrar el mismo arreglo genético para el operón *lldPRD* en otros organismos. La especie bacteriana más cercana a *E. coli* es *Salmonella*. En ella lo que se encontró fue el

mismo arreglo para el operón *lldPRD*, mientras que para el resto de los organismos en los que se conoce la secuencia completa de su genoma, no fue así.

En otros organismos, el operón lldPRD tiene el mismo arreglo.

Se realizó una búsqueda entre los 224 genomas secuenciados para tratar de identificar operones que codifiquen para una L-lactato deshidrogenasa y también si son sintéticos. El modo en el que se hizo fue bajo el criterio de encontrar al menos dos de los genes involucrados en la internalización y metabolismo del L-lactato, y que los ORF se encuentren traslapados. Se identificaron los siguientes operones (Figura 6).

Operón *lldPRD* en otros organismos.

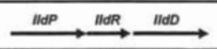
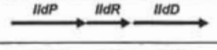

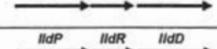

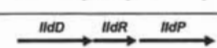
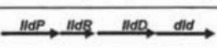
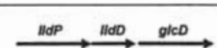
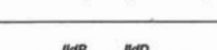
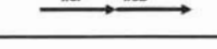
| | |
|--|---|
| <i>Escherichia coli</i> K-12 |  |
| <i>Escherichia</i> O157:H7 EDL933 |  |
| <i>Escherichia</i> CFT073 |  |
| <i>Salmonella typhimurium</i> LT2 |  |
| <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 |  |
| <i>Shigella flexneri</i> 2a str. 301 |  |
| <i>Shigella flexneri</i> 2a str. 2457T |  |
| <i>Acinetobacter</i> sp. ADP1 |  |
| <i>Archeoglobus fulgidus</i> DSM 4304 |  |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01 |  |

Figura 6. Organización de la L-lactato deshidrogenasa en otros organismos. Los datos fueron obtenidos del servidor del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). →: Se refiere a la orientación del gen respectivo. La posición de los genes se tomó respecto a un posible promotor.

En la Figura 6 se presenta la organización de los tres genes del operón de metabolismo de L-lactato. Salvo en las diferentes cepas de *E. coli* que conocemos la orientación del operón, todos los demás están dispuestos de acuerdo a la orientación de la transcripción predicha o bien al inicio del ORF. Bajo ese criterio pudimos identificar dos grupos de operones: los que no contienen al regulador (y que de hecho no está anotado o que por BLAST comparando la secuencia de *lldR* lo pudiésemos identificar) y el segundo grupo, en el que todo el operón pudiese ser identificado. Es importante mencionar que en algunos organismos como *Mycobacterium tuberculosis* o *Haemophilus influenzae* se encuentran tanto la permeasa como la deshidrogenasa, pero en puntos separados del genoma, y el regulador no fue identificado; estos dos casos fueron omitidos de la Figura 6. En 50 organismos en los que se identificó un ORF homólogo a la *lldD*, y en estos casos su ubicación en el genoma es independiente transcripcionalmente de otros genes. Incluso, en pocos organismos pudimos identificar genes homólogos con al menos uno de los genes del operón *lldPRD*. Para *lldR* se obtuvieron varias secuencias homólogas con el dominio de unión al DNA, pero no relacionadas con las enzimas de nuestro interés.

Dentro de los organismos del primer grupo encontramos a: *Pseudomonas aeruginosa PA01* y *Archeoglobus fulgidus DSM 4304*. En ellos, se identificaron traslapados únicamente a la permeasa y a la deshidrogenasa. En *Archeoglobus fulgidus*, además a la glicolato oxidasa subunidad D. Cabe señalar, que en el caso particular de *Pseudomonas aeruginosa PA01*, *lldP* y *lldD* se encuentran aislados, no se predicen ORF en al menos una kilobase río arriba y río abajo del operón.

El operón *lldPRD* como tal se encuentra en dos cepas de *Shigella flexneri*, en las que a pesar de ser cepas filogenéticamente muy cercanas, existe una inversión en el orden de los genes. En la cepa 2457T esta primero *lldD*, luego *lldR* y finalmente *lldP*, mientras que en la cepa 301 encontramos el orden canónico. El orden fue identificado respecto al inicio de cada marco de lectura. Es importante destacar que en los demás organismos el arreglo es el mismo que en *E. coli*.

Finalmente, en el caso particular de *Acinetobacter sp. ADP1*, en el cual en el mismo locus y con el mismo arreglo que en *E. coli* K-12, se encuentra también la D-lactato deshidrogenasa, enzima encargada de transformar el isómero D del lactato en piruvato.

Este arreglo nos permite concluir que estos operones han sido transferidos de un organismo a otro por medio de algún mecanismo de transferencia horizontal de genes.

El operón egoísta es un modelo que explica la forma en que los genes que tienen una importancia metabólica, o bien que su función depende de otros genes (Lawrence 2003). Se basa en que la transferencia no depende de si es ventajoso o no para la célula que posee al operón, sino que es importante para los genes en sí. Esto es claro en la distribución del operón *lldPRD*, su organización no es observada ampliamente, ni siquiera en operones no relacionados, pero que tengan un regulador transcripcional incluido en el arreglo genético. La enzima LldD parece no tener un linaje común dentro del mismo genoma de *E. coli*, ya que no existen muchas enzimas dependientes de FMN que tengan el mismo arreglo estructural que tiene LldD o bien que tengan a nivel de secuencia cierto grado de identidad, posee mayor identidad con enzimas dependientes de FMN de otros organismos.

Por todo esto, queda como propuesta que el operón *lldPRD* fue adquirido por transferencia horizontal. El análisis realizado fue más detallado en los cerca de 100 genomas que en la actualidad están mejor clasificados y que cuentan con una lista cuidadosa de genes anotados por función; en el resto de los genomas es difícil, incluso, estar seguros de que la posición de los genes es la correcta, ya que en algunos casos encontramos discrepancias respecto a los genes circundantes.

Con esta información, se inició la exploración del modo en el que se regula el operón *lldPRD* mediante la inducción por L-lactato.

*¿Son iguales los niveles de inducción de *lldP* y *lldD*?*

De acuerdo con los resultados obtenidos por Dong et al (Dong, Taylor et al. 1993), es difícil saber si los niveles del mRNA de *lldP* y *lldD* son equivalentes o no, ya que sólo usaron una sonda que cubría la región que comprende el final del regulador y parte de la deshidrogenasa. Ello, dio una banda específica y muy abundante de 1.2 kb, que concuerda con el tamaño esperado para *lldD*.

Para conocer si los niveles de mRNA de *lldP* y *lldD* son equivalentes o no, se realizó una hibridización tipo Northern. Usando RNA total extraído de la cepa silvestre CH1827 en Medio mínimo M9 con xilosa como fuente de carbono, en presencia o en ausencia de L-lactato. Se usaron dos sondas, una específica a *lldP* (de 1050 pb) y una para *lldD* (950 pb). En la Figura 7 se muestra el resultado de ese experimento.

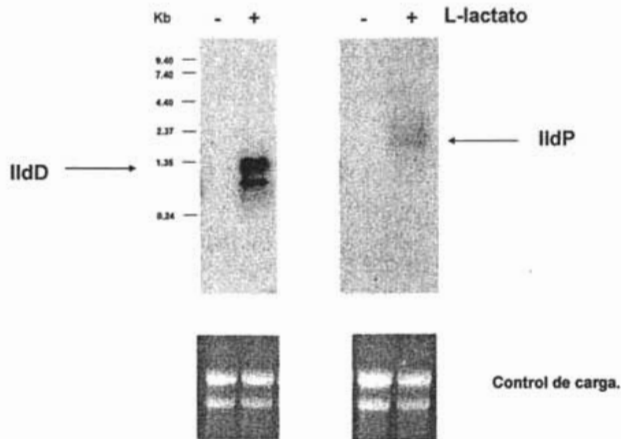


Figura 7. Análisis tipo Northern usando sondas específicas a *lldP* y *lldD*. Las membranas fueron expuestas para autoradiografía el mismo tiempo.

Un aspecto importante que se debe señalar es que las células se colectaron a la misma densidad óptica (mismos tiempos de inducción) y se cargaron cantidades equivalentes de RNA en cada carril. El resultado obtenido no

corresponde a lo que se esperaba, ya que los niveles para cada mensajero deberían ser equivalentes, pero no fue así.

Se observan dos bandas intensas para la sonda de *lldD*, las cuales se pueden explicar como procesamiento del mRNA, la banda de mayor tamaño puede tratarse de un fragmento proveniente del mRNA de *lldR* y el de menor tamaño al del mRNA de *lldD* procesado por completo.

Los niveles de expresión de *lldP* aparentemente son inferiores a los de *lldD*.

Para este resultado se plantean tres posibles explicaciones. La primera, es que ambos mRNA son procesados y la vida media de cada uno de ellos es diferente, donde *lldP* tiene una vida media mas corta que *lldD* (Kennell 2002; Kushner 2002). La segunda, es que cada gen es controlado por un promotor específico. De acuerdo a la anotación hecha en la base de datos Regulon Database (Salgado, Gama-Castro et al. 2004), se predice un promotor que controla *lldP* y uno que controla *lldRD*, como dos unidades transcripcionales distintas, reguladas de modo independiente. Y la tercera es una diferencia en la eficiencia del marcaje de las sondas, donde una de ellas haya incorporado una cantidad inferior de ^{32}P , a pesar de añadir por experimento la misma cantidad de cpm.

Para responder la pregunta de si existe más de un promotor se realizó el siguiente experimento.

Número de promotores en el operón lldPRD.

En los ensayos de Lynch et al (Lynch y Lin 1996), se buscaron sitios de unión para ArcA. En diferentes fragmentos del operón *lldPRD* sólo se encontró que ArcA cubre una región de 100 pb río arriba del inicio de la transcripción de *lldP*. Se planteó la siguiente predicción: el operón es controlado por un único promotor y se encuentra en la región río arriba de *lldP*. El argumento es el

siguiente: si el objetivo principal es silenciar la expresión de *lldD* que no es requerida durante la anaerobiosis, por lo tanto si no existe un sitio de unión de ArcA-P en la secuencia río arriba del inicio de *lldD*, se refuerza la idea de que debe existir un solo promotor.

Para demostrar la existencia de un solo promotor, se realizaron fusiones transcripcionales en diferentes regiones del operón. En la Figura 8, se muestra el mapa de las fusiones al gen de la β -galactosidasa, así como las actividades obtenidas (expresadas en Unidades Miller (Miller 1972)). Las construcciones y los ensayos fueron realizados como se señala en materiales y métodos.

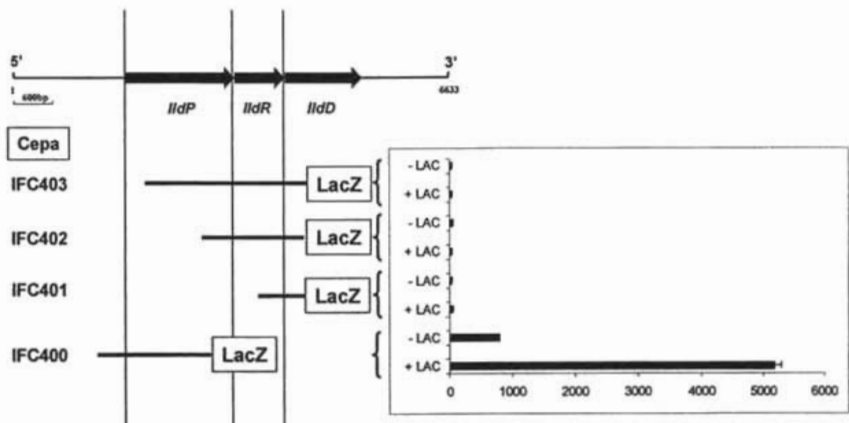


Figura 8. Fusiones transcripcionales al operón *lldPRD*. Los resultados sugieren que el operón es regulado por un único promotor.

Para este experimento se formularon dos preguntas: ¿La regulación es dependiente de L-lactato en la fusión?, y la segunda: De tener regulación, ¿es similar a la que se observó en los ensayos descritos anteriormente con el operón *lldPRD* (Iuchi, Aristarkhov et al. 1994) y (Dong, Taylor et al. 1993)? La

respuesta a la primera pregunta fue que sólo el fragmento que contiene la región río arriba de inicio de la permeasa (*lldP*) presenta inducción por L-lactato (y lo mismo ocurre si se fusiona a partir del promotor a cualquier altura del operón, datos no mostrados). La segunda pregunta tiene como respuesta que los niveles de expresión son tan altos como los reportados en la literatura.

Ningún fragmento interno presentó actividad promotora. El resultado sugiere que el control transcripcional del operón *lldPRD* es por medio de un sólo promotor ubicado en la región río arriba del inicio de *lldP*.

Los datos genéticos confirman la predicción planteada. Con este resultado, se plantea una nueva pregunta: ¿cómo es regulada la expresión de cada gen? En términos de regulación genética, las cantidades de cada gen en un proceso metabólico, o de adaptación, es necesario un balance entre las distintas actividades involucradas. Una posibilidad es que exista control post-transcripcional.

¿La RNasa E está involucrada en la modulación de los niveles de mRNA?

Dado que el operón aparentemente es regulado por una sola secuencia promotora, una posibilidad es que los niveles de cada mensajero pueden ser controlados por un mecanismo post-transcripcional.

Analizando la secuencia de nucleótidos del operón, se encontró que hay secuencias ricas en A y U, como se muestra en la Figura 9. Con ello se realizó un análisis más cuidadoso. En primera instancia no existe un consenso general claro para la secuencia que reconoce la RNasa E en el mRNA. Entre los mRNA cuya abundancia se ve afectada por la RNasa E, lo más frecuente es encontrar que las secuencias ricas en A+U son procesadas (McDowall, Lin-Chao et al. 1994). En un ensayo con oligonucleótidos y enzima purificada se propuso un contexto “degenerado” para el sitio de corte (Kaberdin 2003). A continuación se muestran esas secuencias en el operón *lldPRD*.

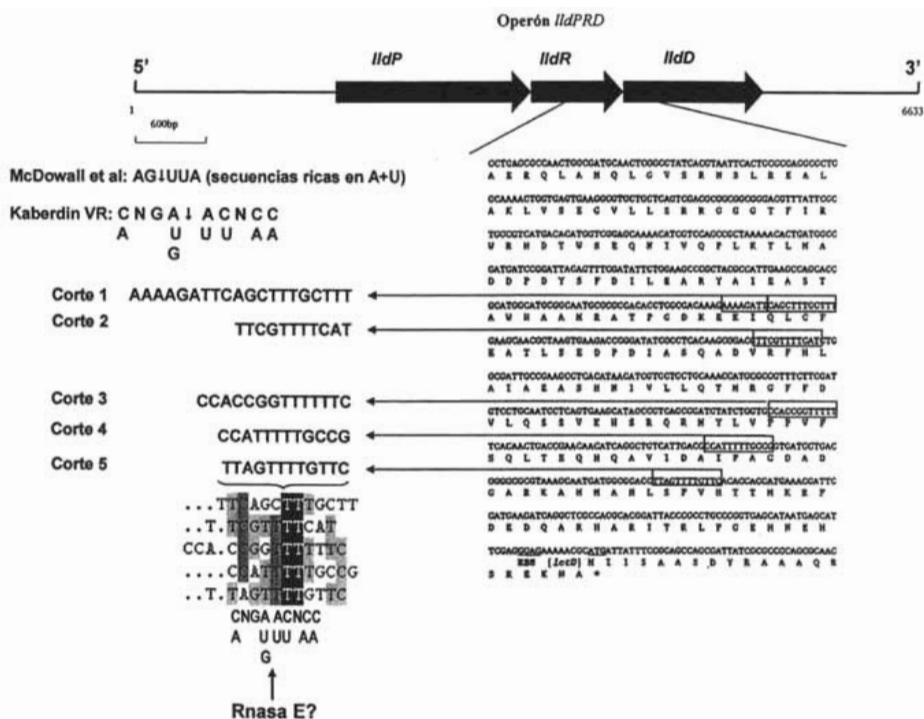


Figura 9. Se muestra la secuencia entre los genes *lldR* y *lldD* para la cadena codificante. En ella se encuentran regiones ricas en A y T. Se muestran los consensos identificados para la RNasa E. En un caso, se presenta la secuencia general (A+U (McDowall, Lin-Chao et al. 1994)) y en el otro, una secuencia degenerada para el corte de RNasa E (Kaberdin 2003), secuencias demostradas experimentalmente. Se muestra también un alineamiento de los 5 probables sitios de corte para la RNasa E.

El razonamiento de que debería de ser controlada la cantidad de mRNA de cada uno de los genes del operón, teniendo mayor importancia controlar la cantidad del regulador transcripcional. Si el principal sitio de corte está dentro de la secuencia que codifica para *lldR*, cuando sea cortado, el mRNA del regulador quedaría inactivado (ya no sería traducido). Una vez inactivado el mRNA de *lldR*, el mRNA menos abundante debería ser el de *lldP*, ya que la degradación ocurre en el sentido 3' → 5', así el sitio de corte coincide con el mRNA del segundo gen menos abundante.

Para demostrar que ese es el caso, se diseñó el siguiente experimento.

Efecto de RNasa E sobre el control post-transcripcional del operón lldPRD.

Para demostrar que la RNasa E participa en la degradación del mRNA del operón *lldPRD*, buscamos la acumulación del mRNA_{*lldPRD*}. Para ello, utilizamos dos cepas, una *rne*⁺ (CH1827) otra *rne*^{TS} (CH1828). La cepa CH1828 tiene un alelo para la RNasa E sensible a temperatura; se ha caracterizado pobremente el grado de sensibilidad, pero en términos generales a 43° C es letal (Aristarkhov, Mikulskis et al. 1996). En la Figura 10 se muestra el resultado del experimento.

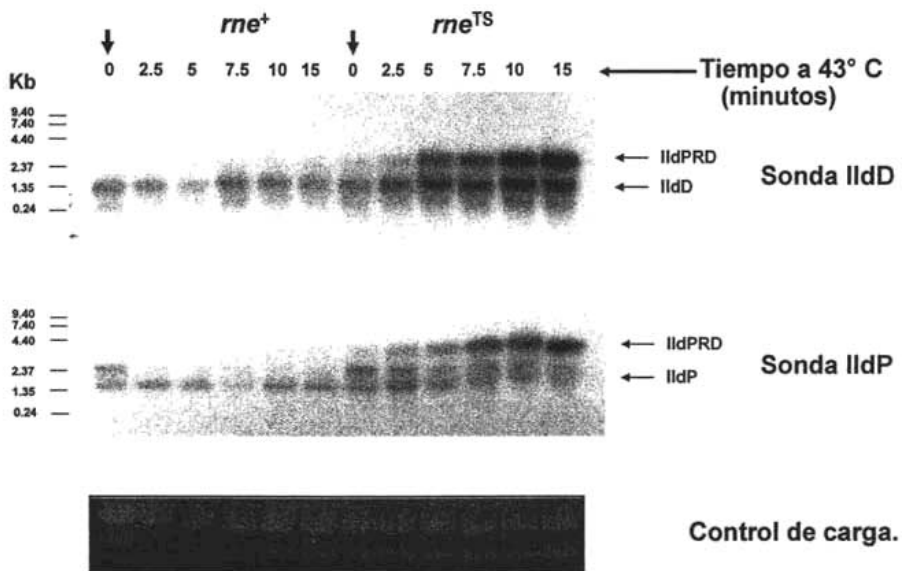


Figura 10. Análisis tipo Northern de RNA total obtenido de la cepa CH1827 (*rne*⁺) y CH1828 (*rne*^{TS}). Con el símbolo (↓) se señala la muestra antes de hacer el choque de calor (tiempo cero), el tiempo corresponde a los minutos posteriores al cambio del cultivo a un baño con agitación a 43° C. Cepas crecidas en presencia de L-lactato.

El resultado indica que la RNasa E participa en la degradación del mRNA del operón. Al someter a la mutante CH1828 a un choque de calor a 43° C, se observa la acumulación de una banda de aproximadamente 3.6 Kb, la cual

coincide con la banda esperada si se acumula el mRNA de los tres ORF. El efecto es observado tanto con una sonda interna para *lldP* como para *lldD*. En el caso de la cepa silvestre no es detectada la acumulación de una banda que correspondiese con el mRNA de toda su extensión.

En el caso del efecto sobre el mRNA de *lldD*, se percibe una ligera acumulación del mRNA de *lldD*. Una posible explicación a esto puede ser que la mutante a 43° C no se inactiva por completo la RNasa E y continúe procesando al mRNA, o bien, que la RNasa E degrada una parte importante del mRNA de *lldD* que determina su vida media.

No es así para *lldP*, en la que se ve claramente un efecto de acumulación del mRNA completo. Cabe señalar, que la banda de aproximadamente 2.8 Kb, pudiera tratarse de un producto de procesamiento (corresponde al tamaño de *lldP* más una parte de la secuencia de *lldR*). Con esto, es posible proponer dos sitios de corte. En la Figura 9 se plantean cinco posibles sitios de corte; con el resultado para *lldP* podemos ver que si el mRNA es procesado en el sitio de corte 1, obtenemos la banda de ~1.6 kb que corresponde al ORF completo, mientras que si es procesado en el sitio de corte 4 o 5 se obtiene la banda de ~2.4 kb, la cual contiene parte de *lldR* (ver Figura 9).

En conclusión, el operón tiene un nivel extra de regulación: el mRNA es degradado de modo específico por la RNasa E; como propuesta, el sitio blanco es la región final de la secuencia de *lldR*, donde por comparación de secuencias pueden estar ubicados los sitios de corte. Es importante resaltar el hecho de que este modo de inactivación de *lldR* es sumamente eficiente.

Otras mutantes de RNasas.

Dado que la RNasa E parece tener un papel importante en el metabolismo del mRNA del operón, se pensó en eliminar la posibilidad de que otra enzima estuviese involucrada. Para ello, se probaron cepas mutantes en otras RNasas.

La primera, fue una mutante por inserción en el gen de la RNasa G , ya que es muy similar a la RNasa E, salvo que carece del dominio con el que interacciona con el degradosoma, (Lee, Bernstein et al. 2002). La RNasa III también está involucrada en el procesamiento de mRNA (Watson y Apirion 1985; Sun, Pertzov et al. 2005). Ambas enzimas son endoribonucleasas.

En la Figura 11 se muestra el resultado obtenido para una mutante que carece de la RNasa III y otra de la RNasa G.

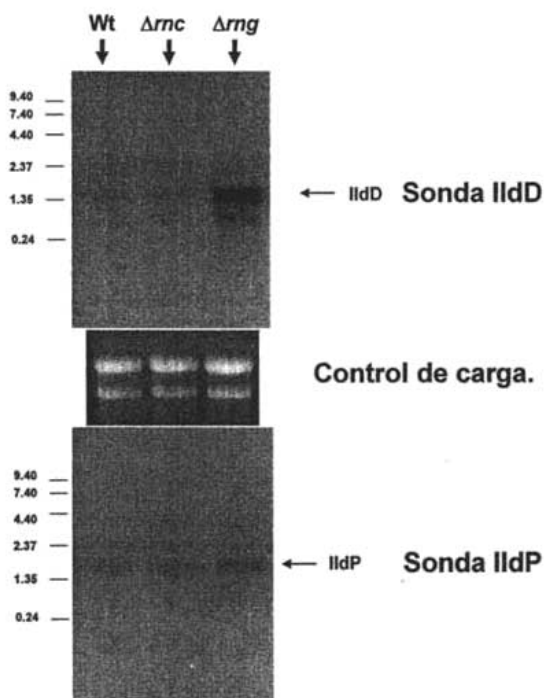


Figura 11. Análisis tipo Northern de las mutantes ECL2006 (Δrnc) y SK2538 (Δrng). Las cepas se crecieron en presencia de L-lactato.

Se observó un efecto interesante con la mutante en RNasa G: una acumulación exacerbada del mRNA de *lldD*. En el fondo genético que tiene la

cepa SK2538 se encontraron mayores niveles de *lldD*; el autoradiograma fue expuesto menos tiempo que el empleado en los ensayos anteriores (de una noche se redujo a dos horas), ya que mayor tiempo de exposición bloqueaba parcialmente la banda observada para la mutante ECL2006. En ausencia de la RNasa G no fue posible detectar una banda equivalente al mRNA de los tres ORF como en el caso de la mutante temperatura sensible de la RNasa E.

El resultado indica que para el caso del operón *lldPRD*, la RNasa G no tiene el mismo blanco que la RNasa E; quizá el sitio catalítico de las dos enzimas difieran en la preferencia de secuencias. Para demostrar esto es necesaria mayor experimentación.

Con los resultados obtenidos, se realizó un análisis tipo Northern con una mutante doble que carece de la RNasa G y es mutante condicional de la RNasa E. En la Figura 12 se muestran los resultados.

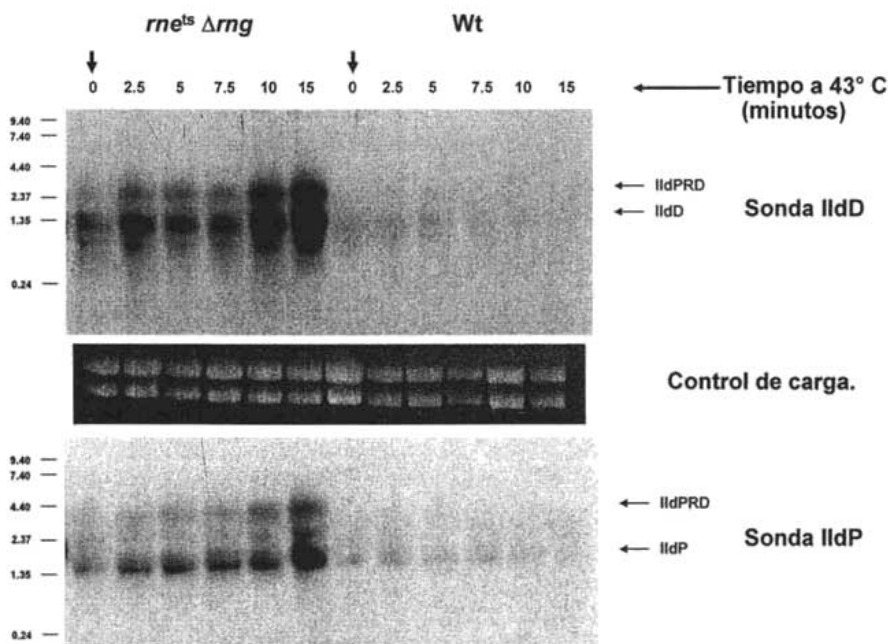


Figura 12. Análisis tipo Northern de las cepas SK2541 ($\Delta rneG$ y rne^{TS}) comparada con la cepa MG1693 (tipo silvestre). Las cepas se crecieron en presencia de L-lactato. El símbolo (\downarrow) indica el momento en el que se transfirió el cultivo a un baño con agitación a 43° C.

Como fue el caso en la Figura 11, fue necesario exponer por menor tiempo para obtener el autoradiograma. En la Figura 12, se reprodujo el resultado con la mutante sencilla en RNasa E, la acumulación del mRNA_{IldPRD}. Es importante destacar que la acumulación de *IldD* nuevamente se reproduce, lo que indica dos posibles explicaciones. La primera, es que el mRNA tiene un sitio de corte diferente al que tiene la RNasa E. La segunda, es que modifica de algún modo la vida media del mRNA, ya que desde el inicio del experimento está exacerbada la cantidad de RNA de *IldD* y se acumula en mayor grado una vez inactivada la RNasa E. Adicionalmente, parecen tener un efecto sinérgico sobre la estabilidad del mRNA de *IldP*, ya que cuando se inactivan ambas enzimas, ocurre la acumulación también del mRNA de *IldP*.

En conjunto, se presenta un esquema más complicado para la regulación del operón. Además, tiene un aporte interesante al campo de las RNAsas; por lo menos en el operón *lldPRD*, la RNasa G parece tener una secuencia de reconocimiento distinta a la reportada para la RNasa E, quizá por estructura secundaria en el RNA (determinante de accesibilidad), o bien, por la secuencia de nucleótidos.

Un argumento que refuerza que ambas enzimas tienen secuencias diferentes de reconocimiento, ya sea por la naturaleza del sitio activo de ambas o simplemente por que la RNasa E forma un complejo macromolecular que restringe la accesibilidad a ciertas secuencias, es que se ha reportado que formas truncas de RNasa E que carece del dominio de interacción al degradosoma son viables, aunque sin ese dominio el fenotipo es letal (Kido, Yamanaka et al. 1996), lo cual significa que su interacción con ciertas secuencias es específica para la RNasa E y no para la G (la pérdida del gen *rng* es viable) (Öw, Perwez et al. 2003).

La RNasa P tiene un papel importante en el metabolismo de tRNA, el precursor maduro del tRNA es su sustrato preferencial, mientras que el inmaduro o el ribosomal la inhiben (Gurevitz, Jain et al. 1983). También, en mRNA de operones policistrónicos ha sido descrita su participación (Li y Altman 2003).

Una cualidad que es importante señalar de esta enzima, es que en su estructura incorpora una molécula de RNA de 360 bases, y es dependiente de extremos 3' hidroxilados. Al igual que otras RNAsas, requiere también de iones para llevar a cabo su actividad enzimática (Gegenheimer y Apirion 1981). En la Figura 13 se muestran los resultados de una mutante condicional temperatura sensible para la RNasa P.

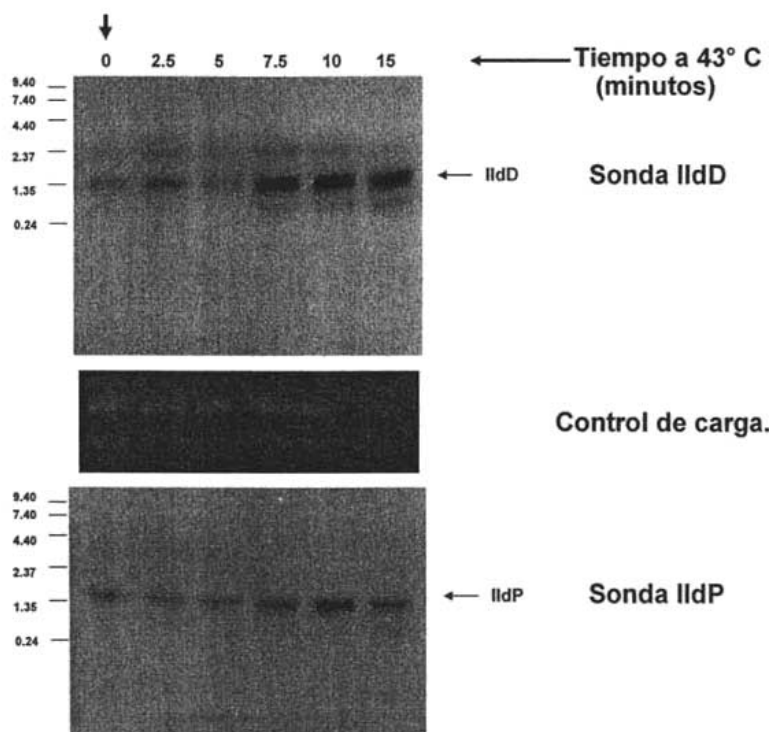


Figura 13. Análisis de la cepa N2020 (*rnp^{TS}*). La cepa fue crecida en presencia de L-lactato. ↓ Indica el momento en el que se transfirió el cultivo a un baño a 43° C. Respecto a la silvestre, ver la Figura 10.

Nuevamente se pudo observar variaciones en la estabilidad y acumulación del mRNA de *lldD*. La posibilidad de que el tiempo de duración del mRNA esté controlado a su vez por un grupo amplio de RNasas ha sido reportado previamente; es lo que regula el balance entre transcripción y traducción, así como los cambios en los programas genéticos (Kennell 2002).

Por todo ello se decidió realizar un ensayo para determinar la vida media del mRNA de los genes *lldD* y *lldP*.

Vida media de los mensajeros.

Para poder medir la vida media de los dos mRNA mas importantes del operón, es decir, *lldP* y *lldD*, se utilizó la cepa IFC404, que es la MC4100 (derivada de la cepa K-12 que para el experimento realizado es silvestre) transformada con el plásmido pLCT2 (Dong, Taylor et al. 1993), que tiene clonados todos los genes del operón y 1.5 kb río arriba y abajo del operón. La razón por la se utilizó el plásmido pLCT2, se debe a que el mRNA de *lldP* es muy poco abundante y así se facilitaría el poder detectar ese mRNA en particular: Para lograrlo se incrementó el número de moléculas del operón por célula, el vector en el que esta clonado es el pBR322, que da aproximadamente 20 copias por célula (Dykxhoorn, St Pierre et al. 1996).

Se trató con 200 µg/ml de rifampicina, un potente inhibidor de la RNA polimerasa (afecta la subunidad β), en presencia de L-lactato. Se tomaron muestras para aislar RNA a distintos tiempos y se analizaron por hibridización tipo Northern. El resultado se muestra en la Figura 14.

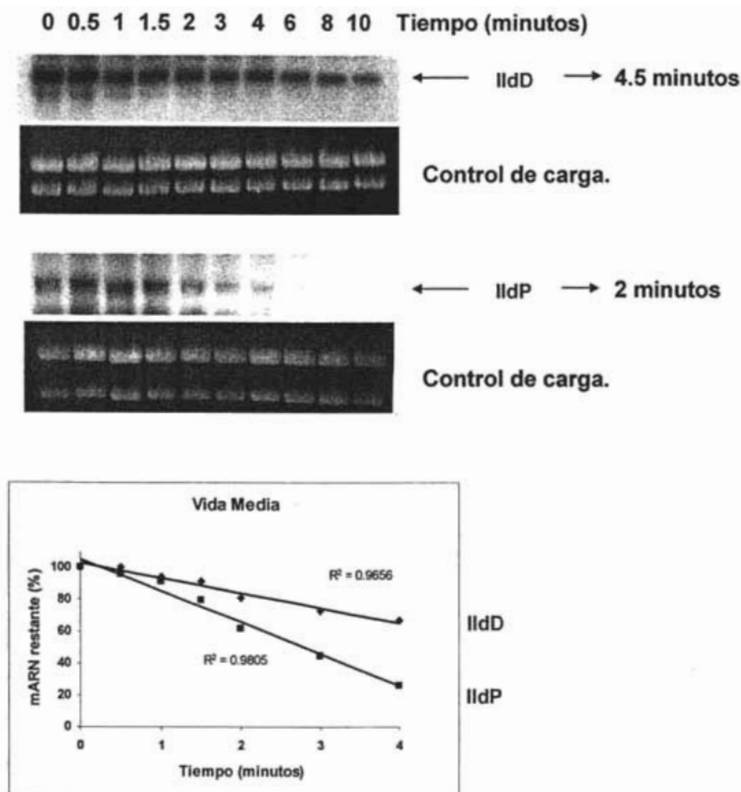


Figura 14. Vida media de los mRNA de *lldP* y *lldD*. La cepa IFC404 se creció en presencia de L-lactato a 37° C.

El mRNA de *lldP* tiene una vida media de aproximadamente la mitad de la de *lldD* (2 y 4.5 minutos respectivamente). Este resultado contribuye con la idea de que existe más de un mecanismo de control sobre cada uno de los mensajeros a nivel post-transcripcional. Primero, el gen del regulador es inactivado por un ataque endoribonucleico. Segundo, los dos genes restantes tienen una vida media diferencial. En conjunto, se responde a la cuestión de cómo se modula la dosis de cada mRNA.

Para un operón bi-cistrónico, se reportó una vida media diferencial entre los mRNA del operón (Nilsson y Uhlin 1991). Para el caso del operón *lldPRD*, es novedoso el hecho de que son tres genes los que conforman el operón, uno de ellos es inactivado por un corte endoribonucleico que separa a dos mensajeros, y estos a su vez tienen vida media diferente.

¿LldR activador o represor?

Hasta ahora se describió el control post-transcripcional del operón, quizá los cortes secundarios sobre el mRNA afecte también los niveles o eficiencia de traducción de cada uno de los genes. También sabemos que ArcA ejerce tanto *in vitro* como *in vivo* un efecto negativo sobre la transcripción del operón. Todo ello nos deja una pregunta fundamental: ¿Qué gen es el activador del operón?

Para responder esa pregunta, se generó una mutante en la que *lldR* estuviese interrumpido por un gen de resistencia a kanamicina; luego fue transferida esa mutación a un fondo genético limpio (en la cepa IFC400, que tiene como reportero una fusión transcripcional de *lacZ* a *lldP*, que como se mostró en la Figura 8 responde a la inducción por L-lactato).

Se clonó en el vector pACT3 el gen *lldR*, que es inducible por IPTG dado que está bajo la represión del gen *lacI^q* y es de bajo número de copias (3 por célula (Dykhhoorn, St Pierre et al. 1996)). Con este sistema transformamos la cepa Δ *lldR* con el plásmido *plldR*.

La Figura 15 muestra el resultado.

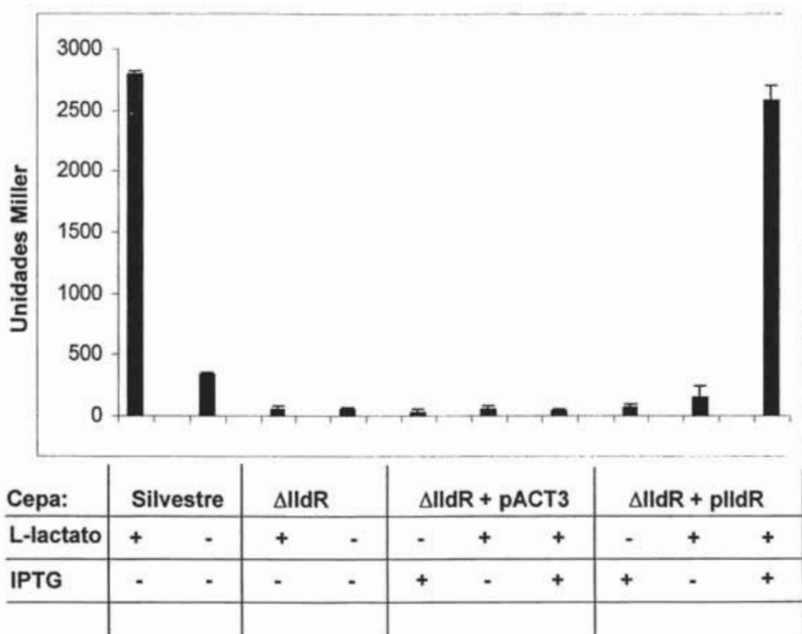


Figura 15. Actividad de β galactosidasa en la mutante IFC algo. Plásmido vacío. Ver materiales y métodos. +/- indican la adición desde el inicio del experimento del inductor señalado, ya sea IPTG o L-lactato.

Como se muestra en la Figura 15, la cepa que carece de mutaciones responde a la inducción por L-lactato, mientras que en la cepa mero diploide *lldP-lacZ* y Δ *lldR* pierde por completo esa regulación. Al transformar la cepa Δ *lldR* con el vector pACT3 vacío, no se observa ninguna activación en presencia de ambos inductores. En la cepa transformada con el plásmido *plldR* al añadir IPTG no se estimula la expresión del gen reportero; al añadir L-lactato solo ocurre un ligero incremento (que es despreciable, aunque puede ser reflejo de que el promotor deja escapar un poco de transcripción, pero sin ser suficiente para activar por completo al gen reportero). Finalmente, al incluir ambos inductores, recuperamos los niveles silvestres de inducción del gen reportero.

Los resultados sugieren que el producto de *lldR* es un activador. En estudios previos (Quail y Guest 1995; Lynch y Lin 1996), se propuso que la secuencia de unión de *lldR* se ubica río abajo del promotor principal del operón (LctP2), actuando de esa forma como un represor secundario (para asegurar que cuando no estuviese el metabolito L-lactato, no hubiese transcripción innecesaria). En un análisis comparativo de los miembros de la familia FadR (Rigali, Derouaux et al. 2002), se encontró una heterogeneidad muy elevada en los dominios llamados de “unión a ligando”, la mayoría de estos factores transcripcionales responden a metabolitos del medio. Con esa información se propuso que la secuencia blanco de *lldR* probablemente sea el consenso propuesto en (Lynch y Lin 1996).

Generalmente los activadores en bacterias tienen secuencias de unión que se ubican río arriba del promotor, o bien, en pocas ocasiones se encuentran entre las secuencias consenso -35 y -10 (Browning y Busby 2004). Recientemente se reportó que el activador FleQ del operón maestro flagelar de *Pseudomonas aeruginosa*, en algunos genes (en particular los relacionados con la exportación del aparato flagelar y la síntesis de flagelina) su sitio de unión es atípico, ya que se localiza enfrente de la RNA polimerasa (Jyot, Dasgupta et al. 2002).

Con estos datos, se propone a LldR como el activador transcripcional del operón *lldPRD*. Tomando la información de la literatura sobre el sitio de unión propuesto al DNA, se trata de una interacción atípica con el DNA, localizándose delante de la RNA polimerasa.

Comentarios finales.

La transferencia horizontal de genes juega un papel muy importante en la especiación bacteriana, ya que le brinda al huésped de los genes foráneos características que le permiten colonizar nuevos nichos ecológicos, obtener resistencias a metabolitos secundarios (antibióticos), o bien, dar variabilidad y diversidad a las respuestas que da a cambios ambientales. Una característica importante es que no está restringida la transferencia horizontal a cierto tipo de genes y, sorprendentemente, se ha visto incluso transferencia de genes tan conservados (usados para hacer la clasificación de organismos bacterianos) que codifican para subunidades ribosomales (Yap, Zhang et al. 1999).

Una función adicional de la organización bacteriana, es que el agrupar a los genes asegura conservar las funciones contenidas en el grupo (Plantinga, van der Does et al. 2004). Se ha documentado que el operón puede acarrear su propia regulación (Plantinga, van der Does et al. 2004). En la historia de *E. coli*, se ha visto que entre más genes son adquiridos por transferencia horizontal, también aumenta la frecuencia de genes en grupos ((Nakamura, Itoh et al. 2004)).

Los datos presentados en este trabajo sugieren que el operón *lldPRD* fue adquirido por transferencia horizontal, conservando su regulación y posiblemente haya incorporado nuevos elementos de control. Algunos argumentos que apoyan la idea son, la enzima LldD no comparte similitud a nivel de secuencia con otras enzimas del genoma de *E. coli*; es de las muy pocas que dependen de FMN. La factibilidad de encontrar la misma organización genética en organismos que no están directamente relacionados con *E. coli*.

La organización que presenta el operón es poco usual, ya que existen pocos casos reportados en el que un regulador transcripcional esté contenido dentro del mismo operón. En muchos casos se ha visto el procesamiento postranscripcional que controla los niveles de mRNA de cada gen (Nilsson y Uhlin 1991; Fortina, Ricci et al. 2003; Mader, Hennig et al. 2004). Lo que no ha

sido reportado es que ocurran simultáneamente dos niveles de regulación en un mismo operón. El primero, que es inactivar uno de los genes del operón, al hacer un corte endoribonucleico en *lldR*, lo que evita sea traducido. El segundo, es que los mRNA de *lldD* y *lldP* tienen vida media diferente, determinante en la dosis particular para esos dos genes.

Finalmente, el control transcripcional del operón es atípico, por un lado las condiciones metabólicas de crecimiento determinan si es expresado o no (aerobiosis vs. anaerobiosis). En conjunto, la regulación del operón *lldPRD* reúne todos los niveles de control genético.

Perspectivas.

Caracterizar el sitio de corte de la RNasa E sobre el mRNA en la región entre *lldR* y *lldD*, para corroborar que las secuencias propuestas en el presente trabajo son en realidad el blanco de esa enzima.

Hacer fusiones traduccionales o ensayos de pulso y caza para determinar si los niveles de traducción de los tres genes es igual o no (ya que pueden estar presentes pasos limitantes en ella dependiendo de si existen estructuras secundarias en el mRNA que limiten la accesibilidad de los ribosomas).

Los datos en relación con *lldR* indican que es necesario para llevar a cabo la respuesta a la presencia de L-lactato, lo que sugiere se trata de un activador transcripcional (contrariamente a lo que se había propuesto anteriormente). Por ello, sería interesante caracterizar experimentalmente su sitio de unión al DNA para así corroborar su posición respecto al promotor *lctP2*. En consecuencia, se abre toda una gama experimental tanto *in vitro* (ensayos de cambio en la movilidad electroforética y de protección a DNasa I), como *in vivo* (fusiones transcripcionales del promotor con las secuencias identificadas mutadas).

Abreviaturas.

- **aa** aminoácidos
- **Abs** absorbencia
- **Amp** ampicilina
- **Arc** Acrónimo para Aerobic redox Control
- **ArcA-P** Regulador de respuesta en su forma fosforilada
- **AMPc** Adenosin Monofosfato cíclico
- **ATP** Adenosin trifosfato
- **Bla** betalactamasa
- **CCCP** carbonil m-clorofenilhidrazon cianida
- **CoA** Coenzima A
- **Cm** cloranfenicol
- **Cpm** cuentas por minuto
- **Da** Daltons
- **DNA** ácido desoxirribonucleico
- **EMSA** Cambio en la movilidad electroforética
- **FAD** Flavin Adenindinucleótido
- **FMN** Flavin Mononucleótido
- **IPTG** isopropil-tio- β -D-galactosido
- **Kan** kanamicina
- **LldD** L-lactato deshidrogenasa
- **LldP** L-lactato permeasa
- **LldR** Regulador transcripcional del operón *lldPRD*
- **MOPS** Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
- **mRNA** RNA mensajero
- **ORF** Marco de lectura abierta (open reading frame)
- **pb** Pares de bases
- **RNA** ácido ribonucleico
- **rRNA** ácido ribonucleico ribosomal
- **tRNA** ácido ribonucleico de transferencia
- **rpm** revoluciones por minuto
- **Tris** tris hidroximetil aminometano

Bibliografia.

- Aristarkhov, A., A. Mikulskis, et al. (1996). "Translation of the adhE transcript to produce ethanol dehydrogenase requires RNase III cleavage in Escherichia coli." J Bacteriol **178**(14): 4327-32.
- Babitzke, P. and S. R. Kushner (1991). "The Ams (altered mRNA stability) protein and ribonuclease E are encoded by the same structural gene of Escherichia coli." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(1): 1-5.
- Barnes, E. M., Jr. and H. R. Kaback (1971). "Mechanisms of active transport in isolated membrane vesicles. I. The site of energy coupling between D-lactate dehydrogenase and beta-galactoside transport in Escherichia coli membrane vesicles." J Biol Chem **246**(17): 5518-22.
- Blattner, F. R., G. Plunkett, 3rd, et al. (1997). "The complete genome sequence of Escherichia coli K-12." Science **277**(5331): 1453-74.
- Browning, D. F. and S. J. Busby (2004). "The regulation of bacterial transcription initiation." Nat Rev Microbiol **2**(1): 57-65.
- Cam, K., G. Rome, et al. (1996). "RNase E processing of essential cell division genes mRNA in Escherichia coli." Nucleic Acids Res **24**(15): 3065-70.
- Campbell, J. W. and J. E. Cronan, Jr. (2001). "Escherichia coli FadR positively regulates transcription of the fabB fatty acid biosynthetic gene." J Bacteriol **183**(20): 5982-90.
- Carpousis, A. J. (2002). "The Escherichia coli RNA degradosome: structure, function and relationship in other ribonucleolytic multienzyme complexes." Biochem Soc Trans **30**(2): 150-5.
- Chauhan, A. K., A. Miczak, et al. (1991). "Sequencing and expression of the rne gene of Escherichia coli." Nucleic Acids Res **19**(1): 125-9.
- Choi, H., S. Kim, et al. (2001). "Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor." Cell **105**(1): 103-13.
- Claverie-Martin, F., M. R. Diaz-Torres, et al. (1989). "Cloning of the altered mRNA stability (ams) gene of Escherichia coli K-12." J Bacteriol **171**(10): 5479-86.
- Dong, J. M., J. S. Taylor, et al. (1993). "Three overlapping lct genes involved in L-lactate utilization by Escherichia coli." J Bacteriol **175**(20): 6671-8.
- Doss, M. and W. K. Philipp-Dormston (1973). "Regulatory link between lactate dehydrogenase and biosynthesis of porphyrin and heme in microorganisms." Enzyme **16**(1): 28-41.
- Doss, M. and W. K. Philipp-Dormston (1974). "The effect of DL-lactate on regulation of porphyrin and heme biosynthesis in Escherichia coli and Achromobacter." FEBS Lett **40**(1): 173-5.
- Drury, L. S. and R. S. Buxton (1985). "DNA sequence analysis of the dye gene of Escherichia coli reveals amino acid homology between the dye and OmpR proteins." J Biol Chem **260**(7): 4236-42.
- Dykxhoorn, D. M., R. St Pierre, et al. (1996). "A set of compatible tac promoter expression vectors." Gene **177**(1-2): 133-6.
- Fortina, M. G., G. Ricci, et al. (2003). "Unusual organization for lactose and galactose gene clusters in Lactobacillus helveticus." Appl Environ Microbiol **69**(6): 3238-43.

- Futai, M. and H. Kimura (1977). "Inducible membrane-bound L-lactate dehydrogenase from *Escherichia coli*. Purification and properties." J Biol Chem **252**(16): 5820-7.
- Gegenheimer, P. and D. Apirion (1981). "Processing of procaryotic ribonucleic acid." Microbiol Rev **45**(4): 502-41.
- Georgellis, D., S. Arvidson, et al. (1992). "Decay of ompA mRNA and processing of 9S RNA are immediately affected by shifts in growth rate, but in opposite manners." J Bacteriol **174**(16): 5382-90.
- Georgellis, D., O. Kwon, et al. (2001). "Quinones as the redox signal for the arc two-component system of bacteria." Science **292**(5525): 2314-6.
- Georgellis, D., A. S. Lynch, et al. (1997). "In vitro phosphorylation study of the arc two-component signal transduction system of *Escherichia coli*." J Bacteriol **179**(17): 5429-35.
- Gurevitz, M., S. K. Jain, et al. (1983). "Identification of a precursor molecular for the RNA moiety of the processing enzyme RNase P." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(14): 4450-4.
- Hall, M. N. and T. J. Silhavy (1981). "Genetic analysis of the ompB locus in *Escherichia coli* K-12." J Mol Biol **151**(1): 1-15.
- Hall, M. N. and T. J. Silhavy (1981). "The ompB locus and the regulation of the major outer membrane porin proteins of *Escherichia coli* K12." J Mol Biol **146**(1): 23-43.
- Hershberg, R., E. Yeger-Lotem, et al. (2005). "Chromosomal organization is shaped by the transcription regulatory network." Trends Genet **21**(3): 138-42.
- Ingledeu, W. J. and R. K. Poole (1984). "The respiratory chains of *Escherichia coli*." Microbiol Rev **48**(3): 222-71.
- Inoue, H., H. Nojima, et al. (1990). "High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids." Gene **96**(1): 23-8.
- Iuchi, S., A. Aristarkhov, et al. (1994). "Effects of nitrate respiration on expression of the Arc-controlled operons encoding succinate dehydrogenase and flavin-linked L-lactate dehydrogenase." J Bacteriol **176**(6): 1695-701.
- Iuchi, S., D. C. Cameron, et al. (1989). "A second global regulator gene (arcB) mediating repression of enzymes in aerobic pathways of *Escherichia coli*." J Bacteriol **171**(2): 868-73.
- Iuchi, S. and E. C. Lin (1988). "arcA (dye), a global regulatory gene in *Escherichia coli* mediating repression of enzymes in aerobic pathways." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(6): 1888-92.
- Iuchi, S., Z. Matsuda, et al. (1990). "The arcB gene of *Escherichia coli* encodes a sensor-regulator protein for anaerobic repression of the arc modulon." Mol Microbiol **4**(5): 715-27.
- Jiang, X. and J. G. Belasco (2004). "Catalytic activation of multimeric RNase E and RNase G by 5'-monophosphorylated RNA." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(25): 9211-6.
- Jyot, J., N. Dasgupta, et al. (2002). "FleQ, the major flagellar gene regulator in *Pseudomonas aeruginosa*, binds to enhancer sites located either upstream or atypically downstream of the RpoN binding site." J Bacteriol **184**(19): 5251-60.

- Kaberdin, V. R. (2003). "Probing the substrate specificity of *Escherichia coli* RNase E using a novel oligonucleotide-based assay." Nucleic Acids Res **31**(16): 4710-6.
- Kennell, D. (2002). "Processing endoribonucleases and mRNA degradation in bacteria." J Bacteriol **184**(17): 4645-57; discussion 4665.
- Keseler, I. M., J. Collado-Vides, et al. (2005). "EcoCyc: a comprehensive database resource for *Escherichia coli*." Nucleic Acids Res **33**(Database issue): D334-7.
- Kido, M., K. Yamanaka, et al. (1996). "RNase E polypeptides lacking a carboxyl-terminal half suppress a mukB mutation in *Escherichia coli*." J Bacteriol **178**(13): 3917-25.
- Kushner, S. R. (2002). "mRNA decay in *Escherichia coli* comes of age." J Bacteriol **184**(17): 4658-65; discussion 4657.
- Kwon, O., D. Georgellis, et al. (2000). "Phosphorelay as the sole physiological route of signal transmission by the arc two-component system of *Escherichia coli*." J Bacteriol **182**(13): 3858-62.
- Kwon, O., D. Georgellis, et al. (2000). "The ArcB sensor kinase of *Escherichia coli*: genetic exploration of the transmembrane region." J Bacteriol **182**(10): 2960-6.
- Lawrence, J. G. (1997). "Selfish operons and speciation by gene transfer." Trends Microbiol **5**(9): 355-9.
- Lawrence, J. G. (2003). "Gene organization: selection, selfishness, and serendipity." Annu Rev Microbiol **57**: 419-40.
- Lee, K., J. A. Bernstein, et al. (2002). "RNase G complementation of rne null mutation identifies functional interrelationships with RNase E in *Escherichia coli*." Mol Microbiol **43**(6): 1445-56.
- Li, Y. and S. Altman (2003). "A specific endoribonuclease, RNase P, affects gene expression of polycistronic operon mRNAs." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(23): 13213-8.
- Lin, R. J. and C. W. Hill (1983). "Mapping the xyl, mtl, and lct loci in *Escherichia coli* K-12." J Bacteriol **156**(2): 914-6.
- Link, A. J., D. Phillips, et al. (1997). "Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization." J Bacteriol **179**(20): 6228-37.
- Liou, G. G., W. N. Jane, et al. (2001). "RNA degradosomes exist in vivo in *Escherichia coli* as multicomponent complexes associated with the cytoplasmic membrane via the N-terminal region of ribonuclease E." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(1): 63-8.
- Liu, X. and P. De Wulf (2004). "Probing the ArcA-P modulon of *Escherichia coli* by whole genome transcriptional analysis and sequence recognition profiling." J Biol Chem **279**(13): 12588-97.
- Lynch, A. S. and E. C. Lin (1996). "Transcriptional control mediated by the ArcA two-component response regulator protein of *Escherichia coli*: characterization of DNA binding at target promoters." J Bacteriol **178**(21): 6238-49.
- Mackie, G. A. (1998). "Ribonuclease E is a 5'-end-dependent endonuclease." Nature **395**(6703): 720-3.

- Mackie, G. A., J. L. Genereaux, et al. (1997). "Modulation of the activity of RNase E in vitro by RNA sequences and secondary structures 5' to cleavage sites." *J Biol Chem* **272**(1): 609-16.
- Mader, U., S. Hennig, et al. (2004). "Transcriptional organization and posttranscriptional regulation of the *Bacillus subtilis* branched-chain amino acid biosynthesis genes." *J Bacteriol* **186**(8): 2240-52.
- Malpica, R., B. Franco, et al. (2004). "Identification of a quinone-sensitive redox switch in the ArcB sensor kinase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(36): 13318-23.
- McDowall, K. J., S. Lin-Chao, et al. (1994). "A+U content rather than a particular nucleotide order determines the specificity of RNase E cleavage." *J Biol Chem* **269**(14): 10790-6.
- Miller, J. H. (1972). "Experiments in Molecular Genetics." *Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, N.Y.*: 352-355.
- Misra, T. K. and D. Apirion (1979). "RNase E, an RNA processing enzyme from *Escherichia coli*." *J Biol Chem* **254**(21): 11154-9.
- Morita, T., H. Kawamoto, et al. (2004). "Enolase in the RNA degradosome plays a crucial role in the rapid decay of glucose transporter mRNA in the response to phosphosugar stress in *Escherichia coli*." *Mol Microbiol* **54**(4): 1063-75.
- Murakawa, G. J., C. Kwan, et al. (1991). "Transcription and decay of the lac messenger: role of an intergenic terminator." *J Bacteriol* **173**(1): 28-36.
- Nakamura, Y., T. Itoh, et al. (2004). "Biased biological functions of horizontally transferred genes in prokaryotic genomes." *Nat Genet* **36**(7): 760-6.
- Nilsson, P. and B. E. Uhlin (1991). "Differential decay of a polycistronic *Escherichia coli* transcript is initiated by RNaseE-dependent endonucleolytic processing." *Mol Microbiol* **5**(7): 1791-9.
- Nishimura, Y., Tan, I. K. P., Oghami, Y., Kohgami, K., and Kamihara, T (1983.). "Induction of membrane-bound L-Lactate dehydrogenase in *Escherichia coli* under conditions of nitrate respiration, fumarate reduction and trimethylamine-N-oxide reduction." *FEMS Microbiol Lett* **17**: 283-286.
- Nunez, M. F., O. Kwon, et al. (2002). "Transport of L-Lactate, D-Lactate, and glycolate by the LldP and GlcA membrane carriers of *Escherichia coli*." *Biochem Biophys Res Commun* **290**(2): 824-9.
- Ow, M. C. and S. R. Kushner (2002). "Initiation of tRNA maturation by RNase E is essential for cell viability in *E. coli*." *Genes Dev* **16**(9): 1102-15.
- Ow, M. C., T. Perwez, et al. (2003). "RNase G of *Escherichia coli* exhibits only limited functional overlap with its essential homologue, RNase E." *Mol Microbiol* **49**(3): 607-22.
- Plantinga, T. H., C. van der Does, et al. (2004). "Transporter's evolution and carbohydrate metabolic clusters." *Trends Microbiol* **12**(1): 4-7.
- Quail, M. A. and J. R. Guest (1995). "Purification, characterization and mode of action of PdhR, the transcriptional repressor of the pdhR-aceEF-lpd operon of *Escherichia coli*." *Mol Microbiol* **15**(3): 519-29.
- Rigali, S., A. Derouaux, et al. (2002). "Subdivision of the helix-turn-helix GntR family of bacterial regulators in the FadR, HutC, MocR, and YtrA subfamilies." *J Biol Chem* **277**(15): 12507-15.

- Rodriguez, C., O. Kwon, et al. (2004). "Effect of D-lactate on the physiological activity of the ArcB sensor kinase in *Escherichia coli*." J Bacteriol **186**(7): 2085-90.
- Rule, G. S., E. A. Pratt, et al. (1985). "Overproduction and nucleotide sequence of the respiratory D-lactate dehydrogenase of *Escherichia coli*." J Bacteriol **161**(3): 1059-68.
- Russell, S. a. (2001). "Molecular Cloning a Laboratory Manual. 3 ed ed." Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Press.
- Salgado, H., S. Gama-Castro, et al. (2004). "RegulonDB (version 4.0): transcriptional regulation, operon organization and growth conditions in *Escherichia coli* K-12." Nucleic Acids Res **32**(Database issue): D303-6.
- Simons, R. W., F. Houman, et al. (1987). "Improved single and multicopy lac-based cloning vectors for protein and operon fusions." Gene **53**(1): 85-96.
- Sun, W., A. Pertzov, et al. (2005). "Catalytic mechanism of *Escherichia coli* ribonuclease III: kinetic and inhibitor evidence for the involvement of two magnesium ions in RNA phosphodiester hydrolysis." Nucleic Acids Res **33**(3): 807-15.
- Tanaka, Y., Y. Anraku, et al. (1976). "*Escherichia coli* membrane D-lactate dehydrogenase. Isolation of the enzyme in aggregated form and its activation by Triton X-100 and phospholipids." J Biochem (Tokyo) **80**(4): 821-30.
- Tarmy, E. M. and N. O. Kaplan (1965). "Interacting binding sites of L-specific lactic dehydrogenase of *Escherichia coli*." Biochem Biophys Res Commun **21**(4): 379-83.
- Tarmy, E. M. and N. O. Kaplan (1968). "Kinetics of *Escherichia coli* B D-lactate dehydrogenase and evidence for pyruvate-controlled change in conformation." J Biol Chem **243**(10): 2587-96.
- Vanzo, N. F., Y. S. Li, et al. (1998). "Ribonuclease E organizes the protein interactions in the *Escherichia coli* RNA degradosome." Genes Dev **12**(17): 2770-81.
- Watson, N. and D. Apirion (1985). "Molecular cloning of the gene for the RNA-processing enzyme RNase III of *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(3): 849-53.
- Wong, P., S. Gladney, et al. (1997). "Mathematical model of the lac operon: inducer exclusion, catabolite repression, and diauxic growth on glucose and lactose." Biotechnol Prog **13**(2): 132-43.
- Yamamoto, K., K. Hirao, et al. (2005). "Functional characterization in vitro of all two-component signal transduction systems from *Escherichia coli*." J Biol Chem **280**(2): 1448-56.
- Yap, W. H., Z. Zhang, et al. (1999). "Distinct types of rRNA operons exist in the genome of the actinomycete *Thermomonospora chromogena* and evidence for horizontal transfer of an entire rRNA operon." J Bacteriol **181**(17): 5201-9.
- Zheng, M., F. Aslund, et al. (1998). "Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation." Science **279**(5357): 1718-21.