



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
Facultad de Estudios Superiores  
Zaragoza



# *Regulación de la expresión del operón lldPRD en Escherichia coli*

---

## **TESIS**

*Área: Biología Molecular*

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

***Brenda Elizabeth Terrazas Torres***

DIRECTOR

**DR. ADRIÁN FERNANDO ÁLVAREZ**

Instituto de Fisiología Celular

ASESOR INTERNO

**M EN B.E. ENRIQUE MENDIETA MÁRQUEZ**

MÉXICO, D. F., A JUNIO DEL 2015.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

El presente proyecto es, en gran parte, el resultado del trabajo y esfuerzo de muchas personas que me han acompañado y guiado por el camino de la investigación, quizás las personas más directamente implicadas en ello, son los miembros del proyecto en el que se enmarca este trabajo. Sobre todo el Dr. Adrián F. Álvarez, director de ésta tesis, que ha podido combinar el rigor científico y metodológico con un continuo ánimo y confianza en el proyecto.

Agradezco al Dr. Dimitris Georgellis, quien confió desde el primer momento en mi capacidad para llevar a cabo el trabajo, que detrás de puertas siempre se encontró guiando y revisando el trabajo, y me abrió las puertas del laboratorio 226 norte del IFC UNAM.

Agradezco el apoyo técnico en el desarrollo de este trabajo de Tesis a la M en C. Claudia Rodríguez Rangel.

Agradezco el apoyo económico brindado a los siguientes proyectos:

Bacterial Plasma Membrane Microdomains: Control of Two Component System Signaling and Beyond. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) #178033.

Control of Microbial Gene Expression by Extra-cellular Stimuli. De la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), #IN206412 y # IN209215.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

A pesar de que la presente obra sólo es responsabilidad mía, la misma no se habría podido llevar a cabo sin el apoyo de muchas personas. Apoyo incondicional de mi familia, que se han preocupado por mí desde que nací y sé que siempre podré contar con ellos.

A mis padres María E. Torres y José A. Terrazas quienes con su palabras de aliento, no me dejaban decaer para que siguiera adelante, siempre perseverante para que cumpliera con mis ideales y gracias por soportar mi actitud hacia el mundo de nunca quedarme con las ganas de nada.

Mi hermano RRTT que aunque pareciera que vivimos en una guerra infinita, podemos unirnos para lograr nuestros objetivos y sobre todo por ser siempre tan paciente conmigo.

A Ricardo Hernández que con su apoyo constante y amor incondicional ha sido el culpable de que mi espíritu sea cada vez más libre y vaya cada vez más lejos, por ser fuente de calma y consejo en todo momento. Por Tomarnos de la mano y hacer frente a al cambio, por que juntos vamos a comernos el mundo entero.

Los grandes amigos son difíciles de encontrar, difíciles de dejar e imposibles de olvidar, te debo todas las risas y el vacilón: Karla Atilano, Elizabeth Viniegra, Lisandro Hernández, Coral Aguilar, Nadia Gudiño, Hugo Olivera, Victoria Martínez, Laura Suárez, Josefina Galván, Paulina Enríquez, Jimena Núñez y Arturo Eduardo entre otros.

Las charlas con los integrantes del laboratorio 226 norte del IFC fueron verdaderamente enriquecedoras, gracias: Eder F. Tamayo, Martha Irais, J. Enrique Guzmán, Hortencia Silva, J. Luis Terán, Adrián Alvarez y Claudia Rodríguez.

Agradezco por el amor de los que me rodean, lo que aprendí y lo que gané; lo que perdí y lo que estoy por vivir.

## Contenido

Abreviaturas .....	1
Resumen.....	2
I. Introducción.....	3
Puntos clave de la regulación génica.....	3
Regulación transcripcional.....	5
Sistema de Dos Componentes ArcBA .....	5
Operón IldPRD .....	7
Regulación post-transcripcional .....	10
Sitios de Unión Ribosomal (RBS).....	10
Estabilidad de mRNA.....	12
II. Justificación.....	14
III. Hipótesis.....	15
IV. Objetivos .....	16
General.....	16
Particulares.....	16
V. Material y Métodos .....	17
Cepas bacterianas y plásmidos .....	17
Medio de cultivo .....	18
Transformación de células.....	18
Purificación de plásmidos.....	18
Preparación de células competentes .....	18
Transformación de células .....	19
Integración de plásmidos al cromosoma celular .....	20
Extracción de RNA.....	22
Northern Blot .....	23
Preparación de las sondas específicas y marcador radioactivo .....	23
<i>Primer Extension</i> .....	24
VI. Resultados y discusión .....	25
VII. Conclusión.....	37
VIII. Propuestas .....	38

IX.Referencias Bibliográficas..... 39

## Abreviaturas

µg	Microgramo
µl	Microlitros
30S	Subunidad pequeña del RNAr
A	Base Nitrogenada Adenina
AMPc	Adenosin Monofosfato Cíclico
Arc	<i>Anoxic Redox Control</i> : Control Redox Anóxico
Asp54	Residuo conservado de Aspartato en la posición 54
Asp576	Residuo conservado de Aspartato en la posición 576
CPR	<i>Cyclic AMP Receptor Protein</i> : Proteína receptora de AMPc
C	Base Nitrogenada Citosina
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> : Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleótido
G	Base Nitrogenada Guanina
His576	Residuo conservado de Histidina en la posición 576
His717	Residuo conservado de Histidina en la posición 717
Lab.	Laboratorio
LB	Luria-Bertani (Medio compuesto para crecimiento celular)
ml	Mililitros
MLV	<i>Murine leukemia virus</i> : Virus de la Leucemia Murina
mRNA	ARN mensajero
nt	nucleótidos
Pi	Grupo fosfato
pmol	Picomol
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> : Ácido Ribonucleico
rRNA	ARN ribosomal
RT	<i>Reverse Transcriptase</i> : Transcriptasa Reversa
SD	Secuencia Shine-Dalgarno
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> : Dodecilsulfato sódico
SSC	<i>Saline-Sodium Citrate</i> : Citrato de Sodio
T	Base Nitrogenada Timina
TCS	<i>Two Component System</i> : Sistema de Dos Componentes
U	Base Nitrogenada Uracilo
UTR	<i>Untranslated Region</i> : Región no traducida de un gen
WT	<i>Wild-Type</i> : Tipo Silvestre (Cepa silvestre)

## Resumen

En el genoma de *Escherichia coli* se encuentra el operón *lldPRD*, el cual transcribe un mRNA policistrónico encargado del metabolismo de L-lactato, cuando el microorganismo crece con este compuesto como fuente única de carbón y en condiciones de crecimiento aeróbico.

El transcrito codifica tres enzimas que se encuentran en el siguiente orden: una permeasa (P) que facilita el transporte celular de L-lactato, un regulador transcripcional (R) que activa o reprime la transcripción en presencia o ausencia del inductor y L-lactato deshidrogenasa (D), esta enzima se encuentra en la membrana citoplasmática interna y desarrolla un papel importante en la cadena respiratoria.

Durante este proyecto seguimos los diferentes puntos posibles de la regulación genética del operón *lldPRD*, para averiguar en cuál, el mRNA policistrónico se partía, pues en la célula los transcritos se encuentran en cantidades diferentes, esto a través de varios ensayos en cepas mutantes y en silvestres de *Escherichia coli*.

Encontramos que la cantidad diferencial de proteínas codificadas por el operón se debe principalmente al procesamiento enzimático de la RNasa E, que escinde el mRNA policistrónico en un sitio dentro del gen *lldR* dejando a los genes *lldP* y *lldD* intactos. Por otra parte la RNasa P parece estar implicada en la estabilidad de los transcritos, sobre todo del segmento *lldD*.

Así la expresión diferencial de los genes individuales del operón *lldPRD* es debido principalmente al procesamiento endorribonucleotídico de la RNasa E y en menor grado a la RNasa P que está involucrada de algún modo en la estabilidad de los transcritos resultando en la diferencia de vida media de *lldP* y *lldD*.

## I. Introducción

Las bacterias son organismos procariotas unicelulares que contienen su información genética en uno o más cromosomas ubicados en una región del citoplasma denominado nucleoide. Los productos de los distintos genes son encontrados en cantidades muy diferentes, dependiendo de la cantidad requerida por la célula. Esto algunas veces es referido como el número de copias de una proteína y es determinado por muchos factores incluyendo la fuerza del promotor y la fuerza de la región de inicio de traducción (Wiley & Simon, 2004).

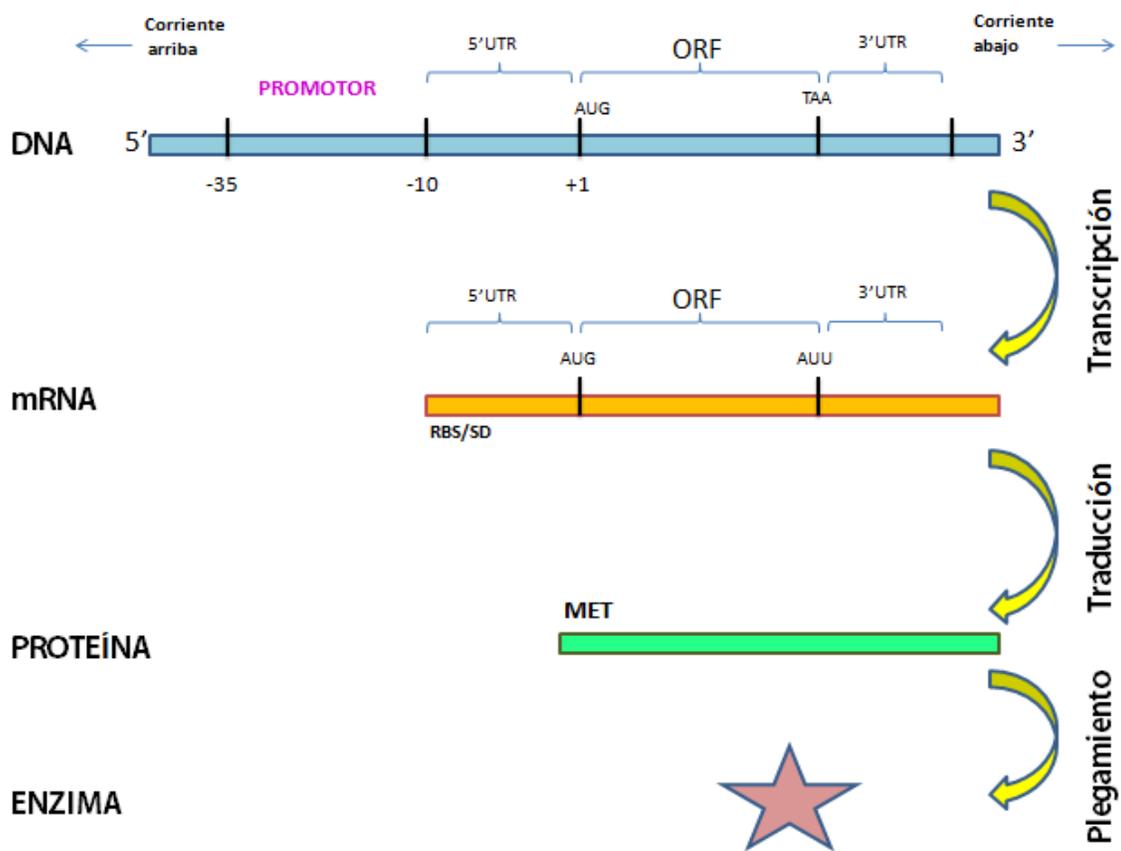
La cantidad del producto de un gen hecho por la célula también depende del estado y sitio en que la célula se encuentre. De manera general, los genes son expresados en la célula sólo cuando sus productos son necesarios y en las cantidades específicas para la célula. El proceso por el cual se generan proteínas específicas, en tiempo y cantidad requerido por la célula, es llamado regulación de la expresión genética y puede ocurrir en cualquier etapa de la expresión genética (Snyder & Chamness, 2007).

### Puntos clave de la regulación génica

Las bacterias son microorganismos con una capacidad extraordinaria de adaptación a diferentes condiciones ambientales. La expresión genética de todas las células depende varios procesos secuenciales (transcripción y traducción) que en su conjunto transfieren la información contenida en los genes (ordenados en nucleótidos) a una secuencia de aminoácidos (el orden, contenido de aminoácidos así como su estructura es parte fundamental de la proteína). Esto implica que los genes que lleva cada célula, se expresarán en un conjunto de caracteres celulares según las necesidades del organismo. Por lo tanto, existen mecanismos para controlar la expresión de los miles de genes contenidos, sintetizando sólo cuando son necesarios y en lo posible en las cantidades óptimas.

Las cantidades de una proteína pueden ser determinadas tanto a nivel de la transcripción para formar mRNA, como a nivel de la traducción del mismo para sintetizar la proteína. Además, las cantidades proteicas dependen también de la relación entre su síntesis y su degradación (Mandigan *et al.*, 2010).

Los sistemas que controlan el nivel de expresión de un gen particular son variados, y los genes son a menudo regulados por más de un sistema. Todo este proceso sucede dentro de la célula mediante un flujo de información y factores de regulación (Figura 1) (Wiley & Simon, 2004).



**Figura 1.** Regulación de la expresión de genes. **1)** Transcripción. El sitio llamado **PROMOTOR** que comprende las regiones -35 y -10 (secuencia consenso) es reconocido por la RNA polimerasa, holoenzima capaz de iniciar la transcripción. La región 5'UTR (secuencia líder) es pequeña y se encuentra entre el inicio de la transcripción y la traducción. La región 3'UTR se encuentra entre el codón de terminación y sitio final del transcrito. **2)** Traducción. La región RBS o también SD es el sitio reconocido por la subunidad del RNA ribosomal, en donde se acopla, reconoce el codón del inicio (AUG regularmente) para que se inicie la traducción. **3)** Plegamiento. Las proteínas sufren una serie de modificaciones post-traduccionales para dar la conformación final de la proteína.

## Regulación transcripcional

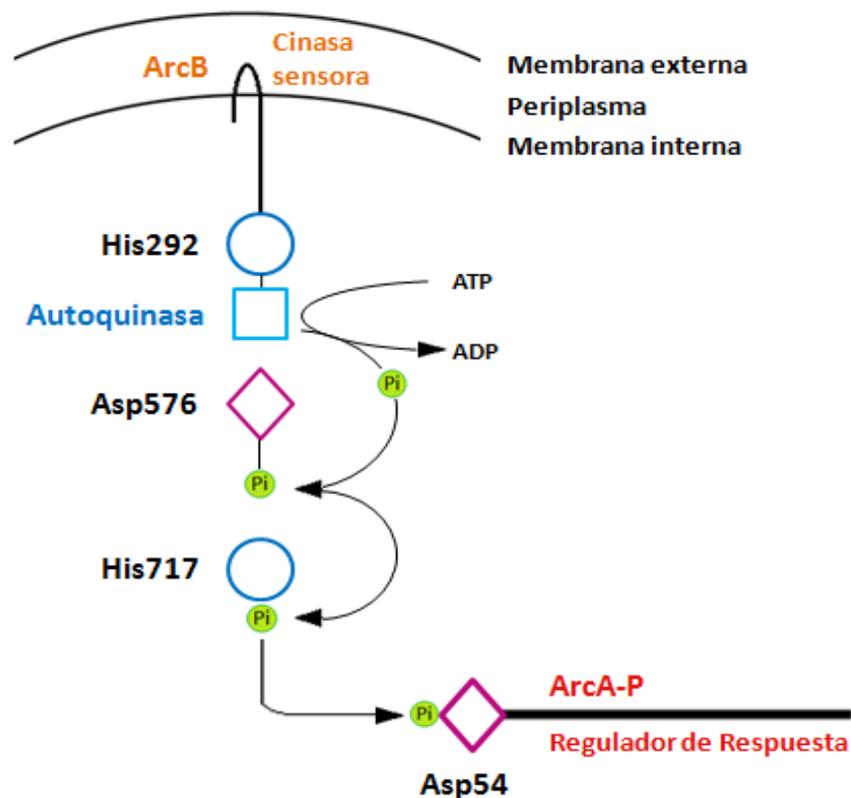
La transcripción es el proceso por medio del cual la información codificada en una de las hebras de DNA se copia en una molécula de RNA, proceso mediado por la RNA polimerasa dependiente de DNA (RNAP) que reconoce una serie de nucleótidos en el DNA llamada secuencia promotora, que cumple la función de reclutar y unir a la enzima para comenzar con la lectura y síntesis del mRNA correspondiente. Los promotores bacterianos se caracterizan por tener secuencias conservadas en las posiciones -10 y -35, tomando como número +1 el sitio de inicio de la transcripción. Usualmente la expresión de un gen es regulada controlando la cantidad de mRNA transcrito (Ríos, 2015).

Un importante mecanismo de regulación desarrollado por las bacterias, se basa en la activación o desactivación de la transcripción de un grupo de genes cuyos productos se encuentran altamente relacionados y organizados en una región del genoma que permite regular su expresión. Esta forma de organización se llama operón y le permite a la célula administrar en forma óptima sus reservas energéticas. Así, todos los genes del operón son transcritos de forma coordinada en un mRNA policistrónico, es decir multigénico (una sola unidad de mRNA que codifica para varias proteínas). La regulación transcripcional de un operón usualmente ocurre en el punto de inicio de ésta (Snyder & Chamness, 2007).

## Sistema de Dos Componentes ArcBA

Las bacterias más versátiles son aquéllas que contienen una amplia reserva de información genética que codifica para ciertos mecanismos que les permiten sobrevivir. Las señales o estímulos detectados por las bacterias son transducidos a través de un mecanismo primario, mecanismo que ha prevalecido en estos microorganismos y es conocido como Sistema de Dos Componentes (SDC) (Mitrophanov & Groisman, 2008).

En *Escherichia coli* uno de los SDC mejor estudiado, es el sistema de control de respiración aeróbica (ArcBA) que media la adaptación celular a los cambios en las condiciones redox presentes en el ambiente durante el crecimiento celular (Salmon *et al.*, 2005). El sistema Arc se encuentra compuesto por una cinasa sensora ArcB y su regulador de respuesta ArcA. El primer componente se encuentra anclado a la membrana citoplasmática por dos segmentos transmembranales. En condiciones anaeróbicas de crecimiento, ArcB actúa como una cinasa, se autofosforila y transfiere el grupo fosforilo de alta energía a ArcA mediante un fosforrelevo. El ArcA fosforilado (ArcA-P) puede unirse a los promotores de más de 300 operones y otros genes para regular su expresión (Figura 2) (Kwon *et al.*, 2000; Malpica *et al.*, 2006).

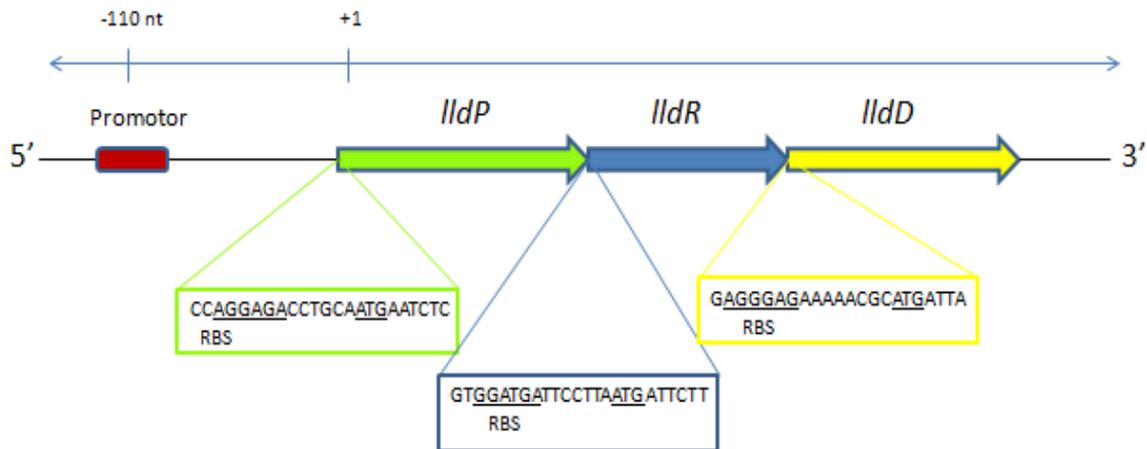


**Figura 2.** SDC ArcBA de *E. coli*. ArcB es una cinasa sensora anclada a la membrana citoplasmática por dos segmentos transmembranales, cataliza la fosforilación vía His292→Asp576→His717 de ArcB a ArcA en el residuo Asp54. La transmisión de señales se realiza desde el primer residuo conservado de Histidina (His292) que se autofosforila en presencia de ATP para llevar su grupo fosfato hasta el regulador de respuesta a su residuo de Aspartato (Asp 54) llevando a la forma ArcA-P, que activa o reprime la expresión de un operon.

Por el contrario, en condiciones aeróbicas ArcB se convierte en una fosfatasa específica para ArcA-P, desfosforilándolo y silenciando el sistema (Georgellis *et al.*, 1997; Kwon *et al.*, 2000). La poza de quinonas (ubiquinonas y menaquinonas) que se encuentra en la membrana plasmática y forma parte de la cadena de transporte de electrones en *E. coli* actúa como señal directa para la activación e inactivación del sistema (Georgellis *et al.*, 2001; Alvarez *et al.*, 2013). Además, la presencia de ciertos intermediarios del metabolismo anóxico o fermentativo (D-lactato, acetato y piruvato) aumentan el nivel de fosforilación de ArcB (Rodriguez *et al.*, 2004). Así el sistema ArcBA es un elemento clave en la regulación transcripcional que permite a las bacterias anaerobias facultativas detectar diversas condiciones de crecimiento respiratorio y adaptarse genéticamente al cambio (Alvarez *et al.*, 2013). Uno de los operones que codifica para enzimas partícipes para la asimilación de L-lactato (operón *lldPRD*) es reprimido directamente por el sistema ArcBA, pues en condiciones anaeróbicas ArcA se une en la posición -14 a +3 del operón impidiendo la formación del transcrito (Dong *et al.*, 1993; Aguilera *et al.*, 2008).

### Operón *lldPRD*

El operón *lldPRD* (antes llamado *lct*) de *E. coli* es responsable del metabolismo aeróbico de L-lactato, oxidándolo a su metabolito central, piruvato por la enzima L-lactato deshidrogenasa dependiente de flavin adenín dinucleótido (FAD) (Dong *et al.*, 1993). Anteriormente se propuso que este sistema podía ser transcrito por dos secuencias promotoras, P1 responsable de la transcripción basal bajo condiciones de no inducción y P2 activo sólo en presencia del inductor (Lynch & Lin 1996). Pero en estudios realizados por Aguilera (2008) se concluyó que el operón era transcrito por un solo promotor y su sitio de iniciación se encuentra 110 nucleótidos corriente arriba del codón de inicio ATG (Figura 3).



**Figura 3.** Organización de los elementos de regulación transcripcional del operón *lldPRD*, se encuentra en rojo la secuencia promotora, 110 nucleótidos corriente arriba del inicio de la transcripción, y el supuesto sitio -10 y -35 también fueron localizados (Aguilera, Campos et al. 2008). Se marcan en los recuadros los Sitios de Unión Ribosomal (RBS) y su respectivo codón de inicio de transcripción (ATG).

El operón *lldPRD* incluye tres genes inducibles al crecer en presencia de L-lactato. El gen *lldP* codifica para la enzima permeasa, *lldR* codifica para una proteína reguladora y el gen *lldD* que codifica para enzima L-lactato deshidrogenasa (Dong et al., 1993; Aguilera et al., 2008) (Figura 3).

### Gen *lldP*

Codifica una proteína permeasa que tiene 551 residuos de aminoácidos. Una proteína transmembranal llamada L-Lactatopermeasa (LidP) encargada del transporte de L-lactato desde el medio extracelular hacia el interior de la célula y es dependiente de la fuerza motriz de protones (Dong et al., 1993; Núñez et al., 2002).

### Gen *lldR*

La proteína codificante LidR pertenece a una de las cuatro subdivisiones (subfamilia FadR) de la familia de reguladores GntR. Esta familia llamada así por el represor del operón gluconato GntR de *Bacillus subtilis*, incluye

aproximadamente 1,300 miembros distribuidos en diversos grupos bacterianos y están involucrados en la regulación de diferentes procesos biológicos. Se ha demostrado que estos reguladores actúan como sensores ambientales para controlar los genes que están involucrados en la respuesta a estímulos externos. Los reguladores de la subfamilia muestran similitudes en el residuo 69 de la región N-terminal que determina el dominio de unión al DNA (Rigali *et al.*, 2002; Aguilera *et al.*, 2008).

Esta proteína LldR tiene 258 residuos de aminoácidos, posee una estructura secundaria mejor conocida como hélice-giro-hélice, que es uno de los principales motivos capaces de unirse al DNA y presenta homología a muchos otros factores transcripcionales bacterianos (Dong *et al.*, 1993; Rigali *et al.*, 2002). LldR en presencia de L-lactato en el medio actúa como un activador transcripcional, mientras que, en ausencia del inductor es un represor del operón *lldPRD* (Aguilera *et al.*, 2008).

### **Gen *lldD***

Codifica para una proteína de 369 residuos de aminoácidos llamada L-lactato deshidrogenasa que se encuentra asociada a la membrana celular y es dependiente de los flavín mononucleótidos (FMN). Ésta transforma el L-lactato en su metabolito central piruvato con la reducción de una flavina como cofactor. Dicha actividad enzimática depende de las condiciones aeróbicas de crecimiento, su actividad máxima es alcanzada en presencia de oxígeno y L-lactato (Futai & Kimura, 1977).

La producción de un gen dado está influenciada por muchos factores determinantes, cada uno de los cuales juega un papel en la producción de niveles adecuados de las proteínas codificadas. Para entender cómo se logra la producción diferencial de proteínas codificadas por un operón, se debe evaluar la contribución relativa de cada una, en decir, sus funciones dentro del organismo. De acuerdo a estudios anteriormente realizados y usando un análisis genómico comparativo, demuestran que la traducción diferencial del mRNA policistrónico es

un determinante clave de ajuste del nivel de proteínas. También concluyen que la regulación ocurre principalmente a nivel traduccional (Quax *et al.*, 2013).

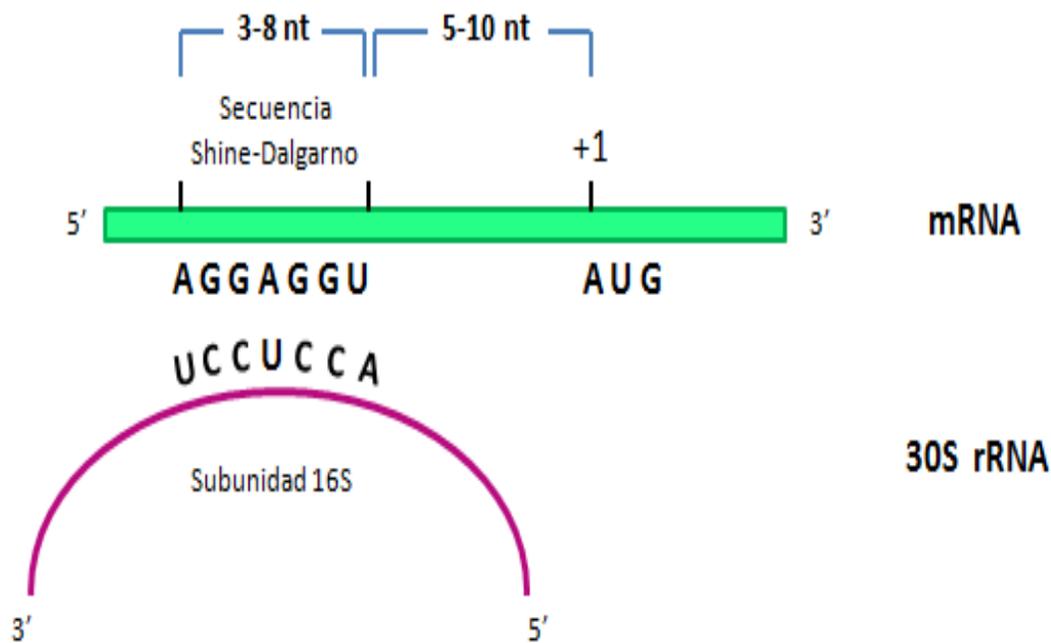
### **Regulación post-transcripcional**

La regulación de producción proteica puede ser controlada después de transcribir el operón, pues se ha observado que los niveles de proteína celular en general, no están correlacionados con su correspondiente nivel de mRNA. La cantidad de mRNA se encuentra determinada por: la estabilidad del transcrito (mRNA) y la eficiencia de la traducción. La diferencia en los niveles de mRNA correspondiente a los genes dentro del operón puede ser debido a una transcripción interna (que sean varios transcritos en lugar de uno solo), procesamiento interno (serie de modificaciones en el mRNA) y decaimiento diferencial del mRNA policistrónico.

### **Sitios de Unión Ribosomal (RBS)**

Después de que el operón ha sido transcrito a su mRNA policistrónico, el siguiente paso es la unión de los ribosomas y la traducción a su proteína específica. La traducción es un proceso complejo que comprende tres estados: iniciación, elongación y terminación. La traducción es primariamente regulada durante la iniciación, en este paso se realiza la unión de los ribosomas en un sitio específico del mRNA (Figura 4); por ello, este paso depende de la eficiencia y precisión con que los ribosomas se unan a su Región de Inicio de la Traducción (TIR) específico (McCarthy & Gualerzi, 1990). El sitio TIR comprende el codón de inicio de la traducción en combinación con la secuencia rica en bases púricas (A/G) llamada Shine-Dalgarno (SD) o RBS y potenciadores traduccionales que son secuencias ricas en A/U y pocas Gs ubicadas frente a SD o río arriba del codón de iniciación que sirven para asegurar y/o mejorar la síntesis de proteínas (Vimberg *et al.*, 2007).

La secuencia SD posee homología con el extremo 3'-OH terminal de la molécula 16S que es parte de la subunidad 30S ribosomal (el sitio se conoce como ASD), esta secuencia ayuda al correcto alineamiento de los ribosomas a su mRNA, pues define la región de inicio de la traducción (TIR) (McCarthy & Gualerzi, 1990; Kozak, 2005; Vimberg *et al.*, 2007).



**Figura 4.** Esquema de la Región de Inicio Traduccional (TIR) en un mRNA. El sitio Shine-Dalgarno (SD) su tamaño típico es de 4 o 5 nucleótidos (puede ser de entre 3-8 nt de largo), se encuentra aproximadamente de 5-10 nucleótidos corriente arriba del codón de inicio, es una secuencia rica en purinas y complementaria a la secuencia 3' terminal de la subunidad 16S ribosomal (Kozak 2005). El sitio de inicio de traducción se encuentra definido por los codones AUG principalmente, en menor proporción GUG y en raros casos CUG, UUG o AUA.

En operones policistrónicos, el ribosoma se disocia del mRNA después de traducir el primer gen, el siguiente gen tiene su propio sitio de unión al ribosoma que es independiente y así, la eficiencia de traducción podría variar en los genes subsecuentes. Este efecto se conoce como polaridad, es un medio alternativo al mecanismo de atenuación, en el cual se logran niveles diferentes de expresión genética del mismo operón (Wiley & Simon, 2004). Este complejo sistema de reconocimiento debe encontrarse en sitio y forma para que pueda iniciarse la

traducción, pues cualquier alteración puede detenerla o alterarla. También cuenta con un amplio número de reguladores que pueden involucrar la represión por parte de una proteína ribosomal que bloquea el RBS, impidiendo la unión del ribosoma, o alterando la conformación estructural del mRNA (Mandigan *et al.*, 2010).

## Estabilidad de mRNA

El decaimiento de un transcrito es un importante evento para la regulación genética en bacterias, el cual se encuentra regulado por ribonucleasas, por lo que el mRNA puede ser degradado antes de su traducción. Las especies de mRNA difieren ampliamente con respecto a su estabilidad metabólica presentando una velocidad de decaimiento propia (Arriano, 1993; Baumberg, 1999).

## Ribonucleasas

Las endorribonucleasas remueven endonucleótidos de los elementos de estabilización (conocidos como estructuras Stem-loop o en forma de horquilla) que impiden la degradación progresiva por exoribonucleasas (Baumberg, 1999). En *E. coli*, la degradación de la mayoría de mRNA se considera que inicia principalmente por la escisión interna mediada por la RNAsa E, una endonucleasa que corta el RNA de cadena simple en regiones ricas en A-U. Con menos frecuencia, el decaimiento del mRNA en *E. coli* comienza con otras endonucleasas: RNAsa III, RNAsa G, o RNAsa P (Deana & Belasco, 2005).

La degradación del mRNA también es llevado a cabo por exonucleasas principalmente: polinucleótido fosforilasa (PNPasa) y RNasa II, llevando el mRNA a su estado mononucleotídico. Estas enzimas son exonucleasas que catalizan en dirección 3' a 5' degradando RNA de cadena simple a partir de extremo 3', y las estructuras de horquilla que pueden proteger al mRNA de un potencial ataque exoribonucleotídico (Belasco & Higgins, 1988; Arriano, 1993). Individualmente las mutaciones a cualquiera de estas dos enzimas tiene poco efecto en el tiempo de

vida media del mRNA pero una inactivación de ambos genes resulta letal para la célula (Baumberg, 1999).

La estabilidad dispar de los mensajeros en bacterias es resultado de la susceptibilidad que tengan éstos a la degradación por endorribonucleasas y exorribonucleasas, también de las diferencias existentes en la secuencia y estructura de los mRNA (Belasco & Higgins, 1988; Ross, 2001).

## II. Justificación

El operón *lldPRD* de *E. coli* está involucrado en el metabolismo de L-lactato, que codifica para dos enzimas involucradas en el metabolismo celular (LldD y LldP) y otro gen que codifica para un regulador transcripcional (LldR). Sin embargo, el orden de los genes es una característica interesante del operón pues el gen que regula la transcripción se encuentra localizado entre las regiones codificantes para las dos enzimas. Por ello la forma en que se regula este gen debiera representar una forma más complicada que la de otros genes.

### III. Hipótesis

La regulación genética en todos los seres vivos es de vital importancia para no sobregirar los gastos energéticos, por ello supondríamos, que las cantidades de las proteínas codificantes debieran ser diferentes, pues la región reguladora debería ser requerida en menores cantidades. Por lo tanto debe existir una forma de regulación del operón en cualquier estadio que permita la expresión diferencial de cada uno de los genes que lo componen.

Suponemos que el procesamiento y estabilidad del mRNA asegura la expresión de los genes de forma individual en cantidades diferentes. En el caso del operón *lldPRD* la regulación está dada a nivel post-transcripcional, por una escisión interna en el sitio de *lldR* mediado por la RNasa E. Así las enzimas permeasa y L-lactato deshidrogenasa se encuentran en cantidades mayores que la proteína reguladora.

## IV. Objetivos

### General

Determinar el mecanismo molecular de regulación genética de la expresión de las proteínas codificadas por el operón *lldPRD* en *Escherichia coli*.

### Particulares

1. Determinar la expresión del operón *lldPRD* con y sin el inductor (L-lactato) en cepas MC4100 (cepa silvestre) en medio mínimo (M9) con un ensayo Northern blot.
2. Buscar promotores internos en el operón *lldPRD*, que puedan controlar la expresión de los genes *lldP*, *lldR* y *lldD* mediante fusiones transcripcionales *-lacZ* que lleven deleciones secuenciales en las regiones corriente arriba, mediante la medición de su actividad  $\beta$ -galactosidasa.
3. Determinar si existe una traducción diferencial de los genes *lldP*, *lldR* y *lldD*, probando la fuerza ejercida por los diferentes Sitios de Unión Ribosomal (RBS), mediante ensayos  $\beta$ -galactosidasa en cepas WT con fusiones traduccionales *-lacZ*.
4. Identificar el transcrito y sus productos de degradación en una cepa silvestre, y en cepas mutantes de las principales ribonucleasas para conocer si la regulación del operón *lldPRD* ocurre a nivel post-transcripcional.
5. Analizar mediante la prueba *Primer Extension* los sitios posibles de escisión endorribonucleolítica en el mRNA *lldR*.
6. Determinar el tiempo de vida media de los mRNA: *lldP* y *lldD*, mediante un análisis de Northern blot.

## V. Material y Métodos

### Cepas bacterianas y plásmidos

Los ensayos se llevaron a cabo en las cepas y plásmidos listados en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Cepas y plásmidos utilizados en el estudio

PLÁSMIDOS	CARACTERÍSTICAS	FUENTE
pGEm	sonda IldP	Colección de lab.
pGEm	sonda IldD	Colección de lab.
pLCT2	<i>IldPRD</i>	(Dong, Taylor et al. 1993)
CEPA	CARACTERÍSTICAS	FUENTE
MC4100	<i>araD139Δ (argF-lac)U169rpsL150 relA1 deoC1 ftb-5301 ptsF15</i>	(Casadaban 1976)
SK2538	<i>rng::cat rph-1 thyA715</i>	(Ow, Perwez et al. 2003)
ECL2006	MC4100 <i>rnc::Tn10</i>	Colección de lab.
N2020	<i>np A49 [ie rnp sensible a la temperatura]</i>	(Apirion 1980)
CH1827	<i>araD139Δ(araABC-leu) 7697 Δ(lac)X74 galU galk hsdR rpsL150 thi zce-726::Tn10</i>	(Mudd, Krisch et al. 1990)
CH1828	Igual que CH1827 pero <i>ams-1</i> [Sensible a la temperatura]	(Mudd, Krisch et al. 1990)
ECL5048	MC4100 $\phi$ (IldP'-lacZ) Fusión transcripcional	Colección de lab.
ECL5051	MC4100 $\phi$ (IldD'-lacZ) Fusión transcripcional	Colección de lab.
IFC400	MC4100 $\phi$ (IldR'-lacZ) Fusión transcripcional	Colección de lab.
IFC401	MC4100 $\phi$ (IldPRD'-lacZ) Fusión transcripcional	Colección de lab.
SD-IldP-lacZ	MC4100 $\phi$ (Promotor+RBS IldP'-lacZ) Fusión traduccional	Este trabajo
SD-IldR-lacZ	MC4100 $\phi$ (Promotor+RBS IldR'-lacZ) Fusión traduccional	Este trabajo
SD-IldD-lacZ	MC4100 $\phi$ (Promotor+RBS IldD'-lacZ) Fusión traduccional	Este trabajo
OLIGOS	SECUENCIA	
Ild-Prom-Fw	5'AACTGCAGGAGATGACTGGG3'	
SD-IldP-Rv	5'CGGGATCCTTCATTGCAGGTCTCCTGG3'	
SD-IldR-Rv	5'CGGGATCCGCCATTAAGGAATCATCCACGTTACATCGTGTAATGAGTCTG3'	
SD-IldD-Rv	5'CGGGATCCGCCATGCGTTTTTCTCCCTCGAACACATCGTGTAATGAGTCTG3'	
PEIldPRD	5'CGTTGCGCTGCGGCGGATAATCG3'	

## Medio de cultivo

Para la toma de muestras de un preinóculo (cultivo saturado, incubado con agitación a 37°C durante 16 horas), los cultivos crecieron en medio Luria Bertani (LB) que contiene triptona y extracto de levadura y NaCl, sirviendo como medio de enriquecimiento.

Todas las cepas crecieron en medio mínimo M9 al cual en lugar de glucosa se le administró Xilosa 20mM como fuente de carbono y casaminoácidos (CAA) (0.2%), todas se incubaron a 37°C excepto aquéllas con alelos termosensibles las cuales crecieron a 30°C.

## Transformación de células

### Purificación de plásmidos

Todos los plásmidos se purificaron a partir de 3 ml de un preinóculo como se detalla en el protocolo del kit comercial AxyPrep Miniprep kit de la marca AxyGen Biosciences.

### Preparación de células competentes

Para la transformación se prepararon células electrocompetentes y quimiocompetentes. Para generar células quimiocompetentes (Hanahan 1983) de las células de distintas cepas de *E. coli*, se inocularon 500 µl de un pre-inóculo de dicha cepa en 50 ml de medio LB y se incubaron hasta una OD<sub>600</sub> entre 0.3-0.5. Luego de una incubación en hielo de 15 minutos se recolectaron las células por centrifugación a 4,000 rpm durante 15 minutos a 4°C formando un pellet celular, el cual se resuspendió en 18 ml de solución fría de RF1 y se incubó en hielo por 30 minutos, al término se recuperaron las células por centrifugación. Finalmente con 4 ml de la solución RF2 fría, se resuspendió el pellet celular y se hicieron alícuotas de 200 µl en tubos para microcentrífuga de 1.5 ml de capacidad, los cuales se

sumergieron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. En estas condiciones, las células pueden ser almacenadas durante varias semanas sin la pérdida de su competencia (Tabla 2).

**Tabla 2.** Soluciones para células competentes

<b>Solución RF1</b>	→	Ajustada a pH 5.8 con Ácido Acético
RbCl		100 mM
MnCl <sub>2</sub>		50 mM
Acetato de Potasio		30 mM
<b>Solución RF2</b>	→	Ajustada a pH 6.5 con NaOH
RbCl		10 mM
MOPS (Ácido morfolinopropanosulfónico)		10 mM
CaCl <sub>2</sub> • 6H <sub>2</sub> O		75 mM
Glicerol		15% (v/v)
Ambas soluciones se esterilizaron por filtración y fueron almacenadas a $4^{\circ}\text{C}$		

Para producir células electrocompetentes, se tomaron 1.5 ml de cultivo saturados de cada cepa a transformar y se centrifugaron en un tubo cónico de 1.5 ml durante 1 minuto a 6,000 rpm, después se lavó el pellet con 500  $\mu\text{l}$  de agua fría y estéril tres veces para al final resuspender en 100  $\mu\text{l}$  del mismo líquido para su uso inmediato.

### Transformación de células

Para transformar células quimiocompetentes con un DNA exógeno, se tomaron 200  $\mu\text{l}$  de células competentes, colocándolas en hielo para su descongelamiento lento y se mezcló con 1-20  $\mu\text{g}$  de DNA, dejando dicha mezcla en hielo durante 30 minutos posibilitando la adsorción a la superficie celular. Se realizó el choque térmico poniendo las células a  $42^{\circ}\text{C}$  durante 1.5 minutos y de inmediato se incubaron 1 minuto en hielo, permitiendo la entrada del plásmido al interior de la célula. Después se agregaron 600  $\mu\text{l}$  de LB fresco y dejándolas 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$  para su recuperación, permitiendo que el plásmido exógeno se segregue durante la división celular (3-5 generaciones).

Para la transformación de células electrocompetentes, se mezclaron los 100  $\mu$ l con 1-20  $\mu$ g de DNA, dicha mezcla se colocó en una celda de electroporación prelavada (con etanol 70% y agua destilada y estéril, se dejó enfriar un minuto en hielo), se aplicó un pulso eléctrico de 1.8 kV, utilizando un electroporador marca Bio-Rad, para de inmediato agregar en la celda 1 ml de LB fresco, al final se pasó toda la mezcla a un tubo cónico de 1.5 ml y se incubó a 37°C durante 1 hora para su recuperación.

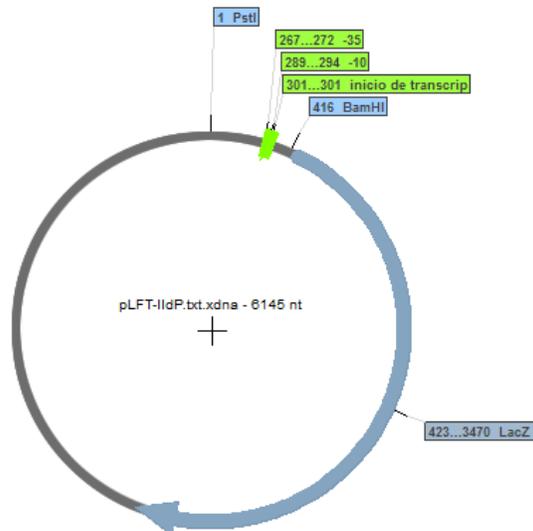
Después de la recuperación de células en cualquiera de los dos métodos, se sembraron alícuotas de 100  $\mu$ l por diseminación en superficie, sobre cajas Petri con medio LB-agar selectivo, esto es, con antibiótico de resistencia (ampicilina y/o cloranfenicol y/o kanamicina) y X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido) a una concentración final de 100  $\mu$ g/ml cuando fuera necesario, a una temperatura de 37°C. Tras 15-20 horas de incubación pudieron observarse colonias de transformantes sobre el agar selectivo.

### Integración de plásmidos al cromosoma celular

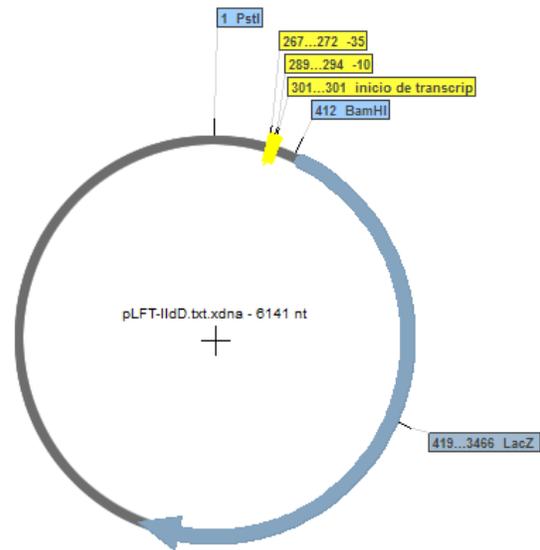
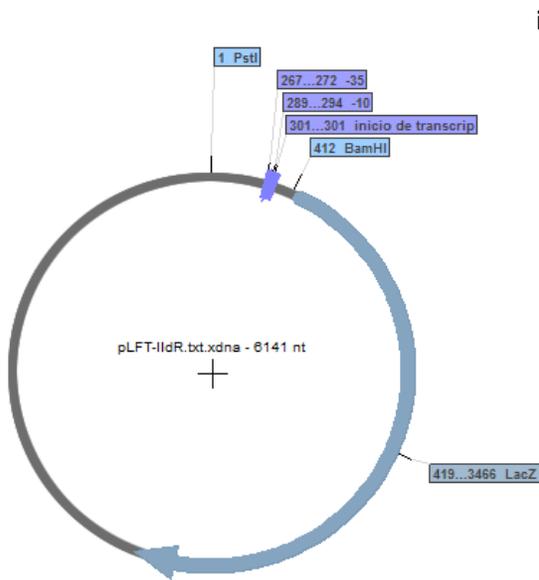
Para esto primero se construyeron los oligonucleótidos necesarios con ayuda del programa Serial Cloner 2.6, los cuales mediante la técnica de PCR se amplificaron. Estas secuencias contenían el promotor del operón *lldPRD* (oligonucleótido Lld-Prom-Fw) y el RBS de cada uno de los genes (SD-lldP-Rv, SD-lldR-Rv y SD-lldD-Rv) (Tabla 1). Después de amplificados se purificaron con el kit *QIAquick PCR Purification*, y se comprobaron los productos con una electroforesis para verificar que tenían el tamaño adecuado (todos tenían entre 400-500 nt). Estos productos se clonaron en el plásmido pLFT (plásmido que contiene el gen *-lacZ* pero sin su promotor) entre los sitios de restricción PstI y BamHI (Figura 5).

Los plásmidos fueron transformados en células competentes y se plaquearon en un medio de cultivo adicionado con X-Gal y su antibiótico de resistencia para

confirmar la presencia del gen reportero. Las colonias que presentaron color azul se “picaron” y almacenaron con glicerol 25% a -75°C hasta ser utilizadas.



**Figura 5.** Mapa gráfico de los plásmidos construidos (Serial Cloner 2.6). **oligo** Secuencia promotora (-35 y -10) y RBS de cada gen. **i)** Ligación pLFT-IldP; **ii)** Ligación pLRF-IldR; **iii)** Ligación pLFT-IldD y se observan en **a)** Sitio de restricción PstI y **b)** Sitio de restricción BamHI. La flecha dentro del plásmido señala el sitio donde se encuentra el gen reportero -lacZ.



**ii**

**iii**

Para la integración (Zhou *et al.*, 2003) se preparó un pre-inoculo de la cepa pINT-ts (la cual posee resistencia a kanamicina y es termosensible), se tomaron de éste 100 µl para incubarlos con agitación en 50 ml de LB fresco a 30°C y sin antibiótico durante 3 horas (OD<sub>600</sub> de aproximadamente 0.5) e inmediatamente después se

provocó un cambio brusco de temperatura al pasar el cultivo a 43°C durante 30 minutos para finalmente dejar en hielo unos minutos.

Dicho cultivo se vació en un tubo cónico estéril de 50 ml y se centrifugó en el cuarto frío a 4,000 rpm por 8 minutos, el pellet celular se resuspendió en 50 ml de agua fría-estéril para de nuevo centrifugar de la misma manera y resuspender en 500 µl de agua fría-estéril, después se prepararon alícuotas de 100 µl en tubos para microcentrífuga de 1.5 ml (haciendo las células electrocompetentes). Cada alícuota se mezcló con 1 µl de DNA (el DNA extraído de las cepas transformadas) para dar un pulso eléctrico de 1.8 kV como se describió anteriormente, con la única diferencia de que la recuperación de células se realizó en 1 ml de LB fresco adicionado con glucosa 0.2% y fueron sembradas de misma manera en cajas Petri.

### Extracción de RNA

Se realizó la extracción de RNA total de las cepas bacterianas mediante el método de fenol-cloroformo descrito anteriormente (Georgellis, Arvidson et al. 1992), tomando 10 ml de células en suspensión cuando su OD<sub>600</sub> de 0.4. Se corrieron 2 µl de cada muestra de RNA extraído en gel agarosa 1% y buffer de fosfatos 2% y usando buffer de corrida de fosfatos 2% (Tabla 3), para comprobar la integridad del RNA y correlacionarla con la cantidad cuantificada por espectrofotometría.

**Tabla 3.** Buffer de fosfatos

<b>Solución monobásica</b>	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5 M
<b>Solución dibásica</b>	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 M
Ajustar la solución a un pH 6.5	

Para los ensayos de vida media se añadió rifampicina (200 µg/ml) al cultivo, pues este antibiótico se une a la subunidad β de la RNA polimerasa previniendo el inicio de la transcripción (Von Gabain, Belasco et al. 1983).

## Northern Blot

Para realizar el ensayo de Northern Blot, se tomaron 5 µg del RNA total purificado y 5 µl de marcador de peso molecular, en geles desnaturalizantes de agarosa-formaldehído (1.5%). Después de la electroforesis se observó el RNA en un transiluminador UV y se tomaron fotografías para tener registro de las bandas de RNA ribosomal y el tamaño aproximado del marcador de peso molecular para posteriormente tener un aproximado del tamaño de las bandas que serán marcadas en la membrana de transferencia.

Después de la electroforesis el RNA fue transferido por capilaridad a una membrana de nylon (durante 20-21 horas). La inmovilización de ácidos nucleicos se realizó inmediatamente después de ser transferidos (debe de secarse antes a una temperatura de 50-60°C durante 5-10 minutos), exponiendo la membrana a la luz UV en un transiluminador durante 3 minutos, después se bloqueó en un baño de solución Denhardt 50X, formamida 18%, SSC 10X, 0.2% SDS y 100 µg de DNA de esperma de salmón (DNA no homólogo) a una temperatura de 42°C durante 2-3 horas. Las sondas marcadas con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP fueron desnaturalizadas a 95°C durante 10 minutos y para después añadir 10 µl a la solución de bloqueo, se dejaron hibridando las membranas a 42°C durante toda la noche.

Las membranas fueron lavadas dos veces en 20 ml de una solución con SSCX 2X y SDS 0.1% a 42°C, y tres veces a temperatura ambiente usando una solución con SSC 0.2X y SDS 0.1%, cada vez durante 15 minutos.

Al final se exponen las membranas en pantallas de almacenamiento de fósforo y las imágenes se obtendrán mediante un escaneo usando Thyphoon image scanner (Amersham).

## Preparación de las sondas específicas y marcador radioactivo

Para generar las sondas específicas, primero se aislo del plásmido pLCT2 mediante una digestión usando la enzima de restricción EcoRI. Los fragmentos

fueron separados en gel de agarosa y luego purificados con ayuda del QIAquick Gel Extraction Kit.

Las sondas purificadas del gel de agarosa se marcaron con 5  $\mu$ l de fósforo radioactivo ( $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  3000 Ci/mmol) usando el kit Rediprime II (Invitrogen) y después purificadas con el kit Qiagen PCR Purification, y almacenadas a  $-20^\circ\text{C}$  en un recipiente de plomo.

### **Primer Extension**

Para el análisis con retrotranscriptasa, se utilizó el oligonucleótido 5'-CGTTGCGCTGCGGCGCGATAATCG-3' (llamado PEIIdPRD) marcado radioactivamente en el extremo 5', usando la enzima polinucleótido kinasa y  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  (3,000 Ci/mmol), esta sonda marcada es complementaria al segmento 5'-CGATTATCGCGCCGCAGCGCAACG-3' que se encuentra en un sitio del gen *IldR*.

10 mmol de la sonda marcada fueron alineados con 5  $\mu$ g de RNA total en 50  $\mu$ l de una solución 10 mM de KCl. Las muestras se desnaturalizaron a  $95^\circ\text{C}$  10 minutos, se enfriaron lentamente en un baño de agua caliente hasta llegar a  $42^\circ\text{C}$ , la mezcla se ajustó 10mM TRIS-HCl (pH 8.3) y se incubó 1 hora a  $42^\circ\text{C}$ . Después se ajustaron las muestras a 5 mM de cada dNTP, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.1% Nonidet P-40, y dithiothreitol 3 mM, llegando a un volumen final de 100  $\mu$ l, se incubaron con 3 U de transcriptasa reversa a  $42^\circ\text{C}$  durante 1 hora. El producto fue después precipitado en etanol y resuspendido en 15  $\mu$ l de buffer de carga de formamida (80% formamida, 10 mM EDTA (pH 8)). El producto de *Primer Extension* se desnaturalizó durante 10 minutos a  $95^\circ\text{C}$ , y se corrió en un gel de secuenciación 6% poliacríamida-urea, usando un marcador de peso molecular (Georgellis, Arvidson et al. 1992; Triezenberg 2001). El gel se secó durante 1 hora a  $80^\circ\text{C}$  y se expuso en pantallas de almacenamiento de fósforo y las imágenes se obtuvieron mediante un escaneo usando Thyphoon image scanner (Amersham).

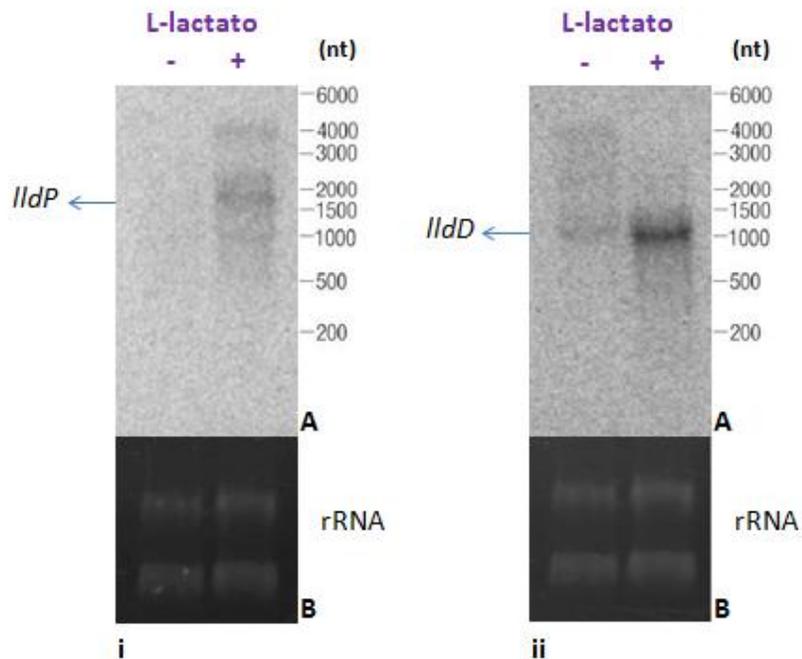
## VI. Resultados y discusión

### L-lactato es inductor positivo de la expresión de *lldPRD*

Con la finalidad de confirmar si el operón *lldPRD* es inducido por la presencia de L-lactato presente en el medio, se extrajo RNA total de la cepa MC1400, la que fue incubada en un ambiente aeróbico con o sin el inductor (L-lactato) utilizando medio mínimo (M9). Se realizó el ensayo Northern blot donde se utilizaron las sondas específicas *lldD* y *lldP* para su detección (Figura 6).

En congruencia con reporte anteriores (Dong, Taylor et al. 1993; Aguilera, Campos et al. 2008) el operón *lldPRD* es fuertemente inducido en presencia de L-lactato en condiciones aeróbicas, y se pudo observar que el gen *lldD* es más fuertemente inducido que *lldP*. El medio de elección es M9 ya que es de composición definida y se puede observar una clara expresión del gen *lldD* o *lldP* al ser inducido con L-lactato.

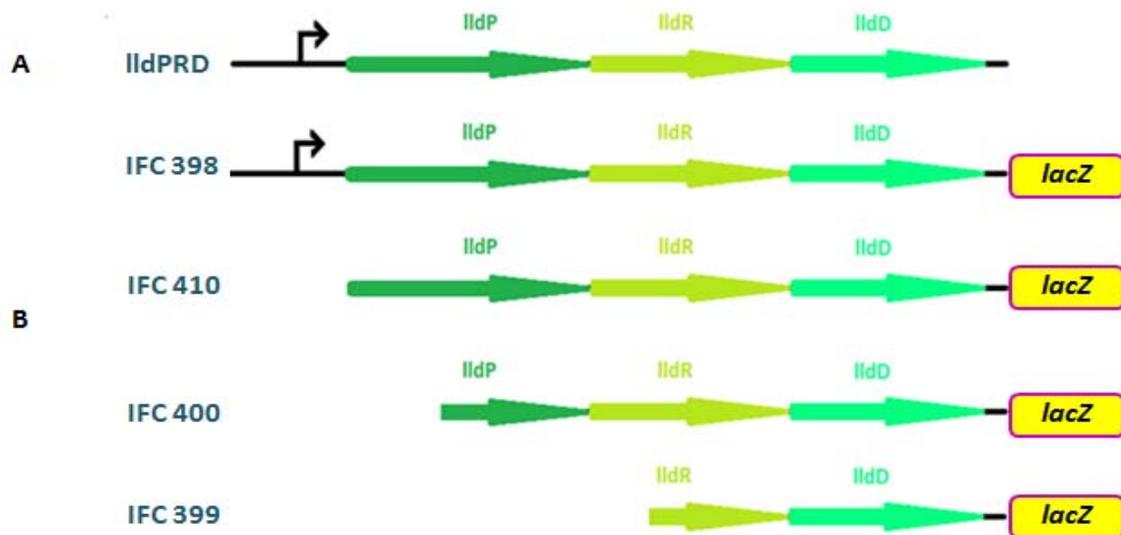
**Figura 6.** Estimulación de la transcripción del operón *lldPRD*, en la cepa MC1400. La cepa se incubó en medio mínimo (M9) suplementado con 20 mM de Xilosa como fuente de carbono y 0.2% de Casaminoácidos (CAA) y en presencia (+) o ausencia (-) de 30 mM de L-lactato como inductor. **A)** Northern blot. Transferencia de la sonda específica *lldP* en el panel izquierdo (**i**) y para la sonda específica de *lldD* en el panel derecho (**ii**). **B)** Bandas de rRNA teñidas con BrEt de la membrana nylon del Northern blot correspondiente.



Hay que destacar la ausencia de la señal correspondiente al tamaño del operón completo durante el ensayo de Northern blot (que tiene un tamaño aproximado de 3600 nt). Este resultado pudo deberse a que posiblemente exista algún otro promotor adicional dentro del operón que gobierne la expresión del gen *lldD*, o bien, al rápido procesamiento del mRNA mediado por ribonucleasas, pues como puede verse en la figura anterior, existe una clara diferencia en la cantidad de mRNA detectado.

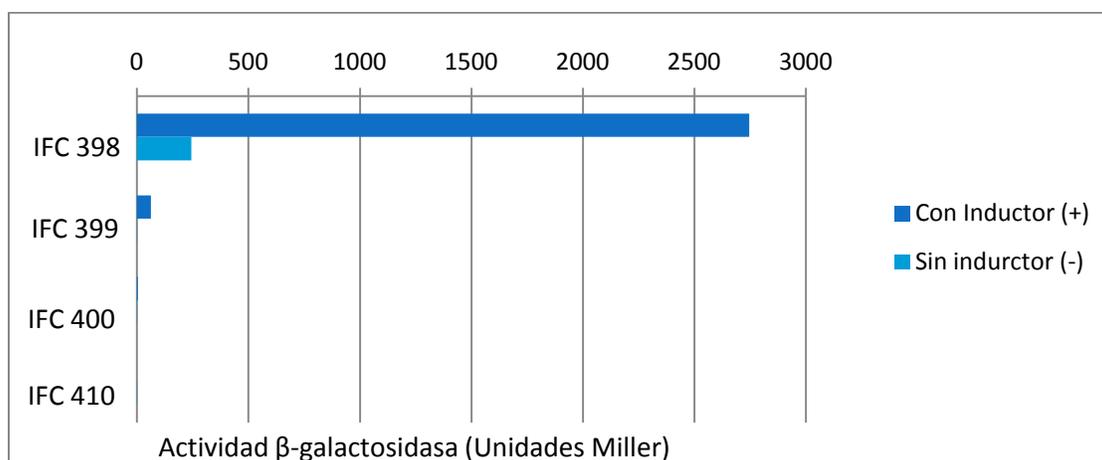
### La expresión del operón *lldPRD* se encuentra controlada por un promotor único

Para revisar si existe más de un promotor en el operón *lldPRD*, y que por ende, sea la consecuencia del alto nivel registrado del mRNA de *lldD* (Figura 6) se realizaron ensayos  $\beta$ -galactosidasa en cuatro diferentes fusiones transcripcionales *-lacZ*, en cepas MC4100 (tomadas del laboratorio y son nombradas: IFC398, IFC399, IFC400 e IFC410) las cuales llevan deleciones secuenciales en regiones corriente arriba del operón *lldPRD* tal como se muestra en la siguiente figura.



**Figura 7.** Esquema de las deleciones. **A)** Estructura completa del operón *lldPRD* y el sitio del promotor propuesto por Aguilera, Campos et al. 2008. **B)** Fusiones transcripcionales *-lacZ* de las cepas obtenidas de laboratorio y utilizadas en este trabajo: IFC398, IFC410, IFC 400 e IFC399.

El crecimiento de las cepas se realizó en condiciones aeróbicas en medio mínimo (M9) adicionado con 20 mM de xilosa y 0.2% de casaminoácidos (CAA) como fuente de carbono y con o sin presencia de 30 mM L-lactato como inductor, al llegar a una OD<sub>600</sub> de 0.4-0.5 se cuantificó la actividad de la enzima mediante el ensayo β-galactosidasa.



**Gráfica 1.** Actividad del ensayo β-galactosidasa específico de cada una de las fusiones-lacZ operón, expresado en Unidades Miller (UM).

La cepa IFC398 es la que se encuentra inducida por L-lactato, esto indica que existe un solo promotor corriente arriba del gen *lldP* que regula la expresión del operón *lldPRD*. En las demás cepas la expresión es nula en comparación con IFC 398 (Gráfica 1).

Se ha corroborado la existencia de un solo promotor corriente arriba del gen *lldP*, por lo cual el operón *lldPRD* debiera ser transcrito de forma completa, sin embargo, y como se muestra en la figura 6 no es posible identificar el transcrito correspondiente al operón completo. Por lo cual se descarta la idea de que la regulación del operón se realiza a nivel transcripcional.

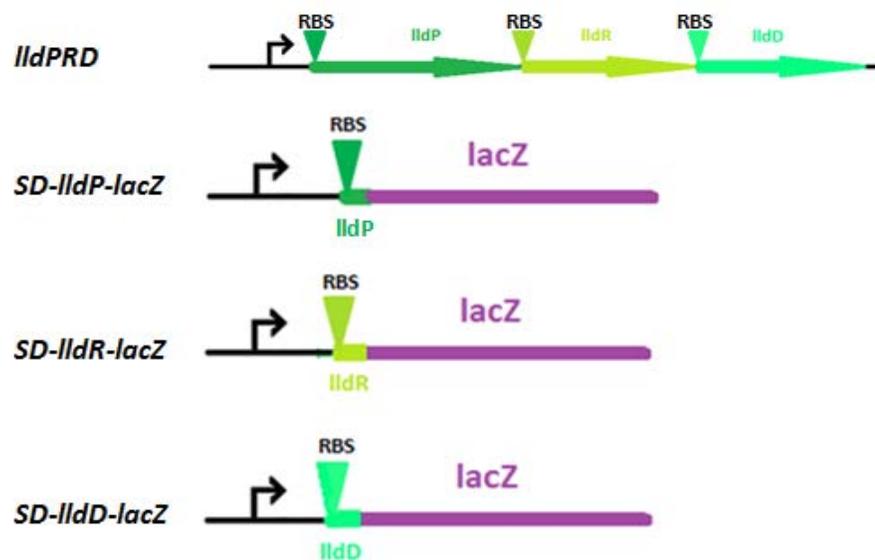
Otro medio posible de lograr una producción diferencial de proteínas codificadas por el operón implicaría una regulación mediante la eficiencia de traducción.

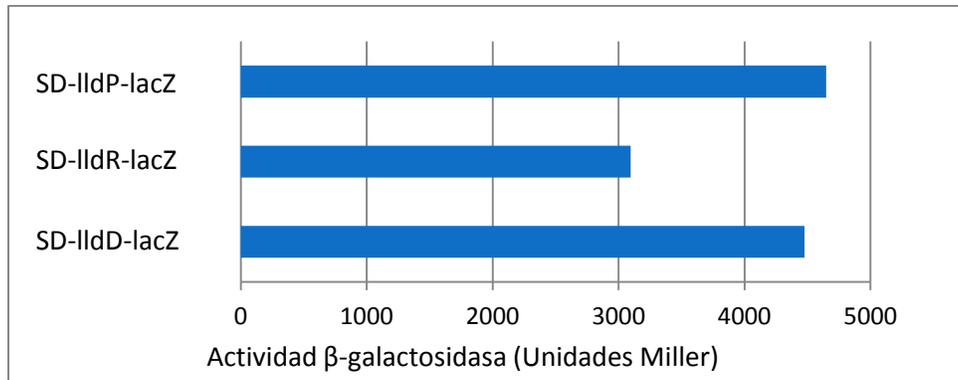
## Regulación traduccional del operón *IldPRD*

Para probar la hipótesis de que la regulación ocurre a nivel traduccional se probó la fuerza de tres distintos Sitios de Unión Ribosomal (RBS) correspondientes a los genes *IldP*, *IldR* y *IldD*.

Para ello se construyeron tres diferentes fusiones traduccionales *-lacZ*: *SDIldP-lacZ*, *SDIldR-lacZ* y *SDIldD-lacZ*. Las tres fusiones contenían el promotor del operón *IldPRD*, además el fragmento RBS y el codón de inicio del gen correspondiente. Después se integraron en el cromosoma de la cepa MC4100 utilizando el plásmido “*helper*” (o facilitadores, llamado pINT-ts) como se mencionó antes, generando tres diferentes cepas SD-*IldP-lacZ*, SD-*IldR-lacZ* y SD-*IldD-lacZ* (Figura 8). La integración se realizó para asegurarnos que el cromosoma posea solo una copia del gen deseado. Las cepas crecieron en medio mínimo (M9) adicionado con 20 mM de xilosa y 0.2% de CAA como fuente de carbono y en presencia de 30 mM L-lactato como inductor. Al llegar a una  $OD_{600}$  de  $\approx 0.4$  se tomo la muestra y se realizó el ensayo  $\beta$ -galactosidasa, con el fin de obtener una medida de actividad de la enzima en UM.

Figura 8. Fusiones traduccionales *-lacZ* en la cepa MC1400, cada una contiene su respectivo RBS y promotor.





**Gráfica 2. Ensayo β-galactosidasa** cuantificada en Unidades Miller, según la actividad del gen reportero impulsado por el respectivo RBS de cada gen.

Como se puede observar en la Gráfica 2 la actividad del reportero presente impulsada por el RBS de *IldP*, *IldR* y *IldD* no muestran diferencias significativas, por lo tanto, no hay un RBS que se una con mayor fuerza a la subunidad 16S ribosomal, traduciendo de manera equitativa los tres genes y descartando la posibilidad de que éstos se encuentren regulados a nivel traduccional.

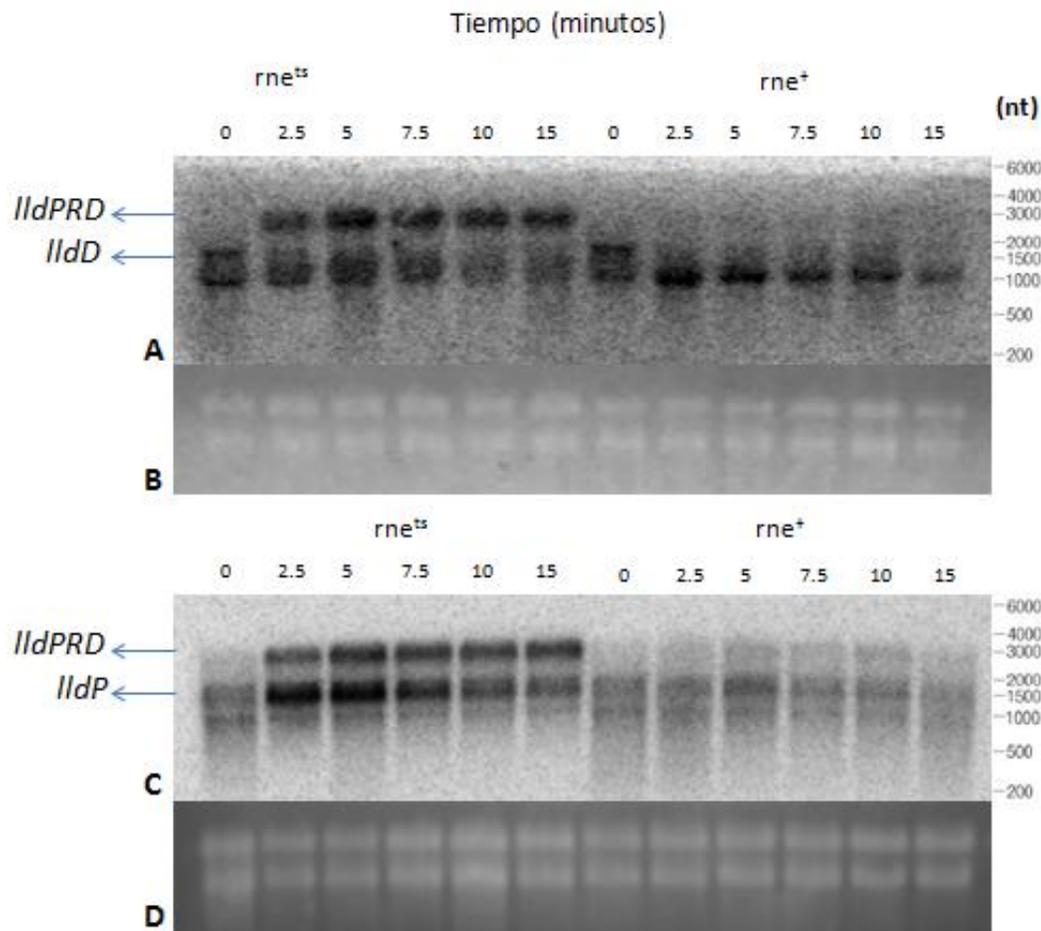
### **Regulación post-transcripcional del operón *IldPRD***

En *E. coli*, la estabilidad y procesamiento posttranscripcional del mRNA depende principalmente de las endonucleasas: RNasa E, RNasa III, y RNasa P. De éstas se ha demostrado que inicia principalmente por la escisión interna, mediada por la RNasa E, controlando el nivel de vida media (Deana & Belasco, 2005; Briegel *et al.*, 2006).

Por lo tanto, existe la posibilidad de que el operón una vez traducido como un mRNA policistrónico se halle en una situación de procesamiento debido a la escisión de una de éstas ribonucleasas en algún lugar de su secuencia, lo que podría afectar la traducción de alguno de los genes que contiene.

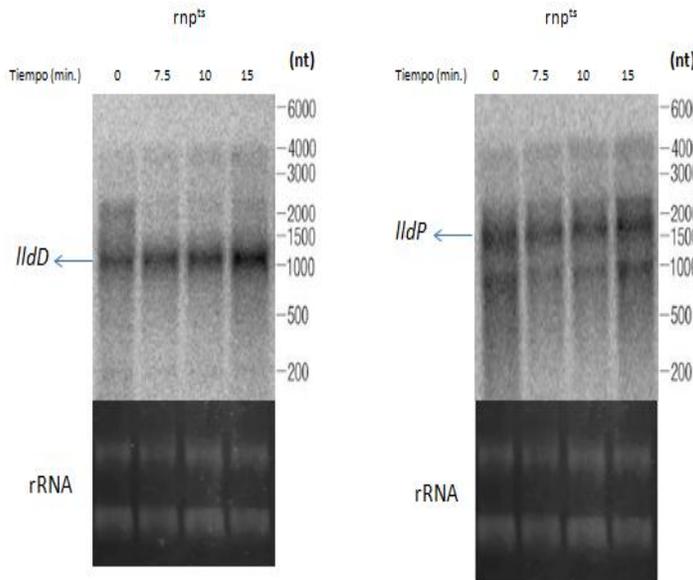
Para ello se extrajo RNA<sub>tot</sub> de una cepa deficiente de RNasa III (*rnc*<sup>-</sup>), y también de cepas mutantes de las enzimas RNasa E (*rne*<sup>ts</sup>) y RNasa P (*rnp*<sup>ts</sup>), las cuales

synthetic enzymes, and a Northern blot was performed using specific probes for *IldD* and *IldP*.



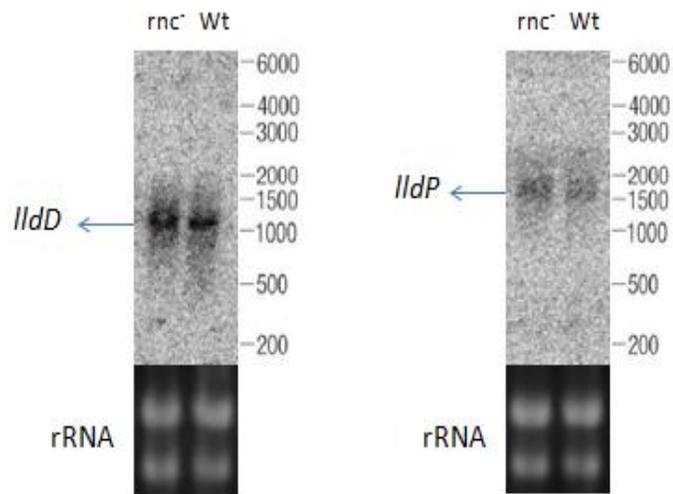
**Figura 9.** Ensayo Northern blot de la extracción de  $RNA_{tot}$  de las cepas  $rne^{ts}$  y  $rne^{+}$  (wt). Las cepas crecieron a  $30^{\circ}C$  en medio mínimo (M9) adicionado con 20mM Xilosa y 0.2% CAA como fuente de carbono, y 30mM de L-lactato como inductor. Cuando las cepas crecieron a una  $OD_{600}$  de 0.4 se cambio a temperatura a  $44^{\circ}C$  para desestabilizar las enzimas termosensibles. **A)** Cepas  $rne^{ts}$  y  $rne^{+}$  con la sonda *IldD*. **B y D)** Representan las bandas teñidas de rRNA con Bromuro de Etidio que sirven como control. **C)** Cepas  $rne^{ts}$  y  $rne^{+}$  con la sonda *IldP*.

Como se observa en la figura 9, en la cepa  $rne^{ts}$ , que al cambiar a una temperatura no permisible ( $44^{\circ}C$ ), la endonucleasa RNasa E se desnatura llevando a una acumulación del transcrito completo del operón *IldPRD* y disminución de *IldD* y *IldP* respectivamente, lo cual sugiere la participación de la RNasaE para el procesamiento del mRNA.



**Figura 1.** Análisis Northern blot del mRNA de *IldPRD* en cepas con **RNasa P termosensible** (SK2538), las cepas crecieron en medio mínimo (M9) suplementado con 20 mM de Xilosa y 0.2% de CAA como fuente de carbono y con 30 mM de L-lactato como inductor a 30°C. Al llegar a una OD<sub>600</sub> de 0.4 se tomo la primer muestra (tiempo 0) y se cambió a 44°C tomando las siguientes muestra a los tiempos indicados.

**Figura 2.** Northern blot de las cepa *rnc*<sup>-</sup> (deficiente de RNasa III) y Wt tomadas a una OD<sub>600</sub> de 0.4 las cepas crecieron en medio mínimo (M9) suplementado con 20 mM de Xilosa y 0.2% de CAA como fuente de carbono y con 30 mM de L-lactato como inductor a 30°C. Se hibrido con sus respectivas sondas *IldD* y *IldP*.



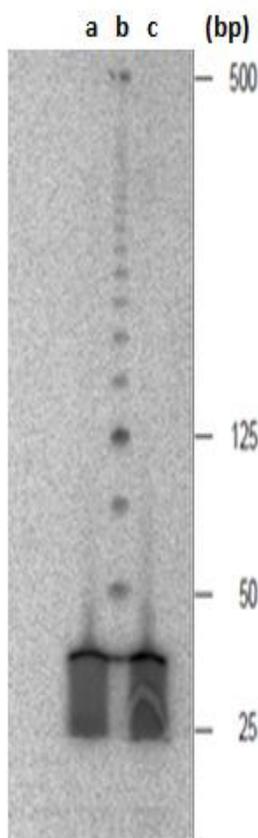
En las figuras 10 y 11 que corresponden a las mutantes de RNasa P y RNasa III, respectivamente, se observa que no hay acumulación del mensajero completo correspondiente al tamaño de *IldPRD*. Puede verse también que al cambiar la temperatura de 30°C a 44°C se acumula la señal de *IldD*, en la cepa mutante *rnp*<sup>ts</sup>, esto sugiere que la RNasa P podría ser responsable de algún modo, por la degradación del mRNA de *IldD*. Mientras que *rnc*<sup>-</sup>, cepa mutante deficiente de RNasa III no parece intervenir en la degradación del transcrito, al verse comparada con la señal mostrada por una cepa silvestre (Wt).

Es razonable concluir que el operón *lldPRD* sufre un procesamiento post-transcripcional a cargo principalmente de la endonucleasa RNasa E dejando intactos los mRNAs de *lldD* y *lldP* mediante la escisión endorribonucleotídica en *lldR* y por ello se encuentra LldR en menor cantidad dentro de la célula.

Sin embargo para revisar si realmente la escisión ocurre en algún sitio del mRNA dentro del sitio *lldR* se realizó el ensayo *Primer Extension*.

### **Procesamiento del operón *lldPRD* por la RNasa E.**

La escisión del operón debe realizarse en un sitio específico del mRNA *lldR* ya que esta proteína es requerida en menor cantidad dentro de la célula, y para averiguar dónde corta la endonucleasa se realizó el ensayo *Primer Extension* en el total de RNA extraído de las cepas *rne*<sup>+</sup> y *rne*<sup>ts</sup> que crecieron en medio mínimo (M9) con 20 mM xilosa y 0.2% CAA como fuente de carbono y 30 mM L-lactato como inductor, a una temperatura de 30°C. Las muestras fueron tomadas con OD<sub>600</sub> de 0.4 (tiempo 0) y se cambió la temperatura a 44°C tomando la muestra pasados los 15 minutos respectivamente. Se realizó la extensión del *primer* como se ha descrito, con el oligonucleótido PE*lldPRD* radiomarcado.



**Figura 12.** *Primer Extension* en cepas *rne<sup>ts</sup>*. **a)** Cepa *rne<sup>+</sup>* con un crecimiento de  $OD_{600}$  0.4 y con 15 minutos a 44°C de temperatura; **b)** Marcador de peso molecular y **c)** cepa *rne<sup>+</sup>* con  $OD_{600}$  0.4.

Como se muestra en la Figura 12, no fue posible observar algún producto de extensión del oligonucleótido en ninguna de las dos cepas.

Con la finalidad de aumentar la concentración del transcrito de *lldPRD*, se repitió el ensayo con la cepa *rne<sup>ts</sup>* y la cepa silvestre, pero ambas portando el plásmido pLCT2 de alto número de copias que contiene el operón *lldPRD*. Sin embargo, no se encontraron las condiciones del ensayo de Primer Extension, para obtener un producto de extensión.

No obstante, como pudo observarse en los ensayos de Northern Blot (Figura 9), el procesamiento del mRNA policistrónico del operón *lldPRD* es realizado por la RNasa

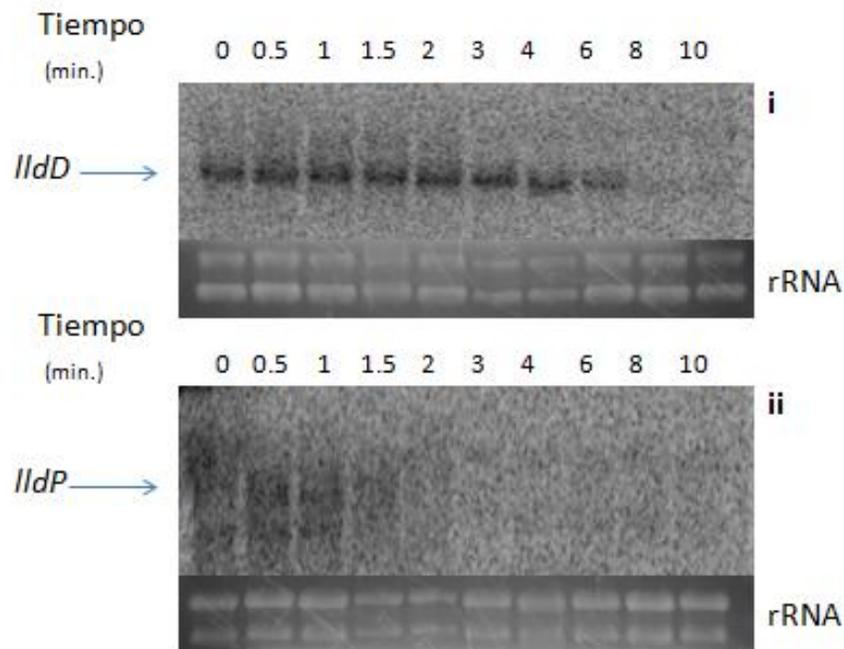
E y como son detectados los transcritos de *lldD* y *lldP* la escisión debe realizarse en el sitio *lldR*.

La RNasa E, es una endonucleasa, asociada a la membrana interna, que está formada por una proteína y RNA muy cercanamente unidos y tiene un importante papel en la regulación del mRNA. Dicha enzima escinde principalmente en regiones ricas en Adeninas y Uracilos (Miczak, Srivastava et al. 1991), y en un estudio anteriormente presentado (Ehretsmann, Carpousis et al. 1992) con un análisis de todos los supuestos sitios de escisión, se sugirió una secuencia consenso RAUUW (R=A o G; W=A o U). Así con ayuda del programa Serial Cloner 2.6 se delimitaron los sitios posibles de escisión en el transcrito *lldR* del operón *lldPRD* (Figura 13).

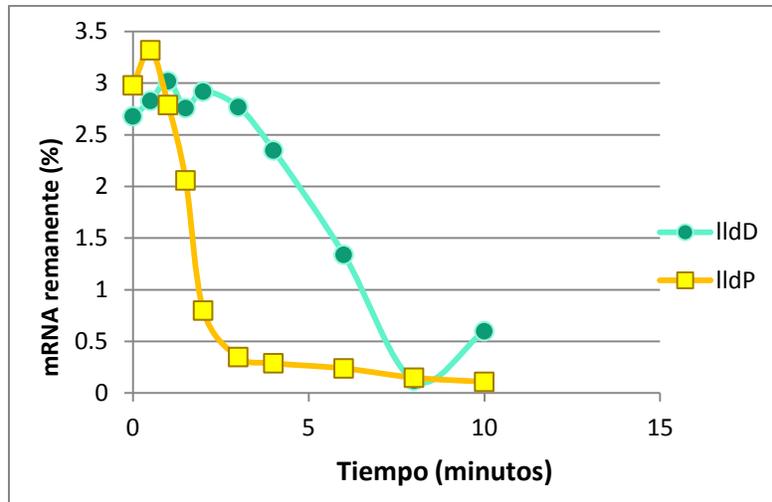


En la figura 14 se realizó el ensayo Northern blot del RNA total extraído de la cepa transformada y se utilizó la sonda *lldD* y *lldP*.

El tiempo de vida media calculada para *lldD* fue de aproximadamente 5 minutos, mientras que el tiempo de vida media de *lldP* se reporta a los 2 minutos. Comparando estos resultados con la gráfica 3 vemos cómo la estabilidad de *lldD* es mucho mayor y no decae de forma abrupta como *lldP*, manteniéndose estable por una mayor cantidad de tiempo.



**Figura 14.** Análisis Northern en la cepa mutante pLCT2. A la cual se le añadió Rifampicina para detener la Transcripción y así revisar la estabilidad del mRNA correspondientes al gen *lldP* y *lldD*. i) Sonda marcada específica para *lldD* y ii) Sonda específica para *lldP*.



**Gráfica 3.** Decaimiento porcentual de *IldP* y *IldD*, el tiempo de vida media calculado fue de **5 minutos para *IldD*** y **2 minutos para *IldP***.

Por lo tanto, la cantidad de los transcritos encontrada en la célula es diferente, debido principalmente a su estabilidad diferencial, de ahí que al ver las figuras de Northern blot las cantidades de *IldD* y *IldP* son siempre diferentes, ya que *IldP* decae muy rápido en comparación de *IldD*.

## VII. Conclusión

El operón es inducido al crecer en un medio rico en L-lactato y en condiciones aeróbicas, donde un solo promotor corriente arriba del gen *lldP* es el encargado de iniciar la transcripción de *lldPRD* de forma completa, como un mRNA policistrónico.

Sin embargo y como se muestra en los ensayos Northern blot, las cantidades de mRNA intacto de ambos genes siempre se muestran en cantidades diferentes, hecho que no es debido la fuerza ejercida por los RBS de cada gen.

El modelo de regulación propuesto para el operón *lldPRD*, es la escisión que la RNasa E produce dentro del mRNA policistrónico, en el sitio del gen *lldR* resultando en cantidades menores de la proteína reguladora y dejando intacto los genes *lldP* y *lldD*, los cuales, debido a la estabilidad propia de las dos especies de mRNA se degradan en diferentes tiempos, pues la vida media reportada para *lldD* es de 5 minutos, mayor al que presentó *lldP*, que es de 2 minutos.

También se podría deber en menor grado a la transposición de los Sitios de Unión Ribosomal que presentan *lldR* y *lldD* con el marco abierto de lectura (ORF-Open Reading Frame) de *lldP* y *lldR* respectivamente, interfiriendo durante la unión ribosomal (subunidad 30S) en el mRNA y como consecuencia reducir la eficiencia de traducción de *LldR* y *LldD* resultando, en la diferente concentración de dichas proteínas celulares, ya que la eficiencia traduccional de un gen, afecta el nivel de traducción de los genes corriente abajo a través de un efecto cascada.

Mientras que para el decaimiento químico la RNasa P parece ser la responsable.

Demostrando que el mRNA juega un importante papel en el control de la expresión génica dentro de un operón policistrónico, puesto que, la diferencia de concentración de *LldP*, *LldR* y *LldD* se debe al procesamiento posttranscripcional enzimático mediado por la RNasa E en el sitio de *lldR*, la obstrucción de la unión ribosomal por la transposición del RBS de *lldR* y *lldD* y la estabilidad diferencial de los mRNA.

## VIII. Propuestas

Los resultados del presente trabajo dan la entrada para realizar estudios dentro del mRNA policistrónico para así determinar en qué sitio exacto del *lldR* se realiza la escisión endoribonucleotídica, comprobando experimentalmente el o los sitios de corte de la RNasa E, lo cual podría realizarse mediante la obtención del transcrito del operón *lldPRD in vitro* y su posterior tratamiento con RNasa E, o con extractos de células de *E. coli* silvestre y mutante en *rne<sup>ts</sup>*. Con ello se aportará información acerca del poco conocido operón *lldPRD*, detallando su mecanismo de regulación génica.

Así como también se pretende dar la pauta acerca de los posibles mecanismos de regulación génica en otros operones policistrónicos, pues éstos, en su mayoría, involucran varios pasos adicionales de regulación.

## IX. Referencias Bibliográficas

- Aguilera, Laura, Campos, Evangelina, Giménez, Rosa, Badía, Josefa, Aguilar, Juan, & Baldoma, Laura. (2008). Dual role of LldR in regulation of the lldPRD operon, involved in L-lactate metabolism in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *190*, 2997-3005. doi: 10.1128/JB.02013-07
- Alvarez, Adrián F, Rodríguez, Claudia, & Georgellis, Dimitris. (2013). Ubiquinone and menaquinone electron carriers represent the yin and yang in the redox regulation of the ArcB sensor kinase. *Journal of Bacteriology*, *195*, 3054-3061. doi: 10.1128/JB.00406-13
- Arriano, CM. (1993). Post-transcriptional control of gene expression: bacterial mRNA degradation. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *9*, 421-432.
- Baumberg, Simon. (1999). *Prokaryotic gene expression*. Oxford: Oxford University Press.
- Belasco, Joel G, & Higgins, Christopher F. (1988). Mechanisms of mRNA decay in bacteria: a perspective. *Gene*, *72*, 15-23.
- Briegel, Karoline J., Baker, Asmaa, & Jain, Chaitanya. (2006). Identification and Analysis of *Escherichia coli* Ribonuclease E Dominant-Negative Mutants. *Genetics*, *172*(1), 7-15. doi: 10.1534/genetics.105.048553
- Deana, Atilio, & Belasco, Joel G. (2005). Lost in translation: the influence of ribosomes on bacterial mRNA decay. *Genes and Development*, *19*, 2526-2533. doi: 10.1101/gad.1348805
- Dong, JM, Taylor, JS, Latour, DJ, Luchi, S, & Lin, EC. (1993). Three overlapping lct genes involved in L-lactate utilization by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *175*, 6671-6678.
- Ehretsmann, C P, Carpousis, A J, & Krisch, H M. (1992). Specificity of *Escherichia coli* endoribonuclease RNase E: in vivo and in vitro analysis of mutants in a bacteriophage T4 mRNA processing site. *Genes & Development*, *6*(1), 149-159. doi: 10.1101/gad.6.1.149
- Futai, Masamitsu, & Kimura, Hiromichi. (1977). Inducible membrane-bound L-Lactate Dehydrogenase from *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, *252*, 5820-5827.
- Georgellis, Dimitris, Arvidson, Staffan, & Von Gabain, Alexander. (1992). Decay of *ompA* mRNA and processing of 9S RNA are immediately affected by shifts in growth rate, but in opposite manners. *Journal of Bacteriology*, *174*, 5382-5390.
- Georgellis, Dimitris, Kwon, Ohsuk, & Lin, EC. (2001). Quinones as the redox signal for the arc two-component system of bacteria. *Science*, *292*, 2314-2316.
- Georgellis, Dimitris, Lynch, A Simon, & Lin, EC. (1997). In vitro phosphorylation study of the Arc Two-Component Signal transduction system of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *179*, 5429-5435.
- Hanahan, Douglas. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Molecular Microbiology*, *166*, 557-580.
- Kozak, Marilyn. (2005). Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. *Gene*, *361*, 13-37.
- Kwon, Ohsuk, Georgellis, Dimitris, & Lin, EC. (2000). Phosphorelay as the sole physiological route of signal transmission by the Arc Two-Component System of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *182*, 3858-3862. doi: 10.1128/JB.182.133858-3862.2000
- Kwon, Ohsuk, Georgellis, Dimitris, Lynch, A Simon, Boyd, Dana, & Lin, EC. (2000). The ArcB sensor kinase of *Escherichia coli*: genetic exploration of the transmembrane region. *Journal of Bacteriology*, *182*, 2960-2966. doi: 10.1128/JB.182.10.2960-2966.2000
- Lynch, A Simon, & Lin, EC. (1996). Transcriptional control mediated by the ArcA two-component response regulator protein of *Escherichia coli*: characterization of DNA binding at target promoters. *Journal of Bacteriology*, *178*, 6238-6249.

- Malpica, Roxana, Peña, Snadoval Gabriela R, Rodríguez, Claudia, Franco, Bernardo, & Georgellis, Dimitris. (2006). Signaling by the Arc Two-Component System provides a link between the redox state of the quinone pool and gene expression. *Antioxid Redox Signal*, *8*, 781-795.
- Mandigan, Michael T., Martinko, John M., Stahl, David, & Clark, David P. (2010). *Brock biology of microorganisms* (13th ed.): Pearson Education, Inc.
- McCarthy, John EG, & Gualerzi, Claudio. (1990). Translational control of prokaryotic gene expression. *Trends Genet*, *6*, 78-85.
- Miczak, A., Srivastava, R. A. K., & Apirion, O. (1991). Location of the RNA-processing enzymes RNase III, RNase E and RNase P in the *Escherichia coli* cell. *Molecular Microbiology*, *5*(7), 1801-1810. doi: 10.1111/j.1365-2958.1991.tb01929.x
- Mitrophanov, Alexander Y, & Groisman, Eduardo A. (2008). Signal integration in bacterial two-component regulatory systems. *Genes & Development*, *22*(19), 2601-2611.
- Newbury, Sarah F., Smith, Noel H., & Higgins, Christopher F. (1987). Differential mRNA stability controls relative gene expression within a polycistronic operon. *Cell*, *51*(6), 1131-1143.
- Núñez, María Felisa, Kwon, Ohsuk, Wilson, T. Hastings, Aguilar, Juan, Baldoma, Laura, & Lin, Edmund C. C. (2002). Transport of L-Lactate, D-Lactate, and Glycolate by the LldP and GlcA Membrane Carriers of *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *290*(2), 824-829.
- Quax, Tessa E F., Wolf, Yuri I, Koehorst, Jasper J, Wurtzel, Omri, van der Oost, Richard, Ran, Wenqi, van der Oost, John. (2013). Differential Translation Tunes Uneven Production of Operon-Encoded Proteins. *Cell Reports*, *4*(5), 938-944.
- Rigali, Sébastien, Derouaux, Adeline, Giannotta, Fabrizio, & Dusart, Jean. (2002). Subdivision of the helix-turn-helix GntR family of bacterial regulators in the FadR, HutC, MocR, and YtrA subfamilies. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(April 12), 12507-12515.
- Rios, Rosa Maria Gutierrez. Introducción a la regulación del inicio de la transcripción y circuitos genéticos.
- Rodriguez, Claudia, Kwon, Ohsuk, & Georgellis, Dimitris. (2004). Effect of D-Lactate on the Physiological Activity of the ArcB Sensor Kinase in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *186*(7), 2085-2090. doi: 10.1128/jb.186.7.2085-2090.2004
- Ross, Jeff. (2001). mRNA Turnover *eLS*: John Wiley & Sons, Ltd.
- Salmon, Kirsty A, Hung, She-pin, Steffen, Nicholas R, Krupp, Rebecca, Pierre, Baldi, Hatfield, Wesley G, & Gunsalus, Robert P. (2005). Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12: effects of oxygen availability and ArcA. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*, 15084-15096. doi: 10.1074/jbc.M4140302200
- Snyder, Larry, & Chamness, Wendy. (2007). *Molecular genetics of bacteria* (3th edition ed.). Washington, DC.
- Triezenberg, Steven J. (2001). Primer Extension. In John Wiley and Sons (Ed.), *Current Protocols in Molecular Biology* (Vol. 20).
- Vimberg, Vladimir, Tats, Age, Remm, Mairo, & Tenson, Tanel. (2007). Translation initiation region sequence references in *Escherichia coli*. *BioMed Central Molecular Biology*, *8*. doi: 10.1186/1471-2199-8-100
- Von Gabain, Alexander, Belasco, Joel G, Schottel, Janet L, Chang, Annie C Y, & Cohen, Stanley N. (1983). Decay of mRNA in *Escherichia coli*: Investigation of the fate of specific segments of transcripts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *80*, 653-657.
- Wiley, Dale Jeremy, & Simon, F. Park. (2004). *Molecular genetics of bacteria* (4th edition ed.). England: John Wiley and Sons Ltd.

- Yamamoto, Tatsuo, Suyama, Akira, Mori, Nozomu, Yokota, Takeshi, & Wada, Akiyoshi. (1985). Gene expression in the polycistronic operons of *Escherichia coli* heat-labile toxin and cholera toxin: a new model of translational control. *FEBS Letters*, *181*(2), 377-380.
- Zhou, Lu, Kim, Soo-Ki, Avramova, Larisa, Datsenko, Kirill A., & Wanner, Barry L. (2003). Use of conditional-replication, integration, and modular CRIM plasmids to make single-copy *lacZ* fusions. In Michel Blot (Ed.), *Methods and tools in biosciences and medicine. Prokaryotic genomics*. (pp. 65-89). Switzerland: Birkhäuser Verlag.