



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Regulación de la expresión del operón *lldPRD* de *Escherichia coli*”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M en C. Lidia Esmeralda Angel Lerma

TUTOR PRINCIPAL

DR. Dimitris Georgellis
[Instituto de Fisiología Celular](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. Enrique Merino Pérez
[Instituto de Biotecnología](#)

DR. Roberto Coria Ortega
[Instituto de Fisiología Celular](#)

Ciudad de México. Abril, 2023



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 ACADÉMICOS

El presente trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular en el laboratorio 226 norte bajo la tutoría del Dr. Dimitris Georgellis.

Agradezco la asesoría del Dr. Adrián F. Álvarez.

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 proyectos:

- “Control de la expresión génica microbiana por estímulos extracelulares” de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), # IN207921.
- “Estudio de la organización, composición y función de microdominios membranales similares a balsas lipídicas en bacterias” de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), # IN208721.
- “Control del Sistema de Dos Componentes BarA/UvrY” del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), CF 19-514856.
- “Balsas lipídicas bacterianas y su impacto en procesos relacionados con virulencia” del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), CF 19-140614.

Agradezco también al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo de Beca de o Doctorado # de becario 517043.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, gracias por creer en mí.

A Javier, por siempre contar contigo.

A Dimitris: por permitirme unirme a un gran laboratorio y equipo, por tus enseñanzas y paciencia todos estos años.

A Adrián: por acompañarme en cada etapa de mi trabajo en el laboratorio, por siempre darte el tiempo de ayudarme y enseñarme.

A Claudia: mi amiga y mi apoyo. Gracias por toda tu ayuda en este tiempo, la considero invaluable, gracias también por las pláticas, las risas y los abrazos.

A mis compañeros de laboratorio: Luis, Óscar, Lidia, Enrique, Kath, Fernanda y Carlos.

A mi comité tutoral: Dr. Enrique Merino Pérez y Dr. Roberto Coria Ortega.

Al jurado de examen:

Presidenta: Gloria Soberón Chávez

Secretario: Guillermo Gosset Lagarda

Vocal: Rosa Laura Camarena Mejía

Vocal: Elda Guadalupe Espín Ocampo

Vocal: Juan Miranda Ríos

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	9
1.1	Regulación genética en bacterias	9
1.1.1	Regulación transcripcional.....	11
1.1.2	Regulación post-transcripcional.....	14
1.1.3	Regulación traduccional	14
1.2	Operón <i>lldPRD</i>	17
1.3	Principales endorribonucleasas de <i>Escherichia coli</i>	19
II.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
III.	HIPÓTESIS.....	21
IV.	OBJETIVOS	22
4.1	Objetivo general	22
4.2	Objetivos específicos.....	22
V.	MATERIALES Y MÉTODOS	23
6.1	Cepas bacterianas	23
6.2	Condiciones de crecimiento	25
6.3	Ensayos de actividad β -galactosidasa	25
6.4	Ensayos de Western Blot.....	26
6.5	Extracción de RNA	27
6.6	Northern Blot.....	28
6.7	Ensayo de extensión del cebador o <i>primer extension</i>	29
VII.	RESULTADOS.....	31
7.1	Cuantificación relativa de las proteínas del operón <i>lldPRD</i> de <i>Escherichia coli</i>	31
7.2	La transcripción del operón está dirigida por un solo promotor	32
7.3	Traducción diferencial de los genes <i>lldP</i> , <i>lldR</i> y <i>lldD</i>	33

7.4	Acción de las principales endorribonucleasas de <i>Escherichia coli</i> sobre el transcrito del operón <i>lldPRD</i>	37
7.5	Mapeo de los sitios de procesamiento de RNasa E en el operón <i>lldPRD</i>	40
7.6	Estabilidad diferencial de los mRNA de <i>lldP</i> y <i>lldD</i>	42
VIII.	DISCUSIÓN	44
IX.	CONCLUSIONES	47
X.	PERSPECTIVAS.....	48
XI.	REFERENCIAS.....	49
XII.	ANEXOS	58

RESUMEN

Escherichia coli es un microorganismo anaerobio facultativo que tiene la capacidad de crecer en L-lactato como única fuente de carbono. La asimilación de este depende de la expresión del operón *lldPRD*, el cual codifica para tres proteínas; la L-lactato permeasa que permite la entrada de L-lactato a la célula, LldR el regulador transcripcional del operón y la enzima L-lactato deshidrogenasa, la cual oxida el L-lactato al metabolito central, piruvato. Una característica inusual del operón *lldPRD* es que el gen que codifica para el regulador transcripcional (*lldR*) se encuentra en medio de los genes codificantes de la permeasa (*lldP*) y la deshidrogenasa (*lldD*), comúnmente los reguladores transcripcionales se encuentran fuera de los operones y con una regulación genética aparte.

La regulación de la expresión genética es fundamental para el correcto funcionamiento celular, en el caso de los transcritos policistrónicos, los mecanismos de regulación post-transcripcional pueden utilizarse para ajustar la cantidad de expresión individual de los genes. En este trabajo se encontró que la dosificación de las proteínas LldP, LldR y LldD codificadas por el operón *lldPRD* de *Escherichia coli*, además de tener regulación a nivel transcripcional y traduccional, requiere de regulación por procesamiento de mRNA dependiente de RNasa E, lo que permite una modulación en la cantidad de proteínas. Este evento de procesamiento comienza con la inactivación casi inmediata del mRNA de *lldR* y continúa con la diferencia de estabilidad de los segmentos que resultan del procesamiento. De esta manera, el mRNA dependiente del procesamiento de RNasa E y la diferencia de estabilidad en los segmentos restantes, aseguran la dosificación final de la expresión individual de los genes del operón *lldPRD*.

ABSTRACT

Escherichia, a facultatively anaerobic organism, is capable of growing on L-lactate as a sole carbon source, this is achieved by the expression of the *lldPRD* operon which codes for three proteins; L-lactate permease which allows entry of L-lactate into the cell, the transcriptional regulator LldR and the enzyme L-lactate dehydrogenase, which oxidizes L-lactate to the central metabolite, pyruvate. An unusual feature of the *lldPRD* operon is that the gene encoding the transcriptional regulator (*lldR*) is located between the genes encoding the permease (*lldP*) and the dehydrogenase (*lldD*), transcriptional regulators commonly are located outside operons and have an independent gene regulation.

The regulation of gene expression is essential for proper cell function, in the case of polycistronic transcripts, posttranscriptional regulatory mechanisms can be used to adjust the expression of individual genes. In this study, it was elucidated that the dosage of the proteins LldP, LldR and LldD proteins encoded by the *Escherichia coli lldPRD* operon, in addition to regulation at the transcriptional and translational level, requires regulation by RNase E-dependent mRNA processing, which allows a modulation in the amount of protein. This processing event begins with the almost immediate inactivation of *lldR* mRNA and continues with the difference in stability of the segments that result from processing. In this way, the mRNA-dependent processing of RNase E and the difference in stability in the remaining segments ensure the fine-tuning of the expression of the individual genes of the *lldPRD* operon.

ABREVIATURAS

°C	Grado centígrado
CAI	Índice de adaptación de codones (Codon Adaptation Index)
cDNA	DNA complementario
CRIM	Conditional-replication, integration and modular
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilen-diaminotetraacético
g	Gramo
G	Fuerza centrífuga
l	Litro
LB	Lysogeny broth
mg	Miligramo
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimol
mRNA	RNA mensajero
nm	Nanómetro
nt	Nucleótido
ONPG	o-nitrofenil-β-D-galactósido
ORFs	Marco de lectura abierto (Open Reading Frames)
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
pH	Potencial de hidrogeniones
RBS	Sitio de unión al ribosoma (Ribosome binding site)
RNA	Ácido ribonucleico (Ribonucleic acid)
rne(Ts)	RNasa E termosensibles
rne+	RNasa E silvestre
rRNA	RNA ribosomal
SD	Secuencia consenso Shine-Dalgarno
SDS	Dodecil sulfato sódico (sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
SSC	Amortiguador citrato de sodio-solución salina (saline-sodium citrate)
TAE	Amortiguador tris, acetato y EDTA
TBE	Amortiguador tris, borato y EDTA
ts	Termosensible
TTBS	Amortiguador Tris, NaCl, Tween 20 (Tween Tris buffered saline)
U	Unidad
UV	Ultravioleta
wt	Silvestre
λ	Lambda
μg	Microgramos
μl	Microlitros

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Regulación genética en bacterias

El descubrimiento del operón *lac* estableció un importante modelo de regulación genética en bacterias, en el cual los genes dentro de un mismo operón son expresados de forma coordinada, gracias a la existencia de proteínas regulatorias que tienen como blanco sitios cercanos ubicados en la vecindad de los promotores.

El operón *lac* está involucrado en el metabolismo de lactosa, consiste en tres genes estructurales contiguos que se transcriben como un solo mRNA: *lacZ*, el cual codifica para la β galactosidasa, enzima que actúa rompiendo la lactosa en galactosa y glucosa y además convierte lactosa a alolactosa; *lacY*, codifica para la permeasa que permite la entrada de lactosa a la célula; y *lacA*, que codifica para una transacetilasa que transfiere un grupo acetil del grupo coenzima A (CoA) al grupo hidroxilo de galactósidos (Jacob & Monod, 1959, 1961; Ramos et al., 2013). El operón *lac* se regula por un mecanismo de represión, en el cual la proteína represora LacI se une al sitio operador del promotor e inhibe transcripción de los genes *lacZYA* (Figura 1). El inductor del operón es la alolactosa que se une a LacI y previene la represión del operón (Clark & Pazdernik, 2013).

El conocimiento de la acción de los represores e inductores de la transcripción que actúan en *trans* fueron una gran aportación sobre el conocimiento de la regulación de la expresión genética (Maas & Mcfall, 1964).

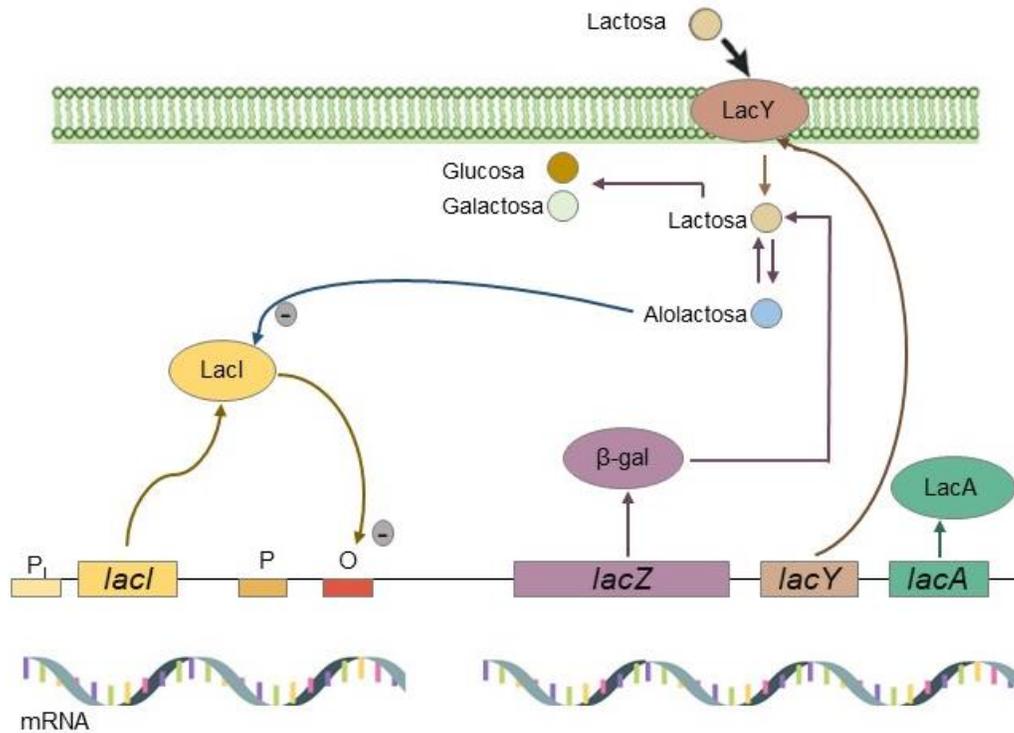


Figura 1. El operón lactosa de *Escherichia coli*. Los genes *lacZ*, *lacY* y *lacA* se transcriben a partir de un único promotor (P) que produce un único mRNA a partir del cual se traducen las tres proteínas. El operón está regulado por el represor LacI, producto del gen *lacI*, que se transcribe a partir de su propio promotor (P_i). El represor inhibe la transcripción uniéndose al operador *lac* (O). El inductor (alolactosa) evita que el represor se una al operador.

Ahora se sabe que además del modelo del operón *lac*, existen una amplia variedad de mecanismos de regulación en bacterias y que estos mecanismos pueden ocurrir a diferentes niveles dentro de los procesos que controlan la expresión génica.

1.1.1 Regulación transcripcional

En el inicio de la transcripción el reconocimiento del promotor por la RNA polimerasa juega un papel importante, por sí sola no puede reconocer el promotor, es necesario que intervengan los factores sigma y que se constituya la holoenzima de RNA polimerasa para poder iniciar la transcripción (Browning & Busby, 2016). La holoenzima se forma con el “core” de la enzima, compuesto por cinco subunidades ($\alpha_2\beta\beta'\omega$) la cuales catalizan la formación de los enlaces fosfodiéster y la unión con el factor sigma (σ), el cual se considera una sexta subunidad dissociable. Existen diferentes factores sigma, los cuales guían a la RNA polimerasa al promotor para formar el complejo abierto, es decir, cuando la holoenzima se une al promotor y se forma la burbuja de transcripción o complejo abierto. La especificidad de la RNA polimerasa depende de su factor sigma (Feklístov et al., 2014). Los factores sigma denominados “housekeeping” o de mantenimiento son los más abundantes y son los que actúan en la mayoría de los promotores. En respuesta a las condiciones ambientales la abundancia de los factores sigma alternativos aumenta y pueden competir por la unión con la RNA polimerasa (Murakami et al., 2002). La actividad de los factores sigma alternativos puede controlarse por diferentes mecanismos como, modificación covalente, secuestro por factores anti-sigma, localización celular así como su tasa de síntesis y degradación (Paget, 2015).

El reconocimiento del promotor por la holoenzima RNA polimerasa está determinado por las secuencias consenso de los elementos -35, el extendido -10, elemento -10, la región discriminativa, la región UP y el elemento de reconocimiento central (Figura 2), mientras más se ajusten a la secuencia consenso, se consideran promotores más fuertes (Browning & Busby, 2016). Una serie de cambios conformacionales se desencadenan por la unión de la holoenzima al promotor, el DNA

de doble cadena del promotor se desenrolla y la hebra de DNA molde entra al sitio activo de la holoenzima, en este punto se sabe que el complejo abierto se ha formado (Bera et al., 2022).

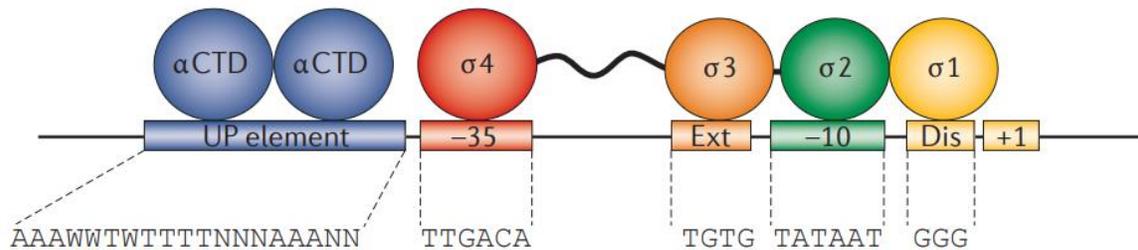


Figura 2. Principales elementos de DNA en el promotor reconocidos por la RNA polimerasa. Se incluyen, el elemento UP (-37 a -58), el elemento -35 (-35 a -30), el elemento extendido -10 (-17 a -14), el elemento -10 (-12 a -7) y el elemento discriminador (-6 a -4). Se muestran las regiones del factor sigma (dominios 1 a 4) y el dominio carboxilo terminal de la subunidad α - de la RNA polimerasa (α -CTD) que entran en contacto con los elementos de promotor. Tomado de *Local and global regulation of transcription initiation in bacteria* por de Browning & Stephen (2016). Nature Reviews Microbiology.

Existen otras moléculas, además de los factores sigma que pueden regular la actividad de la holoenzima, su participación puede modular la estabilidad del complejo abierto o incluso son capaces de secuestrar la holoenzima, disminuyendo de esta manera la cantidad de RNA polimerasa disponible. Un ejemplo es el RNA 6S, este RNA no codificante que se sintetiza en respuesta al crecimiento lento de la célula, y adquiere una estructura similar a la que se encuentra presente en la burbuja de transcripción, por lo cual promueve la captura de la RNA polimerasa disminuyendo la cantidad de enzima disponible para la síntesis de nuevos RNAs (Cavanagh & Wassarman, 2014; Paul et al., 2005). Existen también factores provenientes de fagos que intervienen en la actividad de la RNA polimerasa, la proteína Gp2 del fago T7 puede inhibir la actividad de la RNA polimerasa induciendo un cambio conformacional que bloquea el acceso del DNA al sitio activo, la proteína P7 del fago Xp10 inhibe la actividad de la RNA polimerasa desplazado al factor sigma

(Liu et al., 2014). Otro factor importante que interviene con la actividad de la holoenzima son los niveles de los cuatro nucleósidos trifosfatos (NTP), sus sustratos (Browning & Busby, 2016).

El promotor de DNA también posee elementos de regulación intrínsecos, esta regulación puede ser desde el superenrollamiento hasta la identidad y arquitectura de las secuencias de reconocimiento de la RNA polimerasa. Además, como se mencionó, se encuentran los factores proteicos o factores de transcripción que pueden bloquear o facilitar el acceso de la RNA polimerasa al promotor. Los factores de transcripción se pueden unir al promotor al sitio del operador, su papel consiste modular la actividad del promotor, activando o inhibiendo la transcripción en respuesta a las señales ambientales (Browning & Busby, 2016).

Las señales provenientes del medio ambiente son detectadas en muchos casos de forma directa por el factor de transcripción, como es el caso de LacI, que une lactosa (alolactosa) y esto disminuye su afinidad por el DNA. En contraste, en bacterias existen los sistemas de dos componentes, los cuales detectan señales de cambios del ambiente (disponibilidad de nutrientes, oxígeno, pH, entre otros) y desencadenan una respuesta adaptativa. Los sistemas de dos componentes consisten de una cinasa censora que se autofosforila en respuesta a la percepción de una señal ambiental y una proteína conocida con el nombre de regulador de respuesta, la cual es fosforilada por la cinasa y genera una respuesta adaptativa que le permite al microorganismo contender con el estímulo percibido. Existen muchos reguladores de respuesta que son factores de transcripción, y su fosforilación controla su afinidad por el DNA, de este modo, esta proteína se une a regiones promotoras de determinados genes y actúa activando o reprimiendo la transcripción de dichos genes (Terán et al., 2019).

1.1.2 Regulación post-transcripcional

La regulación post-transcripcional en bacterias ocurre principalmente por pequeños RNAs reguladores, estos se pueden unir a mRNAs blancos provocando un aumento o inhibición de la traducción o bien, alterar la estabilidad del mRNA, generalmente los pequeños RNAs requieren la ayuda de la chaperona de RNA Hfq, la cual tiene un papel central en la regulación post-transcripcional promoviendo la interacción de los pequeños RNAs con sus mRNAs blancos (McQuail et al., 2019).

En *E. coli* la respuesta al estrés también es mediada por la expresión del factor sigma alternativo, RpoS. Existe un mecanismo de regulación post-transcripcional que incrementa la cantidad de RpoS en condiciones de estrés; una vez sintetizado, se une a la RNA polimerasa para activar el regulón que permite la adaptación de la bacteria a las condiciones de estrés. Cuando la célula vuelve a su condición óptima, la proteína RpoS es degradada y su traducción se inhibe (Battesti et al., 2011).

1.1.3 Regulación traduccional

Es importante regular la traducción en sus tres etapas; inicio, elongación y terminación. La regulación del inicio de la traducción puede incluir, secuestro de sitio de unión del ribosoma y el control del número de ribosomas disponibles (Tollerson & Ibba, 2020).

En la mayoría de las bacterias la secuencia Shine-Dalgarno (SD) que se encuentra cercana al extremo 5' del mRNA es clave para la unión del ribosoma, esta secuencia se aparea con el anti SD

presente en el extremo 3' del rRNA 16s, generalmente, los mRNA con mayor tasa de traducción poseen secuencias SD cercanas a la secuencia consenso "AGGAGG" (Ma et al., 2002).

Los niveles de ribosomas en la célula pueden regularse post-transcripcionalmente durante su ensamblaje, un proceso cuidadosamente regulado en el que intervienen proteínas ribosomales y subunidades actuando de manera coordinada, además, proteínas de ensamblaje (Pestova et al., 2001). La unión de las subunidades ribosomales juega un papel importante en el inicio de la traducción, los factores de iniciación coordinan el tiempo y la ubicación de la iniciación (Rodnina, 2018). La proteína LepA facilita la unión de proteínas a la subunidad pequeña del ribosoma, además participa en la maduración del rRNA16S, por otro lado BipA regula el ensamblaje de los ribosomas en condiciones de estrés (Fan et al., 2015).

La unión de las subunidades ribosomales es un paso crítico en el inicio de la traducción, los factores de iniciación coordinan el tiempo y el espacio en donde sucede. El factor iniciador IF1 ayuda en la selección de tRNA^{fmet} y participa en la asociación y disociación de ribosomas, el factor iniciador IF2 asegura la selección del tRNA^{fmet} para iniciar la traducción, el factor de inicio IF3 sirve en la selección del codón de inicio para promover la unión con el tRNA^{fmet} (Yamamoto et al., 2016). Las subunidades de los ribosomas se asocian y disocian al iniciar y terminar la traducción de genes, pero en algunos casos, las subunidades pueden permanecer juntas para iniciar la traducción de un siguiente gen, haciendo más eficiente el proceso (Yamamoto et al., 2016).

El número de ribosomas es directamente proporcional a la tasa de crecimiento, pueden sintetizarse en grandes cantidades debido a los múltiples operones para rRNA (*rrnA*), *E. coli*, posee siete operones capaces de adaptarse a las condiciones ambientales (Condon et al., 1995).

En la etapa de elongación, los ribosomas catalizan la formación de enlaces peptídicos entre aminoácidos, la disponibilidad de los tRNA y el número de ribosomas activos pueden controlar esta etapa (Dai et al., 2018). Una pausa de los ribosomas puede ocurrir debido a cadenas específicas de aminoácidos que inducen a un estancamiento del ribosoma o por secuencias con varias prolina seguidas, la prolina es el aminoácido más tardado en formar el enlace peptídico, en consecuencia se disminuye la velocidad del ribosoma (Pavlov et al., 2009).

La terminación de la traducción en bacterias ocurre por los tres factores de terminación: RF1, RF2 y RF3, RF1 y RF2 reconocen secuencias de término UGA, UAA, UAG y UAA y el RF3 disocia al ribosoma. Si no están presentes los factores de terminación, el ribosoma no se puede separar del codón de término y su concentración en la célula se disminuye (Zaher & Green, 2011). La regulación genética en la terminación de la traducción ocurre por cambios de marco de lectura y por la lectura del codón de terminación.

En cada paso de la traducción existen mecanismos que se activan en respuesta a estímulos internos y ambientales. Asimismo, la transcripción y la traducción actúan en conjunto para regular la expresión génica asegurar un mejor ajuste de la expresión de proteínas (Tollerson & Ibba, 2020).

1.2 Operón *lldPRD*

Escherichia coli tiene la capacidad de crecer en L-lactato como única fuente de carbono, esto es posible gracias a la actividad de la L-lactato deshidrogenasa dependiente de flavín mononucleótido, enzima asociada a membrana, la cual oxida el L-lactato al metabolito central, piruvato. Esta actividad enzimática depende de las concentraciones de oxígeno presentes en las condiciones de crecimiento; alcanzando su máxima actividad en condiciones aerobias y en presencia de L-lactato (Futai & Kimura, 1977) pero siendo ausente durante condiciones fermentativas, incluso ante la presencia del inductor (Nishimura et al., 1983).

El gen que codifica para la L-lactato deshidrogenasa está localizado en el operón *lldPRD* (Dong et al., 1993), el cual también incluye a los genes *lldP* y *lldR*, que codifican la L-lactato permeasa y el regulador transcripcional (Dong et al., 1993). La expresión del operón *lldPRD* se ha demostrado que se lleva a cabo por un único promotor (Aguilera et al., 2008) y es controlado por LldR y ArcA (Aguilera et al., 2008; Lynch & Lin, 1996). LldR pertenece a la familia de reguladores transcripcionales GntR, que muestra un dominio hélice-vuelta-hélice en la región NH2 terminal. LldR ha sido propuesto como activador de la expresión del operón *lldPRD* en células en crecimiento en la presencia de L-lactato y reprime su transcripción en la ausencia del inductor, funcionando como regulador transcripcional dual (Aguilera et al., 2008).

Por otro lado, ArcA, forma parte del sistema de dos componentes de transducción de señales ArcAB, el cual, en condiciones anóxicas o fermentativas de crecimiento, inicia una cascada de fosforilación que culmina con la fosforilación de ArcA (ArcA-P) (Alvarez et al., 2013; Georgellis et al., 2001; Malpica et al., 2004, 2006). ArcA-P se une a la región del promotor de *lldPRD* (posición -25 a -11 con respecto al sitio de inicio de la transcripción de *lldP*) y reprime la

transcripción de *lldPRD* (Lynch & Lin, 1996).

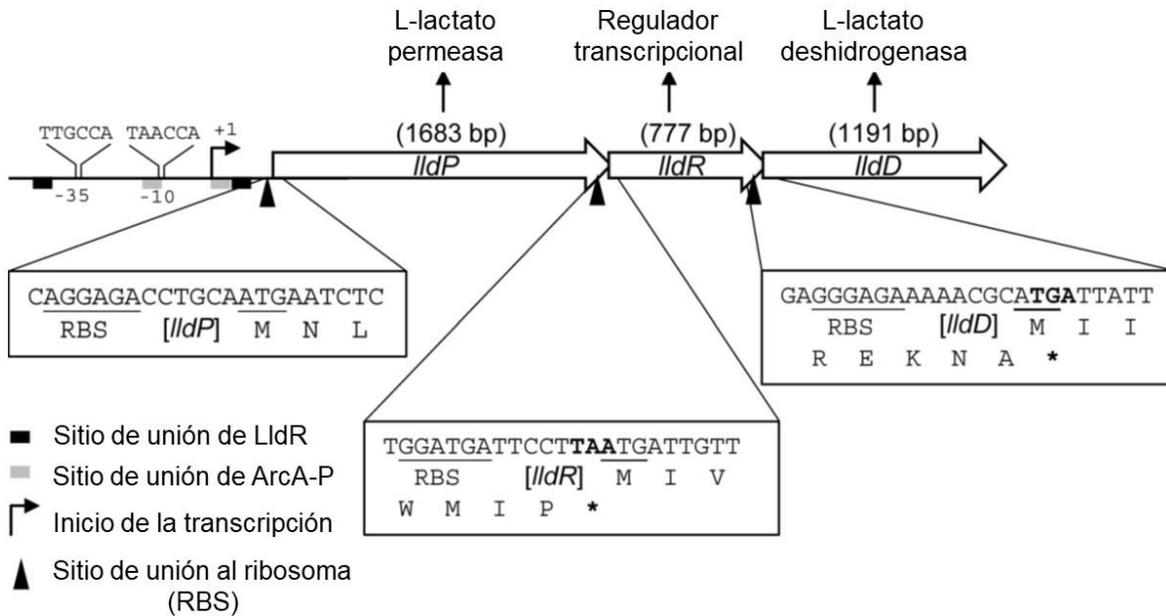


Figura 3. Organización genética del operón *lldPRD*. Las flechas horizontales indican las posiciones y direcciones de los tres genes. La longitud de los genes se muestra entre paréntesis. Se señalan elementos transcripcionales río arriba de la región de los genes estructurales (como el promotor, secuencias -35 y -10), el sitio de inicio de la transcripción y el sitio de unión de ArcA-P y LldR. En los cuadros de texto, los sitios de unión al ribosoma (RBS) y el codón de inicio se encuentran subrayados, y los codones de parada de los genes sobrelapados están en negrita y etiquetados con asteriscos. Adaptado de *Protein Dosage of the lldPRD Operon Is Correlated with RNase E-Dependent mRNA Processing* por Angel-Lerma et al., 2021. *Journal of Bacteriology*.

El operón *lldPRD* tiene una característica interesante poco usual, los tres marcos de lectura abiertos (ORFs) se encuentran sobrelapados en sus codones de término e inicio de la traducción (Figura 3) (Dong et al., 1993). Otra característica inusual del operón es el orden de los tres genes sobrelapados; el cistron que codifica para la proteína reguladora (LldR) se encuentra en medio de los genes estructurales de la permeasa y la deshidrogenasa (Figura 3). Esta característica es atípica, ya que generalmente el gen que codifica para la proteína reguladora, de la cual la célula sólo necesita unas pocas moléculas, está codificado en una región diferente y cuenta con regulación de la transcripción independiente a los demás genes.

1.3 Principales endorribonucleasas de *Escherichia coli*

Las ribonucleasas (RNAsas) son enzimas que participan en el metabolismo del RNA, sus funciones incluyen maduración, degradación, procesamiento y control de calidad del RNA, e incluso pueden participar en la regulación genética (Bechhofer & Deutscher, 2019). Para iniciar la degradación o procesamiento del mRNA en la mayoría de las ocasiones es necesaria una RNasa del tipo endorribonucleasa, capaz de realizar cortes endorribonucleolíticos en el RNA.

Se han purificado al menos nueve endorribonucleasas en *E. coli*; de ellas, RNasa E es la principal encargada de los eventos de procesamiento del RNA, seguida de RNasa III y RNasa P (Bechhofer & Deutscher, 2019). Por otro lado, RNasa G es una endorribonucleasa que posee una similitud de aproximadamente 50% en la secuencia de la región catalítica de RNasa E, por lo tanto, algunas de sus funciones se superponen, su especificidad de corte es similar pero no idéntica. (Lee et al., 2002; Ow et al., 2004).

La RNasa E es una endorribonucleasa esencial presente en la mayoría de las bacterias, en *E. coli* es codificada por el gen *rne*. Juega un papel importante en todos los aspectos del metabolismo de RNA, participa en el inicio de la degradación del RNA mensajero, maduración de los precursores de RNA de transferencia y RNA ribosomal, procesamiento y degradación de pequeños RNAs y control de la calidad del RNA ribosomal (Bandyra & Luisi, 2018; Mackie, 1998, 2013).

La enzima RNasa E procesa RNA de cadena sencilla, no tiene una secuencia de reconocimiento específica, pero se sabe que corta sitios ricos en A-U y que tiene preferencia por los sustratos de RNA monofosfatados en el extremo 5' (Jiang & Belasco, 2004). Dependiendo del organismo, la enzima RNasa E se asocia con otras proteínas para formar el complejo multi enzimático conocido

como el degradosoma de RNA, el cual degrada y procesa el RNA celular (Bandyra & Luisi, 2018; Koslover et al., 2008).

La RNasa E tiene un papel importante en la regulación de la expresión genética, es la principal endorribonucleasa encargada de mantener en homeostasis el RNA mensajero celular, ya sea por procesamiento y degradación del RNA mensajero o por su función en la maduración de RNA ribosomal y RNA de transferencia. Asimismo, esta enzima puede actuar sobre transcritos policistrónicos, la diferencia en la estabilidad del RNA mensajero permite un control en la expresión de proteínas, generalmente un tiempo de vida media más extenso le permite al RNA mensajero pasar por más rondas de traducción en comparación con moléculas de RNA mensajero con tiempos de vida más cortos (Richards et al., 2008).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La regulación genética en todos los seres vivos es de vital importancia para controlar el gasto energético, por ello las cantidades de las proteínas codificantes del operón *lldPRD* de *Escherichia coli* deberían ser diferentes. La disposición particular de los tres genes en el operón *lldPRD* retrata una paradoja, ya que se espera que la proteína reguladora sea requerida en cantidades relativamente pequeñas en comparación con las otras dos proteínas. Existe muy poca información sobre el mecanismo de regulación de la expresión del operón *lldPRD*, sin embargo, la disposición particular de los tres genes en el operón *lldPRD* sugiere que la diferencia en la cantidad relativa de las tres proteínas se debe a una regulación post-transcripcional diferencial, ya que la transcripción de los tres genes está dirigida por un solo promotor.

III. HIPÓTESIS

La dosificación de proteínas codificantes del operón *lldPRD* de *Escherichia coli* tiene regulación a nivel postranscripcional.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Estudiar los factores que están involucrados en el mecanismo de regulación de la expresión de las proteínas codificadas por el operón *lldPRD* en *Escherichia coli*.

4.2 Objetivos específicos

1. Evaluar si existe diferencia en la concentración relativa de las proteínas expresadas por el operón *lldPRD* de *Escherichia coli* durante condiciones de inducción.
2. Corroborar si la transcripción del operón está dirigida por un solo promotor.
3. Determinar si existe una traducción diferencial de los genes *lldP*, *lldR* y *lldD*, valorando la funcionalidad de los sitios de unión al ribosoma, mediante el uso de fusiones traduccionales con *lacZ*.
4. Determinar si las principales endorribonucleasas de *Escherichia coli* tienen alguna acción sobre el transcrito, para conocer si la regulación del operón *lldPRD* ocurre por procesamiento del mRNA.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo se encuentran listadas en la Tabla I.

Tabla I. Cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo

Cepa	Genotipo	Referencia
MC4100 (silvestre)	<i>F- [araD139]B/r DE(argF-lac)169 Lambda- e14- flhD5301 DE(fruK-yeiR)725(fruA25) relA1 rpsL150(strR) rbsR22 DE(fimB-fimE)632(::IS1) deoC1</i>	(Casadaban, 1976)
ECL5002	MC4100 $\lambda\Phi$ (<i>lldP'</i> - <i>lacZ</i>) fusión transcripcional	(Kwon et al., 2000)
IFC5028	MC4100 $\lambda\Phi$ (<i>lldRD'</i> - <i>lacZ</i>) fusión transcripcional	Presente trabajo
IFC5029	MC4100 $\lambda\Phi$ (Promotor RBS <i>lldP'</i> - <i>lacZ</i>) fusión traduccional	Presente trabajo
IFC5030	MC4100 $\lambda\Phi$ (Promotor <i>lldP</i> RBS <i>lldR'</i> - <i>lacZ</i>) fusión traduccional	Presente trabajo
IFC5031	MC4100 $\lambda\Phi$ (Promotor <i>lldPR</i> RBS <i>lldD'</i> - <i>lacZ</i>) fusión traduccional	Presente trabajo
IFC5032	MC4100 $\lambda\Phi$ (Promotor <i>lldP</i> RBS <i>lldRI-759'</i> - <i>lacZ</i>) fusión traduccional	Presente trabajo
IFC5033	Locus nativo de <i>lldR</i> etiquetado en el C-terminal con 3xFLAG	Presente trabajo
IFC5034	Locus nativo de <i>lldD</i> etiquetado en el C-terminal con 3xFLAG	Presente trabajo
CH1827	MC1061 <i>zce-726::Tn10</i>	(Mudd et al., 1990)
CH1828	CH1827 <i>rne</i> (ts)	(Mudd et al., 1990)
ECL2006	MC4100 <i>rnc::Tn10</i>	(Misra & Apirion, 1979)
N2020	[<i>ie rnp</i> termosensible] <i>npA49 argA52 trpA36 glyA34 rpsL lacZ</i>	(Apirion, 1980)
SK2538	<i>Δrng::cat rph-1 thyA715</i>	(Ow et al., 2004)

La cepa IFC5028 se construyó para obtener la fusión transcripcional *lldRD'*-*lacZ* (con resistencia a ampicilina), para ello se usaron los oligonucleótidos LacZPDfw y LacZDrev, la construcción se integró en el sitio de inserción del fago λ del cromosoma utilizando la metodología del sistema CRIM (Haldimann & Wanner, 2001).

En la construcción de las cepas IFC5029, IFC5030, IFC5031 y IFC5032 se utilizó el oligonucleótido lld-Prom-Fw (todas las cepas contienen el promotor propio del operón) y como oligonucleótidos reversos: LLDPTRADREV, LLDRTRADREV y LLDDTRADREV, respectivamente; se llevó a cabo la metodología del sistema CRIM para generar fusiones con el gen reportero *-lacZ* (con resistencia a ampicilina) e integrarlas en el sitio de inserción del fago λ (Haldimann & Wanner, 2001).

Para las cepas IFC5033 y IFC5034 se realizó un etiquetado en el extremo carboxilo terminal con el epítotope 3xFLAG, la elaboración de dichas cepas se realizó a través de recombinación homóloga usando el sistema de recombinasa del fago *lambda red* (Datsenko & Wanner, 2000; Uzzau et al., 2001), para ello se generó un producto de PCR empleando oligonucleótidos que contenían una secuencia semejante a la región a reemplazar, el plásmido pKD4 se utilizó como molde de DNA, dicho plásmido contiene la secuencia codificadora del epítotope 3xFLAG flanqueado por sitios FRT y un casete de resistencia a kanamicina. Los oligonucleótidos empleados fueron: lldR-3FLAG-Fw y lldR-3FLAG-Rv para la cepa IFC5033 y lldD-3FLAG-Fw y lldD-3FLAG-Rv para la cepa IFC5034.

La secuencia de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se encuentra en el apartado de anexos.

6.2 Condiciones de crecimiento

Los cultivos se realizaron en condiciones aerobias en placas de agar o medio líquido en agitación constante a las temperaturas 30°, 37° o 43°, dependiendo del ensayo, los medios de cultivo utilizados fueron LB (triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, cloruro de sodio 10 g/L) y medio mínimo M9 (la composición de este medio se encuentra en anexos). Cuando fue necesario el medio fue suplementado con L-lactato 20mM, como inductor del operón y con los antibióticos ampicilina 100 µg/ml, kanamicina 50 µg/ml y tetraciclina 10 µg/ml. Para el ensayo de la vida media de las proteínas se utilizó cloranfenicol 20 µg/ml y para evaluar la vida media de los mRNA se usó rifampicina 200 µg/ml.

6.3 Ensayos de actividad β-galactosidasa

En los ensayos de regulación transcripcional y regulación traduccional se utilizaron fusiones con el gen reportero *lacZ*. Se determinó la actividad de la enzima β-galactosidasa siguiendo el método de Miller (Miller, 1972) se cuantificó la hidrólisis del compuesto o-nitrofenil-β-D-galactósido (ONPG) por la enzima β-galactosidasa. La actividad del gen reportero es expresada en unidades Miller, las cuales se calculan con la siguiente fórmula:

$$1000 * \frac{DO_{420nm} - (1.75 * DO_{550nm})}{10 * 0.1 * DO_{600nm}}$$

La absorbancia a 420nm indica la actividad de la enzima β-galactosidasa, $1.75 * DO_{550nm}$ se toma como factor de corrección de los restos celulares y la absorbancia a 600nm corresponde a la densidad óptica del cultivo, la cual se multiplica por el tiempo de reacción (10 min) y por el volumen del cultivo utilizado (0.1 ml).

Para realizar los ensayos se utilizó el medio mínimo M9 con antibiótico ampicilina con y sin adición de L-lactato 20mM, las células se cultivaron aeróbicamente a 37° C en agitación de 250 rpm hasta una DO_{600nm} de 0.5. Una vez alcanzada la densidad óptica, se tomó una alícuota de 0.1 ml y se agregó a tubos de ensayo previamente adicionados con 0.9 ml de amortiguador Z ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 0.6 M, $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 0.04 M, β -mercaptoetanol 0.05 M), 10 μ l de SDS al 10% y 20 μ l de cloroformo, posteriormente se agitaron los tubos en vórtex para lograr la lisis celular y se inició la reacción adicionando 0.5 ml de ONPG 4mg/ml, transcurridos 10 min a temperatura ambiente se detuvo la reacción con 0.5 ml de Na_2CO_3 1M.

6.4 Ensayos de Western Blot

Los ensayos de Western Blot se utilizaron para determinar la abundancia de las proteínas LldR y LldD, correspondientes a las cepas IFC5033 e IFC5034, respectivamente. Las células se cultivaron en medio mínimo M9 con el antibiótico de selección kanamicina, además con la adición de L-lactato 20mM, el crecimiento se realizó de forma aerobia a 37° C y en agitación constante a 250 rpm hasta lograr una DO_{600nm} de 0.5-0.6.

Se tomó una alícuota de 1 ml del cultivo y se centrifugó durante 1 min a 13,000 g, se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en el amortiguador de carga para proteínas, a continuación, se incubaron a temperatura de 96° C por un tiempo de 10 min, de la suspensión se tomaron 10 μ l y se cargaron en geles SDS-PAGE al 10%. En este ensayo fue necesario hacer una dilución de la proteína LldD para poder visualizarla en la misma membrana que la proteína LldR, el contenido total de proteína del cultivo de la cepa con la etiqueta LldR 3xFLAG fue 100 veces mayor.

Una vez separadas las proteínas en el gel, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa Hybond-ECL (Amersham Biosciences), con la solución de transferencia (Tris 25 mM, glicina 250 mM, EDTA 1 mM, metanol 20%).

Realizada la transferencia se procedió a equilibrar la membrana con el amortiguador TTBS (Tris 25 mM, NaCl 150 mM, con 0.05% de Tween 20) durante 10 min, después se incubó en solución de bloqueo (5% de leche descremada en TTBS) por 30 min, a continuación se hicieron tres lavados con TTBS de 10 min cada uno, posteriormente se agregaron los anticuerpos primarios anti FLAG en una dilución 1:10000 con el amortiguador TTBS, y se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente, después se hicieron tres lavados de 10 min con TTBS y se agregó el anticuerpo secundario anti ratón en dilución 1:10000 durante 1 hora, terminada la incubación se realizaron de nuevo tres lavados con TTBS de 10 min (todas las incubaciones se realizaron en agitación oscilatoria y a temperatura ambiente).

Las proteínas fueron detectadas siguiendo el protocolo Amersham ECL Western Blotting Detection Kit.

6.5 Extracción de RNA

La extracción del RNA se realizó por el método de fenol caliente (Georgellis et al., 1992), las células crecieron en medio mínimo M9 con el antibiótico de selección y dependiendo de la cepa, con y sin la adición de L-lactato. Los cultivos se realizaron en agitación constante a 250 rpm a temperaturas de 30 °C, 37 °C o 43 °C según se requirió para la cepa, hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0.5-0.6.

Las células se centrifugaron a 4 °C por 4 min a 13,000 g y se resuspendieron en frío con 200 µl de solución I (acetato de sodio 0.1 M, sacarosa 0.3 M, pH 4.5), después se agregaron 200 µl de la solución II (acetato de sodio 0.01 M, SDS 2%, pH 4.5), a continuación, las muestras se calentaron a 80 °C por 1.5 min, posteriormente se adicionaron 400 µl de fenol caliente (80 °C) y se mezclaron con el uso de vórtex, después se incubaron 3 min a 80 °C y a continuación se centrifugaron a 4 °C durante 10 min a 13,000 g. La fase acuosa se separó y se pasó a un nuevo microtubo, se realizaron dos extracciones más con fenol caliente y posterior a ello dos lavados con un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, después se realizaron tres lavados con cloroformo frío, siempre conservando la fase acuosa y transfiriéndola a un nuevo microtubo, finalmente se precipitó con una solución 3M de acetato de sodio y 2.5 volúmenes de etanol. La pastilla se resuspendió en H₂O estéril.

La integridad del RNA se observó en geles de agarosa (1 %) y la concentración se analizó con NanoDrop, las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

6.6 Northern Blot

Para el ensayo Northern Blot, se cargaron 5 µg de RNA total de en geles desnaturalizantes de agarosa-formaldehído (1 %), posteriormente con se tiñó el gel con bromuro de etidio para observar el RNA en un transiluminador UV, con ello se verificó su calidad y concentración relativa, se tomaron fotografías para registrar el tamaño de las bandas de RNA ribosomal y el tamaño aproximado del marcador de peso molecular para posteriormente calcular el tamaño de las bandas que serán marcadas en la membrana de transferencia.

Se realizó la transferencia del RNA por capilaridad a una membrana de nylon usando la solución SSC 20x (1x SSC = 0.15M NaCl, 0.015 M de citrato de sodio), terminada la transferencia (12-18 h), la membrana se secó a una temperatura de 50-60 °C durante 5-10 minutos y se expuso a la luz UV en un transiluminador, se dejó por 3 min para lograr el entrecruzamiento del RNA con la membrana.

La membrana se incubó a una temperatura de 42°C durante 2-3 h con solución para pre-hibridar (solución de Denhardt 5x, SSC 5x, SDS 0.2%, formamida 50%, fosfato de sodio pH 6.5 0.01 M y DNA de esperma de salmón 10 mg/ml). Una vez terminada la pre-hibridación, las sondas se desnaturalizaron por 5 minutos a 96 °C y se añadió al amortiguador de pre-hibridación, la membrana se incubó a 42 °C por 12-16 horas en agitación, a continuación, la membrana se lavó dos veces con la solución A (SSC 2x, SDS 0.1 %) y dos veces con la solución B (SSC 0.2x, SDS 0.1 %), los lavados se realizaron a 42 °C por 30 minutos cada uno. La membrana se expuso en una pantalla amplificadora para detectar radioactividad durante 12-16 horas, posteriormente se visualizó con el escáner Thyphoon (Amersham Biosciences).

Las sondas utilizadas se marcaron con el kit RadPrime DNA Labeling System (Invitrogen).

6.7 Ensayo de extensión del cebador o *primer extension*

Se utilizaron 40 µg de RNA total de las cepas CH1827 y CH1828 y el oligonucleótido PE2-1ldPRD, el cual se marcó radioactivamente, las muestras y el oligo se desnaturalizaron durante 5 min a 65 °C y se dejaron enfriar a temperatura ambiente, se usó el sistema Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) para la síntesis del cDNA.

El producto de reacción se precipitó con 0.5 ml de N-butanol y se centrifugó durante 20 min a 13,000 g, a continuación, se le adicionó 0.7 ml de etanol absoluto y se centrifugó durante 5 min a 13,000 g, se retiró el sobrenadante y se resuspendió la pastilla con 0.7 ml de etanol al 70%, a continuación, se centrifugó a 13,000 g durante 5 min y se decantó el sobrenadante. Finalmente, la pastilla se secó en el equipo SpeedVac SC100 (Savant) y se resuspendió en 8 µl de una solución con formamida al 95%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol al 0.05% y xileno cianol FF al 0.05%. La suspensión se analizó con electroforesis en geles de secuencia (poliacrilamida 8%, urea 8 M).

La reacción de secuenciación se realizó por el método de Sanger utilizando como templado el plásmido pPLCT3 (operón *lldPRD*) y el oligonucleótido PE2-*lldPRD* marcado radioactivamente.

VII. RESULTADOS

7.1 Cuantificación relativa de las proteínas del operón *lldPRD* de *Escherichia coli*

Para confirmar que la cantidad de proteínas del operón es distinta, se realizaron fusiones cromosomales con la etiqueta 3xFLAG en las proteínas LldR y LldD, las células crecieron bajo condiciones de inducción (aerobiosis y en presencia de L-lactato) y se compararon mediante análisis de Western blot usando el anticuerpo primario anti-FLAG y como anticuerpo secundario anti-ratón. Para dicho experimento se realizó una dilución de 100 veces la concentración de proteína total de la cepa LldD-3xFLAG en comparación de la cepa LldR-3xFLAG. Se encontró que la proteína LldD es al menos 500 veces más abundante que la proteína LldR (Figura 4).

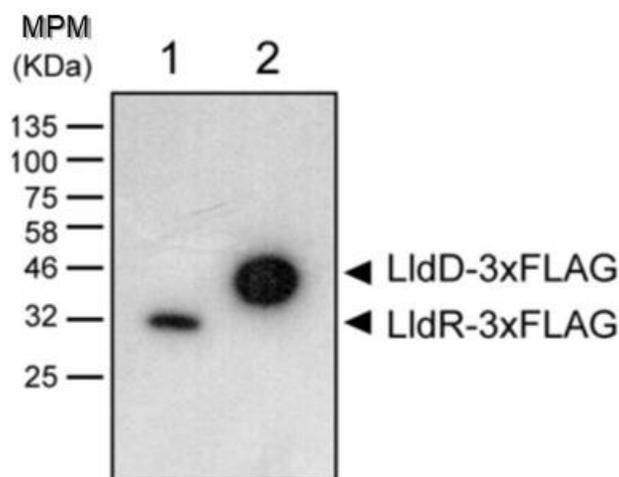


Figura 4. Concentración relativa de las proteínas LldR-3xFlag (31.9-kDa) y LldD-3xFlag (45.4-kDa). Las células de *E. coli* con las proteínas etiquetadas crecieron aeróbicamente en medio mínimo M9 suplementado con 0.2% de casaminoácidos y 20mM de L-lactato, se analizaron usando el ensayo de Western blot con anticuerpos anti-Flag. Extractos de las células IFC5032 y IFC5033 fueron cargados en los carriles 1 y 2, respectivamente. El contenido total de proteína cargada en el carril 1 fue 100 veces mayor que la cantidad cargada en el carril 2. La migración de los marcadores de peso molecular para proteínas se muestra a la izquierda. Adaptado de *Protein Dosage of the lldPRD Operon Is Correlated with RNase E-Dependent mRNA Processing* por Angel-Lerma et al., 2021. Journal of Bacteriology.

La estabilidad de las proteínas también se analizó para descartar que ese fuera el motivo de la diferencia en las cantidades encontradas, como resultado se encontraron tiempos de vida media similares que descartan dicha posibilidad (Figura 5).

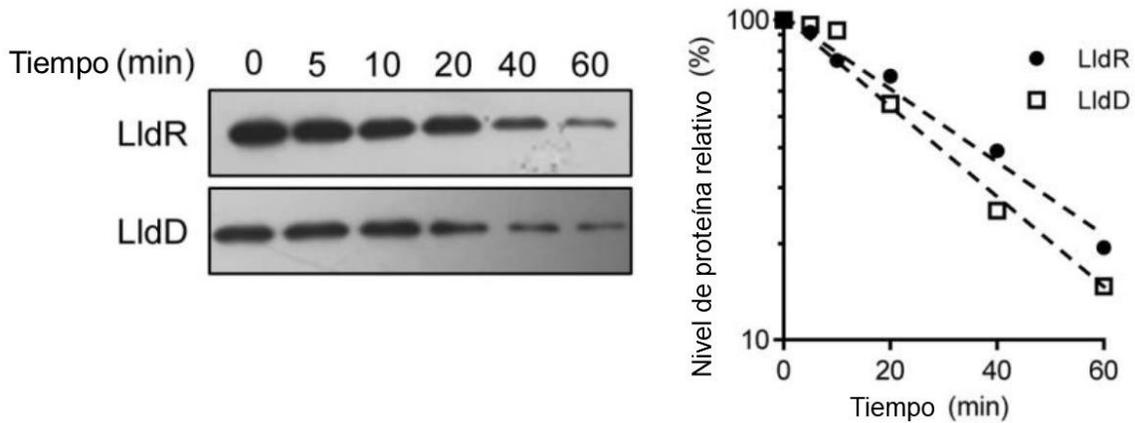


Figura 5. Estabilidad de las proteínas LldR-3xFLAG y LldD-3xFLAG después de la inhibición de su síntesis con cloranfenicol. (Izquierda) Análisis de Western blot usando anticuerpos anti-FLAG. (Derecha) Determinación cuantitativa de LldR y LldD a partir del Western blot representados en función del tiempo. Adaptado de *Protein Dosage of the lldPRD Operon Is Correlated with RNase E-Dependent mRNA Processing* por Angel-Lerma et al., 2021. Journal of Bacteriology.

7.2 La transcripción del operón está dirigida por un solo promotor

Se analizó la posibilidad de la presencia de promotores funcionales dentro del operón *lldPRD*. Para tal fin se construyeron fusiones transcripcionales con *lacZ*, la primera de ellas conteniendo la región río arriba de *lldPRD* que incluye el promotor (cepa ECL5002) (Kwon et al., 2000), la otra cepa se construyó al fusionar la región que incluye desde el nucleótido 10 de *lldP*, la secuencia completa de *lldR* y los primeros 65 nucleótidos de *lldD* (cepa IFC5028). Las cepas con las fusiones transcripcionales se cultivaron en medio líquido bajo condiciones aeróbicas en presencia y ausencia de L-lactato, la actividad β -galactosidasa se midió a mitad de la fase exponencial de

crecimiento. Se encontró que la expresión del reportero fue inducida solamente en presencia de L-lactato en la cepa que contiene la región río arriba de *lldP* (Figura 6).

Los resultados demuestran que la transcripción de los tres genes del operón está dirigida por un promotor único localizado río arriba del gen *lldP*, en consecuencia, se espera que se genere un único transcrito policistrónico *lldPRD*.

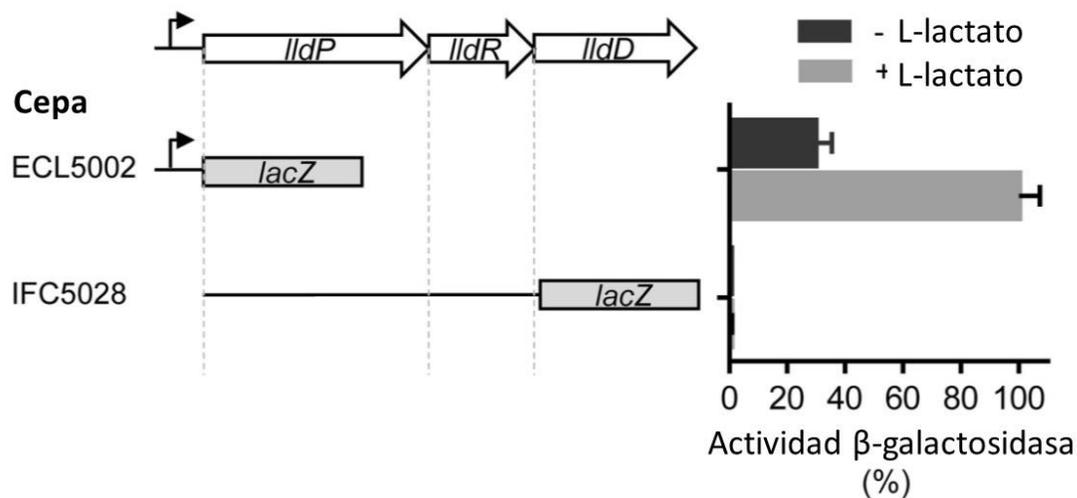


Figura 6. Inspección de posibles promotores del operón *lldPRD*. (Izquierda) Esquema representativo del operón *lldPRD* y los fragmentos fusionados con *-lacZ* en las cepas construidas, ECL5002 y IFC5028. (Derecha) Las cepas ECL5002 y IFC5028 se cultivaron aeróbicamente en medio mínimo M9 suplementado con 0.2% de casaminoácidos en presencia (+) o ausencia (-) de 20mM de L-lactato. A mitad de la fase exponencial de crecimiento las células se colectaron para analizar la actividad β-galactosidasa, los resultados se muestran en porcentaje de actividad en relación con la cepa ECL5002. Se presentan los promedios de cuatro réplicas del experimento realizados de manera independiente, se indican la desviación estándar (barras de error). Adaptado de *Protein Dosage of the lldPRD Operon Is Correlated with RNase E-Dependent mRNA Processing* por Angel-Lerma et al., 2021. Journal of Bacteriology.

7.3 Traducción diferencial de los genes *lldP*, *lldR* y *lldD*

Para conocer si la diferencia en la cantidad de proteínas del operón *lldPRD* está dada a nivel traduccional, se comparó la eficiencia de los sitios de unión al ribosoma (RBS) de los tres genes.

Para ello, se construyeron tres diferentes fusiones traduccionales con el gen reportero *lacZ*, *lldP*'-*lacZ*, *lldR*'-*lacZ* y *lldD*'-*lacZ*, las cuales fueron colocadas en el sitio de integración del fago λ en el cromosoma de *E. coli* silvestre MC4100, generando las cepas IF5029, IFC5030, y IFC5031. Las tres construcciones contienen el promotor propio del operón *lldPRD* y la secuencia completa río arriba del gen de interés, incluyendo el sitio de unión al ribosoma (RBS) y los dos primeros codones del respectivo cistron (Figura 7). Las cepas se cultivaron en medio mínimo M9 bajo condiciones aeróbicas en presencia y ausencia de L-lactato, la actividad β -galactosidasa se midió a mitad de la fase exponencial de crecimiento. Se observó que la expresión del reportero originada por el RBS de *lldP* fue aproximadamente 2 veces menor que la expresión dada por el RBS de *lldR* y *lldD* (Figura 7). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre el RBS de *lldR* y *lldD* (Figura 7). Como una posible causa en la diferencia de las concentraciones de las proteínas del operón *lldPRD*, analizamos el uso preferencial de codones, evaluando el índice de adaptación de codones (CAI) (Sharp & Li, 1987), utilizando la tabla de uso de codones de *E. coli* K-12 como referencia (Puigbò et al., 2008). Los valores de CAI obtenidos para *lldD*, *lldP* y *lldR* fueron de 0.790, 0.747 y 0.737, respectivamente, el orden relativo de los valores CAI corresponde a las abundancias relativas de sus respectivos productos proteicos, esto no es suficiente para explicar la gran diferencia observada entre las proteínas LldR y LldD (Figura 7). Por lo tanto, deben estar involucrados mecanismos adicionales en la regulación de la expresión del operón *lldPRD*.

Para explorar la posibilidad de que la diferencia en la cantidad de proteínas está regulada a nivel postranscripcional, debido al procesamiento del mRNA, se construyó una cuarta fusión traduccional con el gen reportero *lacZ*. Esta fusión es similar a la fusión IFC5030, con la diferencia de que incluye casi por completo la secuencia codificante de *lldR*. Como las fusiones anteriores,

se colocó en el sitio de incorporación del fago λ en el cromosoma de MC4100, generando la cepa IFC5032.

Las cepas IFC5030 y IFC5032 se cultivaron en medio mínimo M9 aeróbicamente en presencia y ausencia de L-lactato, la actividad β -galactosidasa se midió a mitad de la fase exponencial de crecimiento. Se encontró que la expresión del reportero de IFC5032 fue 10 veces menor que IFC5030 (Figura 7). Por lo tanto, se presume que el cistron *lldR* pudiera contener sitios de regulación a nivel postranscripcional.

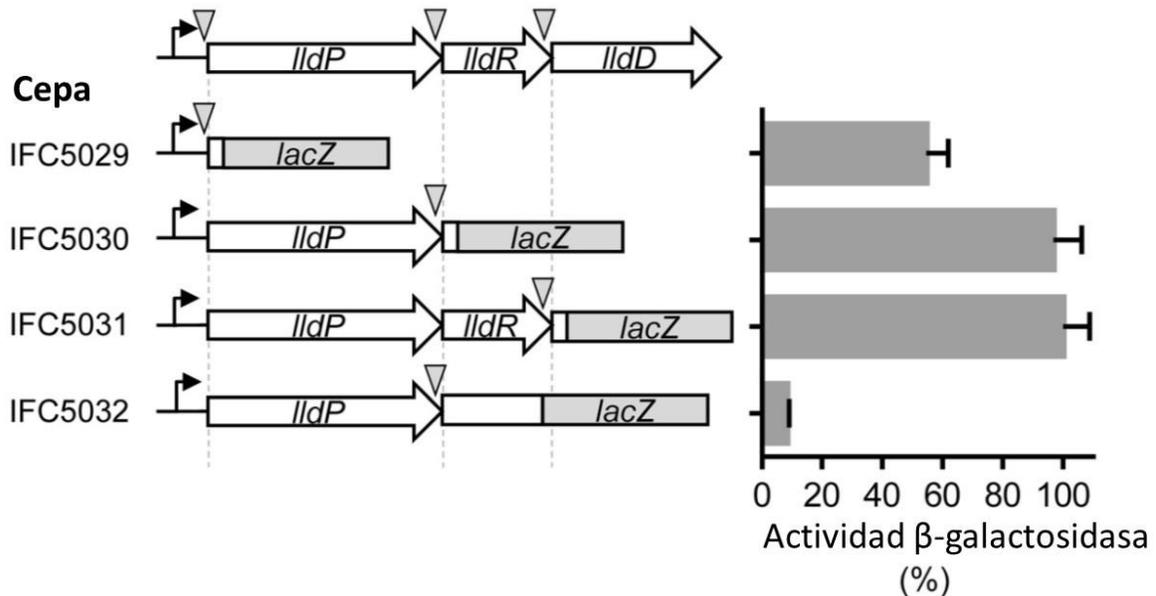


Figura 7. Tasa de traducción de los genes del operón *lldPRD* determinados por fusiones traduccionales *lacZ*. (Izquierda) Representación esquemática del operón *lldPRD* y los fragmentos unidos a *lacZ*, cepas IFC5029, IFC5030, IFC5031 y IFC5032. La posición relativa de los RBS en cada gen se indica con un triángulo. (Derecha) Las cepas IFC5029, IFC5030, IFC5031, y IFC5032 se cultivaron aeróbicamente en medio mínimo M9 suplementado con 0.2% de casaminoácidos con 20 mM de L-lactato como inductor. A mitad de la fase exponencial de crecimiento las células se colectaron para analizar la actividad β -galactosidasa, los resultados se muestran en porcentaje de actividad en relación con la cepa IFC5031. Se presentan los promedios de cuatro réplicas del experimento realizados de manera independiente, se indican la desviación estándar (barras de error). Adaptado de *Protein Dosage of the lldPRD Operon Is Correlated with RNase E-Dependent mRNA Processing* por Angel-Lerma et al., 2021. Journal of Bacteriology.

7.4 Acción de las principales endorribonucleasas de *Escherichia coli* sobre el transcrito del operón *lldPRD*

El procesamiento del mRNA de *E. coli* se debe a la acción de varias RNasas (Kushner, 2002), las responsables de la mayoría del procesamiento endorribonucleolítico de RNA son, RNasa E, RNasa III y RNasa P.

El mRNA de *lldPRD* se examinó en células deficientes de RNasa E [*rne*(Ts)], RNasa P [*rnp*(Ts)], RNasa III (*rnc*::Tn10), o RNasa G (*rng*::*cat*) (17-22). Para evaluar la participación de la RNasa E y la RNasa P, se usaron los alelos *rne*(Ts) y *rnp*(Ts), que producen enzimas condicionales sensibles a temperatura, se usan porque RNasa E y RNasa P son esenciales para la viabilidad celular. En el caso de la cepa mutante en *rng*, se usó porque su producto, RNasa G, es parálogo de RNasa E, se ha reportado que las actividades de ambas enzimas se sobrelapan (Lee et al., 2002).

En los análisis de Northern blot se utilizaron sondas específicas de *lldP* y *lldD* y el RNA aislado de las mutantes deficientes en RNasas.

En la mutante termosensible de RNasa E se observó que después del cambio de temperatura a 43 °C (temperatura no permisiva) una banda de 3,600 nt, correspondiente al tamaño completo del mensajero de *lldPRD*, se acumula; pero no se observa en la cepa silvestre (Figura 9). En contraste, no se detectó este efecto en las cepas mutantes de RNasa II y RNasa G o RNasa P a temperatura no permisiva (Figura 10).

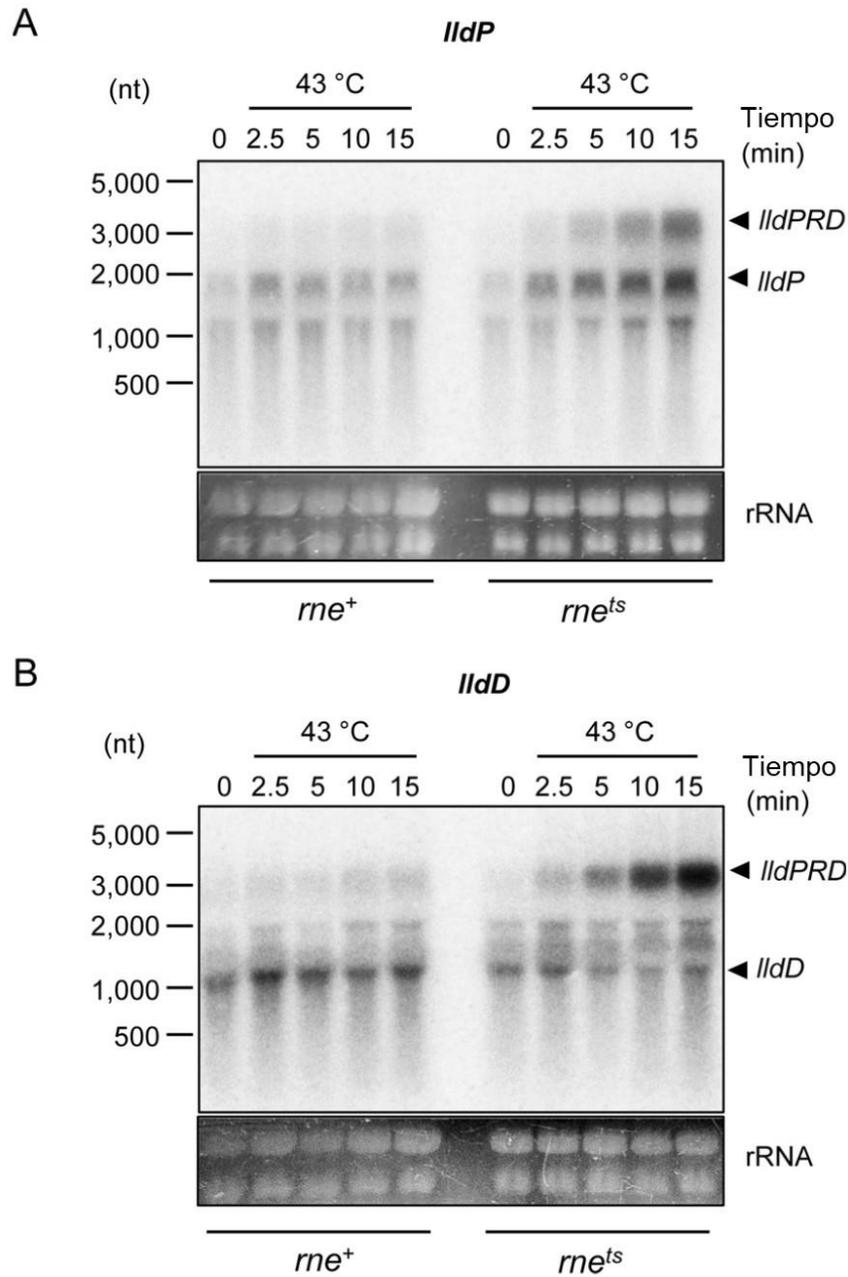


Figura 9. Análisis del mRNA de *lldPRD* en cepas *rne*⁺ y *rne*(Ts) mediante Northern blot. Las cepas CH1827 (*rne*⁺) y CH1828 *rne*(Ts) se cultivaron aeróbicamente a 30 °C, al llegar a una DO600 de 0.4, las células se cambiaron temperatura de 43 °C, se tomaron alícuotas a los tiempos indicados para la extracción de RNA total. Se muestran los radiogramas para las sondas específicas de *lldP* (A) y *lldD* (B). Las posiciones del marcador de peso molecular se muestran a la izquierda. Las flechas indican las posiciones de los transcritos de *lldP*, *lldD* y *lldPRD*. El panel de abajo muestra el RNA teñido con bromuro de etidio de la correspondiente membrana de hibridación, lo cual se usó como control de carga. Adaptado de *Protein Dosage of the lldPRD Operon Is Correlated with RNase E-Dependent mRNA Processing* por (Angel-Lerma et al., 2021). *Journal of Bacteriology*.

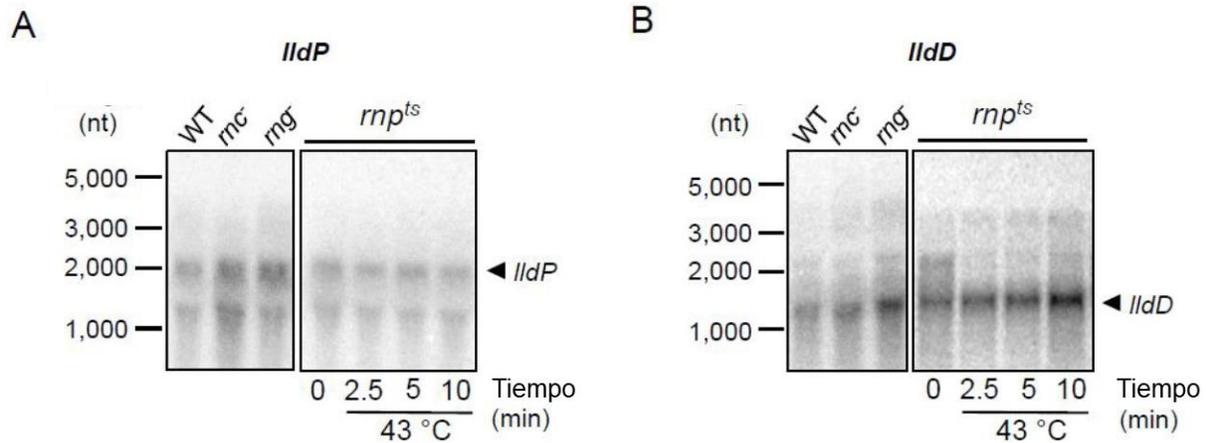


Figura 10. Análisis del mRNA de *lldPRD* en cepas deficientes en RNasa P (*rnp^{ts}*), RNasa III (*rnc::Tn10*) o RNase G (*rng::cat*) mediante Northern blot. Las cepas MC4100 (wt), ECL2006 (*rnc::Tn10*) y SK2538 (*rng::cat*) se cultivaron aeróbicamente a 37°C, hasta llegar a una DO₆₀₀ de 0.6. Las células de N2020 (*rnp^{ts}*) se cultivaron aeróbicamente a 30°C, al llegar a una DO₆₀₀ de 0.4 las células se cambiaron a temperatura de 43°C, se tomaron alícuotas a los tiempos indicados para la extracción de RNA total. Se utilizaron sondas específicas de *lldP* (A) y *lldD* (B). Las posiciones del marcador de peso molecular se muestran a la izquierda. Las flechas indican las posiciones de los transcritos de *lldP* y *lldD*. Adaptado de *Protein Dosage of the lldPRD Operon Is Correlated with RNase E-Dependent mRNA Processing* por Angel-Lerma et al., 2021. Journal of Bacteriology.

Con estos resultados pudimos concluir que RNasa E es responsable del procesamiento del mRNA de *lldPRD*, dejando intacto los mensajeros de *lldP* y *lldD*, pero cortando de manera endorribonucleolítica al mensajero de *lldR*, de esta manera la cantidad del mRNA de *lldR* disminuye drásticamente, por lo tanto, solo cantidades pequeñas de LldR se producen.

7.5 Mapeo de los sitios de procesamiento de RNasa E en el operón *lldPRD*

Con la finalidad de conocer los posibles sitios de corte en el mRNA de *lldR*, se realizó un mapeo de los extremos 5' de los mRNA mediante la técnica de *primer extension*. Se utilizó RNA aislado de la cepa silvestre y de la termosensible de RNasa E con un cebador complementario a las posiciones 528 a 549 del transcrito de *lldR*, con respecto al sitio de inicio de la traducción de *lldR*. Se encontraron dos productos de transcripción reversa, cuya intensidad se observa disminuida en la mutante en RNasa E a temperatura no permisiva (43°C) en comparación a la cepa silvestre o la mutante RNasa E a 30°C. El extremo 5' de estos productos se ubica dentro de la región codificante del mRNA de *lldR*, en las posiciones +381 y +389 con respecto al sitio de inicio de la traducción de *lldR* (Figura 11 A). Notablemente, las secuencias de estos sitios concuerdan con los sitios de reconocimiento/escisión de la RNasa E propuestos, que comprende regiones ricas en AU monocatenarias (Figura 11 B) (Chao et al., 2017; Del Campo et al., 2015; Ehretsmann et al., 1992; Lin-Chao et al., 1994; Mackie, 1991; McDowall et al., 1994). Adicionalmente, se detectó un producto de *primer extension* en la mutante RNasa E a temperatura no permisiva, en la posición +341 con respecto al codón de inicio de *lldR* (Figura 11 A). Sin embargo, no pudimos discernir si este producto es sitio para la escisión de una RNasa diferente de la RNasa E o si se debe a un producto de transcriptasa reversa incompleto. No obstante, se puede concluir que RNasa E es responsable de procesar el mRNA de *lldPRD* dentro del marco de lectura abierto de *lldR*, obstaculizando la traducción de LldR.

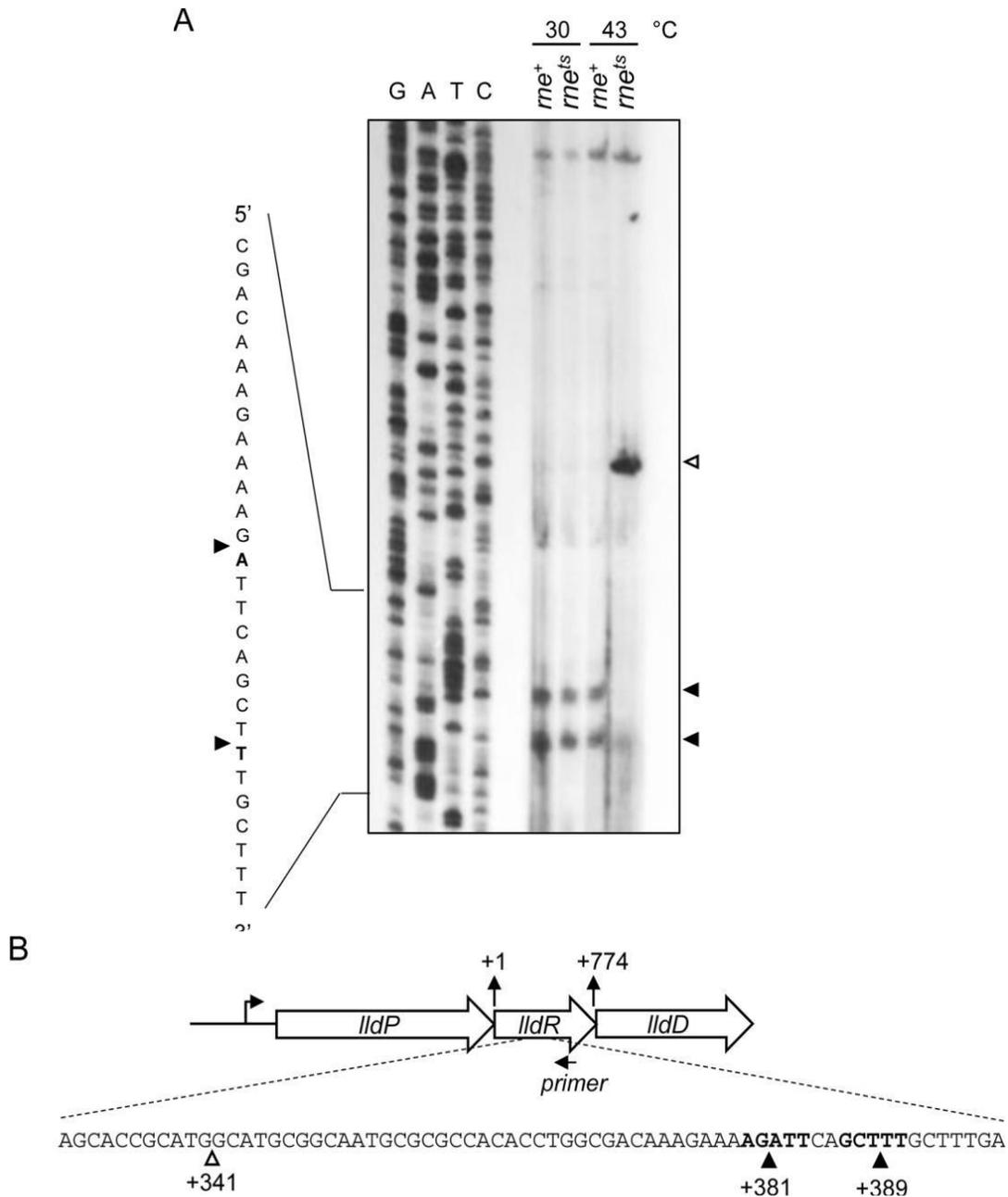


Figura 11. Análisis *primer extension* para conocer los de sitios de corte de RNasa E en el transcrito de *lldR*. (A) RNA total de las cepas CH1827 (*rne*⁺) y CH1828 [*rne*(Ts)], cultivadas aeróbicamente en presencia de L-lactato 20 mM a 30 °C y 15 min después de un cambio a una temperatura no permisiva (43 °C), se prepararon y utilizaron para el análisis de *primer extension*. Un cebador marcado en el extremo 5' específico para el transcrito de *lldR* se hibridó con el RNA total y se extendió mediante transcriptasa reversa. El cDNA resultante se resolvió en un gel de poliácridamida al 8 % junto a una reacción de secuenciación de DNA que se utilizó como referencia. Las posiciones de los productos de extensión están marcados a la derecha. La porción de la secuencia de mRNA (que corresponde a la secuencia complementaria de la escalera de secuenciación de DNA) se presenta a la izquierda, y los extremos 5' identificados se muestran en negrita. (B) Representación esquemática del operón *lldPRD* y los sitios de corte de RNasa E identificados por el análisis de extensión del cebador. Se muestran los sitios de escisión en el transcrito de *lldR* en las posiciones +381 y +389 con respecto al codón de inicio de *lldR* (▲), y las secuencias de reconocimiento de RNasa E predichas, que cumplen con el sitio de RNasa E propuesto RN↓WUU (donde R significa G o A, W significa A o U,

y N significa cualquier nucleótido) (30), están marcados en negrita. También se indica (Δ) el extremo 5' correspondiente al producto de extensión más grande detectado en la mutante de RNasa E, en la posición +341 con respecto al codón de inicio *lldR*. Tomado de *Protein Dosage of the lldPRD Operon Is Correlated with RNase E-Dependent mRNA Processing* por Angel-Lerma et al., 2021. Journal of Bacteriology.

7.6 Estabilidad diferencial de los mRNA de *lldP* y *lldD*

Como se mencionó anteriormente, el corte endorribonucleolítico en el mRNA de *lldR*, disminuye drásticamente la cantidad de mRNA intacto, por lo que solo una pequeña cantidad se puede traducir a la proteína LldR. Por otra parte, los productos resultantes del corte que contienen *lldP* y *lldD*, se esperarían encontrar en cantidades similares de proteínas LldP y LldD. Sin embargo, análisis proteómicos reportados, indican que la cantidad de LldD es aproximadamente 13 a 15 veces más abundante que LldP (Lippolis et al., 2009; Masuda et al., 2009), esta diferencia no se puede explicar totalmente por la eficiencia de los sitios de inicio de la traducción (RBS) (Figura 7) ni por el uso preferencial de codones.

Supusimos que la estabilidad diferencial de los dos mRNA pudiera estar contribuyendo a modular la dosis de las proteínas LldP y LldD. Para probarlo, determinamos la longevidad de los mRNA de *lldP* y *lldD*. Se realizó un cultivo de MC4100 en medio mínimo M9 adicionado con casaminoácidos y L-lactato como inductor. A mitad de la fase de crecimiento exponencial, la transcripción se bloqueó con rifampicina, antibiótico que inhibe la actividad de la RNA polimerasa, se tomaron alícuotas a diferentes intervalos de tiempo para su análisis.

Se realizó la extracción de RNA total y se analizó la vida media de los mRNA mediante Northern blot y una sonda específica para *lldP* y otra para *lldD*. Se detectó que la vida media del mRNA de *lldP* es de 2.5 min, mientras que la vida media de *lldD* fue de aproximadamente 7 min (Figura 12).

Llegando a la conclusión de que la estabilidad diferencial de los transcritos también contribuye a la modulación de las concentraciones de las proteínas LldP y LldD.

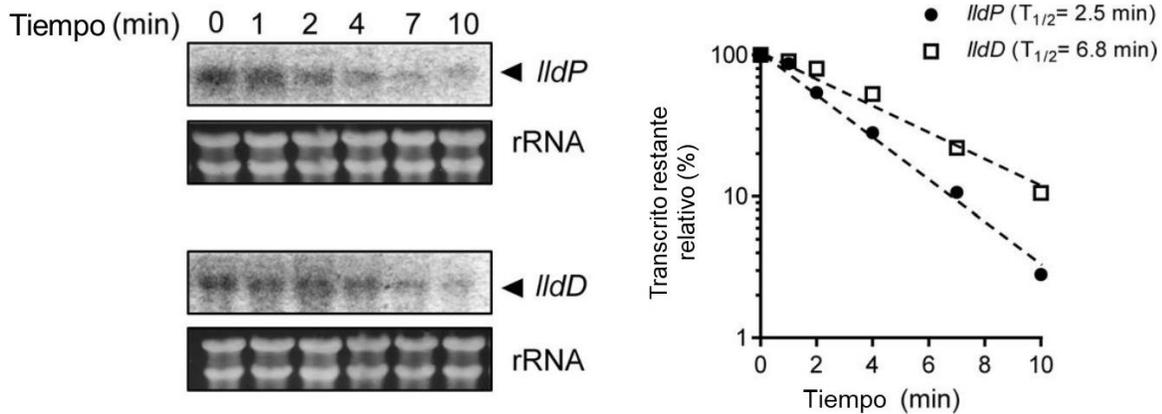


Figura 12. Análisis de la estabilidad del mRNA de *lldP* y *lldD* evaluada por Northern blot. Se realizó un cultivo de MC4100 en medio mínimo M9 adicionado con L-lactato 20 mM a 37 °C, al llegar a fase exponencial de crecimiento se adicionó rifampicina. A continuación, se tomaron alícuotas a los tiempos indicados y se extrajo el RNA total. (Izquierda) Autorradiogramas usando la sonda específica *lldP* (arriba) o *lldD* (abajo). Los paneles inferiores muestran las bandas de rRNA teñidas con bromuro de etidio de las membranas correspondientes. (Derecha) Gráfico semilogarítmico de la descomposición del mRNA de *lldP* y *lldD*. Las vidas medias calculadas fueron 6.8 min para *lldD* y 2.5 min para *lldP*. Adaptado de *Protein Dosage of the lldPRD Operon Is Correlated with RNase E-Dependent mRNA Processing* por Angel-Lerma et al., 2021. Journal of Bacteriology.

VIII. DISCUSIÓN

La tasa de síntesis de una proteína depende de la cantidad de su mRNA, el cual, a su vez depende de su propia tasa de síntesis y degradación. En las bacterias una gran cantidad de genes se encuentran organizados en operones policistrónicos, por lo que se espera que esta organización facilite la expresión coordinada de los diferentes genes del operón. No obstante, los productos proteicos de diferentes genes de un operón pueden producirse en distintas cantidades molares. En estos casos, se necesitan pasos adicionales de regulación para ajustar la expresión de genes específicos dentro de un operón. Por ejemplo, la presencia de promotores internos permite niveles diferenciales de transcripción de los genes de un operón (Conway et al., 2014; Güell et al., 2011). En otros casos, las eficiencias de traducción de los cistrones individuales en un transcrito policistrónico pueden determinar diferencias en la cantidad de proteínas (G.-W. Li et al., 2014; Quax et al., 2013). Alternativamente, la producción diferencial de proteínas a partir de los genes de un mRNA policistrónico puede ocurrir en consecuencia del procesamiento del transcrito primario debido a RNasas que actúan dentro de regiones intergénicas dando lugar a moléculas de mRNA con diferentes estabildades segmentarias (Båga et al., 1988; Belasco et al., 1985; Chen et al., 1988; Desnoyers et al., 2009; Jordi et al., 1993; Y. Li & Altman, 2004; Papenfort et al., 2013; Yajnik & Godson, 1993).

Un mecanismo diferente de regulación de la expresión génica surgió del estudio del operón *lldPRD*. El modelo propuesto de los eventos que controlan las cantidades molares de las proteínas codificadas en el operón *lldPRD* se puede describir de la siguiente manera.

La RNasa E genera rápidamente un corte en el transcrito primario de *lldPRD*, en uno o varios sitios ubicados dentro del cistrón de *lldR*. Este evento da como resultado una disminución drástica en la

cantidad de mRNA intacto de *lldR* y, por lo tanto, solo se producen pequeñas cantidades de la proteína LldR funcional.

Los cortes endoribonucleolíticos dentro de *lldR* dan como resultado dos especies de mRNA con estabilidades diferentes, por un lado, el mRNA que contiene el cistron *lldP* (con vida media [$t_{1/2}$], $\approx 2,5$ min) y por otro lado el mRNA con el cistron de *lldD* ($t_{1/2}$, ≈ 7 min).

La diferencia en la longevidad entre las especies de mRNA de *lldP* y *lldD* se refleja en las cantidades en estado estacionario de los dos mensajeros.

Finalmente, otra cuestión importante que puede incluirse en este modelo es la accesibilidad de los sitios de corte del mRNA de *lldR* a la RNasa E. Es bien sabido que mientras se traduce un mRNA, está cubierto por ribosomas y, por lo tanto, está protegido de las escisiones endoribonucleolíticas por diferentes RNasas (Dar & Sorek, 2018; Edri & Tuller, 2014). En el caso del operón *lldPRD*, los resultados de los experimentos de inicio de la traducción no mostraron que la eficiencia de inicio de la traducción de *lldR* estuviera afectada en relación con la del gen *lldP* o *lldD*. No obstante, existe diferencia en el uso preferencial de codones de los tres cistrones, determinados por el índice de adaptación de codones (CAI) (Sharp & Li, 1987), se observó que la tasa de elongación de traducción de *lldR* pudiera ser menor que la de *lldP* y *lldD*. Y aún más importante, se encontró que el primer tercio de la secuencia de codificación de *lldR* tiene un valor de CAI más bajo que el resto del operón. Esto daría como resultado una baja tasa de elongación de la traducción y contribuiría al hacinamiento de ribosomas en esta región de mRNA. De hecho, la correlación entre las bajas eficiencias de elongación de la traducción, deducidas de valores de CAI más bajos, y las densidades de ribosomas elevadas se ha demostrado previamente (Quax et al., 2013; Tuller et al., 2010). Como consecuencia, se puede especular que el fragmento correspondiente al segundo tercio

de *lldR* en la unidad policistrónica debería tener una menor densidad de ribosomas y, por lo tanto, permanecer accesible a la RNasa E.

De esta manera, se propone un nuevo modelo que es capaz de modular eficientemente las cantidades molares de las tres proteínas codificadas en el operón *lldPRD*. Este modelo implica como primer punto, la tasa de traducción intrínsecamente más baja y el hacinamiento de ribosomas del primer tercio de *lldR* debido a un menor uso preferencial de codones en comparación con el resto del operón (este paso está respaldado por los valores de CAI pero queda por demostrar experimentalmente), en un segundo punto, la exposición concomitante a la RNasa E del segmento de mRNA correspondiente al segundo tercio del cistrón *lldR*, este evento que conduce a una inactivación casi inmediata del mRNA de *lldR*, como tercer punto, estabilidades diferenciales de los dos productos de escisión generados, que llevan, respectivamente, el mRNA de *lldP* y *lldD*, y en un por último como cuarto punto, menor eficiencia de traducción de *lldP* que de *lldD*, debido a tasas más bajas de iniciación y elongación de la traducción.

IX. CONCLUSIONES

La regulación de la expresión genética es fundamental para el correcto funcionamiento celular. El operón *lldPRD* de *Escherichia coli* presenta la paradoja de tener el gen que codifica la proteína reguladora entre los genes que codifican una permeasa y una enzima.

Las conclusiones obtenidas de este trabajo fueron las siguientes:

- La diferencia en la dosificación de proteínas no es debido a regulación transcripcional, los tres genes del operón *lldPRD* se transcriben bajo un único promotor.
- Al analizar las fusiones traduccionales con *lacZ* se encontró diferencia entre las construcciones que contienen el RBS de *lldP* y *lldD*, pero no se encontraron diferencias significativas entre las construcciones que contienen el RBS de *lldR* y *lldD*, por lo que no podemos atribuir a una regulación traduccional la diferencia observada en la expresión de las proteínas LldR y LldD.
- El mRNA del operón *lldPRD* sufre procesamiento por la RNasa E, este evento tiene lugar dentro del cistron de *lldR*, permitiendo que solamente pocas moléculas de *lldR* logren traducirse. Esto pudiera explicar la diferencia entre la cantidad de proteínas LldR y LldD etiquetadas.
- Se mapearon los sitios de procesamiento de RNasa E en el gen *lldR*, las secuencias encontradas corresponden a la secuencia consenso reportada para la enzima.
- La estabilidad diferencial de los productos resultantes del corte que contienen *lldP* y *lldD* contribuye a la modulación de las concentraciones de las proteínas LldP y LldD.

- El cistrón de *lldR* tiene un menor uso preferencial de codones en comparación al resto del operón, por lo que tendría una tasa de traducción más baja y como resultado es susceptible a cortes endorribonucleolíticos.
- Con los resultados encontrados, se propuso un nuevo modelo de regulación genética (descrito en el apartado de discusión).

X. PERSPECTIVAS

- Etiquetar la proteína LldP para tener una comparación de las tres proteínas del operón *lldPRD*.
- Demostrar experimentalmente que existe menor tasa de traducción de *lldR* debido a un menor uso preferencial de codones.
- Conocer los factores involucrados en la regulación de la proteína LldR para saber cómo se regula su actividad sobre el operón *lldPRD*.
- Realizar estudios estructurales con el cistrón de *lldR* y la RNasa E purificada para corroborar los sitios de corte sin posibles procesamientos adicionales.

XI. REFERENCIAS

- Aguilera, L., Campos, E., Giménez, R., Badía, J., Aguilar, J., & Baldoma, L. (2008). Dual Role of LldR in Regulation of the *lldPRD* Operon, Involved in L -Lactate Metabolism in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *190*(8), 2997–3005. <https://doi.org/10.1128/JB.02013-07>
- Alvarez, A. F., Rodriguez, C., & Georgellis, D. (2013). Ubiquinone and Menaquinone Electron Carriers Represent the Yin and Yang in the Redox Regulation of the ArcB Sensor Kinase. *Journal of Bacteriology*, *195*(13), 3054–3061. <https://doi.org/10.1128/JB.00406-13>
- Angel-Lerma, L. E., Merino, E., Kwon, O., Medina-Aparicio, L., Hernández-Lucas, I., Alvarez, A. F., & Georgellis, D. (2021). Protein Dosage of the *lldPRD* Operon Is Correlated with RNase E-Dependent mRNA Processing. *Journal of Bacteriology*, *203*(6). <https://doi.org/10.1128/JB.00555-20>
- Apirion, D. (1980). GENETIC MAPPING AND SOME CHARACTERIZATION OF THE *rnpA49* MUTATION OF *ESCHERICHIA COLI* THAT AFFECTS THE RNA-PROCESSING ENZYME RIBONUCLEASE P. *Genetics*, *94*(2), 291–299. <https://doi.org/10.1093/genetics/94.2.291>
- Båga, M., Göransson, M., Normark, S., & Uhlin, B. E. (1988). Processed mRNA with differential stability in the regulation of *E. coli* pilin gene expression. *Cell*, *52*(2), 197–206. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90508-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90508-9)
- Battesti, A., Majdalani, N., & Gottesman, S. (2011). The RpoS-Mediated General Stress Response in *Escherichia coli*. *Annual Review of Microbiology*, *65*(1), 189–213. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102946>
- Bechhofer, D. H., & Deutscher, M. P. (2019). Bacterial ribonucleases and their roles in RNA metabolism. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *54*(3), 242–300. <https://doi.org/10.1080/10409238.2019.1651816>
- Belasco, J. G., Beatty, J. T., Adams, C. W., von Gabain, A., & Cohen, S. N. (1985). Differential expression of photosynthesis genes in *R. capsulata* results from segmental differences in stability

- within the polycistronic *rxmA* transcript. *Cell*, *40*(1), 171–181. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(85\)90320-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90320-4)
- Bera, S. C., America, P. P. B., Maatsola, S., Seifert, M., Ostrofet, E., Cnossen, J., Spermann, M., Papini, F. S., Depken, M., Malinen, A. M., & Dulin, D. (2022). Quantitative parameters of bacterial RNA polymerase open-complex formation, stabilization and disruption on a consensus promoter. *Nucleic Acids Research*, *50*(13), 7511–7528. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac560>
- Browning, D. F., & Busby, S. J. W. (2016). Local and global regulation of transcription initiation in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, *14*(10), 638–650. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.103>
- Casadaban, M. J. (1976). Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *Journal of Molecular Biology*, *104*(3), 541–555. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(76\)90119-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(76)90119-4)
- Cavanagh, A. T., & Wassarman, K. M. (2014). 6S RNA, a Global Regulator of Transcription in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and Beyond. *Annual Review of Microbiology*, *68*(1), 45–60. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150135>
- Chao, Y., Li, L., Girodat, D., Förstner, K. U., Said, N., Corcoran, C., Śmiga, M., Papenfort, K., Reinhardt, R., Wieden, H.-J., Luisi, B. F., & Vogel, J. (2017). In Vivo Cleavage Map Illuminates the Central Role of RNase E in Coding and Non-coding RNA Pathways. *Molecular Cell*, *65*(1), 39–51. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.11.002>
- Chen, C.-Y. A., Beatty, J. T., Cohen, S. N., & Belasco, J. G. (1988). An intercistronic stem-loop structure functions as an mRNA decay terminator necessary but insufficient for *puf* mRNA stability. *Cell*, *52*(4), 609–619. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90473-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90473-4)
- Clark, D. P., & Pazdernik, N. J. (2013). Regulation of Transcription in Prokaryotes. In *Molecular Biology* (pp. e338–e343). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378594-7.00050-0>

- Condon, C., Liveris, D., Squires, C., Schwartz, I., & Squires, C. L. (1995). rRNA operon multiplicity in *Escherichia coli* and the physiological implications of rrn inactivation. *Journal of Bacteriology*, *177*(14), 4152–4156. <https://doi.org/10.1128/jb.177.14.4152-4156.1995>
- Conway, T., Creecy, J. P., Maddox, S. M., Grissom, J. E., Conkle, T. L., Shadid, T. M., Teramoto, J., San Miguel, P., Shimada, T., Ishihama, A., Mori, H., & Wanner, B. L. (2014). Unprecedented High-Resolution View of Bacterial Operon Architecture Revealed by RNA Sequencing. *MBio*, *5*(4), e01442-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01442-14>
- Dai, X., Zhu, M., Warren, M., Balakrishnan, R., Okano, H., Williamson, J. R., Fredrick, K., & Hwa, T. (2018). Slowdown of Translational Elongation in *Escherichia coli* under Hyperosmotic Stress. *MBio*, *9*(1), e02375-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.02375-17>
- Dar, D., & Sorek, R. (2018). Extensive reshaping of bacterial operons by programmed mRNA decay. *PLOS Genetics*, *14*(4), e1007354. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007354>
- Datsenko, K. A., & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(12), 6640–6645. <https://doi.org/10.1073/pnas.120163297>
- Del Campo, C., Bartholomäus, A., Fedyunin, I., & Ignatova, Z. (2015). Secondary Structure across the Bacterial Transcriptome Reveals Versatile Roles in mRNA Regulation and Function. *PLOS Genetics*, *11*(10), e1005613. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005613>
- Desnoyers, G., Morissette, A., Prévost, K., & Massé, E. (2009). Small RNA-induced differential degradation of the polycistronic mRNA iscRSUA. *The EMBO Journal*, *28*(11), 1551–1561. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.116>
- Dong, J. M., Taylor, J. S., Latour, D. J., Iuchi, S., & Lin, E. C. (1993). Three overlapping lct genes involved in L-lactate utilization by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *175*(20), 6671–6678. <https://doi.org/10.1128/jb.175.20.6671-6678.1993>
- Edri, S., & Tuller, T. (2014). Quantifying the Effect of Ribosomal Density on mRNA Stability. *PLoS ONE*, *9*(7), e102308. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102308>

- 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. <https://doi.org/10.1101/gad.6.1.149>
- Fan, H., Hahm, J., Diggs, S., Perry, J. J. P., & Blaha, G. (2015). Structural and Functional Analysis of BipA, a Regulator of Virulence in Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 290(34), 20856–20864. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.659136>
- Feklístov, A., Sharon, B. D., Darst, S. A., & Gross, C. A. (2014). Bacterial Sigma Factors: A Historical, Structural, and Genomic Perspective. *Annual Review of Microbiology*, 68(1), 357–376. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155737>
- Futai, M., & Kimura, H. (1977). Inducible membrane-bound L-lactate dehydrogenase from *Escherichia coli*. Purification and properties. *The Journal of Biological Chemistry*, 252(16), 5820–5827.
- Georgellis, D., Arvidson, S., & von Gabain, A. (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(16), 5382–5390. <https://doi.org/10.1128/jb.174.16.5382-5390.1992>
- Georgellis, D., Kwon, O., & Lin, E. C. C. (2001). Quinones as the Redox Signal for the Arc Two-Component System of Bacteria. *Science*, 292(5525), 2314–2316. <https://doi.org/10.1126/science.1059361>
- Güell, M., Yus, E., Lluch-Senar, M., & Serrano, L. (2011). Bacterial transcriptomics: What is beyond the RNA hori-zome? *Nature Reviews Microbiology*, 9(9), 658–669. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2620>
- Haldimann, A., & Wanner, B. L. (2001). Conditional-Replication, Integration, Excision, and Retrieval Plasmid-Host Systems for Gene Structure-Function Studies of Bacteria. *Journal of Bacteriology*, 183(21), 6384–6393. <https://doi.org/10.1128/JB.183.21.6384-6393.2001>
- Jacob, F., & Monod, J. (1959). [Genes of structure and genes of regulation in the biosynthesis of proteins]. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De l'Academie Des Sciences*, 249, 1282–1284.

- Jacob, F., & Monod, J. (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of Molecular Biology*, 3(3), 318–356. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(61\)80072-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(61)80072-7)
- Jordi, B. J., op den Camp, I. E., de Haan, L. A., van der Zeijst, B. A., & Gaastra, W. (1993). Differential decay of RNA of the CFA/I fimbrial operon and control of relative gene expression. *Journal of Bacteriology*, 175(24), 7976–7981. <https://doi.org/10.1128/jb.175.24.7976-7981.1993>
- Kushner, S. R. (2002). mRNA Decay in *Escherichia coli* Comes of Age. *Journal of Bacteriology*, 184(17), 4658–4665. <https://doi.org/10.1128/JB.184.17.4658-4665.2002>
- Kwon, O., Georgellis, D., Lynch, A. S., Boyd, D., & Lin, E. C. C. (2000). The ArcB Sensor Kinase of *Escherichia coli*: Genetic Exploration of the Transmembrane Region. *Journal of Bacteriology*, 182(10), 2960–2966. <https://doi.org/10.1128/JB.182.10.2960-2966.2000>
- Lee, K., Bernstein, J. A., & Cohen, S. N. (2002). RNase G complementation of rne null mutation identifies functional interrelationships with RNase E in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 43(6), 1445–1456. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02848.x>
- Li, G.-W., Burkhardt, D., Gross, C., & Weissman, J. S. (2014). Quantifying Absolute Protein Synthesis Rates Reveals Principles Underlying Allocation of Cellular Resources. *Cell*, 157(3), 624–635. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.033>
- Li, Y., & Altman, S. (2004). Polarity Effects in the Lactose Operon of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 339(1), 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.03.041>
- Lin-Chao, S., Wong, T. T., McDowall, K. J., & Cohen, S. N. (1994). Effects of nucleotide sequence on the specificity of rne-dependent and RNase E-mediated cleavages of RNA I encoded by the pBR322 plasmid. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(14), 10797–10803.
- Lippolis, J. D., Bayles, D. O., & Reinhardt, T. A. (2009). Proteomic Changes in *Escherichia coli* When Grown in Fresh Milk versus Laboratory Media. *Journal of Proteome Research*, 8(1), 149–158. <https://doi.org/10.1021/pr800458v>
- Liu, B., Shadrin, A., Sheppard, C., Mekler, V., Xu, Y., Severinov, K., Matthews, S., & Wigneshweraraj, S. (2014). A bacteriophage transcription regulator inhibits bacterial transcription initiation by σ -

- factor displacement. *Nucleic Acids Research*, 42(7), 4294–4305.
<https://doi.org/10.1093/nar/gku080>
- Lynch, A. S., & Lin, E. C. (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(21), 6238–6249. <https://doi.org/10.1128/jb.178.21.6238-6249.1996>
- Ma, J., Campbell, A., & Karlin, S. (2002). Correlations between Shine-Dalgarno Sequences and Gene Features Such as Predicted Expression Levels and Operon Structures. *Journal of Bacteriology*, 184(20), 5733–5745. <https://doi.org/10.1128/JB.184.20.5733-5745.2002>
- Maas, W. K., & Mcfall, E. (1964). GENETIC ASPECTS OF METABOLIC CONTROL. *Annual Review of Microbiology*, 18, 95–110. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.18.100164.000523>
- Mackie, G. A. (1991). Specific endonucleolytic cleavage of the mRNA for ribosomal protein S20 of *Escherichia coli* requires the product of the *ams* gene in vivo and in vitro. *Journal of Bacteriology*, 173(8), 2488–2497. <https://doi.org/10.1128/jb.173.8.2488-2497.1991>
- Malpica, R., Franco, B., Rodriguez, C., Kwon, O., & Georgellis, D. (2004). Identification of a quinone-sensitive redox switch in the ArcB sensor kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(36), 13318–13323. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403064101>
- Malpica, R., Sandoval, G. R. P., Rodríguez, C., Franco, B., & Georgellis, D. (2006). Signaling by the Arc Two-Component System Provides a Link Between the Redox State of the Quinone Pool and Gene Expression. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(5–6), 781–795.
<https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.781>
- Masuda, T., Saito, N., Tomita, M., & Ishihama, Y. (2009). Unbiased Quantitation of *Escherichia coli* Membrane Proteome Using Phase Transfer Surfactants. *Molecular & Cellular Proteomics*, 8(12), 2770–2777. <https://doi.org/10.1074/mcp.M900240-MCP200>
- McDowall, K. J., Lin-Chao, S., & Cohen, S. N. (1994). A+U content rather than a particular nucleotide order determines the specificity of RNase E cleavage. *Journal of Biological Chemistry*, 269(14), 10790–10796. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)34129-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)34129-7)

- McQuail, J., Switzer, A., & Wigneshweraraj, R. (2019). Post-transcriptional regulation of gene expression in *Escherichia coli* experiencing sustained nitrogen starvation. *Access Microbiology*, 1(1A).
<https://doi.org/10.1099/acmi.ac2019.po0500>
- Miller, J. H. (1972). *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Misra, T. K., & Apirion, D. (1979). RNase E, an RNA processing enzyme from *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 254(21), 11154–11159.
- Mudd, E. A., Krisch, H. M., & Higgins, C. F. (1990). RNase E, an endoribonuclease, has a general role in the chemical decay of *Escherichia coli* mRNA: Evidence that rne and ams are the same genetic locus. *Molecular Microbiology*, 4(12), 2127–2135. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1990.tb00574.x>
- Murakami, K. S., Masuda, S., Campbell, E. A., Muzzin, O., & Darst, S. A. (2002). Structural Basis of Transcription Initiation: An RNA Polymerase Holoenzyme-DNA Complex. *Science*, 296(5571), 1285–1290. <https://doi.org/10.1126/science.1069595>
- Nishimura, Y., Tan, I. K. P., Ohgami, Y., Kohgami, K., & 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 Microbiology Letters*, 17(1–3), 283–286. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1983.tb00419.x>
- Ow, M. C., Perwez, T., & Kushner, S. R. (2004). RNase G of *Escherichia coli* exhibits only limited functional overlap with its essential homologue, RNase E: Role of RNase G in RNA metabolism. *Molecular Microbiology*, 49(3), 607–622. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03587.x>
- Paget, M. (2015). Bacterial Sigma Factors and Anti-Sigma Factors: Structure, Function and Distribution. *Biomolecules*, 5(3), 1245–1265. <https://doi.org/10.3390/biom5031245>
- Papenfort, K., Sun, Y., Miyakoshi, M., Vanderpool, C. K., & Vogel, J. (2013). Small RNA-Mediated Activation of Sugar Phosphatase mRNA Regulates Glucose Homeostasis. *Cell*, 153(2), 426–437.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.003>

- Paul, B. J., Berkmen, M. B., & Gourse, R. L. (2005). DksA potentiates direct activation of amino acid promoters by ppGpp. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(22), 7823–7828. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501170102>
- Pavlov, M. Y., Watts, R. E., Tan, Z., Cornish, V. W., Ehrenberg, M., & Forster, A. C. (2009). Slow peptide bond formation by proline and other *N*-alkylamino acids in translation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(1), 50–54. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809211106>
- Pestova, T. V., Kolupaeva, V. G., Lomakin, I. B., Pilipenko, E. V., Shatsky, I. N., Agol, V. I., & Hellen, C. U. T. (2001). Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(13), 7029–7036. <https://doi.org/10.1073/pnas.111145798>
- Puigbò, P., Bravo, I. G., & Garcia-Vallve, S. (2008). CAIcal: A combined set of tools to assess codon usage adaptation. *Biology Direct*, *3*(1), 38. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-3-38>
- Quax, T. E. F., Wolf, Y. I., Koehorst, J. J., Wurtzel, O., van der Oost, R., Ran, W., Blombach, F., Makarova, K. S., Brouns, S. J. J., Forster, A. C., Wagner, E. G. H., Sorek, R., Koonin, E. V., & van der Oost, J. (2013). Differential Translation Tunes Uneven Production of Operon-Encoded Proteins. *Cell Reports*, *4*(5), 938–944. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.07.049>
- Ramos, J. L., García-Salamanca, A., Molina-Santiago, C., & Udaondo, Z. (2013). Operon. In *Brenner's Encyclopedia of Genetics* (pp. 176–180). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01096-2>
- Rodnina, M. V. (2018). Translation in Prokaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *10*(9), a032664. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032664>
- Sharp, P. M., & Li, W.-H. (1987). The codon adaptation index—a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Research*, *15*(3), 1281–1295. <https://doi.org/10.1093/nar/15.3.1281>
- Tollerson, R., & Ibba, M. (2020). Translational regulation of environmental adaptation in bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, *295*(30), 10434–10445. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.012742>

- Tuller, T., Carmi, A., Vestsigian, K., Navon, S., Dorfan, Y., Zaborske, J., Pan, T., Dahan, O., Furman, I., & Pilpel, Y. (2010). An Evolutionarily Conserved Mechanism for Controlling the Efficiency of Protein Translation. *Cell*, *141*(2), 344–354. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.031>
- Uzzau, S., Figueroa-Bossi, N., Rubino, S., & Bossi, L. (2001). Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(26), 15264–15269. <https://doi.org/10.1073/pnas.261348198>
- Yajnik, V., & Godson, G. N. (1993). Selective decay of *Escherichia coli* dnaG messenger RNA is initiated by RNase E. *The Journal of Biological Chemistry*, *268*(18), 13253–13260.
- Yamamoto, H., Wittek, D., Gupta, R., Qin, B., Ueda, T., Krause, R., Yamamoto, K., Albrecht, R., Pech, M., & Nierhaus, K. H. (2016). 70S-scanning initiation is a novel and frequent initiation mode of ribosomal translation in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(9). <https://doi.org/10.1073/pnas.1524554113>
- Zaher, H. S., & Green, R. (2011). A Primary Role for Release Factor 3 in Quality Control during Translation Elongation in *Escherichia coli*. *Cell*, *147*(2), 396–408. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.045>

XII. ANEXOS

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Uso
lldR-3FLAG-Fw	GCCCGGTGAGCATAATGAGCATTTCGAGGGAGAAA AACGCAGACTACAAAGACCATGACGGTG	Utilizado para la etiqueta cromosomal del gen <i>lldR</i> con el epítoto 3xFLAG
lldR-3FLAG-Rv	GTTGCGCTGCGGCGCGATAATCGCTGGCTGCGGA AATAATCATATGAATATCCTCCTTAGTTCC	Utilizado para la etiqueta cromosomal del gen <i>lldR</i> con el epítoto 3xFLAG
lldD-3FLAG-Fw	GCCTGCGGCACTGGCTCCCATGGCGAAAGGGAAT GCGGCAGACTACAAAGACCATGACGGTG	Utilizado para la etiqueta cromosomal del gen <i>lldD</i> con el epítoto 3xFLAG
lldD-3FLAG-Rv	CTCCCTGAGGGAGAGGGTTAGGGTGAGGGGGCGC AAACGAATGAATATCCTCCTTAGTTCCT	Utilizado para la etiqueta cromosomal del gen <i>lldD</i> con el epítoto 3xFLAG
LacZPdw	CGGAATTCTCCCGCCGGGAATATCTGGC	Utilizado para generar la fusión transcripcional <i>lacZ</i> de la cepa IFC5028
LacZDrev	CGGGATCCAACAGGAACGGCGGCAGAATGC	Utilizado para generar la fusión transcripcional <i>lacZ</i> de la cepa IFC5028
lld-Prom-Fw	AACTGCAGGAGATGACTGGG	Utilizado para generar la fusiones transcripcionales <i>lacZ</i> de la cepas IFC5029, IFC5030, IFC5031 e IFC5032
LLDPTRAD REV	CCCGGATCCCAGAGATTCATTGCAGG	Utilizado para generar la fusión traduccional <i>lldP-lacZ</i> de la cepa IFC5029
LLDRTRA DREV	CCCGGATCCAATCATTAAGGAATC	Utilizado para generar la fusión traduccional <i>lldP-lacZ</i> de la cepa IFC5030
LLDDTRA DREV	CCCGGATCCAATAATCATGCGTTTTTC	Utilizado para generar la fusión traduccional <i>lldD-lacZ</i> de la cepa IFC5031
FuslldRlacZ-Rv	CCGGATCCGAATGCTCATTATGCTCACC	Utilizado para generar la fusión traduccional <i>lldR-lacZ</i> de la cepa IFC5032

IIdP1	GTGAAAACCGGGCAG	Utilizado para amplificar la sonda específica de <i>lldP</i>
IIdP2	ACAGTCCGGAATAGTTC	Utilizado para amplificar la sonda específica de <i>lldP</i>
IIdD1	AGCCAGCGATTATCG	Utilizado para amplificar la sonda específica de <i>lldD</i>
IIdD2	CATACGCACGACATC	Utilizado para amplificar la sonda específica de <i>lldD</i>
PE2-IIdPRD	CTGACGGCTATGCTTCACTGAG	Utilizado para el análisis de <i>primer extension</i>

Tabla 2. Composición del medio de cultivo mínimo M9 5x.

Medio mínimo M9 5x
64 g Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O
15 g KH ₂ PO ₄
2.5 g NaCl
5 g NH ₄ Cl
Se disuelven en 1 L de agua destilada

Tabla 3. Composición del medio de cultivo mínimo M9 1x.

Medio mínimo M9 1x
1 x sales M9
2mM MgSO ₄
0.1mM CaCl ₂
0.4% casaminoácidos
20mM de L-lactato*
En agua estéril
* Se adicionó L-lactato cuando fue necesario



Protein Dosage of the *lldPRD* Operon Is Correlated with RNase E-Dependent mRNA Processing

Lidia E. Angel-Lerma,^a Enrique Merino,^b Ohsuk Kwon,^{c,d} Liliana Medina-Aparicio,^b Ismael Hernández-Lucas,^b Adrián F. Alvarez,^a Dimitris Georgellis^a

^aDepartamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

^bDepartamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, Mexico

^cKorea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Daejeon, Republic of Korea

^dBiosystems and Bioengineering Program, University of Science and Technology (UST), Daejeon, Republic of Korea

ABSTRACT The ability of *Escherichia coli* to grow on L-lactate as a sole carbon source depends on the expression of the *lldPRD* operon. A striking feature of this operon is that the gene encoding the transcriptional regulator (LldR) is located between the genes encoding the permease (LldP) and the dehydrogenase (LldD). In this study, we report that the dosages of the LldP, LldR, and LldD proteins are not modulated on the transcriptional level. Instead, modulation of the protein dosage is correlated primarily with RNase E-dependent mRNA-processing events that take place within the *lldR* mRNA, leading to the immediate inactivation of *lldR*, to differential segmental stabilities of the resulting cleavage products, and to differences in the translation efficiencies of the three cistrons. A model for the processing events controlling the molar quantities of the proteins in the *lldPRD* operon is presented and discussed.

IMPORTANCE Adjustment of gene expression is critical for proper cell function. In the case of polycistronic transcripts, posttranscriptional regulatory mechanisms can be used to fine-tune the expression of individual cistrons. Here, we elucidate how the protein dosage of the *Escherichia coli lldPRD* operon, which presents the paradox of having the gene encoding a regulator protein located between genes that code for a permease and an enzyme, is regulated. Our results demonstrate that the key event in this regulatory mechanism involves the RNase E-dependent cleavage of the primary *lldPRD* transcript at an internal site(s) located within the *lldR* cistron, resulting in a drastic decrease in the amount of intact *lldR* mRNA, in differential segmental stabilities of the resulting cleavage products, and in differences in the translation efficiencies of the three cistrons.

KEYWORDS *lldPRD* operon, posttranscriptional regulation, RNase E, mRNA stability

Escherichia coli, a facultatively anaerobic organism, is capable of growing on L-lactate as a sole carbon source. This is achieved by the activity of the flavin mononucleotide-dependent L-lactate dehydrogenase, a membrane-associated enzyme, which oxidizes L-lactate to the central metabolite pyruvate. This enzymatic activity depends on the respiratory growth conditions; it reaches a maximum in aerobically growing cells in the presence of L-lactate (1) but is completely absent under fermentative growth conditions, even in the presence of the inducer (2).

The gene encoding L-lactate dehydrogenase is located on the *lldPRD* operon (formerly known as *lctPRD*) (3), which also includes the *lldP* and *lldR* genes, encoding an L-lactate permease and a transcriptional regulator, respectively (3). The expression of the *lldPRD* operon has been shown to be driven by a single promoter (4) and to be controlled by LldR and ArcA (4, 5). LldR, which belongs to the GntR family of helix-turn-helix proteins, has been proposed to activate the expression of the *lldPRD* operon in cells

Citation Angel-Lerma LE, Merino E, Kwon O, Medina-Aparicio L, Hernández-Lucas I, Alvarez AF, Georgellis D. 2021. Protein dosage of the *lldPRD* operon is correlated with RNase E-dependent mRNA processing. *J Bacteriol* 203:e00555-20. <https://doi.org/10.1128/JB.00555-20>.

Editor Tina M. Henkin, Ohio State University

Copyright © 2021 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Dimitris Georgellis, dimitris@fc.unam.mx.

Received 6 October 2020

Accepted 16 December 2020

Accepted manuscript posted online 23 December 2020

Published 22 February 2021

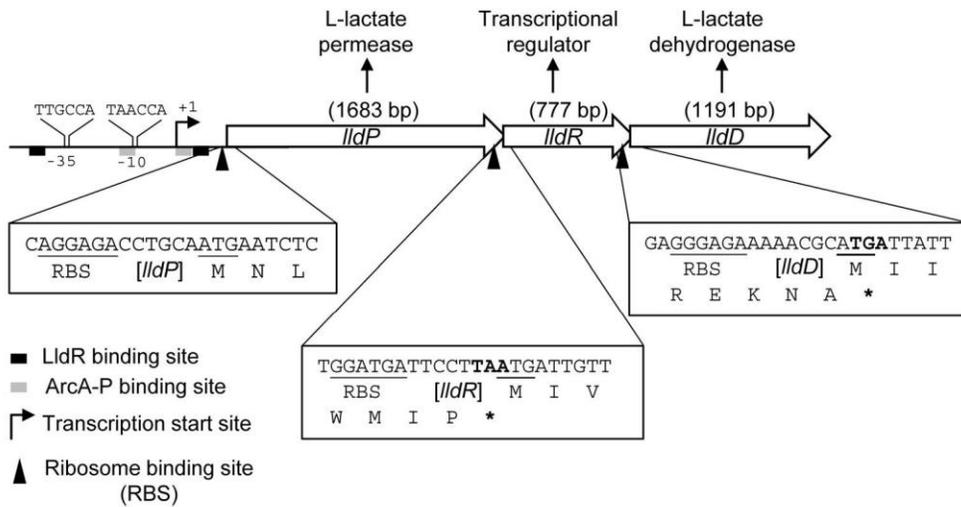


FIG 1 Genetic structure of the *lldPRD* operon. Open arrows indicate the positions and directions of the three structural genes. Gene lengths are given in parentheses. Transcriptional elements in the upstream region of the structural genes (such as promoter -35 and -10 sequences), the transcription initiation site, and the ArcA-P and LldR binding sites are indicated. The relative position of the RBS of each gene is shown. In the text boxes, the ribosome binding sites and the start codons are underlined, and the stop codons of the overlapping genes are shown in boldface and labeled with asterisks.

grown in the presence of L-lactate and to repress the expression of the operon in the absence of the inducer, serving as a dual transcriptional regulator (4). ArcA, on the other hand, is a constituent of the ArcBA two-component signal transduction system, which under anoxic or fermentative growth conditions initiates a phosphorelay cascade culminating in ArcA phosphorylation (ArcA-P) (6–9). ArcA-P, in turn, binds to the *lldPRD* promoter region (at positions -124 to -107 relative to the *lldP* translation initiation site) and represses *lldPRD* transcription (5).

An interesting feature of the *lldPRD* operon is that the stop codon of each upstream gene overlaps the start codon of the downstream gene in such a way that the three coding regions are arranged in three different reading frames (Fig. 1) (3). Another unusual feature of this operon is the order of the three overlapping genes; the gene encoding the regulator protein is located between the genes that code for a permease and an enzyme. This genetic organization constitutes a paradox, since the regulator protein is expected to be required in small amounts relative to those of the two other, nonregulatory proteins. Here, we address the question of how the dose of the product of each gene of the *lldPRD* operon is modulated. Our results demonstrate that mRNA processing, differential segmental stability, and differences in translation efficiencies ensure the fine-tuning of the expression of the individual genes of this operon. A regulatory model is discussed.

RESULTS

The protein dosage of the *lldPRD* operon is not controlled at the transcriptional level. The genetic organization of the *lldPRD* operon possesses the interesting feature of having a transcriptional regulator (*lldR*) located between genes encoding a permease (*lldP*) and an enzyme (*lldD*) (Fig. 1). However, this presents a paradox, because transcriptional regulator proteins are expected to be required in very small amounts in comparison to structural or enzymatically active proteins. To ensure that this was the case, chromosomal fusions leading to C-terminal $3\times$ FLAG tags were generated for LldR and LldD, and the protein levels in cells growing under inducing conditions (i.e., aerobic growth and the presence of L-lactate) were compared by Western blot analysis using anti-Flag antibodies. It was found that the LldD protein was at least 500-fold more abundant than the LldR protein (Fig. 2A). The longevities of the LldD and LldR proteins were then probed (Fig. 2B) in order to find out whether this could explain the

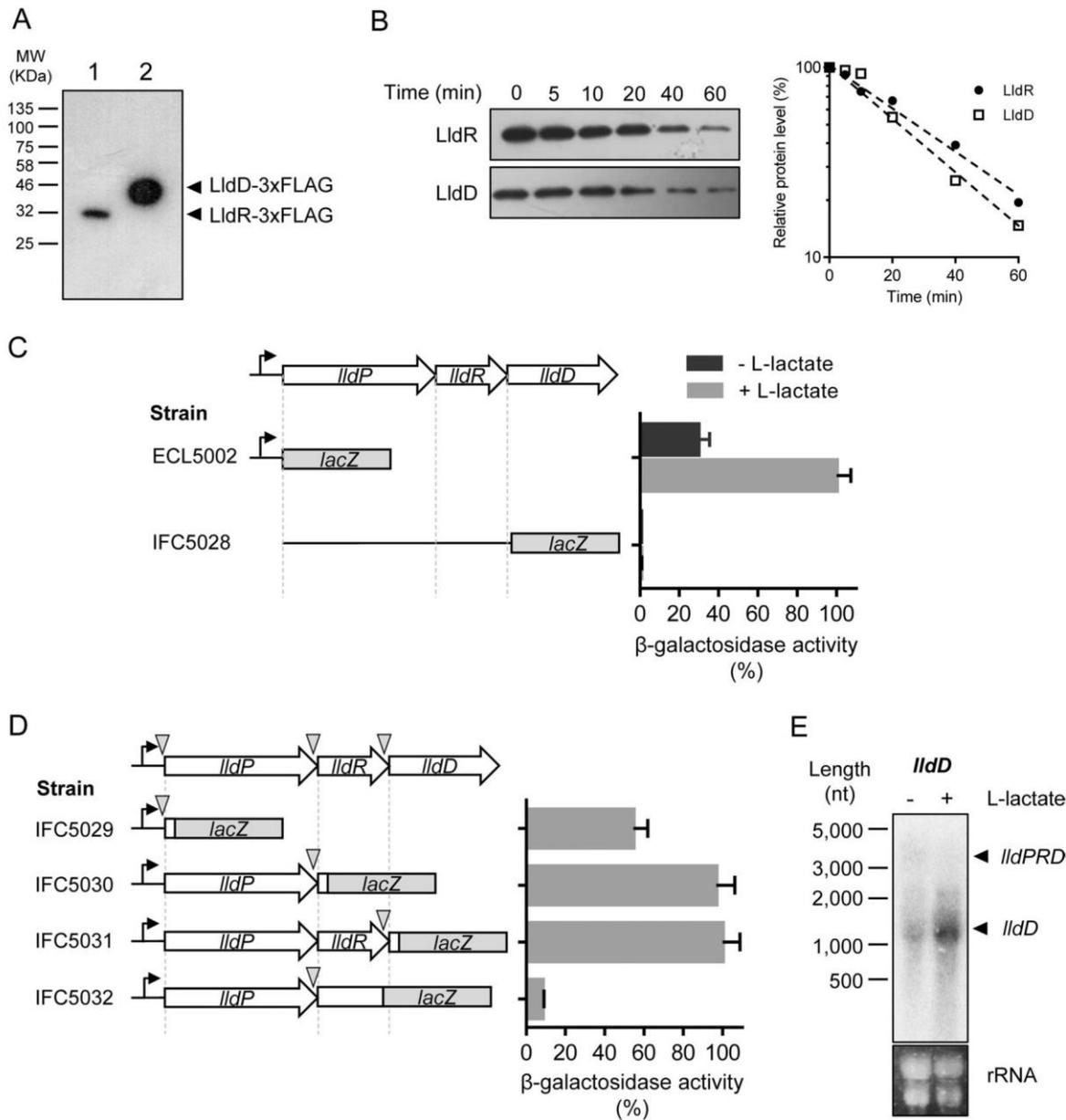


FIG 2 Unequal protein production from the *lldPRD* operon is not controlled at the transcriptional or translational level. (A) Levels of the LldR-3×FLAG (31.9-kDa) and LldD-3×FLAG (45.4-kDa) proteins in *E. coli* cells grown aerobically on M9 minimal medium supplemented with 0.2% Casamino Acids and 20 mM L-lactate, as determined by Western blot analyses using anti-Flag antibodies. Cell extracts from strains IFC5032 and IFC5033 were loaded in lanes 1 and 2, respectively. The total protein content loaded in lane 1 is 100 times higher than that loaded in lane 2. The positions of standard protein markers are shown on the left. (B) Stabilities of the LldR-3×FLAG and LldD-3×FLAG proteins after inhibition of protein synthesis with chloramphenicol. (Left) Western blot analysis using anti-Flag antibodies. (Right) Quantitative determination of LldR and LldD from Western blot experiments plotted as a function of time. (C) Probing for possible internal promoters in the *lldPRD* operon. (Left) Schematic representation of the *lldPRD* operon and the fragments fused to *lacZ* to construct strains ECL5002 and IFC5028. (Right) Strains ECL5002 and IFC5028 were grown aerobically on M9 minimal medium supplemented with 0.2% Casamino Acids either in the presence (+) or in the absence (-) of 20 mM L-lactate. At the mid-exponential phase of growth, cells were harvested and assayed for β-galactosidase activity, expressed as a percentage of the activity of strain ECL5002 grown in the presence of the inducer. Averages from four independent experiments are presented, and standard deviations (error bars) are indicated. (D) Translation initiation rates of the three *lldPRD* genes as determined by *lacZ* translational fusions. (Left) Schematic representation of the *lldPRD* operon and the fragments fused to *lacZ* for strains IFC5029, IFC5030, IFC5031, and IFC5032. The relative position of the RBS of each gene or *lacZ* fusion is indicated by a triangle. (Right) Strains IFC5029, IFC5030, IFC5031, and IFC5032 were grown aerobically on M9 minimal medium supplemented with 0.2% Casamino Acids and 20 mM L-lactate as the inducer. At the mid-exponential phase of growth, cells were harvested and assayed for β-galactosidase activity, expressed as a percentage of the activity of strain IFC5031. Averages from four independent experiments are presented, and standard deviations (error bars) are indicated. (E) Analysis of the *lld* transcript by Northern blotting. Strain MC4100 was incubated on M9 minimal medium supplemented with 0.2% Casamino Acids in the presence (+) or absence (-) of 20 mM L-lactate, and total RNA isolated from samples that were harvested during mid-exponential growth was probed for the *lld* transcript using an *lldD*-specific

(Continued on next page)

difference in protein amounts. No significant difference in stability was observed between LldD and LldR (Fig. 2B), discarding this possibility. Furthermore, previous proteomic analyses have revealed that LldD is about 13- to 15-fold more abundant than LldP (10, 11), providing further support to the uneven stoichiometry of the protein products of the *lldPRD* operon. We therefore speculated that the product doses of the *lldPRD* operon might be controlled at the transcriptional or translational level. The first possibility implies the presence of functional promoters within the *lldPRD* operon. Therefore, the number of promoters controlling the expression of the three *lld* genes was scrutinized. To this end, *lacZ* transcriptional fusions were constructed, one carrying the upstream region of the *lldPRD* operon that includes the promoter (strain ECL5002) (12) and another carrying the DNA sequence comprising the *lldP* gene (from the 10th codon), the entire *lldR* coding sequence, and the first 65 nucleotides (nt) of *lldD* (strain IFC5028). The *lacZ* fusion-carrying strains were grown aerobically in the absence or presence of L-lactate, and β -galactosidase activity was measured at the mid-exponential-growth phase. It was found that reporter expression was induced by L-lactate only in the strain carrying the construct that includes the promoter upstream of *lldP* (Fig. 2C), in accordance with previous studies (4, 5). Thus, transcription of all three *lld* genes relies on a single promoter located upstream of the *lldP* gene, and as a consequence, a single polycistronic *lldPRD* mRNA is to be expected.

The protein dosage of the *lldPRD* operon is partially controlled at the translational level. To assess the possibility that the differential protein production of the *lldPRD* operon was mediated at the level of translation, the strengths of the three ribosome binding sites (RBS) were compared. To this end, three different '*lacZ*' translational fusions, *lldP*'-'*lacZ*', *lldR*'-'*lacZ*', and *lldD*'-'*lacZ*', were constructed and placed on the λ attachment site of the MC4100 chromosome, generating the corresponding strains IF5029, IFC5030, and IFC5031. All constructs contained the *lldPRD* native promoter and the entire sequence upstream of the gene of interest, including the RBS and the first two codons of the respective cistron (Fig. 2D). The strains were grown aerobically in the presence of the inducer L-lactate, and β -galactosidase activity was measured at the mid-exponential-growth phase (Fig. 2D). It was found that the expression of the reporter driven by the RBS of *lldP* was approximately 2-fold lower than the expression of those driven by the RBS of *lldR* and *lldD*. However, no significant difference was observed between the RBS of *lldR* and the RBS of *lldD* (Fig. 2D). As a possible alternative cause of the differential concentrations of the *lldPRD* operon protein products, we analyzed the bias in the preferential use of codons in their genes. To this end, we evaluated the codon adaptation index (CAI) (13), using the codon usage table of *E. coli* K-12 as a reference set (14). The CAI values obtained for *lldD*, *lldP*, and *lldR* were 0.790, 0.745, and 0.737, respectively. Interestingly, the CAI value of the first third of the *lldR* coding sequence was found to be lower than that of the rest of the *lldR* coding sequence (0.729 and 0.756, respectively), suggesting a lower translation elongation rate along the first section of *lldR*. Although the relative order of the CAI values for the genes of the *lldPRD* operon corresponds to the relative abundances of their respective protein products, and similar differences in CAI values have been shown to contribute to uneven stoichiometries of proteins from polycistronic transcripts (15), these are not sufficient to explain the vast difference observed between the LldR and LldD proteins (Fig. 2A). Thus, additional mechanisms must be involved in the regulation of the expression of the *lldPRD* operon.

RNase E-dependent processing of the *lldPRD* polycistronic mRNA. To explore the possibility that the individual protein dosage is controlled by posttranscriptional events such as mRNA processing, we constructed a fourth '*lacZ*' translational fusion. This translational fusion, which is an *lldR*'-'*lacZ*' fusion similar to that of IFC5030 except

FIG 2 Legend (Continued)

DNA probe. A blot representative of results from three independent experiments is shown. The positions of standard RNA markers are shown to the left of the blot. The lower panel shows the ethidium bromide-stained rRNA bands of the corresponding Hybond membrane, used as a loading control.

that it includes almost the entire *lldR* coding sequence (positions +1 to +759 relative to the *lldR* start codon), was placed on the λ attachment site of the MC4100 chromosome, generating strain IFC5032 (Fig. 2D). IFC5032 and IFC5030 were grown aerobically in the absence or presence of L-lactate, and β -galactosidase activity was measured at the mid-exponential-growth phase. It was found that reporter expression of strain IFC5032 was 10-fold lower than that of IFC5030 (Fig. 2D). It was therefore tempting to speculate that the *lldR* cistron may contain sites of regulation at the posttranscriptional level. This is supported by a previous report, where Northern blot analysis revealed that although the *lldD* gene was induced by L-lactate, the full-length *lldPRD* mRNA was not detected (3). To confirm this result, total RNA was extracted from MC4100 cells grown aerobically in M9 minimal medium supplemented with 0.2% Casamino Acids in the absence or presence of the inducer, and Northern blot analysis was carried out using an *lldD*-specific probe (Fig. 2E). In agreement with the previous report (3), the *lldD* gene was strongly induced at the presence of L-lactate, but the full-length *lldPRD* mRNA, expected to be about 3,600 nt, was not detected under any growth condition (Fig. 2E). Thus, it seems reasonable to suggest that posttranscriptional mRNA processing might be involved in regulating the individual transcription product doses of the *lldPRD* operon.

In *E. coli*, mRNA processing and stability rely on the action of numerous RNases (16). Of these, RNase E, RNase III, and RNase P are responsible for most of the primary endoribonucleolytic RNA-processing events. Therefore, the fate of the *lldPRD* messenger was examined in cells deficient in RNase E [*rne*(Ts)], RNase P [*rnp*(Ts)], RNase III (*rnc::Tn10*), or RNase G (*rng::cat*) (17–22). The *rne*(Ts) and *rnp*(Ts) mutant alleles, producing conditional temperature-sensitive enzymes, were employed because RNase E and RNase P are essential for cell viability. Also, the *rng* mutant was used because its product, RNase G, is a paralog of RNase E (23), and the two enzymes have been reported to have overlapping functions (23). Northern blot analyses using the specific *lldP* and *lldD* probes and RNA isolated from the RNase-deficient mutants and their isogenic strains were carried out. It was observed that after a shift to a nonpermissive temperature (43°C), a band of ~ 3,600 nt, corresponding to the full length *lldPRD* messenger, accumulated with time in the *rne*(Ts) mutant but not in the wild-type strain (Fig. 3). In contrast, no effect was observed in the *rnc* and *rng* mutant strains or in the *rnp*(Ts) mutant strain after a shift to the nonpermissive temperature (see Fig. S1 in the supplemental material). Thus, it seems reasonable to conclude that RNase E is responsible for processing the *lldPRD* mRNA into two mRNA species, carrying, respectively, the intact *lldP* and *lldD* mRNAs, by endoribonucleolytic cleavage(s) within the *lldR* mRNA. As a consequence, the amount of intact *lldR* mRNA to be translated decreases drastically, and therefore, only small amounts of LldR are produced.

In an effort to probe possible cleavage sites within the *lldR* mRNA, primer extension mapping was employed. RNA isolated from the wild-type strain or the *rne*(Ts) mutant was used together with a primer complementary to positions 528 to 549 of the *lldR* transcript with respect to the start of *lldR* translation. Two reverse transcriptase products whose intensities were significantly lower in the RNase E mutant at the nonpermissive temperature (43°C) than in the wild-type strain or the RNase E mutant at 30°C were identified within a portion of the coding region of the *lldR* mRNA (at positions +381 and +389 with respect to the start of *lldR* translation) (Fig. 4A). Notably, the sequences of these sites are reminiscent of the proposed RNase E recognition/cleavage site, which comprises single-stranded AU-rich regions (Fig. 4B) (24–30). Additionally, a larger primer extension product was detected only in the RNase E mutant at the nonpermissive temperature, at position +341 relative to the *lldR* start codon (Fig. 4). However, we were not able to discern whether this product is the site for the cleavage of an RNase different from RNase E or whether it represents an incomplete reverse transcriptase product. Nevertheless, it can be concluded that RNase E is responsible for processing the *lldPRD* mRNA within the *lldR* open reading frame, thereby hampering the translation of *lldR*.

Differential mRNA stability of *lldP* and *lldD* mRNA species. As mentioned above, endoribonucleolytic cleavage(s) within *lldR* should result in a drastic decrease in the

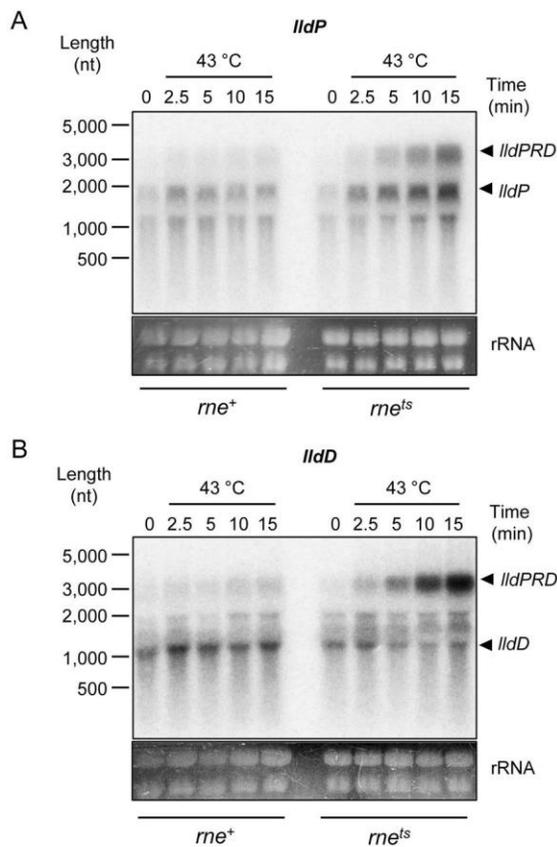


FIG 3 Analysis of *lldPRD* mRNA in an *me*⁺ and an *rne*(Ts) strain by Northern blotting. Strains CH1827 (*rne*⁺) and CH1828 [*rne*(Ts)] were grown aerobically at 30°C. At an OD₆₀₀ of 0.4, cells were shifted to 43°C, samples were withdrawn at the indicated times, and total RNA was isolated. Shown are autoradiograms of blots with the specific *lldP* probe (A) and the *lldD* probe (B). The positions of standard RNA markers are shown on the left. Arrowheads indicate the positions of the *lldP*, *lldD*, and *lldPRD* transcripts. Lower panels show the ethidium bromide-stained rRNA bands of the corresponding Hybond membranes, used as loading controls.

amount of intact *lldR* mRNA, and therefore, only a small fraction of the transcribed *lldR* will be translated to a functional LldR protein. Moreover, the two cleavage products, carrying the intact *lldP* and *lldD*, are expected to be present at equivalent concentrations and to produce similar amounts of the LldP and LldD proteins. However, previous proteomic analyses have indicated that LldD is 13- to 15-fold more abundant than LldP (10, 11), a difference that cannot be fully explained by the rate of initiation of translation (Fig. 2C) or by the bias in the preferential use of codons. Therefore, we hypothesized that differential stability of the two mRNA species may also contribute to the modulation of the LldP and LldD protein doses. To test this, the longevities of *lldP* and *lldD* mRNAs were determined. *E. coli* MC4100 cells were grown in M9 minimal medium supplemented with Casamino Acids and L-lactate as the inducer. At mid-exponential growth, transcription was blocked by rifampin, which inhibits the action of the DNA-dependent RNA polymerase, and aliquots were withdrawn at various time intervals. Total RNA was isolated, and the half-life of the mRNA was analyzed by Northern blotting using *lldP*- and *lldD*-specific probes (Fig. 5). The half-life of the *lldP* mRNA was found to be ~2.5 min, whereas the half-life of the *lldD* mRNA was about 7 min (Fig. 5). Thus, differential transcript stability should also contribute to the modulation of the intracellular amounts of the LldP and LldD proteins.

Are there other transcription factors arranged in a genomic organization similar to that of the *lldPRD* operon? The above observations raised the question of whether the genomic organization of the *lldPRD* operon is unique or whether other transcription factor (TF) cistrons are also present in the middle of their respective

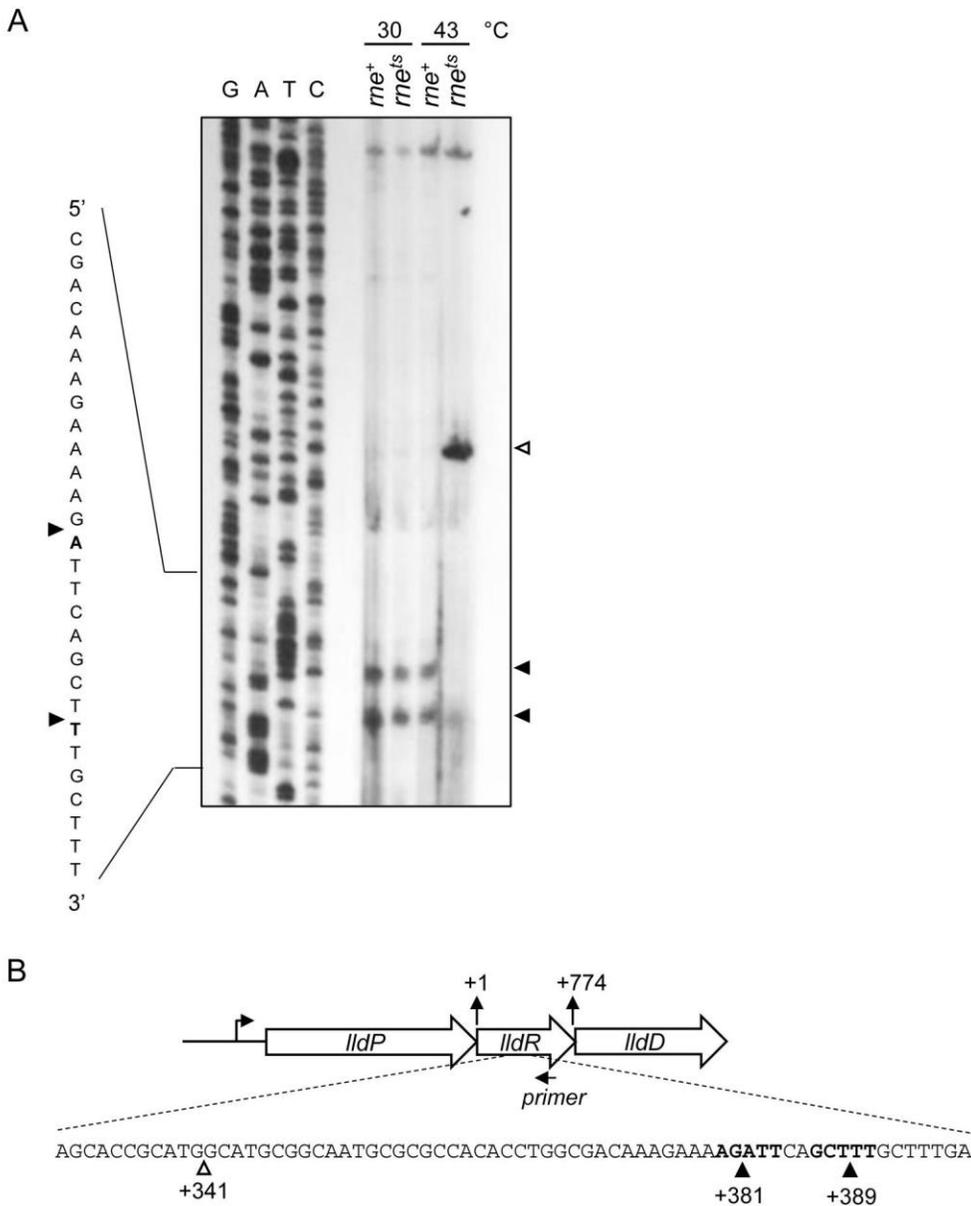


FIG 4 Primer extension analysis of sites of RNase E cleavage into the *lldR* transcript. (A) Total RNAs from strains CH1827 (*rne*⁺) and CH1828 [*rne*(Ts)], grown aerobically in the presence of 20 mM L-lactate at 30°C and 15 min after a shift to a nonpermissive temperature (43°C), were prepared and used for primer extension analysis. A 5'-end-labeled primer specific for the *lldR* transcript was annealed to total RNA and extended by reverse transcriptase. The resulting cDNA was resolved in an 8% polyacrylamide gel alongside a DNA sequencing ladder. Positions of relevant primer extension products are marked on the right. The relevant portion of the mRNA sequence (corresponding to the complementary sequence of the DNA sequencing ladder) is presented on the left, and the identified 5' ends are shown in boldface. (B) Schematic representation of the *lldPRD* operon and RNase E cleavage sites identified by primer extension analysis. Sites of cleavage into the *lldR* transcript at positions +381 and +389 with respect to the start codon of *lldR* are shown (▲), and predicted RNase E recognition sequences, which fulfill the proposed RNase E target motif RN↓WUU (where R stands for G or A, W stands for A or U, and N stands for any nucleotide) (30), are marked in boldface. The 5' end corresponding to the larger primer extension product detected in the RNase E mutant, at position +341 with respect to the *lldR* start codon, is also indicated (Δ).

operons. To answer this question, we used RegulonDB (31) to obtain a list of the *E. coli* K-12 genes that encode TFs (301 annotated TFs) and ProOpDB (32) to obtain the set of predicted *E. coli* K-12 operons. By employing a Perl program that was developed *ad hoc*, the relative positions of the genes encoding TFs within the operons were located

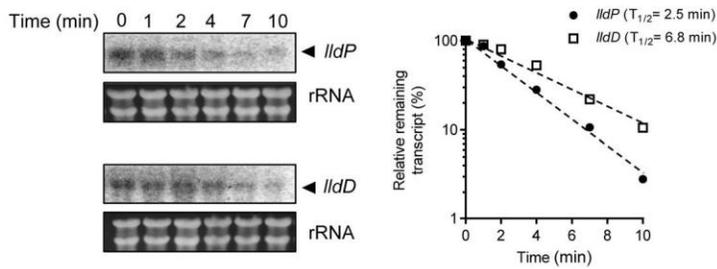


FIG 5 Northern blot analysis of *lldP* and *lldD* mRNA stabilities. *E. coli* MC4100 was grown in LB medium supplemented with 20mM L-lactate at 37°C to the mid-exponential phase prior to the addition of rifampin. Samples were then harvested at the indicated times, and RNA was extracted as described in Materials and Methods. Ten micrograms of total RNA from each time point was used for Northern blot analysis. (Left) Autoradiograms of blots using the specific *lldP* (top) or *lldD* (bottom) probe. Lower panels show the ethidium bromide-stained rRNA bands of the corresponding Hybond membranes. (Right) Semilogarithmic plot of *lldP* and *lldD* mRNA decay. The calculated half-lives were 6.8 min for *lldD* and 2.5 min for *lldP*.

and accounted for. The complete list of *E. coli* operons encoding TFs is presented in Fig. S2 and Table S3, and the results are summarized in Fig. 6. Our analysis revealed that 143 of the TFs are encoded by monocistronic mRNAs, and 158 are encoded by mRNAs located on polycistronic units. In the latter group, 78 TF genes were located at the beginning of the transcript, and 61 were located at the end; only in 19 cases was the TF located internally, in a manner similar to that of the *lldPRD* operon (Fig. 6; also Fig. S2). Among these, six TFs are constituents of the family of two-component signal transduction systems and are cotranscribed with their cognate partners (Fig. S2), and two operons, *gutM-srlR-gutQ* and *marR-marA-marB*, contain TF-encoding genes in both the first and the second positions. Finally, in six operons the presence of internal promoters has been reported (Fig. S2). Thus, of the 301 TFs that exist in *E. coli* K-12, only 5 have a setting similar to that of the *lldPRD* operon. It would be interesting to find out whether posttranscriptional mechanisms, similar to those described here for the *lldPRD* mRNA, control the expression of these TFs.

DISCUSSION

The rate of synthesis of a protein depends on the amount of its mRNA, which, in turn, depends on its rates of synthesis and decay. However, numerous prokaryotic genes that encode related functions are organized in polycistronic operons. Such an organization is expected to facilitate the coordinated expression of the different cis-

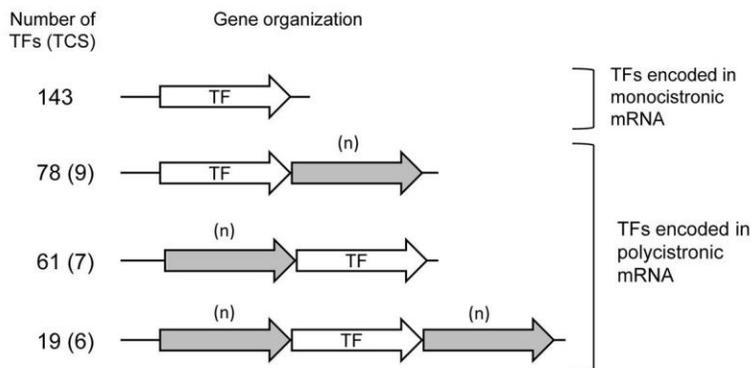


FIG 6 Gene organization of the 301 predicted TFs encoded in the *E. coli* genome. Open arrows represent genes encoding predicted TFs, and shaded arrows represent other genes. “(n)” stands for a number from 1 to 15. The number of TFs in each organizational group (TFs in monocistronic mRNA units or at the beginning, end, or middle of polycistronic mRNA units) is given on the left, and the number of TFs that are part of a two-component regulatory system (TCS), and share an operon with the cognate histidine kinase, is given in parentheses.

trons of the operon. Nonetheless, the protein products of different genes of an operon may be produced in different molar quantities. In these cases, additional steps of regulation are needed to fine-tune the expression of specific genes within an operon. For example, the presence of internal promoters allows differential transcription levels of the genes of an operon (33, 34). In other cases, the translation efficiencies of individual cistrons in a polycistronic transcript can determine the unequal protein dosage (15, 35). Alternatively, differential protein production from the genes of a polycistronic mRNA can occur after the processing of the primary transcript by RNase-dependent cleavages within intergenic regions that give rise to mRNA molecules with different segmental stabilities (36–45).

Yet another mode of modulation of gene expression emerged from our study on the *lldPRD* operon. The model proposed here for the processing events controlling the molar quantities of the proteins encoded in the *lld* operon can be described as follows. RNase E promptly cleaves the primary *lldPRD* transcript at an internal site(s) located within the *lldR* cistron. This event results in a drastic decrease in the amount of intact *lldR* mRNA, and therefore, only small amounts of functional LldR are produced. Endoribonucleolytic cleavages within *lldR* result in two mRNA species with differential stabilities, carrying the intact *lldP* (half-life [$t_{1/2}$], ≈ 2.5 min) and *lldD* ($t_{1/2}$, ≈ 7 min) cistrons. The difference in longevity between the *lldP* and *lldD* mRNA species is reflected in the steady-state amounts of the two messengers.

Finally, another important issue that can be included in our model is the accessibility to RNase E of its target sites within the *lldR* mRNA. It is well known that while an mRNA is being translated, it is covered by ribosomes and is thereby protected from endoribonucleolytic cleavages by different RNases (46, 47). In the case of the *lldPRD* operon, our results from translation initiation experiments did not show that the translation initiation efficiency of *lldR* was impaired relative to that of the *lldP* or *lldD* gene. Notwithstanding, the codon biases of the three cistrons, determined by the codon adaptation index (CAI) (13), revealed that the translation elongation rate of *lldR* may be lower than those of *lldP* and *lldD*. Most importantly, the first third of the *lldR* coding sequence was found to have a lower CAI value than the rest of the operon. This would result in a low rate of translation elongation and would contribute to ribosome crowding in this mRNA region. Indeed, the correlation between low translation elongation efficiencies, inferred from lower CAI values, and elevated ribosome densities has been demonstrated previously (15, 48). As a consequence, one can speculate that the fragment corresponding to the second third of *lldR* in the polycistronic unit should have a lower ribosome density and therefore remain accessible to RNase E.

Thus, a mechanism that is able to efficiently modulate the molar quantities of the three proteins encoded on the *lldPRD* operon is proposed. This mechanism involves (i) the intrinsically lower rate of translation and the ribosome crowding of the first third of *lldR* due to its lower biased codon usage compared to the rest of the operon (this step is supported by the CAI values but remains to be demonstrated experimentally), (ii) concomitant exposure of the mRNA segment corresponding to the second third of the *lldR* cistron to RNase E cleavage, an event that leads to a nearly immediate inactivation of the *lldR* mRNA, (iii) differential stabilities of the two cleavage products generated, which carry, respectively, the *lldP* and the *lldD* mRNAs, and (iv) lower translation efficiency of *lldP* than of *lldD*, due to lower translation initiation and elongation rates.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and culture conditions. The bacterial strains used in this study are listed in Table S1 in the supplemental material. Strains were routinely grown in lysogeny broth (LB) medium or in M9 defined minimal medium (49) supplemented with 0.2% (wt/vol) Casamino Acids (casein acid hydrolysate). When appropriate, the medium was supplemented with 20 mM L-lactate as an inducer, and antibiotics were added to the medium at the following concentrations: kanamycin, 50 $\mu\text{g/ml}$; ampicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$; and tetracycline, 10 $\mu\text{g/ml}$. For mRNA half-life measurements, the transcriptional inhibitor rifampin was used at a final concentration of 200 $\mu\text{g/ml}$. For assays to determine protein stability, chloramphenicol (10 $\mu\text{g/ml}$) was used to inhibit translation. Strains IFC5033 and IFC5034, expressing FLAG-tagged LldR and LldD, respectively, were created using the λ Red recombinase method, as described

previously (50) (the primers used are listed in Table S2). The transcriptional *lacZ* fusion in strain IFC5028 was generated using primers LacZPdw and LacZDrev (Table S2). The PCR product was digested with the restriction enzymes EcoRI and BamHI and was ligated to the corresponding sites of plasmid pRS415 (51), and the construct was transferred to the *att*(λ) site of the chromosome of MC4100 via phage λ RS45 as described elsewhere (51). Strains IFC5029, IFC5030, IFC5031, and IFC5032, carrying different *lacZ* translational fusions (Fig. 2C), were obtained using the CRIM system (52). Briefly, plasmid-borne translational *lacZ* fusions were constructed by cloning the PCR-amplified fragments (the primers used are listed in Table S2) into the PstI/BamHI site (for strains IFC5029 and IFC5032) or the PstI/EcoRI site (for strains IFC5030 and IFC5031) of plasmid pLFT (53). Constructs were integrated into the chromosome at the *att*(λ) site using the helper plasmid pINT-ts (54) as described previously (52).

Western blotting. Cells of strains IFC5033 and IFC5034 were grown aerobically at 37°C in LB medium supplemented with L-lactate and were harvested by centrifugation at an optical density at 600 nm (OD_{600}) of 0.6. Cell pellets were resuspended in 60 μ l of lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 4% SDS [pH 6.8]) and were boiled for 5 min. Cell extracts from strain IFC5034 were diluted 1:100 with lysis buffer. Aliquots of 10 μ l were separated by SDS-PAGE (12% polyacrylamide gel), and the proteins were transferred to a Hybond-ECL filter (Amersham Biosciences). The filter was equilibrated in TTBS buffer (25 mM Tris, 150 mM NaCl, and 0.05% Tween 20) for 10 min and was incubated in blocking buffer (1% milk in TTBS) for 1 h at room temperature. Monoclonal antibodies against the FLAG epitope were added at a dilution of 1:10,000 and were incubated for 1 h at room temperature. The bound antibody was detected by using an anti-mouse IgG antibody conjugated to horseradish peroxidase (1:10,000 dilution) and the Immobilon Western detection system (Millipore). Protein bands were quantified using ImageQuant software (Molecular Dynamics).

β -Galactosidase activity assay. For the β -galactosidase activity assays, cells were cultured aerobically in 10 ml of M9 mineral medium supplemented with 0.2% Casamino Acids, contained in 250-ml baffled flasks at 37°C with shaking (300 rpm), and harvested at an OD_{600} of 0.6. Where indicated, L-lactate was added at a final concentration of 20 mM. β -Galactosidase activity was assayed and calculated in Miller units as described previously (55).

RNA extraction and Northern blot analysis. RNA was obtained by the hot phenol extraction method as described previously (56). For Northern blots, 10 μ g of RNA was fractionated on denaturing 1.2% agarose-formaldehyde gels and transferred to nitrocellulose membranes (Amersham XL) by capillary transfer by using 20 \times SSC (1 \times SSC is 0.15 M NaCl plus 0.015 M sodium citrate). Membranes were cross-linked using a UV-cross-linking device (Stratalinker; Stratagene) and were prehybridized for 3 h at 42°C in a buffer containing 5 \times Denhardt's solution (57), 5 \times SSC, 0.2% SDS, 50% formamide, and 250 mg of sheared salmon sperm DNA per ml. Probes were denatured at 90°C for 5 min, placed on ice, added to the blocking solution, and incubated at 42°C overnight. For generating the *lldP*- and *lldD*-specific probes, primer pairs lldP1/lldP2 and lldD1/lldD2 (Table S2) were used in PCRs with plasmid pLCT2 (3) as the template. The PCR products were introduced by T/A cloning into the pGEM-T Easy vector (Promega), generating plasmids pGEM-ProbeP (for *lldP*) and pGEM-ProbeD (for *lldD*). Each probe was obtained by digesting either plasmid pGEM-ProbeP or plasmid pGEM-ProbeD with EcoRI. The fragments were separated on agarose gels and purified using the Qiagen Agarose purification kit. Probe labeling was performed by using [α -³²P]dCTP and the RadPrime kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Membranes were washed twice with 50 ml of 2 \times SSC and 0.1% SDS at 37°C and twice with 0.2 \times SSC and 0.1% SDS at 42°C. Images were obtained using phosphorimager screens and the Typhoon image scanner (Amersham), and radioactive bands were quantified using ImageQuant software (Molecular Dynamics).

Primer extension analysis to identify RNase E cleavage sites. Strains CH1827 (*rne*⁺) and CH1828 [*rne*(Ts)] were grown aerobically in LB medium supplemented with 20 mM L-lactate at 30°C to an OD_{600} of 0.4. Cultures were then shifted to 43°C for 15 min before cells were collected and total RNA was isolated by the hot phenol extraction method (56). Forty micrograms of RNA was annealed to 50 pmol of primer PE2-*lldPRD* labeled with ³²P at its 5' end (Table S2), complementary to positions +528 to +549 of the *lldR* transcript with respect to the start of *lldR* translation, by heating to 95°C for 3 min and then slowly cooling to 45°C. The primer was extended with Maxima H Minus reverse transcriptase (Thermo Scientific) at 55°C for 30 min, and the products were then purified by 1-butanol precipitation and analyzed by electrophoresis in 8% polyacrylamide–8 M urea gels alongside sequencing ladders. Sequencing ladders were generated by extending the same primer (PE2-*lldPRD*) with plasmid pLCT2 (3) as the template.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

SUPPLEMENTAL FILE 1, PDF file, 0.3 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Claudia Rodriguez for technical assistance and the Unidad de Biología Molecular of the Instituto de Fisiología Celular (UBM-IFC), Universidad Nacional Autónoma de México, for providing technical resources, DNA synthesis, and sequencing.

This work was supported by grants IN208718 (to A.F.A.), IN209918 (to D.G.), and IN203618 (to I.H.-L.) from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

The funders had no role in study design, data collection, analysis, and interpretation, the decision to publish, or the preparation of the manuscript.

REFERENCES

- Futai M, Kimura H. 1977. Inducible membrane-bound L-lactate dehydrogenase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 252:5820–5827.
- Nishimura Y, Tan IKP, Ohgami Y, Kohgami K, 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.
- Dong JM, Taylor JS, Latour DJ, Iuchi S, Lin EC. 1993. Three overlapping *lct* genes involved in L-lactate utilization by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 175:6671–6678. <https://doi.org/10.1128/jb.175.20.6671-6678.1993>.
- Aguilera L, Campos E, Giménez R, Badía J, Aguilar J, Baldoma L. 2008. Dual role of LldR in regulation of the *lldPRD* operon, involved in L-lactate metabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 190:2997–3005. <https://doi.org/10.1128/JB.02013-07>.
- Lynch AS, Lin EC. 1996. Transcriptional control mediated by the ArcA two-component response regulator protein of *Escherichia coli*: characterization of DNA binding at target promoters. *J Bacteriol* 178:6238–6249. <https://doi.org/10.1128/jb.178.21.6238-6249.1996>.
- Georgellis D, Kwon O, Lin EC. 2001. Quinones as the redox signal for the Arc two-component system of bacteria. *Science* 292:2314–2316. <https://doi.org/10.1126/science.1059361>.
- Malpica R, Franco B, Rodríguez C, Kwon O, Georgellis D. 2004. Identification of a quinone-sensitive redox switch in the ArcB sensor kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:13318–13323. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403064101>.
- Malpica R, Sandoval GR, Rodríguez C, Franco B, Georgellis D. 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. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.781>.
- Alvarez AF, Rodríguez C, Georgellis D. 2013. Ubiquinone and menaquinone electron carriers represent the yin and yang in the redox regulation of the ArcB sensor kinase. *J Bacteriol* 195:3054–3061. <https://doi.org/10.1128/JB.00406-13>.
- Lippolis JD, Bayles DO, Reinhardt TA. 2009. Proteomic changes in *Escherichia coli* when grown in fresh milk versus laboratory media. *J Proteome Res* 8:149–158. <https://doi.org/10.1021/pr800458v>.
- Masuda T, Saito N, Tomita M, Ishihama Y. 2009. Unbiased quantitation of *Escherichia coli* membrane proteome using phase transfer surfactants. *Mol Cell Proteomics* 8:2770–2777. <https://doi.org/10.1074/mcp.M900240-MCP200>.
- Kwon O, Georgellis D, Lynch AS, Boyd D, Lin EC. 2000. The ArcB sensor kinase of *Escherichia coli*: genetic exploration of the transmembrane region. *J Bacteriol* 182:2960–2966. <https://doi.org/10.1128/jb.182.10.2960-2966.2000>.
- Sharp PM, Li W-H. 1987. The codon adaptation index—a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Res* 15:1281–1295. <https://doi.org/10.1093/nar/15.3.1281>.
- Puigbò P, Bravo IG, Garcia-Vallve S. 2008. CAIcal: a combined set of tools to assess codon usage adaptation. *Biol Direct* 3:38. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-3-38>.
- Quax TEF, Wolf YI, Koehehorst JJ, Wurtzel O, Van der Oost R, Ran W, Blombach F, Makarova KS, Brouns SJJ, Forster AC, Wagner EGH, Sorek R, Koonin EV, Van der Oost J. 2013. Differential translation tunes uneven production of operon-encoded proteins. *Cell Rep* 4:938–944. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.07.049>.
- Kushner SR. 2002. mRNA decay in *Escherichia coli* comes of age. *J Bacteriol* 184:4658–4665. <https://doi.org/10.1128/jb.184.17.4658-4665.2002>.
- Apirion D. 1980. Genetic mapping and some characterization of the *rnpA49* mutation of *Escherichia coli* that affects the RNA-processing enzyme ribonuclease P. *Genetics* 94:291–299.
- Misra TK, Apirion D. 1979. RNase E, an RNA processing enzyme from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 254:11154–11159.
- Mudd EA, Krisch HM, Higgins CF. 1990. RNase E, an endoribonuclease, has a general role in the chemical decay of *Escherichia coli* mRNA: evidence that *rne* and *ams* are the same genetic locus. *Mol Microbiol* 4:2127–2135. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1990.tb00574.x>.
- Robertson HD, Webster RE, Zinder ND. 1968. Purification and properties of ribonuclease III from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 243:82–91.
- Umitsuki G, Wachi M, Takada A, Hikichi T, Nagai K. 2001. Involvement of RNase G in *in vivo* mRNA metabolism in *Escherichia coli*. *Genes Cells* 6:403–410. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2001.00430.x>.
- Ow MC, Perwez T, Kushner SR. 2003. RNase G of *Escherichia coli* exhibits only limited functional overlap with its essential homologue, RNase E. *Mol Microbiol* 49:607–622. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03587.x>.
- Lee K, Bernstein JA, Cohen SN. 2002. RNase G complementation of *rne* null mutation identifies functional interrelationships with RNase E in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 43:1445–1456. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02848.x>.
- Kaberlin VR. 2003. Probing the substrate specificity of *Escherichia coli* RNase E using a novel oligonucleotide-based assay. *Nucleic Acids Res* 31:4710–4716. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg690>.
- Ehretsmann CP, Carpousis AJ, Krisch HM. 1992. Specificity of *Escherichia coli* endoribonuclease RNase E: *in vivo* and *in vitro* analysis of mutants in a bacteriophage T4 mRNA processing site. *Genes Dev* 6:149–159. <https://doi.org/10.1101/gad.6.1.149>.
- Lin-Chao S, Wong T-T, McDowall KJ, Cohen SN. 1994. Effects of nucleotide sequence on the specificity of *rne*-dependent and RNase E-mediated cleavages of RNA I encoded by the pBR322 plasmid. *J Biol Chem* 269:10797–10803.
- McDowall KJ, Lin-Chao S, Cohen SN. 1994. A+U content rather than a particular nucleotide order determines the specificity of RNase E cleavage. *J Biol Chem* 269:10790–10796.
- Mackie GA. 1991. Specific endonucleolytic cleavage of the mRNA for ribosomal protein S20 of *Escherichia coli* requires the product of the *ams* gene *in vivo* and *in vitro*. *J Bacteriol* 173:2488–2497. <https://doi.org/10.1128/jb.173.8.2488-2497.1991>.
- Del Campo C, Bartholomäus A, Fedyunin I, Ignatova Z. 2015. Secondary structure across the bacterial transcriptome reveals versatile roles in mRNA regulation and function. *PLoS Genet* 11:e1005613. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005613>.
- Chao Y, Li L, Girodat D, Förstner KU, Said N, Corcoran C, Śmiga M, Papenfort K, Reinhardt R, Wieden H-J, Luisi BF, Vogel J. 2017. *In vivo* cleavage map illuminates the central role of RNase E in coding and non-coding RNA pathways. *Mol Cell* 65:39–51. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.11.002>.
- Gama-Castro S, Salgado H, Santos-Zavaleta A, Ledezma-Tejeda D, Muñoz-Rascado L, García-Sotelo JS, Alquicira-Hernández K, Martínez-Flores I, Pannier L, Castro-Mondragón JA, Medina-Rivera A, Solano-Lira H, Bonavides-Martínez C, Pérez-Rueda E, Alquicira-Hernández S, Porrón-Sotelo L, López-Fuentes A, Hernández-Koutoucheva A, Moral-Chávez VD, Rinaldi F, Collado-Vides J. 2016. RegulonDB version 9.0: high-level integration of gene regulation, coexpression, motif clustering and beyond. *Nucleic Acids Res* 44(D1):D133–D143. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1156>.
- Taboada B, Ciria R, Martínez-Guerrero CE, Merino E. 2012. ProOpDB: Prokaryotic Operon DataBase. *Nucleic Acids Res* 40:D627–D631. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1020>.
- Güell M, Yus E, Lluç-Senar M, Serrano L. 2011. Bacterial transcriptomics: what is beyond the RNA horis-ome? *Nat Rev Microbiol* 9:658–669. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2620>.
- Conway T, Creech JP, Maddox SM, Grissom JE, Conkle TL, Shadid TM, Teramoto J, Miguel PS, Shimada T, Ishihama A, Mori H, Wanner BL. 2014. Unprecedented high-resolution view of bacterial operon architecture revealed by RNA sequencing. *mBio* 5:e01442-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01442-14>.
- Li GW, Burkhardt D, Gross C, Weissman JS. 2014. Quantifying absolute protein synthesis rates reveals principles underlying allocation of cellular resources. *Cell* 157:624–635. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.033>.

36. Chen CYA, Beatty JT, Cohen SN, Belasco JG. 1988. An intercistronic stem-loop structure functions as an mRNA decay terminator necessary but insufficient for *puf* mRNA stability. *Cell* 52:609–619. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90473-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90473-4).
37. Desnoyers G, Morissette A, Prévost K, Massé E. 2009. Small RNA-induced differential degradation of the polycistronic mRNA *iscRSUA*. *EMBO J* 28:1551–1561. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.116>.
38. Jordi BJ, Op den Camp IE, de Haan LA, van der Zeijst BA, Gastra W. 1993. Differential decay of RNA of the CFA/I fimbrial operon and control of relative gene expression. *J Bacteriol* 175:7976–7981. <https://doi.org/10.1128/jb.175.24.7976-7981.1993>.
39. Papenfort K, Sun Y, Miyakoshi M, Vanderpool CK, Vogel J. 2013. Small RNA-mediated activation of sugar phosphatase mRNA regulates glucose homeostasis. *Cell* 153:426–437. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.003>.
40. Li Y, Altman S. 2004. Polarity effects in the lactose operon of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 339:31–39. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.03.041>.
41. Båga M, Göransson M, Normark S, Uhlin BE. 1988. Processed mRNA with differential stability in the regulation of *E. coli* pilin gene expression. *Cell* 52:197–206. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90508-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90508-9).
42. Belasco JG, Beatty JT, Adams CW, von Gabain A, Cohen SN. 1985. Differential expression of photosynthesis genes in *R. capsulata* results from segmental differences in stability within the polycistronic *rxcA* transcript. *Cell* 40:171–181. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(85\)90320-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90320-4).
43. Burchhardt G, Keshav KF, Yomano L, Ingram LO. 1993. Mutational analysis of segmental stabilization of transcripts from the *Zymomonas mobilis* *gap-pgk* operon. *J Bacteriol* 175:2327–2333. <https://doi.org/10.1128/jb.175.8.2327-2333.1993>.
44. Eddy CK, Keshav KF, An H, Utt EA, Mejia JP, Ingram LO. 1991. Segmental message stabilization as a mechanism for differential expression from the *Zymomonas mobilis* *gap* operon. *J Bacteriol* 173:245–254. <https://doi.org/10.1128/jb.173.1.245-254.1991>.
45. Yajnik V, Godson GN. 1993. Selective decay of *Escherichia coli* *dnaG* messenger RNA is initiated by RNase E. *J Biol Chem* 268:13253–13260.
46. Edri S, Tuller T. 2014. Quantifying the effect of ribosomal density on mRNA stability. *PLoS One* 9:e102308. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102308>.
47. Dar D, Sorek R. 2018. Extensive reshaping of bacterial operons by programmed mRNA decay. *PLoS Genet* 14:e1007354. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007354>.
48. Tuller T, Carmi A, Vestsigian K, Navon S, Dorfan Y, Zaborske J, Pan T, Dahan O, Furman I, Pilpel Y. 2010. An evolutionarily conserved mechanism for controlling the efficiency of protein translation. *Cell* 141:344–354. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.031>.
49. Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
50. Uzzau S, Figueroa-Bossi N, Rubino S, Bossi L. 2001. Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:15264–15269. <https://doi.org/10.1073/pnas.261348198>.
51. Simons RW, Houman F, Kleckner N. 1987. Improved single and multicopy *lac*-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene* 53:85–96. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(87\)90095-3](https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90095-3).
52. Haldimann A, Wanner BL. 2001. Conditional-replication, integration, excision, and retrieval plasmid-host systems for gene structure-function studies of bacteria. *J Bacteriol* 183:6384–6393. <https://doi.org/10.1128/JB.183.21.6384-6393.2001>.
53. Edwards AN, Patterson-Fortin LM, Vakulskas CA, Mercante JW, Potrykus K, Vinella D, Camacho MI, Fields JA, Thompson SA, Georgellis D, Cashel M, Babitzke P, Romeo T. 2011. Circuitry linking the Csr and stringent response global regulatory systems. *Mol Microbiol* 80:1561–1580. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07663.x>.
54. Hasan N, Koob M, Szybalski W. 1994. *Escherichia coli* genome targeting, I. Cre-lox-mediated *in vitro* generation of *ori*- plasmids and their *in vivo* chromosomal integration and retrieval. *Gene* 150:51–56. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90856-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90856-7).
55. Miller JH. 1972. *Experiments in molecular genetics*, p 352–355. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
56. Georgellis D, Arvidson S, Von Gabain A. 1992. Decay of *ompA* mRNA and processing of 9S RNA are immediately affected by shifts in growth rate, but in opposite manners. *J Bacteriol* 174:5382–5390. <https://doi.org/10.1128/jb.174.16.5382-5390.1992>.
57. Denhardt DT. 1966. A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 23:641–646. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(66\)90447-5](https://doi.org/10.1016/0006-291x(66)90447-5).