

28



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

“UN SISTEMA PARA ESTUDIAR INTERACCIONES
PROTEICAS EN EL DEGRADOSOMA DE
Escherichia coli”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A
MAURA EPIFANIA / MATUS ORTEGA

ASESORES: DR. JAIME GARCIA MENA
DRA. CECILIA MONTAÑEZ OJEDA
M.V.Z. GERARDO CRUZ JIMENEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2001



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

UNIVERSIDAD NACIONAL
 AVENIDA DE
 MEXICO

U. N. A. M.
 FACULTAD DE ESTUDIOS
 SUPERIORES
 ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
 DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
 P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
 Jefe del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Un Sistema para Estudiar Interacciones Protéicas en el Degradósoma de Escherichia coli"

que presenta la pasante: Maura Epifania Matus Ortega
 con número de cuenta: 9010971-1 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

ATENTAMENTE.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 28 de Marzo de 2001

PRESIDENTE	<u>M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez</u>	
VOCAL	<u>Q.F.B. Ma. Esther Revuelta Miranda</u>	
SECRETARIO	<u>Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>Q.F.B. Alejandra Hernández Ceruelos</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>M. en C. Natabiel Soto Guevara</u>	

AGRADECIMIENTOS

A mis padres **Macario Matus Gutierrez** y **Maura Ortega Gómez** por su apoyo moral y económico, su infinita paciencia y comprensión. Esto no existe sin ustedes.

A mi hermano **Macario Genaro** por su apoyo, su comprensión y sus palabras de aliento. Por la confianza que depositó en mi y me hizo seguir adelante.

Al Doctor **Jaime García Mena** por su apoyo, confianza y paciencia para transmitirme sus conocimientos. Gracias por aceptarme en su Laboratorio.

A la **UNAM** por abrirme las puertas al conocimiento y brindarme las facilidades para desarrollarme académica y personalmente.

A la **FES Cuautitlán** y a cada uno de los maestros que contribuyó en mi formación académica.

Al **CINVESTAV** por permitirme hacer uso de sus instalaciones.

A mis amigos: **Verónica Arroyo**, **Esbeth García**, **J. J. Alejandro Mellado**, **Alejandro Díaz**, **Carlos Tinajero**, **Héctor García**, por todo su apoyo, confianza y sus consejos.

A la familia **Ramírez del Laboratorio 6**: **Alberto Piña**, **Claudia Cano**, **José Trinidad Higareda**, **Ricardo González**, **Sergio Canseco**, por su compañía, apoyo y su amistad.

DEDICATORIAS

A mi hermano: Macario Genaro.

A mis abuelos Epifania, Genaro(†), Tomasa(†), Secundino(†).

A mis tías: Catalina, Hermila(†), Ciria, Juanita, Vicenta(†).

A mis primos: Tomy, Malena, Cata, Tián, Helio, Héctor, Martín, Reina, René, Ana Laura, Toño, Jorge, María de la Luz, Sebastián.

A mis sobrinos: Cecilia, Emmanuel, Fernando, Héctor, Helio, Ivonne, Josué, Juanito, Julio César, Liliana, Natalia, Sebastián, Sofía.

A mis amigos y compañeros: Aída Sánchez, Alejandra Barbosa, Carlos Tinajero, J Enrique Vázquez, Gustavo Hernández, Ismael Rivera, Jorge Urbán, Leonardo Pérez, Manuel Paz, Natalia Cabrera, Salvador Hernández, Sandra I. Vargas, Raúl Arias, Vicente Cabrera.

**"UN SISTEMA PARA
ESTUDIAR
INTERACCIONES
PROTEICAS EN EL
DEGRADOSOMA DE
Escherichia coli"**

INDICE	1
1. RESUMEN	10
2. INTRODUCCIÓN	11
2.1 Ácidos nucleicos y síntesis de proteínas	11
2.2. El ácido ribonucleico (ARNm).	11
2.3 El Degradosoma de <i>Escherichia coli</i> y la degradación de ARNm.	13
2.4. La Polinucleótido Fosforilasa (PNPasa).	15
2.5. La PNPasa71.	18
3. OBJETIVOS	20
4. HIPOTESIS	21
5. MATERIALES Y MÉTODOS	22
5.1. Cepas bacterianas.	22
5.2. Plásmidos.	22
5.3. Medios de cultivo.	23
5.4. Preparación de tubos de conservación de cepas bacterianas.	23
5.5. Extracción de ADN de bacterias.	23
5.5.1. Extracción a mediana escala por el método de lisis alcalina.	23
5.5.2. Extracción a mediana escala mediante el QIAGEN Plasmid Maxi Kit.	24
5.5.3. Mini extracción de plásmido mediante el QIAprep Spin Miniprep.	24
5.5.4. Extracción rápida de ADN de plásmidos (Método StrataGene).	25
5.5.5. Purificación fenólica.	25
5.6. Purificación de ADN a partir de rebanadas de agarosa.	26
5.7. Electroforesis de ADN.	26

5.8. Cuantificación de ADN	26
5.9 Documentación de geles.	27
5.10 Transformación de bacterias.	27
5.10.1. Nitrógeno líquido.	27
5.10.2. Cloruro de Calcio.	28
5.11. Manejo de ADN.	28
5.11.1. Reacciones de restricción.	28
5.11.2. Reacción de Klenow.	29
5.11.3. Reacciones de ligación de ADN	30
5.11.4. Reacciones de PCR.	30
5.12. Manejo de proteínas.	31
5.12.1 Ensayos de inducción de proteínas.	31
5.12.2. Gel de proteínas solubles totales (Coomassie).	32
5.12.3. Tinción de geles de poliacrilamida.	32
5.12.4. Ensayos de polimerización de ADP	33
5.12.5. Ensayos tipo “Trampa en Batch”.	33
5.12.6. Evaluación de la concentración óptima de NaCl.	34
5.12.7. Evaluación de la concentración mínima de Imidazol.	34
5.12.8. Determinación de la concentración de proteínas por el método de Bradford.	35
5.12.9. Ensayos de inmunodetección.	36
5.13. Prueba de autoregulación.	38
5.14. Programas de cómputo utilizados.	39
6. RESULTADOS	40
6.1. Diseño de vectores de expresión en computadora.	40
6.2. Construcción de un sistema dual para la expresión de PNPasa-6xHis.	44
6.2.1. Obtención de fragmentos.	44
6.2.1.1. Construcción del gen para PNPasa-6xHis.	44

6.2.1.2. Preparación de los fragmentos para la ligación.	44
6.2.1.3 Preparación de la cepa receptora	45
6.2.2. Ligación de los fragmentos para construir pIntermediario	46
6.2.3. Transformación de la cepa receptora.	46
6.2.4. Análisis de la expresión de la producción de PNPasa-6xHis.	47
6.3. Construcción de un sistema monoplasmídico para la expresión de PNPasa-6xHis y enzimas mutantes.	48
6.3.1. Análisis de la orientación del fragmento LacIq en los candidatos a pEJ01	50
6.4. Construcción de enzimas mutantes.	50
6.4.1 Construcción de la enzima PNPasa71-6xHis.	50
6.4.2. Construcción de la enzima PNPasa Δ S1-6xHis.	51
6.4.3. Construcción de la enzima PNPasa Δ KH-6xHis.	51
6.5 Substitución de la proteína PNPasa-6xHis por cada enzima mutante en el sistema monoplasmídico.	52
6.5.1. PNPasa71-6xHis (pEJ02)	53
6.5.2. PNPasa Δ S1-6xHis (pEJ03).	54
6.5.3. PNPasa Δ KH-6xHis (pEJ04).	55
6.6. Expresión de la PNPasa-6xHis y enzimas mutantes por el sistema monoplasmídico.	56
6.7. Actividad de polimerización de ADP.	57
6.8. Prueba de unión a la columna de níquel-NTA de las PNPasa-6xHis.	58
6.9. Prueba de autoregulación de las enzimas construidas.	58
6.10. Concentración óptima de NaCl para el ensayo tipo "Trampa".	59
6.11. Concentración mínima necesaria de Imidazol para el ensayo tipo "Trampa".	60
6.11. Ensayos de inmunodetección.	60

7. FIGURAS DE LOS RESULTADOS	62
8. DISCUSION	102
8.1. PNPasa-6xHis es expresada tanto por el sistema dual como por el sistema monoplasmídico	102
8.2. PNPasa-6xHis es capaz de autoregular eficientemente la expresión de PNPasa.	106
8.3. El sistema monoplasmídico expresa eficientemente las enzimas mutantes.	106
8.4. La expresión de las enzimas mutantes no es inducida por IPTG.	110
8.5. La presencia de seis residuos de Histidina no inhibe la polimerización de ADP.	110
8.6. Es probable que los dominios KH y S1 participen en la agregación de PNPasa.	112
8.7. Las enzimas construidas, excepto PNPasa Δ S1-6xHis son retenidas en la matriz de Agarosa-Níquel de los ensayos tipo “Trampa”.	113
8.8. Los dominios KH y S1 son necesarios para la autoregulación.	114
8.9. PNPasa-6xHis se retiene a diferentes concentraciones de NaCl y se eluye con 200 mM de Imidazol en el ensayo tipo “Trampa”.	115
8.10. RNasa E se une a PNPasa-6xHis en el ensayo tipo “Trampa”.	115
9. CONCLUSIONES	117
10. BIBLIOGRAFIA	119

INDICE DE FIGURAS

No	Figura	Pág
1.	A: Esquema de traducción, transcripción y síntesis de proteínas en procariontes.	62
	B: Degradación del ARNm.	62
2.	Modelo del Degradosoma de <i>Eschericia coli</i> .	63
3.	Esquema del gen de PNPasa de <i>Eschericia coli</i> .	64
4.	Secuencia de los iniciadores utilizados en la amplificación de PNPasas	65
5.	Esquema del ensayo de inducción de proteínas.	66
6.	Curva tipo de concentración de Albúmina Sérica Bovina.	67
7.	A: Plásmido pCJ11.	68
	B: Plásmido pQE70.	68
8.	Fragmento de <i>pnp</i> amplificado por PCR.	69
9.	Construcción del pIntermediario.	70
10.	A: Plásmido pIntermediario.	71
	B: Plásmido pREP4.	71
11.	Construcción de pEJ01.	72
12.	A: Plásmido pEJ01.	73
	B: Plásmido pCJ11ΔS1.	73
13.	A: Plásmido pEJ02.	74
	B: Plásmido pEJ03.	74
14.	Plásmido pEJ04.	75
15.	Esquema que muestra las diferencias entre las proteínas construidas.	76
16.	Esquema que muestra las diferencias en la secuencia teórica de los aminoácidos entre las proteínas construidas.	77

17. A: Análisis de productos de PCR en gel de agarosa al 1%.	78
B: Amplificado de PNPasa-6xHis a 3.0 mM de MgCl ₂	78
18. A: Corte de pQE70 con la enzima BglI en gel de agarosa al 1%.	79
B: Obtención de los fragmentos para clonación.	79
19. A: Fragmentos purificados para clonar, en gel de agarosa al 1%.	80
B: Corte de pREP4 con la enzima SalI	80
20. Tinción de Azul Coomassie. PAGE-SDS (10%) con los extractos crudos de las proteínas solubles.	81
21. Construcción del plásmido pEJ01.	
A: Fragmentos purificados listos para ligar.	82
B: Gel con el ADN de los plásmidos candidatos a pEJ01.	82
22. Geles analíticos con el ADN de los plásmidos candidato a pEJ01.	83
23. Geles con el ADN de los plásmidos candidato a pEJ01 para identificar la orientación del inserto.	84
24. A: Análisis de los productos de PCR en gel de agarosa al 1%.	85
B: Análisis de los amplificados de PNPasa Δ SI-6xHis y PNPasa71-6xHis.	85
25. A: Análisis de producto de PCR PNPasa Δ KH-6xHis fragmento 1 en gel de agarosa al 1%.	86
B: Análisis de productos de PCR PNPasa Δ KH-6xHis fragmento 2 en gel de agarosa al 2%.	86
26. Análisis de los amplificados 1 y 2 de PNPasa Δ KH-6xHis en geles de agarosa al 1 y 2%.	87
27. Geles analíticos de agarosa al 1% con el ADN de los plásmidos candidato a pEJ02 y pEJ03.	88
28. Análisis de los plásmidos candidato a pEJ04 en geles de agarosa al 1%	89
29. PAGE-SDS al 10% con los extractos crudos de las cepas conteniendo los plásmidos candidato PNPasa-6xHis.	90
30. Prueba bioquímica para evaluar el funcionamiento del gen represor <i>LacIq</i> .	91

31. A: PAGE-SDS al 10% con los extractos crudos de las proteínas PNPasa-6xHis.	92
B: Ensayo de polimerización de ADP. Gel nativo de poliacrilamida al 7.5%, teñido con naranja de acridina.	92
32. Ensayo de polimerización de ADP para los candidatos de PNPasa Δ KH-6xHis.	93
33. Análisis de los plásmidos pEJ01, pEJ04 y pEJ05 en geles de agarosa al 1%.	94
34. Geles analíticos PAGE-SDS al 10% de ensayos tipo “Trampa” de las proteínas PNPasa-6xHis.	95
35. Ensayo de autoregulación para las proteínas construidas en GF5322 <i>recA::Tn10</i> .	96
36. Ensayos de tipo “Trampa” para evaluar el efecto de la concentración de NaCl.	97
37. Ensayos de tipo “Trampa” para encontrar la concentración óptima de Imidazol.	98
38. Western Blot de ensayos tipo “Trampa” con las proteínas solubles de PNP(-) y PNPasa-6xHis.	
A: PAGE-SDS al 10% teñido con azul Coomassie.	99
B: Western Blot con anticuerpo anti-PNPasa.	99
39. A: Western Blot de ensayo tipo “Trampa” con anticuerpo anti-RNasaE.	100
B: Western Blot de ensayo tipo “Trampa” con anticuerpo anti-RhlB.	100
40. Western Blot de ensayo tipo “Trampa” con anticuerpo anti-Enolasa.	101

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Acido desoxiribonucleico.

ADP: Adenosin difosfato.

Amp: Ampicilina.

ARN: Acido ribonucleico.

ARNm: Acido ribonucleico mensajero.

ARNt: Acido ribonucleico de transferencia.

ATP: Adenosin trifosfato.

CaCl₂: Cloruro de Calcio.

colEI: Origen de replicación del plásmido pBR322

E. coli: *Escherichia coli*.

E: Elution (Elución)

EDTA: Acido etilen diamino tetraacetico.

FT: Flow Through (proteínas no unidas a la columna).

GroEL: Proteína chaperona y de choque térmico de *Escherichia coli*.

IPTG: isopropil-β-D-tiogalactósido.

Kan: Kanamicina.

kDa: Kilo daltons.

KH: Dominio de PNPasa de *E. coli* con homología al dominio KH número 6 de la Vigilina Humana

LB: Luria-Bertoni.

mg: miligramo.

mL: mililitro.

MgCl₂: Cloruro de Magnesio.

PAGE-SDS: Electroforésis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.

pb: pares de bases.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PNPasa-6xHis: Polinucleótido fosforilasa con una secuencia codificante para 6 histidinas al final del gen

PNPasa: Polinucleótido fosforilasa

PNPasa71-6xHis: Polinucleótido fosforilasa con la mutación 71 y una secuencia codificante para 6 histidinas al final del gen

PNPasa Δ KH-6xHis: Polinucleótido fosforilasa con la mutación Δ KH y una secuencia codificante para 6 histidinas al final del gen

PNPasa Δ SI-6xHis: Polinucleótido fosforilasa con la mutación Δ SI y una secuencia codificante para 6 histidinas al final del gen

PPK: Polifosfato cinasa de *Escherichia coli*.

RhlB: Helicasa ARN de *Escherichia coli*

RNasaE: Ribonucleasa E de *Escherichia coli*.

RNasaIII: Ribonucleasa III de *Escherichia coli*.

rpsO: Transcrito monocistrónico codificado por la proteína S15.

RSBII: Sitio de unión ribosomal.

S1: Dominio de PNPasa de *E. coli* con homología a los 6 dominios de la proteína S1 de *E. coli*.

t0: Terminador transcripcional T0.

T1: Terminador transcripcional T1

TE: Tris-EDTA.

μ g: microgramo.

μ L: microlitro.

W: Wash (lavado).

1. RESUMEN

En *E. coli* una gran parte de la degradación del ARNm está mediada por la actividad de endo y exoribonucleasas que componen el Degradosoma. La polinucleótido fosforilasa (PNPasa) es un componente importante del Degradosoma que tiene actividad de fosfoexoribonucleasa. En el Degradosoma esta enzima interacciona directamente con la RNasa E. En sus 711 aminoácidos la PNPasa tiene un dominio homólogo al dominio S1 de unión a RNA y otro dominio con homología al dominio KH # 6 de la Vigilina Humana. A pesar de la importancia de estos dominios en la estructura y función de las proteínas, no se ha estudiado el papel de estos dominios en las interacciones intra o intermoleculares de la PNPasa. En este trabajo se reporta el desarrollo de un sistema para estudiar las interacciones entre la PNPasa y las proteínas del Degradosoma u otros factores proteicos. Para ello se construyeron mutantes de PNPasa con alteraciones en los dominios KH y S1. A todas las construcciones se les añadió una bandera de seis histidinas en el extremo carboxilo del gen mediante una reacción de PCR. La razón por la que se incluyeron las histidinas es para poder retener las proteínas construidas en una resina de agarosa-Níquel. Las proteínas construidas fueron PNPasa-6xHis, PNPasa71-6xHis, PNPasa Δ S1-6xHis, y PNPasa Δ KH-6xHis. Las construcciones se hicieron inicialmente en un sistema dual de vectores de expresión, finalmente los genes modificados se clonaron en un sistema de expresión monoplasmídico. Se probó la expresión de las proteínas, su actividad enzimática y su autorregulación, tanto en los silvestres y mutantes con histidinas. También se hicieron ensayos tipo "Trampa" para probar la retención de las proteínas en columnas de Agarosa-Níquel. Finalmente se hicieron ensayos Western Blot con anticuerpos que reconocen a las proteínas componentes del Degradosoma mínimo.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Ácidos Nucléicos y Síntesis de Proteínas

La información genética de todo organismo se encuentra en la secuencia de ácido desoxirribonucleico (ADN). Cada molécula de ADN está formada por una doble hélice de cadenas complementarias unidas por puentes de hidrógeno entre los pares de bases C-G y A-T. La duplicación de la información genética ocurre cuando cada una de las cadenas originales es copiada por la enzima ADN polimerasa. Este proceso es conocido como la replicación del ADN.

La expresión de la información genética del ADN ocurre por la traducción de la secuencia de ADN en proteínas, primero se copia un segmento del ADN a una cadena complementaria de ácido ribonucleico (ARN). Esta molécula transcrita se llama ARN mensajero (ARNm). El ARNm se traduce a proteínas por un proceso que se lleva a cabo en los ribosomas. Primero los nucleótidos del ARNm son leídos como conjuntos de 3 (tripletes) que corresponden a un aminoácido de acuerdo al código genético. Finalmente los ribosomas incorporan a los aminoácidos activados como aminoacil-ARN de transferencia (ARNt) de acuerdo a la secuencia que se encuentre en el ARNm. Los aminoácidos añadidos forman una proteína y determinan su conformación tridimensional. Un esquema de estos procesos se puede ver en la figura 1A.

2.2. El Ácido Ribonucleico Mensajero (ARNm).

El ácido ribonucleico mensajero (ARNm) como todos los elementos involucrados en la expresión del material genético tiene un papel fundamental en las células. Todos los ARN pueden clasificarse por su estabilidad dentro de la célula. Los ARN más estables son los de transferencia (ARNt) y los ribosomales (ARNr). El tiempo de vida media del ARNm en muchos organismos es corto con respecto al

tiempo de duplicación celular. En procariontes como *E. coli*, el tiempo de vida media de los ARNm es de 1 a 2 minutos, aunque hay ARNm cuya vida media puede ser 15 minutos como el ARNm *ompA*. En cultivos de células eucariontes como las levaduras el tiempo de vida media del ARNm puede ser desde 25 minutos hasta 16 horas en humanos (Singer *et al*, 1985).

La concentración del ARNm depende mucho de su estabilidad y los niveles de su producción no dependen tanto de la fuerza de su promotor (Ross, 1995). Es decir, un ARNm estable se acumula más que un ARNm no estable aunque sean transcritos por promotores de igual fuerza. Por otra parte la degradación rápida del ARNm permite amplificar señales de regulación negativa que incrementan la represión de la expresión genética. Como sucede en algunos ARNm durante la represión traduccional de *E. coli* (Singer *et al*, 1985) y en la autoregulación de la expresión de RNasaE (Mudd *et al*, 1993). Además, la degradación selectiva del ARNm es importante para la expresión diferencial de productos de genes alejados en algunos ARNm policistrónicos, tal es el caso del operón maltosa (Newbury *et al*, 1987). Por otro lado las células pueden reducir su requerimiento de energía al reciclarse los ribonucleótidos después de la degradación del ARNm (Deutscher *et al*, 1991).

Las células pueden adaptar la síntesis de proteínas en respuesta a cambios de las condiciones de su entorno. La estabilidad del ARNm depende de las condiciones de crecimiento, de señales del medio y de la eficiencia de la traducción (Petersen, 1993). Aún así en la última década se hicieron trabajos que proponen vías diferentes de degradación del ARNm en *E. coli*, específicamente elementos ARN que controlan los niveles de degradación y proteínas celulares que llevan a cabo procesos de degradación.

En todas las células, tanto en eucariontes como en procariontes, el procesamiento y degradación del ARN mensajero (ARNm) son eventos importantes involucrados en el control de la expresión genética. En *E. coli*, la degradación del

ARNm se lleva a cabo por la actividad combinada de endoribonucleasas y exoribonucleasas (Belasco *et al*, 1988)

2.3. El Degradosoma de *Escherichia coli* y la Degradación del ARNm.

Durante la purificación de la proteína ribonucleasa E (RNasa E) de *E. coli* (Carpousis *et al*, 1994), se descubrió la asociación de varias enzimas en un complejo multiprotéico llamado Degradosoma. Los principales componentes del Degradosoma de *E. coli* son RNasa E, PNPasa y la ARN helicasa RhlB (Baumeister *et al*, 1991; Belasco, 1993; Belasco *et al*, 1985). El complejo también contiene a la Enolasa, una enzima glicolítica cuya función en el metabolismo del ARN no se ha descrito aún. Otras proteínas asociadas en cantidades subestequiométricas son DnaK, GroEL y polifosfato cinasa (PPK). Aún no está claro el papel de todas estas enzimas en la degradación del ARNm.

Las funciones conocidas de los componentes proteicos principales del Degradosoma de *E. coli* son: RNasa E es una proteína con actividad de endonucleasa en su dominio amino terminal (Taraseviciene *et al*, 1995; McDowall y Cohen, 1996) En el mismo dominio se ha descrito también la actividad de degradación de tallos 3' poli (A) o poli (U) (Bessarab *et al*, 1998). Estudios recientes muestran que la región C-terminal de la RNasa E sirve como anzuelo para que los otros componentes principales del Degradosoma (RhlB, Enolasa y PNPasa) se agrupen (Vanzo *et al*, 1998). La ARN helicasa RhlB es dependiente de ATP y aparentemente facilita la degradación del ARN estructurado por secuencias estables de doble cadena (estructuras tallo-burbuja). La Enolasa es una enzima glicolítica que cataliza la eliminación de una molécula de agua desde el 2-fosfoglicerato para formar fosfoenolpiruvato, su papel en el Degradosoma no está bien determinado (Miczak *et al*, 1996). Se ha identificado a la polifosfato cinasa (PPK) como un componente adicional del Degradosoma que cataliza la polimerización reversible del fosfato gama del ATP en polifosfato (poli(P)). La exoribonucleasa PNPasa es uno de

los componentes principales del Degradosoma de *E. coli* cuya función se describe más adelante.

Se ha sugerido que el Degradosoma es responsable de la degradación de ARNm mediante la acción de endo y exoribonucleasas (Blum *et al*, 1997). Un mecanismo propuesto para la degradación del ARNm establece que ésta puede iniciar con un corte endonucleolítico por RNasa E, en este momento el extremo 3' recién modificado puede ser atacado directamente por PNPasa. La figura 1B muestra un esquema de este mecanismo. Carpousis y colaboradores (1994) encontraron evidencia de la asociación entre PNPasa y RNasa E. Se ha sugerido que durante la digestión por PNPasa, RNasa E puede liberarse del complejo y unirse a otras moléculas de PNPasa libres para iniciar un nuevo ciclo de degradación. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que PNPasa y RNasa E permanezcan asociadas durante todo el proceso. Aunque la PNPasa degrada de 3' → 5', el Degradosoma puede degradar progresivamente el transcrito en dirección 5' → 3'. La figura 2 muestra un esquema del Degradosoma según Coburn y Mackic (1999) Se ha sugerido que la Helicasa coopera disociando estructuras complejas de ARNm que pueden impedir el ataque de RNasa E o la actividad de PNPasa. Aún no se sabe como se unen y/o cambia la estructura conformacional de los componentes del Degradosoma, así como su afinidad por cada uno, sin embargo se ha reportado ya una asociación de PNPasa con la proteína GroEL (Ybarra *et al*, 1996).

Recientemente se han descrito otros complejos multiprotéicos. Todos estos complejos tiene un sentido de degradación 3' → 5'. Uno de los complejos tiene un componente homólogo de PNPasa y una endonucleasa aparentemente relacionada con RNasa E. Esta endonucleasa tiene reacción cruzada con anticuerpos contra la enzima de *E. coli* y está implicada en el procesamiento y degradación de ARNm de cloroplasto (Hayes *et al*, 1996). Se han descrito otros dos complejos en levadura (*Saccharomyces cerevisiae*): el complejo mtEXO y el Exosoma. El complejo mtEXO contiene una exonucleasa relacionada con RNasa E de *E. coli*. Este complejo degrada los intrones del ARN mitocondrial en levadura (Margossian *et al*,

1996). El Exosoma está involucrado en procesamiento de ARN ribosomal y degradación de ARNm. Este complejo con actividad de $3' \rightarrow 5'$ contiene 5 enzimas que degradan sentido $3' \rightarrow 5'$, cuatro de las cuales se relacionan con RNasa E y PNPasa de *E. coli* (Anderson *et al.*, 1998; Mitchell *et al.*, 1997) El homólogo humano de la exonucleasa de levadura Rpr4p, se ha detectado en un complejo sugiriendo que las células animales también poseen un Exosoma. Los componentes integrales del Exosoma de levadura son indispensables para la viabilidad. La alteración *in vivo* de cualquiera de ellos lleva a la degradación incontrolada del ARNm. Estos resultados sugieren que las enzimas constitutivas del Exosoma actúan de manera conjunta (Carpousis *et al.*, 1999).

2.4. La Polinucleótido Fosforilasa (PNPasa).

La polinucleótido fosforilasa (PNPasa) fue la primera enzima caracterizada con la capacidad de formar poliribonucleótidos *in vitro*. PNPasa se ha purificado de diferentes organismos desde su descubrimiento en 1956. Esta enzima se encuentra ampliamente distribuida en bacterias Gram positivas y Gram negativas y también se ha encontrado en cloroplastos (Hayes *et al.*, 1996). Clásicamente PNPasa puede aislarse en dos formas activas, la forma A que es un trímero de subunidades α y la forma β que incluye además de las α un dímero de subunidades β (Portier, 1975) El núcleo catalítico de la enzima se encuentra en las subunidades α (Littauer *et al.*, 1982). Las subunidades β de la PNPasa son semejantes a la enzima Enolasa, no se ha encontrado afinidad por ARN y no se conoce su función en el degradosoma (Py *et al.*, 1996; Miczak *et al.*, 1996). La PNPasa posee dos actividades enzimáticas: la actividad de exoribonucleasa de $3' \rightarrow 5'$ tanto *in vivo* como *in vitro*, y la actividad de ARN polimerasa de $5' \rightarrow 3'$ *in vitro*.

La enzima de *E. coli* es la que mejor se ha caracterizado. Consiste en tres subunidades α idénticas de 77.1 kDa, sin embargo en geles SDS las subunidades muestran un tamaño aparente de 85 kDa (Coburn y Mackie, 1999). En la región C-

terminal de PNPasa se han caracterizado dos dominios de unión a ARN (Figura 3). El primer dominio con homología al módulo KH # 6 de Vigilina Humana, se encuentra de los residuos 557 al 591. Este dominio está presente también en varias ribonucleoproteínas heteronucleares (hrRNP) así como en la proteína ribosomal S3, el factor de transcripción NusA y el regulador de empalme en levaduras MERI, entre otros (Coburn y Mackie, 1999). Una característica relevante en este dominio es la presencia de una cadena de aminoácidos hidrofóbicos (I, L, V) en intervalos regulares y un pentapéptido central IGxxG. El dominio KH consiste en un arreglo $\beta\alpha\beta\beta\alpha$ en el que las hélices α están acomodadas de manera opuesta a las tres cadenas β antiparalelas formando un centro hidrofóbico (Musco *et al*, 1996).

El segundo dominio de 70 aminoácidos localizado entre los residuos 619 y 691 muestra una fuerte homología con cada uno de los 6 dominios de la proteína S1 de *E. coli* (Bycroft, 1997; Règnier *et al*, 1987). El dominio S1 está compuesto de 5 cadenas β antiparalelas. La cadena 1 contiene un abultamiento en el residuo 14 que permite que el dominio se enrolle formando un barril. Presuntamente uno o ambos dominios forman el sitio de unión a ARN de cadena sencilla involucrados en la degradación de ARN

In vivo algunos ARNm se encuentran protegidos y estabilizados por estructuras secundarias de tallo-burbuja en el extremo 5'. Estas estructuras son reconocidas específicamente por la RNasa III que las corta endonucleolíticamente iniciando así la degradación del ARNm. Una vez hecho el corte endonucleolítico la PNPasa o la RNasa II pueden actuar exonucleolíticamente desde el extremo 3' al 5' degradando el RNAm. Un ejemplo de esto ocurre en la regulación de la expresión del gen *int* en el bacteriofago Lambda (Montañez *et al*, 1986). La PNPasa está involucrada también en la degradación de algunos ARNm específicos tales como el RNAm *rpsO* (Braun *et al*, 1995) y la degradación del receptor de replicación antisentido de plásmidos *ColEI* (Xu *et al*, 1995).

El gen *pnp* comienza de manera inusual con un triplete UUG y se encuentra en el minuto 71.3 del cromosoma de *E. coli* después del gen *rpsO* que codifica para

la proteína ribosomal S15. El gen *pnp* se transcribe desde dos promotores, el propio y el del gen precedente *rpsO* (Portier *et al*, 1984). Tanto el transcrito corto de *pnp* como el transcrito dicistrónico largo son procesados por RNasa III en el tallo-burbuja que se localiza 119 nucleótidos antes del codón de inicio de *pnp* (Portier *et al*, 1987).

En *E. coli* la expresión del gen de PNPasa se autoregula postranscripcionalmente. El modelo propuesto como mecanismo de autoregulación sugiere que la PNPasa que normalmente tiene actividad de exonucleasa se une de manera específica al operador procesado. Esta unión de PNPasa a la región no traducida de su ARNm cerca de la región Shine-Dalgarno, bloquea la traducción y promueve la degradación del ARNm *pnp* (Robert-Le Meur *et al*, 1992; Robert-Le Meur *et al*, 1994). Esta propiedad puede no ser exclusiva para el ARN *pnp*, y la enzima puede ser capaz de unirse a ambos extremos de cualquier ARNm (Godefroy *et al*, 1972). Con el descubrimiento del Degradosoma, se ha dicho que la función posible de la unión de PNPasa es liberar a la RNasa E del ARNm procesado. La importancia del corte de RNasa III en la regulación se evidencia en que la actividad de PNPasa se sobre expresa más de 10 veces en cepas con una mutación *ts* en el gen *rnc* (Portier *et al*, 1987). Estas observaciones sugieren una interrelación funcional entre RNasa III, PNPasa y RNasa E.

La PNPasa es necesaria también para otras funciones como el desarrollo de competencia en microorganismos como *Bacillus subtilis* (Luttinger *et al*, 1996). También se ha demostrado que la PNPasa se une de manera específica al ADN, sugiriendo que podría tener una función adicional a aquella en la degradación del ARNm (Zhang *et al*, 1998).

2.5 PNPasa71.

Entre los estudios que se han hecho encaminados a conocer el papel y la relación estructura-actividad de PNPasa, se ha aislado una proteína mutante en el dominio KH. En la proteína PNPasa 71 se sustituyó el codón 570 GGT glicina por GAT ácido aspártico (la mutación G570-D). La mutación afecta un residuo fuertemente conservado del dominio KH (Musco *et al*, 1996), que aparentemente está involucrado en la unión al ARN y la formación de complejos proteicos. Esto afecta la autoregulación de la expresión de la PNPasa probablemente porque afecta la afinidad de PNPasa por su ARNm incrementando la concentración de PNPasa (García-Mena *et al*, 1999).

Las consecuencias de esta mutación son múltiples: la proteína incrementa la degradación de *sibI* dependiente del ARNm de *galk*. Además la proteína mutante muestra un corrimiento electroforético alterado respecto a la proteína silvestre en geles nativos de poliacrilamida (no desnaturalizantes). Esto indica la formación de un complejo anormal que provoca que se retrase la migración. Finalmente la enzima mutante se acumula en una gran cantidad en la célula por que tiene un defecto en su autoregulación (García-Mena *et al*, 1999). Todas estas características son resultado de una sola mutación en el dominio KH. Estos resultados sugieren que este dominio es muy importante en las interacciones de la proteína. Posiblemente la mutación en el dominio KH de PNPasa 71 incremente la estabilidad de las interacciones intermoleculares de las subunidades α (Portier, 1975). Existe la posibilidad de que la mutación G570-D afecte la interacción entre los trímeros de subunidad α y/u otro factor que module la actividad del Degradosoma. Otra posibilidad es que el cambio en el dominio afecte directamente la interacción PNPasa 71 con su ARNm (García-Mena *et al*, 1999).

En este trabajo se toma como modelo de estudio de las interacciones proteicas al Degradosoma de *E. coli*. PNPasa por ser uno de los componentes de

este complejo es útil en el estudio del Degradosoma, además de estar involucrada en eventos importantes como el procesamiento y degradación de ARNm. El Degradosoma es un buen modelo de estudio ya que es un complejo multiproteico involucrado en un proceso importante como es el metabolismo del ARNm.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un sistema para estudiar interacciones protéicas en el Degradosoma de *Escherichia coli*.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Construir vectores de expresión, de mediana copia, que contengan los genes *pnp*, *pnp-71*, *pnp-ΔS1* y *pnp-ΔKH* mutantes de *Escherichia coli* con seis residuos de Histidina en el extremo carboxilo del gen.
2. Caracterizar los vectores construidos con enzimas de restricción.
3. Evaluar la regulación de la expresión de PNPasa-6xHis en los sistemas de vectores construidos.
4. Determinar la actividad enzimática de cada His-PNPasa para evaluar el efecto de las histidinas.
5. Evaluar la autoregulación postranscripcional de la expresión de una PNPasa silvestre por cada His-PNPasa.
6. Determinar la importancia de los dominios S1 y KH de PNPasa en la actividad de polimerización de ADP.
7. Evaluar el papel de los dominios S1 y KH en la autoregulación de PNPasa.
8. Determinar la importancia de los dominios S1 y KH en la agregación de PNPasa.
9. Estudiar comparativamente las interacciones de las PNPasa construidas respecto a la PNPasa-6xHis, con otros componentes del Degradosoma *in vitro* mediante ensayo tipo “Trampa”.
10. Determinar por inmunodetección qué componentes del Degradosoma son retenidos en la columna de Agarosa-Níquel al retenerse PNPasa.

4. HIPOTESIS

Es posible estudiar interacciones proteicas entre los componentes del Degradosoma de *Escherichia coli* mediante el diseño de un ensayo *in vitro* tipo “trampa”.

5. MATERIALES Y METODOS

5. Materiales y Métodos

5.1. Cepas Bacterianas:

DH5 α	ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15, <i>rec A1</i> , <i>end A1</i> , <i>gyr A96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (Γ_K^- , m_K^+), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , deo R, Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169
N99	F- <i>galk2 rpsL</i> lambda-
N99 <i>pnp</i>	F- <i>galk2 rpsL</i> lambda- <i>pnp</i>
N99 <i>pnp</i> ::Tn5	F- <i>galk2 rpsL</i> lambda- <i>pnp</i> ::Tn5
N99 <i>pnp</i> ::Tn10	F- <i>galk2 rpsL</i> lambda- <i>pnp</i> ::Tn10
GF5322	<i>recA</i> ::Tn10

5.2. Plásmidos:

pCJ11, plásmido derivado de pUC19 que tiene el operón silvestre *pnp* (García Mena, 1992). pCAS21, plásmido derivado de pGB2 con el gen *pnp* mutante 71 y que contiene el gen de la resistencia a espectinomicina y un fragmento que incluye el gen *rep* que participa en la replicación de plásmidos (García Mena, 1992). pREP4 (QIA *express*) plásmido de baja copia derivado de pACYC184 que contiene el replicón *p15A*. Este plásmido confiere a la célula hospedera resistencia a kanamicina a una concentración de 25 μ g/mL y contiene el gen *lacIq* codificante para la proteína represora Lac Iq (Farabaugh, 1978). pQE-70 (QIA *express*) plásmido de baja copia derivado de la familia de los plásmidos pDS, específicamente de pDS56/RBSII y pDS781/RBSII-DHFRS (Stüber *et al*, 1990)

5.3. Medios de Cultivo:

El medio de cultivo fue Luria-Bertani (LB), sólido o líquido usando antibióticos cuando fue necesario; LB con tetraciclina (12.5 µg/mL), LB con kanamicina (25 µg/mL), LB con ampicilina (50 µg/mL), LB con kanamicina-ampicilina (25 y 50 µg/mL respectivamente). La preparación de los medios de cultivo se realizó siguiendo el protocolo establecido en Sambrook *et al*, 1989.

5.4. Preparación de Tubos de Conservación de Cepas Bacterianas:

De cultivos de 16 de horas a 37° C de cada cepa bacteriana, se inoculó una asada en 5 mL de LB con el antibiótico requerido y se incubó a 37° C hasta alcanzar una densidad óptica (D. O.) de 0.2 - 0.3 a 550nm. Se tomó 1.5 mL de cultivo y se depositaron en un vial estéril, posteriormente se añadió 1.5 mL de glicerol estéril al 40% para tener una concentración final de glicerol de 20%. El cultivo en el vial se congeló en baño de hielo seco-etanol y se guardó para su conservación en un ultracongelador a -70° C.

5.5. Extracción de ADN de Bacterias:

La extracción de los plásmidos a utilizar se realizó con los siguientes métodos:

5.5.1. Extracción a Mediana Escala por el Método de Lisis Alcalina:

De cultivos de 16 horas a 37° C en placas de las cepas necesarias, se resuspendió toda la masa bacteriana de 2 cajas por cada 250 mL de medio de cultivo. Esta solución se inoculó en los 250 mL de medio de cultivo LB, con el antibiótico adecuado si lo requería, y se dejó crecer a 37° C por el tiempo necesario para alcanzar una D.O. a 550nm de 0.2 - 0.3 por mL. Este cultivo se centrifugó a 6 000 RPM en una centrífuga refrigerada Eppendorf modelo Centrifuge 5804 R, por 4

minutos a 4° C para concentrar la masa bacteriana. A la masa bacteriana concentrada se le extrajo el ADN plasmídico como se describe en Sambrook *et al*, 1989.

5.5.2. Extracción a Mediana Escala Mediante el QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Cat. 12263).

La masa bacteriana de dos cajas se resuspendió en 250 mL de medio de cultivo, se preparó como se indicó anteriormente y se le extrajo el ADN plasmídico mediante cromatografía de intercambio iónico por unión a una resina. La pastilla bacteriana se resuspendió en 50 mM Tris.Cl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/mL RNasaA. La lisis de bacterias se realizó con la adición de 200 mM de NaOH, 1% SDS. Las proteínas, ARN, ADN cromosomal y toda impureza de bajo peso molecular se precipitaron con 3 mM de CH₃COONa, pH 5.5, por centrifugación a 20 000 g. El sobrenadante conteniendo el ADN plasmídico se vertió en la columna en donde fue retenido. Los restos celulares que no se eliminaron por precipitación, se retiraron por lavados con 1 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0; 15% isopropanol. El ADN plasmídico se recuperó con 1.25 M de NaCl; 50 mM Tris.HCl, pH 8.5; 15% isopropanol, se concentró y se eliminaron las sales por precipitación con isopropanol.

5.5.3. Mini Extracción de Plásmido Mediante el QIAprep Spin Miniprep (Cat. 27106).

Se tomó un inóculo grande a partir de un cultivo en caja de la cepa bacteriana a utilizar crecida por 16 horas a 37° C. El inóculo se disolvió en 5 mL de medio LB, con el antibiótico adecuado si lo necesitaba y se incubó el cultivo por 3 horas a 37° C con agitación constante a 200 RPM. Una vez transcurrido ese tiempo el cultivo se empastilló por centrifugación a 6 000 RPM por 4 minutos a 4° C. A la masa bacteriana empastillada se le extrajo el ADN plasmídico mediante adsorción del

ADN en una membrana de sílica-gel en presencia de alta sal a pH de 7.0 y su recuperación en presencia de 10 mM Tris-Cl, pH de 8.5.

5.5.4. Extracción Rápida de ADN de Plásmidos (Método de StrataGene):

De un cultivo de 16 horas a 37° C se tomó una colonia aislada con un palillo de madera estéril y se resuspendió completamente en 20 µL de un amortiguador que contiene: 100 mM de NaCl, 10 mM de EDTA y 2 mM de Tris HCl pH 8.0. Se añadió 20 µL de una solución de Fenol-Cloroformo (1:1), se mezcló vigorosamente y se centrifugó por 10 minutos a 14 000 RPM. Se separó la fase acuosa conteniendo el plásmido a un tubo limpio (20 µL en promedio).

5.5.5. Purificación Fenólica:

Cuando fue necesario las purificaciones de ADN se realizaron mediante extracciones fenólicas de la siguiente manera: a la solución de ADN se le agregó un volumen igual de fenol saturado con Tris.HCl pH 7.5 adicionado de hidroxiquinolina a una concentración final de 0.1% (Sambrook *et al*, 1989). Se centrifugó por 5 minutos a 14 000 RPM. La fase acuosa se separó y se mezcló con una solución de fenol-cloroformo (2:1). La fase acuosa se extrajo de nuevo y se precipitó, con un décimo del volumen de CH₃COONa 2.7 M y dos volúmenes de etanol al 100%, centrifugando por 30 minutos a 14 000 RPM a 4° C. Se retiró el sobrenadante y la pastilla de ADN se lavó con dos volúmenes de etanol al 70%. Después de centrifugar por 15 minutos a 14 000 RPM a 4° C, se retiró el etanol y la pastilla de ADN se secó mediante una corriente de aire. Finalmente se resuspendió en un volumen adecuado de TE pH 8.0.

5.6. Purificación de ADN a Partir de Rebanadas de Agarosa:

El ADN a purificar se separó en un gel de agarosa al 0.75% o al 1.0% con Bromuro de Etidio (BrEt) 0.5 µg/mL en todos los casos. La electroforesis se realizó a 120 Volts y de 18 a 20 mAmp en un tiempo apropiado para una óptima separación de los fragmentos. Una vez separado el fragmento a purificar se cortó la rebanada de agarosa con el ADN lo más delgado posible, la rebanada se colocó en una columna Micro Bio-Spin Chromatography Columns (Cat. 732-6204) El ADN se extrajo mediante una centrifugación a 10 000 RPM por 10 minutos a 4° C. Al líquido eluido se le extrajeron impurezas mediante extracción fenólica.

5.7. Electroforesis de ADN:

Las muestras de los plásmidos extraídos se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% con 0.5 µg/mL de Bromuro de Etidio (BrEt) en amortiguador TBE 1X (89 mM Tris Base, 98 mM Acido Bórico y 2 mM EDTA, pH 8.5). 2 µL de muestra con el ADN del plásmido se mezclaron con 2 µL de amortiguador de muestra 5X concentrado (0.125% Azul de Bromofenol, 25% glicerol) para tener una concentración final del amortiguador de muestra 1X mas 6 µL de agua desmineralizada para completar un volumen total de 10 µL (Sambrook *et al*, 1989). Se utilizaron geles de 20, 40 y 50 mL de agarosa. Las electroforesis se realizaron a 120 Volts y de 18 a 20 mAmp.

5.8. Cuantificación de ADN:

La cuantificación del ADN plasmídico se realizó con 500 µL de una dilución 1:100 del ADN diluyendo con agua desionizada. Las diluciones se midieron en un espectrofotómetro GeneQuant RNA/DNA calculator de Pharmacia Biotech, y se leyó a una longitud de onda de 260nm .

5.9. Documentación de Geles:

Una vez transcurrida la electroforesis, se tomó una fotografía del gel en el analizador de imágenes Foto Dyne (Cat. 6-1006, Foto Dyne Inc.), con lámparas de luz U.V. con apertura de diafragma de $f = 1.2$ y una distancia focal de 75. Las imágenes de los geles fueron digitalizadas usando el programa Collage versión 3.0 para Macintosh, Image Dynamics Corp., las imágenes se integraron 3 veces.

5.10. Transformación de Bacterias:

5.10.1. Nitrógeno líquido:

Cuando se tenía ADN de plásmido intacto se transformaron bacterias por el método de congelación con nitrógeno líquido como lo describe Takahashi *et al.*, 1992. Primero con un cultivo en medio sólido de 16 horas a 37° C, se inoculó 5 mL de medio líquido y se incubó a 37° C el tiempo necesario para alcanzar una D.O. de 0.2 a 0.4 a 550 nm de absorbancia. Se tomó aproximadamente 10 η g de plásmido circular y se mezcló con 100 μ L de cultivo en un tubo para microcentrífuga de 1.5 mL. La mezcla se colocó directamente en nitrógeno líquido durante un minuto. Posteriormente se dejó la mezcla congelada en reposo a temperatura ambiente hasta fundirse. Una vez fundida la mezcla de transformación, se sembró en los medios diferenciales correspondientes. Como controles de transformación se sembraron bacterias con el vector carente del inserto, bacterias transformadas en medio sin antibiótico y bacterias sin transformar. Se contó el número de bacterias transformadas en el medio selectivo y en los controles.

5.10.2. Cloruro de Calcio:

Las transformaciones de las cepas bacterianas con los plásmidos se realizaron modificando el método de Sambrook *et al*, 1989. Una asada de un cultivo fresco de bacterias en medio sólido se inoculó en 5 mL de medio LB con antibiótico si lo requería. Se dejó crecer hasta tener una D. O. a 550nm de absorbancia de 0.3 a 0.4 y se concentró para tener una D O de 0.5, todos los pasos siguientes se realizaron en hielo excepto donde se indique. Primero se centrifugó el volumen que se tenía a 6 000 RPM, por 4 minutos a 4° C, y se resuspendió en un décimo del volumen original con CaCl₂, 0.1 M. La suspensión bacteriana se incubó durante 10 minutos. Después se volvió a empastillar la masa bacteriana y se resuspendió en un quinto del volumen anterior de CaCl₂, 0.1 M. Se prepararon alícuotas de 200 µL para las transformaciones, se añadió a cada alícuota aproximadamente 10 ng del ADN correspondiente, y se dejó reposar por 30 minutos. A la mezcla de transformación se le dió un choque térmico de 90 segundos a 42° C en un termobloque Multi-Blok Heater Lab-Line, e inmediatamente después se dejó reposar en hielo por 2 minutos. Se añadió 800 µL de medio LB para completar un volumen de 1000 µL y se incubó por 45 minutos a 37° C, para permitir la recuperación de las bacterias y la expresión del plásmido. Posteriormente se sembró la mezcla de ligación en el medio sólido con el antibiótico necesario. Las placas se incubaron por 16 horas a 37° C. Como controles de transformación se sembraron bacterias con el vector carente del inserto, bacterias transformadas en medio sin antibiótico y bacterias sin transformar. Se contó el número de bacterias transformadas en el medio selectivo y en los controles.

5.11. Manejo de ADN:

5.11.1. Reacciones de Restricción:

Las restricciones se realizaron con las siguientes condiciones generales, excepto cuando se indique lo contrario. Se utilizó 1 U de enzima de la marca Gibco

BRL por μg de ADN. Las reacciones de restricción se llevaron a cabo en tubos para microcentrífuga de 1.5 mL. El volumen de reacción fue de 20 μL . La incubación de las reacciones se realizó por una hora en un termoblock Multi-Block Heater, Lab-Line a la temperatura correspondiente para cada enzima.

Las enzimas utilizadas se listan a continuación con la temperatura y el amortiguador utilizado.

Enzima	Amortiguador	T °C
AccI	50mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM MgCl_2 (REACT 1)	37
ApaI	20mM Tris-HCl pH 7.4, 5mM MgCl_2 , 50mM KCl (REACT 4)	30
BamHI	50mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM MgCl_2 , 100mM NaCl (REACT 3)	37
BglI	50mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM MgCl_2 , 50mM NaCl (REACT 2)	37
BglII	50mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM MgCl_2 , 100mM NaCl (REACT 3)	37
EcoRI	50mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM MgCl_2 , 100mM NaCl (REACT 3)	37
HindIII	50mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM MgCl_2 , 50mM NaCl (REACT 2)	37
SalI	50mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM MgCl_2 , 50mM NaCl (REACT 10)	37
SmaI	20mM Tris-HCl pH 7.4, 5mM MgCl_2 , 50mM KCl (REACT 4)	30
SphI	50mM Tris-HCl pH 7.4, 6mM MgCl_2 , 50mM NaCl, 50mM KCl (REACT 6)	37
XbaI	50mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM MgCl_2 , 50mM NaCl (REACT 2),	37

5.11.2. Reacción de Klenow:

Las reacciones para obtener extremos romos se llevaron a cabo en tubos para microcentrífuga de 1.5 mL. Las condiciones de las reacciones fueron: 1 Unidad de Enzima Klenow (Boehringer Mannheim, Cat. 1008404) por μg de ADN como Brent

et al, 1999. Amortiguador: 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT. Nucleótidos: 20 mM de mezcla de desoxinucleótidos (dNTPs, Boehringer Mannheim, Cat. 1277049). El volumen final de la reacción fue de 60 µL. La reacción se llevó a cabo por 1 hora a 37° C.

5.11.3. Reacciones de Ligación de ADN:

Las reacciones de ligación se llevaron a cabo en tubos para microcentrífuga de 1.5 mL. La enzima empleada fue T4 ADN Ligasa con una concentración de 1 U/µL, y se emplearon 1 U por µg de extremos cohesivos y/o romos (Boehringer Mannheim). Las condiciones de la reacción fueron: Amortiguador: 150 mM Tris HCl pH 8.5, 50 mM MgCl₂, 50 mM DTT y 200 mg/mL de Polietilenglicol (PEG) 8000). ATP: 0.17 M ATP (Boehringer Mannheim). El volumen de reacción fue de 20 µL. Las ligaciones se realizaron por 20 horas a 16° C salvo donde se indique lo contrario.

5.11.4. Reacciones de PCR:

Las reacciones de PCR se realizaron en tubos para reacciones de PCR de 250 µL de la marca Bio-Rad (Cat. 223-9473) en un volumen final de 100 µL de amortiguador de PCR (1X): 10 mM Tris.HCl, pH 8.3, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, (Boehringer Mannheim); 0.2 mM de cada dNTP (dATP, dGTP, dCTP y dTTP; Boehringer Mannheim); 1.0 µM de cada iniciador; 1 µg de ADN molde, salvo donde se indique lo contrario; 5 unidades de *Taq* Polimerasa (5 U/µL, *Taq* DNA Polymerase, recombinante, Boehringer Mannheim). La secuencia de los iniciadores utilizados se muestra en la figura 4.

Las reacciones se llevaron a cabo con el programa siguiente: Desnaturalización inicial a 95° C por un minuto; 25 ciclos de desnaturalización a 95° C por 30 segundos, alineamiento por 30 segundos a la temperatura necesaria

para cada par de iniciadores, y alargamiento a 72° C por 90 segundos. Al final de los ciclos se realizó un alargamiento final a 72° C por 7 minutos. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Lab Line: Programmable Thermal Block II. Module Heaters, Model: 212. Los fragmentos amplificados se purificaron mediante una extracción fenólica de las seis reacciones por separado que se resuspendieron en un volumen de 10 µL de TE pH 8.0 cada una, se verificó el producto analizando 0.5 µL de cada reacción en un gel de agarosa al 1%.

5.12. Manejo de Proteínas:

5.12.1. Ensayos de Inducción de Proteínas:

Se prepararon extractos crudos de las proteínas PNPasa silvestre y mutantes para los ensayos de proteínas totales de la siguiente manera: se sembró en medio LB sólido con el antibiótico requerido una colonia de la bacteria con el plásmido a analizar y se incubó por 16 hrs a 37° C. Se tomaron varias colonias de este cultivo y se resuspendieron en 5 mL de medio LB líquido para una D.O. de aproximadamente 1.0 a 550 nm de absorbancia. De esta solución se tomaron dos muestras diferentes. Una de las muestras se tomó como tiempo 0 de inducción que se ajustó en LB-Amp a 1 mL de suspensión con D.O. de 2.0 a 550 nm de absorbancia. La otra muestra se diluyó en LB líquido con el antibiótico necesario para tener 5 mL de solución con una D.O. de 0.2 a 550 nm de absorbancia. A esta solución se realizó la inducción de proteínas con 2 mM de IPTG y se incubó por 2 horas a 37° C con una agitación constante de 200 RPM. Al final de la incubación se tomó el volumen necesario de cultivo para tener una suspensión de 1 mL con una D.O. 550nm de 2. Esta muestra se tomó como muestra inducida. El esquema de la figura 5 muestra el proceso anterior.

Una vez teniendo las dos muestras se trabajaron en baño de hielo con el siguiente proceso: se empaquetó la masa bacteriana por centrifugación. El paquete

celular se disolvió en amortiguador Ib (50 mM Tris.HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA y 1 mM DTT) para lavar las bacterias y se empaquetó de nuevo por centrifugación. Posteriormente se resuspendió en amortiguador Ib para tener una D.O. 550nm de 2.0. Esta solución bacteriana se sonicó por 8 ciclos de 10 segundos con una amplitud de 16 micrones. Al cabo de la sonicación se empaquetaron los restos celulares por centrifugación a 15 000 g durante 10 minutos a 10° C e inmediatamente después se separó el sobrenadante con las proteínas a un tubo nuevo.

5.12.2. Gel de Proteínas Solubles Totales (Coomassie):

Los extractos crudos de proteínas solubles totales obtenidas a tiempo cero y con inducción, se analizaron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (PAGE-SDS). Gel Concentrador 4% 1 M Tris Base pH 6.8, 10% Dodecil Sulfato de Sodio (SDS), 4% Acrilamida/Bisacrilamida 38:2, 0.05% $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ y 0.05% TEMED; Gel Resolvedor 10% 1 M Tris Base pH 8.8, 10% Dodecil Sulfato de Sodio (SDS), 10% Acrilamida/Bisacrilamida 38:2, 0.05% $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ y 0.05% TEMED. Los geles se corrieron a 200 Volts por 35 minutos en amortiguador IX Laemmli (Laemmli, 1970).

5.12.3. Tinción de Geles de Poliacrilamida:

Después de la electroforesis, los geles se tiñeron por 30 minutos con una solución de Azul Coomassie al 0.25%, 45% de Metanol y 10% de ácido acético, se retiró el exceso de colorante con una solución para destefir con 10% de Metanol y 10% de ácido acético; se destiñeron completamente con 200 veces el volumen de un gel de agua desionizada por calentamiento de 20 minutos en un horno de microondas marca Samsung modelo MW8552W con potencia de 10 como se describe en Hervieu, 1997.

5.12.4. Ensayos de Polimerización de ADP:

Para los ensayos de polimerización de ADP, se prepararon extractos crudos de bacterias mediante el método modificado de Thang *et al*, 1967. Se tomaron los extractos crudos de las proteínas obtenidas anteriormente, se fraccionaron en geles no desnaturizantes de poli(acrilamida) al 7.5% [(Acrilamida/Bisacrilamida 38:2), 1X TBE, 0.05% $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ y 0.05% TEMED] y al 10% [(Acrilamida/Bisacrilamida 38:2), 1X TBE, 0.05% $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ y 0.05% TEMED]. Los geles se corrieron a 120 Volts por 90 minutos, posteriormente se incubaron por 15 horas a 37°C con agitación suave y constante en Amortiguador II 1X (0.1 M Tris Base pH 8.0, 10 mM MgCl_2 , 0.4 mM EDTA y 10 mM ADP). Las proteínas y el poly A se fijaron con una solución de ácido acético al 7% y el poly A se tiñó aplicando sobre el gel 0.5 mL de una solución de Naranja de Acridina al 0.5% por 30 minutos con agitación suave y constante. El exceso de colorante se eliminó con agua corriente.

5.12.5. Ensayos Tipo “Trampa en Batch” :

Los extractos crudos de bacterias obtenidos como anteriormente se ha descrito, se ajustaron de manera tal que se tuvo 20 μg de proteínas en 80 μL de amortiguador Ib (50 mM Tris.HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM DTT). Estas proteínas se mezclaron con 20 μL de matriz de agarosa NTA- Ni^{2+} (capacidad de unión de 5-10 mg de proteína 6xHis por mililitro de suspensión) de la marca QIAGEN (Cat. 30210). Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación suave y constante. Después se empaquetó la resina por centrifugación por 10 segundos y se separó el sobrenadante. Se realizó un lavado de la resina con amortiguador Ib. Las proteínas se eluyeron con un lavado de la matriz con 80 μL de amortiguador Ib con 250 mM de Imidazol. De las muestras de 80 μL se tomaron 20 μL para cargar en amortiguador 1X (Amortiguador Laemmli: Tris.HCl 0.0625 M

pH: 6.8, 2% SDS, y 10 % glicerol; 5% β -mercaptoetanol y 0.025% azul de bromofenol), en un volumen final de 30 μ L. Los 30 μ L se cargaron en un gel desnaturalizante de Poliacrilamida al 10%. Los geles se corrieron a 200 Volts y 45 mA por 35 minutos

5.12.6. Evaluación de la Concentración Óptima de NaCl.

Se hicieron ensayos de Trampa a diferentes concentraciones de NaCl para identificar el efecto de las sales en la obtención de proteínas. Se ensayaron cinco concentraciones diferentes de NaCl. Las concentraciones utilizadas fueron: 100, 150, 200, 250, 300 mM NaCl.

Los extractos crudos de bacterias obtenidos como anteriormente se ha descrito, se ajustaron de manera tal que se tuvo 20 μ g de proteínas en 80 μ L de amortiguador Ib. Estas proteínas se mezclaron con 20 μ L de matriz de agarosa NTA-Ni²⁺. Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación suave y constante. Después se empaquetó la resina por centrifugación por 10 segundos y se separó el sobrenadante. Se realizó un lavado de la resina con amortiguador Ib y otro lavado con 80 μ L amortiguador Ib con una de las diferentes concentraciones de NaCl. Las proteínas se eluyeron con un lavado de la resina con 80 μ L de amortiguador Ib con 250 mM de Imidazol. De las muestras de 80 μ L se tomaron 20 μ L para cargar en amortiguador 1X, en un volumen final de 30 μ L. Los 30 μ L se cargaron en un gel desnaturalizante de Poliacrilamida al 10%. Los geles se corrieron a 200 Volts por 35 minutos.

5.12.7. Evaluación de la Concentración Mínima de Imidazol.

Se hicieron ensayos de Trampa a diferentes concentraciones de Imidazol para obtener la concentración mínima de obtención de la PNPasa atrapada por la NTA-

Ni^{2+} . Se ensayaron cinco concentraciones diferentes de Imidazol 50, 100, 150, 200, 250 mM.

Los extractos crudos de bacterias obtenidos como anteriormente se ha descrito, se ajustaron de manera tal que se tuvo 20 μg de proteínas en 80 μL de amortiguador Ib. Estas proteínas se mezclaron con 20 μL de suspensión de agarosa NTA- Ni^{2+} . Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación suave y constante. Después se empaquetó la resina por centrifugación por 10 segundos y se separó el sobrenadante. Se realizó un lavado de la resina con 80 μL amortiguador Ib. Las proteínas se eluyeron con un lavado de la resina con 80 μL de amortiguador Ib con una de las diferentes concentraciones de Imidazol. De las muestras de 80 μL se tomaron 20 μL para cargar en amortiguador 1X, en un volumen final de 30 μL . Los 30 μL se cargaron en un gel desnaturizante de Poliacrilamida al 10%. Los geles se corrieron a 200 Volts por 35 minutos.

5.12.8. Determinación de la Concentración de Proteínas por el Método de Bradford:

Se determinó la concentración de proteínas en los extractos crudos por la técnica de Bradford, 1976, con el Kit Bio-Rad Protein Assay (Cat. 500-0006). Se preparó una curva patrón con Albúmina Sérica Bovina (BSA) con las concentraciones de 2.5, 5.0, 7.5 y 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se preparó un “blanco” con amortiguador Ib. Los extractos crudos sonicados se diluyeron en un volumen de 800 μL . Tanto a la curva patrón, el blanco y las muestras se añadió 200 μL del reactivo concentrado 5X de Bradford (Azul Brillante Coomassie G-250) para tenerlo 1X. Se tomó el tiempo en el que al primer tubo “Blanco” se le añadió el reactivo. Se mezclaron y se cargaron 200 μL de cada muestra en los pozos de una placa de ELISA, por duplicado, y se leyeron las densidades ópticas de las muestras en un lector de placas de ELISA (DYNEX MRX Microplate Reader II) con un filtro cuya

longitud de onda es de 630 nm. Los resultados de las muestras se interpolaron contra la curva patrón para obtener la concentración de proteínas. En la figura 6 se muestra una curva tipo de concentración de BSA.

5.12.9. Ensayos de Inmunodetección:

Los ensayos de inmunodetección se hicieron con las muestras obtenidas de los ensayos de trampa descritos anteriormente. Las muestras se cargaron en un gel PAGE-SDS al 10% en las condiciones mencionadas. Después de la electroforesis los geles se tomaron con guantes. Los geles se equilibraron por 15 minutos en amortiguador de transferencia IX (48 mM Tris, 39 mM glicina, 0.037% SDS y 20% Metanol) con un pH entre 9.0 y 9.4. La membrana PVDF (Trans-Blot Transfer Medium de BioRad, Cat. 162-0186) a la que se transfirieron las proteínas se hidrató como sigue: la membrana se sumergió en 10 mL de metanol 100% (0.170 mL/cm²) por varios segundos en un ángulo de 45° hasta que la membrana estuvo translúcida. Poco a poco se fue agregando agua filtrada y esterilizada hasta completar un volumen de 40 mL de agua y reducir el metanol a 20%. Se cortaron dos piezas de papel filtro grueso del tamaño del gel. Se saturó el papel filtro en amortiguador de transferencia.

La transferencia de las proteínas se hizo con una cámara de transferencia semihúmeda (Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell de BioRad, Cat. 170-3940). La cámara se preparó de la siguiente manera: se retiró la cubierta de seguridad y se colocó un filtro sobre el ánodo, se eliminaron las burbujas haciendo pasar sobre el filtro una pipeta esterilizada. Se colocó la membrana sobre el filtro, enseguida se puso el gel y se colocó el otro filtro sobre el gel. Después de colocar cada elemento se retiraron las burbujas como se explicó previamente. Finalmente se puso el cátodo sin mover el sandwich y se colocó la tapa. La cámara se conectó a la fuente de poder. La transferencia se realizó por 45 minutos con un voltaje constante de 20 Volts, y un promedio de 208 mAmps y 3 Wats. Una vez terminada la

transferencia se apagó la fuente de poder y se desconectó. Enseguida se retiró la cubierta y el cátodo. La membrana se sumergió en 30 mL (0.510 mL/cm^2) de TBS IX (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7.5) por 10 min. con agitación suave a 37°C . Se decantó la solución y se volvió a lavar. Por otro lado el gel se tificó con azul Coomassie como se explico en *Tinción de Geles de Poliacrilamida*. Para bloquear la membrana se sumergió en un ángulo de 45° en 30 mL (0.510 mL/cm^2) de solución de bloqueo (1% (w/v) de gelatina de pescado (Sigma, Cat. G-7765) y 1% (w/v) Leche libre de grasa (Svelty de Neslte) en TBS). Se incubó la membrana por 60 min a 37°C con agitación suave. Se decantó la solución de bloqueo y se lavó la membrana con 30 mL (0.510 mL/cm^2) de TTBS IX con bloqueadores (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0.2 % Tween 20 (BioRad, Cat. 170-5017), 1% gelatina de pescado (Sigma, Cat. G-7765) y 1% de leche libre de grasa (Svelty de Neslte). Se incubó 10 min. a 37°C con agitación suave y se lavó una vez mas.

La incubación con el anticuerpo primario diluido 1: 25 000 se hizo de la siguiente manera, se decantó el TTBS y se añadió 15 mL (0.255 mL/cm^2) de solución de anticuerpo primario (0.6 μL de anticuerpo en 7.5 mL de TTBS con bloqueadores, se filtró por 0.2 mm. y se completó a 15 mL con solución bloqueadora). El anticuerpo primario se incubó por 1 hora a 37°C con agitación suave. Después de la incubación se hicieron dos lavados: se decantó el anticuerpo primario y se agregó 30 mL de TTBS con bloqueadores (0.510 mL/cm^2). Se incubó por 10 min. a 37°C con agitación suave.

La incubación con el segundo anticuerpo diluido 1: 5 000 se hizo como sigue: se decantó el TTBS y se añadió 30 mL (0.170 mL/cm^2) de solución con el segundo anticuerpo conjugado con Fosfatasa Alcalina (2 μL de conjugado Alkaline Phosphatase (AP) conjugated antibody Bio-Rad, Cat. 170-5011, en 5 mL de TTBS con bloqueadores, se filtró por 0.2 mm. y se completó a 10 mL con solución bloqueadora). El segundo anticuerpo se incubó 30 min. a 37° con agitación suave. Después de la incubación se hicieron cinco lavados con TTBS con bloqueadores: se

decanó el anticuerpo secundario y se añadió 30 mL (0.170 mL/cm²) de TTBS con bloqueadores. Se incubó 10 min. a 37° C con agitación suave

El desarrollo de la marca luminiscente se hizo como sigue: se retiró la membrana y se secó el exceso de líquido. Se colocó la membrana en una bolsa de plástico "Ziploc" (S.C. Johnson & Son Inc.), y se selló. Se agregó 3 mL (0.05 mL/cm²) de la solución de sustrato (Immun-Star Chemiluminiscente Substrate Bio-Rad, Cat. 170-5011). Se incubó por 5 min. Se eliminó el exceso de líquido por sellado, sin permitir que la membrana se secase.

Después de la incubación se expuso la membrana a una película para diagnóstico (X-Omat K de Kodak Cat. 601-1597). El revelado de la película se hizo durante 7 segundos con revelador GBX de Kodak (Cat.190-0943), se retiró el revelador y se fijó la película con fijador GBX de Kodak (Cat.190-1859) por 1 minuto. El tiempo de exposición de la membrana a la película dependió del anticuerpo ensayado

Se hicieron ensayos diferentes para los anticuerpos de conejo anti-Enolasa, anti-RNase E policlonal y anti-RhlB donados por el Dr. Carpousis y anti-PNPase proporcionado por el Dr. García-Mena.

5.13. Prueba de Autoregulación:

Para probar que las PNPasas construidas son capaces de autoregular postranscripcionalmente su síntesis se empleó la cepa de *E. coli* GF5322*recA*::Tn10 que contiene una proteína de fusión reportadora: *pnp*::*lacZ* contenida en un profago lambda (Rober Le Meur *et al*, 1992). La cepa GF5322*recA*::Tn10 fue transformada con los plásmidos pEJ01, pEJ02, pEJ03, pEJ04 y pEJ05 que tienen los genes codificante para las proteínas PNPasa-6xHis, PNPasa71-6xHis, PNPasaΔS1-6xHis, PNPasaΔKH-6xHis y PNPasaΔKH4b-6xHis. Las cepas transformadas se hicieron crecer en medio MacConkey con lactosa y ampicilina a 30° C, se tomaron lecturas de los crecimientos a las 22 y 40 hrs.

5.14. Programas de Cómputo Utilizados:

En la planeación de la construcción y modificación de los vectores se utilizó el programa VECTOR NTI v 5.03 Informax Inc. Para ver las estructuras tridimensionales de las proteínas y diseñar las mutaciones, se utilizó el programa RasWinMolecular Graphics Windows Version 2.6. Para el alineamiento y comparación entre las proteínas construidas se utilizó el programa Multiple Sequence Alignment v1.0.1.2. Informax Inc. Para el análisis estadístico de la concentración de proteínas se utilizó el programa Curve Expert Version 1.31. para Windows Double-precision. Microsoft Co. 1993. Para la documentación de fotografías de los geles se utilizó el programa Corel Photo-Paint 8.232 Corel Co. Eastman Kodak Co.

6. RESULTADOS

6.1. Diseño de Vectores de Expresión en Computadora.

El diseño de vectores de expresión se realizó con el programa Vector NTI v5.03 Informax Inc. Para el diseño de la PNPasa-6xHis silvestre se construyó *in silico* el plásmido pCJ11 que se muestra en la figura 7A a partir de la construcción previa de los plásmidos pGB1 y pGB2 (Churchward *et al*, 1984) y la secuencia del operón de PNPasa reportada en la base de datos GenBank. A partir del plásmido pCJ11 se diseñaron los oligonucleótidos iniciadores para amplificar el gen de PNPasa con las siguientes características:

Iniciador Sentido: El sitio de inicio de la traducción TTG-met reportado para el cistron de PNPasa se sustituyó por ATG-met, en el extremo 5' insertándose un sitio de restricción para la enzima SphI. **Iniciador Antisentido:** Se insertaron seis codones que codifican para Histidina (6xHis) recorriéndose el sitio de término de la traducción TAA seis codones y en el extremo amino se insertó el sitio de restricción para la enzima BamHI. La secuencia de los iniciadores se muestra en la figura 4.

Se simuló la amplificación de PNPasa-6xHis con los iniciadores obtenidos anteriormente a partir de la construcción del pCJ11. El producto de PCR simulado se restringió con las enzimas BamHI y SphI. De la restricción anterior se obtuvo un fragmento de 2171 pb que puede verse esquemáticamente en la figura 8. La secuencia del vector de clonación pQE70 se obtuvo de QIAGEN Inc (www.qiagen.com) y puede verse gráficamente en la figura 7B. Se restringió el vector pQE70 con las enzimas BglII, SphI y BamHI (los sitios de corte se muestran en la figura 7B). De esta restricción se obtuvieron dos fragmentos: BglII - SphI (989 pb) que incluye 3/4 partes de gen de resistencia a ampicilina, el promotor optimizado reconocido por la RNA polimerasa de *E. coli* (promotor del fago T5) y dos secuencias del operador *lac* para control de la transcripción: promotor/operador (P/O), y el sitio de unión ribosomal (RBS II). El fragmento BglII - BamHI (2434 pb)

incluye terminador t0, terminador T1, origen de replicación *colE1* y 1/4 del gen de resistencia a ampicilina. Se ligaron los tres fragmentos para construir el plásmido pIntermediario de 5575 pb, la figura 9 muestra un esquema de esta construcción. Este plásmido se puede ver gráficamente en la figura 10A y tiene las siguientes características: para inicio de transcripción un promotor inducible optimizado P/O reconocido por la ARN polimerasa de *E. coli* (promotor del fago T5) y dos secuencias del operador *lac* para control de la transcripción. Un sitio de unión ribosomal sintético RBS II para inicio de la traducción. También contiene sitios de clonación múltiples así como codones para terminación de la traducción. Dos terminadores transcripcionales fuertes: t0 del fago Lambda y el T1 del operón *rrnB* de *E. coli*, para prevenir transcripciones incorrectas y asegurar la estabilidad de los vectores construidos. El gen *β -lactamasa* que le confiere resistencia a ampicilina a 50 mg/mL. Un origen de replicación *colE1*, y el gen de PNPasa con una secuencia codificante de 6 Histidinas al final del gen.

El plásmido Intermediario al poseer el promotor operador óptimo del fago T5 tiene niveles de transcripción altos, y por lo tanto la expresión de la proteína PNPasa-6xHis podría resultar tóxica para la célula hospedera. Para regular la expresión de la proteína se requiere de la proteína represora LacIq que se codifica en el gen del represor fuerte *LacIq*, por eso es necesario mantener dentro de las células hospederas el sistema dual pIntermediario y pREP4. El plásmido pREP4 se muestra en la figura 10B, el gen *LacIq* se encuentra flanqueado por los sitios de restricción Sall. Para inducir la expresión de la proteína PNPasa se requiere añadir isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG), que se une al represor *lacIq* para inactivarlo.

Para el diseño de la construcción del plásmido pEJ01, primero se simuló una linearización del pIntermediario con la enzima XbaI, después los extremos cohesivos se hicieron parejos con una reacción con la enzima Klenow. En la figura 10A se muestra el sitio XbaI. La secuencia de pREP4 se obtuvo de QIAGEN Inc. (www.qiagen.com). Se simuló la restricción del plásmido pREP4 con la enzima Sall para obtener un fragmento de 1238 pb que incluye el represor LacIq con su

promotor respectivo (esto se muestra en la figura 10B entre los sitios SalI). Después se hicieron los extremos romos con la enzima Klenow. Se simuló una ligación del fragmento de 1238 pb con el pIntermediario linearizado para obtener el plásmido pEJ01 de 6821 pb. La figura 11 muestra esta construcción y la figura 12A muestra el esquema del plásmido pEJ01. Debido a que se ligaron los extremos parejos en la ligación se obtuvieron dos tipos de plásmido pEJ01 con una diferencia en la orientación del represor *LacIq*. Una de las dos posibilidades del plásmido pEJ01 tiene en el mismo sentido la secuencia del gen de PNPasa-6xHis y la secuencia del gen de la proteína de regulación y represión de *Lac*, la otra posibilidad es que estas secuencias se encuentren en sentidos opuestos. La diferencia entre el pIntermediario y el pEJ01 es la presencia del gen *LacIq* que codifica para la proteína represora Lac que se une a la secuencia del operador y regula la expresión de proteínas recombinantes

La proteína PNPasa71-6xHis es expresada por el plásmido pEJ02 que se muestra en la figura 13A y se construyó con base a la construcción anterior del pEJ01. En este caso se cambió el residuo 2372 en el codón GGT, que codifica para glicina, por GAT que codifica para aspártico (mutación G570). Este cambio afecta al aminoácido 570 de la secuencia de PNPasa reportada en el GenBank (clave de acceso J02638), (García Mena *et al.*, 1999). La secuencia mutante Δ S1 de PNPasa se utilizó en la construcción de plásmido pEJ03 que se muestra en la figura 13B con base a la previa construcción de plásmido pEJ01. Se amplificó la secuencia de la proteína mutante a partir de plásmido pCJ11 Δ S1 (ver figura 12B) donado por la Dra. R. M. Bermúdez Cruz. En esta mutación se eliminaron los aminoácidos 626 a 651 del dominio S1 y el terminador t2 de la secuencia de PNPasa reportada en el GenBank. Los nucleótidos eliminados fueron 78, desde 2538 hasta 2616 en la secuencia de PNPasa reportada en el GenBank, y corresponden a los nucleótidos 4288 hasta 4365 del pEJ01. En la figura 15 puede verse el esquema de la mutación Δ S1 en PNPasa Δ S1-6xHis y la figura 16 muestra la secuencia de los aminoácidos en la eliminación PNPasa Δ S1-6xHis respecto a PNPasa.

La construcción de la secuencia de la mutante Δ KH de PNPasa en el plásmido pEJ04 que se muestra en la figura 14 se realizó por la combinación de los iniciadores utilizados en el diseño de PNPasa-6xHis y otros nuevos iniciadores cuya secuencia se muestra en la figura 4. Estos últimos fueron diseñados para eliminar la tercera hélice alfa que protege el centro hidrofóbico del dominio KH de la PNPasa. Se diseñaron los oligonucleótidos iniciadores de tal manera que se eliminaron 13 aminoácidos (EKAKHAIIRRIEEI) que corresponden a la tercera hélice alfa del dominio KH (Musco *et al*, 1996). Estos aminoácidos corresponden también a los nucleótidos 4219 hasta 4257 en el plásmido pEJ01. Al realizar la eliminación anterior, también se introdujeron dos mutaciones silenciosas, una en la posición de nucleótido 4218 en donde se cambió una citocina(C) por una timina(T) y la otra fue el cambio de una timina(T) por una citocina(C) en la posición 4260 de la secuencia de pEJ01. Estas mutaciones introducen un sitio de restricción KpnI. En esta construcción se intentó destruir el centro hidrofóbico en el que participa esta hélice basándose en la homología con el dominio KH # 6 de la Vigilina Humana (Musco *et al*, 1996). Teniendo los dos juegos de iniciadores PNPasa1 y PNPasa2, Kpn01 y Kpn02 (Figura 4), se planeó realizar dos reacciones de PCR. En la primera reacción se utilizaron los iniciadores para amplificar un fragmento de 1807 pb que abarca desde el sitio SphI hasta la generación de un sitio KpnI, incluyendo el sitio de inicio de traducción ATG. La segunda reacción abarca la amplificación de un fragmento de 313 pb desde la generación del sitio KpnI hasta el sitio BamHI, incluyendo la secuencia codificante de 6 histidinas al final del gen y el sitio de término de la traducción AAT. De esta manera al restringir los fragmentos amplificados y unirlos por el sitio KpnI se eliminó la tercera hélice alfa de la proteína. La figura 15 muestra el esquema de la mutación Δ KH en PNPasa Δ KH-6xHis y la figura 16 muestra la secuencia de los aminoácidos en la eliminación PNPasa Δ KH-6xHis respecto a PNPasa.

6.2. Construcción un Sistema Dual para la Expresión de PNPasa-6xHis.

El sistema dual se planteó para estar compuesto de un plásmido que expresa la PNPasa-6xHis a partir de un promotor regulado por el represor lacIq expresado por el plásmido pREP4.

6.2.1. Obtención de Fragmentos:

6.2.1.1. Construcción del Gen para PNPasa-6xHis.

A partir de la cepa de *E. coli* DH5 α se extrajo plásmido pCJ11 a mediana escala. Se tomó 1 μ g de ADN para la reacción de PCR del gen de PNPasa-6xHis. Se hicieron 6 reacciones de PCR como se indica en materiales y métodos para establecer las condiciones óptimas de la reacción. Se probaron concentraciones de MgCl₂ desde 1.5 mM hasta 9 mM. Los productos de estas reacciones se muestran en la figura 17A. La temperatura de alineamiento correspondió a 52° C por 30 segundos en cada ciclo. En el ADN amplificado la mejor condición fue a 3.0 mM de MgCl₂. Esto puede verse en la figura 17A en el carril 3. Una vez teniendo la concentración óptima de MgCl₂, se hicieron 6 reacciones de PCR con 3.0 mM de MgCl₂ y se analizaron en un gel de agarosa al 1%. El fragmento amplificado puede observarse en los carriles 2 y 3 de la figura 17B, con un peso molecular aproximado de 2171 pb que migra entre los marcadores de peso molecular de 2323 pb y 1929 pb. El fragmento amplificado de 2171 pb se cortó con las enzimas BamHI y SphI para obtener un fragmento de 2152 pb con el gen de PNPasa-6xHis y los sitios de restricción listos para clonar en el vector. Estos sitios se esquematizan en la figura 8.

6.2.1.2. Preparación de los Fragmentos para la Ligación.

El vector recipiente en el que se clonó el amplificado PNPasa-6xHis de 2171 pb fue el plásmido pQE70. De la cepa DH5 α pQE70 se extrajo plásmido, se verificó su extracción y se probó la existencia de los sitios de restricción: BamHI y SphI por

análisis en un gel de agarosa al 1%. En la figura 18A en el carril 3 se muestra la existencia del sitio BglI en pQE70 cortado con BglI de 3427 pb y en el carril 2 está pQE70 sin cortar. Para la construcción del pIntermediario se realizó un corte del vector recipiente pQE70 con dos enzimas en dos pasos debido a que los sitios BamHI y SphI se encuentran muy cercanos. Usando esta estrategia se aseguró la obtención de pIntermediario ya que al hacer la ligación se reconstruyó el gen de resistencia a ampicilina al ligarse los sitios BglI como se muestra en la figura 9. Se cortaron 37.5 µg de plásmido con la enzima BglI en un volumen total de 600 µL. Se obtuvo el plásmido linearizado de 3427 pb que se muestra en la figura 18A en el carril 3.

Posteriormente se tomaron 21 µg (71 %) de plásmido linearizado con BglI de 3427 pb para restringirlo con la enzima BamHI en un volumen final de 100 µL. Se obtuvieron dos fragmentos, el BglI/BamHI de 2434 pb que es el fragmento requerido y el resto de 993 pb que no era útil. Los 49 µg (29 %) del plásmido pQE70-BglI restante se cortaron con la enzima SphI en un volumen final de 200 µL. De esta restricción se obtuvo el plásmido cortado en dos fragmentos, el requerido BglI/SphI de 989 pb y el no útil de 2438 pb. En la figura 18B se muestra un gel analítico donde en el carril 5 está pQE70 cortado con BglI y BamHI de 2434 pb y en el carril 4 pQE70 cortado con BglI y SphI de 989 pb. Los fragmentos necesarios se purificaron mediante un gel preparativo de agarosa al 1%. Estos fragmentos puros se muestran en la figura 19A, en el carril 2 se tiene BglI/SphI de 989 pb y en el carril 3 BglI/BamHI de 2434 pb.

6.2.1.3. Preparación de la Cepa Receptora.

La cepa DH5α/pREP4 se obtuvo de la siguiente manera: se extrajo plásmido pREP4 a mediana escala con el QIAGEN Plasmid Maxi Kit. Se analizó el ADN preparado y el sitio de restricción para la enzima SalI como se señala en la figura 10B. En el carril 3 de la figura 19B se muestra la restricción pREP4 con la enzima

SalI. Las bacterias DH5 α Ca₂⁺-competentes se transformaron con el plásmido pREP4. Las bacterias se seleccionaron en medio sólido LB-Kan

6.2.2. Ligación de Fragmentos para Construir el pIntermediario.

La construcción del plásmido pIntermediario se hizo al ligar los fragmentos derivados de pQE70 BglI-SphI de 989 pb, BglI-BamHI de 2434 pb más el producto de PCR PNPasa-6xHis de 2171 pb cortado con BamHI y SphI (ver figura 9). La mezcla de ligación de los fragmentos anteriores se utilizó para transformar la cepa DH5 α /pREP4.

6.2.3. Transformación de la Cepa Receptora.

Las bacterias DH5 α /pREP4 fueron transformadas por el método de CaCl₂, con la mezcla de ligación mencionada anteriormente conteniendo el pIntermediario y se seleccionaron candidatos en medio sólido LB-Amp. De las postransformantes se estudiaron seis colonias candidato. De los candidatos obtenidos se obtuvo extracto crudo inducido y sin inducir como se explica en materiales y métodos. Se analizaron cantidades iguales de proteínas en geles de PAGE-SDS. En la figura 20A puede observarse que existe un aumento en la producción de una proteína que migra con un peso esperado para la PNPasa-6xHis. Los extractos provienen de las cepas candidato positivas 1 y 2 como se muestran en la figura 20A, y el candidato 4 de la figura 20B. Fueron candidatos negativos las cepas 3 de la figura 20A, 5 y 6 de la figura 20B. En éstas no se observa aumento en la expresión de ninguna proteína de manera particular.

La PNPasa se aísla como un trímero de subunidades idénticas con una masa molecular de 77.1 kDa por unidad (Grunberg-Manago, 1999). Sin embargo en geles SDS se ha observado un tamaño aparente de 85 kDa, debido a la basicidad de la proteína. (Portier, 1975). En nuestros ensayos se observó que la PNPasa-6xHis de 78.1 kDa migra cerca del marcador de peso molecular de 97.4 kDa (ver figura 31A).

6.2.4. Análisis de la Expresión de la Producción de PNPasa-6xHis.

Las cepas candidato positivas DH5 α conteniendo los plásmidos pIntermediario y pREP4 no mostraron incremento en la producción de la proteína PNPasa-6xHis al inducir con 2 mM de IPTG como se ve en las figuras 20A y B. En estas cepas se observa la misma cantidad de PNPasa-6xHis en las dos condiciones. Inicialmente se pensó que la falta de regulación se debía a que la proteína represora LacIq expresada por pREP4 no funcionaba adecuadamente, por ello se realizó una prueba para probar su funcionalidad. La prueba consistió en transformar bacterias N99 (*sup⁰ strA galK^{amb}, lac+*) con pREP4. El fundamento es que si el represor funciona debe unirse al operador del operón cromosomal *Lac* reduciendo por represión la transcripción del gen *LacZ* de la bacteria N99 y por lo tanto la síntesis de β -galactosidasa. La prueba mostró que las colonias de las bacterias N99/pREP4 crecidas en medio sólido MacConkey con lactosa y Kan crecieron blancas y con un diámetro entre 0.2 y 0.4 mm a las 16 hrs a 37° C. Las bacterias control N99 sin plásmido que contrariamente mostraron un color rosa y un diámetro de 0.4 a 0.5 mm a las mismas condiciones de cultivo en MacConkey. La interpretación de esta prueba indica que la coloración de las colonias de N99/pREP4 se debe a que el medio no se acidificó por que no hubo fermentación de lactosa por la β -galactosidasa. Esto prueba que el producto del gen *lacIq* presente en el plásmido pREP4 es capaz de reprimir la transcripción del operón lac del cromosoma de N99. Lo anterior se muestra que el represor si funciona y la falta de regulación en la expresión de las proteínas no se debe a un defecto del represor. Una vez probado el represor, la razón de la falta de regulación podría ser la existencia de un mayor número de copias de pIntermediario respecto a las copias del pREP4 de manera que habría titulación del represor. Otra posibilidad es que el promotor de pQE70 en el que se construyó pIntermediario no pueda reprimirse. Para solucionar este problema se pensó en aumentar el número de copias del gen *lacIq*, colocando el gen de la proteína PNPasa-6xHis y el gen de la proteína represora en un mismo plásmido.

Esto permitiría tener el mismo número de copias de ambos para mejorar la regulación.

6.3. Construcción de un Sistema Monoplasmídico para la Expresión de PNPasa-6xHis y Enzimas Mutantes.

Originalmente la idea fue la construcción de un plásmido que tuviera tanto el gen codificante de la proteína PNPasa-6xHis como el gen *LacIq* que codifica la proteína represora Lac. No se pudo hacer esta construcción desde el principio ya que se necesitaba incluir el fragmento conteniendo el gen *LacIq* y su promotor de pREP4 y solamente podía obtenerse por la restricción con la enzima *Sall*. En pQE70 existe un sitio *Sall* que interfiere con esta estrategia y por eso se planeó crear el vector en dos pasos. Aunado a esto encontramos la falta de regulación en la expresión de la proteína PNPasa-6xHis así que la construcción de un solo plásmido fue necesaria. Una vez teniendo el pIntermediario se incluyó el fragmento *lacIq* siguiendo la estrategia mencionada en la sección de diseño de vectores.

Se obtuvo plásmido a partir de la cepa positiva 4 DH5 α pIntermediario/pREP4 a mediana escala por el método de lisis alcalina. El ADN obtenido se cortó con las enzimas *XbaI*, *EcoRI*. Una vez confirmados los sitios de restricción se cortaron 250 μ g de los plásmidos pIntermediario con la enzima *XbaI* para linearizar el vector y 400 μ g de pREP4 con la enzima *Sall* para obtener el fragmento *Sall-Sall* de 1238 pb que contiene el fragmento *lacIq*. Los fragmentos *Sall-Sall* de 1238 pb y pIntermediario linearizado con *XbaI* de 5575 pb fueron purificados mediante geles preparativos de agarosa al 0.7% y al 1% respectivamente como se describe en materiales y métodos. Los fragmentos puros pueden verse en la figura 21A en el carril 1 el fragmento *Sall-Sall* de 1238 pb y en el carril 3 el pIntermediario linearizado con *XbaI* de 5575 pb. Se hicieron cohesivos los extremos de 0.03 μ g de plásmido linearizado y 0.17 μ g del fragmento *lacIq* usando la enzima *Klenow* en una misma reacción. El ADN se limpió y aproximadamente 0.1 μ g en un

volumen final de 20 μL . Se transformaron bacterias DH5 α competentes por calcio con la mezcla de ligación. Se seleccionaron colonias postransformantes en medio sólido LB-Amp, obteniéndose 616 colonias candidato en toda la mezcla de ligación. Se seleccionaron 12 colonias al azar y se purificaron en placas con medio sólido LB-Amp para analizarlas. Se extrajo ADN plasmídico de cada una de las 12 colonias por el método del Kit QIAprep Spin Miniprep. 1.0 μg del ADN de plásmido extraído se restringió con la enzima ApaI en un volumen final de 10 μL . Se utilizó la enzima ApaI por que está presente únicamente en la secuencia del gen *lacIq* y por lo tanto su presencia en el plásmido obtenido indica que el fragmento está presente. Después de la digestión se analizaron los resultados de los plásmidos cortados respecto a los plásmidos sin cortar en un gel de agarosa al 1%. La digestión de los plásmidos puede verse en los geles de la figura 21B, 22A y B. En los carriles con número par están los plásmidos sin cortar y en los carriles con número impar están las digestiones de los plásmidos.

Se obtuvieron 6 colonias candidato positivas de las cepas que se cortaron con ApaI. Esto sugiere que el fragmento *lacIq* está presente en los plásmidos de los candidatos positivos ya que el sitio de restricción está presente solamente en el fragmento insertado al vector. En la figura 21B se muestran los candidatos positivos 6 (carriles 4 y 5), 7 (carriles 6 y 7) y 12 (carriles 8 y 9) y en la figura 22B los candidatos 10 (carriles 2 y 3) 18 (carriles 4 y 5) y 20 (carriles 8 y 9). Se transformó N992⁺-competentes con el ADN de los plásmidos candidato positivos 6, 7, 12, 10, 18 y 20 y se tomó un candidato negativo 2 (ver carriles 6 y 7 de la figura 22A) mediante el método de CaCl₂. Las bacterias transformadas se sembraron en cajas de LB-Amp. Se obtuvieron incontables colonias transformadas chicas y grandes. Se purificó una colonia transformante de cada cepa y se resembró para los ensayos siguientes.

6.3.1. Análisis de la Orientación del Fragmento lacIq en los Candidatos a pEJ01.

Para saber en qué orientación está el inserto el gen de PNPasa-6xHis en los plásmidos candidatos e identificar al pEJ01, se cortó el ADN extraído de las cepas candidato 6, 10 y 2(-) con la enzima SphI. La digestión se realizó con menos de 1.0 µg de ADN de cada cepa en un volumen final de 10 µL. Después del corte se analizaron los resultados de los plásmidos digeridos respecto a los plásmidos sin digerir en un gel de agarosa al 1%. En la figura 23A puede observarse la digestión de los plásmidos, en el carril 2 puede verse el candidato 6 cortado con SphI, se obtuvieron dos fragmentos de aproximadamente 3624 pb y 3197 pb. El tamaño de los fragmentos obtenidos por el corte con SphI son los esperados para un plásmido que coincide con el mapa de la figura 12A, por esta razón este candidato se identificó como pEJ01. En el carril 3 se observa el plásmido sin cortar. El plásmido tiene un peso de aproximadamente 6821 pb.

6.4. Construcción de Enzimas Mutantes.

6.4.1. Construcción de la Enzima PNPasa71-6xHis.

La enzima PNPasa71-6xHis se construyó mediante reacción de PCR usando ADN del plásmido pCAS21 de donde se amplificó *pnp-71* añadiéndole la bandera de 6 histidinas. El plásmido pCAS21 se extrajo de tres colonias homogéneas de *E. coli* DH5α por el método rápido de extracción de plásmido de Stratagene. Se realizaron tres reacciones de PCR con 9 µL del ADN de cada extracción en un volumen de reacción de 100 µL. Las condiciones de reacción fueron las mencionadas en materiales y métodos, con una temperatura de alineamiento de 52° C por 30 segundos en cada ciclo y 3.0 mM de MgCl₂. Se utilizaron los mismos iniciadores que en la amplificación de PNPasa-6xHis. El ADN amplificado de cada reacción se purificó como se indica en materiales y métodos y se resuspendió en un volumen de 50 µL de TE pH 8.0. El ADN se analizó en un gel de agarosa al 1%. Los productos de reacción se pueden ver en la figura 24A carriles 5, 6 y 7. Los

productos de reacción se cuantificaron por espectrofotometría, como se detalló en materiales y métodos. Del fragmento amplificado de PNPasa71-6xHis de 2171 pb se cortaron 5.8 µg con las enzimas BamHI y SmaI para generar los sitios de restricción. Después de la digestión se purificó el producto amplificado y cortado y se resuspendió en un volumen de 50 µL de TE. Finalmente se comprobó su peso molecular de 1934 pb en un gel de agarosa al 1% que puede verse en la figura 24B en el carril 2.

6.4.2. Construcción de la Enzima PNPasaΔS1-6xHis.

La enzima PNPasaΔS1-6xHis se construyó mediante una amplificación del fragmento de PNPasaΔS1-6xHis a partir del plásmido pCJ11ΔSI proporcionado por la Dra. R. M. Bermúdez. Se utilizaron los mismos iniciadores que en la construcción del pEJ01 usando 0.1 µg de plásmido pCJ11 ΔSI en un volumen de reacción de 100 µL. La temperatura de alineamiento utilizada fue de 52° C por 30 segundos. Los fragmentos amplificados se resuspendieron en un volumen de 50 µL de TE para cada reacción. La figura 24A muestra el producto de PCR en los carriles 2, 3 y 4, el peso aproximado del producto es de 2093 pb. Se cortaron 18.9 µg del producto con las enzimas BamHI y SmaI en un volumen final de 60 µL. Después de la restricción el ADN se purificó y se resuspendió en un volumen de 50 µL de TE. La digestión se analizó en un gel de agarosa al 1% que se muestra en la figura 24B en el carril 3. El peso molecular del producto final es de aproximadamente 1856 pb.

6.4.3. Construcción de la Enzima PNPasaΔKH-6xHis.

La enzima PNPasaΔKH-6xHis se construyó utilizando como molde los productos de amplificación PNPasa-6xHis. Esto se realizó en dos partes, en la primera reacción se utilizaron los iniciadores Sentido PNPasa1 y el Antisentido Kpn02 descritos anteriormente. Las condiciones de reacción fueron indicadas en materiales y métodos, la temperatura de alineamiento fue de 52° C por 30 segundos.

Se hicieron seis reacciones de PCR usando 0.13 µg de ADN PNPasa-6xHis de 2171 pb generado en la construcción del gen de PNPasa-6xHis. En la segunda reacción se utilizaron los iniciadores Sentido Kpn01 y Antisentido PNPasa2, bajo las condiciones señaladas. Los productos de reacción purificados se resuspendieron en un volumen de 50 µL de TE para cada reacción. El producto de reacción PNPasaΔKH1-6xHis de aproximadamente 1807 pb se puede ver en la figura 25A donde el mejor rendimiento se obtuvo con 3.0 mM de MgCl₂ en el carril 3. Los productos de reacción PNPasaΔKH2-6xHis de aproximadamente 313 pb se pueden ver en la figura 25B en donde el mejor rendimiento se obtuvo con 3.0 mM de MgCl₂ en el carril 3. Se cortaron 12.8 µg del fragmento amplificado de PNPasaΔKH1-6xHis con 20 unidades de cada una de las enzimas KpnI y BamHI en un volumen de reacción de 90 µL. También se cortaron 7.2 µg del fragmento amplificado de PNPasaΔKH2-6xHis con 14 unidades de cada una de las enzimas KpnI y SmaI en un volumen final de 80 µL. Los productos digeridos se purificaron como se indicó anteriormente. Cada reacción se resuspendió en un volumen de 20 µL de TE. El fragmento purificado de PNPasaΔKH1-6xHis cortado con KpnI-BamHI de 1584 pb se observa en el carril 3 de la figura 26A, en un gel de agarosa al 1%. El fragmento PNPasaΔKH2-6xHis cortado con KpnI-SmaI de 307 pb se observa en el carril 2 de la figura 26B, en un gel de agarosa al 2%.

6.5. Substitución de la Enzima PNPasa-6xHis por Cada Proteína Mutante en el Sistema Monoplasmídico.

Una vez teniendo el plásmido pEJ01, el siguiente paso consistió en la substitución de la proteína PNPasa-6xHis por las demás proteínas mutantes construidas. De estas substituciones se generaron los plásmidos pEJ02, pEJ03 y pEJ04.

6.5.1. PNPasa71-6xHis (pEJ02).

La sustitución por la PNPasa71-6xHis se realizó de la siguiente manera. se cortaron 299 μg de plásmido pEJ01 con las enzimas BamHI y SmaI y se purificó el fragmento receptor BamHI-SmaI de 4887 pb a partir de un gel preparativo de agarosa al 1%. El producto purificado se resuspendió en un volumen de 50 μL de TE. El ADN puede verse en el carril 1 de la figura 23B. Se tomaron 3 μg del fragmento SmaI-BamHI de 1934 pb PNPasa71-6xHis preparado en la sección 4.1 y se ligaron con 1.0 μg del fragmento receptor pEJ01 cortado con BamHI y SmaI. Con 10 μL de la mezcla de la ligación anterior (2.5 μg de ADN ligado) se transformaron bacterias N99*pnp*::Tn5 competentes por CaCl_2 . Las bacterias transformadas se seleccionaron en medio LB-Amp, obteniéndose 100 colonias postransformantes. Se tomaron 3 colonias candidato para analizar su capacidad de polimerizar ADP. Las colonias candidato tuvieron un fenotipo de colonias brillantes y convexas de entre 1.0 y 1.5 mm de diámetro después de incubarse por 16 horas a 37° C en LB-Amp. De las tres cepas candidato se prepararon extractos crudos para ver la expresión de PNPasa71-6xHis y para probar la capacidad de polimerizar ADP por la enzima como se indica en materiales y métodos (resultados no mostrados). Las tres cepas candidato fueron expresadas por el plásmido pero sólo una resultó con capacidad de polimerizar ADP y con el corrimiento electroforético en gel nativo de poliacrilamida retrasado como se esperaba para la mutación 71 (García-Mena, *et al*, 1999). Este resultado puede explicarse por una recombinación genética en la cepa N99*pnp*Tn5 entre el ADN plasmídico y el cromosomal que permita la eliminación de la mutación en el plásmido. Para minimizar los problemas futuros de recombinación se transformaron bacterias DH5 α *recA*⁻::Tn10 Ca^{+2} -competentes. Se analizó el ADN de las tres cepas candidato N99*pnp*Tn5 (las dos negativas y la clona positiva para polimerización de ADP) y se les extrajo ADN plasmídico mediante Kit QIAprep Spin Miniprep. Se cortó 1.0 μg de plásmido pEJ02 con las enzimas BamHI y SmaI para confirmar la inserción del fragmento PNPasa71-6xHis, en un volumen de

reacción de 10 μ L. La reacción se analizó en un gel de agarosa al 1%. En el carril 2 de la figura 27A se observa la restricción del candidato g1, en el carril 4 para el candidato g2. En la figura 27B se observa la restricción del candidato c en el carril 2. En todos los candidatos se puede observar la existencia del inserto PNPasa71-6xHis en una banda de 1939 pb que se muestra en los carriles 2 y 4 de la figura 27A y en el carril 2 de la figura 27B. El ADN de la colonia positiva para la polimerización ADP se utilizó para transformar bacterias DH5 α competentes por CaCl₂. Las transformaciones se realizaron con 5 μ L del plásmido extraído, se obtuvo un número incontable de colonias brillantes, convexas y entre 1.0 y 1.5 mm de diámetro después de una incubación de 16 horas a 37° C. Se purificó una colonia candidato para obtener ADN plasmídico, a 1 μ g de ADN extraído se restringió con las enzimas BamHI y SmaI para confirmar la clonación del inserto (resultados no mostrados). Para evidenciar que la proteína PNPasa71-6xHis se expresaba en la cepa DH5 α se realizaron pruebas de expresión de proteínas y de polimerización de ADP cuyos resultados se detallan mas adelante.

6.5 2. PNPasa Δ S1-6xHis (pEJ03).

Para sustituir con PNPasa-6xHis el gen conteniendo la eliminación en el dominio S1, se ligaron 3 μ g del producto de PCR PNPasa Δ S1-6xHis cortado con SmaI-BamHI con 1.0 μ g del fragmento de pEJ01 cortado con BamHI y SmaI, en un volumen final de 20 μ L. La ligación se llevó a cabo durante 16 horas a temperatura ambiente. Las bacterias DH5 α competentes por CaCl₂ se transformaron con 10 μ L de la mezcla de ligación (2.0 μ g de ADN ligado). Las bacterias transformadas se seleccionaron en medio sólido LB-Amp. De esta transformación se obtuvieron 50 colonias de las que se tomaron 3 colonias al azar para evaluar la existencia de PNPasa Δ S1-6xHis. Las colonias candidato tuvieron un fenotipo brillantes y convexas con un diámetro de entre 1.0 y 1.5 mm después de 16 horas de incubación a 37° C. Para confirmar la presencia del inserto SmaI-BamHI de 1866 pb se analizó

el ADN de los plásmidos de cada colonia candidato luego de ser cortados con las enzimas BamHI y SmaI. En la figura 27 se muestran candidatos positivos con el inserto

6.5.3. PNPasa Δ KH-6xHis (pEJ04).

La sustitución por PNPasa Δ KH-6xHis se realizó de la siguiente manera: se tomó 1 μ g del fragmento pEJ01 cortado con SmaI-BamHI de 1934 pb previamente cortado y purificado para la construcción de pEJ02 (el ADN purificado puede verse en el carril 1 de la figura 23B), y se ligó con 2.24 μ g del producto de PCR PNPasa Δ KH1-6xHis cortado con KpnI-BamHI de 307 pb (3.774 veces el vector recipiente en proporción molar) y 1.08 μ g del producto de PCR PNPasa Δ KH2-6xHis cortado con KpnI-SmaI de 1584 pb (8 veces el vector recipiente en proporción molar), con 5 unidades de T4 DNA ligasa en un volumen de reacción final de 20 μ L. Finalmente se transformaron bacterias DH5 α competentes por CaCl₂ con 10 μ L de la mezcla de ligación (2.376 μ g de ADN ligado, haciendo la suma de las cantidades de ADN de cada fragmento en la ligación) y se seleccionaron bacterias transformadas en medio LB-Amp, obteniéndose 57 colonias postrtransformantes. Se purificaron 5 colonias candidato al azar para comprobar la existencia de PNPasa Δ KH-6xHis. Las colonias candidato tuvieron un fenotipo brillantes y convexas con un diámetro de entre 1.0 y 1.5 mm después de incubarse por 16 horas a 37° C. El esquema del plásmido pEJ04 se puede ver en la figura 14. A 5 colonias purificadas se les extrajo ADN plasmídico por el método de Kit QIAprep Spin Miniprep. 1.0 μ g de ADN de plásmido extraído fue cortado con 2 unidades de la enzima KpnI en un volumen final de 10 μ L. Las restricciones pueden verse en los geles de las figuras 28A y 28B, los candidatos que tienen el sitio KpnI son los positivos para el inserto Δ KH: 1, 5, 7 y 10. En la figura 28B se muestra en el carril 2 el candidato 10 restringido con KpnI que origina dos fragmentos cuyos pesos son de cerca de 5686 pb y 2323 pb. El candidato mas probable es el 1 debido a que su peso

es cercano al teórico esperado para la construcción Δ KH de 6782 pb (Figura 28A carril 6).

6.6. Expresión de la PNPasa-6xHis y Enzimas Mutantes por el Sistema Monoplasmídico.

Se prepararon extractos crudos de proteínas solubles PNPasa-6xHis de los candidatos N99*pnp::Tn5* pEJ01 y se analizaron en un gel de PAGE-SDS. Las muestras probadas fueron sin inducción y dos horas después de haber inducido con IPTG 2 mM. En las figuras 29A y B se colocaron los extractos de cada cepa. Las cepas candidato positivas son las 6, 7, 10, 12, 18 y 20. También se obtuvo una cepa candidato negativo, el candidato 2 que se muestra en la figura 29A. En la expresión de la proteína PNPasa-6xHis, no se observa diferencia en la producción de la proteína antes y después de haber inducido con 2 mM de IPTG. Aunque PNPasa-6xHis es expresada por el vector pEJ01, no hay inducción por 2 mM IPTG es decir, la expresión es aparentemente constitutiva. Como se hizo anteriormente para LacIq de pREP4 (ver en la sección “Construcción del sistema dual para la expresión de PNPasa-6xHis”), se probó la funcionalidad del producto del gen *LacIq* presente en pEJ01. En la figura 30 se ve la cepa N99 transformada con los candidatos 10 (sector 1), 12 (sector 2), 2 (sector 3) y con pQE70 (sector 4). Puede verse que LacIq expresado por el candidato 10 (que después se llamó pEJ01) en el sector 1 es capaz de reprimir la expresión de β -galactosidasa cromosomal en la cepa. Esto no sucedió cuando se usó el vector pQE70 del sector 4 sin LacIq en la misma cepa de N99. Al realizar los ensayos en la cepa DH5 α pudimos ver que tampoco existe regulación de la expresión de proteínas antes y después de inducir (resultados no mostrados).

También se prepararon extractos crudos de proteínas solubles de los plásmidos con los genes para las demás construcciones de PNPasa en DH5 α . Los extractos se analizaron en un gel PAGE-SDS que se muestra en la figura 31A. Puede verse que las proteínas PNPasa6x-His, PNPasa71-6xHis, y PNPasa Δ KH-6xHis con

una eliminación de 13 aminoácidos migran cerca del marcador de peso molecular de 97.4 kDa. La proteína PNPasa Δ S1-6xHis migra cerca del marcador de 68 kDa como resultado de la eliminación de 25 aminoácidos

6.7. Actividad de Polimerización de ADP.

Se hizo el análisis de polimerización de ADP por las proteínas construidas haciendo la comparación entre la proteína PNPasa6x-His y las proteínas mutantes en fondo DH5 α . Todas las construcciones hacen la polimerización de ADP. En el gel nativo de poliacrilamida de la figura 31B se muestran estas actividades. Se observa que el corrimiento electroforético de la proteína PNPasa71-6xHis se retrasa respecto a la proteína PNPasa-6xHis como se esperaba (García-Mena *et al*, 1999). La eliminación de 13 aminoácidos en el dominio KH de la proteína PNPasa Δ KH-6xHis, provoca un retraso en el corrimiento electroforético. Pero esto no ocurre en el corrimiento de la proteína PNPasa Δ S1-6xHis. La eliminación de los 25 aminoácidos en el dominio S1 provoca que el corrimiento esté adelantado respecto a PNPasa-6xHis.

Cabe señalar que durante la construcción de la proteína PNPasa Δ KH-6xHis se obtuvieron varias cepas candidato cuya actividad de polimerización de ADP fue muy interesante. Uno de estos candidatos tiene una actividad diferente que se muestra en la figura 32 en los carriles 5- y 5+. En este candidato se puede observar 4 bandas bien definidas. Para conocer un poco mas de este candidato se extrajo ADN plasmídico al que se llamó plásmido pEJ05. Este ADN se cortó con las enzimas BamHI y KpnI. Se tomaron como referencia los plásmidos pEJ01 y pEJ04. En el carril 3 de la figura 33B puede observarse que el plásmido pEJ05 contiene el sitio KpnI. Esto sugiere que tiene la mutación de los 15 aminoácidos. Su peso molecular al tenerlo linearizado es de cerca de 7242 pb a diferencia del peso de pEJ04 de 6787 pb como puede observarse en los carriles 3 y 4 de la figura 33B.

6.8. Prueba de Unión a la Columna de Níquel-NTA de las PNPasa-6xHis.

Los ensayos de tipo trampa para las proteínas PNPasa construidas en fondo DH5 α se hicieron como se indica en materiales y métodos y se analizaron en geles PAGE-SDS. La figura 34 muestra estos ensayos. Los carriles FT contienen todas las proteínas que pasaron a través de la matriz y no fueron retenidas. En los carriles W se encuentran las proteínas que fueron removidas con el lavado de la matriz. En los carriles E están las proteínas liberadas al hacer pasar a través de la matriz una concentración de 250 mM de Imidazol. En la figura 34A se observa que la proteína PNPasa-6xHis es retenida en la matriz de agarosa-níquel. Esto es que después de lavar la columna, la proteína es liberada al aplicar Imidazol como lo muestra el eluato del carril E. La proteína PNPasa71-6xHis también es retenida en la matriz y liberada con el Imidazol. Sin embargo, en la figura 34B se observa que la mayor cantidad de la proteína PNPasa Δ S1-6xHis se encuentra con todas las demás proteínas que no se unen a la matriz en el carril FT. Una mínima porción se puede observar en los carriles del lavado (W) y de elución con Imidazol (E). La proteína PNPasa Δ KH-6xHis sí se retiene en la matriz y se libera después de lavar y eluirla con Imidazol.

6.9. Prueba de Autoregulación de las Enzimas Construidas.

Se sabe que PNPasa autoregula su síntesis postranscripcionalmente (Robert-Le Meur *et al*, 1992). Para probar si las PNPasas construidas son capaces de autoregular su síntesis postranscripcionalmente se empleó la cepa de *E. coli* GF5322*recA*⁻::Tn10 que contiene una proteína de fusión reportadora: *pnp*::*lacZ* contenida en un profago lambda (Rober-Le Meur *et al*, 1992). Esta cepa expresa una β -galactosidasa híbrida debida a la fusión *pnp*::*lacZ*. La prueba de autoregulación consistió en transformar la cepa GF5322*recA*⁻::Tn10 Ca⁺²-competentes con los plásmidos pEJ01, pEJ02, pEJ03, pEJ04 y pEJ05 que tienen los genes codificantes

para las proteínas PNPasa-6xHis, PNPasa71-6xHis, PNPasa Δ S1-6xHis, PNPasa Δ KH-6xHis y PNPasa Δ KH-6xHis mutante con 4 bandas (PNPasa Δ KH4bandas-6xHis). Las cepas transformadas se purificaron en medio LB-Amp. Se tomó una cepa purificada de cada una y se hizo crecer en medio MacConkey con lactosa y ampicilina. Como control de la prueba se transformó GF5322*pnp::Tn5recA*::Tn10 con el plásmido pQE70 y con el plásmido pCJ11 que contiene la proteína PNPasa silvestre. Las cepas con los plásmidos se hicieron crecer por 22 horas a 30° C. El crecimiento se observa en la figura 35. Puede observarse que en GF5322*recA*::Tn10 conteniendo PNPasa y PNPasa-6xHis las colonias son pálidas mientras que las colonias de las cepas con los plásmidos pEJ02, pEJ03, pEJ04 y pEJ05 y pQE70 (Δ pnp) son rosas. Las colonias pálidas de la cepa con la proteína PNPasa-6xHis son pálidas debido a que no se acidificó el medio. Esto es por que no hubo fermentación de lactosa que debió realizarla la enzima híbrida PNPasa- β -galactosidasa. Esto sugiere que la proteína PNPasa-6xHis tiene la capacidad de unirse al ARNm de la fusión cromosomal *pnp::lacZ* impidiendo la síntesis de la proteína híbrida. Es decir que al no haber PNPasa- β -galactosidasa, la lactosa no es fermentada, y por eso no hay acidificación del medio. Lo anterior sugiere que las proteínas PNPasa y PNPasa-6xHis son capaces de autoregular su síntesis postranscripcionalmente. En la cepa control, con pQE70, y en las cepas con las proteínas mutantes: PNPasa71-6xHis, PNPasa Δ S1-6xHis, PNPasa Δ KH-6xHis y PNPasa Δ KH4bandas-6xHis, las colonias crecieron con una coloración rosa. Esto sugiere que estas enzimas no autoregulan eficientemente.

6.10. Concentración Óptima de NaCl para el Ensayo Tipo “Trampa”.

Antes de hacer los ensayos de inmunodetección, fue necesario establecer las concentraciones óptimas de NaCl para eluir las proteínas en ensayos de tipo “Trampa”. Para ello se hicieron ensayos “Trampa” utilizando diferentes

concentraciones de NaCl 100, 150, 200, 250 y 300 mM, como se describió en materiales y métodos. Los ensayos mostraron que ninguna de las concentraciones de NaCl utilizadas afectan la cantidad de proteína retenida y luego eluida de la resina de agarosa. PNPasa-6xHis no se observa en los lavados con diferente concentración de NaCl (Figura 36A) y en los eluatos se observan cantidades similares de PNPasa-6xHis (Figura 36B).

6.11. Concentración Mínima Necesaria de Imidazol para el Ensayo Tipo “Trampa”.

Se hicieron ensayos tipo “Trampa” para establecer la concentración mínima necesaria de Imidazol para eluir PNPasa. Las concentraciones de Imidazol utilizadas para eluir las proteínas fueron 50, 100, 150, 200 y 250 mM, como se detalló en materiales y métodos. Los resultados de las pruebas muestran que las concentraciones de 50, 100 y 150 de Imidazol no proporcionan una buena cantidad de PNPasa, sin embargo con una concentración de 200 mM se obtiene una cantidad muy cercana que cuando se eluye con la concentración recomendada por el fabricante del sistema de 250 mM (Figura 37B). También se observó que en prp(-) no hay elución de ninguna proteína con las concentraciones diferentes de Imidazol (Figura 37A).

6.12. Ensayos de Inmunodetección.

Los ensayos de inmunodetección se hicieron para saber qué componentes del Degradosoma se unen a PNPasa-6xHis con las condiciones utilizadas. De los ensayos de inmunodetección hechos como se detalló en materiales y métodos se observó que PNPasa-6xHis después de ser eluida de la resina (Figura 38A), puede ser detectada por el anticuerpo de conejo anti-PNPasa en una dilución de 1:25 000 (Figura 38B). Los ensayos con el anticuerpo de conejo anti-RNasa E mostraron que

la proteína RNasa E está presente en los extractos crudos en una buena cantidad. Sin embargo en el ensayo de tipo trampa, una cantidad considerable de la proteína es eluida en el primer lavado y solo se retiene una cantidad menor junto con PNPasa-6xHis, que después se eluye con Imidazol. En los resultados del ensayo de trampa para la cepa pnp(-) se observa que RNasa E no se retiene en la resina; toda la cantidad presente en el extracto se eluye en el primer lavado y no se observa nada al eluir con Imidazol. Esto sugiere que RNasa E se une a PNPasa pero las condiciones ensayadas no son las óptimas para la unión de PNPasa-6xHis y RNasa E. Lo anterior se puede observar en la figura 39A. Los ensayos con el anticuerpo de conejo anti-RhlB mostraron que la proteína está presente en el lavado hecho antes de eluir PNPasa-6xHis, y que en los eluatos de PNPasa-6xHis después de pasar por la columna la cantidad detectada es poca (Figura 39B). Estos resultados sugieren que RhlB se une a la resina de Níquel, probablemente al aumentar la cantidad de proteínas totales se obtenga un resultado más claro, también es posible que las condiciones utilizadas no sean las óptimas de unión para RhlB. Con el anticuerpo de conejo anti-Enolasa, se observó que una cantidad detectable está presente en el lavado de la resina antes de eluir PNPasa-6xHis y en los eluatos de PNPasa-6xHis se observa una señal muy débil (Figura 40). Esto sugiere que Enolasa se une a PNPasa-6xHis en una cantidad muy pequeña y es probable que las condiciones ensayadas no sean las óptimas para la unión.

7. FIGURAS DE LOS RESULTADOS

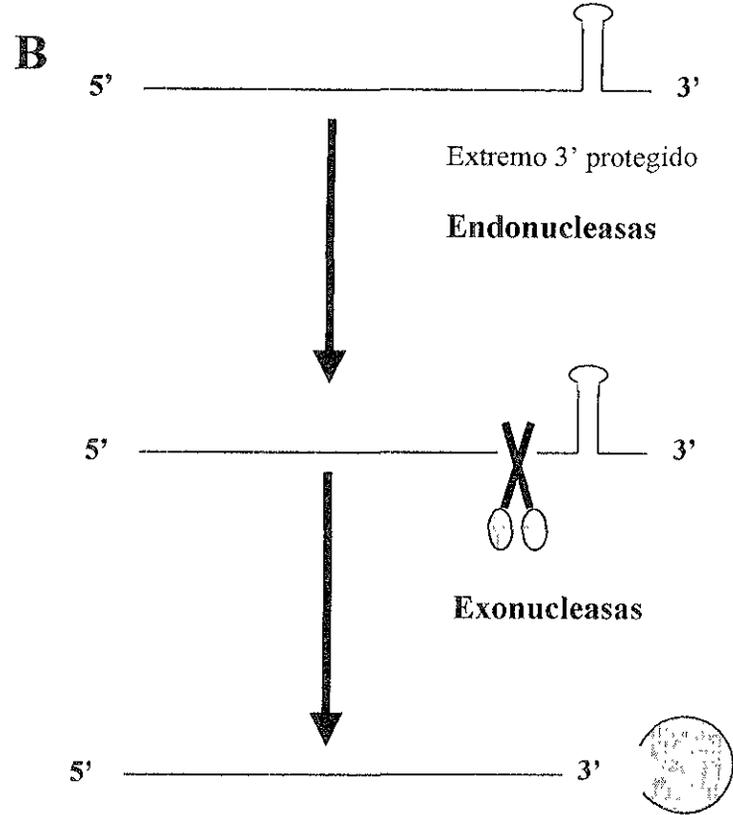
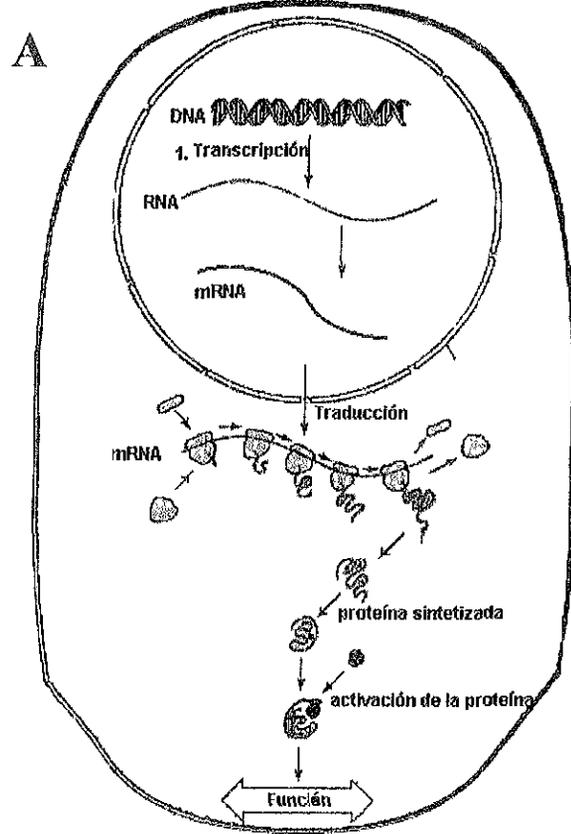


Figura 1. **A:** Esquema de traducción, transcripción y síntesis de proteínas en procariontes. Modelo modificado de Griffiths *et al* 1998. **B:** Degradación del ARNm. El “tallo-burbuja” protege al extremo 5' del ARNm del ataque de las exonucleasas. Sin embargo, las endonucleasas (tijeras) cortan en la región anterior al tallo-burbuja creando un extremo 3' libre que puede ser atacado fácilmente por las exonucleasas. Modelo basado en el de Carpousis *et al* 1999.

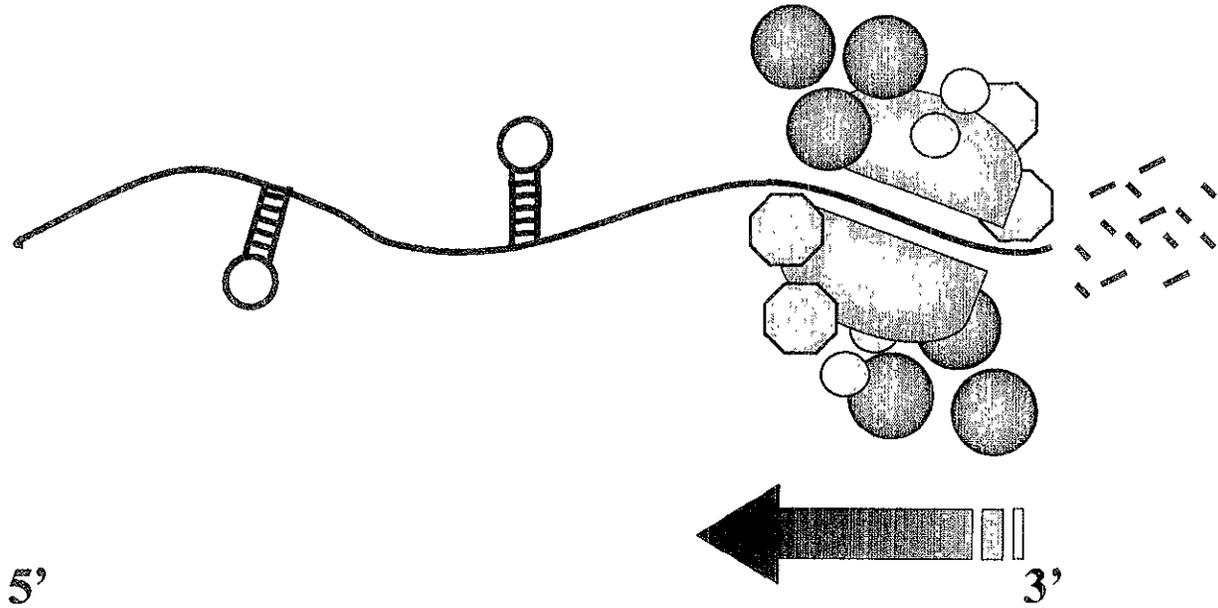


Figura 2. Modelo del Degradósoma de *Escherichia coli*. Las dos figuras elipsoides representan a las dos subunidades de RNasaE. Los seis círculos de color obscuro son dos trímeros de PNPasa, los octágonos representan dos dímeros de helicasa y los círculos más pequeños representan dos dímeros de enolasa. Los dibujos no están hechos a escala. Modelo basado en el de Coburn and Mackie 1999.

PNPasa

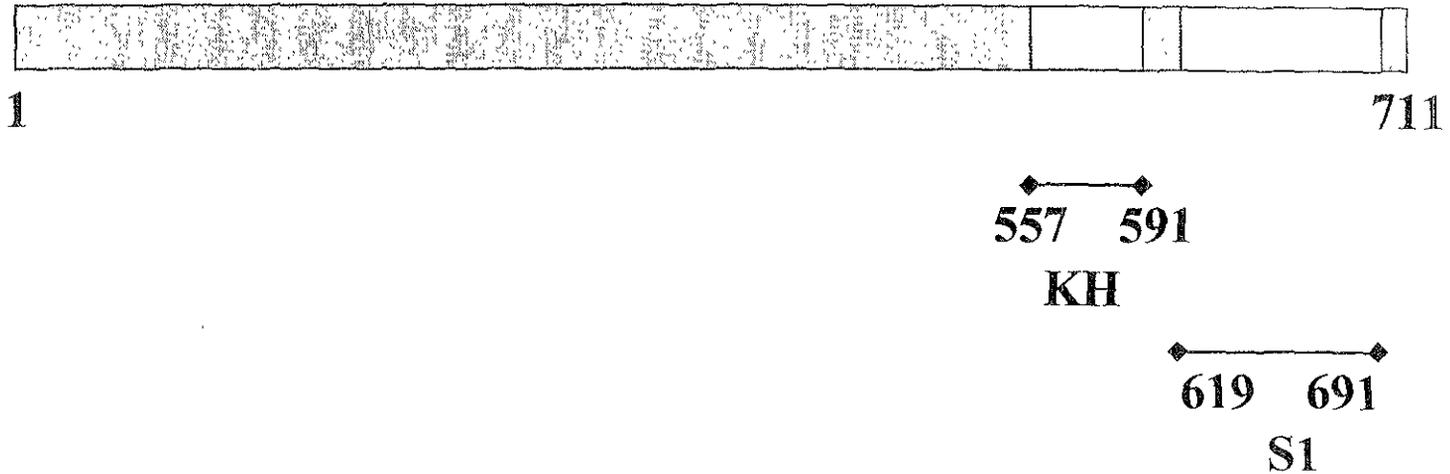


Figura 3. Esquema del gen de PNPasa de *Escherichia coli* en el que se muestran los dominios KH y S1. Los números indican el número de los aminoácidos.

Iniciador Sentido 32-mer(PNPasa)

Sitio SphI

5'- TAT ACA gCA TgC TTA ATC CgA TCg TTC gTA AA -3'

Inicio Traducción

Iniciador Antisentido 50-mer(PNPasa2)

Sitio BamHI His His His His His His

5'- ACC ggA TCC TTA gTg ATg gTg ATg gTg ATg CTC gCC CTg TTC

Término Traducción

AgC AgC Cg -3'

Iniciador Sentido 28-mer(Kpn01)

Sitio KpnI

5'- ggg gTA CCg CAg AAA TCg AAg TTg gCC g -3'

Iniciador Antisentido 28-mer(Kpn02)

Sitio KpnI

5'- ggg gTA CCg TCg gTC gCT gCA ATC TTC A -3'

Figura 4. Secuencia de los iniciadores utilizados en la amplificación de PNPasas.

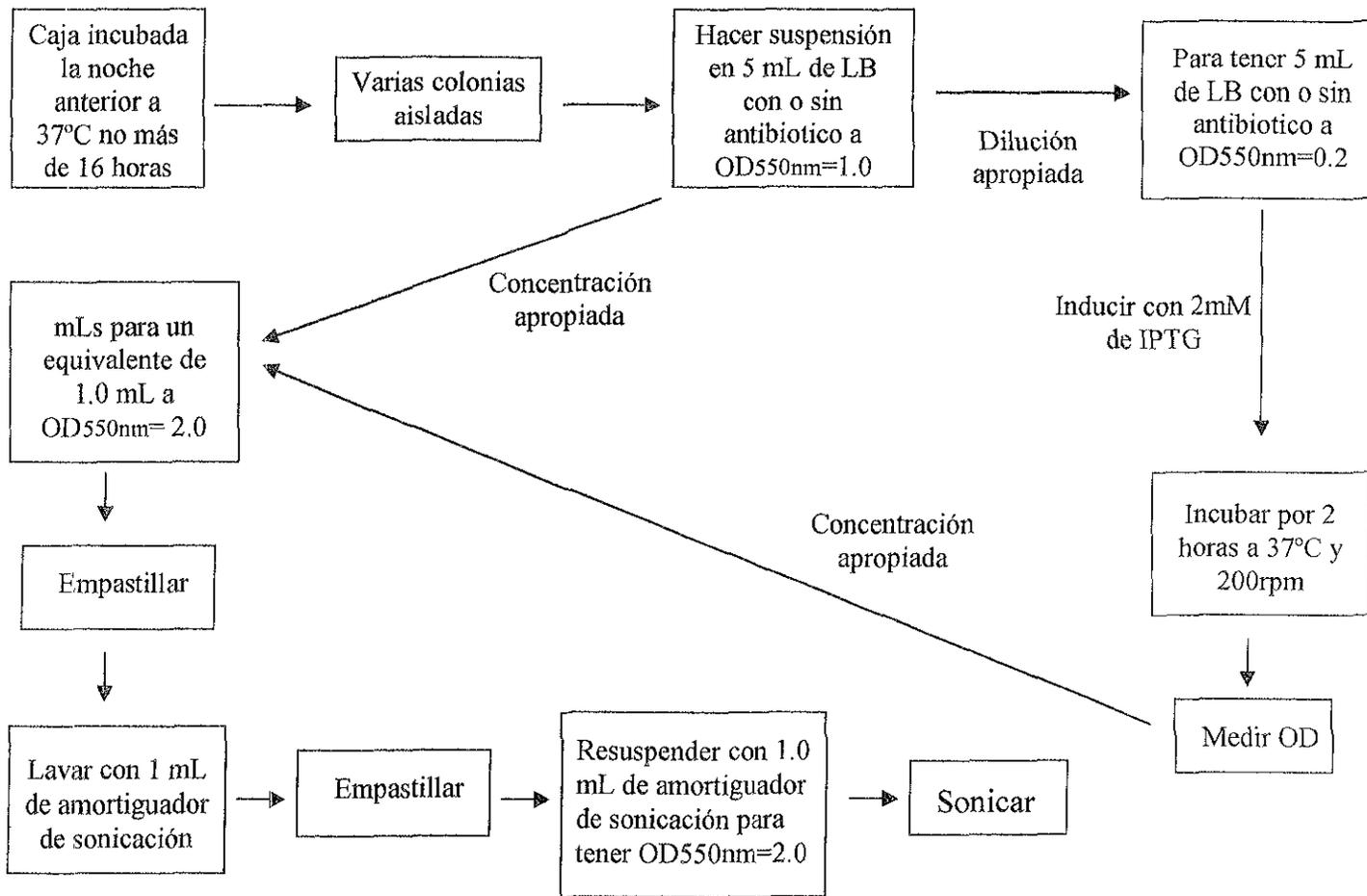
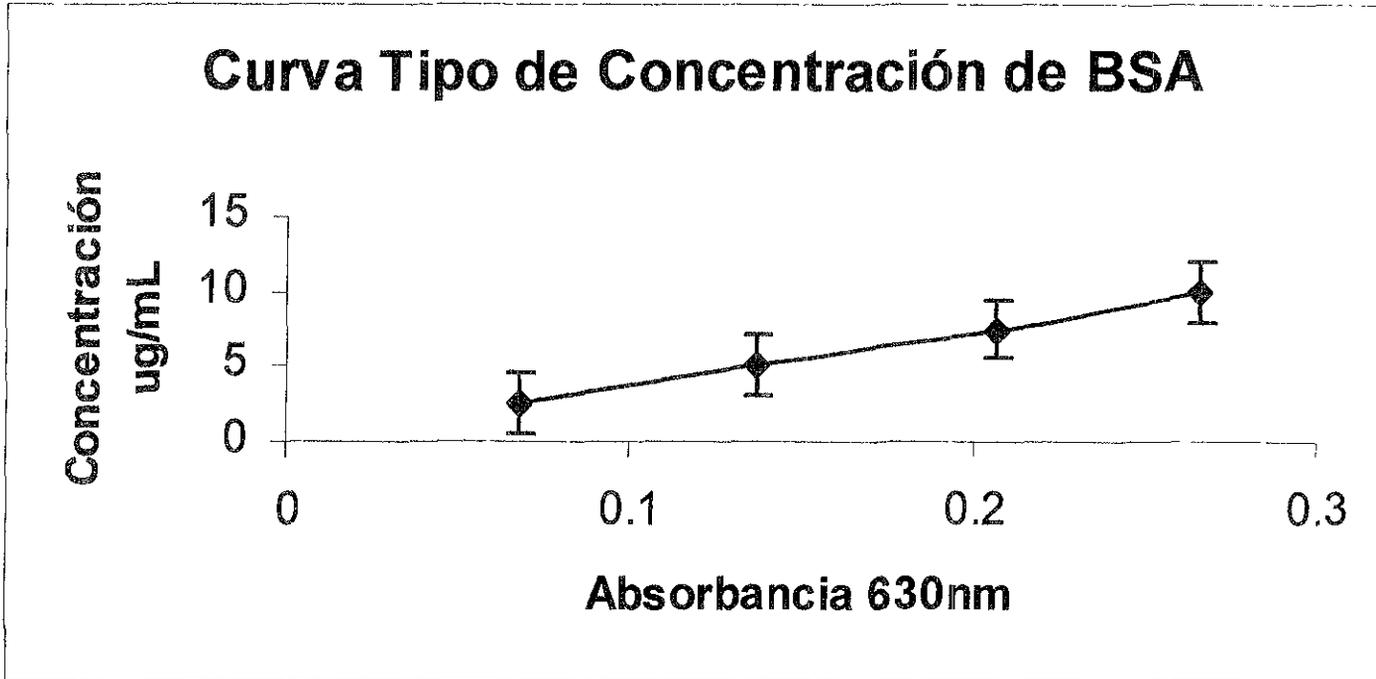


Figura 5. Esquema del ensayo de inducción de proteínas.



$r = 0.98874814$

$S = 0.59130572$

$n = 11$

Figura 6. Curva tipo de concentración de Albúmina Sérica Bovina.

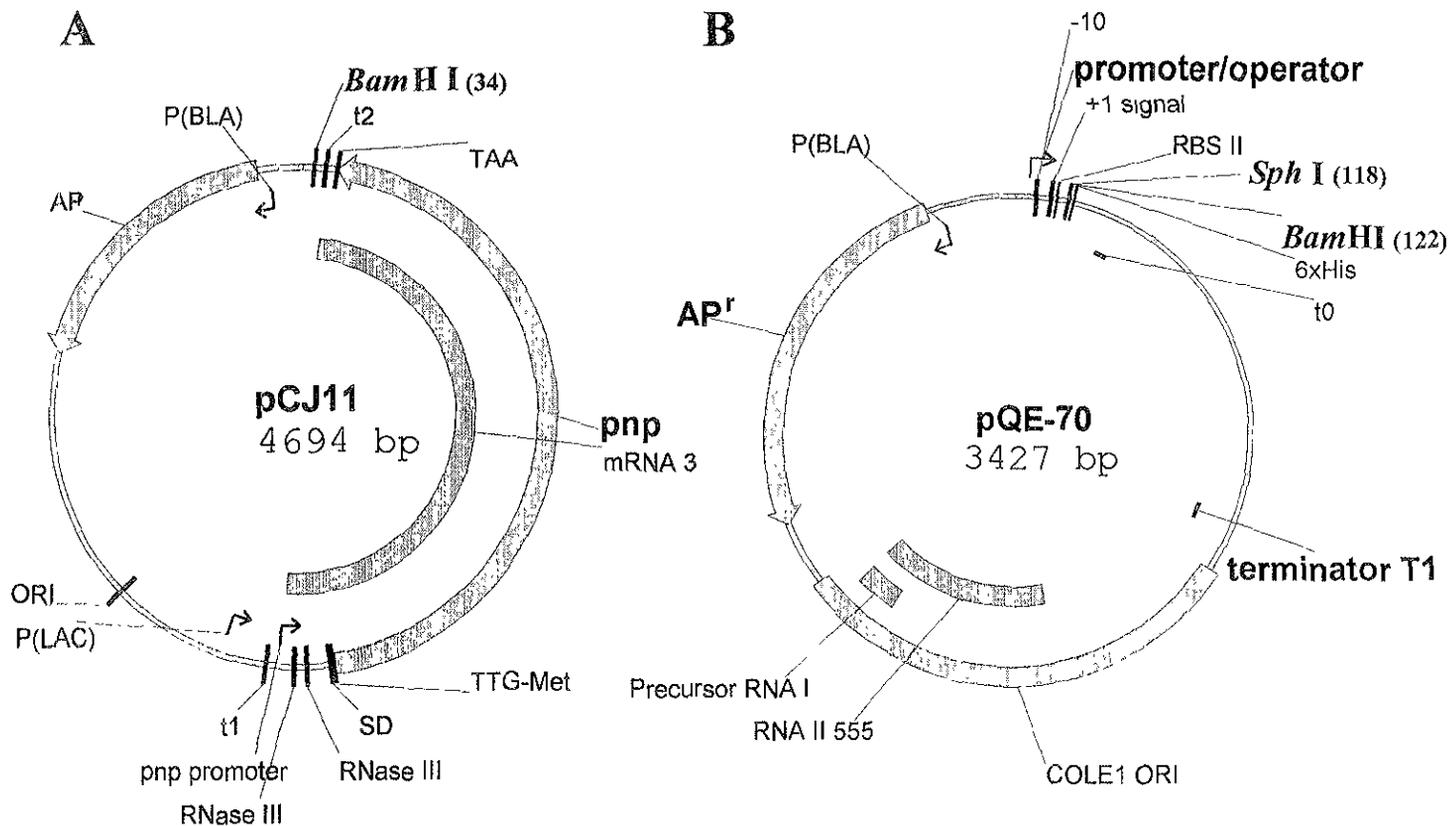


Figura 7. A: Plásmido pCJ11 del que se obtuvo el fragmento de *pnp* amplificado por PCR. B: Plásmido pQE70 recipiente del fragmento amplificado de *pnp* por PCR en los sitios SphI y BamHI.

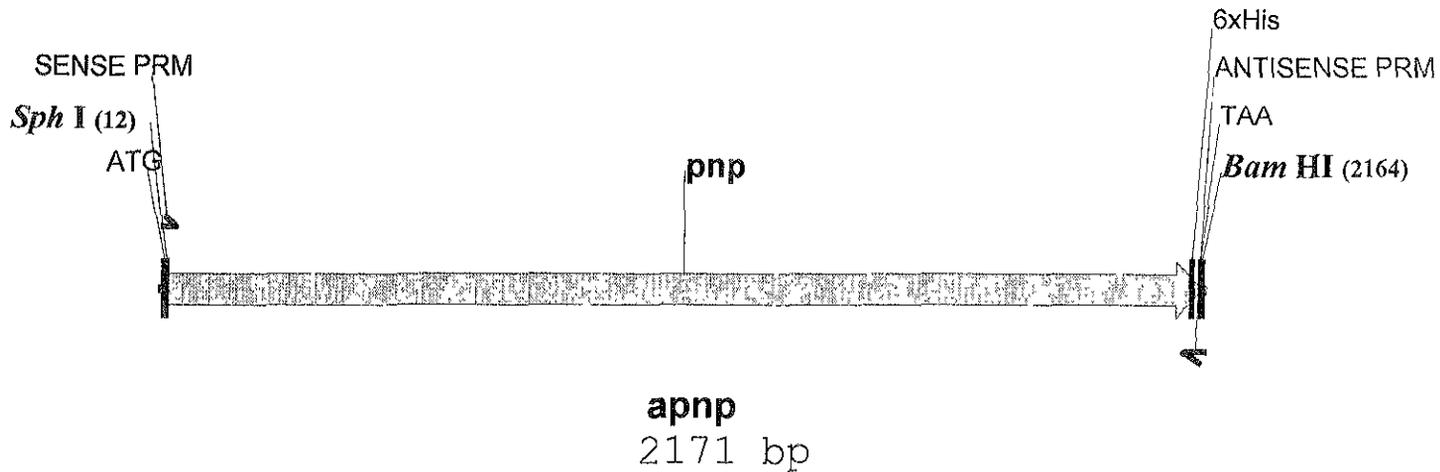


Figura 8. Fragmento de *pnp* amplificado por PCR. Flanqueado por sitios *Sph*I y *Bam*HI. Este *cistrón* contiene todos los aminoácidos de PNPasa mas las seis histidinas.

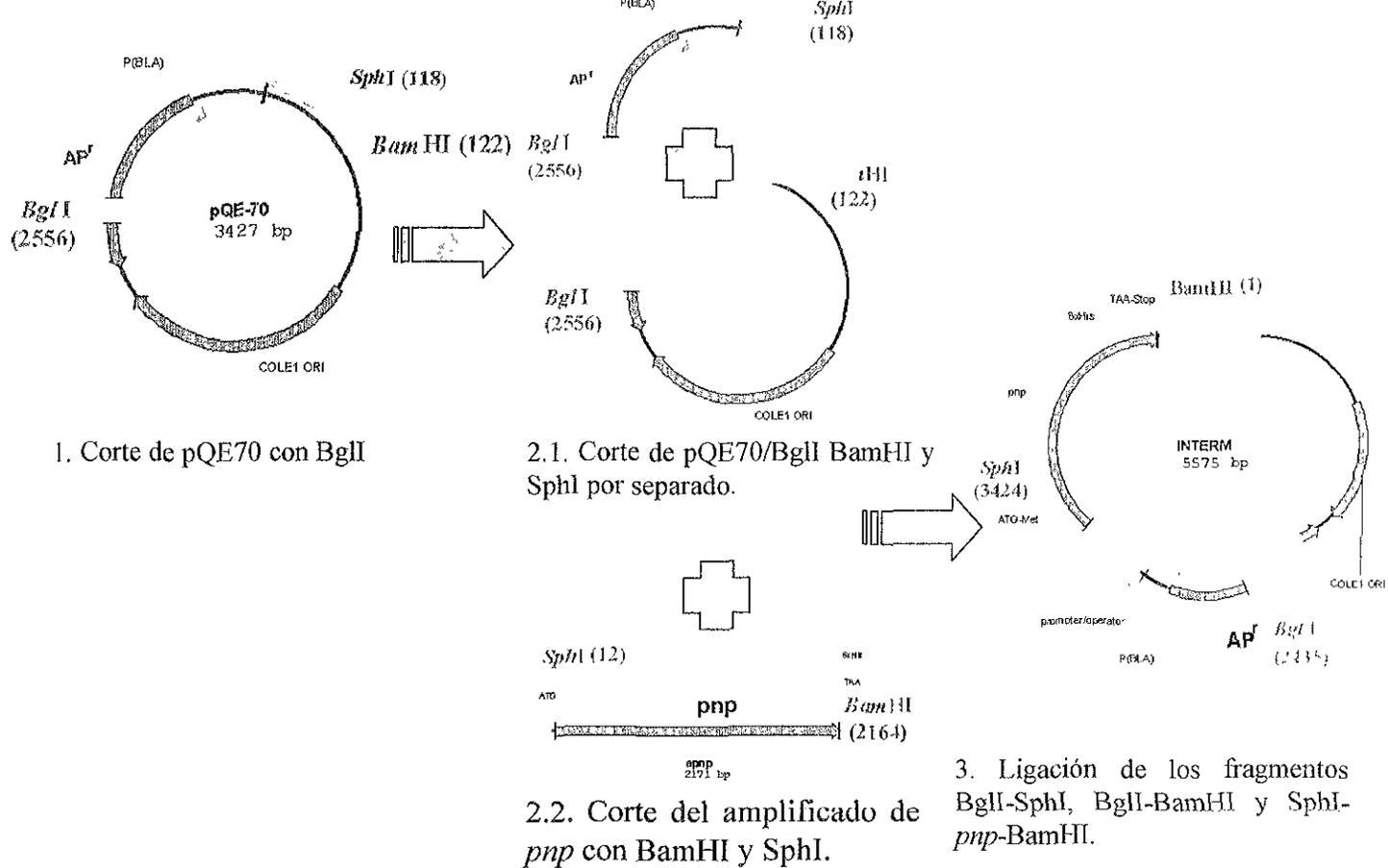


Figura 9. Construcción del pIntermediario a partir de pQE70 y el amplificado de pnp.

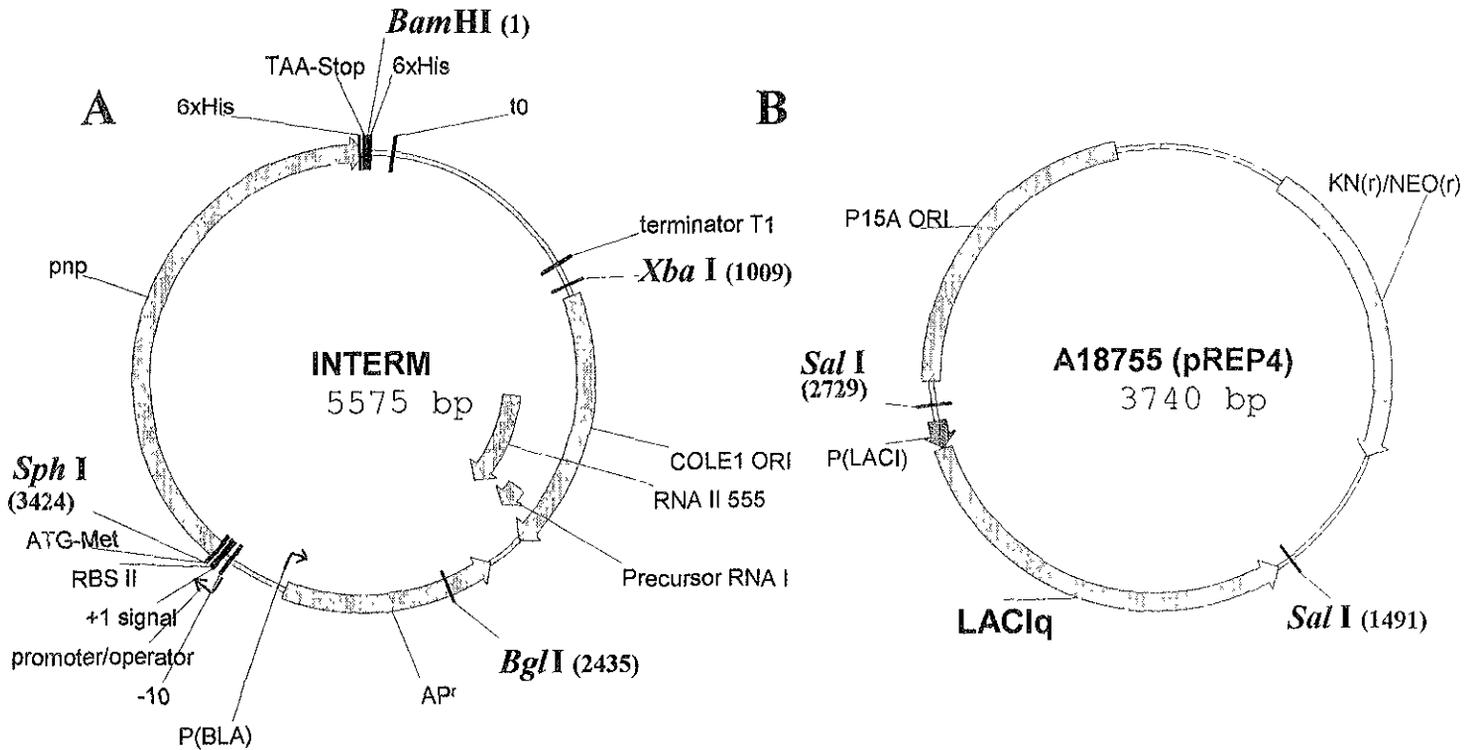


Figura 10. **A:** Plásmido pIntermediario que contiene el gen de *pnp* es recipiente del fragmento LacIq por un corte en el sitio *Xba*I. **B:** Plásmido pREP4 que codifica el gen de LacIq que regula la transcripción de PNPasa y del que se obtendrá el fragmento LacIq con un corte con la enzima *Sal*I.

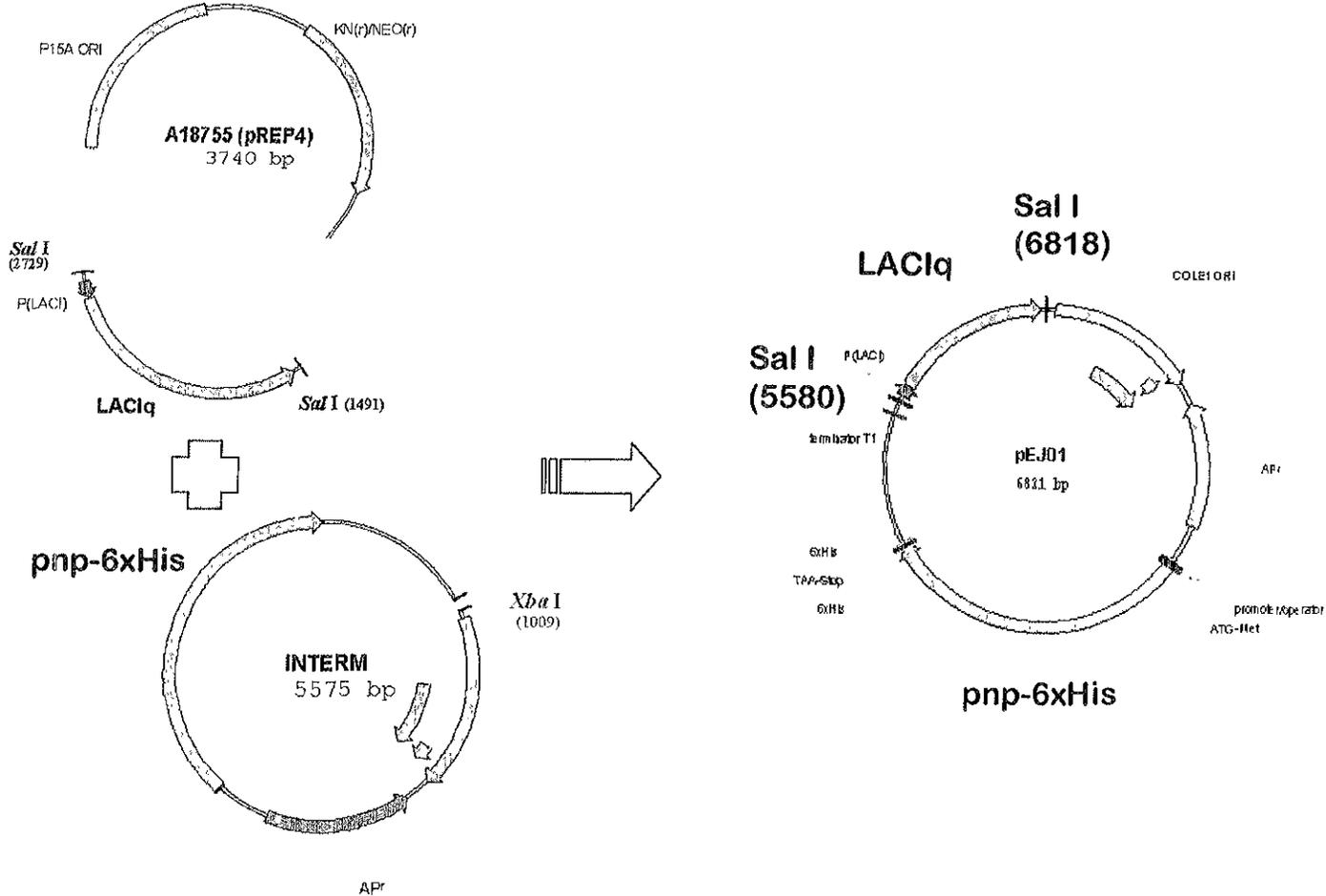


Figura 11. Construcción de pEJ01 a partir de pIntermediario y pREP4.

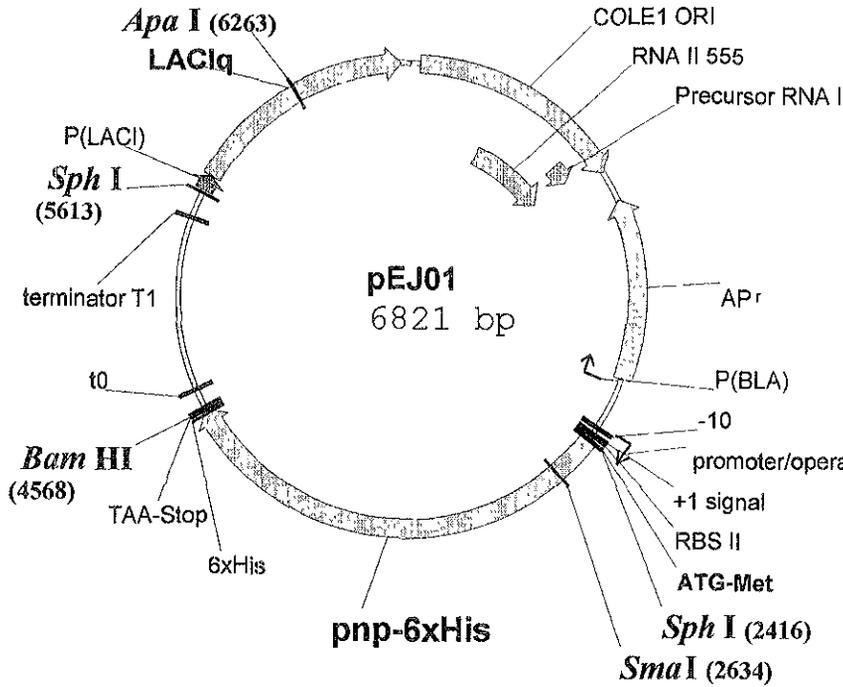
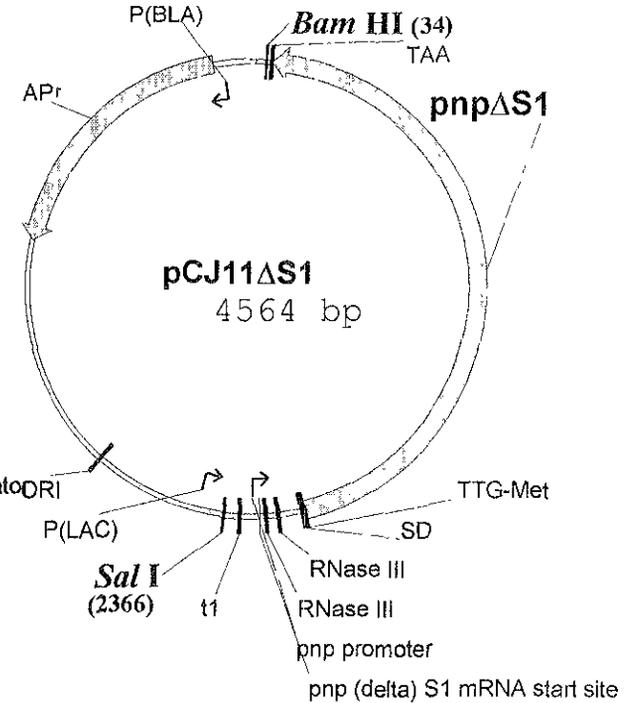
A**B**

Figura 12. **A:** Plásmido pEJ01 que contiene el gen codificante de la proteína PNPasa-6xHis y el fragmento LacIq que regula su transcripción. **B:** Plásmido pCJ11ΔS1 del que se obtuvo el gen de *pnpΔS1* por PCR.

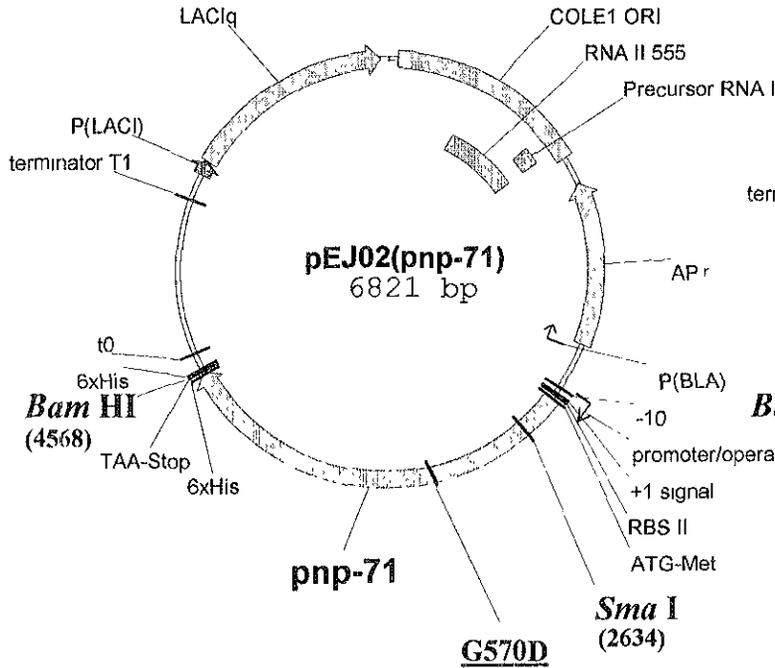
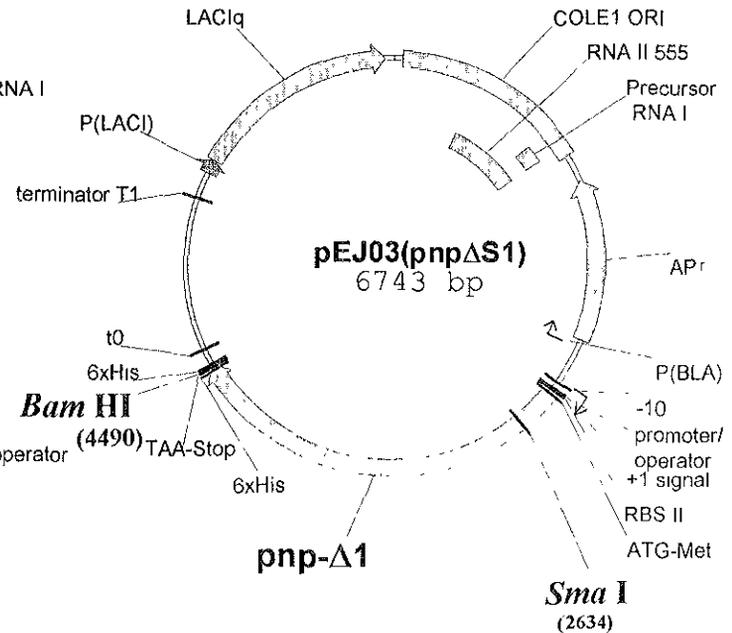
A**B**

Figura 13. A: Plásmido pEJ02 que contiene el gen codificante de la proteína PNPasa71-6xHis. B: Plásmido pEJ03 que contiene el gen codificante de la proteína PNPasa Δ S1-6xHis.

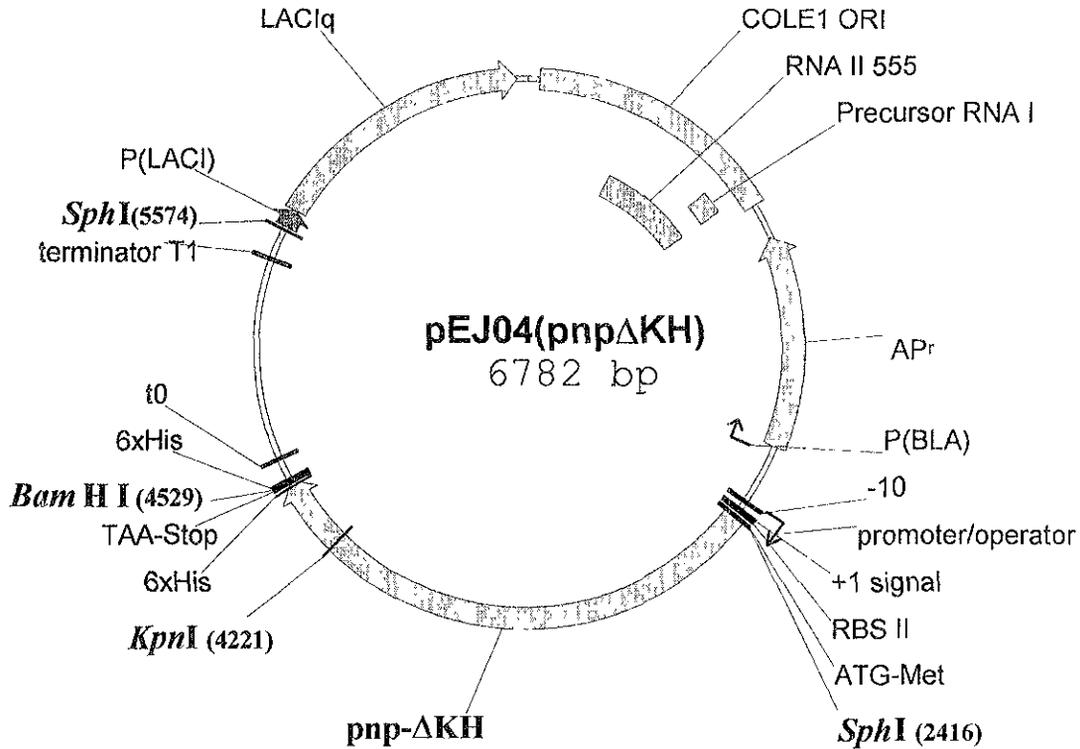


Figura 14. Plásmido pEJ04 que contiene el gen codificante de la proteína PNPasa Δ KH-6xHis.

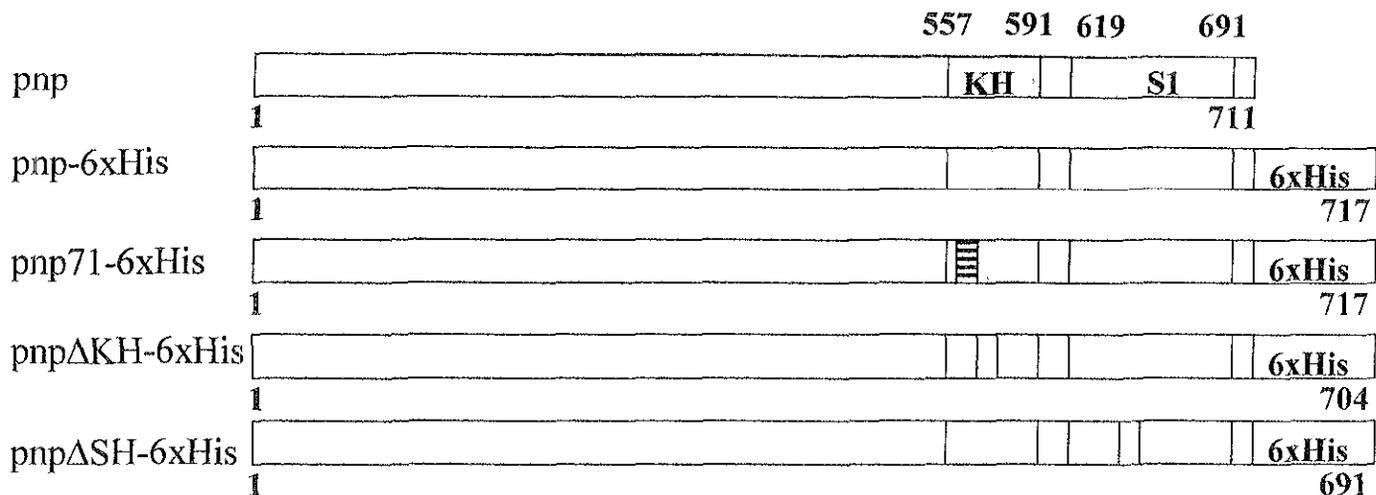


Figura 15. Esquema que muestra las diferencias entre las proteínas construidas, el número de aminoácidos de cada una. Los residuos de aa donde inician y terminan los dominios KH y S1 están indicados con los números correspondientes. El primer dibujo muestra a PNPasa silvestre. El segundo dibujo muestra a PNPasa-6xHis con 6 histidinas al final de la proteína. El tercer dibujo muestra a PNPasa71-6xHis, en el dominio KH está la mutación en el aminoácido 570 (líneas transversales). El siguiente dibujo muestra a PNPasaΔKH-6xHis, el espacio vacío en el dominio KH corresponde a la eliminación de 13 aa. El último dibujo muestra a PNPasaΔS1-6xHis, el espacio vacío en el dominio S1 corresponde a la eliminación de 26 aminoácidos. Los dibujos no están hechos a escala.

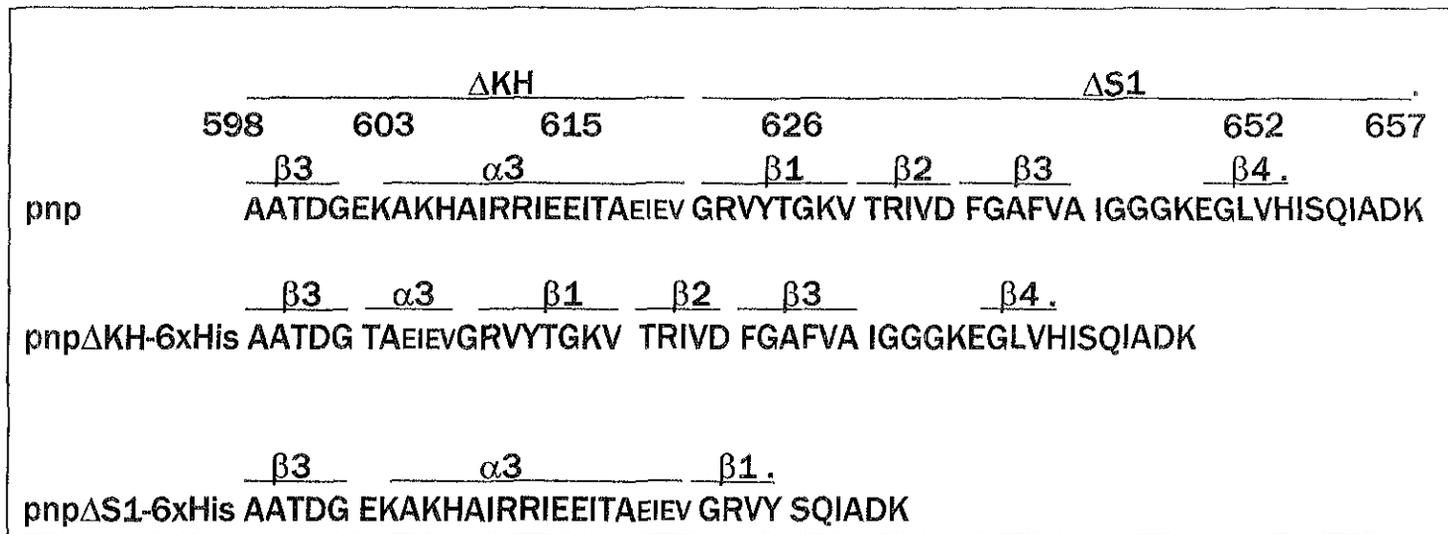


Figura 16. Esquema que muestra las diferencias en la secuencia teórica de los aminoácidos entre las proteínas construidas. Se muestra una porción final del dominio KH (598-617) y una porción inicial del dominio S1 (622-657). La primera secuencia corresponde a la proteína PNPasa silvestre que sirve como referencia para las eliminaciones. En la secuencia de la proteína PNPasaΔKH-6xHis se muestra con una línea los 13 aa eliminados. Estos aa corresponden a la tercera hélice α del dominio. En la secuencia de la proteína PNPasaΔS1-6xHis se eliminaron 26 aa que se representan con una línea. Se eliminó la parte final de la primera cadena β , así como la segunda y tercera cadenas β y una porción inicial de una pequeña hélice α del dominio S1 (Bycroft *et al*, 1997).

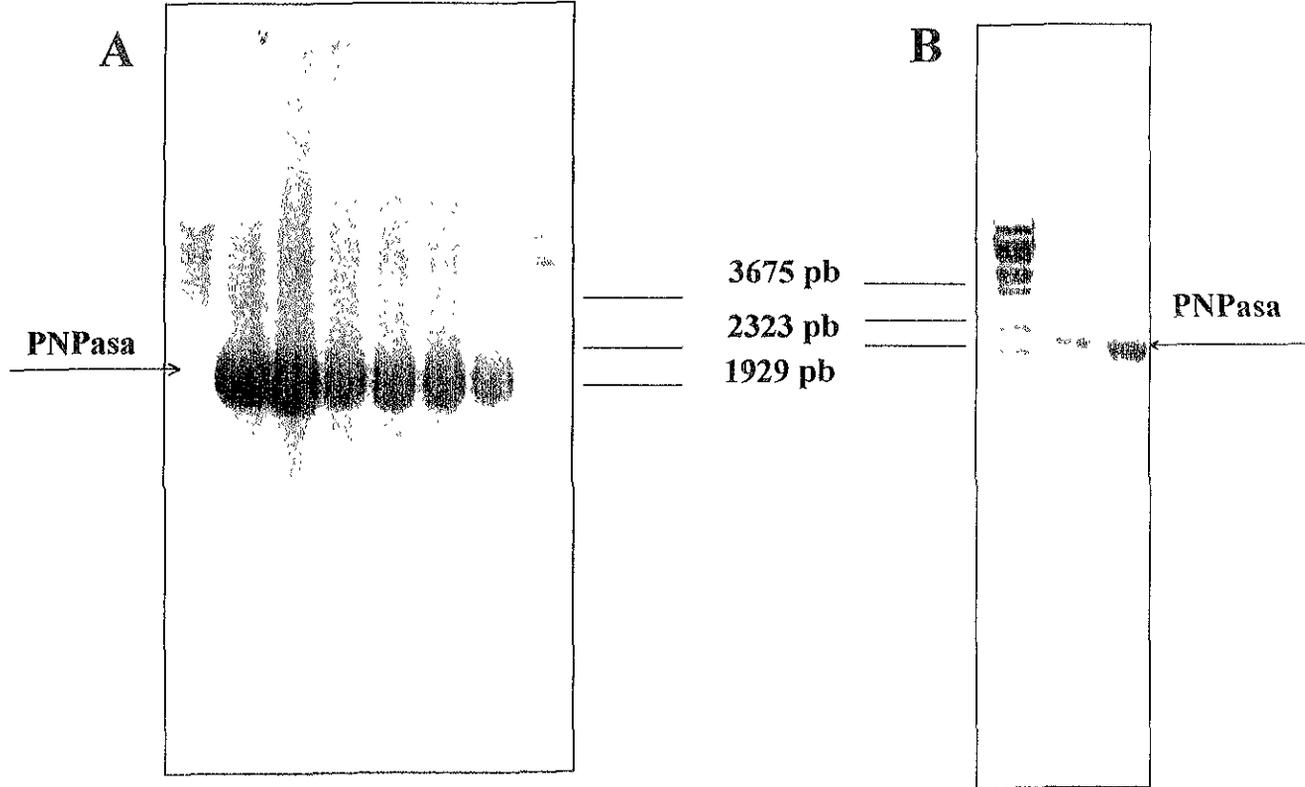


Figura 17. **A:** Análisis de productos de PCR en gel de Agarosa al 1%: Se establecieron las condiciones óptimas para amplificar PNPasa-6xHis, Carriles: 1 y 8 marcador de peso molecular Lambda/BstEII. Carriles 2, 3, 4, 5, 6 y 7 ADN amplificado con 1.5, 3.0, 4.5, 6.0, 7.5 y 9.0 mM de MgCl₂, respectivamente. **B:** Amplificado del PNPasa-6xHis a 3.0 mM de MgCl₂, Carriles: 1 marcador de peso molecular Lambda/BstEII, 2 y 3, 1 y 2 uL de producto de PCR, respectivamente. El peso molecular del amplificado es de 2171 pb.

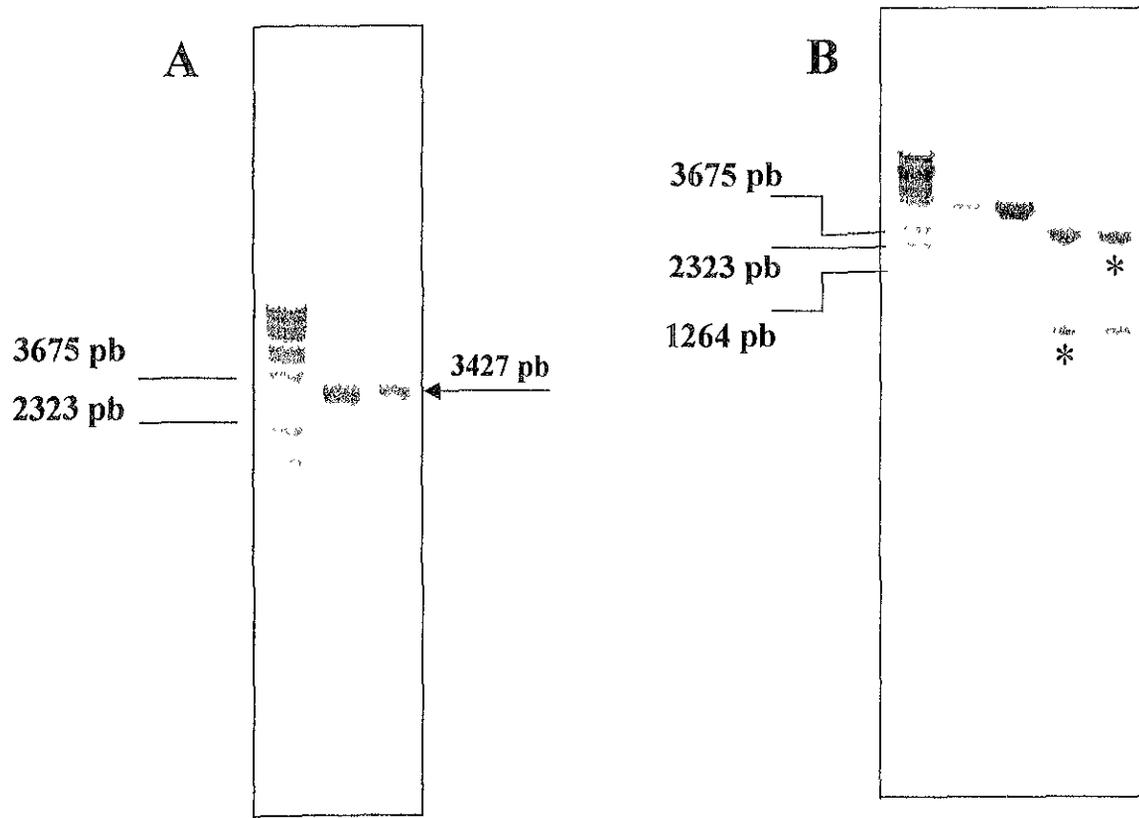


Figura 18. A: Corte de pQE70 con la enzima BglI en gel de Agarosa al 1%. Carriles: 1 marcador de peso molecular Lambda/BstEII; 2. pQE70 sin corte y 3. pQE70/BglI de 3427 pb. B: Obtención de los fragmentos para clonación. Carriles: 1. marcador de peso molecular Lambda/BstEII; 2. pQE70, 3. pQE70/BglI de 3427 pb(lineal); 4. pQE70/BglI-SphI de 989 pb (*) y 5. pQE70/BglI-BamHI de 2343 pb (*).

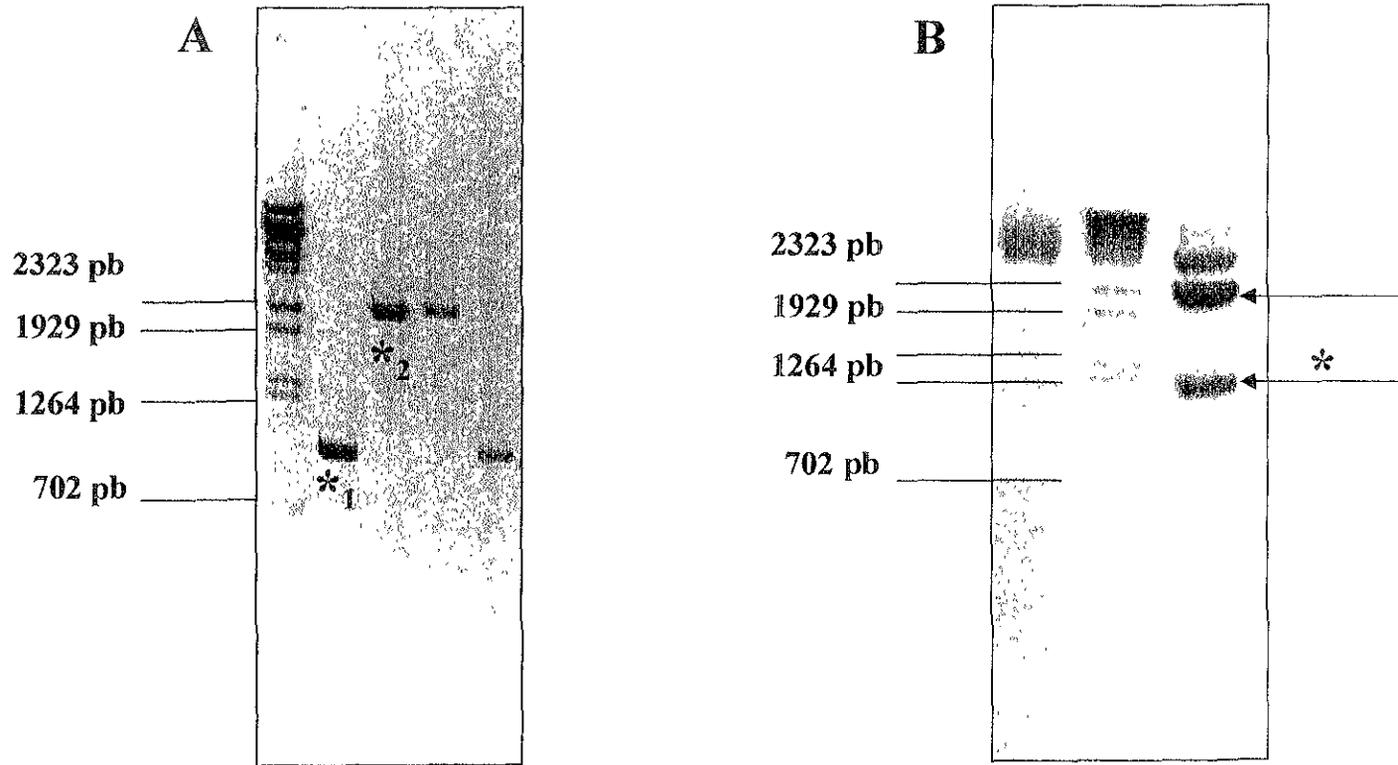


Figura 19. **A:** Fragmentos purificados para clonar en gel de Agarosa 1%. Carriles: 1. marcador de peso molecular Lambda/BstEII, 2. fragmento de 989 pb BglI-SphI (*1), 3. fragmento de 2434 pb BglI-BamHI, 4 y 5 fragmentos restantes de 2438 pb BglI-SphI y de 993 pb BglI-BamHI respectivamente. **B:** Corte de pREP4 con la enzima SalI. Carriles: 1. pREP4, 2. marcador de peso molecular Lambda/BstEII y 3. pREP4/SalI (*). El fragmento requerido es de 1238 pb.

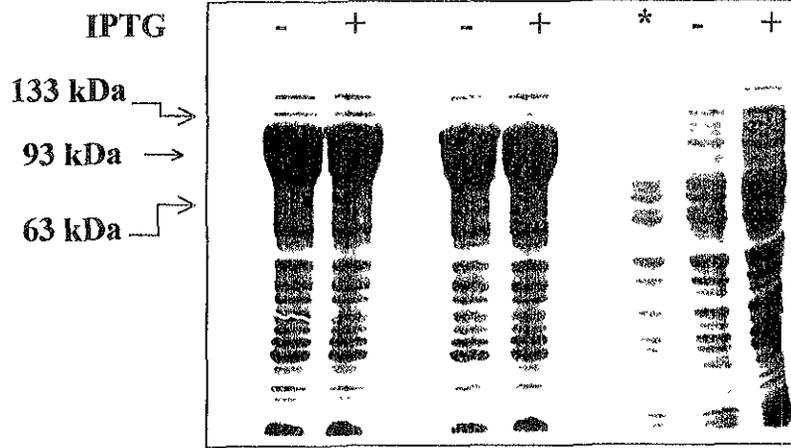
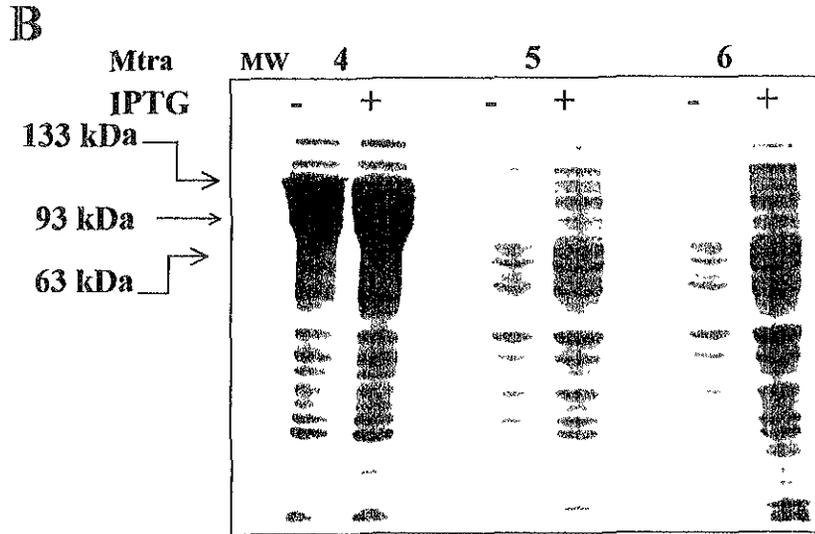


Figura 20. Tinción de azul Coomassie. PAGE-SDS (10%) con los extractos crudos de las proteínas solubles con y sin inducción de las cepas candidato DH5 α /pREP4 conteniendo el vector que expresa PNPasa-6xHis. * Contaminación de la muestra 3.



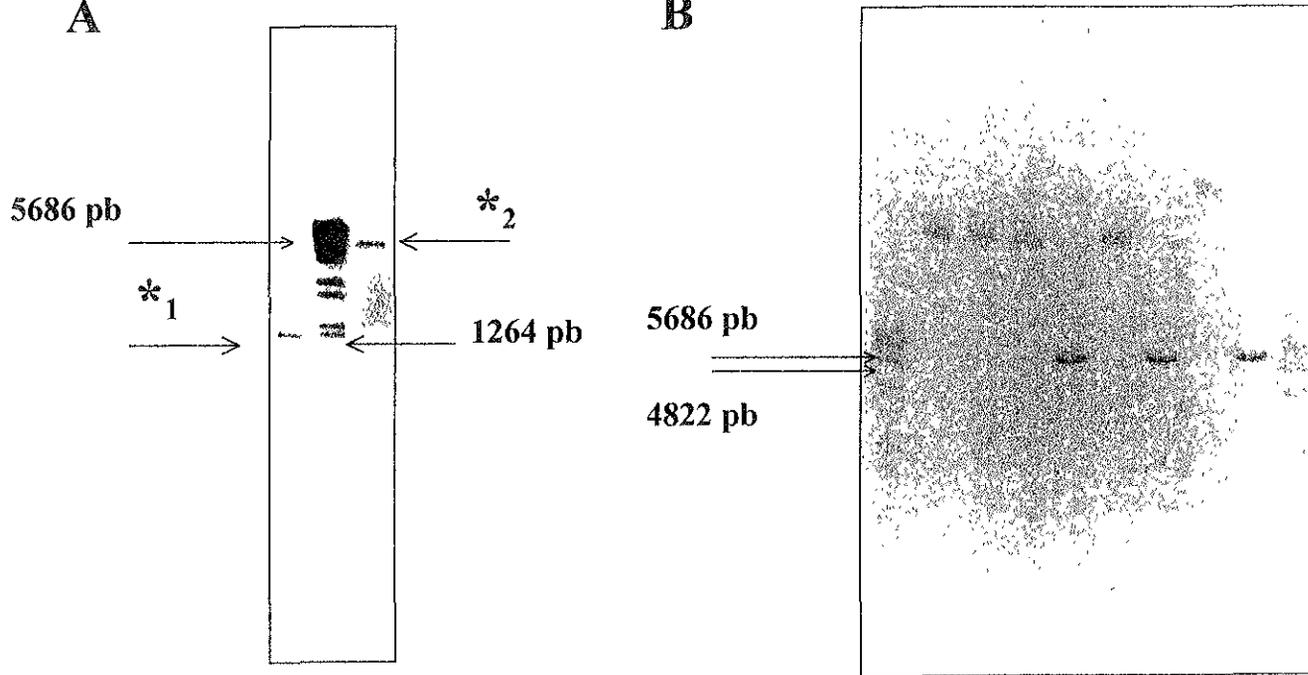


Figura 21. Construcción del plásmido pEJ01. **A:** Fragmentos purificados listos para la ligación en gel analítico de Agarosa al 1%. Carriles: 1. fragmento purificado de 1298 pb que contiene el gen codificante de *lacIq* (*1), procedente del corte de pREP4 con *Sall*; 2. marcador de peso molecular Lambda/*BstEII*; 3. pIntermediario restringido con *XbaI* para linearizarlo de 5575 pb (*2). **B:** Gel con el ADN de los plásmidos candidato de las cepas DH5 α pEJ01 linearizado (6821 pb) con *ApaI* para identificar a la clona positiva. Carriles: 1 y 10 marcador de peso molecular Lambda/*BstEII*; 2. candidato4; 3. candidato4/*ApaI*; 4. candidato6; 5. candidato 6/*ApaI*; 6. candidato7; 7. candidato7/*ApaI*; 8. candidato12; 9. candidato12/*ApaI*.

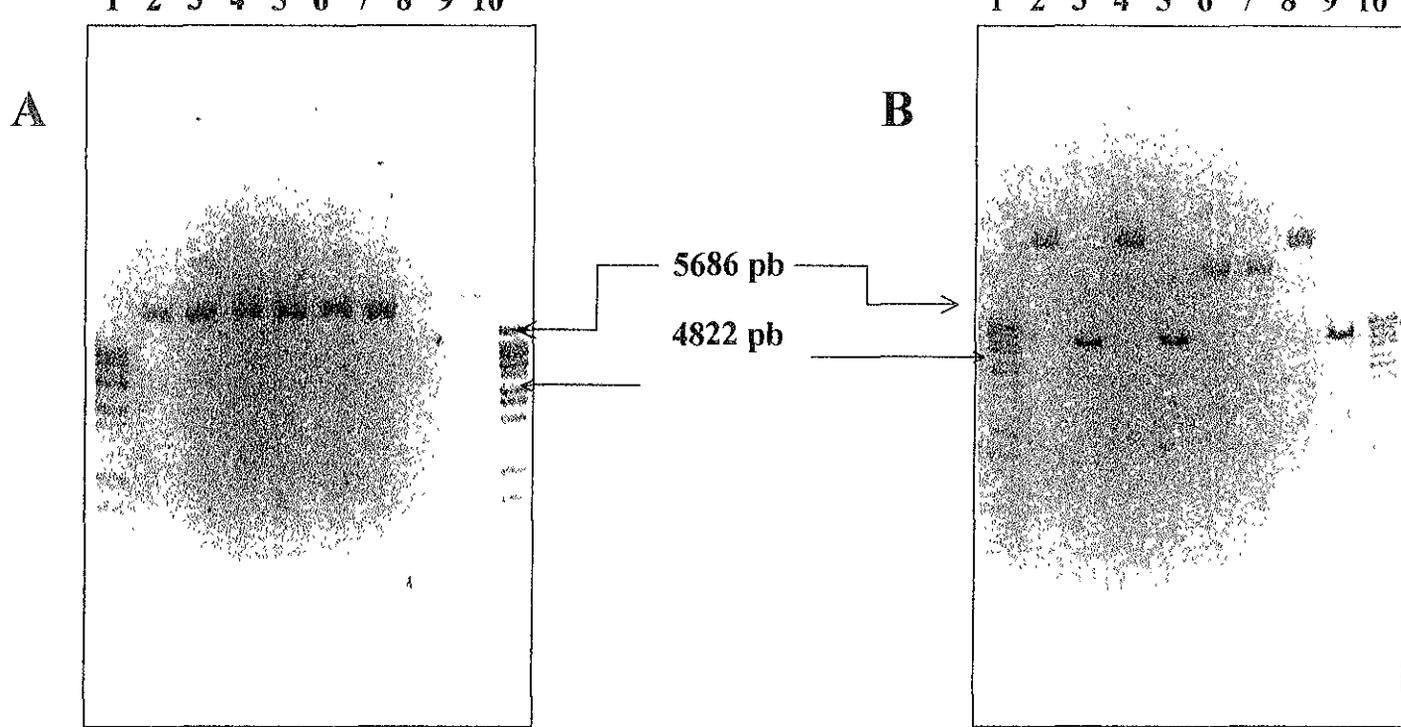


Figura 22. Geles analíticos de Agarosa al 1% donde se muestra el ADN de los plásmidos candidato de las cepas DH5 α pEJ01 linearizado (6821 pb) con ApaI para identificar a las clonas positivas. **A.** Carriles: 1 y 10 marcador de peso molecular Lambda/BstEII; 2. candidato13; 3. candidato13/ApaI; 4. candidato14; 5. candidato14/ApaI; 6. candidato2; 7. candidato2/ApaI; 8. candidato8; 9. candidato 8/ApaI. **B.** Carriles: 1 y 10 marcador de peso molecular Lambda/BstEII; 2. candidato10; 3. candidato10/ApaI; 4. candidato18; 5. candidato18/ApaI; 6. candidato19; 7. candidato19/ApaI; 8. candidato20; 9. candidato20/ApaI.

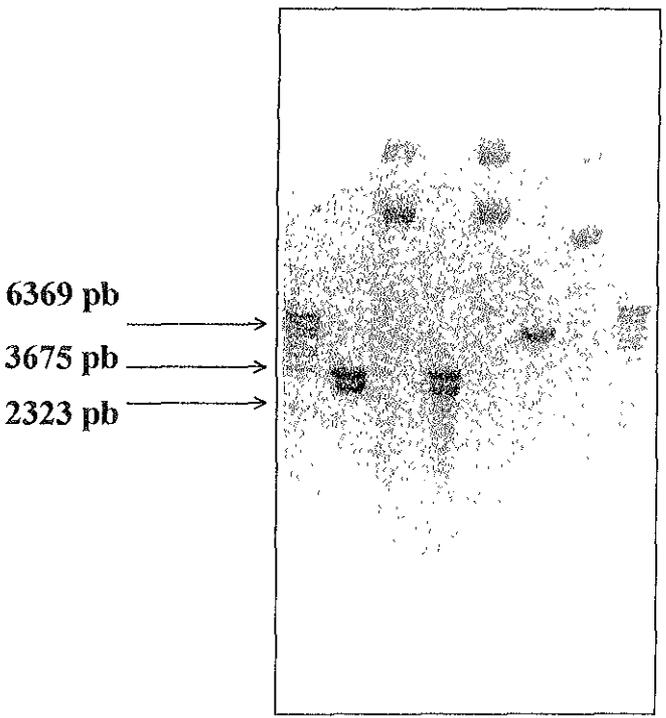
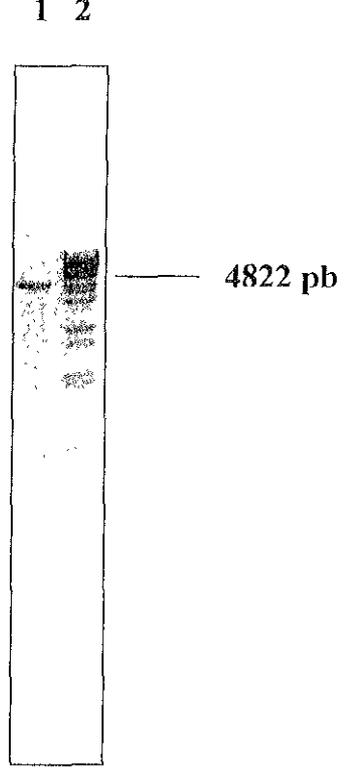
A**B**

Figura 23. **A:** Gel analítico de Agarosa al 1% donde se muestra el ADN de los plásmidos candidato de las cepas N99pnp::Tn5 pEJ01 restringido con SphI para identificar la orientación del inserto de PNPasa-6xHis. Carriles: 1 y 8 marcador de peso molecular Lambda/BstEII; 2. candidato6/SphI; 3. candidato 6; 4. candidato10/SphI; 5. candidato10; 6. candidato2/SphI; 7. candidato2. **B:** Fragmento del plásmido pEJ01 cortado y purificado con BamHI y SmaI listo para clonar. Carriles 1. pEJ01/BamHI-SmaI fragmento de 4887 pb; 2. marcador de peso molecular Lambda/BstEII.

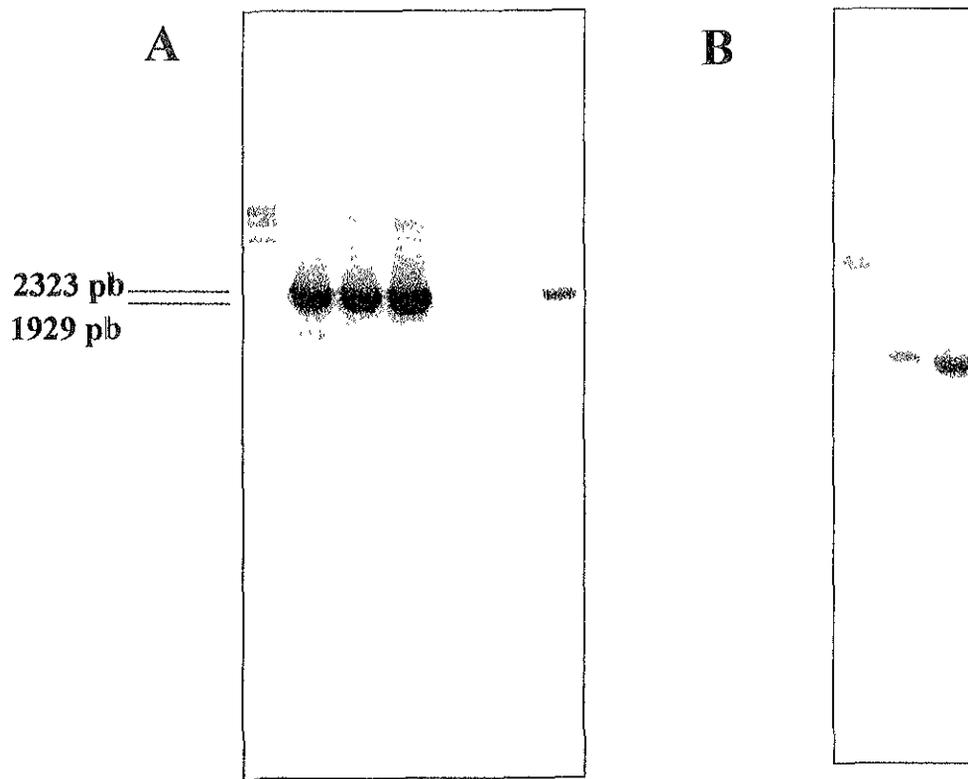


Figura 24. Geles de agarosa al 1% **A**: Análisis de los productos de PCR para los fragmentos PNPasa Δ S1-6xHis y PNPasa71-6xHis. Carriles: 1 marcador de peso molecular Lambda/BstEII, 2, 3 y 4 amplificado de PNPasa Δ S1-6xHis de 2093 pb, 5, 6, y 7 amplificados de PNPasa71-6xHis de 2171 pb. **B**: Análisis de los amplificados PNPasa Δ S1-6xHis y PNPasa71-6xHis cortados con BamHI y SphI. Carriles: 1 marcador de peso molecular Lambda/BstEII, 2, PNPasa71-6xHis/BamHI-SphI (1934 pb), 3, PNPasa Δ S1-6xHis/BamHI-SphI (1856 pb).

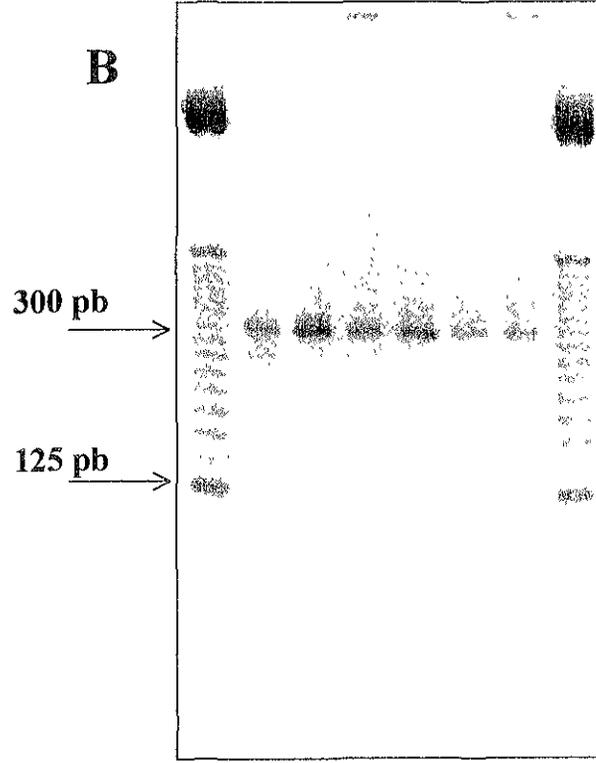
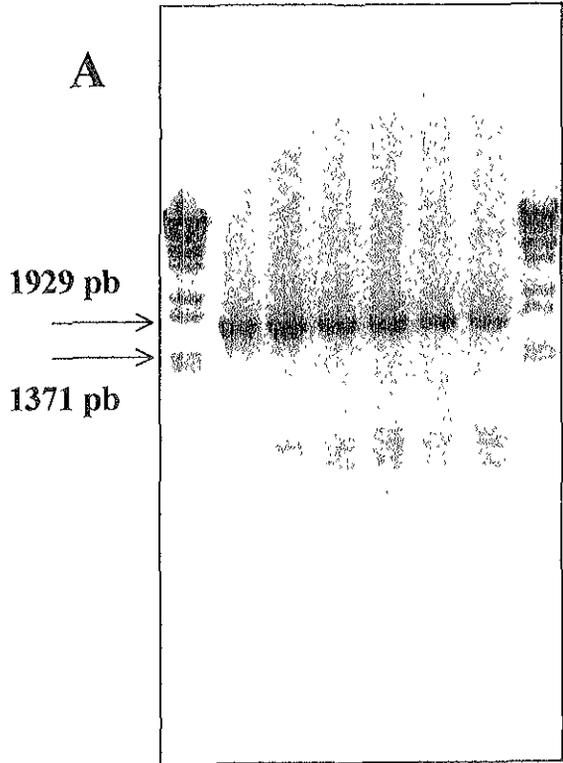


Figura 25. **A:** Análisis de productos de PCR para el fragmento 1 de PNPasa Δ KH-6xHis. Gel de Agarosa al 1 %. Carriles: 1. y 8. marcador de peso molecular Lambda/BstEII, 2, 3, 4, 5 y 6 amplificados de 1807 pb, a 1.5, 3.0, 4.5, 6.0, 7.5 y 9.0 mM de MgCl₂, respectivamente. **B:** Análisis de productos de PCR para el fragmento 2 de PNPasa Δ KH-6xHis en gel de agarosa al 2%. Carriles: 1. y 8. marcador de peso molecular escalera de 25 pb, 2, 3, 4, 5 y 6 amplificados de 313 pb, a 1.5, 3.0, 4.5, 6.0, 7.5 y 9.0 mM de MgCl₂, respectivamente.

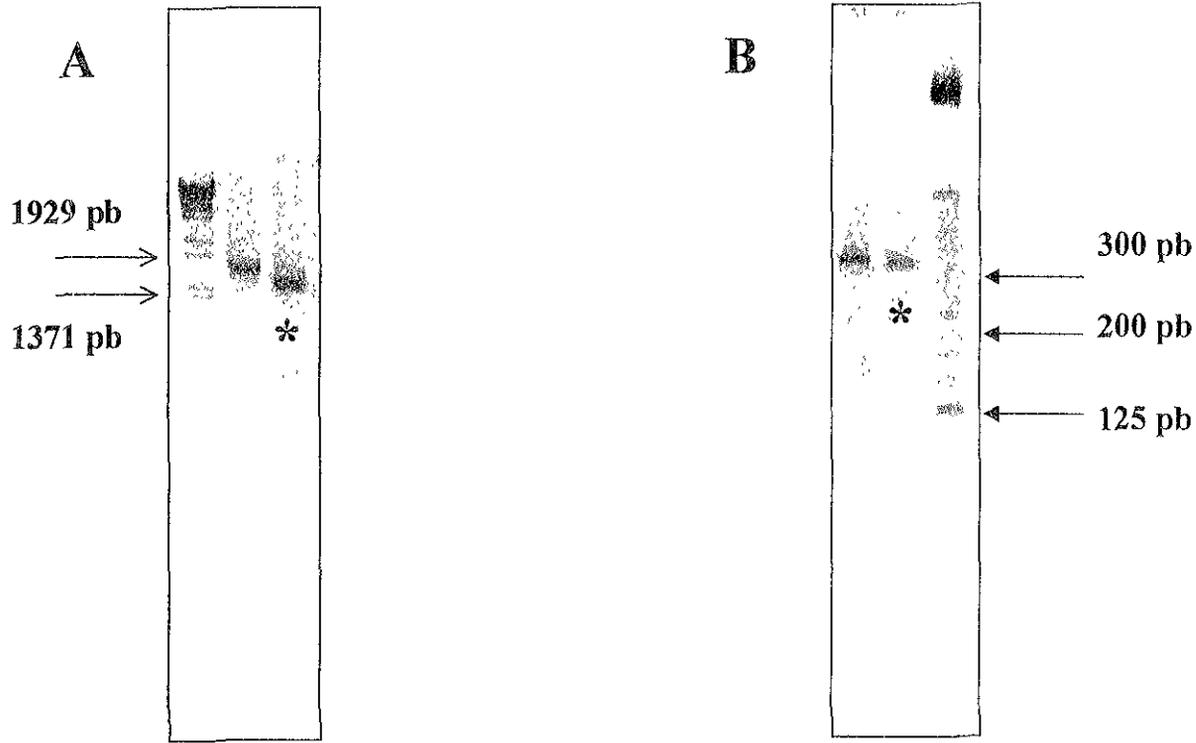


Figura 26. Análisis de los amplificadores 1 y 2 de PNPasa Δ KH-6xHis cortados con KpnI, BamHI y SmaI en geles de Agarosa al 1 y 2%. **A:** Carriles: 1. marcador de peso molecular Lambda/BstEII, 2. fragmento PNPasa Δ KH1-6xHis, 3. (*)fragmento PNPasa Δ KH1-6xHis/KpnI-BamHI de 1584 pb. **B:** Carriles: 1. PNPasa Δ KH2-6xHis, 2. (*)PNPasa Δ KH2-6xHis/KpnI-SmaI de 307 pb, 3. escalera de 25 pb.

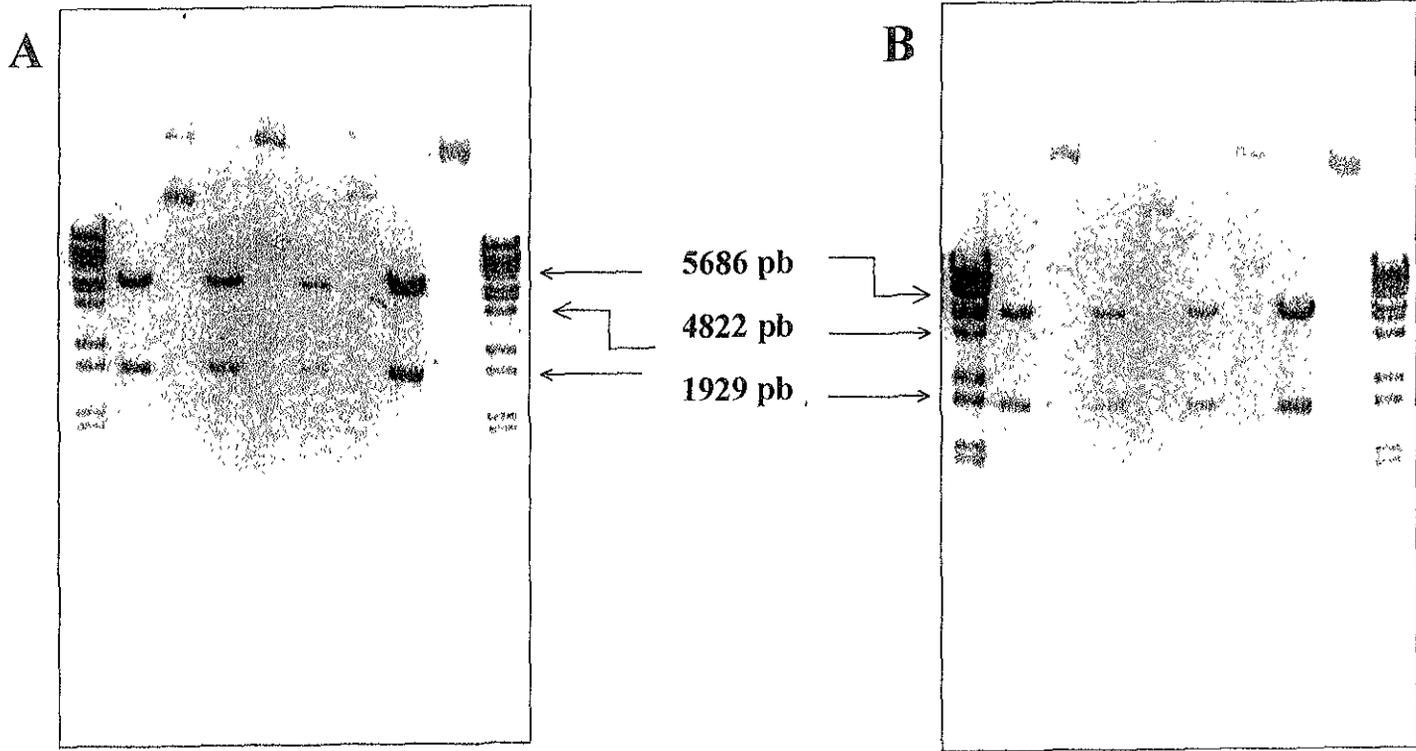


Figura 27. Geles analíticos de Agarosa al 1% con el ADN de los plásmidos candidato a pEJ02 y pEJ03. **A:** Carriles: 1. y 10. marcador de peso molecular Lambda/BstEII; 2. pEJ02g1/BamHI-SmaI; 3. pEJ02g1; 4. pEJ02g2/BamHI-SmaI; 5. pEJ02g2; 6. pEJ03g1/BamHI-SmaI; 7. pEJ03g1; 8. pEJ01/BamHI-SmaI; 9. pEJ03. **B:** Carriles: 1. y 10. marcador de peso molecular Lambda/BstEII; 2. pEJ02c/BamHI-SmaI; 3. pEJ02c; 4. pEJ03g2/BamHI-SmaI; 5. pEJ03g2; 6. pEJ03c/BamHI-SmaI; 7. pEJ03c; 8. pEJ01/BamHI-SmaI; 9. pEJ01. Pesos esperados: pEJ01: 4887 pb y 1934 pb, pEJ02: 4887 pb y 1934 pb, pEJ03: 4887 pb y 1856 pb.

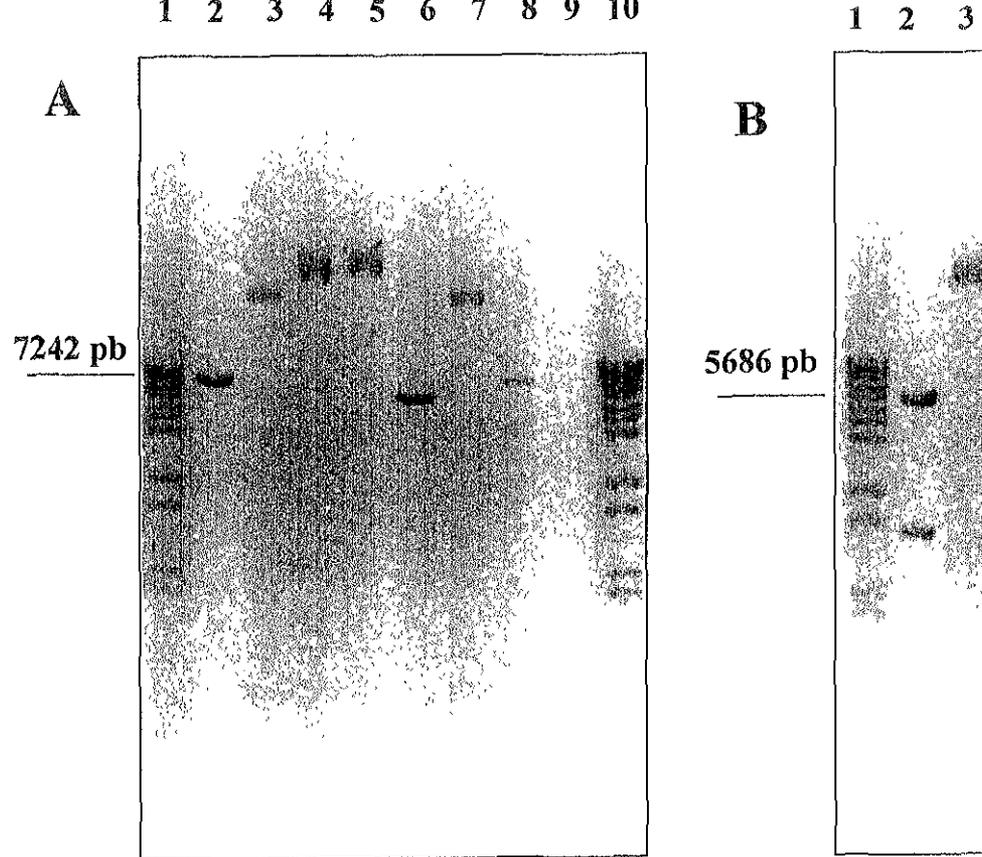


Figura 28. Análisis de los plásmidos candidato a pEJ04 cortados con KpnI en geles de Agarosa al 1%, para identificar las clonas positivas de Δ KH. **A:** Carriles 1. y 10. marcador de peso molecular Lambda/BsteII; 2. candidato 5/KpnI; 3. candidato 5; 4. candidato 4/KpnI; 5. candidato 4; 6. candidato 1/KpnI; 7. candidato 1; 8. candidato 7/KpnI; 9. candidato 7. **B:** Carril 1 marcador de peso molecular Lambda/BsteII; 2. candidato 10/KpnI; 3. candidato 10. Peso esperado para pEJ04 6782 pb.

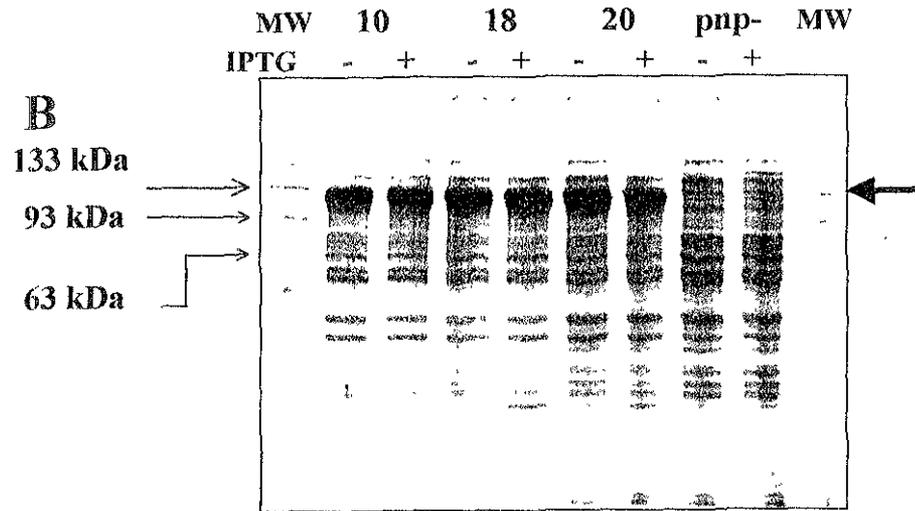
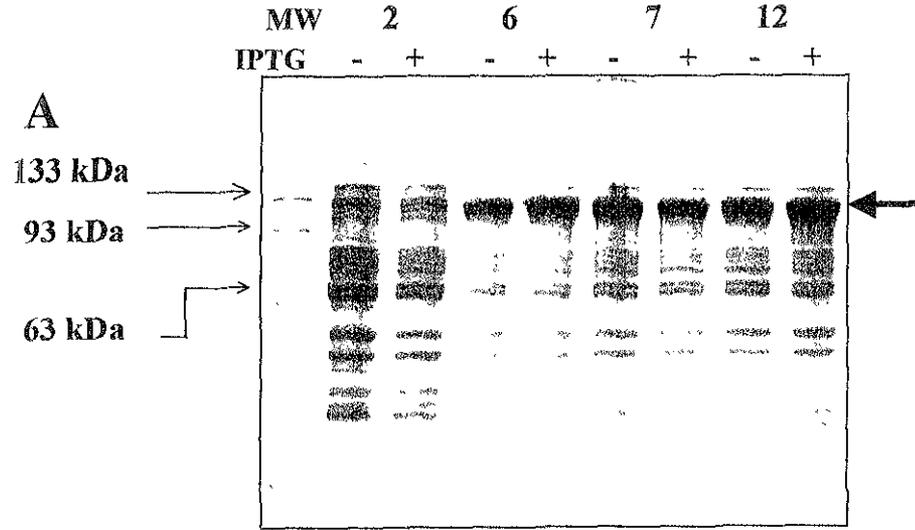
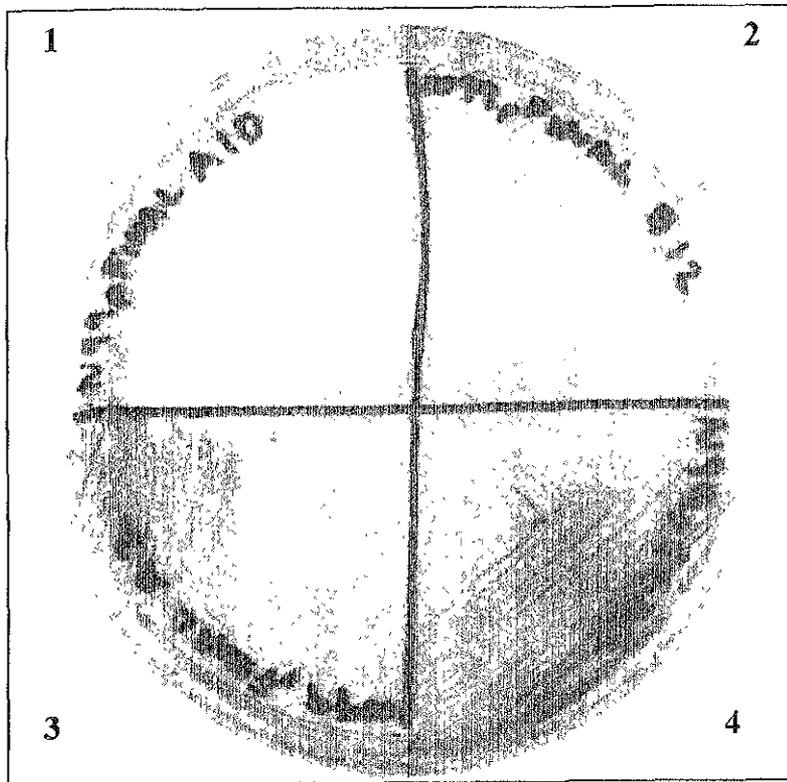


Figura 29. PAGE-SDS al 10% con los extractos crudos de las cepas N99pnp::Tn5 conteniendo los plásmidos candidato a pEJ01 con PNPasa-6xHis. Tinción con azul Coomassie. La flecha indica la PNPasa-6xHis de aproximadamente 78.10 kDa.

Represión lacI
positiva



Represión lacI
positiva

No represión
lacI

No represión
lacI

Figura 30. Prueba bioquímica para evaluar el funcionamiento del gen represor LacIq en los candidatos pEJ01. Caja de MacConkey con cultivos de 16 horas a 37°C: Sectores: 1, Cepa N99 candidato 10(lacIq +); 2, Cepa N99 candidato 12(lacIq+); 3, Cepa N99 candidato 2(lacIq-); 4, Cepa N99 pQE70(lacIq-).

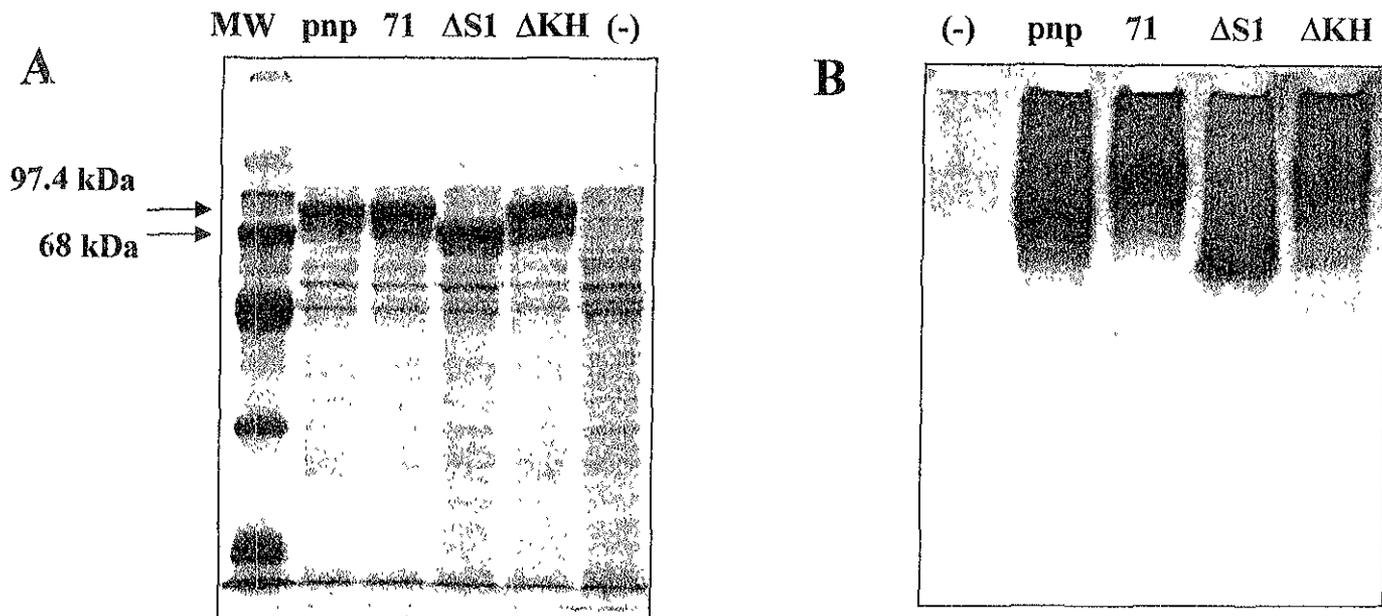


Figura 31. **A:** PAGE-SDS al 10% teñido con azul Coomassie con los extractos crudos de las proteínas solubles PNPasa-6xHis (78.10 kDa), PNPasa71-6xHis (78.16 kDa) y PNPasa Δ S1-6xHis (75.47 kDa) y PNPasa Δ KH-6xHis (76.52 kDa) en DH5 α , (-): control negativo N99pnpTn5. MW: Marcador de peso molecular. **B:** Ensayo de polimerización de ADP. Gel nativo de Poliacrilamida al 7.5%, teñido con naranja de acridina. Extractos crudos de las proteínas en DH5 α . Control negativo: N99pnpTn5; proteínas PNPasa-6xHis, PNPasa-71-6xHis, PNPasa Δ S1-6xHis y PNPasa Δ KH-6xHis.

Alelo	1		4		5		pnp(-)	
IPTG	-	+	-	+	-	+	-	+

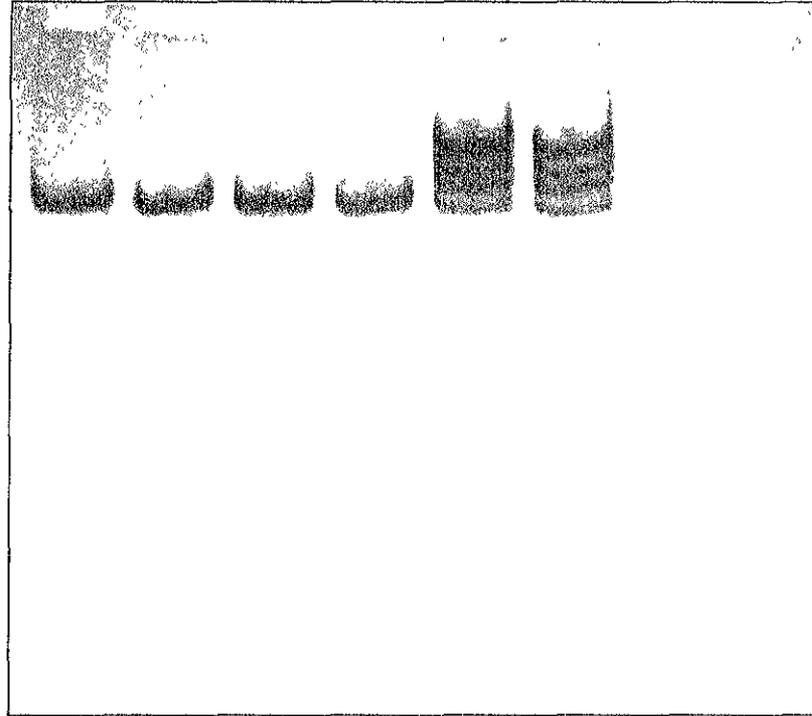
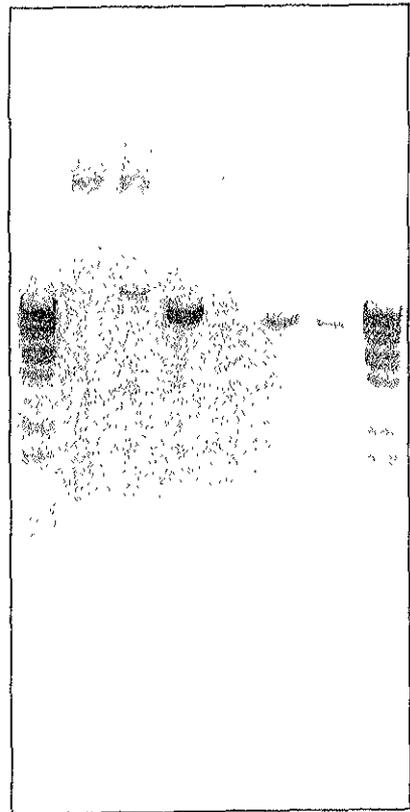
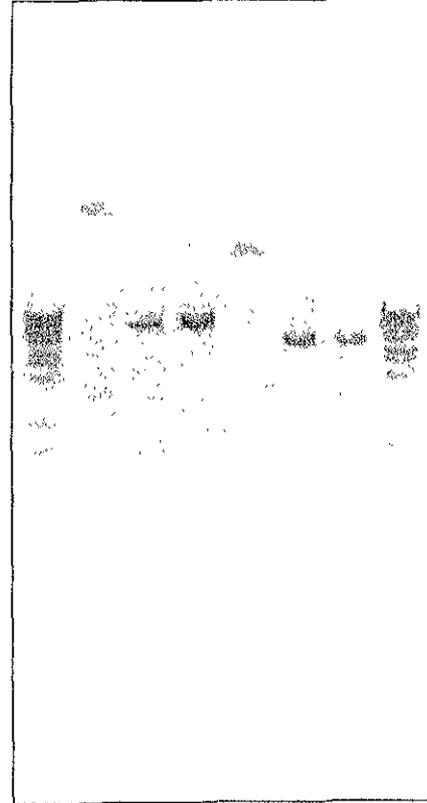


Figura 32. Ensayo de polimerización de ADP. Gel nativo de Poliacrilamida al 7.5% teñido con naranja de acridina. Extractos crudos de las proteínas candidatos PNPasa Δ KH-6xHis en cepas DH5 α . Candidatos 1, 4, 5 y control negativo N99pnpTn5.

A**B**

7242 pb

Figura 33. Análisis de los plásmidos pEJ01, pEJ04 y pEJ05 mediante el corte con las enzimas KpnI y BamHI en geles de Agarosa al 1%. **A:** Carriles: 1. y 8. marcador de peso molecular; 2. pEJ01; 3. pEJ01/KpnI; 4. pEJ01/BamHI; 5. pEJ04; 6. pEJ04/KpnI; 7. pEJ04/BamHI. **B:** Carriles: 1. y 8. marcador de peso molecular; 2. pEJ05; 3. pEJ05/KpnI; 4. pEJ05/BamHI; 5. pEJ04(*1) sin corte; 6. pEJ04(*2)/KpnI de 6782 pb; 7. pEJ04(*3)/BamHI de 6782 pb.

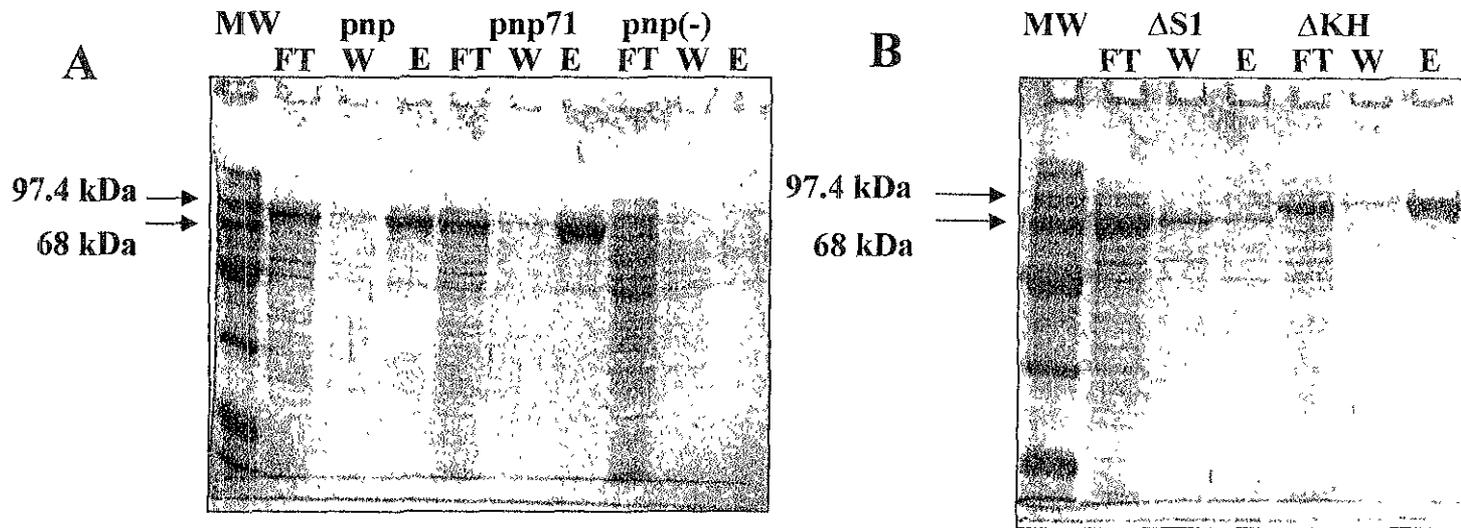


Figura 34. Geles analíticos PAGE-SDS al 10% de ensayos “tipo trampa” para PNPasa-6xHis teñido con azul Coomassie de las proteínas solubles totales de DH5α conteniendo PNPasa-6xHis, PNPasa71-6xHis, PNPasaΔS1-6xHis y PNPasaΔKH-6xHis. Carriles: MW: marcador de peso molecular; FT(proteínas no unidas), W(lavado), E(elución con Imidazol). **A:** PNPasa-6xHis, PNPasa71-6xHis y N99pnp::Tn5. **B:** PNPasaΔS1-6xHis y PNPasaΔKH-6xHis.

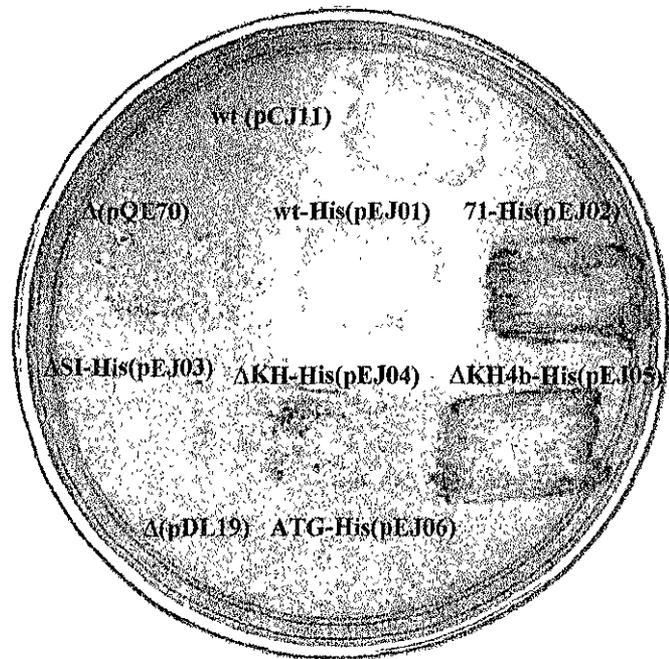
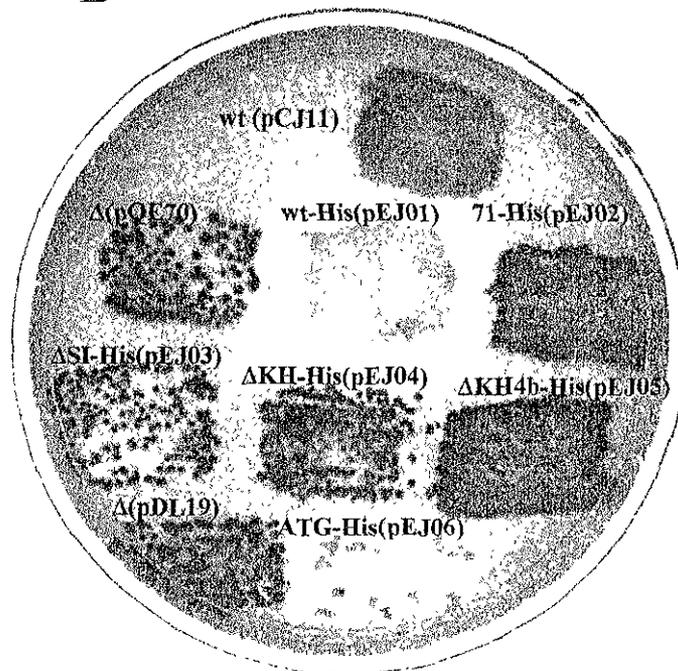
A**B****22 Hrs****40 Hrs**

Figura 35. Ensayo de autoregulación de una fusión *pnp::lacZ* por las proteínas PNPasa construidas en la cepa GF5322 *recA::Tn10*. 1. PNPasa en pCJ11, 2. Δ PNPasa en pQE70, 3. PNPasa-6xHis en pEJ01, 4. PNPasa71-6xHis en pEJ02, 5. PNPasa Δ S1-6xHis en pEJ03, 6. PNPasa Δ KH en pEJ04, 7. PNPasa PNPasa Δ KH4b-6xHis en pEJ05, 8. Δ PNPasa en pDL19, 9. PNPasa-ATG-6xHis pEJ06.

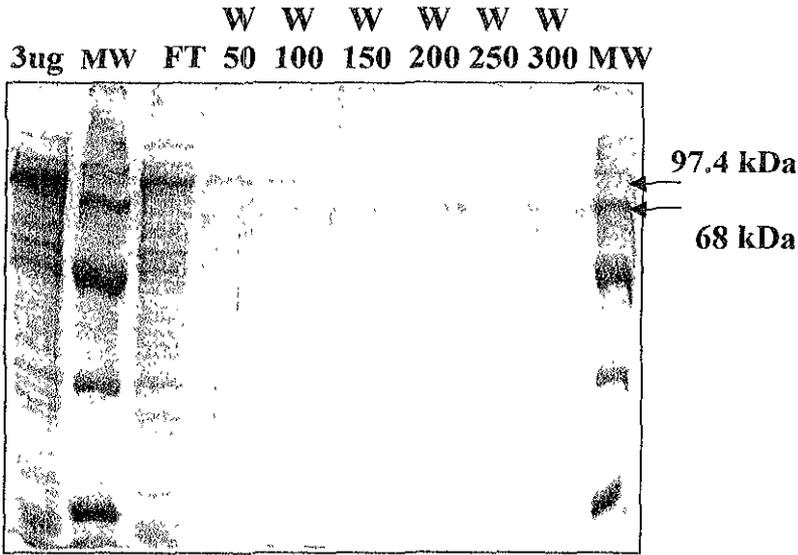
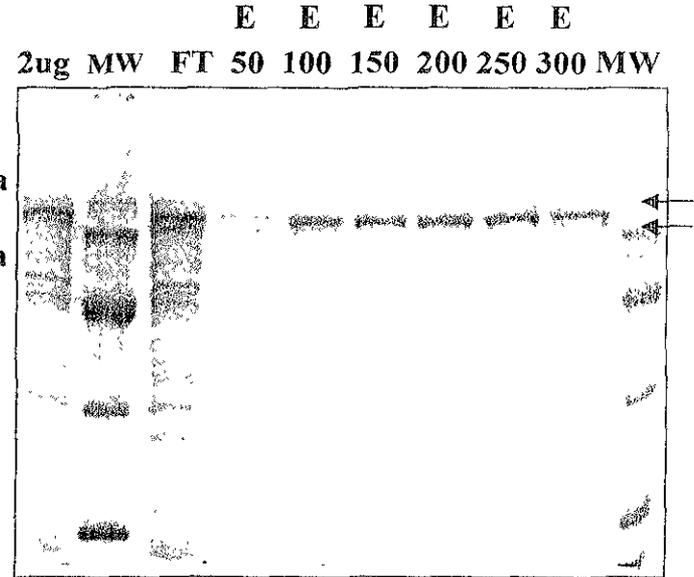
A**B**

Figura 36. Ensayos de tipo "Trampa" para evaluar el efecto de los lavados con diferente concentración de NaCl, antes de la elución de PNPasa-6xHis. Geles PAGE-SDS 10%. A: 3ug de proteínas totales. MW: marcador de peso molecular. FT: flow-through, W: Lavados con 50, 100, 150, 200, 250 y 300 mM de NaCl. B: 2ug de proteínas totales. MW: marcador de peso molecular. FT: flow-through, E: Eluatos de PNPasa-6xHis a 250 mM Imidazol después de lavar con 50, 100, 150, 200, 250 y 300 mM de NaCl.

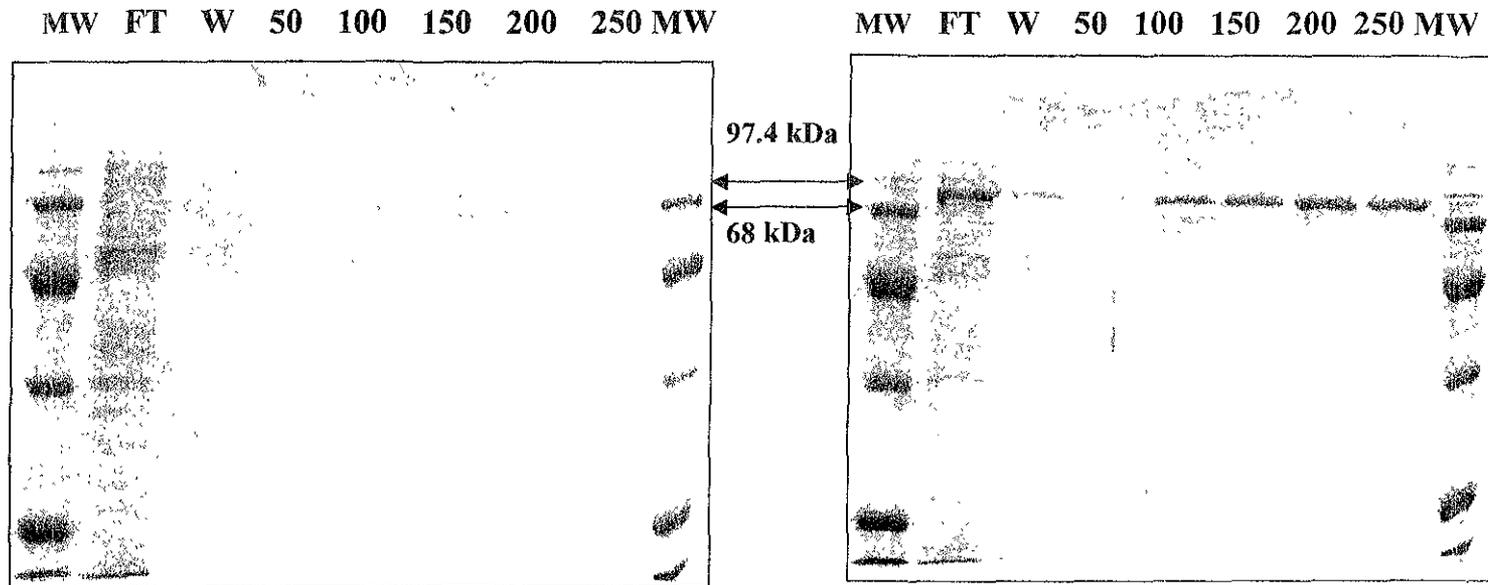


Figura 37. Ensayos de “Trampa” para evaluar la mínima concentración de Imidazol necesaria para eluir PNPasa-6xHis. Geles PAGE-SDS 10%. **A:** Extractos de N99pnp::Tn5 pQE70; MW: marcador de peso molecular. FT: flow-through, W: Lavado, Eluatos con 50, 100, 150, 200 y 250 mM de Imidazol. **B:** Extractos de N99pnp::Tn5 pEJ01 MW: marcador de peso molecular. FT: flow-through, W: Lavado, Eluatos de PNPasa-6xHis con 50, 100, 150, 200 y 250 mM de Imidazol.

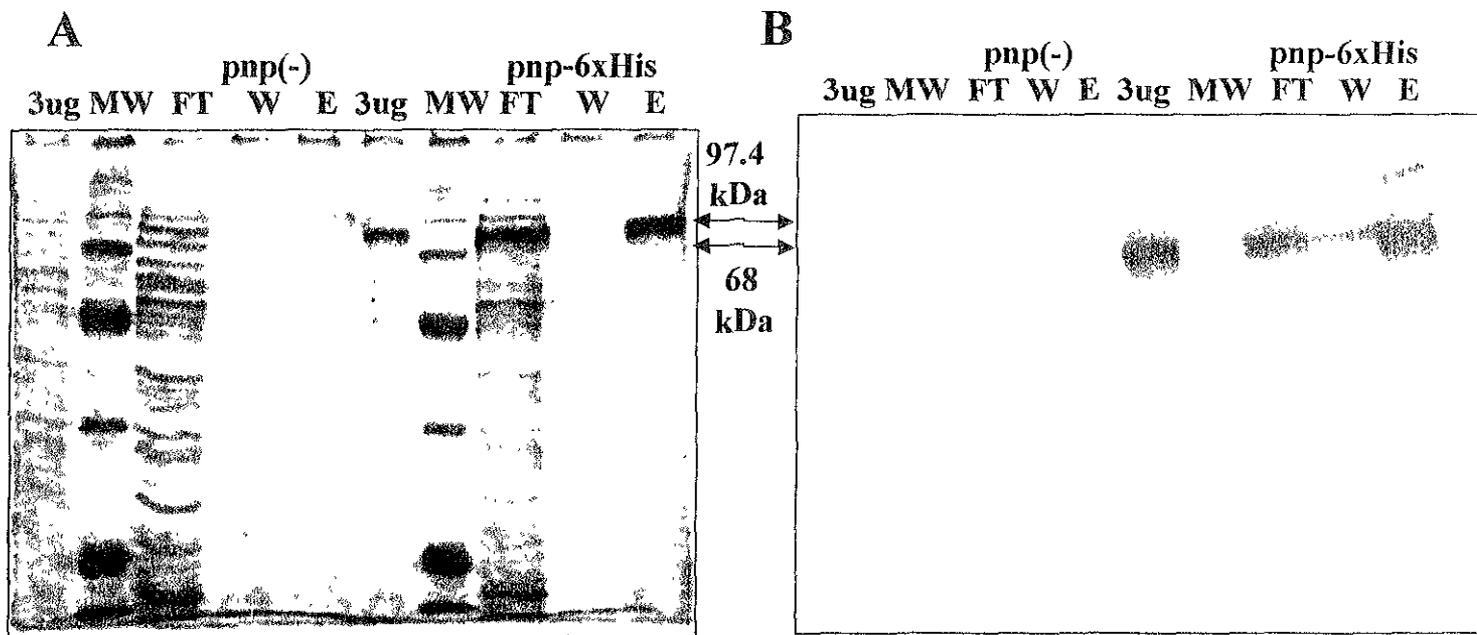


Figura 38. Western Blot de los ensayos tipo “Trampa” con los extractos crudos de las proteínas solubles PNP(-) y PNPasa-6xHis en fondo N99::pnpTn5. Carriles: 3ug (3ug de proteínas totales), MW: marcador de peso molecular; FT(flow-through), W(lavado), E(elución). **A**: PAGE-SDS (10%) teñido con azul Coomassie. **B**: Western Blot con anticuerpo anti PNPasa

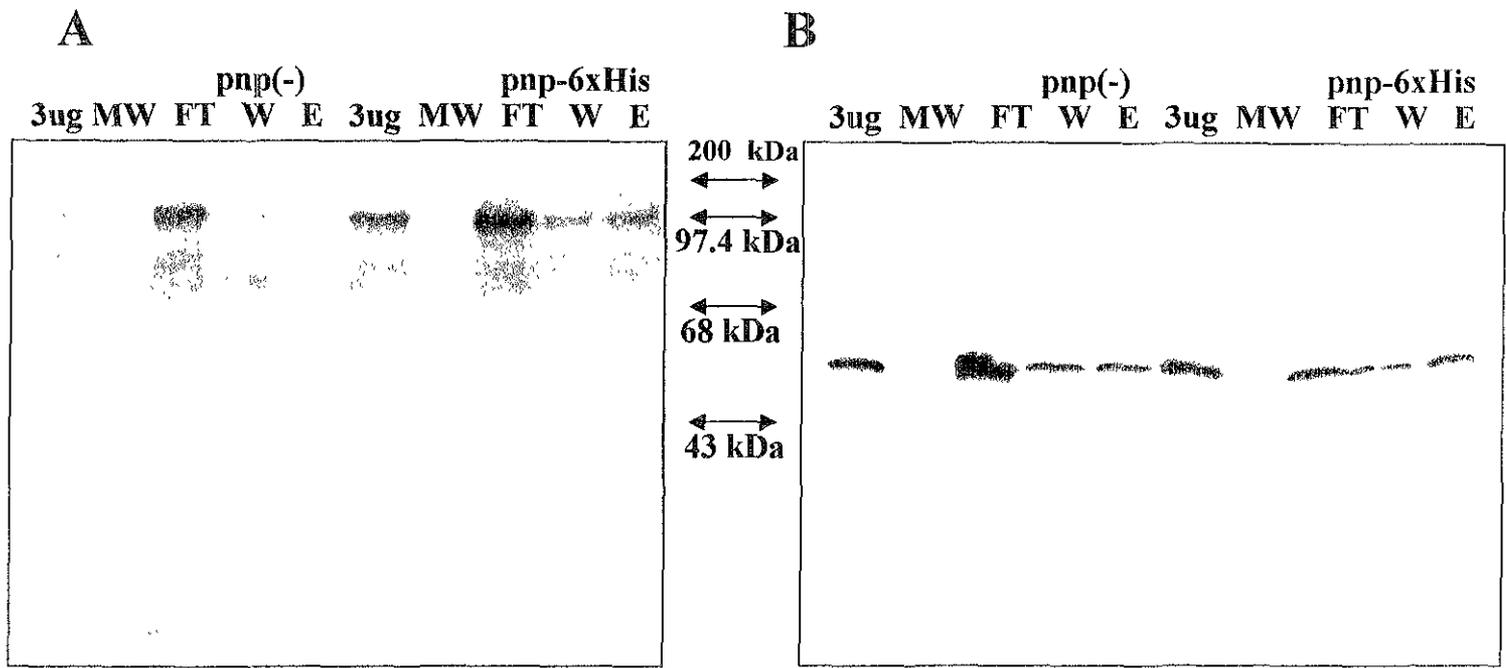


Figura 39. Western Blot de los ensayos tipo “Trampa” con los extractos crudos de las proteínas solubles PNP(-) y PNPasa-6xHis en fondo N99::pnpTn5. Carriles: 3ug (3ug de proteínas totales), MW: marcador de peso molecular; FT(flow-through), W(lavado), E(elución). **A:** Western Blot con anticuerpo anti RNaseE. **B:** Western Blot con anticuerpo anti RhIB.

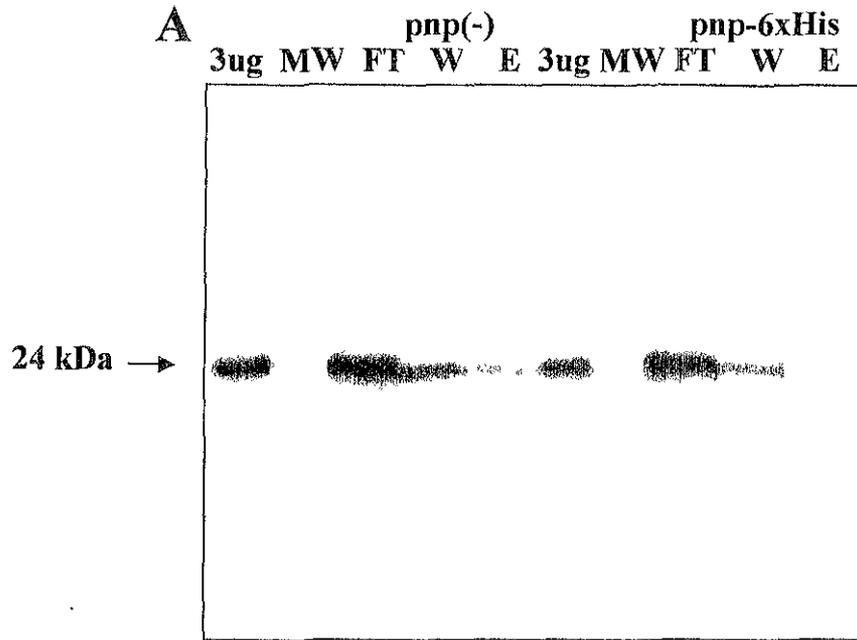


Figura 40. Western Blot de los ensayos tipo “Trampa” con los extractos crudos de las proteínas solubles PNP(-) y PNPasa-6xHis en fondo N99::pnpTn5. Carriles: 3ug (3ug de proteínas totales), MW: marcador de peso molecular; FT(flow-through), W(lavado), E(elución). A: Western Blot con anticuerpo anti Enolasa.

8. DISCUSIÓN

8.1. PNPasa-6xHis es Expresada Tanto por el Sistema Dual Como por el Sistema Monoplasmídico.

La utilización del programa Vector NTI versión v5.03 fue parte fundamental en la construcción de los vectores de expresión. La utilización de este programa ayudó en el diseño de los vectores de expresión para establecer los sitios de corte para la enzima adecuada en cada una de las construcciones hechas. Este programa fue de utilidad en el diseño y establecimiento de las características fisicoquímicas de los oligonucleótidos necesarios para las reacciones de PCR. Con este programa se pudo simular cada paso de las construcciones de manera que el trabajo experimental se desarrolló con una idea más clara y segura. Así mismo, esta herramienta ayudó a diseñar los vectores más rápido y con la certeza de que los resultados obtenidos fueron lo más cercano a la realidad.

En cuanto al trabajo experimental, se hicieron seis reacciones de PCR para amplificar el gen de PNPasa-6xHis en las que se varió la concentración de $MgCl_2$. La temperatura de alineamiento adecuada a las características fisicoquímicas del par de iniciadores fue de $52^\circ C$. La reacción en la que se obtuvo una mayor cantidad de producto fue 3 mM de $MgCl_2$, como se observa en el carril 3 de la figura 17A. Sin embargo, con todas las condiciones de $MgCl_2$ analizadas hubo una buena cantidad de producto de amplificación. Los productos de amplificación en todas las reacciones son del tamaño esperado de 2171 pb. Para realizar la amplificación por PCR, los iniciadores incluyeron algunos cambios importantes: el iniciador sentido sustituyó el sitio de inicio de la traducción TTG-met reportado para el cistron de PNPasa (Grunber-Manago, 1999) por el triplete ATG-met. Este cambio se realizó para asegurar el inicio de la traducción óptimo en la construcción. Simultáneamente se incluyó el sitio de restricción para la enzima SphI en el extremo 5'. Con el iniciador antisentido se incluyeron 6 codones que codifican para 6 histidinas (6xHis)

al final del gen. Estas 6 histidinas permitieron que la proteína se retuviera en una matriz de Agarosa-Níquel para purificarla. Después de los 6 codones de histidinas se incluyó el sitio de término de la traducción TTA, esto significa que se recorrió el sitio de término 6 codones. También se incluyó el sitio de restricción para la enzima BamHI después de TTA. Estos sitios se incluyeron para poder clonar el producto de amplificación en el vector recipiente.

Como vector recipiente se eligió el vector pQE70 de la empresa QIAGEN Inc. Se trata de un vector diseñado especialmente para clonación y expresión de genes. Sus principales características son tener el promotor fuerte del fago T5 inducible optimizado. Este promotor es reconocido por la ARN polimerasa de *E. coli* y tiene dos secuencias del operador *lac* para la unión del represor *lacIq*, un sitio de unión ribosomal sintético RBS II para altos niveles traduccionales y sitios múltiples de clonación y codones de terminación traduccional. El vector contiene también dos terminadores transcripcionales fuertes: el t0 del fago Lambda y el T1 del operón *rrnB* de *E. coli*. Para su selección tiene el gen de β -lactamasa que le confiere resistencia ampicilina y el origen de replicación *colEI* para su multiplicación en la bacteria. El gen de PNPasa-6xHis se insertó entre los sitios SphI y BamHI del plásmido pQE70 asegurando su expresión por que antes del sitio de inicio de la traducción ATG-met, le precedió el sitio de unión ribosomal y el promotor fuerte inducible del vector. Así mismo, además de su propio terminador t2 que se incluyó cuando se amplificó por PCR el gen *pnp*, existen dos terminadores fuertes que aseguran el término de su transcripción. Finalmente el gen de resistencia ampicilina asegura la selección de las bacterias transformadas.

Durante la construcción, el gen de β -lactamasa tuvo una función adicional. El vector pQE70 se cortó en dos pasos con las enzimas BglI-SphI y BglI-BamHI (Figura 9). La razón de esta operación fue que en pQE70 los sitios SphI y BamHI donde se iba a clonar están muy cerca (solamente a 4 pb uno de otro). Para poder cortar en un sitio de restricción situado en el extremo de una molécula de ADN, las enzimas necesitan de una secuencia mínima de nucleótidos para anclarse y cortar. Al

cortar una de las enzimas, ésta no dejaría nucleótidos suficientes para el anclaje de la segunda enzima y no se llevaría a cabo un segundo corte. Por esta situación se hicieron los cortes por separado. Primero el vector se linearizó con un corte por BglI, que interrumpe el gen de β -lactamasa, y el ADN se dividió en dos partes. Una de ellas se cortó con SphI y la otra con BamHI. Así se aseguró tener listos los sitios complementarios a los sitios del amplificado. Al llevar a cabo la ligación de los tres fragmentos, se generó el plásmido pIntermediario. En éste se reconstruyó el gen de β -lactamasa (ver Figura 9), esto se confirmó por la capacidad de las cepas transformadas con pIntermediario de crecer en un medio con ampicilina.

La expresión de PNPasa-6xHis debía ser inducible por IPTG en el sistema dual, sin embargo, las cepas que contenían al vector pIntermediario no controlaban la expresión de la proteína PNPasa-6xHis. Esto se observó cuando se hicieron ensayos comparativos antes y después de inducir la expresión de proteínas. En estos ensayos se observó que aún sin inducción por IPTG la expresión de la proteína era abundante y no había diferencia antes y después de inducir, como lo muestra la figura 20. El promotor fuerte inducible presente en pIntermediario necesita de la proteína represora *lacIq* presente en el plásmido pREP4 para controlar los niveles de expresión. Una posible explicación para la falta de regulación es que la proteína represora no funcione adecuadamente. Para saberlo se realizó una prueba indirecta en la que se evaluó la funcionalidad del gen *LacIq* presente en el plásmido pREP4. La prueba se detalló en la sección de resultados 6.2.4., esta prueba indicó que la proteína sí funcionaba correctamente. Otra posible razón de la falta de regulación sería una diferencia considerable entre el número de copias del vector con el gen de PNPasa-6xHis respecto al vector que expresa el gen para la proteína represora *lacIq*. Probablemente esto se deba a que pIntermediario es un vector de alta copia debido a su origen de replicación *colEI* y pREP4 es un plásmido de mediana copia con un origen de replicación *p15A*. Una proporción desigual de los vectores ocasionaría que la proteína represora *lacIq* fuera insuficiente para controlar la expresión de la proteína PNPasa-6xHis. Lo adecuado es tener en un solo vector tanto al promotor

como al gen codificante para la proteína represora. El siguiente paso consistió en clonar en el pIntermediario el gen que codifica para la proteína represora *lacIq* (Figura 11). En la construcción del plásmido final pEJ01 se empleó el pIntermediario linearizado con XbaI y un fragmento procedente de pREP4 que contiene el gen codificante para la proteína represora *lacIq*. Para identificar al plásmido correcto se hizo un corte con la enzima ApaI que linearizó a los plásmidos mostrados en las figuras 21B, 22A y B. Se utilizó la enzima ApaI ya que no está presente en pQE70 y por lo tanto tampoco en pIntermediario, sin embargo se encuentra en el fragmento *lacIq* que se insertó en pIntermediario, es decir que la construcción final de pEJ01 debe contener un sitio ApaI (Figura 12A). Al mismo tiempo se identificó el fragmento *LacIq* insertado. Al hacer los extremos parejos en los componentes de pEJ01, el fragmento *LacIq* recién clonado tenía la posibilidad de insertarse en dos orientaciones. Para identificar la orientación del inserto se cortó con la enzima SphI y se liberaron dos fragmentos cuyos pesos moleculares son de 3619 pb y 3202 pb como se muestra en la figura 23A en los carriles 2 y 4. Esto correspondería a una orientación del inserto en el mismo sentido que el inserto de *pnp-6xHis*, como se muestra en el esquema de pEJ01 de la figura 12A.

Al realizar los ensayos de expresión de proteínas los resultados mostraron que persistía el fenómeno de expresión constitutiva sin inducción por IPTG de PNPasa-6xHis a pesar de tener en un mismo vector el gen que codifica para la proteína represora *LacIq*. Estos ensayos se muestran en la figura 29. En este caso también se probó la funcionalidad de la proteína represora *LacIq*. Los resultados indicaron que *LacIq* también es funcional en los cadidatos pEJ01 (Figura 30). Para explicar este resultado es posible decir que aún cuando la proteína *LacIq* sea funcional para reprimir la expresión del operón *lac* cromosomal, ésta no se produzca en los niveles necesarios para un operón multicopia. Esto podría deberse a que la PNPasa-6xHis tenga una mayor afinidad por el ARNm de la proteína *LacIq* y degrade una parte antes de llevarse a cabo la traducción. Otra posibilidad es que PNPasa-6xHis se una a una pequeña cantidad de ARNm de *LacIq* de manera que impida la traducción.

También es posible que LacI^q no sea lo suficientemente fuerte al operador *lac* presente en nuestro vector y la represión sea insuficiente.

8.2. PNPasa-6xHis es Capaz de Autoregular Eficientemente la Expresión de PNPasa.

Para probar que PNPasa-6xHis es capaz de autorregular en *trans* el gen de PNPasa silvestre se empleó la cepa de *E. coli* GF5322*recA*:Tn10 que contiene una proteína de fusión reportadora *pnp::lacZ* contenida en un profago lambda (Rober-Le Meur *et al.*, 1992). La cepa GF5322*recA*:Tn10 fue transformada con el plásmido pEJ01, que tiene el gen codificante para la proteína PNPasa-6xHis. Las cepas transformadas se hicieron crecer en medio MacConkey con lactosa y ampicilina por 22 horas a 30° C. La coloración menos intensa de las colonias que portan pEJ01 en comparación con las colonias que portan pQE70 a las 22 y 40 horas de incubación que se muestran en la figura 35, sugiere que la proteína PNPasa-6xHis es capaz de autorregular postranscripcionalmente la expresión de PNPasa silvestre a partir de una copia cromosómica.

8.3. El Sistema Monoplasmídico Expresa Eficientemente las Enzimas Mutantes.

Para construir la proteína PNPasa71-6xHis también se hicieron reacciones de PCR a partir del gen de *pnp-71* contenido en el plásmido pCAS21. En estas reacciones se utilizaron los mismos iniciadores usados para la proteína PNPasa-6xHis. Esto se pudo hacer ya que la mutación 71 se encuentra en el residuo 570 del gen de *pnp*, por eso cuando se amplifica con los iniciadores mencionados, el producto amplificado incluye la mutación. Estas reacciones se realizaron a las mismas condiciones que para la reacción original. Los resultados obtenidos fueron satisfactorios ya que el producto fue de 2171 pb como se esperaba y en una cantidad suficiente a pesar de que la reacción se hizo a partir de una colonia bacteriana.

Aunque la reacción se realizó a partir de todo el ADN extraído de una colonia bacteriana, no se observó la formación de productos de reacción inespecíficos. El producto de amplificación se cortó con las enzimas SmaI y BamHI para poder ligarlo al vector recipiente pEJ01 cortado con BamHI-SmaI. La razón por la que se utilizó esta estrategia de clonación es para mantener intacto el sitio +1 de traducción del gen. Además el plásmido recipiente pEJ01 tiene dos sitios de restricción para la enzima SphI, esto tiene como consecuencia hacer una restricción parcial de pEJ01 para después identificar el fragmento útil. Por otro lado al reducir el tamaño del inserto amplificado por PCR se evita alguna mutación generada durante la amplificación. pEJ01 tiene un sitio único SmaI que permite sustituir el fragmento pEJ01/SmaI-BamHI de 1934 pb por el fragmento amplificado y restringido PNPasa71-6xHis/SmaI-BamHI de 1934 pb entre el sitio SmaI y el sitio BamHI. De esta manera se originó el plásmido pEJ02.

En la construcción de PNPasa Δ S1-6xHis se utilizó una reacción de PCR con los mismos iniciadores mencionados. En este caso los iniciadores también fueron útiles ya que la mutación se encuentra en la parte interna del gen. Las condiciones de reacción fueron las mismas que para PNPasa-6xHis y la amplificación se realizó a partir del plásmido pCJ11 Δ S1 proporcionado por la Dra. R. Ma. Bermúdez C. Los productos de amplificación fueron de 2093 pb, en una cantidad suficiente y sin bandas inespecíficas, esto se muestra en la figura 24A. El producto amplificado se restringió con las enzimas BamHI y SmaI clonándose en pEJ01 cortado con BamHI-SmaI y generándose el plásmido pEJ03. La mutación Δ S1 elimina 75 nucleótidos que codifican para los aminoácidos 10 al 35 (TGK VTR IVD FGA FVA IGG GKE GLV HI) del dominio S1 de PNPasa. En este dominio la mutación elimina un 80% de la primera cadena beta, el 100% de la segunda y tercera cadenas beta del dominio así como el principio de una pequeña hélice α después de la tercera cadena beta (Bycroft *et al.*, 1997). En esta porción de aminoácidos eliminados destacan los residuos altamente conservados: Gly-11, Val-13, Gly-20, Val-23 y Gly-31 que forman el centro hidrofóbico del dominio S1. El residuo Val-13 es el más

conservado en los dominios S1 conocidos y sólo algunas veces es reemplazado por isoleucina. Val-13 se encuentra muy cerca de la Gly-11, Gly-53 y es posible que juntos formen un sitio estructuralmente fuerte en el dominio. Entre los aminoácidos eliminados tenemos otros que no son altamente conservados pero muchos dominios S1 los contienen, éstos son Phe-19, Phe-22 e His-34. Estos residuos se encuentran cerca entre sí en la parte superficial del dominio junto con los residuos Asp-64 y Arg-68. Esta región es un buen candidato para ser el sitio de unión al ARN (Bycroft *et al*, 1997).

Con esta eliminación en el dominio S1 es posible que la proteína resultante sea defectuosa en la unión a ARN por carecer de tres de los cinco aminoácidos superficiales que se cree que están involucrados en la unión del ARN (Phe-19, Phe-22, His-34, Asp-64 y Arg-68). La razón de que algunos aminoácidos estén altamente conservados puede ser que la función de estos sea muy importante. Se ha propuesto que los aminoácidos del dominio S1 que están altamente conservados son importantes en la región de unión a ARN. Para saber si se ha perdido la función de unir ARN de la proteína, es interesante probar la capacidad de PNPasa Δ S1-6xHis de unir ARN.

Para construir la proteína mutante PNPasa Δ KH-6xHis primero se realizó un análisis del dominio KH haciendo una similitud con el dominio KH # 6 de la Vigilina (Musco *et al*, 1996). Para conocer la estructura tridimensional del dominio se usaron los programas Ras-Mol y Cn3D 2.5. Se han encontrado dominios KH en varias proteínas cuya función se relaciona con el ARN. En estas proteínas existen secuencias de aminoácidos altamente conservadas. La secuencia de aminoácidos que forma la tercera hélice alfa del dominio KH # 6 en la Vigilina y que estabiliza su centro hidrofóbico es una de las secuencias más conservadas, probablemente esto se debe a que su función es muy importante y/o indispensable en el funcionamiento de las mismas. En base al análisis anterior se decidió eliminar la tercera hélice alfa desprotegiendo el centro hidrofóbico del dominio. Al tener una mutación así, se pretende evaluar la importancia del dominio KH en PNPasa. La construcción de

PNPasa Δ KH-6xHis se realizó de manera que se pudiera eliminar la tercera hélice α que protege el centro hidrofóbico del dominio. La eliminación se hizo por medio de la reacción de PCR. Como iniciadores se utilizaron los que ya se tenían diseñados para amplificar todo el gen *pnp-6xHis* y se diseñaron otros iniciadores internos para realizar la eliminación. Al mismo tiempo se generó un sitio de restricción KpnI. En esta construcción se eliminaron 13 aminoácidos (EKE KHA IRR IEE I) que conforman la tercera hélice alfa en el dominio KH y protegen su centro hidrofóbico.

La amplificación se realizó en dos partes a partir del plásmido pEJ01. Los nuevos iniciadores diseñados incluyeron 2 mutaciones silenciosas que permitieron generar el sitio único de restricción para la enzima KpnI. Estas mutaciones fueron el cambio de una C por una T en el nucleótido 4218 y el cambio de una T por una C en el nucleótido 2460 de la secuencia de pEJ01. La razón de incluir el sitio de restricción KpnI es para detectar la mutación en los productos resultantes. Además al incluir este sitio es posible restaurar la eliminación y/o sustituir la porción eliminada por secuencias relacionadas para investigaciones posteriores. Los aminoácidos eliminados que forman la tercera hélice α , se encuentran altamente conservados en diferentes dominios KH y son importantes para la estabilidad del dominio ya que protegen la superficie hidrofóbica de las cadenas beta (Musco *et al*, 1996).

Como se mencionó antes la construcción se realizó en dos partes. En la primera parte se amplificó un fragmento de 1807 pb que inicia con un sitio de restricción SphI y finaliza con un sitio de restricción KpnI. En la segunda parte se amplificó un fragmento de 308 pb que inicia con un sitio de restricción KpnI y finaliza en un sitio BamHI. En la amplificación de ambos productos se evaluaron las concentraciones de MgCl₂ y la mejor en ambos casos fue de 3 mM como lo muestra la figura 18. En ninguna de las reacciones se generaron bandas inespecíficas. Para llevar a cabo la ligación de los fragmentos amplificados en el vector pEJ01 cortado con BamHI-SmaI, se restringió el primer fragmento con las enzimas SmaI y KpnI, el segundo fragmento con las enzimas KpnI y BamHI. Los fragmentos restringidos se

ligaron con el vector recipiente pEJ01 cortado con BamHI-SmaI generándose el plásmido pEJ04. La razón por la que se cortó con SmaI en lugar de SphI es para dejar intacto el sitio +1 de traducción y para reducir las probabilidades de incluir mutaciones generadas durante la reacción de PCR. Por otra parte era conveniente no usar el sitio SphI ya que en el vector recipiente existen dos sitios de restricción para SphI que dificultarían la construcción, como se explicó en la construcción de PNPasa71-6xHis.

8.4. La Expresión de las Enzimas Mutantes no es Inducida por IPTG.

Todas las proteínas construidas son expresadas en el sistema monoplasmídico, las construcciones son PNPasa-6xHis (silvestre), PNPasa71-6xHis (mutante 71), PNPasa Δ S1-6xHis (mutante Δ S1) y PNPasa Δ KH-6xHis (mutante Δ KH). La proteína silvestre, mutante 71 y mutante Δ KH tiene un corrimiento electroforético similar en PAGE-SDS como se observa en la figura 31A. La mutante Δ S1 muestra un corrimiento electroforético diferente al de las otras proteínas, se acerca más al corrimiento del marcador de peso molecular de 68 kDa. Cabe mencionar las proteínas se expresan aún sin haber inducido con IPTG (resultados no mostrados), esto se debe a que no hay represión de la expresión de las PNPasas por *lacIq*, a pesar de que se observó que el gen del producto represor *lacIq* es funcional.

8.5. La Presencia de Seis Residuos de Histidina no Inhibe la Polimerización de ADP.

Respecto a la actividad enzimática de las proteínas construidas, se probó su capacidad de polimerizar ADP. En la proteína silvestre (PNPasa-6xHis) la inserción de 6 histidinas al final del gen no afectó esta actividad como se observa el gel nativo de poliacrilamida de la figura 31B. En cuanto a la mutante 71 los resultados son los esperados, es decir que tampoco se afectó la actividad de polimerización de ADP al

incluir 6 histidinas al final del gen y el corrimiento electroforético se ve retrasado como se esperaba por observaciones anteriores (García-Mena, 1999)

Al evaluar la actividad de polimerización de ADP de la mutante $\Delta S1$ se observó que la inclusión de 6 histidinas al final del gen tampoco afecta la actividad de polimerización. De igual manera la eliminación de 25 aminoácidos que forman el centro hidrofóbico del dominio tampoco afecta la actividad de polimerización de ADP. Sin embargo el corrimiento electroforético se ve afectado en geles no desnaturalizantes. En este caso se observa un adelanto muy marcado respecto al comportamiento de la proteína silvestre que contrasta con el de la mutante 71. Por esta razón puede sugerirse que un dominio S1 intacto es necesario para establecer las interacciones protéicas de las subunidades α . Esto sugiere que la sola presencia del dominio KH no es suficiente. También puede decirse que la porción eliminada en el dominio S1 no tiene una función importante en la actividad de polimerización de ADP.

En la evaluación de la actividad de polimerización de ADP de la mutante ΔKH , se observó que las 6 histidinas al final del gen no interfieren con esta actividad enzimática. La eliminación de la tercera hélice alfa en el dominio KH tampoco participa directamente en la actividad de polimerizar ribonucleótidos difosfatados. Como se esperaba, el corrimiento electroforético se ve retrasado como en la mutante 71.

En cuanto a la mutante encontrada durante la construcción de la proteína PNPasa ΔK -6xHis, en la evaluación de la actividad de polimerización de ADP se observó la formación de 4 bandas bien definidas. Esto se puede observar en el figura 32. A esta proteína se llamó PNPasa ΔK -6xHis4bandas. La posible razón de la presencia de estas bandas puede ser la existencia de diferentes complejos polimerizantes en la cepa. La formación de estos complejos se debe a que se ha producido una especie diferente de PNPasa. Para que esto haya ocurrido es probable que durante la construcción de PNPasa ΔK -6xHis se ligaron mas fragmentos de los

requeridos y/o los fragmentos se ligaron en un orden diferente. Esto se puede apoyar en la información que se tiene del plásmido que expresa la mutación, es decir en el plásmido pEJ05. Este plásmido tiene un peso molecular de cerca de 7272 pb según su corrimiento electroforético (Figura 33B). Este peso es mayor que el peso esperado para pEJ04 de 6728 pb (Figura 33A) indicando que la PNPasa de pEJ05 podría tener aminoácidos adicionales. Otro dato que se tiene es que la proteína generada no tiene la capacidad de unirse a la matriz de agarosa-Níquel. Esto podría deberse a que las 6 histidinas no estén accesibles para detener a la proteína en la matriz. Para conocer el cambio en la secuencia es necesario efectuar un análisis restriccional y de secuenciación del fragmento clonado.

8.6. Es Probable que los Dominios KH y S1 Tengan un Papel en la Agregación de PNPasa.

Debido a que las proteínas mutantes 71, $\Delta S1$, ΔKH y ΔKH -4 bandas muestran un corrimiento electroforético diferente al de la proteína silvestre puede sugerirse que estos dominios participan en la agregación. Específicamente puede decirse que la modificación del dominio S1 evita la agregación, y el KH solo no puede promoverla, ya que el corrimiento electroforético del complejo polimerizante se adelanta considerablemente. En la mutación $\Delta S1$ el corrimiento electroforético se ve afectado en geles no desnaturizantes. En ellos se observa un adelanto muy marcado respecto al comportamiento de la proteína silvestre y que contrasta con el de la mutante 71 (figura 31B). Esto podría indicar que la agregación es promovida por el dominio S1 ya que retirar una porción del dominio aparentemente provoca que las subunidades α de PNPasa no se agregen. En el caso del dominio KH puede decirse que una alteración provoca una mayor agregación como se puede observar en el retraso del corrimiento electroforético del complejo polimerizante (ver Figura 31B y 32). La modificación en el dominio KH puede ser puntual (mutante 71) o de una porción mayor (la tercera hélice alfa en mutante ΔKH y mutación desconocida en ΔKH -4 bandas). Nosotros proponemos que la causa del retraso del corrimiento

electroforético es una superagregación de las subunidades α de PNPasa. De ser así sugerimos que un dominio KH intacto es necesario para estabilizar las interacciones intermoleculares apropiadas entre las subunidades α de PNPasa o evitar superagregación. Esto se hace evidente por que las dos mutaciones en las que se afectó el dominio KH el corrimiento electroforético se altera de la misma manera. Una interpretación de estos resultados sería que se requiere de los dos dominios KH y S1 para la agregación normal de las subunidades α de PNPasa. Si solamente el dominio S1 está presente, entonces habría superagregación y su ausencia ocasionaría la no interacción de las subunidades α . Esto haría que el dominio KH fuera necesario para evitar la superagregación.

8.7. Las Enzimas Construidas, Excepto PNPasa Δ S1-6xHis, son Retenidas en la Matriz de Agarosa-Níquel de los Ensayos Tipo “Trampa”.

En los ensayos de tipo trampa las proteínas silvestre y 71 se retienen en la matriz de agarosa-Níquel a causa de las 6 histidinas insertadas al final del gen. Esto se observa en el PAGE-SDS de la figura 34A. Esto permite continuar con la identificación de los elementos que pudieran unirse a las proteínas por ensayos con anticuerpos como se ha indicado. Coburn y colaboradores han reportado ensayos de PNPasa con 6xHis el extremo carboxilo en los que su enzima no es funcional después de ser retenida en la matriz (Coburn, 1998).

En este trabajo se pensó que poner las histidinas en el extremo carboxilo permitiría que estuvieran accesibles a la resina y por ello la proteína sería retenida. De esta manera se trabajó con enzimas completas conteniendo la bandera de histidinas. Afortunadamente en nuestra construcción esto resultó correcto y esta bandera permite que la proteína se retenga en la matriz de Ni^{+2} -NTA, sugiriendo que el extremo amino con las 6 histidinas queda accesible para su retención en la resina. Las histidinas son expuestas en la conformación tridimensional de la proteína.

La proteína $\Delta S1$ no se retiene en la matriz de agarosa-Níquel como se observa en la figura 34B. Una razón podría ser que no se hubieran insertado las 6 histidinas al final del gen pero esto se descarta ya que los iniciadores que los incluyeron en la reacción de PCR, incluyen inmediatamente después el sitio de término de la traducción y el sitio de restricción BamHI. Otra posibilidad más atractiva es que las 6 histidinas incluidas no estén accesibles en la superficie, es decir que se encuentren “secuestradas” en la enzima, impidiendo que se retenga en la matriz.

La mutante ΔKH si se retuvo en la matriz de agarosa-Níquel. Esto sugiere que para el caso de la eliminación en el dominio KH, la conformación adoptada por la proteína no es tal que impida la exposición de las 6 histidinas para que estén accesibles y pueda retenerse en la matriz.

8.8. Los Dominios KH y S1 de PNPasa son Necesarios en la Autoregulación.

De la misma manera que se realizó la prueba de autoregulación para la proteína PNPasa-6xHis se realizaron pruebas de autoregulación para las proteínas mutantes construidas. Se transformaron bacterias GF5322 *recA::Tn10* Ca^{+2} -competentes con los plásmidos que contienen los genes codificantes para las proteínas mutantes PNPasa71-6xHis, PNPasa $\Delta S1$ -6xHis, PNPasa ΔKH -6xHis y la proteína mutante PNPasa ΔKH -6xHis mutante 4 bandas (PNPasa ΔKH 4bandas-6xHis). Las colonias transformadas se purificaron y después se hicieron crecer en medio MacConkey con lactosa y ampicilina. El crecimiento se puede observar en la figura 35. Los resultados mostraron que las proteínas mutantes 71, $\Delta S1$, ΔKH y ΔKH 4bandas no autoregulan. Esto permite sugerir que los dominios S1 y KH son necesarios para una autorregulación eficiente.

8.9. PNPasa-6xHis se Retiene con Diferentes Concentraciones de NaCl y se eluye con 200 mM de Imidazol en el Ensayo Tipo “Trampa”.

Con los ensayos para encontrar las concentraciones óptimas de NaCl e Imidazol se observa que las concentraciones de NaCl utilizadas desde 100 mM a 300 mM no afectan la cantidad de PNPasa-6xHis retenida y eluida de la resina de agarosa. Los resultados de las pruebas para encontrar la concentración óptima de Imidazol a utilizar sugieren, que una concentración de 200 mM de Imidazol es suficiente para eluir la mayoría de la proteína retenida por la agarosa.

8.10. RNasa E se Une a PNPasa-6xHis en las Condiciones Probadas.

En los ensayos de inmunodetección usando las fracciones colectadas en los ensayos tipo trampa, la PNPasa-6xHis puede detectarse con el anticuerpo anti PNPasa de conejo a una dilución de 1: 25 000. Así mismo es posible detectar RNasa E, RhlB y Enolasa con los respectivos anticuerpos diluidos 1: 25 000. Los ensayos con el anticuerpo anti RNasa E mostraron que esta proteína se eluye en las fracciones de las proteínas que no se unen a la resina y de lavado. Adicionalmente la RNasa E puede ser detectada en la fracción de elución de PNPasa-6xHis. Es probable que las condiciones utilizadas en el ensayo no sean las óptimas para que RNasa E se una a PNPasa-6xHis. Por ello es necesario variar las condiciones del ensayo para encontrar las condiciones óptimas de unión. Cabe mencionar que con las condiciones probadas RNasa E no se une de manera inespecífica a la resina, esto se observa en la fracción eluida con Imidazol para la cepa pnp(-). Sugiriendo que es necesaria la unión de PNPasa-6xHis a la resina para que se una también RNasa E. Respecto a RhlB, los extractos ensayados con el anticuerpo de conejo anti-RhLB mostraron que RhlB se une a la resina por que está presente en igual cantidad en las tres fracciones de carga, lavado y elución. Esto se concluye a partir de los ensayos en pnp-6xHis y pnp(-), ya que en ambos se observan bandas de la misma intensidad,

es decir, que la unión de RhlB a la resina es independiente de la unión de PNPasa-6xHis. Esto no permite saber si RhlB se une a PNPasa-6xHis, por lo que es necesario encontrar las condiciones óptimas del ensayo en las que RhlB no se una a la resina. Por lo que respecta a Enolasa, esta proteína está presente en una cantidad considerable en el lavado previo a la elución de PNPasa-6xHis, pero no puede observarse Enolasa en los eluatos de PNPasa-6xHis. Esto sugiere que Enolasa no se une a PNPasa-6xHis en nuestro ensayo. Está documentado que RNasa E organiza el Degradosoma (Vanzo *et al*, 1998) y por lo tanto se espera que RNasa E se una a PNPasa-6xHis en los ensayos de tipo trampa. Por eso es necesario encontrar las mejores condiciones de unión de RNasa E a PNPasa-6xHis. Una vez unida RNasa E en una cantidad suficiente, deben unirse RhlB y Enolasa.

9. CONCLUSIONES

1. Se desarrolló un sistema para estudiar interacciones protéicas en el Degradosoma de *E. coli*
2. Se construyeron vectores de expresión de mediana copia que contienen los genes *pnp-6xHis*, *pnp71-6xHis*, *pnp Δ S1-6xHis* y *pnp Δ KH-6xHis* mutantes de *E. coli* con 6 residuos de Histidina en el extremo carboxilo del gen.
3. Se caracterizaron los vectores construidos con enzimas de restricción.
4. La expresión de la proteína PNPasa-6xHis no se regula en el sistema de 2 plásmidos y tampoco en el sistema monoplasmídico, a pesar de que el gen represor *LacIq* funciona adecuadamente.
5. Las seis Histidinas incluidas al final de los genes *pnp-6xHis*, *pnp71-6xHis*, *pnp Δ S1-6xHis* y *pnp Δ KH-6xHis* no interfieren con la actividad enzimática de polimerización de ADP *in vitro* de las proteínas PNPasa-6xHis, PNPasa-71, PNPasa- Δ S1 y PNPasa- Δ KH.
6. La proteína PNPasa-6xHis es capaz de autorregular portranscripcionalmente la expresión de una PNPasa silvestre. Las proteínas PNPasa-71, PNPasa- Δ S1 y PNPasa- Δ KH no son capaces de autorregular de manera postranscripcional la expresión de una PNPasa silvestre. Los dominios S1 y KH son necesarios para la autoregulación de PNPasa.
7. Los dominios S1 y KH son necesarios para la actividad de polimerización de ADP

8. Los dominios SI y KH controlan la agregación. El dominio SI favorece la agregación y el dominio KH evita la agregación excesiva en PNPasa.

9. Se ha mostrado que en nuestros ensayos tipo "Trampa" RNasaE se une a PNPasa-6xHis en pequeñas cantidades. La Enolasa no se une a PNPasa-6xHis y la RhlB se une a la resina en las condiciones probadas.

10. El sistema diseñado permite retener a las proteínas PNPasa-6xHis, PNPasa71-6xHis y PNPasa Δ KH-6xHis en una resina de Agarosa-Ni⁺². Aunque hay evidencia de retención específica de RNasa E con la PNPasa-6xHis no está claro si el Degradosoma de *E. coli* es retenido junto con estas proteínas. La proteína PNPasa- Δ S1 no se retiene por el sistema diseñado.

11. Se aisló una nueva proteína mutante, PNPasa Δ KH4bandas-6xHis, que es capaz de realizar la actividad enzimática de polimerizar ADP *in vitro*, en geles nativos de poli(acrilamida). Sin embargo, muestra 4 bandas de polimerización diferentes. Esta proteína no es retenida en Agarosa-Ni⁺², ni es capaz de autoregular postranscripcionalmente la expresión de una PNPasa silvestre.

12. Es posible realizar ensayos tipo "Trampa" para PNPasa-6xHis con altas concentraciones de NaCl hasta de 300 mM.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Anderson J. S. J. and Parker R. (1998) The 3' to 5' dégradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SK12 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex *EMBO J* **17**: 1447-1506.
2. Baumeister R., Flache P., Melefors O., von Gabain A., Hillen W (1991) Lack of a 5' non-coding region in Tn1721 encoded tetR mRNA is associated with a low efficiency of translation and a short half-life in *Escherichia coli* *Nucleic Acids Res.* **19**: 4595-4600.
3. Belasco J. G. (1993). mRNA degradation in procaryotic cells: an overview. In control of messenger RNA stability. J. C. Belasco and Braverman, eds Academic Press New York pp 3-12
4. 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 rxcA transcript. *Cell.* **40**:171-181.
5. Belasco J. G., Higgins C. F. (1988) Mechanisms of mRNA decay in bacteria: a perspective. *Gene.* **72**: 15-23
6. Bessarab D. A., Kaberdin V. R., Wei C. L., Liou G. G., Lin Chao S. (1998) RNA componets of *Escherichia coli* degradosome: evidence for rRNA decay *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 3157 -3161.
7. Blum E., Py B., Carpousis A. J., Higgins C.F. (1997) Polyphospate kinase is a component of the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Mol. Microbiol.* **26**: 387-398
8. Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of micrograme quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**: 248-254

- 9 Braun F., Hajnsdorf E., Règnier P. (1995) Polynucleotide Phosphorylase is required for the rapid degradation of the RNase E-Processed *rpsO* messenger RNA of *Escherichia coli* devoid of its 3' hairpin *Mol. Microbiol.* **19**: 997-1005
10. Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl K. (1999) Current Protocols in Molecular Biology. Ausubel F. M. eds. John Wiley and Sons Inc. U. S. A.
11. Bycroft M., Hubbard T. J. P., Proctor M. Freund S.M.V., Murzin A. G. (1997) The solution structure of the S1 RNA binding domain: a member of an ancient nucleic acid-binding fold. *Cell.* **88**: 235-242
12. Carpousis, A. J., G. Van Houwe, C Ehrestman, H M. krisch. (1994) Copurification of *E. coli* RNaseE and PNPase: Evidence for a specific association between two enzymes important in RNA processing and degradation. *Cell.* **76**: 889-900
13. Carpousis A. J., Vanzo N. F. Raynal L. C. (1999) mRNA a degradation a tale of poly(A) and multiprotein machines. *Trends Genet.* **15**: 24-28.
14. Churchward G. A., Belin D., Nagamine Y. (1984) A pSC101-derived plasmid which shows no sequence homology to other commonly used cloning vectors. *Gene.* **31**: 165-171.
15. Coburn G. A., Mackie G. A. (1999) Degradation of mRNA in *Escherichia coli* and old problem with some news twist. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* **62**: 55-108.
16. Deutscher M. P., Reuven N. B. (1991) Enzymatic basis for hydrolytic versus phosphorolytic mRNA degradation in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**: 3277-3280.
17. Farabaugh P. J., Schmeissner U., Hofer M., Miller J. H. (1978) Genetic studies of the lac repressor. VII. On the molecular nature of spontaneous hotspot in the *lacI* gene of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **126**: 847-857
18. Garcia-Mena, J. (1992) Polynucleotide phosphorylase, *sib* and gene expression Tesis Doctoral, CINVESTAV, México.

19. García-Mena, J., Asis Das, Sánchez-Trujillo A., Portier C., Montañés C. (1999) A novel mutation in the KH domain of polynucleotide phosphorylase affects autoregulation and mRNA decay in *Escherichia coli* *Molecular Microbiology*. **33**: 235-248
20. Godefroy-Colburn T., Grunberg-Manago M. (1972) Grunberg-Manago, 1963. In *The Enzymes*,. Ney York/London Academic Press 3rd ed **7**: 533-752
21. Griffiths A. J. F., Miller J. H., Suzuki D. T., Lewontin R. C., Gelbart W.M. (1998) An introduction to genetic analysis. W H Freeman and Co. U. S. A. pp 385.
22. Grunberg-Manago, M. (1999) Messenger RNA stability and its role in control of gene expression in bacteria and phages *Annu. Rev. Genet.* **33**: 193-227.
23. Hayes R., Kudlar J., Schuster G., Gabay L., Maliga P., Gruissem W. (1996) Chloroplasts mRNA 3'-end processing by a high molecular weight protein complex is regulated by nuclear encoded RNA binding proteins. *EMBO J.* **15**: 1132-1141.
24. Hervieu G. (1997) Elsevier Trends Technical Tips Online. MRC Molecular Neuroscience Group, Department of Neurobiology, Babraham Institute, Cambridge, UK, CB2 4AT. Reference no. T01089. (http://tto.trends.com/tto/index_of_TTO.shtml)
25. Laemmli U. K. (1970) Clavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680-685.
26. Littauer V. Z., Soreq H. (1982) Polynucleotide phosphorylase. In the enzymes Boyer. P. D. (ed) Vol. XV, Nucleic Acid Part B. Academic Press. Pp 517-553.
27. Luttinger A., Hann J., Dubnau D. (1996) Polynucleotide phosphorylase is necessary for competence development in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **19**: 343-356.
28. McDowell, K. J., S. N. Cohen. (1996) The N-terminal domain of the *rne* gene product has RNase E activity and is nonoverlapping with the arginine-rich RNA-binding site *J. Mol. Biol.* **255**: 349-355.

- 29 Margossian, S P et al, (1996) The DEXH box protein Suv3p is a componente of a yeast mitochondrial 3'- to -5' exoribonuclease that suppresses group I intron toxicity. *Cell*. **84**: 119-209.
- 30 Miczak A., Kaberdin, V. R., Wei, C L , Lin-Chao, S. (1996) Proteins associated with Rnase E in a multicomponent ribonucleolytic complex. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **93**: 3865-3869
31. Mitchell P., Petfalski E , Sherchenko A , Mann M., Tollervey D. (1997) The exosome a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'-5' exoribonucleases. *Cell*. **91**: 475-466.
32. Montañez C , Bueno J., Schhmeissner U., Court D L., Guarneros G. (1986) Mutations of bacteriophage lambda that define independent but overlappin RNA processing and transcription termination sites. *J. Mol. Biol* **191**: 29-37.
33. Mudd E A., Higgins C. F. (1993) *Escherichia coli* endoribonuclease RNase E. autoregulation of expression and site-specific cleavage of mRNA. *Mol Microbiol.* **9**: 557-568.
34. Musco G., Stier G., Joseph C., Castiglione M. M. A., Nilges M., Gibson T. J., Pastore A. (1996) Three-dimensional structure and stability of the KH domain: molecular insights into the fragile X syndrome. *Cell*. **85**: 237-245.
35. Newbury S. F., Smith N. H., Robinson E. C., Hiles I. D., Higgins C. F. (1987) Differential mRNA stability controls relative gene expression within a polycistronic operon. *Cell*. **51**: 1131-1143.
36. Petersen C. (1993). Translation and mRNA stability in bacteria: a complex relation ship pp 117-147.
- 37 Portier C., Donor L., Grunberg-Manago M., Règnier P. (1987) The first step in the functional inactivation of the *Escherichia coli* polynucleotide phosphorylase messenger is a ribonuclease III processing at the 5' end. *EMBO J.* **6**: 2165-2170.
38. Portier C , Règnier P. (1984) Expression of the rpsO and pnp genes: structural analysis of a DNA fragment carrying their control regions. *Nucleid Acid Res.* **12**: 6091-6102.

39. Portier C. (1975). Quaternary structure of polynucleotide phosphorylase from *Escherichia coli* : evidence of a complex between two types of polypeptide chains *Eur. J. Biochem.* **55**: 573-582
40. Py B., Higgins C. F., Krisch H. M., Carpousis. J. (1996) A DEAD box RNA helicase in the *Escherichia coli* degradosome. *Nature.* **381**: 169-172.
41. Règnier P., Grunberg-Manago M., Portier C. (1987) Nucleotide sequence of the pnp gene of *Escherichia coli* encoding polynucleotide phosphorylase Homology of the primary structure of the protein with the RNA-binding domain of ribosomal protein S1. *J Biol Chem* **262**: 63-68.
42. Robert-Le Meur M., Portier C. (1992) *Escherichia coli* polynucleotide phosphorylase expression is autoregulated through an RNase III-dependent mechanism. *EMBO J.* **11**: 2633-2641.
43. Robert-Le Meur, M., Portier, C. (1994) Polynucleotide Phosphorylase of *Escherichia coli* induces the degradation of its RNase III processed messenger by preventing its translation. *Nucleid. Acid. Res.* **22**: 397-403
44. Ross J. (1995). mRNA stability in mammalian cells *Microbiol Rev.* **59**: 423-450
45. Sambrook-Fritsch-Maniatis (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2a edición. Editorial: Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp. B 24
46. Singer P., Nomura M. (1985) Stability of ribosomal protein mRNA and translational feedback regulation in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet.* **199**: 543-546.
47. Stüber D., Matile H., Garotta G. (1990) System for high-level production in *Escherichia coli* and rapid purification of recombinant proteins: application to epitope mapping, preparation of antibodies, and structure functions analysis. In *Immunological Methods*, Lefkovits, Y. and Pernis, B., eds., vol IV, Academic Press, Ney York, pp 121-152.
48. Takahashi R., Valeika S R., Glass K. W (1992) A simple method of plasmid transformation of *E. coli* by rapid freezing. *Biotechniques.* **13**: 711-715.

49. Taraseviciene, L., G R Björk, B E Uhlin. (1995) Evidence for an RNA binding region in the *Escherichia coli* processing endoribonuclease RNase E. *J. Biol. Chem.* **246**: 6297-6802.
50. Thang, M. N. Thang, D. C., Leautey, J. (1967) Séparation et identification de polynucléotide phosphorylase par électrophorèse sur gel polyacrylamide. *C. R. Acad. Sci. Paris.* **265(Série D)**: 1823-1826.
51. Vanzo N. F., Li Y. S., Py B., Blum E., Higgins C. F., Raynal L., Krisch H., Carpousis A. (1998) Ribonuclease E organizes the protein interactions in *Escherichia coli* RNA degradosome. *Genes Dev.* **12**: 2770-2781.
52. Xu F., Cohen S. N. (1995) RNA degradation in *Escherichia coli* regulated by 3' adenylation and 5' phosphorylation. *Nature.* **374**: 180-183
53. Ybarra J., Horowitz P.M (1996) Nucleotides reveal polynucléotide phosphorylase activity from conventionally purified GroEL. *J Biol Chem.* **271**: 25063-25066.
54. Zhang P., Vigne J. L., Mellon S. (1998) Polirybonucleotide phosphorilase is a double-stranded DNA-binding protein. *DNA and cell biology.* **17**: 169-175