



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**UNA NUEVA MUTACIÓN EN EL DOMINIO KH DE LA
ENZIMA POLINUCLEÓTIDO FOSFORILASA QUE
AFECTA LA AUTORREGULACIÓN Y EL DECAIMIENTO
DEL mRNA EN *Escherichia coli* .**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

EN LA MODALIDAD DE ARTÍCULO PUBLICADO

P R E S E N T A

ALEJANDRA SÁNCHEZ TRUJILLO

2005



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.

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. CECILIA MONTAÑEZ OJEDA.

El presente, es el producto del trabajo en colaboración de varias personas, autores del artículo original “*A novel mutation in the KH domain of polynucleotide phosphorylase affects autoregulation and mRNA decay in Escherichia coli*”. A continuación se indican los experimentos realizados por la autora de esta tesis; tanto los que forman parte del artículo original como los que complementan el trabajo experimental de tesis.

SECCIÓN I

- Construcción del vector pAJKB que se empleó para producir la sonda anti *galK* 5', esta sonda fue utilizada para detectar los transcritos que pasan a través del terminador tI y llegan hasta el gene reportero *galK*.
- Determinación de la estabilidad de los transcritos *pgal-tI* y *pgal-tI-galK*. Se inhibió la transcripción celular y se realizó una cinética de extracción de RNA total de las cepas bacterianas silvestres y mutantes a diferentes tiempos, con el fin de establecer los tiempos más adecuados para este análisis (datos no mostrados).
- A los tiempos establecidos, se realizaron extracciones de RNA total de las cepas bacterianas N99 silvestre, N99 *pnp::tn5* y N99 *pnp-71* transformadas con cada uno de los plásmidos de interés (ver *Procedimientos Experimentales*).
- Las preparaciones de RNA se sometieron a ensayos de hibridación tipo “Northern blot” para lo que se sintetizaron las sondas anti-*sib* y anti-*galK*, así como los marcadores de peso molecular. Se calculó la vida media de los transcritos de interés.
- Se determinó el número de copias de cada uno de los plásmidos transformados en las diferentes cepas bacterianas.

SECCION II

- Construcción del vector pAJKE empleado para producir la sonda anti- *galK* 3', esta sonda fue utilizada para detectar los transcritos que pasan a través del terminador *tI* y llegan hasta el final del gene reportero *galK*.
- A tiempos establecidos y a las temperaturas permisivas y no permisivas para la expresión del gene de la RNasa E, se realizaron extracciones de RNA total de las cepas bacterianas N99 silvestre y N99 *rne*- transformadas cada una con los plásmidos pKG1800, pUS6 y pMS1 (ver *Procedimientos Experimentales*).
- Se sintetizaron mediante transcripción *in vitro* las ribosondas radiactivas anti-*sib*, anti-*galK* 5', anti-*galK* 3' así como los marcadores de peso molecular.
- Se determinó la estabilidad de los transcritos *pgal - tI*, *pgal - tI - galK* y *pgal - galK*, utilizando ensayos de hibridación tipo "Northern blot" y se calculó la vida media de los transcritos detectados.

A mi mamá, con todo mi amor, por su esfuerzo, por el apoyo y los consejos que siempre me ha brindado, porque siempre esta dispuesta a escuchar y ayudar a los demás aún a costa de su bienestar.

A mi papá, con gran amor, porque me ha enseñado a no claudicar en los momentos difíciles, por creer en mi. Gracias por su apoyo.

A Bulmaro, con amor, por su apoyo constante, porque con él he aprendido que el prisma con que se ve la vida es diferente para cada persona, así como los sueños y el camino que cada uno sigue. Por su ejemplo. Gracias por caminar conmigo.

A Isai Alejandro e Israel, porque son el motor de mi vida, por la alegría con la que llenan cada momento, porque me han enseñado a amar la vida.

A mis hermanos, Antonio, Jorge, Rubén, Esther y Norma, porque juntos hemos aprendido que la familia es nuestro mejor tesoro, y porque cada uno forma parte de mi corazón.

A la memoria de Marco Antonio Sánchez García, porque nos dejaste el bello recuerdo de tu presencia y la certeza de una vida nueva.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Cecilia Montañez Ojeda, con mucho cariño, por el apoyo y confianza que siempre me ha brindado, por todas sus enseñanzas y por el gran ser humano que es.

Al Dr. Jaime García Mena, porque el artículo publicado es en gran parte su trabajo, por su apoyo, valiosos consejos y atinados comentarios, y por su amistad.

A Ramsés Ilarraza Lomelí, por su amistad, por su experiencia y conocimientos compartidos en todo momento, y en la edición de las figuras de esta tesis.

A Adalberto Herrera Ramírez, por su apoyo técnico en el desarrollo de este trabajo y por saber ser un gran amigo.

A Víctor M. Ceja Orozco, por su apoyo en la transducción de las cepas utilizadas en la sección II de este trabajo, por sus valiosos comentarios y amistad.

Al Dr. Francisco Depardón Benítez, por su invaluable apoyo técnico y su amistad.

Al Dr. Carlos Fernández Tomas, por haber motivado mi gusto en la investigación, por creer en mí y por su valiosa amistad. Un cariñoso recuerdo.

A mis amigos y compañeros, Víctor, Francisco, Lulú, Adalberto, Ramsés, Fernando, Liliana y José.

A todos mis amigos, de ayer, hoy y siempre. Porque la verdadera amistad es un “don”, es un sentimiento puro, que se entrega sin reservas ni temores y sin esperar nada a cambio. Y yo soy afortunada al contar con cada uno de ustedes.

A los Drs. Sergio Vaca Pacheco, Diego Arenas Aranda, Bulmaro Cisneros Vega y al M. en C. Ramón Víctor Moreno Torres, por la revisión de esta tesis.

ÍNDICE

Resumen	9
Introducción	11
Resultados	
El mRNA de la galactocinasa se estabiliza debido a la inactivación de la PNPasa	15
La mutación <i>sib1</i> reduce la terminación de la transcripción y la estabilidad del mRNA de galK.	18
Aislamiento de una PNPasa mutante que disminuye la expresión de la galactocinasa	21
El fenotipo bioquímico pleiotrópico de la mutante SGM71 es causado por una mutación en la subunidad α de la PNPasa.	23
La mutación <i>pnp71</i> substituye una glicina conservada en el dominio KH de la subunidad α de la PNPasa.	26
La mutación <i>pnp-71</i> disminuye la expresión del mRNA <i>pgal-sib1-galK</i>	27
La sustitución G-570D no incrementa la actividad intrínseca de intercambio de fosfato de la enzima PNPasa purificada	28
La sustitución G-570D causa una acumulación incrementada de la subunidad α de la PNPasa.	30
La mutante PNPasa 71 esta afectada en su autorregulación	32
Discusión	34
Procedimientos experimentales Sección I	
Cepas bacterianas, fagos y plásmidos	41
Condiciones de crecimiento de los cultivos bacterianos y mutagénesis con nitrosoguanidina	43

Preparación de extractos de <i>E. coli</i>	43
Actividades enzimáticas de los extractos crudos	44
Amplificación y manipulación de DNA	44
Determinación de la vida media del mRNA de la galactocinasa	45
Cuantificación de la cantidad de plásmido	46
Preparación de la enzima PNPasa y análisis de sus actividades catalíticas	47
Electroforesis y cuantificación de proteínas	47
Inmunodetección de la PNPasa	48
Sección II	
Introducción	49
Resultados	
La RNasa E participa en el decaimiento del mRNA de la galactocinasa.	50
La RNasa E participa en el procesamiento del mRNA de <i>tI / sib</i>	52
Discusión	57
Procedimientos experimentales Sección II	
Cepas bacterianas y plásmidos	60
Amplificación y manipulación de DNA	60
Condiciones de crecimiento de los cultivos bacterianos	61
Determinación de la vida media del mRNA de <i>tI/sib</i> y de la galactocinasa	61
Bibliografía	64

RESUMEN

La polinucleotido fosforilasa (PNPasa) es una exonucleasa, con actividad 3'-5', clave en el decaimiento del mRNA en bacterias. En el presente estudio se reporta el aislamiento de una nueva mutante de la PNPasa de *E. coli* que afecta su control autógeno y el decaimiento del mRNA. Mediante el empleo de un vector bacteriano mostramos que la inactivación de la PNPasa, por medio de la inserción de un transposón, incrementa la vida media del mRNA de la galactocinasa. En este vector, cuando el retroregulador (*sib/tI*) del gen *int* del bacteriofago lambda se coloca entre el promotor *pgal* y el gen estructural *galk* se disminuye severamente la expresión de *galk*, debido a la terminación de la transcripción.

La presencia de la mutación puntual *sibI* provoca que la transcripción pase a través del terminador de la transcripción *tI* y que se incremente la expresión de *galk*. Nosotros empleamos el vector que porta la mutación *sibI* para seleccionar mutantes de *E. coli* que reducen la expresión de *galk*. El análisis genético y molecular de una de las mutantes aisladas reveló que contiene una mutación en el gen *pnp*, el cual codifica para la subunidad catalítica α de la enzima PNPasa. La mutación responsable, que denominamos *pnp-71*, substituyó una glicina altamente conservada en el dominio KH de la PNPasa, por un aspartato. Como resultado de la sustitución G-570D, la mutante bacteriana presentó una acumulación elevada de la subunidad α lo que ocasionó a su vez, una actividad alta de la PNPasa; este resultado indica que existe un problema en la autorregulación de la enzima. Como era de esperarse, la subunidad α purificada mostró una movilidad electroforética normal en geles desnaturizantes. Sin embargo, la proteína mutante, presente en extractos crudos, mostró una movilidad electroforética alterada en geles no desnaturizantes, lo que

sugiere la formación de un nuevo complejo enzimático. Tomando en cuenta el papel que se le ha asignado al dominio KH en las interacciones RNA- proteína y proteína - proteína, nosotros proponemos un modelo para explicar como la mutación *pnp-71* podría afectar la autorregulación y el decaimiento del mRNA.

INTRODUCCIÓN

El procesamiento y degradación del RNA mensajero (mRNA), por medio de la acción concertada de las endo y exoribonucleasas, es un evento importante en el control de la expresión genética de todos los seres vivos (Belasco & Higginis, 1988). En *Escherichia coli* (*E. coli*), los componentes de la maquinaria de procesamiento/degradación incluye a las endoribonucleasas: ribonucleasa III y la ribonucleasa E; así como las exoribonucleasas polinucleotido fosforilasa (PNPasa) y la ribonucleasa II (Donovan & Kushner, 1986; Guarneros & Portier, 1990; Court, 1993; Cohen & McDowall, 1977). En la mayoría de los mRNAs, las estructuras secundarias estables bloquean la acción de las exonucleasas y de esta manera protegen de la degradación a las secuencias que se encuentran río arriba e incrementan su estabilidad *in vivo* (Higgins *et al.*, 1993; Cisneros *et al.*, 1996). Se ha propuesto que un factor celular llamado *exoribonuclease-impeding factor* (EIF), se une al tallo 3' de algunos mRNAs e incrementa el tiempo que dura la exoribonucleasa unida a las estructuras de horquilla (Causton *et al.*, 1994). La degradación de estos mensajeros se inicia por medio de un corte endonucleolítico que ocurre ya sea dentro de la estructura secundaria 3' o arriba de ella, consecuentemente, se generan productos que son susceptibles a una rápida degradación por exonucleasas.

La retroregulación del gen *int* del bacteriofago λ es un ejemplo sobresaliente de un mecanismo post-transcripcional de procesamiento-degradación promovido por una estructura de horquilla 3' (Montañez *et al.*, 1986; Guarneros, 1988). El gen *int* puede ser transcrito a partir de dos promotores; *pI* y *pL*. Sin embargo, durante la infección de *E. coli* por el fago λ , el transcrito producido por *pL* no conduce a la expresión de la proteína Int,

debido a que está sujeto a un control de antiterminación de la transcripción mediado por la proteína N del fago λ . Este control involucra el corte del mensajero *pL-int* en la región *sib*, justo en el extremo 3' de la región codificadora de *int* y su subsecuente degradación exonucleolítica (Schmeissner *et al.*, 1984a., Montañez *et al.*, 1986). En contraste, el transcrito de *pI*, regulado positivamente por la proteína activadora CII, concluye en el terminador *tI* (una estructura de horquilla que se sobrepone con *sib*). El transcrito *pI-int* no es procesado por la RNasa III, por lo tanto, permanece estable y expresa la proteína Int eficientemente (Miller *et al.*, 1981; Schmeissner *et al.*, 1984b). Las dos estructuras de horquilla formadas en la región *sib/tI* tienen efectos diferentes sobre la expresión de los genes colocados arriba de ellas. Cuando es clonado como módulo, la secuencia *sib/tI* puede proteger al RNA que se localiza río arriba de un ataque exoribonucleolítico. La introducción de mutaciones desestabilizadoras, como *sibI*, hacen que el RNA terminado sea susceptible a la degradación por la PNPasa (Cisneros *et al.*, 1996), mientras que permiten la expresión de genes colocados río abajo, lo cual es resultado de una terminación de la transcripción deficiente (Montañez *et al.*, 1986).

La PNPasa, una enzima conservada en el reino de las bacterias, tiene una participación crítica en el metabolismo del RNA (Littauer & Soreq, 1982). *In vitro*, la PNPasa purificada cataliza la degradación fosforolítica del RNA en dirección 3' \rightarrow 5', liberando nucleótidos difosfatos 5'. Una propiedad única de la enzima es su capacidad de formar polímeros largos con secuencia al azar a partir de ribonucleótidos difosfatos sin la necesidad de un molde. La PNPasa también cataliza el intercambio de fosfato entre el fosfato inorgánico y el fosfato β de los nucleótidos difosfatos (Grunberg-Manago, 1963).

El componente catalítico de la PNPasa es un homotrímero de la subunidad α , que consiste de 711 aminoácidos. Éste componente forma un complejo llamado degradosoma, que consiste de la RNasa E, el EIF, la polifosfatasa cinasa, la DnaK, la enolasa y la helicasa RhIB (Carpousis *et al.*, 1994; Py *et al.*, 1994; Miczak *et al.*, 1996; Blum *et al.*, 1997). El degradosoma posee una actividad dependiente de ATP que le ayuda a la PNPasa a degradar RNAs estructurados. A su vez la PNPasa puede asociarse con la RNasa III (Swatantra *et al.*, 1982). Aunque la degradación del mRNA en *E. coli* se lleva a cabo primordialmente por la RNasa II (Deutscher & Racher-Reuven, 1991), la PNPasa participa en la degradación de algunos mRNAs específicos (Higgins *et al.*, 1993), incluyendo el mensajero del gen *rpsO* (Braun *et al.*, 1995) y el RNA antisentido que reprime la replicación de los plásmidos del tipo ColE1 (Xu & Cohen, 1995). La PNPasa se ha implicado también en el desarrollo de la competencia en *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) (Luttinger *et al.*, 1996).

En *E. coli*, la expresión del gen de la subunidad catalítica de la PNPasa se autorregula a nivel post-transcripcional (Robert-Le Meur & Portier, 1992). En su autorregulación se requiere de un corte inicial del mensajero de la PNPasa por la RNasa III (Portier *et al.*, 1987); y es posible que la PNPasa reconozca un determinante expuesto en el extremo 5' de su mRNA previamente cortado (Robert-Le Meur & Portier, 1994). La estructura de la PNPasa aún no se ha descrito, sin embargo, su subunidad catalítica contiene un dominio S1 de unión a RNA que está formado por cinco fibras antiparalelas del tipo β -barril (Bycroft *et al.*, 1997). La región de la proteína, inmediatamente anterior al dominio S1 presenta una alta homología con el dominio KH que tiene la propiedad de unirse a RNA (Siomi *et al.*, 1994) además de participar en interacciones proteína-proteína (Zhang *et al.*, 1995). Mediante análisis de resonancia magnética nuclear (NMR) se ha resuelto la estructura

tridimensional del dominio KH de la proteína vigilina humana. Esta proteína está compuesta por un plegamiento estable $\beta\alpha\beta\beta\alpha$, en donde las dos hélices α adyacentes están conectadas por una horquilla flexible de glicina-lisina-X-glicina, altamente conservado (Musco *et al.*, 1996). El extremo carboxilo terminal de la PNPasa, que incluye los dominios KH y S1, es esencial para su actividad catalítica, como se demostró mediante el aislamiento de una mutante que presenta el dominio KH truncado debido a la inserción del transposon Tn5, justo antes del dominio KH. El alelo *pnp::Tn5* codifica para un péptido inestable que no posee actividad enzimática (Portier, 1980) e interesantemente, tampoco la función de autorregulación (Robert-LeMeur & Portier, 1992).

Con la finalidad de explorar la función de la PNPasa en el control genético post-transcripcional de *E. coli* y de investigar la relación entre su estructura y función, diseñamos un esquema de selección genética para el aislamiento de mutantes de la PNPasa. En este estudio, se describe una nueva mutante de la PNPasa que presenta una substitución del residuo de glicina más conservado dentro del dominio KH (Glicina-Lisina-X-Glicina). La mutante PNPasa aislada presenta un incremento en el decaimiento del mRNA de *galK*, el cual es controlado por la región *sib1* del fago lambda. La mutante está alterada también en su autorregulación, y por lo tanto, hay una acumulación importante de subunidades catalíticas en la célula. Se presentan evidencias de que la enzima mutante tiene una propiedad física distintiva que indica una alteración en su interacción proteína-proteína, lo cual podría explicar las características de la mutante.

RESULTADOS

El mRNA de la galactocinasa se estabiliza debido a la inactivación de la PNPasa

Para explorar el papel de la PNPasa en el decaimiento del mRNA, inicialmente investigamos la forma en que la inactivación de la PNPasa afectaba la estabilidad del gen reportero galactocinasa (*galK*), codificado en el plásmido pKG1800 (Fig. 1A). En este vector, el gen *galK* está controlado transcripcionalmente por su promotor *pgal*, produciendo una alta expresión de la galactocinasa. Se aisló el RNA total de las cepas silvestre y mutante isógena *pnp::tn5*, transformadas con el plásmido pKG1800, y se analizó mediante ensayos tipo *Northern blot*, empleando una sonda de RNA anti-*galK* 5'. La Figura 2A muestra que el plásmido pKG1800 produce transcritos abundantes de diversos tamaños que portan la región codificadora de *galK*. El transcrito más largo, de aproximadamente 1.8 kb, representa el mRNA de tamaño completo, que va desde el promotor *pgal* hasta el final de *galK*. Los transcritos más pequeños representan muy probablemente productos de degradación que resultan de una degradación 3' exonucleolítica, de un procesamiento endonucleolítico o de una combinación entre ambos fenómenos. La inactivación de la PNPasa, debido a la inserción del Tn5, incrementa de 1 minuto a aproximadamente 2.2 minutos la vida media de ambos tipos de mensajeros, los de tamaño completo y los productos de degradación (Fig. 2A, comparar los carriles de *pnp* y *pnp::Tn5*). Por lo tanto, la PNPasa puede influir sobre la degradación del mRNA de *galK*, al menos cuando se expresa a partir del vector pKG1800.

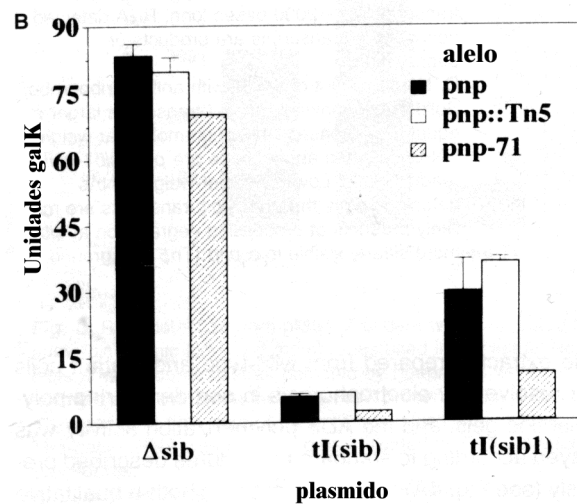
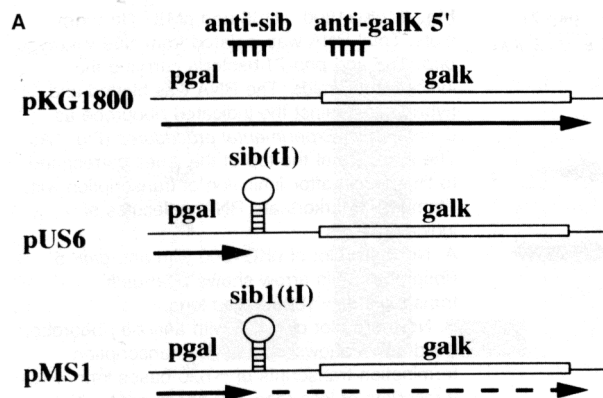


Figura 1. A. Vectores que expresan galactocinasa. El vector pKG1800 expresa el gen de la galactocinasa (*galk*) a partir del promotor *pgal* (flecha larga). En el vector pUS6, la galactocinasa no se expresa eficientemente debido a la presencia del terminador de la transcripción *tI* (flecha corta), que esta localizado en la región *sib* (0.23Kb) del fago λ (coordenadas 27724-27479). En el vector pMS1, la mutación *sib1* de *tI* provoca que la transcripción continúe más allá de *tI* permitiendo bajos niveles de expresión de *galk* (flecha discontinua). La horquilla representa la región *sib* (*tI*) o *sib1* (*tI*), y las barras no rellenas el cistron *galk*. Las barras dentadas representan las ribosondas utilizadas en los análisis de hibridación tipo “Northern blot”, *pgal* representa el promotor del operon de la galactocinasa.

B. Actividad de la galactocinasa en los diferentes alelos *pnp*. Los ensayos se llevaron a cabo como se describe en *Procedimientos Experimentales*. Los resultados representan el promedio de cuatro determinaciones independientes, excepto para Zgi:tn10 *pnp-71* con solamente dos ensayos. Los alelos PNPasa estuvieron en el fondo genético de la cepa S165 transformada con los vectores pKG1800 (Δ sib); pUS6 *tI* (*sib*) y pMS1 *tI* (*sib1*) (ver *Procedimientos Experimentales*).

Cuando la región *λsib* se clona entre *pgal* y *galk* (plásmido pUS6), el terminador *tI* actúa eficientemente para abolir casi completamente la transcripción de *galk* (Fig. 2B, carriles *pnp*), lo cual esta de acuerdo con los reportes previos (Schmeissner *et al.*, 1984b; Montañez *et al.*, 1986; Cisneros *et al.*, 1996). La inactivación de la PNPasa incrementa la estabilidad del transcrito terminado *pgal-tI*, como se demuestra cuando se utiliza una sonda anti-*sib* (Fig. 2B); su vida media se incrementa de 2.4 en el fondo *pnp* a 3.7 minutos en la cepa *pnp::Tn5*.

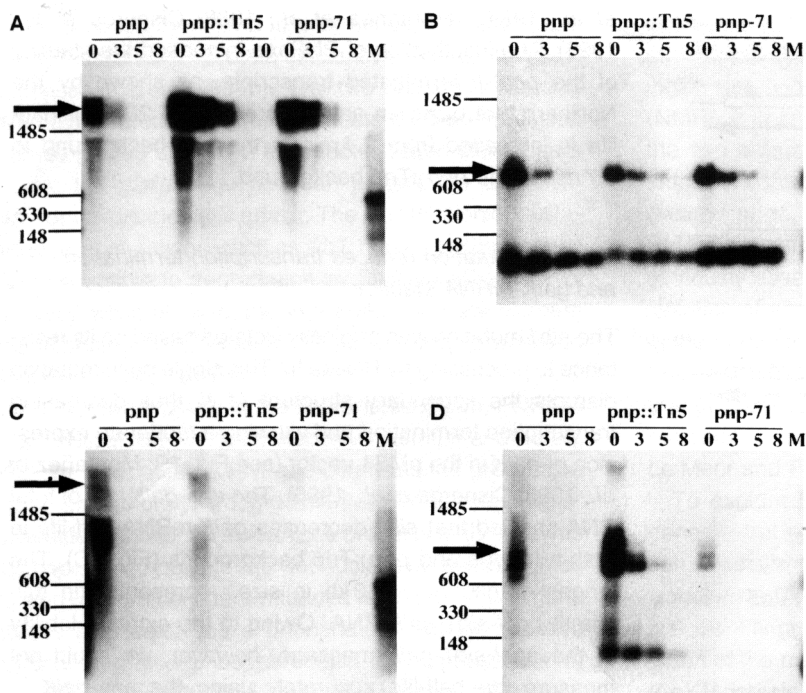


Figura 2. Análisis de hibridación tipo “Northern blot” de los vectores pKG1800, pUS6 y pMS1. Se aisló el RNA total a partir de los cultivos bacterianos de las cepas N99 tipo silvestre, *pnp::tn5* y *pnp71*, transformadas con los plásmidos que se indican. El RNA se sometió a electroforesis en geles de agarosa, se transfirió a las membranas de nylon y se hibridó usando las ribosondas indicadas, como se describe en la sección de *Procedimientos Experimentales* (Fig. 1A). Los números colocados en la parte superior de los carriles corresponden al tiempo en minutos que transcurrió después de que

se inhibió la transcripción con rifampicina. Los marcadores que se emplearon son moléculas de RNA que tienen el tamaño referido.

- A. Hibridación tipo *Northern blot*, plásmido pKG1800 con la ribsonda anti-*galK* 5'. La flecha muestra los transcritos *pgal-galK* que tienen 1800 bases de longitud.
- B. Hibridación tipo *Northern blot*, plásmido pUS6 con la ribsonda anti-*sib*. La flecha muestra los transcritos terminados *pgal-ti(sib)* de ~630 bases de longitud: los transcritos de tamaño menor a 150 bases son muy probablemente productos de procesamiento en la región *sib*.
- C. Hibridación tipo *Northern blot*, plásmido pMS1 con la ribsonda anti-*galK* 5'. La flecha muestra los transcritos *pgal-sib1-galK* que tienen una longitud de ~2000 bases. Los RNAs detectados por debajo de estos transcritos son productos de degradación.
- D. Hibridación tipo *Northern blot*, plásmido pMS1 con la ribsonda anti-*sib*. La flecha muestra los transcritos *pgal-sib1* que son iguales o más grandes que 630 bases. Los RNAs de alto peso molecular detectados corresponden a transcritos *pgal-sib1-galK*, los cuales pasan más allá de la señal de terminación de la transcripción. Los RNAs de bajo peso molecular detectados por debajo de los transcritos *pgal-sib1* son probablemente productos de procesamiento a nivel de la región *sib1*, los cuales son más visibles en una cepa *pnp::Tn5*.

La mutación sib1 reduce la terminación de la transcripción y la estabilidad del mRNA de galK.

La mutación *sib1* se aisló en base a su resistencia al procesamiento por la RNasa III. Esta mutación puntual altera la estructura secundaria de *tI*, de esta manera, disminuye la terminación de la transcripción y permite una expresión moderada de *galK* a partir el vector pMS1 (ver Fig. 1B; Montañez *et al.*, 1986; Cisneros *et al.*, 1996). El ensayo de hibridación empleando la sonda anti-*galK*, muestra que la mutación *sib1* disminuye la vida media del mRNA de *galK* en ambas cepas, la silvestre y la *pnp::Tn5* (Fig. 2 C). El transcrito de tamaño mayor, aproximadamente 2.0 kb, representa el mRNA *pgal-sib1-galK* de tamaño completo. Debido a la extrema labilidad del transcrito *pgal-sib1-galK*, no fue posible medir

su vida media de una manera confiable, utilizando la sonda anti-*galK* 5', incluso en la cepa *pnp::Tn5*.

No obstante, observamos en la cepa *pnp::Tn5*, un incremento de ~1.7 veces en el nivel de mRNA de *galK* que se expresan a partir del vector pMS1 con respecto a la cepa silvestre (Fig. 3B). Además, cuando el RNA total de las mismas cepas fue analizado con la sonda anti-*sib*, ambos transcritos, *pgal-sib1-galK* y *pgal-sib1*, presentan una mayor estabilidad en la cepa mutante *pnp::Tn5* (Fig. 2D). El nivel del transcrito *pgal-sib1* fue cinco veces mayor en la cepa *pnp::Tn5* que en la cepa parental *pnp +* (Fig. 3A). Juntos, estos resultados indican i) que la estructura *sib1-tI* disminuye la estabilidad de la secuencia *galK*, que está río abajo y ii) que la PNPasa promueve el decaimiento del mRNA de *galK* en este sistema plasmídico.

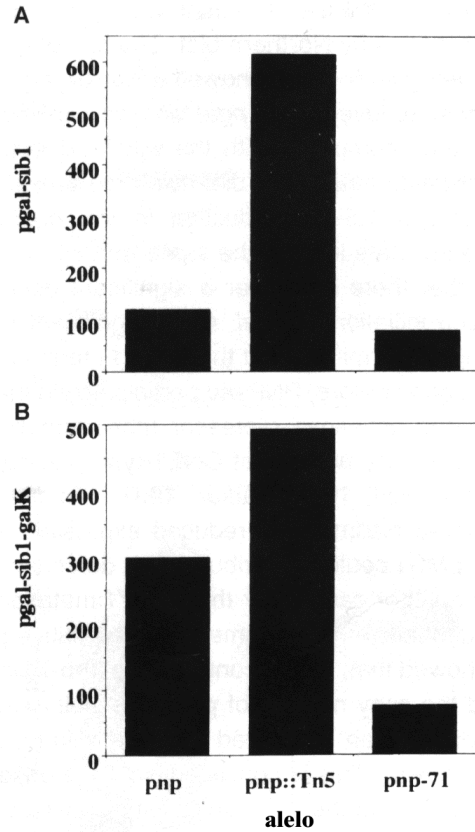


Figura 3. Detección de RNA del plásmido pMS1. Los datos de las densidades ópticas (DO) se obtuvieron de las películas autoradiográficas y de las membranas que se usaron en los experimentos de hibridación tipo “Northern blot”. Las cantidades de RNA que se detectaron con las ribosondas se normalizaron usando las cantidades de RNA total presente en las membranas de nitrocelulosa al tiempo cero de inhibición de la transcripción por rifampicina. El mRNA de *galk* se cuantificó como se indica en *Procedimientos Experimentales*.

A. El RNA de *pgal-sib* se detectó usando una ribosonda anti-*sib*.

B. El mRNA de *pgal-sib1-galk* se detectó usando una ribosonda anti-*galk* 5’.

Aislamiento de una PNPasa mutante que disminuye la expresión de la galactocinasa.

Enseguida, decidimos utilizar el plásmido pMS1 para seleccionar mutantes que inhibieran la expresión de *galK*. Potencialmente, estas mutantes podrían haber adquirido la habilidad para degradar el mRNA de *galK* más rápidamente, permitiendo así la identificación de componentes que participan en el sistema normal de degradación del mRNA en *E. coli*. La selección de mutantes deficientes en la expresión de *galK* es posible ya que la expresión del gen *galK*, en ausencia de las otras enzimas del operon *gal* causa toxicidad, como resultado de la acumulación de galactosa-1- fosfato (Shapiro and Adhya, 1969). Como era de esperarse, la cepa de *E. coli* S165, que carece del operon *gal* por una deleción, se convierte en sensible a la galactosa cuando se transforma con el vector pMS1. Sin embargo, la expresión moderada de galactocinasa a partir del plásmido pMS1 no inhibe completamente el crecimiento celular, sino que ocasiona la producción de colonias planas y rugosas sobre las cajas de medio de cultivo LB-galactosa. En contraste, el vector pKG1800 que no contiene la secuencia terminadora *tI*, sí causa una inhibición completa del crecimiento, mientras que el plásmido pUS6, que contiene la región silvestre *sib/tI* clonada entre *pgal* y *galK*, produce colonias redondas y lisas. Por lo tanto, existe una relación directa entre el nivel de expresión de la galactocinasa y el crecimiento y morfología de las colonias.

Para seleccionar las mutantes de *E. coli* que presentaran una disminución en la expresión de *galK*, sometimos a la cepa S165 a mutagénesis con el químico nitrosoguanidina. Se transformó al banco de mutantes con el vector pMS1 y seleccionamos las transformantes resistentes a la ampicilina (Amp) en cajas de medio LB-Gal-Amp. Una vez que se obtuvo un crecimiento suficiente de las colonias se seleccionaron las colonias

mutantes que toleraban la galactosa, las cuales formaron colonias redondas y lisas sobre un fondo de colonias planas y rugosas. Una de estas mutantes fue la SGM71. En experimentos subsecuentes, demostramos que esta mutante expresa únicamente 6 unidades de galactocinasa a partir del plásmido pMS1 mientras que con el mismo plásmido expresa 29 unidades de galactocinasa en la cepa S165.

La expresión reducida de *galK* en la mutante SGM71 puede ser el resultado de una variedad de causas, incluyendo defectos en la iniciación de la transcripción, aumento en la eficiencia de la terminación de la transcripción, decremento en la traducción o la hiperdegradación del mRNA de *galK*. En apoyo a la última posibilidad, se puede mencionar el resultado obtenido con el análisis de “Northern blot”, el cual sugirió que el decaimiento de los mRNAs que contienen la región *sib1* esta alterado en la mutante SGM71. Este hallazgo preliminar nos motivo a analizar la actividad de PNPasa en la mutante SGM71. Para este propósito, se prepararon extractos crudos a partir de cultivos de la cepa silvestre o de la cepa mutante, y se midió la actividad de polimerización de ADP, en geles de poliacrilamida no desnaturizantes, de acuerdo a los procedimientos estandarizados que se describieron anteriormente (Fig.4A). Efectivamente, se encontraron cambios cualitativos y cuantitativos en la actividad de PNPasa en la mutante. Primeramente, la banda que corresponde con la actividad de PNPasa de la mutante migró más lentamente con respecto a la del tipo silvestre. En segundo lugar, la cantidad de producto polimerizado poli (A), fue mayor en la mutante que en el tipo silvestre. Estos resultados demuestran que una mutación (o una combinación de mutaciones) en la cepa mutante SGM71 tiene dos efectos sobre la PNPasa: (i) un incremento en la actividad de PNPasa, lo cual podría ser el resultado de una elevada expresión de la subunidad α de la PNPasa, la activación de su actividad catalítica intrínseca

o la inactivación de un inhibidor; (ii) una movilidad electroforética anormal, la cual podría ser el resultado de una agregación diferencial entre moléculas de la PNPasa o interacciones con otras proteínas.

El fenotipo bioquímico pleiotrópico de la mutante SGM71 es causado por una mutación en la subunidad α de la PNPasa.

Enseguida, para determinar si uno o más de uno de los atributos bioquímicos de la PNPasa que se observan en la mutante SGM71 era causado por una mutación en la subunidad α de la PNPasa, llevamos a cabo experimentos de transducción con el fago P1. Se empleó la cepa bacteriana *Zgi:Tn10-pnp-nusA*, que porta en su genoma un transposon Tn10 (Tet^R) unido a la región *pnp-nusA*, para transducir a la cepa SGM71 y producir primero transductantes Tet^f nusA⁺ que retuvieran el fenotipo completo de la PNPasa71 (Fig. 4A, carril 3). Subsecuentemente, una de las transductantes SGM71 *Zgi::Tn10* se usó como donadora para transferir el gene *pnp* hacia la cepa parental SA165 así como a un juego de otras cepas. De hecho, en cada caso una fracción significativa de las transductantes Tet^R adquirió el fenotipo bioquímico de la cepa SGM71, lo que establece firmemente que la mutación responsable esta ligada al locus *pnp*. Las cepas S165 *pnp-71* recién construidas expresaron 11 unidades de galactocinasa comparado con las 29 unidades producidas por la *pnp* parental (Fig. 1B). Estos resultados muestran claramente que tanto la propiedad bioquímica alterada en la PNPasa como el fenotipo del decaimiento del mRNA son causados por la misma mutación que esta ligada al locus *pnp*.

Para discernir si la mutación responsable del fenotipo *pnp71* estaba localizada en el gene *pnp* o no, aislamos el gene *pnp* a partir del cromosoma mutante de la cepa SGM71, mediante amplificación por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y lo clonamos en un vector de baja copia. Para comparar, amplificamos por PCR también el gene *pnp* silvestre a partir del plásmido pYN115 y lo clonamos (ver *Procedimientos Experimentales*). Los iniciadores utilizados en la reacción de PCR se diseñaron para poder amplificar un fragmento de DNA que incluyera desde la región del terminador *tI*, previa al gene *rpsO* hasta el terminador *tI2* que esta colocado después del gene *pnp* (Regnier *et al.*, 1987). Los productos de PCR se clonaron en el vector pGB2 y se generaron los plásmidos pCAS11 (*pnp*) y pCAS21 (*pnp-71*). Se analizaron los extractos obtenidos a partir de las cepas transformadas con cada uno de los vectores mencionados mediante electroforesis en geles nativos y se estableció que la mutación presente en la cepa SGM71 esta localizada dentro del fragmento clonado, ya que cada una de las dos propiedades bioquímicas de la mutante PNPasa71 (la actividad PNPasa elevada y su movilidad alterada) fueron retenidas por el plásmido que porta la copia del gene *pnp-71*. La cepa N99 *pnp::Tn5*, la cual no tiene actividad de PNPasa (Fig. 4A, carril 2), se transformó con los plásmidos pCAS11 y pCAS21, y en los extractos crudos preparados se analizó la actividad de polimerización de ADP. Como se esperaba, el plásmido pCAS11 complementó la actividad silvestre de la PNPasa en estas células (Fig. 4A, carril 4), mientras que el plásmido pCAS21 les confirió el fenotipo SGM71. De forma interesante, la cepa *pnp+* transformada con el plásmido pCAS21, mostró que la coexpresión dentro de una misma célula de las subunidades mutante y silvestre de la PNPasa originan enzimas PNPasas con una movilidad intermedia en geles no desnaturalizantes (Fig. 4A, carril 7).

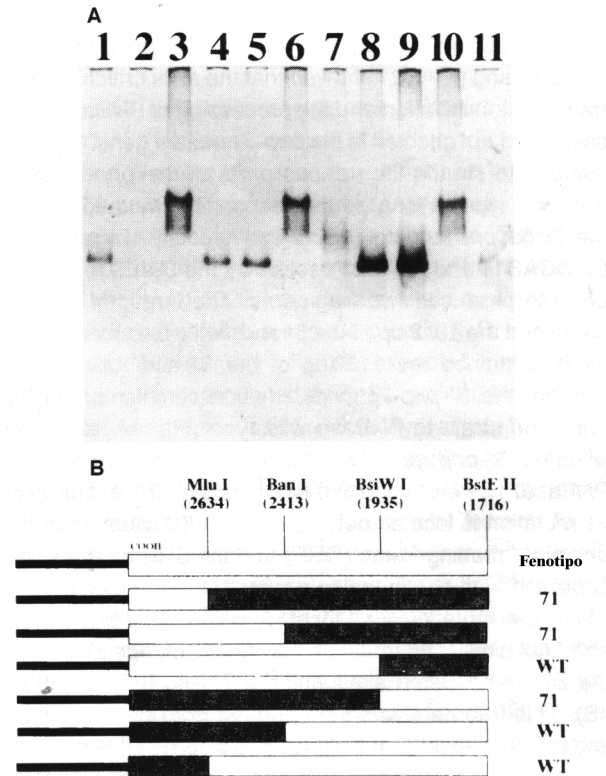


Figura 4. A. Actividad de polimerización de la PNPasa en extractos crudos de *E. coli*. Se analizó la actividad de polimerización de ADP en extractos crudos de N99 con diferentes combinaciones de alelos *pnp* presentes en el cromosoma y en los vectores, como se indica en *Procedimientos Experimentales*. Carril 1, *pnp*; carril 2, *pnp*::Tn5; carril 3, *pnp71*; carril 4, *pnp*::Tn5/pCAS11; carril 5, *pnp*/pCAS11; carril 6, *pnp*::Tn5/pCAS21; carril 7, *pnp*/pCAS21; carril 8, *pnp*::Tn5/pCJ11; carril 9, *pnp*/pCJ11; carril 10, fusión *pnp*::Tn5/*pnp*:*pnp-71* en pCAS11; carril 11, fusión *pnp*::Tn5/*pnp-71*:*pnp* en pCAS11 (ver texto).

B. Localización de la mutación *pnp-71* por fusión genética. Los rectángulos representan los genes *pnp* (en blanco) y *pnp-71* (en negro). El extremo carboxilo terminal esta representado por COOH, y las barras negras representan el DNA del vector pCAS11. Los números en paréntesis indican las coordenadas de la secuencia del gene *pnp*. El fenotipo de las diferentes clonas se indica a la derecha. El fenotipo 71 se refiere al retardo que presenta el complejo de polimerización en geles nativos (ver *Procedimientos Experimentales*).

La mutación pnp71 substituye una glicina conservada en el dominio KH de la subunidad α de la PNPasa.

Mediante la secuenciación inicial del extremo 5' de los insertos clonados en los vectores pCAS11 y pCAS21 se demostró que los sitios críticos para el inicio de la transcripción y el procesamiento del mensajero de la PNPasa no estaban afectados en el gene mutante *pnp71*. Enseguida, decidimos combinar las diferentes regiones del gen *pnp-71* con las del gene silvestre para localizar dentro de la vasta región codificadora de la PNPasa la mutación responsable. Mediante la digestión de los plásmidos pCAS11 y pCAS21 con la enzima de restricción *Bst EII* se obtuvieron dos fragmentos. El de mayor tamaño contenía 1312 pares de bases (pb) del extremo 5', mientras que el más pequeño tenía 1150 pb del extremo 3'. Con base a un intercambio, la fusión 5'-*pnp-71::pnp-3'* le confirió la función PNP silvestre a la cepa *pnp::Tn5* (Fig.4A, carril 11), mientras que la fusión 5'-*pnp::pnp71-3'* le confirió el fenotipo PNPasa71 (Fig. 4A, carril 10). De esta manera, la mutación *pnp-71* se localizó entre los sitios *Bst EII*, dentro del marco de lectura abierto (ORF) de la *pnp* y su extremo 3'. Se continuó con la misma estrategia para cercar más el fragmento en donde se encontraba la mutación, para esto se usaron los sitios de restricción *BsiWI*, *BanI* y *MluI*. Finalmente, la mutación se localizó entre los sitios *BanI* y *BsiWI*, dentro de un fragmento de 478 pb (Fig. 4B). Este fragmento se purificó a partir de ambos, el plásmido silvestre y mutante, y se subclonó en el vector pUC19. La secuenciación de DNA mostró que la única diferencia entre las secuencias mutante y silvestre era un transición de G por A en la posición 2372 de la secuencia del gene *pnp* (Regnier *et al.*, 1987). Esta mutación cambia el codon GGT que codifica para la glicina

570, por un codon GAT que especifica para un aspartato. La glicina 570 es el residuo más conservado del dominio KH, presente en todas las PNPasas reportadas. Es muy probable que la substitución de la glicina por el aspartato este alterando la estructura de dominio KH y por lo tanto afecte su función de una manera significativa.

La mutación *pnp-71* disminuye la expresión del mRNA *pgal-sib1-galK*

Para investigar como la expresión de la galactocinasa que se expresa a partir del plásmido pMS1, se encontraba afectada en la mutante PNPasa71, examinamos el mRNA de *galK* mediante ensayos de hibridación tipo “Northern blot”. Cuando se analizó el RNA total usando una sonda anti-*galK* 5’ se observó que los niveles del mRNA *pgal-sib1-galK* presentan un decremento de cuatro veces en la mutante *pnp-71* en comparación con la cepa silvestre (Fig. 3B). En contraste, los experimentos paralelos en la misma mutante, usando la sonda anti-*sib*, mostraron una reducción de 1.5 veces en los niveles del mRNA *pgal-tI(sib1)*.

Estos resultados sugieren que no hay una reducción significativa en el inicio de la transcripción de *pgal* ni un incremento sustantivo en la terminación de la transcripción en el terminador *tI(sib1)*.

Como se mencionó anteriormente, la PNPasa participa en el decaimiento del RNA I, el represor antisentido que normalmente regula de una forma negativa el número de copias de los plásmidos tipo ColE1 (Lin-Chao & Cohen, 1991; Sarkar, 1997). Dado que el plásmido pMS1 es un derivado de ColE1, la reducida expresión de *galK* podría ser atribuida a que la mutación *pnp-71* causa una reducción en su número de copias. No obstante, cuando

calculamos la cantidad relativa de plásmidos presentes por célula en las cepas silvestre y mutante, encontramos que la mutación *pnp-71* no solo no reduce el número de copias del plásmido pMS1 sino que lo incrementa al doble (datos no mostrados). Esto es consistente con la observación de que la actividad de PNPasa esta elevada en la mutante *pnp-71*, lo cual podría causar un decremento en el RNA I y consecuentemente, provocar un aumento en la replicación del plásmido. Incidentalmente, el efecto de la mutación *pnp-71* sobre el mRNA de *galK* depende de la presencia de la secuencia *sib1* que está colocada antes del gene *galK*; los experimentos con la sonda anti-*galK* 5' muestran que los niveles del transcrito de *galK* expresado a partir del plásmido pKG1800 no se reducen por la mutación *pnp-71*. De hecho, existe un incremento en la vida media del transcrito de longitud completa y de los productos de degradación (de un valor inferior a 1 minuto hasta aproximadamente 2.1 minutos, comparar el carril de *pnp* con el de *pnp-71* en la Fig. 2A).

La sustitución G-570D no incrementa la actividad intrínseca de intercambio de fosfato de la enzima PNPasa purificada

Para investigar si el aumento en la actividad de polimerización de ADP de la mutante PNPasa-71 se debía a un incremento de su propiedad catalítica o no, se purificó la enzima PNPasa a partir de las cepas silvestre y mutante y se analizó su actividad de intercambio de fosfato. Esta reacción es un excelente indicador de la eficiencia intrínseca de la enzima para llevar a cabo su actividad fosforolítica y de polimerización. Lo anterior debido a que ambas reacciones están implicadas en el mecanismo de reemplazo del fosfato β del nucleósido

difosfato en presencia de fosfato inorgánico. Las enzimas PNPasa silvestre y PNPasa71 fueron purificadas a homogeneidad (Fig. 5A), y se les midió la actividad específica de la reacción de intercambio, como se describe en *Procedimientos Experimentales*. Mientras que la enzima silvestre mostró una actividad específica de 3438, la mutante G-570D presentó una actividad específica de 2276. En otras palabras, la enzima mutante mantuvo un 66% de la actividad de la enzima silvestre. Este resultado es inconsistente con la noción de que el incremento de cuatro veces que se observa en la actividad de la PNPasa en los extractos crudos de la mutante *pnp-71* se debe a un aumento de la actividad catalítica intrínseca de la enzima. También es inconsistente con esta conjetura la observación de que ambas actividades: la polimerización de ADP y la fosforólisis de poli(A) no muestran diferencias sustantivas cuando se comparan las enzimas silvestre y mutante (datos no mostrados). De manera interesante, cuando se analizó la actividad de polimerización de ADP de las enzimas purificadas, por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes, se observó que la enzima mutante PNPasa71 muestra una migración retardada similar a la que se encuentra en los extractos crudos (datos no mostrados). Esto sugiere que comparada con la enzima silvestre, la enzima mutante tiene una propiedad de agregación alterada; esta posibilidad permanece abierta para ser analizada en trabajos futuros.

La substitución G-570D causa una acumulación incrementada de la subunidad α de la PNPasa.

Como siguiente paso, decidimos producir un anti-suero anti-PNPasa y emplearlo para cuantificar en extractos crudos la subunidad α de la PNPasa, para lo cual realizamos experimentos de “*Western blot*” y “*slot blot*”. Como se muestra en la Fig. 5B, comparada con la cepa silvestre, la cepa mutante *pnp-71* expresa una mayor cantidad de la subunidad α . Es importante mencionar que no detectamos a la subunidad α de 77 kDa, en la cepa GF5322 que contiene el alelo *pnp::Tn5*; en cambio, se detectó un producto de menor tamaño que podría corresponder con el tamaño esperado para la forma truncada de la subunidad α producido por la inserción de Tn5. Con la finalidad de cuantificar de una manera más exacta el contenido de la subunidad α , se generó una curva lineal de dosis respuesta variando la cantidad de la subunidad α purificada a partir de la PNPasa silvestre y haciendo la cuantificación por medio de experimentos de “*slot blot*”. Bajo estas condiciones de cuantificación, las señales producidas a partir de los extractos de las cepas silvestre y mutante se compararon con la generada a partir de las cantidades conocidas de la subunidad α pura. Mediante este ensayo se estimó que los extractos provenientes de la cepa mutante producen una cantidad de la subunidad α siete veces mayor que la obtenida a partir de los extractos de la cepa silvestre. Entonces, la substitución G570D causa un incremento sustancial en la acumulación de la subunidad α de la PNPasa, lo cual debe ser el resultado de un aumento en su síntesis o de una disminución en su degradación.

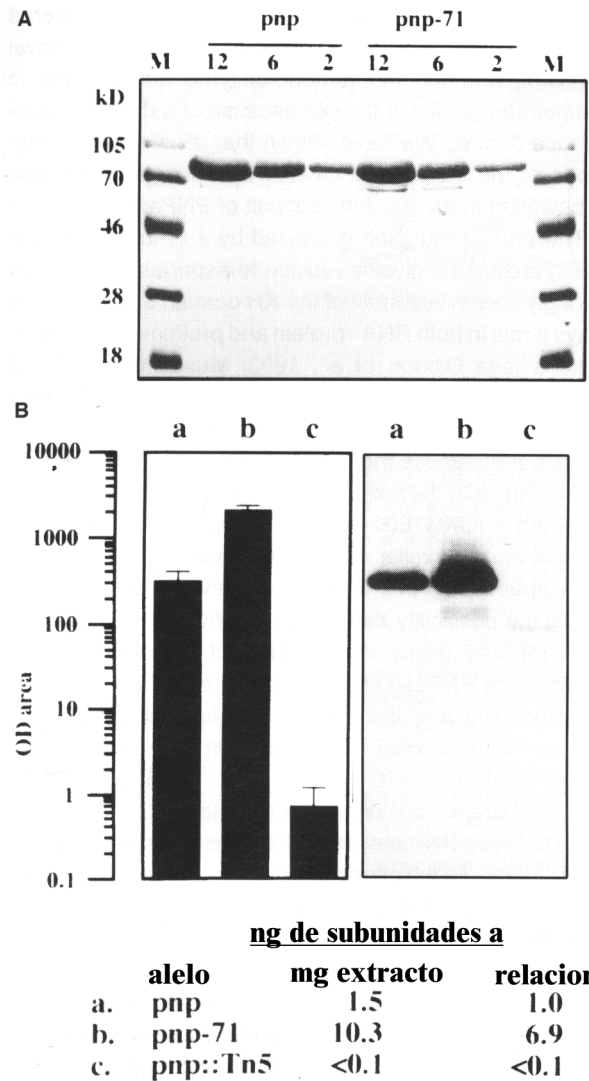


Figura 5. A. Análisis de la PNPasa y la PNPasa71 en geles desnaturalizantes. Se cargaron diluciones apropiadas de cada enzima y se llevo a cabo la electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10% con SDS. La proteínas se tiñeron con el colorante azul de Coomassie (ver *Procedimientos Experimentales*). Los números indican los μg de proteína que se colocaron en cada carril.

B. Inmunodetección de la PNPasa en extractos crudos. Las subunidades α de la PNPasa se detectaron mediante ensayos tipo “Western blot” usando 2 μg de los extractos de *E. coli* por carril, como se describe en la sección de *Procedimientos Experimentales*. Los carriles (a, *pnp*; b, *pnp-71*; y c, *pnp::Tn5*) corresponden a los extractos crudos de bacterias GF5321, MU950 y GF5322. Los datos de quimioluminiscencia están expresados como el área de D.O. en μg^{-1} y son los datos promedio de seis determinaciones independientes. En este ensayo, 1.0 DO es igual a ~ 5 μg de la subunidad α de la PNPasa pura. El cociente corresponde a los ng de las subunidades α de las cepas *pnp-71* o *pnp::Tn5* divididos

entre los ng de la subunidad α de la cepa *pnp*. Para la cepa *pnp::Tn5*, el cociente <0.1 es igual a 0.0034 ng de las subunidades $\alpha \mu\text{g}^{-1}$ presentes en el extracto y el cociente <0.1 es igual a 0.0022 (ver *Procedimientos Experimentales*).

La mutante PNPasa 71 esta afectada en su autorregulación

Posteriormente, decidimos investigar directamente si los niveles altos de la subunidad α presentes en la mutante *pnp-71* son el resultado de un defecto en su autorregulación. Como se mencionó anteriormente, la PNPasa actúa post-transcripcionalmente para reprimir su propia síntesis. Para monitorear convenientemente esta autorepresión usamos la fusión reportera *pnp::lacZ* que esta presente en el fago λ (Robert-Le Meur & Portier, 1992). Así, la cepa GF5321 Δlac , que contiene la fusión *pnp::lacZ* en el profago λ , expresa la proteína híbrida PNPasa- β -galactosidasa a un nivel reducido en comparación con la cepa *pnp::tn5* derivada de GF5322. Para investigar la influencia de la *pnp-71* en la autorregulación, realizamos la transducción de la región *Zgi:Tn10 pnp-71* a la cepa GF5321, y entonces comparamos la expresión de la β -galactosidasa en esta cepa (MU950) con la producida en las cepas isogénicas *pnp* y *pnp::Tn5*. La Figura 6A muestra que mientras la PNPasa silvestre reprime la expresión de la proteína híbrida (PNPasa- β -galactosidasa) 21 veces, el producto del alelo *pnp-71* la reprime únicamente tres veces. Por lo tanto, la subunidad α de la mutante PNPasa71 tiene un defecto significativo en la autorepresión.

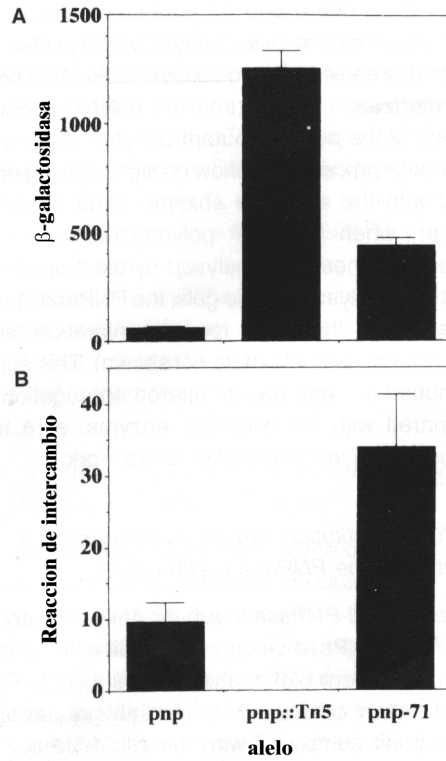


Figura 6. Actividades enzimáticas de la PNPasa en extractos crudos de *E. coli*.

- A. Los valores de la actividad de β-galactosidasa corresponden a las unidades $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de los extractos.
- B. Los valores de la actividad de la PNPasa corresponden a μmol de fosfato intercambiado $\text{h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ en el extracto.
- En ambos ensayos, las figuras consideran el promedio de nueve determinaciones independientes (ver *Procedimientos Experimentales*).

DISCUSIÓN

A partir del descubrimiento de la PNPasa (Grunberg-Manago & Ochoa, 1955), se han realizado numerosos experimentos genéticos y bioquímicos con la finalidad de caracterizar su actividad enzimática y revelar su función en *E. coli* (Grunberg-Manago, 1963; Reiner, 1969; Godefroy-Colburn & Grunberg-Manago, 1972; Portier, 1980; Littauer & Soreq, 1982; Yancey & Kushner, 1990). En este trabajo, aislamos una PNPasa mutante de *E. coli*, *pnp-71*, que muestra propiedades interesantes: (i) la enzima mutante incrementa el decaimiento del mRNA de *galK*, *sib1*-dependiente, que se expresa a partir del plásmido pMS1; (ii) la enzima mutante presenta una movilidad electroforética alterada en geles nativos, indicativo de la formación de un complejo nuevo y (iii) la enzima mutante se acumula en forma abundante en la célula debido a un defecto en su control autógeno. Nosotros hemos demostrado que todos los fenotipos de la mutante son causados por la sustitución de un solo aminoácido en la subunidad catalítica de la PNPasa.

La mutación *pnp-71* es causada por una transición de G por A, que resulta en el cambio de un residuo de glicina por un aspartato en la región más conservada del dominio KH, el cual tiene el potencial de participar en interacciones de RNA-proteína y proteína-proteína (ver Gibson *et al.*, 1993; Musco *et al.*, 1996). Aunque la mutante PNPasa71 se aisló por su habilidad para reducir la expresión de *galK* del plásmido pMS1 y en verdad, la mutante incrementa el decaimiento del transcrito *pgal-sib1-galK* (Fig. 2C), la vida media del transcrito *pgal-galK* del plásmido pKG1800 se incrementa en la mutante a un nivel similar al observado en la cepa *pnp::Tn5* (Fig. 2A). Este resultado aparentemente paradójico abre la posibilidad de que los mRNAs *pgal-sib1-galK* y *pgal-galK* tengan diferentes mecanismos de decaimiento. La subunidad α de la PNPasa es un componente del

degradosoma del mRNA de *E. coli*, un complejo multienzimático que también contiene a la endoribonucleasa RNase E (Carpousis *et al.*, 1994; Py *et al.*, 1994; 1996; Miczak *et al.*, 1996; Blum *et al.*, 1997). Existen evidencias adicionales que sugieren una asociación en la célula entre la PNPasa y la RNasa III (Swatantra *et al.*, 1982). Dado que la estructura *sib* del fago λ es normalmente procesada por la RNasa III, podría ser que el complejo de la RNasa III y la PNPasa reconocieran el mensajero que contiene *sibI*. Nuestros resultados muestran que el mensajero no terminado *pgal-tI(sibI)-galK* y el transcrito terminado *pgal-tI(sibI)* son degradados mas eficientemente en un fondo *pnp-71* que en un fondo silvestre. Así mismo, el mRNA *pgal-galK* se estabiliza en la cepa mutante *pnp-71*, un comportamiento similar a lo que ocurre en una cepa que carece de actividad de PNPasa. Estos hallazgos pueden ser explicados de una manera sencilla con base a una disminución en la afinidad del degradosoma que contiene a la PNPasa⁷¹ por los mRNAs que son relativamente estables debido a su estructura genética intrínseca, como sería el caso del transcrito *pgal-galK*.

Una propuesta más interesante para explicar la degradación diferencial de las dos diferentes especies de RNA, con y sin *sibI*, en la cepa *pnp-71* se resume en la Fig. 7A. De acuerdo con este modelo, las subunidades catalíticas de la PNPasa estan en equilibrio entre las formas libres y las que se encuentran asociadas al degradosoma. Las subunidades ensambladas en este complejo altamente ordenado podrían participar en una ruta combinada (endo/exonucleolítica) que es responsable de la degradación del mRNA *pgal-sibI-galK* generando transcritos *pgal-tI(sibI)* por medio de un corte exonucleolítico más que un procesamiento endonucleolítico. Un postulado adicional de este modelo es que las subunidades de la PNPasa libres (o un complejo diferente) participan en la degradación

exonucleolítica del mRNA *pgal-galk*, el cual carece de la estructura *sib1*. De acuerdo con estos postulados, la mutación *pnp-71* cambia el equilibrio hacia la formación del complejo degradosoma. De esta forma, la disminución de subunidades libres de la PNPasa estabilizaría el mensajero de *galk* que se produce a partir del promotor *pgal*, mientras que la presencia de complejos de orden superior provocaría la degradación rápida de los transcritos que contienen la estructura *sib1*. Otra posibilidad interesante que podría ser probada es que la PNPasa71 incrementa su asociación con la RNasa III de una manera que aumenta la afinidad del complejo por *sib1*, y así, mejora el procesamiento de la horquilla *sib1*.

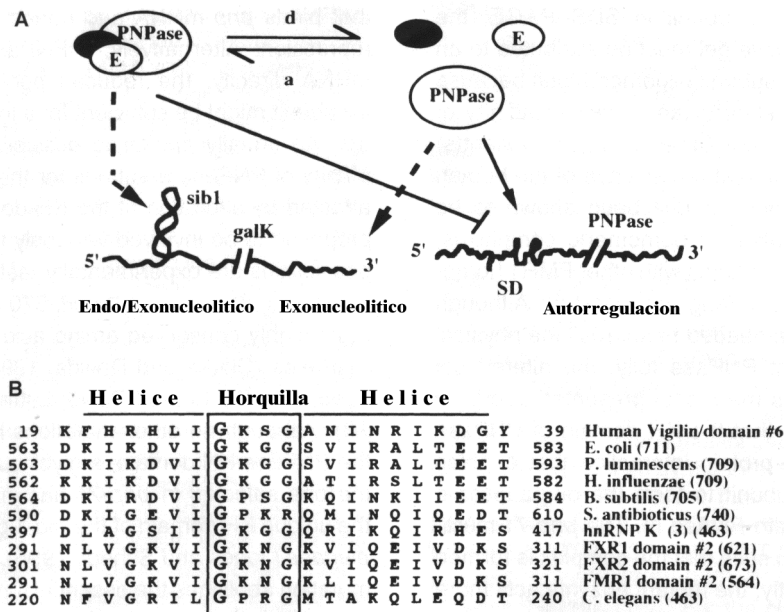


Figura 7. A. El modelo de equilibrio de la PNPasa 71. Para la autorregulación dentro de la bacteria, la subunidad α de la polinucleótido fosforilasa puede existir libre o asociada con otras proteínas, tales como los componentes del degradosoma. En contraste con la enzima libre, la PNPasa asociada es incapaz de reprimir la expresión de su mRNA, el cual es

procesado por la RNasa III. En la mutante *pnp-71*, el cambio en el dominio KH afecta el equilibrio y favorece la reacción “a”. Para el caso de la competencia entre las actividades endo/exo contra la exonucleolítica, de acuerdo a este modelo, cuando la PNPasa se agrega con otras enzimas, como la RNasa E, participa en actividades endo/exo que degradan RNA estructurado. Por otro lado, cuando las subunidades α de la PNPasa están disociadas, la enzima exhibe actividad fosforolítica preferencialmente sobre RNAs no estructurados. En el caso de la mutante PNPasa71, la mutación en el dominio KH podría incrementar la estabilidad del complejo; consecuentemente, la actividad endo/exonucleolítica se incrementaría en la mutante (ver el texto). E representa la RNasa E; SD, se refiere a la secuencia Shine Dalgarno. “a” indica la reacción de asociación de la PNPasa con otras proteínas; “d” indica reacción de disociación. El círculo negro representa cualquiera de los componentes del degradosoma u otra proteína desconocida.

B. Alineamiento de la secuencia de amino ácidos de los dominios KH seleccionados. El alineamiento se llevó a cabo usando el programa MP_{SRCH} (S.S. Sturrock & J.F. Collins, Biocomputing Research Unit, University of Edingurgh, UK) y el dominio KH maxi de la PNPasa. Las predicciones estructurales están delimitadas de acuerdo a la estructura tridimensional del dominio 6 de la vigilina humana, como se describió por Musco *et al.* (1996). Se muestra el alineamiento de las secuencias de amino ácidos de los motivos α -loop- α de la PNPasa de *E. coli*, (Regnier *et al.*, 1987), *P. luminescens* (Clarke & Dowds, 1994), *H. influenza* (Fleischmann *et al.*, 1995), *B. subtilis* (Luttinger *et al.*, 1996), *S. antibioticus* (Jones & Bibb, 1996) y el motivo KH de la hnRNP humana, dominio K número 3 (Siomi *et al.*, 1993), el dominio número 2 de la FXR1 humana (Siomi *et al.*, 1995), el dominio número 2 de la FXR2 humana (Zhang *et al.*, 1995), el dominio número 2 de la FMR1 (Verkerk *et al.*, 1993) y de la GLD-1 de *C. elegans* (Jones and Schedl, 1995). La caja indica el dominio *loop*; las hélices están marcadas en la línea superior; una G alargada en el dominio *loop* indica la glicina conservada que está mutada en el alelo *pnp-71*. Los números colocados al lado de las secuencias localizan el motivo dentro de la secuencia de amino ácidos, excepto para el dominio número 6 de la vigilina, en donde los números indican la posición en el dominio KH Maxi (Musco *et al.*, 1996). Los números entre paréntesis indican el número total de residuos de cada proteína.

Una observación sobresaliente reportada en este trabajo es que la mutación *pnp-71* causa una movilidad electroforética alterada de la PNPasa presente en extractos celulares crudos. La PNPasa de *E. coli* se purifica como un homotrímero de la subunidad α (Portier, 1975). Claramente, la conducta molecular alterada de la enzima mutante PNPasa71 puede atribuirse a un oligómero de orden superior. Sin embargo, el estado oligomérico alterado no puede ser debido a una simple agregación causada por la cantidad elevada de la enzima mutante en el extracto crudo; de hecho, los niveles elevados de la PNPasa silvestre, expresados a partir de un plásmido multicopia, incrementan la actividad de polimerización de ADP pero no presentan la movilidad alterada que se observa con la enzima mutante (Fig. 4A, carriles 8 y 9). Además, la co-expresión en la célula de ambas enzimas, el tipo silvestre y la mutante, resulta en la formación de complejos con movilidad intermedia (Fig. 4A, carril 7). Tomando en consideración que la mutación *pnp-71* no cambia la movilidad de la subunidad α de la PNPasa en geles desnaturizantes, el efecto observado en geles nativos podría atribuirse a un alteración en la estructura del oligómero de la subunidad α , lo anterior debido a un estado oligomérico diferente o a una afinidad incrementada hacia otros componentes celulares. Es importante mencionar que en el caso de la proteína humana FMR1, se ha demostrado que el dominio KH es necesario tanto para la formación de complejos homoméricos como para la formación de complejos heteroméricos con otras proteína homologas a FMR1, como FXR1 y FXR2 (Zhang *et al.*, 1995). Aunque estamos concientes de que se requiere trabajo adicional para conocer completamente las propiedades físicas de nuestra mutante PNPasa71, su movilidad alterada apoya el modelo presentado en este trabajo. Se puede especular que el dominio KH de la PNPasa esta implicado en una interacción proteína-proteína que permite a la subunidad catalítica de la

PNPasa formar el degradosoma o un complejo con la RNasa III. La mutación *pnp-71* altera el dominio KH de tal forma que el complejo se forma con más avidéz. Consecuentemente, la enzima mutante actúa más eficientemente sobre los sustratos de RNA que contienen estructuras que los marcan específicamente para ser degradados eficientemente por el degradosoma. De manera notable, el mRNA de la PNPasa es procesado por la RNasa III. Sería interesante determinar si la *pnp-71* aumenta el decaimiento de su propio mRNA.

Otro de los atributos sobresalientes de la mutante *pnp-71* es su defecto en la regulación autógena. Los trabajos previos de Robert-Le Meur y Portier (1992) habían sugerido previamente que esta autorregulación podría implicar una represión a nivel traduccional más que una degradación del mRNA conducida por la propia enzima. De acuerdo con este modelo, la enzima solo se puede unir a su propio mensajero, alrededor de la secuencia Shine-Dalgarno, después de que ciertos determinantes del mRNA son expuestos debido al procesamiento que sufre por parte de la RNasa III. Con excepción del alelo *pnp::Tn5*, el cual altera claramente la catálisis y la autorregulación de la PNPasa (Robert-Le Meur & Portier, 1994), todas las demás mutaciones reportadas como defectuosas en la autorepresión de la PNPasa se habían localizado en la región del mRNA de la PNPasa que participa en la unión a los ribosomas, y ninguna en el cistron de la enzima. Si la PNPasa realmente interactúa de una manera directa con su propio mensajero, un aspecto sobresaliente de este mecanismo de autorregulación debería ser la afinidad específica de la enzima por el mensajero procesado. Aunque existe un reporte único que menciona que la PNPasa se une de manera preferencial a una secuencia de DNA de doble cadena de rata (Zhang *et al.*, 1998), hasta nuestro conocimiento no se ha documentado que la PNPasa se una preferentemente a alguna secuencia específica de RNA.

Una posibilidad interesante para explicar el mecanismo que controla la autorregulación sería que la subunidad α adquiere una afinidad específica por su propio mRNA por medio de una interacción *in vivo* con otra proteína. Si la mutación *pnp-71* incrementa la interacción proteína-proteína que favorece el ensamblaje de la PNPasa mutante con el degradosoma, este evento podría al mismo tiempo reducir la cantidad del complejo represor que se une al mRNA de la PNPasa, causando la pérdida de la autorepresión. Alternativamente, si la PNPasa se une directamente a su mRNA, la reducción en la poza de subunidades α libres podría ser un evento suficiente para provocar la pérdida del control autógeno. Otra posibilidad igualmente atractiva es que la afinidad específica de la subunidad α de la PNPasa por su propio mRNA se afecta directamente por la alteración del dominio KH, el cual se ha propuesto que participa en la unión a RNA. Estas posibilidades son viables de probarse experimentalmente.

Como se mencionó anteriormente, el residuo G-570 representa el amino ácido más conservado entre todas las PNPasas bacterianas conocidas (Clarke & Dowds, 1994; Fleischmann *et al.*, 1995; Jones & Bibb, 1996; Luttinger *et al.*, 1996) (Fig. 7B). Aunque no se han reportado otras mutaciones en el dominio KH, un reemplazo de glicina similar al seleccionado en la mutación *pnp-71* se ha documentado para el dominio KH único del gene *gld-1* de *Caenorhabditis elegans* (Jones & Schedl, 1995). La mutación del dominio KH del gene *gld-1* elimina la función primordial de este factor germinal específico, la cual consiste en dirigir la oogénesis y actuar como supresor de tumores. También se ha documentado que el cambio de la secuencia Glicina-X-X-Glicina en el dominio KH de la proteína humana hnRNPK daña su capacidad de unirse *in vitro* a secuencias poli(C) (Siomi *et al.*, 1994). El hecho de que la mutación *pnp-71* no afecta sustancialmente las propiedades catalíticas intrínsecas de la PNPasa [polimerización de ADP o la fosforólisis de poli(C)], las cuales son una medida de la capacidad de unión de la PNPasa al RNA] apoya nuestra visión de que la mutación G570D afecta la interacción proteína-proteína. Se requiere determinar en un futuro si esta mutación afecta el reconocimiento de un RNA específico.

PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Cepas bacterianas, fagos y plásmidos

Las cepas de *E. coli* que se usaron en este trabajo derivan de la bacteria S165 $\Delta gal155^-$ (KTE) ν^- (Shapiro & Adhya, 1969) o de la bacteria N99 $sup^0 strA galK_2$ (colección del NIH) y fueron construidas como se indica en el texto. Las células se transformaron con DNA recombinante de acuerdo a Davies *et al.* (1980). Los lisados que se usaron en los experimentos de transducción se prepararon de acuerdo a Silhavy *et al.* (1984). La bacteria SGM71 se infectó con un lisado del fago P1vir preparado mediante la infección de la cepa Zgi:Tn10 *nusA1*, en esta cepa la mutación *nusA1* esta ligada en un 60% a TET^R. Nosotros seleccionamos las transductantes SGM71 TET^R-*nusA* a 37°C. Las siete transductantes analizadas exhibieron la alteración en la actividad de la PNPasa en geles de poliacrilamida. La cepa SGM71 Zgi:Tn10 *nusA* se empleó para los experimentos posteriores de transducción. Esta cepa contenía la presunta mutación *pnp-71* ligada al transposon Tn 10. El fenotipo PNPasa71 representó el 26% de las transductantes tetraciclina-resistentes derivadas de N99. Seleccionamos una cepa candidata N99 Zgi:Tn10 *pnp-71*, la cual fue positiva para la actividad PNPasa71 analizada en geles de poliacrilamida.

El plásmido pKG1800 deriva del vector pBR322 y porta la fusión *pgal-galK* (McKenney *et al.*, 1981). El plásmido pUS6 es un derivado de pKG1800, contiene la región *sib* de 0.23 kpb (coordenadas 27724-27479 del genoma del fago λ) entre *pgal* y *galK* (Schmeissner *et al.*, 1984b). El plásmido PMS1 que deriva de pUS6 contiene la mutación *sib1* en la posición 27573 (Montañez *et al.*, 1986). El plásmido pGB2 deriva de pSC101

(Churchward *et al.*, 1984). Los plásmidos pCAS11 y pCAS21 derivan de pGB2 y contienen los productos de PCR *Sall-BamHI pnp* y *pnp71* respectivamente. El vector pYN115 porta el fragmento de *E. coli* correspondiente al operón silvestre de la *pnp* (Nakamura & Mizusawa, 1985); el vector pCJ11, que porta el operón silvestre de la *pnp* amplificado por PCR (García-Mena, 1992) es un derivado de pUC19 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985). El plásmido pAJKB que codifica para la sonda anti-*galK* 5' se construyó mediante la clonación del fragmento *EcoRV-NarI* del gene *galK* (105 pb) dentro de los sitios *EcoRV-AccI* del vector pSP72 (Promega). La cepa N99, transformada con el plásmido pCJ11, se usó para la purificación de la PNPasa silvestre, mientras que la cepa N99 *pnp-71*, transformada con el plásmido pCAS21, se empleó para la purificación de la mutante, PNPasa71. La bacteria GF5321 (*argG6, argE3, his4, ΔlacX74, rpsL*) es una cepa lisogénica del fago λGF2 que contiene una fusión *pnp::lacZ*. La cepa GF5322 es una cepa isogénica que contiene el alelo *pnp::Tn5* (Robert-Le Meur & Portier, 1992). La bacteria MU950 es derivada de la cepa GF5321 a la cual se le transfirió la región *Zgi:Tn10 pnp-71* mediante transducción.

Condiciones de crecimiento de los cultivos bacterianos y mutagénesis con nitrosoguanidina

Los medios de cultivo se prepararon como lo describe Sambrook *et al.* (1989). Cuando fue necesario, se agregó antibiótico a las siguientes concentraciones: tetraciclina, 12.5 μgml⁻¹; ampicilina, 50μg ml⁻¹, kanamicina, 25 μg ml⁻¹ y estreptomycin 50 μg ml⁻¹. Para la selección de mutantes, las células S165 se propagaron sobre cajas de medio LB-Amp

conteniendo 0.6% de galactosa (LB-Amp.Gal). Los experimentos de mutagénesis se realizaron de acuerdo a Burns *et al.* (1987) con ligeras modificaciones.

Preparación de extractos de E. coli

Los cultivos bacterianos (5 ml), se propagaron en cajas de medio LB durante toda la noche a 32°C, utilizando las condiciones apropiadas para cada cepa. Los cultivos se diluyeron en medio fresco hasta alcanzar una densidad de 0.1 DO₆₀₀. Las muestras se removieron cuando alcanzaron densidades de crecimiento de 0.2, 0.3 y 0.4 DO₆₀₀, se centrifugaron y se resuspendieron a una densidad de 1.0 DO₆₀₀ en una solución 100mM de Tris base, pH 8.0, 400 mM de NaCl y 8mM de β-mercaptoetanol. Las células se sometieron a sonicación a 4°C, los restos se removieron mediante centrifugación y el sobrenadante se dializó a 4°C con el sistema de membrana Spectrapor (rango de retención >3500), usando la solución amortiguadora siguiente: 50 mM de Tris base pH 8.0, 250 mM de NaCl, 8.4 mM de β-mercaptoetanol y 0.1 mM de EDTA pH 8.0. Se hicieron alícuotas de los extractos y se almacenaron a -80°C.

Actividades enzimáticas de los extractos crudos

Los ensayos de galactocinasa se efectuaron en un medio de triptona, mediante una adaptación del protocolo reportado (Wilson & Hogness, 1966). Para calcular la actividad específica se realizó la siguiente determinación: actividad específica = $([c.p.m. - \text{blanco}] / \text{cantidad cargada}) \times 1 / (15 \text{ minutos de ensayo}) \times 1 / (\text{ml del extracto usado}) \times 1 / [\text{DO de las células suspendidas} (\sim 1.0)] \times 0.03 \text{ ml del volumen de reacción} \times 1000$. La actividad

de polimerización de ADP de la PNPasa se analizó en geles nativos de poliacrilamida, de acuerdo a Thang *et al.*, (1967). La reacción de la actividad e intercambio de fosfato se midió de acuerdo a Portier (1980). Las unidades de actividad se expresaron como μmol de [^{32}P]-UDP sintetizado $\text{h}^{-1} \text{ml}^{-1}$. La actividad de β -galactocidasa de la fusión *pnp::lacZ* se midió de acuerdo a una adaptación del método de Sambrook *et al.* (1989). Las unidades ópticas de la reacción se midieron en placas Falcon 3072, usando el filtro de 450nm del lector de microplacas Bio-Rad modelo 450. Las unidades de galactocinasa se expresaron como: $\text{minutos}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de extracto = $[A_{405}/(\text{minutos de reacción}) (\text{ml de extracto}) (\text{mg de proteína ml}^{-1} \text{ del extracto})] \times 1000$.

Amplificación y manipulación de DNA

Las enzimas de restricción utilizadas se adquirieron de New England Biolabs y se usaron de acuerdo a las recomendaciones del proveedor. Las clonas plasmídicas se purificaron mediante el método alcalino SDS (Birnboim & Doly, 1979) y se corroboró la clonación y orientación mediante análisis de restricción. La amplificación de los fragmentos de DNA de los genes silvestre y *pnp-71* (2462 pb) se llevo a cabo por PCR (Saiki *et al.*, 1985) usando un termociclador de la compañía Coy Instruments y la DNA polimerasa Vent. Se empleó el siguiente par de iniciadores: oligo-1 5' CTG GGT CGA CGT CGC TAA TTC T-3'; y oligo2- 5'-CGT CCG GAT CCC GGT TGC TAA C-3' (Operon Technologies). Para la clonación y secuenciación de los fragmentos de PCR de la PNPasa, el vector pGB2 se digirió en el sitio *AseI*, y las muestras se cortaron con las enzimas *BamHI* o *Sall*. Los productos digeridos de PCR correspondientes a la *pnp* o a la *pnp-71* se ligaron a los

fragmentos de DNA *AseI-spcR-BamHI* de 2.0 kpb y *Sall-rep-AseI* de 2.2 kpb, lo que previene la lectura transcripcional desde *spcR* hacia los genes *pnp*. Para la secuenciación de DNA, los plásmidos pCAS11 y pCAS21 se sometieron a doble digestión con las enzimas *BsiWI* y *BanI*. Se aisló el fragmento *BanI-BsiWI* de 478 pb, se rellenó con la enzima Klenow y se ligó al vector pUC19, previamente linearizado con la enzima *SmaI* y defosforilado. La secuencia se determinó por medio del método de los dideoxinucleótidos (Tabor & Richardson), usando la enzima Secuencasa v2 de US Biochemicals.

Determinación de la vida media del mRNA de la galactocinasa

Se aisló el RNA total usando un método modificado (Sarmientos *et al.*, 1983). Las células se crecieron a una DO_{600} de 0.4. Al tiempo cero, la transcripción se inhibió usando el antibiótico rifampicina, a una concentración final de 1 mg ml^{-1} , y a los tiempos apropiados se tomaron alícuotas. Las sondas de RNA se sintetizaron usando los reactivos y el protocolo de Promega; empleando $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-UTP}$ (Dupont NEG-007H). La sonda anti-*galk* 5', de 148 bases, se transcribió con la RNA polimerasa SP6 usando el vector pAJKB previamente linearizado con *EcoRV*. La sonda anti-*sib*, de 149 bases, se describió previamente (Cisneros *et al.*, 1986). Para los experimentos de Northern blot se emplearon membranas de nylon, Hybond-N (Amersham), las cuales se hibridaron con las sondas anti-*galk* 5' y anti-*sib*. La señal de las bandas seleccionadas se cuantificó a partir de las placas autoradiográficas, bajo condiciones de linealidad. La vida media de cada mRNA se calculó mediante un análisis de mínimos cuadrados de una gráfica semilogarítmica, en donde la DO_{600} de los transcritos se graficó en función del tiempo (Belasco & Brawerman, 1993).

Cuantificación de la cantidad de plásmido

Se estimó comparativamente el número de copias de plásmido de las diferentes cepas empleadas para el aislamiento del RNA total. Se mezcló 1.0 ml del cultivo celular que portaba cada uno de los plásmidos de interés, con 0.2 ml del cultivo bacteriano que contenía el plásmido control. Los cultivos se ajustaron a una DO_{550} de 2.0. Se aislaron los plásmidos cuantitativamente mediante el método alcalino (Birnboim & Doly, 1979) y las alícuotas apropiadas se cortaron con la enzima *EcoRI*. Las mezclas de reacción se resolvieron en geles de agarosa al 1%, y las bandas de DNA teñidas con bromuro de etidio se cuantificaron por densitometría. Los valores se normalizaron usando el plásmido control de cada carril.

Preparación de la enzima PNPasa y análisis de sus actividades catalíticas

La PNPasa se purificó usando el procedimiento reportado por Portier (1975) con algunas modificaciones. Los últimos pasos de purificación incluyeron un paso de adsorción en una columna MonoQ HR 5/5 FPLC de Pharmacia, equilibrada con 0.05 M NaCl, 0.02M Tris base, pH 7.5, y uno de elución usando un gradiente lineal de 0.05--0.70 M de NaCl. Se obtuvieron aproximadamente 16 mg de la subunidad α silvestre de la PNPasa a partir de 19 g de la pastilla de la cepa N99 transformada con el plásmido pCJ11, mientras que se obtuvieron aproximadamente 8 mg de la subunidad α de la PNPasa71 a partir de la misma cantidad de pastilla de la cepa N99 *pnp-71* transformada con el plásmido pCAS21. El gel desnaturizante de la Fig. 6A muestra que ambas enzimas tienen el mismo tamaño y niveles equivalentes de purificación. Las actividades enzimáticas de intercambio de fosfato, fosforólisis y polimerización se estimaron de acuerdo a Portier (1980).

Electroforesis y cuantificación de proteínas

Los extractos o las enzimas se separaron en geles de poliacrilamida al 10% o 7.5%, con 0.1% de SDS. Los marcadores preteñidos fueron de Gibco BRL 6041 LA. Cuando fue necesario, los geles se tiñeron de acuerdo a Laemmli (1970). La concentración de proteínas se determinó de acuerdo a Bradford (1976), usando BSA como estándar.

Inmunodetección de la PNPasa

Las subunidades α de la PNPasa, presentes en los extractos de E. coli, se detectaron mediante ensayos tipo Western blot, usando membranas de Millipore Immobilon-P, y un sistema de detección quimio-luminiscente con el sustrato CSPD y el anticuerpo de cabra anti-conejo (IgG), de acuerdo a las instrucciones del proveedor (Tropix). Las señales obtenidas a partir de los slot blots de la PNPasa pura (de concentración conocida) y de la PNPasa presente en los extractos, se cuantificaron a partir de las placas de rayos X (X-Omat KXK-1, Kodak). Las señales se cuantificaron por densitometría usando el densitómetro de video de Bio-Rad, modelo 620. Las áreas densitométricas se expresaron como μg de extracto. Se usaron las condiciones apropiadas para obtener una relación lineal entre la señal obtenida a partir de las placas y la cantidad de subunidad α pura o de los extractos. El suero inmune anti-PNPasa se preparó inmunizando conejos con la subunidad α purificada en este trabajo. Con el fin de remover anticuerpos inespecíficos, el suero se trato con polvos cetónicos obtenidos de la cepa N99 pnp::Tn5 (Harlow & Lane, 1988).

SECCION II

De acuerdo con los resultados mostrados en la sección I sobre el procesamiento de los transcritos *pgal-tI* y *pgal-tI-galk*, generados en nuestro sistema plasmídico, en las cepas N99 tipo silvestre y N99 *pnp::Tn5*, se puede concluir que la PNPasa participa de manera importante en la estabilidad de estos RNAs mensajeros, es decir, en su control post-transcripcional. La estabilidad de los mRNA procariontes depende de la conexión entre su procesamiento y degradación lo cual involucra la acción concertada entre endo- y exoribonucleasas. En la ejecución de estos fenómenos participa un complejo multi-protéico llamado RNA degradosoma, cuyos componentes mayoritarios son: la 3' polinucleótido fosforilasa (PNPasa), una caja DEAD-RNA helicasa (RNA helicasa B, RhIB), la RNasa E, la poli(A) polimerasa y otras enzimas, cuya función aún no es clara, como la enolasa y GroEL (Carpousis, A.J. 2002). La RNasa E es una endonucleasa que tiene un papel fundamental en el ensamblaje del degradosoma, ya que por su extremo carboxilo une a las demás proteínas del complejo, además, posee un dominio de unión a RNA y un dominio con actividad ribonucleolítica (dependiente del extremo 5' libre) en su extremo amino terminal.

Tomando en consideración lo antes mencionado, es de esperarse que la PNPasa no sea la única enzima involucrada en la degradación de los transcritos, *pgal-tI*, y *pgal-tI-galk*, sino que la RNasa E, componente del degradosoma, participe también en su procesamiento.

El objetivo de esta sección fué identificar otras enzimas que intervienen en el procesamiento (estabilidad y/o degradación) de los transcritos *pgal-tI*, *pgal-tI-galK*, *pgal-galK* para entender de manera más completa la participación de las mismas en la estabilidad de los transcritos en estudio así como su expresión. Debido a la participación de la RNasa E en la función del degradosoma, se utilizó una cepa deficiente en la actividad de esta enzima, y se procedió a analizar la estabilidad de los transcritos mencionados. En esta sección, que no forma parte del artículo original, se presentan los resultados obtenidos empleando la cepa deficiente en RNasa E.

RESULTADOS

La RNasa E participa en el decaimiento del mRNA de la galactocinasa.

Para este análisis se utilizó un derivado de la cepa N99 que porta una mutación termo-sensible en el gene de la RNasa E (*rne-3071*). Cuando la bacteria se propaga a 30 °C, la RNasa mutante se comporta como la enzima silvestre, sin embargo, cuando la bacteria se transfiere a la temperatura no permisiva (44°C) la mutación se expresa y la enzima RNasa E se inactiva.

En la (Fig. 8A₁) se observan los resultados de la hibridación tipo *Northern blot* empleando la sonda anti-*galK* 5'. Al analizar la cepa *rne* silvestre transformada con el plásmido pKG1800 y cultivada a 30°C se detectaron dos transcritos, uno de aproximadamente 1800 b y otro de 1400 b. La vida media de los transcritos observados en estas condiciones fue de 3.65 min. Como se mencionó anteriormente, el transcrito de mayor

tamaño (1800 b) corresponde al mensajero completo de *pgal-galK*, mientras que el más pequeño (aproximadamente 1400 b) probablemente se origine por la acción de una endonucleasa, en uno o más sitios. Se han detectado en el transcrito de *galK* secuencias cortas de cadena sencilla ricas en adeninas y uridinas que pueden ser blanco preferencial para el corte por RNasa E, posteriormente, los productos de corte podrían ser degradados por las exonucleasas 3' (PNPasa o RNasa II).

Cuando la cepa *rne* silvestre se propagó a 44°C, la cantidad de los transcritos aumentó, aproximadamente 5 veces, a tiempo 0 min, no obstante, su tasa de degradación fue más alta, ya que su vida media bajó a 1.20 min (este efecto puede deberse a la temperatura). De manera interesante, cuando la cepa *rne* mutante transformada con el plásmido pKG1800 se cultivó a 44°C, además de los mRNAs de 1800 y 1400 bases, se observó una serie de cuatro transcritos en un rango de 296 a 1200 bases. Nuestros resultados sugieren que estos mRNAs son productos de procesamiento del transcrito *pgal-galK* y que la inactivación de la RNasa E permite que todos los transcritos sean estables, ya que su vida media fue de 6.2 min, es decir, aumentó con relación a la cepa silvestre bajo las mismas condiciones. Experimentos paralelos usando una sonda anti-*galK* 3' (Fig. 8A₂) demostraron que hay una mayor abundancia tanto de los transcritos completos como de los truncados en la cepa *rne* mutante, cultivada a 44°C, en comparación con lo obtenido con la sonda anti-*galK* 5' (Fig. 8A₁), aumentando la vida media de todos los transcritos presentes a 12 min, (la vida media de la silvestre en las mismas condiciones fue de 1.01 min). Estos resultados sugieren que el decaimiento del mRNA de la galactocinasa inicia a partir del extremo 5', debido probablemente a cortes endonucleolíticos. Es posible, que cuando la enzima RNasa E está activa haga cortes sobre los transcritos que dejen expuestos los extremos 3' por donde atacan las exonucleasas presentes en el degradosoma.

La RNasa E participa en el procesamiento del mRNA de tI / sib.

Como siguiente paso, se transformaron las cepas N99 silvestre y mutante con el plásmido pUS6, que lleva clonado el terminador *tI* entre *pgal* y *galK*, y se llevaron a cabo los experimentos de hibridación tipo *Northern blot* empleando la sonda anti-*tI(sib)*. En la (Fig. 8B₁) se observa que a 30°C y 44°C la cepa *rne* silvestre produce dos mRNAs mayoritarios, uno de aproximadamente 600 b y otro ligeramente mayor a 149 b, el primero corresponde al mRNA *pgal-tI* mientras que el segundo es muy probable que corresponda a un producto de procesamiento que mantiene la región del terminador *tI*. Estas mismas especies de RNA se observaron en la cepa *rne* mutante crecida a 30°C. Sin embargo, cuando la cepa mutante se propagó a 44°C, se detectaron dos transcritos adicionales que sobrepasan el terminador; el de mayor tamaño (aproximadamente 1480 b) podría corresponder al mensajero *pgal-tI-galK* mientras que el otro (mayor a 608 b) a un mRNA que inicia en *pgal*, sobrepasa *tI* pero que se detiene antes de *galK*. Así mismo, se identificó un tercer transcrito que migró al nivel del marcador de 296 b, por debajo del mRNA *pgal-tI*. En la cepa *rne* mutante, además de la detección de transcritos de tamaño diferente en relación a la cepa silvestre, los mRNAs en general aumentaron su vida media. No se observó degradación evidente durante los tiempos de toma de muestra, a diferencia de lo ocurrido con la cepa silvestre en las mismas condiciones y cuya vida media fue de 2.11 min. Al cuantificar el transcrito mayoritario de aproximadamente 600 b (*pgal-tI*) observamos también que aumentó su vida media a más de 25 min en la cepa mutante, (estable en todos los tiempos de muestreo) contra 1.05 min en la cepa *rne* silvestre.

Experimentos paralelos empleando las sondas anti-*galK* 5' (Fig. 8 B₂) y anti-*galK* 3' (Fig. 8B₃) mostraron que en la cepa *rne* silvestre el terminador *tI* detiene aparentemente de manera eficiente la señal transcripcional iniciada en *pgal*, ya que solamente se detectó un barrido tenue que va de, arriba de 149 b. hasta menos de 1400 b. a los 0 min de iniciado el tratamiento con rifampicina. En contraste, en la cepa *rne*- propagada a 44°C, observamos claramente una serie de cinco transcritos en un rango de tamaño de 296 b a aproximadamente 1200 b. Estos resultados indican que a pesar de la presencia del terminador *tI*, existe una cantidad importante de transcritos que lo sobrepasan pero que son procesados a especies de tamaños diversos. Como una observación adicional se encontró que ninguno de los transcritos tiene un tamaño cercano a 2000 bases, equivalente al transcrito completo. Cuando se cuantificó la eficiencia de *tI* mediante métodos enzimáticos se reportó como un terminador con 88% de eficiencia; sin embargo estos experimentos muestran que este comportamiento ocurre ya que los transcritos que sobrepasan a *tI* son rápidamente procesados. Los transcritos más abundantes se observan cuando son iluminados con la sonda anti-*galK* 3', esto sugiere que su decaimiento inicia en el extremo 5'. Dichos mensajeros son visualizados únicamente cuando la RNasa E se inactiva, lo que indica que esta enzima participa en su metabolismo.

Finalmente, decidimos analizar el comportamiento del plásmido pMS1 en el mismo fondo genético. Este vector porta la mutación *sib1* en la región *tI(sib)*, lo que afecta la estabilidad de la estructura de horquilla del terminador. Mediante el uso de la sonda anti-*tI* (Fig. 8C₁) se observó en la cepa *rne*⁺, crecida tanto a 30°C como a 44°C, un barrido arriba del marcador de 608 b, el cual corresponde con los transcritos que sobrepasan *tI*.

La señal mencionada fue aparente a los 0 min del tratamiento con rifampicina, transcurridos 3 min después de la adición del antibiótico ya no se detecto ningún transcrito,

Fig.8 Efecto de la mutación *rne* sobre la estabilidad de los transcritos *pgal-tl* y *pgal-tl-galk* mediante análisis de hibridación tipo “*Northern blot*” de los vectores pKG1800, pUS6 y pMS1. Se aisló el RNA total a partir de los cultivos bacterianos de las cepas N99 tipo silvestre, y N99 *rne* mutante, transformadas con los plásmidos que se indican y cultivadas a las temperaturas de 30°C y 44°C. El RNA aislado fué sometido a electroforesis en geles de agarosa, se transfirió a las membranas de nylon y se hibridó usando las ribosondas indicadas, como se describe en la sección de *Procedimientos Experimentales*. Los números colocados en la parte superior de los carriles corresponden al tiempo en minutos que transcurrió después de que se inhibió la transcripción con rifampicina y se tomó la muestra. Los marcadores que se emplearon son moléculas de RNA que tienen el tamaño referido.

A₁. Hibridación tipo *Northern blot* del plásmido pKG1800 con la ribosonda anti-*galk* 5'. La flecha muestra los transcritos *pgal-galk* que tienen 1800 bases de longitud.

- A₂. Hibridación tipo *Northern blot* del plásmido pKG1800 con la ribosonda anti-*galK* 3'. La flecha muestra los transcritos *pgal-galK* que tienen 1800 bases de longitud.
- B₁. Hibridación tipo *Northern blot* del plásmido pUS6 con la ribosonda anti-*sib*. Las flechas en ambos lados muestran los transcritos terminados *pgal-ti(sib)* de ~630 bases de longitud; los transcritos de tamaño menor, son muy probablemente productos de procesamiento en la región *sib*. En la cepa *rne-* se observan los transcritos que sobrepasan al terminador tI, mayores de 630 bases.
- B₂. Hibridación tipo *Northern blot* del plásmido pUS6 con la ribosonda anti-*galK* 5', solo en la cepa *rne-*, se observan los transcritos que pasaron la estructura del terminador y llegaron a *galK*. La flecha muestra la región que corresponde a 1400 bases.
- B₃. Hibridación tipo *Northern blot* del plásmido pUS6 con la ribosonda anti-*galK* 3', la señal detectada con esta sonda es evidentemente más fuerte que la detectada con la sonda anti-*galK* 5'.
- C₁. Hibridación tipo *Northern blot* del plásmido pMS1 con la ribosonda anti-*sib*. En este análisis solo se observan transcritos en la cepa que expresa la mutación *rne*, Los RNAs de alto peso molecular detectados corresponden a los transcritos *pgal-sib1-galK*, los cuales pasan más allá de la señal de terminación de la transcripción. La flecha de arriba indica que el tamaño de los transcritos de mayor longitud es de aproximadamente 1200 bases. No hay señal aparentemente del transcrito terminado (~630 bases) *pgal-sib1*. La flecha cercana al marcador de 608 b. indica el sitio donde deberíamos detectar este transcrito. Los RNAs de bajo peso molecular son probablemente productos de procesamiento a nivel de la región *sib1*.
- C₂. Hibridación tipo *Northern blot* del plásmido pMS1 con la ribosonda anti-*galK* 5'. Las flechas muestran los transcritos *pgal-sib1-galK* que tienen un rango de longitud que va de ~300 a 1400 bases.
- C₃. Hibridación tipo *Northern blot* del plásmido pMS1 con la ribosonda anti-*galK* 3'. La señal que se observa en los carriles en donde la RNasa E está inactiva es muy intensa y como lo indican las flechas, presenta un tamaño arriba de 160 y menor de 1400 bases, en los demás carriles no hay señal o es muy débil.

RESULTADOS

La RNasa E participa en el decaimiento del mRNA de la galactocinasa.

Para este análisis se utilizó un derivado de la cepa N99 que porta una mutación termo-sensible en el gene de la RNasa E (*rne-3071*). Cuando la bacteria se propaga a 30 °C, la RNasa mutante se comporta como la enzima silvestre, sin embargo, cuando la bacteria se transfiere a la temperatura no permisiva (44°C) la mutación se expresa y la enzima RNasa E se inactiva.

En la (Fig. 8A₁) se observan los resultados de la hibridación tipo *Northern blot* empleando la sonda anti-*galK* 5'. Al analizar la cepa *rne* silvestre transformada con el plásmido pKG1800 y cultivada a 30°C se detectaron dos transcritos, uno de aproximadamente 1800 b y otro de 1400 b. La vida media de los transcritos observados en estas condiciones fue de 3.65 min. Como se mencionó anteriormente, el transcrito de mayor tamaño (1800 b) corresponde al mensajero completo de *pgal-galK*, mientras que el más pequeño (aproximadamente 1400 b) probablemente se origine por la acción de una endonucleasa, en uno o más sitios. Se han detectado en el transcrito de *galK* secuencias cortas de cadena sencilla ricas en adeninas y uridinas que pueden ser blanco preferencial para el corte por RNasa E, posteriormente, los productos de corte podrían ser degradados por las exonucleasas 3' (PNPasa o RNasa II).

Cuando la cepa *rne* silvestre se propagó a 44°C, la cantidad de los transcritos aumentó, aproximadamente 5 veces, a tiempo 0 min, no obstante, su tasa de degradación fue más alta, ya que su vida media bajó a 1.20 min (este efecto puede deberse a la temperatura). De

manera interesante, cuando la cepa *rne* mutante transformada con el plásmido pKG1800 se cultivó a 44°C, además de los mRNAs de 1800 y 1400 bases, se observó una serie de cuatro transcritos en un rango de 296 a 1200 bases. Nuestros resultados sugieren que estos mRNAs son productos de procesamiento del transcrito *pgal-galK* y que la inactivación de la RNasa E permite que todos los transcritos sean estables, ya que su vida media fue de 6.2 min, es decir, aumentó con relación a la cepa silvestre bajo las mismas condiciones. Experimentos paralelos usando una sonda anti-*galK* 3' (Fig. 8A₂) demostraron que hay una mayor abundancia tanto de los transcritos completos como de los truncados en la cepa *rne* mutante, cultivada a 44°C, en comparación con lo obtenido con la sonda anti-*galK* 5' (Fig. 8A₁), aumentando la vida media de todos los transcritos presentes a 12 min, (la vida media de la silvestre en las mismas condiciones fue de 1.01 min). Estos resultados sugieren que el decaimiento del mRNA de la galactocinasa inicia a partir del extremo 5', debido probablemente a cortes endonucleolíticos. Es posible, que cuando la enzima RNasa E está activa haga cortes sobre los transcritos que dejen expuestos los extremos 3' por donde atacan las exonucleasas presentes en el degradosoma.

La RNasa E participa en el procesamiento del mRNA de *tI* / *sib*.

Como siguiente paso, se transformaron las cepas N99 silvestre y mutante con el plásmido pUS6, que lleva clonado el terminador *tI* entre *pgal* y *galK*, y se llevaron a cabo los experimentos de hibridación tipo *Northern blot* empleando la sonda anti-*tI(sib)*. En la (Fig. 8B₁) se observa que a 30°C y 44°C la cepa *rne* silvestre produce dos mRNAs mayoritarios, uno de aproximadamente 600 b y otro ligeramente mayor a 149 b, el primero corresponde al mRNA *pgal-tI* mientras que el segundo es muy probable que corresponda a

un producto de procesamiento que mantiene la región del terminador *tI*. Estas mismas especies de RNA se observaron en la cepa *rne* mutante crecida a 30°C. Sin embargo, cuando la cepa mutante se propagó a 44°C, se detectaron dos transcritos adicionales que sobrepasan el terminador; el de mayor tamaño (aproximadamente 1480 b) podría corresponder al mensajero *pgal-tI-galK* mientras que el otro (mayor a 608 b) a un mRNA que inicia en *pgal*, sobrepasa *tI* pero que se detiene antes de *galK*. Así mismo, se identificó un tercer transcrito que migró al nivel del marcador de 296 b, por debajo del mRNA *pgal-tI*. En la cepa *rne* mutante, además de la detección de transcritos de tamaño diferente en relación a la cepa silvestre, los mRNAs en general aumentaron su vida media. No se observó degradación evidente durante los tiempos de toma de muestra, a diferencia de lo ocurrido con la cepa silvestre en las mismas condiciones y cuya vida media fue de 2.11 min. Al cuantificar el transcrito mayoritario de aproximadamente 600 b (*pgal-tI*) observamos también que aumentó su vida media a más de 25 min en la cepa mutante, (estable en todos los tiempos de muestreo) contra 1.05 min en la cepa *rne* silvestre.

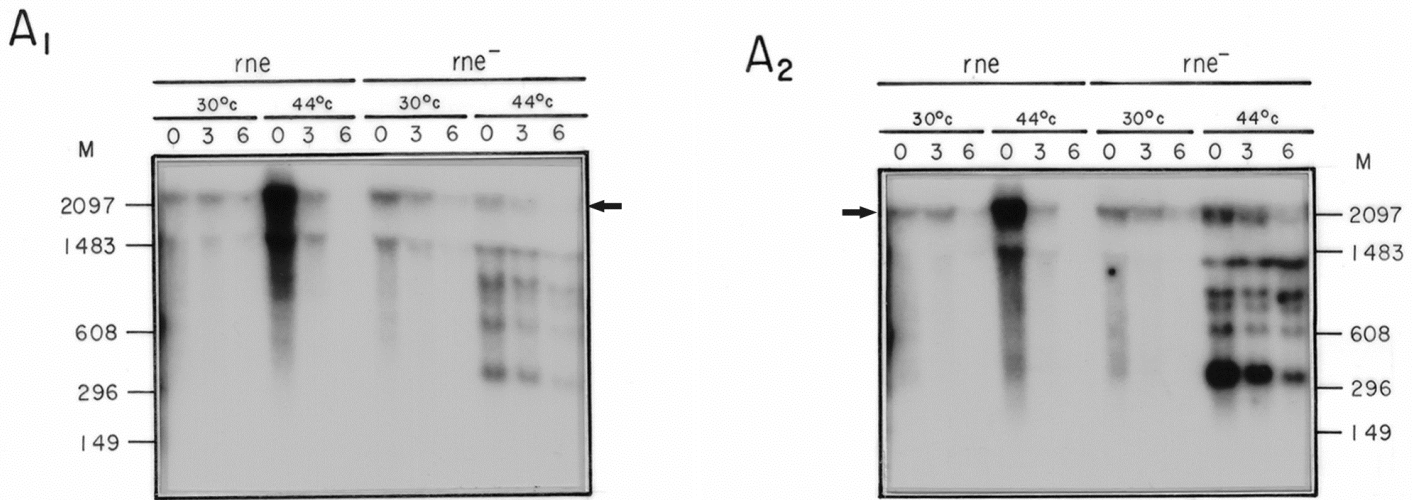
Experimentos paralelos empleando las sondas anti-*galK* 5' (Fig. 8 B₂) y anti-*galK* 3' (Fig. 8B₃) mostraron que en la cepa *rne* silvestre el terminador *tI* detiene aparentemente de manera eficiente la señal transcripcional iniciada en *pgal*, ya que solamente se detectó un barrido tenue que va de, arriba de 149 b. hasta menos de 1400 b. a los 0 min de iniciado el tratamiento con rifampicina. En contraste, en la cepa *rne*- propagada a 44°C, observamos claramente una serie de cinco transcritos en un rango de tamaño de 296 b a aproximadamente 1200 b. Estos resultados indican que a pesar de la presencia del terminador *tI*, existe una cantidad importante de transcritos que lo sobrepasan pero que son procesados a especies de tamaños diversos. Como una observación adicional se encontró que ninguno de los transcritos tiene un tamaño cercano a 2000 bases, equivalente al

transcrito completo. Cuando se cuantificó la eficiencia de *tI* mediante métodos enzimáticos se reportó como un terminador con 88% de eficiencia; sin embargo estos experimentos muestran que este comportamiento ocurre ya que los transcritos que sobrepasan a *tI* son rápidamente procesados. Los transcritos más abundantes se observan cuando son iluminados con la sonda anti-*galK* 3', esto sugiere que su decaimiento inicia en el extremo 5'. Dichos mensajeros son visualizados únicamente cuando la RNasa E se inactiva, lo que indica que esta enzima participa en su metabolismo.

Finalmente, decidimos analizar el comportamiento del plásmido pMS1 en el mismo fondo genético. Este vector porta la mutación *sib1* en la región *tI(sib)*, lo que afecta la estabilidad de la estructura de horquilla del terminador. Mediante el uso de la sonda anti-*tI* (Fig. 8C₁) se observó en la cepa *rne*⁺, crecida tanto a 30°C como a 44°C, un barrido arriba del marcador de 608 b, el cual corresponde con los transcritos que sobrepasan *tI*.

La señal mencionada fue aparente a los 0 min del tratamiento con rifampicina, transcurridos 3 min después de la adición del antibiótico ya no se detectó ningún transcrito, y al cuantificar su vida media esta fue de 2.0 min en ambos casos, poniéndose de manifiesto su gran inestabilidad. Sin embargo, el barrido fue más intenso que el obtenido con el plásmido pUS6, lo cual confirma que la mutación *sib1* afecta la eficiencia del terminador. En la cepa *rne* mutante, cultivada a 44 °C, (temperatura a la cual se inactiva la enzima) se visualizó una serie de cinco transcritos nuevos en un rango de tamaño de 296 a aproximadamente 1200 b, estas señales persistieron incluso después de los 6 min de inhibida la transcripción (Fig. 8C₁). El patrón de transcritos que se obtuvo utilizando las sondas anti-*galK* 5' (Fig. 8C₂), y anti-*galK* 3' (Fig. 8C₃), así como la estabilidad de los mismos, (al medir la vida media de los transcritos no se observó degradación evidente), fueron muy similares a lo obtenido con la sonda anti-*tI* en la cepa *rne*⁻, con la observación

nuevamente de que son mas abundantes cuando son alumbrados con la sonda anti-*galK* 3' (Fig. 8C₃). Todo lo anterior sugiere que ambos grupos de transcritos que portan las regiones *tl* y *galK*, muy probablemente son degradados inicialmente por cortes endonucleolíticos mediados por RNasa E, seguido por la acción de las exonucleasas 3' (PNPasa y/o RNasa



II).

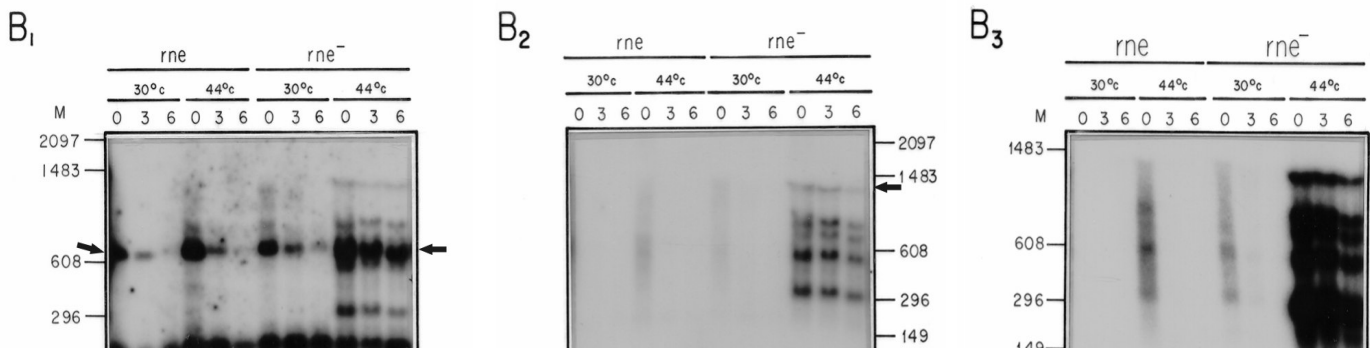


Fig.8 Efecto de la mutación *rne* sobre la estabilidad de los transcritos *pgal-tI* y *pgal-tI-galk* mediante análisis de hibridación tipo “Northern blot” de los vectores pKG1800, pUS6 y pMS1. Se aisló el RNA total a partir de los cultivos bacterianos de las cepas N99 tipo silvestre, y N99 *rne* mutante, transformadas con los plásmidos que se indican y cultivadas a las temperaturas de 30°C y 44°C. El RNA aislado fué sometido a electroforesis en geles de agarosa, se transfirió a las membranas de nylon y se hibridó usando las ribosondas indicadas, como se describe en la sección de *Procedimientos Experimentales*. Los números colocados en la parte superior de los carriles corresponden al tiempo en minutos que transcurrió después de que se inhibió la transcripción con rifampicina y se tomó la muestra. Los marcadores que se emplearon son moléculas de RNA que tienen el tamaño referido.

- A₁. Hibridación tipo *Northern blot* del plásmido pKG1800 con la ribosonda anti-*galk* 5'. La flecha muestra los transcritos *pgal-galk* que tienen 1800 bases de longitud.
- A₂. Hibridación tipo *Northern blot* del plásmido pKG1800 con la ribosonda anti-*galk* 3'. La flecha muestra los transcritos *pgal-galk* que tienen 1800 bases de longitud.
- B₁. Hibridación tipo *Northern blot* del plásmido pUS6 con la ribosonda anti-*sib*. Las flechas en ambos lados muestran los transcritos terminados *pgal-ti(sib)* de ~630 bases de longitud; los transcritos de tamaño menor, son muy probablemente productos de procesamiento en la región *sib*. En la cepa *rne-* se observan los transcritos que sobrepasan al terminador tI, mayores de 630 bases.
- B₂. Hibridación tipo *Northern blot* del plásmido pUS6 con la ribosonda anti-*galk* 5', solo en la cepa *rne-*, se observan los transcritos que pasaron la estructura del terminador y llegaron a *galk*. La flecha muestra la región que corresponde a 1400 bases.
- B₃. Hibridación tipo *Northern blot* del plásmido pUS6 con la ribosonda anti-*galk* 3', la señal detectada con esta sonda es evidentemente más fuerte que la detectada con la sonda anti-*galk* 5'.
- C₁. Hibridación tipo *Northern blot* del plásmido pMS1 con la ribosonda anti-*sib*. En este análisis solo se observan transcritos en la cepa que expresa la mutación *rne*, Los RNAs de alto peso molecular detectados corresponden a los

transcritos *pgal-sib1-galK*, los cuales pasan más allá de la señal de terminación de la transcripción. La flecha de arriba indica que el tamaño de los transcritos de mayor longitud es de aproximadamente 1200 bases. No hay señal aparentemente del transcrito terminado (~630 bases) *pgal-sib1*. La flecha cercana al marcador de 608 b. indica el sitio donde deberíamos detectar este transcrito. Los RNAs de bajo peso molecular son probablemente productos de procesamiento a nivel de la región *sib1*.

- C₂. Hibridación tipo *Northern blot* del plásmido pMS1 con la ribosonda anti-*galK* 5'. Las flechas muestran los transcritos *pgal-sib1-galK* que tienen un rango de longitud que va de ~300 a 1400 bases.
- C₃. Hibridación tipo *Northern blot* del plásmido pMS1 con la ribosonda anti-*galK* 3'. La señal que se observa en los carriles en donde la RNasa E está inactiva es muy intensa y como lo indican las flechas, presenta un tamaño arriba de 160 y menor de 1400 bases, en los demás carriles no hay señal o es muy débil.

DISCUSIÓN SECCIÓN II

La estabilidad de los mRNAs es un parámetro esencial en el control de la expresión genética de los organismos procariontes. Actualmente se acepta que la vida media de los transcritos depende de la conexión entre su procesamiento y degradación; estos procesos involucran la acción concertada de las endo- y las exo-ribonucleasas, las cuales ejercen su función de acuerdo a las señales presentes en el RNA blanco, tanto en su secuencia, como de su estructura.

En *E. coli*, las endonucleasas (la principal enzima de este tipo es la RNasa E) inician la degradación de los transcritos, produciendo fragmentos de RNA que son subsecuentemente degradados a nucleótidos por la acción de las 3' exoribonucleasas (la RNasa II y la PNPasa) (Carpousis, A.J. 2002). Las regiones de los mRNA que debido a su estructura secundaria son inaccesibles a las exonucleasas pueden ser desenrolladas por la acción de una RNA helicasa. De manera interesante estos tres tipos de enzimas coexisten en un mismo complejo multienzimático denominado degradosoma. (Carpousis *et al.*, 1994; Py *et al.*, 1994; 1996; Miczak *et al.*, 1996; Blum *et al.*, 1997).

Con la finalidad de analizar la participación de la RNasa E en el procesamiento de los transcritos *pgal-tI*, *pgal-tI/sibI-galK* y *pgal-galK*, utilizamos la cepa bacteriana *rne-*, la cual presenta una mutación que la hace termo-sensible (*rne-3071* donada por el Dr. S. R. Kushner).

De manera general, nuestros resultados muestran que los transcritos de longitud completa *pgal-tI* y *pgal-tI-galK*, así como los RNAs truncados que derivan de su procesamiento se estabilizan considerablemente en ausencia de la RNasa E. Estos

resultados sugieren que en la cepa silvestre los transcritos mencionados son cortados por la RNasa E y en combinación con la acción del degradosoma activo, del cual forma parte, son degradados eficientemente. Por otro lado, es importante comentar que cuando se analizó el funcionamiento del terminador *tI* en la cepa *rne-* con las sondas anti-*galK* 3' y 5' observamos toda una serie de RNAs truncados, lo cual indica que la RNA polimerasa pasa a través del terminador sintetizándolos. Estos resultados muestran que el terminador *tI* no es tan eficiente *in vivo* (99% de eficiencia) como se había reportado previamente (Schmeissner *et al.*, 1984b; Montañez *et al.*, 1986; Cisneros *et al.*, 1996).

La explicación a esta discrepancia es que, los transcritos que sobrepasan la señal del terminador en una cepa silvestre, son rápidamente procesados por las endonucleasas RNasa E, RNasa III, etc. y degradados de manera eficiente por la exonucleasa PNPasa al encontrar el extremo 3' adecuado para actuar; por lo cual no eran detectados en los ensayos anteriores, sugiriéndoles esto, que toda la transcripción se detenía en *tI*. La participación de la RNasa E en la estabilidad de los transcritos *pgal-tI* y *pgal-tI-galK* quedó aun más de manifiesto cuando se analizó la mutación *sibI*, la cual daña la estructura del terminador *tI* confiriéndole una alta inestabilidad al transcrito *pgal-tI/sibI*; se ha reportado que esta mutación hace que el mRNA terminado en *tI* sea susceptible a la degradación por la PNPasa (Cisneros *et al.*, 1996). En la cepa mutante *rne-* la vida media del transcrito *pgal-tI/sibI* y de múltiples RNAs truncados que sobrepasaron la señal de terminación *tI* aumentó, estabilizándolos a tal grado que nos permitió su visualización.

Con respecto al transcrito *pgal-tI-galk*, observamos que siempre fue más abundante la señal encontrada con la sonda que detecta los transcritos del final de *galK* (3' de *galK*) que aquella detectada con la sonda del inicio de este gene (5' de *galK*), lo cual sugiere que el procesamiento de este transcrito inicia con cortes endonucleolíticos desde el extremo 5', lo

que permite posteriormente la degradación paulatina de los transcritos para generar especies de menor tamaño por medio de la acción de la PNPasa y/o en combinación con las enzimas componentes del degradosoma, sin embargo no sabemos si en la cepa que porta la mutación *rne*- el degradosoma se pueda ensamblar eficientemente o existe algún procesamiento alternativo que lleve a cabo los cortes endonucleolíticos cuando RNasa E se encuentra inactiva.

En conclusión, nuestros resultados demuestran que, adicional a la participación de la PNPasa, la enzima RNasa E también está involucrada en el procesamiento de los transcritos, *pgal-tI*, *pgal-tI-galK* y *pgal-galK*, así como de sus productos truncados.

El sistema empleado en este trabajo nos permite concluir que terminador *tI* no es tan eficiente *in vivo* como se había reportado.

PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

SECCION II

Cepas bacterianas y plásmidos

Las cepas de *E. coli* que se usaron en este trabajo son, la bacteria N99 *sup*⁰ *strA galK*₂ (colección del NIH) y la mutante termo-sensible N99 *sup*⁰ *strA gal K*₂ *rne::tn10* (a partir de la cepa SK7669 F- *thyA715 rne-3071, pyrC::Tn10* donada por el Dr. S. R. Kushner se cotransdujo la mutación *rne-3071* condicionalmente letal, con el marcador que confiere la resistencia a tetraciclina *pyrC::Tn10*, el gen *pyrC* mapea a menos de un minuto del gen *rne* en el cromosoma de *E. coli*). (Kushner *et al.*, 1993).

Las células se transformaron con DNA recombinante de acuerdo a Davies et al. (1980). Los plásmidos pKG1800, pUS6 y pMS1 que se utilizaron en la transformación de las cepas, fueron descritos en la sección I de esta tesis.

El plásmido pAJKE que codifica para la sonda anti-*galK* 3' se construyó mediante la clonación del fragmento *EcoRV-HpaI* del gene *galK* (1230 pb) dentro del sitio *EcoRV* del vector pSP72 (Promega) que al cortarse con la enzima *BsiWI* y transcribir con la RNA polimerasa SP6 genera la sonda de 296 pb utilizada en los ensayos de hibridación.

Amplificación y manipulación de DNA

Las enzimas de restricción utilizadas se adquirieron de New England Biolabs o de BRL y se usaron de acuerdo a las recomendaciones del proveedor. El DNA de las clonas

plasmídicas se amplificó y purificó mediante el método alcalino--SDS (Birnboim & Doly, 1979) y se corroboró la clonación y orientación mediante análisis de restricción empleando las enzimas apropiadas. Las mezclas de reacción se resolvieron en geles de agarosa al 1% ó de poliacrilamida al 5% dependiendo del tamaño de los fragmentos originados, las bandas de DNA fueron teñidas con bromuro de etidio y visualizadas en un transiluminador de luz ultravioleta.

Condiciones de crecimiento de los cultivos bacterianos

Los medios de cultivo se prepararon como lo describe Sambrook *et al.* (1989). En los casos que lo requirieron se agregó antibiótico a las siguientes concentraciones: tetraciclina, 12.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$; ampicilina, 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Los cultivos bacterianos se crecieron en cajas de medio LB (Luria Broth) con el antibiótico apropiado durante toda la noche a 30°C, para tener colonias aisladas de las cuales se seleccionó una colonia para ser propagada en medio LB líquido. Se utilizaron las condiciones apropiadas de crecimiento, para llevar a cabo la extracción de RNA de cada cepa, es decir, 30°C para propagar las células y 44°C para inducir la expresión de la mutación *rne 3071* en las células que la contienen (el método es ampliamente descrito a continuación).

*Determinación de la vida media del mRNA de *tI/sib* y de *galactocinasa**

Se aisló el RNA total usando un método modificado (Sarmientos *et al.*, 1983). De un cultivo de toda la noche crecido a 30°C, se hace una dilución 1:100 en medio L. B. con el antibiótico apropiado. Estas células se crecieron a 30°C hasta una DO_{600} de 0.4 momento

en que el cultivo fue dividido en dos; una parte del mismo continuó incubándose a 30°C mientras que la otra parte se incubó a la temperatura no permisiva de 44°C (a esta temperatura se manifiesta la mutación en el gene de RNasa E, lo que nos permite tener una cepa *rne-*) durante 60 minutos. Transcurrido este tiempo, la transcripción se inhibió usando el antibiótico rifampicina, a una concentración final de 0.5 mg/ml⁻¹, siendo éste el tiempo cero. A los tiempos antes establecidos (3' y 6') se tomaron las siguientes alícuotas, (10 ml del cultivo por cada muestra) colocándolas en tubos que tienen previamente 5ml de etanol frío, se mezcla y permanecen incubados en hielo hasta que se toma la última muestra. La extracción del RNA total se continua como se describe en Sarmientos *et. al.*, 1983. Este procedimiento se siguió tanto para la cepa silvestre como para la mutante en *rne*.

Las sondas de RNA se sintetizaron usando los reactivos y el protocolo de Amersham; en este caso, se empleó [α -³²P]-UTP (Amersham, AA0003). La sonda anti-*galK* 5', de 148 bases, se transcribió con la RNA polimerasa SP6 usando el vector pAJKB previamente linearizado con *EcoRV*. La sonda anti-*sib*, de 149 bases, se describió previamente (Cisneros *et al.*, 1986). La sonda anti-*galK* 3', de 296 bases, se transcribió con la RNA polimerasa SP6 utilizando el vector pAJKE linearizado con la enzima *BsiWI*. Se corroboró el tamaño e integridad de las sondas y marcadores de RNA en geles desnaturizantes de poliacrilamida-urea.

Para los experimentos de *Northern blot* se emplearon membranas de nylon, Hybond-N (Amersham); la transferencia del RNA presente en los geles desnaturizantes de agarosa 1.5%, formaldehído 6% a las membranas se realizó por difusión durante toda la noche. Posteriormente las membranas se hibridaron con las sondas anti-*galK* 5' y anti *galK* 3' a la temperatura de 65°C y con la sonda anti-*tl/sib* a la temperatura de 55°C, seguido de varios

lavados astringentes para retirar la marca radioactiva no incorporada. La señal de las bandas seleccionadas se cuantificó a partir de las placas autorradiográficas, bajo condiciones de linealidad.

La vida media de cada mRNA se calculó mediante el siguiente procedimiento: utilizando el software de análisis de imágenes *Kodak Digital Science 1D Image Analysis Software, Versión 3.0* se digitalizaron las placas autorradiográficas (producto de cada uno de los ensayos de *Northern blot*), y se cuantificó la concentración de transcritos presentes, traducida como intensidad, estos datos se normalizaron contra la cantidad de RNA total de cada muestra, los resultados así obtenidos se graficaron en función del tiempo utilizando el programa *Curve Expert*, versión 1.3 a fin de obtener un modelo de linearización adecuado al comportamiento de los datos.

Bibliografía

- Babitzke, P., and Kushner, S. R. (1991) The Ams (altered mRNA stability) protein and ribonuclease E are encoded by the same structural gene of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 1-5.
- Belasco, J.G., and Brawerman, G. (1993) Experimental approaches to the study of mRNA decay. In *Control of Messenger RNA Stability*. Belasco, J.G., and Brawerman, G. (eds). San Diego: Academic Press, pp. 475-493.
- Belasco, J.G., and Higgins, C.F. (1988) Mechanisms of mRNA decay in bacteria: a perspective. *Gene* **72**: 15-23.
- Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523.
- Blum, E., Py, B., Carpousis, A.J., and Higgins, C.F. (1997) Polyphosphate kinase is a component of the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Mol Microbiol* **26**: 387-398.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Braun, F., Hajnsdorf, E., and Reigner, P. (1995) Polynucleotide phosphor-ylase is required for the rapid degradation of the RNase E-processed rpsO messenger RNA of *Escherichia coli* devoid of its 38 hairpin. *Mol Microbiol* **19**: 997-1005.
- Burns, P.A., Gordon, A.J.E., and Glickman, B.W. (1987) Influence of neighbouring base sequence on N-methyl-N8-nitro-Nitrosoguanidine mutagenesis in the *lacI* gene of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **194**: 385-390.
- Bycroft, M., Hubbard, T.J.P., Proctor, M., Freund, S.M.V., and 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.
- Carpousis, A.J., vanHouwe, G., Ehretsmann, C., and Krisch, H.M. (1994) Copurification of *E. coli* RNase E and PNPase: evidence for a specific association between two enzymes important in RNA processing and degradation. *Cell* **76**: 889-900.
- Carpousis, A.J., (2002) The *Escherichia coli* RNA degradosome: structure, function and relationship to other ribonucleolytic multienzyme complexes. *Biochemical Society Transactions* **30**: 150-155.
- Causton, H., Py, B., McLaren, R.S., and Higgins, C.F. (1994) mRNA degradation in *Escherichia coli* : a novel factor which impedes the exoribonucleolytic activity of PNPase at stem-loop structures. *Mol Microbiol* **14**: 731-741.
- Churchward, G., Belin, D., and Nagamine, Y. (1984) A pSC101-derived plasmid which shows no sequence homology to other commonly used cloning vectors. *Gene* **31**: 165-171.
- Cisneros, B., Court, D.L., Sanchez, A., and Montañez, C. (1996) Point mutations in a transcription terminator lambda tI, that affect both transcription termination, and RNA stability. *Gene* **181**: 127-133.

- Clarke, D.J., and Dowds, B.C. (1994) The gene coding for polynucleotide phosphorylase in *Photothabdus sp.* Strain K122, is induced at low temperatures. *J Bacteriol* **176**: 3775-3784.
- Cohen, S., and McDowall, K. (1997) RNase E: still a wonderfully mysterious enzyme. *Mol Microbiol* **23**: 1099-1106.
- Court, D. (1993) RNA processing and degradation by RNase III. In *Control of Messenger RNA Stability*. Belasco, J., and Brawerman, G. (eds). San Diego: Academic Press, pp. 71-116.
- Davies, R.W., Botstein, D., and Roth, J.R. (1980) *A Manual for Genetics Engineering. Advanced Bacterial Genetics*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Deutscher, M.P., and Racher-Reuven, N. (1991) Enzymatic basis for hydrolytic versus phosphorolytic mRNA degradation in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 3277-3280.
- Donovan, W.P., and Kushner, S.R. (1986) polynucleotide phosphorylase and ribonuclease II are required for cell viability and mRNA turnover in *Escherichia coli* K12. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 120-124.
- Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., et al. (1995) Whole-genome random sequencing and assemble of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269**: 496-512.
- García-Mena, J. (1992) Polynucleotide phosphorylase, *sib* and gene expression. Doctoral Thesis, CINVESTAV-IPN, Mexico City.
- Gibson, T.J., Thompson, J.D., and Heringa, J. (1993) The KH domain occurs in a diverse set of RNA-binding proteins that include the antiterminator NusA and is probably involved in binding to nucleic acid. *FEBS Lett* **324**: 361-366.
- Godefroy-Colburn, T., and Grunberg-Manago, M. (1972) Polynucleotide phosphorylase. In *The Enzymes*, Vol.VII.Boyer,P.D. (ed.). San Diego: Academic Press, pp. 533-574.
- Grunberg-Manago, M. (1963) Polynucleotide phosphorylase. In *Progress in Nucleic Acid Research*, Vol. 1. Davidson, J.N., and Cohn, W.E. (eds). San Diego: Academic Press, pp. 93-133.
- Grunberg-Manago, M., and Ochoa, S. (1955) Enzymatic synthesis and breakdown of polynucleotides; polynucleotide phosphorylase. *J Am Chem Soc* **77**: 3165-3166.
- Guarneros, G. (1988) Retroregulation of bacteriophage lambda int gene expression. In *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Hobom, G., and Rott, R. (eds). Berlin:Springer, pp. 1-19.
- Guarneros, G., and Portier, C. (1990) Different specificities of ribonuclease II and polynucleotide phosphorylase in 3' mRNA decay. *Biochimie* **72**: 771-777.
- Harlow, E., and Lane, D. (1988) *Antibodies: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Higgins, C.F., Causton, H.C., Dance, G.S.G., and Mudd, E.A. (1993) The role of the 38 end in mRNA stability and decay. In *Control of Messenger RNA Stability*. Belasco, J.G., and Brawerman, G. (eds). San Diego: Academic Press, pp. 13-30.
- Jones, G.H., and Bibb, M.J. (1996) Guanosine pentaphosphate synthetase from *Streptomyces antibioticus* is also a polynucleotide phosphorylase. *J Bacteriol* **178**: 4281-4288.

- Jones, A.R., and Schedl, T. (1995) Mutations in *gld-1*, a female germ cell-specific tumor suppressor gene in *Caenorhabditis elegans*, affect a conserved domain also found in Src-associated protein Sam 68. *Genes Dev* **9**: 1491-1504.
- Kushner, S.R., Arraiano C., and Yancey, S.D. (1993) Identification of endonucleolytic cleavage sites involved in decay of *Escherichia coli* *trxA* mRNA. *J Bacteriol* **175**. (4): 1034-52.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lin-Chao, S., and Cohen, S.N. (1991) The rate of processing and degradation of antisense RNA I regulates the replication of ColE I-type plasmids *in vivo*. *Cell* **65**: 1233-1242.
- Littauer, U.Z., and Soreq, H. (1982) Polynucleotide phosphorylase. In *The Enzymes*, Vol. XV, *Nucleic Acids*, part B. Boyer, P.D. (ed.). San Diego: Academic Press, pp. 517-553.
- Luttinger, A., Hahn, J., and Dubnau, D. (1996) Polynucleotide phosphorylase is necessary for competence development in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **19**: 343-356.
- McKenney, K., Shimatake, H., Court, D.L., Schmeissner, U., Brady, C., and Rosenberg, M. (1981) A system to study promoter and terminator signals recognized by *Escherichia coli* RNA polymerase. In *Gene Amplification and Analysis*, Vol. II, *Analysis of Nucleic Acids by Enzymatic Methods*. Chirikjian, J.C., and Papas, T.S. (eds). North Holland: Elsevier, pp. 383-415.
- Miczak, A., Kaberdin, V.R., Wei, C.-L., and Lin-Chao, S. (1996) Proteins associated with RNase E in a multicomponent ribonucleolytic complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 3865-3869.
- Miller, H.I., Abraham, J., Benedik, M., Campbell, A., Court, D., Echols, H., et al. (1981) Regulation of the integration excision reaction by bacteriophage lambda. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* **45**: 439-445.
- Montanez, C., Bueno, J., Schmeissner, U., Court, D.L., and Guarneros, G. (1986) Mutations of bacteriophage lambda that define independent but overlapping RNA processing and transcription termination sites. *J Mol Biol* **191**: 29-37.
- Musco, G., Stier, G., Joseph, C., Castiglione-Morelli, M.A., Nilges, M., Gibson, T.J., et al. (1996) Three-dimensional structure and stability of the KH domain: molecular insights into the X fragile syndrome. *Cell* **85**: 235-242.
- Nakamura, Y., and Mizusawa, S. (1985) *In vivo* evidence that the *nusA* and *infB* genes of *E. coli* are part of the same multi-gene operon which encodes at least four proteins. *EMBO J* **4**: 527-532.
- 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.
- Portier, C. (1980) Isolation of a polynucleotide phosphorylase mutant using a kanamycin resistant determinant. *Mol Gen Genet* **178**: 343-349.
- Portier, C., Dondon, L., Grunberg-Manago, M., and Regnier, 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.
- Py, B., Causton, H., Mudd, E.A., and Higgins, C.F. (1994) A protein complex mediating mRNA degradation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **14**: 717-729.
- Py, B., Higgins, C.F., Krisch, H.M., and Carpousis, J. (1996) A DEAD-box RNA helicase in the *Escherichia coli* degradosome. *Nature* **381**: 169-172.

- Regnier, P., Grunberg-Manago, M., and Portier, C. (1987) Nucleotide sequence of the *pnp* gene of *Escherichia coli* encoding polynucleotide phosphorylase. *J BiolChem* **262**: 63-68.
- Reiner, A.M. (1969) Characterization of polynucleotide phosphorylase mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **97**: 1437-1443.
- Robert-Le Meur, M., and Portier, C. (1992) *E. coli* polynucleotide phosphorylase expression is autoregulated PNPase autoregulation through an RNaseIII-dependent mechanism. *EMBO J* **11**:2633-2641.
- Robert-Le Meur, M., and Portier, C. (1994) Polynucleotide phosphorylase of *Escherichia coli* induces the degradation of its RNase III processed messenger by preventing its translation. *Nucleic Acids Res* **22**: 397-403.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., et al. (1985) Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sarkar, N. (1997) Polyadenylation of mRNA in prokaryotes. *Annu Rev Biochem* **66**: 173-197.
- Sarmientos, P., Sylvester, J.E., Contents, S., and Cashel, M. (1983) Differential stringent control of the tandem *E. coli* ribosomal RNA promoters, from the *rrnA* operon expressed *in vivo* in multicopy plasmids. *Cell* **32**: 1337-1346.
- Schmeissner, U., McKenney, K., Rosenberg, M., and Court, D. (1984a) Removal of terminator structure by RNA processing regulates *int* gene expression. *J Mol Biol* **176**: 39-53.
- Schmeissner, U., McKenney, K., Rosenberg, M., and Court, D. (1984b) Transcription terminator involved in the expression of the *int* gene of phage lambda. *Gene* **28**: 343-350.
- Shapiro, J.A., and Adhya, S. (1969) The galactose operon of *E. coli* K-12 II. A deletion analysis of operon structure and polarity. *Genetics* **62**: 249-264.
- Silhavy, T.J., Berman, M.L., and Enquist, L.W. (1984) *Experiments with Gene Fusions*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Siomi, H., Matunis, M.J., Michael, W.M., and Dreyfuss, G. (1993) The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif. *Nucleic Acids Res* **21**: 1193-1198.
- Siomi, H., Choi, M.C., Siomi, M.C., Nussbaum, R.L., and Dreyfuss, G. (1994) Essential role for KH domains in RNA binding: impaired RNA binding by a mutation in the KH domain of FMR1 that causes fragile X syndrome. *Cell* **77**: 33-39.
- Siomi, M.C., Siomi, H., Sauer, W.H., Srinivisan, S., Nussbaum, R.L., and Dreyfuss, G. (1995) FXR1, an autosomal homology of the fragile X mental retardation gene. *EMBO J* **14**: 2401-2408.
- Swatantra, K.J., Pragai, B., and Apirion, D. (1982) A possible complex containing RNA processing enzymes. *Biochem Biophys Res Commun* **106**: 768-778.
- Tabor, S., and Richardson, C.C. (1987) DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 4767-4771.
- Thang, M.N., Thang, D.C., and Leautey, J. (1967) Séparation et identification de polynucléotide phosphorylase par électrophorèse sur gel polyacrylamide. *C R Acad Sci Paris* **265** (Série D): 1823-1826.

- Verkerk, A.J., de Graaff, E., DeBouille, K., Eichler, E.E., Konecki, D.S., Reyniers, E., et al. (1993) Alternative splicing in the fragile X gene FMR1. *Hum Mol Genet* **2**: 399-404.
- Wilson, D., and Hogness, D. (1966) Galactokinase and uridine diphosphogalactose 4-epimerase from *Escherichia coli*. In *Methods in Enzymology*, Vol. III, *Complex Carbohydrates*. Neufeld, E.F., and Ginsburg, V. (eds). San Diego: Academic Press, pp. 229-240.
- Xu, F., and Cohen, S. (1995) RNA degradation in *Escherichia coli* regulated by 38 adenylation and 58 phosphorylation. *Nature* **374**: 180-183.
- Yancey, S.D., and Kushner, S.R. (1990) Isolation and characterization of a new temperature-sensitive polynucleotide phosphorylase mutation in *Escherichia coli* K-12. *Biochimie* **72**: 835-843.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.
- Zhang, Y., O'Connor, J.P., Siomi, M.C., Srinivasan, S., Dutra, A., Nussbaum, R., et al. (1995) The fragile X mental retardation syndrome protein interacts with novel homologs FXR1 and FXR2. *EMBO J* **14**: 5358-5366.
- Zhang, P., Vigne, J.L., and Mellon, S.H. (1998) Polyribonucleotide phosphorylase is a double stranded DNA-binding protein. *DNA Cell Biol* **17**: 169-1