



Cinvestav
Irapuato

DEPARTAMENTO
Ingeniería Genética

PROGRAMA
Biotecnología de Plantas

TÍTULO DEL PROYECTO DE TESIS:

ANALISIS DE LA INTERACCION GENÉTICA ENTRE LOS GENES DUPLICADOS QUE
CODIFICAN PARA LAS RNA HELICASAS DE CAJA DEAD EN *Bacillus subtilis*

PRESENTA
José Antonio González Gutiérrez

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
Doctor en Ciencias

Irapuato Gto. México

NOVIEMBRE del 2018

ABSTRACT

The presence of duplicated genes in organisms is well documented, and there is increased interest in understanding genetic interactions among paralogous family members. Often, the different members are dispensable, so the question remains of why paralogous genes are retained. Gene-gene interaction can be revealed by phenotypes being modified by a combination of certain genes; a phenomenon termed epistasis. In the Firmicutes, the ancient and conserved DEAD-box RNA helicase (DBRH) gene family increased the number of its members through gene duplication events. *B. subtilis* possesses four DBRH genes, *cshA*, *cshB*, *deaD*, and *yfmL*. All but *DeaD* exhibit growth deficiency at 18 °C. We explored the interaction of the *B. subtilis* DEAD-box RNA helicase by analyzing the double mutant growth and effect on the growth of manipulating gene expression. We quantitated changes in transcription of the different DBRH genes in the different mutant background to determine if a compensatory expression could explain the lack of a phenotype in some mutants. We construct a chimera among variable *cshA*, *cshB* and *deaD* C-terminus and conserved core of *yfmL* to determinate a possible generic function. Although gene expression of most paralogous DBRH genes increased in every helicase mutant background this does entail compensated DBRH's function, as no cross-complementation was observed upon overexpression of paralogous genes, except for marginal complementation of *YfmL* in the *CshB* mutant background. Positive epistasis (amelioration of the defective growth) was only observed for *cshA*, *cshB* and *yfmL*. Small negative interference effects for all combinations with *deaD*. None of the different chimeras complemented the different mutants, and instead, all chimeras inhibited the growth of the $\Delta yfmL$ mutant, and other combinations were also deleterious. Our findings suggest that the long time divergence between DEAD-box RNA helicase genes derived in their specialized function in RNA metabolism and that under laboratory conditions lack of individual DBRH helicases does not compromise growth.

RESUMEN

La presencia de genes duplicados en los organismos está bien documentada, y existe un gran interés por comprender como se dan las interacciones entre genes parálogos de una misma familia. Con frecuencia los diferentes miembros de una familia de genes son dispensables, por lo que permanece la pregunta de por qué se conservan los genes parálogos. La interacción gen-gen puede ser revelada por la modificación de fenotipos dados por ciertos genes; fenómeno denominado epistasis. En los Firmicutes, la familia de las RNA Helicasas de caja DEAD (DBRH) ha aumentado su número de miembros a través de procesos de duplicación. *Bacillus subtilis* posee cuatro genes DBRH. *cshA*, *cshB*, *deaD*, y *yfmL*. Cepas bacterianas, conteniendo mutantes individuales en cada uno de estos genes muestran un crecimiento deficiente a 18 °C pero no a 37 °C. En este trabajo se exploró la interacción entre las DBRHs mediante el análisis del crecimiento de las dobles mutantes y la manipulación de su expresión genética. Cuantificamos el nivel de transcripción para cada uno de los genes DBRH en los diferentes fondos mutantes para determinar si hay una expresión compensatoria que pudieran explicar la falta de fenotipo en algunas mutantes y a 37 °C. También construimos quimeras entre la región carboxi-terminal variable de CshA, CshB y DeaD con la región conservada de YfmL para determinar una posible función genérica. Nosotros encontramos que la expresión genética a nivel de mRNA de la mayoría de los parálogos de las DBRH incrementó en cada uno de los fondos mutantes, no ocurrió lo mismo a nivel de expresión de proteína, por lo que no parece haber una compensación funcional de las DBRHs. De igual forma, tras la sobreexpresión de los genes parálogos no se presentó complementación cruzada, con la excepción de una complementación parcial de YfmL en el fondo mutante de CshB. Se observó epistasis positiva únicamente para mutantes dobles de *cshA*, *cshB* y *yfmL*. Para todas las combinaciones de *deaD* se observaron ligeros efectos negativos. Al analizar la inserción el efecto de la sobreexpresión de las quimeras en ningún caso se logró la complementación de los fondos mutantes simples, por lo contrario, existieron efectos deletéreos. Nuestros hallazgos sugieren que a lo largo tiempo los genes de las DBRHs han divergido hacia una función especializada en el metabolismo del RNA, y que el hecho de que la ausencia individual de las DBRH no comprometa el crecimiento de las mutantes bajo condiciones de laboratorio no se explica por una función redundante.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a CONACYT por la beca 102712 que me permitió realizar mis estudios de doctorado y contribuir a la comunidad mediante la generación de conocimiento.

A mi esposa María Cristina por acompañarme en cada momento de mi vida aligerando la carga, brindandome su amor y fuerzar para concluir cada proyecto en el que participamos.

A mis hijos Mateo y Paulo por ser mi principal fuente de inspiración y motivación para brindar mi mejor día a día.

A mi comité de asesores, gracias por su apoyo y su confianza para realizar un tabajo digno y a la altura de la Intitución.

A todos los participantes Itzel Vargas, Gabriel Guillén, Diana Fabiola Díaz, Africa Islas, Varinia López que contribuyeron con su trabajo y experiencia en la realización del presente trabajo.

A todo el equipo de trabajadores del CINVESTAV preparación de medios, lavado de material, secretarias, vigilancia y todo el personal que contribuye al óptimo trabajo en la institución.

ÍNDICE

ABSTRACT	i
RESUMEN	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
INDICE GENERAL	iv
INDICE DE FIGURAS	vi
INIDICE DE TABLAS	vii

1.-INTRODUCCIÓN

1

1.1.- RNA HELICASAS.

1.1.1.- Descripción

1.1.2.-Clasificación.

1.1.3.- Mecanismo de acción

1.1.4.- Proteínas de caja DEAD en bacterias.

1.1.5.- Respuesta de las RNA helicasa al estrés abiótico.

1.1.6.- Evolución de las RNA de caja DEAD.

1.2.-Robustez y duplicación genética

1.3.- Interacciones epistáticas entre los genes.

2.-HIPÓTESIS 13

3.- OBJETIVOS 13

3.1.- Objetivo general

3.2.- Objetivos específicos

4.-MATERIALES Y METODOS 14

4.1.- Obtención y purificación de DNA.

4.2 .- Preparación de células competentes y transformación de B. subtilis por el método de “dos pasos”.

4.3.- Extracción de DNA plasmídico por el método de Birnboim y Doly

(lisis alcalina).

4.4.- Obtención de cepa auto-complementate $\Delta\text{deaD}::\text{Tet} \text{ amyE}::\text{deaD}$ cat.

4.5.- El modelo de crecimiento logístico.

4.6.- Modificación genética.

4.6.1.- Cambio de "cassette" de resistencia a cloranfenicol en cepas mutantes simples ΔcshA y ΔcshB .

4.6.2.- Dobles mutantes

4.6.3.- Sobre-expresantes inducibles con xilosa

4.6.4.- Fusión de núcleo helicasa $y\text{fmL}$ con región carboxi terminal de cshA

4.6.5.- RNA helicasas con FLAG-tag

4.7.- Cinéticas de crecimiento para las mutantes simples a 18 °C.

4.8.- Cinéticas de crecimiento para cepas sobre-expresantes.

4.9.- Cálculo de espistais entre los genes codificantes para RNA helicasas.

4.10.- Análisis del patrón de expresión genética de las mutantes simples en condiciones de estrés.

4.11.- Análisis de la expresión de las RNA helicas mediante Westernblot.

4.11.1.-Electroforesis en gel de poliacrilamida.

4.11.2.-Transferencia

4.11.3.- Inmunoblotting.

4.11.4.- Revelado por el método de chemidoc.

5.- RESULTADOS

24

5.1.- Estrés abiótico en mutantes simples.

5.2.- Crecimiento de las dobles mutantes en dos condiciones de temperatura y las relaciones espitáticas.

5.3.- Análisis del efecto de la mutación simple en la expresión del resto de los genes parálogos.

5.3.1.- Cuatificación de la transcripción por qPCR.

5.3.2.- Analisis de la expresión mediante Westernblot

5.4.- Evaluación de redundancia funcional

5.5.- Complementación de quimera en *cshA-yfmL* en mutantes simples $\Delta cshA$ y $\Delta yfmL$

6.- DISCUSIÓN	40
7.- PERSPECTIVAS	44
8.- INFORMACIÓN BIBLIOGRÁFICA	45
9.- APENDICE A	50
10.-APENDICE B	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

1. Secuencias conservadas de las cuatro RNA helicasas tipo DEAD box en <i>B.subtilis</i> .	2
2. Las RNA helicasas pueden funcionar como unidad individual o ser parte de complejos multiproteicos.	4
3. Estrategia general de experimentación.	14
4. Diseño de la construcción para la cepa auto complementante	17
5. Combinaciones de cepas generadas para analizar complementación cruzada.	18
6. El alineamiento de las cuatro secuencias de aminoácidos de las RNA helicasas permitió identificar la región central conservada	19
7. Esquema de la construcción quimérica entre el núcleo helicasa de <i>yfmL</i> y carboxi-terminal de <i>csHA</i> .	20
8. Las cepas mutantes y silvestre muestran crecimiento diferencial a 18 °C.	25
9. Las dobles mutantes de genes de caja DEAD exhiben cinéticas de crecimiento a 37 °C similares a las de las mutantes sencillas.	26
10. Tasa de crecimiento de mutantes dobles y simples.	27
11. Relación espitática entre los genes de las RNA helicasas a 37 °C.	28
12. Relación espitática diferencial entre genes de las RNA helicasas a 18 °C.	29
13. Efecto diferencial en la expresión genética de las RNA helicasas en ausencia de un gen a 37 °C.	30
14. Efecto diferencial en la expresión genética de las RNA helicasas en Ausencia de un gen.	31
15. Efecto diferencial en la expresión genética de las RNA helicasas en ausencia de un gen.	33
16. Las RNA helicasas no se sobreexpresan en los fondos mutantes.	34
17. Expresión diferencial de las RNA helicasas en diferentes fases de crecimiento y temperatura.	34
18. Autocomplementación de RNA helicasas a 18°C.	35
19. Efecto de dosis discreta al sobre-expresar los genes de las RNA	

helicasas en el fondo silvestre.	36
20. No se observa complementación cruzada entre los genes de las RNA helicasa.	37
21. No se observa efecto por al sobreexpresar las quimeras en los diferentes fondos a 37 °C.	39
22. La sobreexpresión de las quimeras fue negativo en algunos fondos a 18°C.	40

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
1. Las RNA helicasas de <i>E. coli</i> tienen diferentes funciones y tamaños.	6
2. Información general de proteínas de caja-DEAD en <i>B. subtilis</i> .	8
3. Tasa de crecimiento máxima y relativa de las mutantes simples y dobles a 37 °C y a 18 °C.	29
4. Resumen de los datos de la expresión genética de los cuatro genes de RNA helicasas en los fondos mutantes usando el gen <i>sigA</i> como control.	31
5. Resumen de la expresión genética de los cuatro genes de RNA helicasas en los fondos mutantes usando el gen <i>gyrA</i> como control.	32
6. Tasa máxima de crecimiento de cepas auto-complementantes con y sin inductor al 1% evaluadas a 18 °C.	35
7. Resumen de la máxima tasa de crecimiento en el análisis de complementación cruzada.	38

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- RNA HELICASAS

1.1.1. Qué son las RNA helicasas.

Los RNAs son el producto de la transcripción de los genes, y por lo mismo tienen enorme diversidad, tanto en el tamaño como en la estructura que adoptan. Al ser moléculas de cadena sencilla, sufren plegamientos de manera espontánea, con base a la formación de enlaces entre bases complementarias. Prácticamente todos los RNAs durante la transcripción se asocian a múltiples proteínas que permiten mantener un plegamiento mínimo, en caso de mRNAs que serán traducidos, o bien que facilitan un plegamiento correcto para aquellos RNAs cuya función depende enteramente en la estructura, como es el caso de los rRNA. Es en este plegamiento correcto de las moléculas de RNA en donde la participación de las RNA helicasas es esencial. Las RNA helicasas son, por lo tanto, moléculas requeridas por todos los organismos vivos. Participan en virtualmente todos los aspectos de expresión genética, y juegan un rol importante en procesos regulatorios asegurando la fidelidad de las reacciones biológicas. Tienen actividad enzimática, colaboran en la adecuada formación de estructuras tridimensionales de RNA y realizan procesos de plegamiento y disociación de moléculas de RNA. La disociación de las cadenas de RNA plegadas dependen de del uso energía, a través de la hidrólisis de NTP (Cordin, Banroques, Tanner, & Linder, 2006).

1.1.2.- Clasificación de las RNA helicasas.

Las RNA helicasas fueron identificadas como una nueva familia de proteínas a finales de 1980, cuando al alinear las secuencias de aminoácidos de ocho homólogos del factor de inicio de la transcripción (eIF4A) de levadura se encontró la presencia de varios motivos conservados. El alineamiento permitió identificar motivos similares en proteínas de unión al ATP, proteínas que participan en la replicación de ADN y proteínas de unión a nucleótidos. El nombre de la familia derivó de la secuencia de aminoácidos D-E-A-D (Asp-Glu-Ala-Asp) presente en uno de los motivos. (Linder et al., 1989).

La clasificación de estas proteínas en tres superfamilias (SF I, SF II, SF III) y dos familias fue realizada por Corbaleny A. y Koonin en 1993 con base a la presencia y características de los

motivos conservados en la secuencia primaria de aminoácidos. Las RNA helicasas contienen un núcleo estructural conservado (helicasa) de alrededor de 300 a 400 aminoácidos, con al menos 12 motivos (**Figura 1**, tomada de Cordin, Banroques, Tanner, & Linder, 2006), mismos que tienen distintas funciones. Los motivos I y II, también conocidos como los Walker A y B, junto con los motivos V y VI participan en la unión a los fosfatos de ATP; los motivos Ia, Ib, GG, IV, QxxR y V se unen al sustrato de RNA; y el motivo Q reconoce específicamente la adenina de ATP. El motivo III coordina al motivo I, los motivos II y VI se acercan al fosfato del ATP para crear una mayor afinidad en el sitio de unión para el RNA (Banroques, Cordin, Doère, Linder, & Tanner, 2011).

Dentro de cada familia es mayor el número de motivos conservados, pero entre superfamilias (SF) la conservación de motivos es menor (Jarmoskaite & Russell, 2011). Entre las SF I y SF II existen regiones altamente conservadas como las involucradas en la unión e hidrólisis del trifosfato (I, II y VI) localizados en la hendidura formada entre los dos dominios. El motivo Q, que coordina la base nitrogenada adenina, es menos conservada entre ambas superfamilias (Fairman-Williams, Guenther, & Jankowsky, 2010).

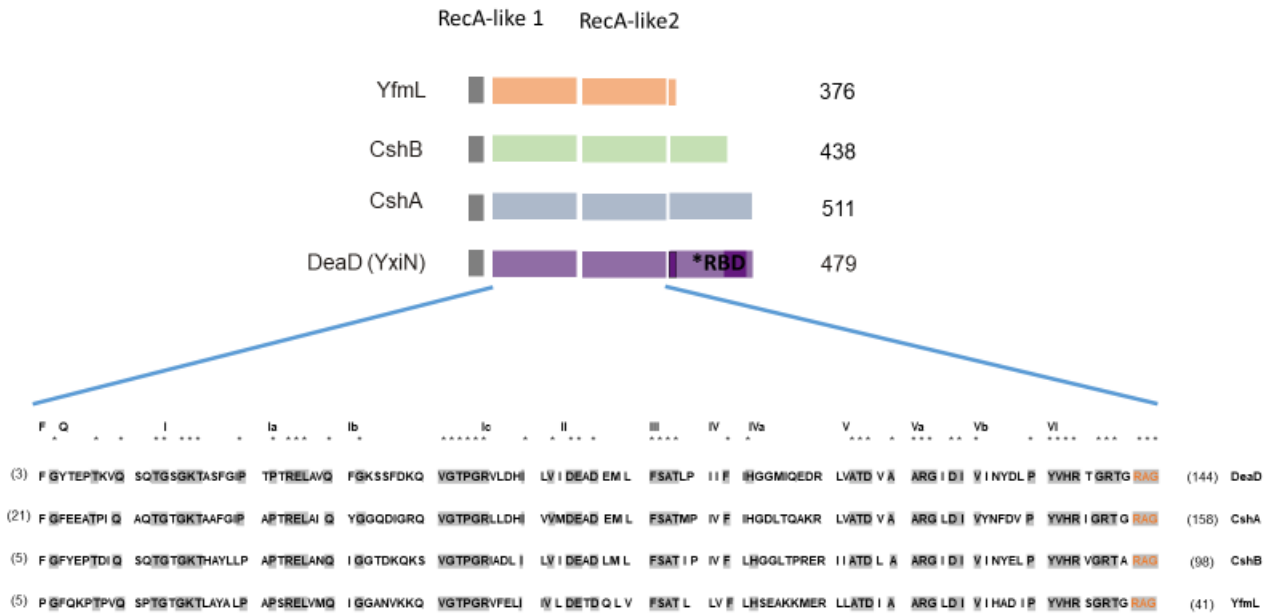


Figura.1.- **Secuencias conservadas de las cuatro RNA helicasas tipo DEAD box en *B. subtilis*.** La secuencia consenso está sombreada en gris. El número en paréntesis representa los residuos de aminoácidos en N' y C' terminal de cada proteína.

Las RNA helicasas de caja DEAD pertenecen a la super familia SF II, que es por mucho la familia más grande y actúan en forma de monómeros o dímeros. SFII está a su vez formada por tres familias, denominadas DEAD, DEAH y DexH, según la variación en el motivo DEAD (Cordin et al., 2006).

Las estructuras cristalográficas que se han resuelto de las SFI y SFII muestran dos dominios globulares covalentemente unidos. Nótese que ambos son dominios RecA-like por lo que cada uno de éstos contiene generalmente 5 láminas β rodeadas de 5 α -hélices. Es interesante que en las helicasas SFII existen diferencias estructurales marcadas en la distancia y orientación de los dos dominios. Además, en algunas estructuras se encuentra que los dos dominios están rotados 50 grados uno respecto del otro. Estas diferencias en la vecindad y orientación de los dominios muestran la flexibilidad de las estructuras de las helicasas de SFII que probablemente sea importante en su actividad (Korolev, Hsieh, Gauss, Lohman, & Waksman, 1997; Subramanya, Bird, Brannigan, & Wigley, 1996; Theis, Chen, Skorvaga, Van Houten, & Kisker, 1999; Velankar, Soutanas, Dillingham, Subramanya, & Wigley, 1999).

1.1.3.- Mecanismo de acción

Desde el descubrimiento de las RNA helicasas la actividad bioquímica central identificada es la habilidad de unir e hidrolizar ATP en un ciclo que es estimulado por la unión a una cadena sencilla o doble de RNA (ABDEL-MONEM, DÜRWARD, & HOFFMANN-BERLING, 1976). Las diferentes proteínas de caja DEAD actúan eficientemente en pequeños segmentos de doble cadena de RNA o cadenas combinadas de RNA-DNA y esta actividad básica permite muchas de sus funciones, especialmente las que involucran los cambios estructurales del RNA (Figura 2). El mecanismo convencional usado por helicasas en el extremo de una cadena doble es el uso de los ciclos de unión e hidrólisis de ATP para moverse o traslocarse a lo largo de una de las cadenas. La mayoría de las SFI y SFII se mueven en dirección 3' – 5' y un pequeño número en dirección 5' – 3' (Jankowsky, 2011).

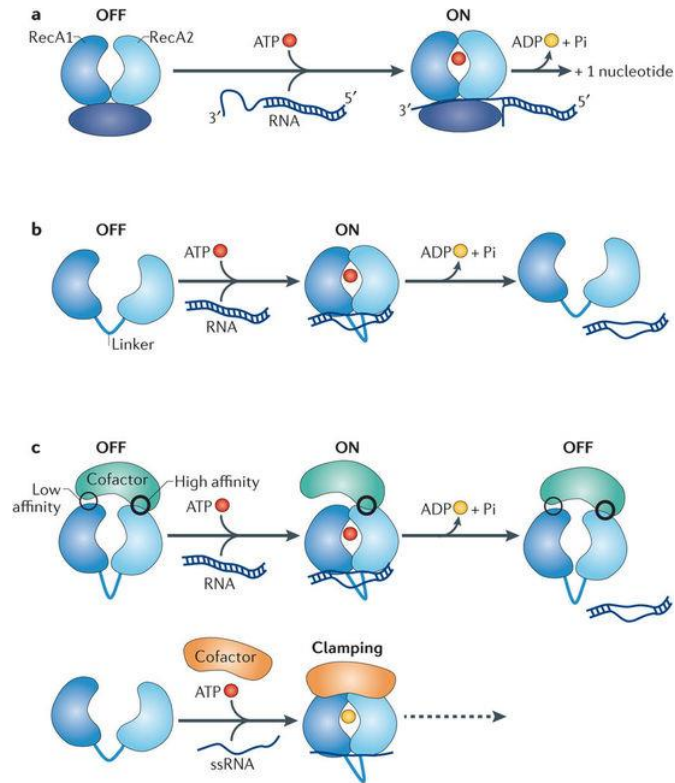


Figura 2.- **Las RNA helicasas pueden funcionar como unidad individual o ser parte de complejos multiproteicos.** a) La enzima puede anclarse a un extremo libre de la doble cadena de un RNA y disociarla mediante el uso de ATP. b) Anclaje de la RNA helicasa en la parte interna de la doble cadena con la posterior hidrólisis de ATP. c) La enzima puede funcionar como centro de anclaje para formar complejos mutiproteicos. Tomada de (Bourgeois, Mortreux, & Auboeuf, 2016)

La hidrolisis del ATP permite generar cambios de afinidad sobre el RNA de cadena sencilla, permitiendo a las proteínas de caja DEAD unir y liberar al RNA de una forma continua y regulada. Esta unión regulada es usada por diferentes proteínas DEAD de diferentes formas. Puede ser usada para separar cadenas de RNA con regiones cortas de doble cadena, para promover un rearrreglo de RNAs complejos y estructurados, para remodelar complejos RNA-proteína (riboproteína) o aún para formar complejos altamente estables sobre cadenas sencillas de RNA (Jarmoskaite & Russell, 2011).

In vivo, las RNA helicasas comúnmente funcionan dentro de grandes complejos, como es el ribosoma o el espliceosoma. En ellos pueden interactuar con factores proteicos que modulan su actividad. Sin embargo, no está claro cómo las RNA helicasas pueden identificar su sustrato

específico (aunque para muchas de ellas casi siempre su sustrato es inespecífico) o cómo son reguladas sus actividades *in vivo*. Es probable que las secuencias no conservadas dentro del núcleo conservado y las región amino- o carboxi- terminal variables modulen la actividad helicasa (Banroques et al., 2011).

Se ha descubierto en algunas helicasas de organismos eucariotes que las secuencias del carboxi-terminal aumentan la afinidad por el sustrato y en algunos casos el flanco amino terminal posee una actividad de serín proteasa. De este modo los flancos parecen modificar y tal vez regular la actividad enzimática del núcleo. Se han co-cristalizado algunas helicasas con nucleótidos di o trifosfato (o análogos) y con oligonucleótidos de RNA y DNA. En esos casos los nucleótidos se unen dentro de la hendidura formada entre los dos dominios y el sustrato (RNA o DNA) se unen a la base del núcleo helicasa (Cordin et al., 2006).

Como se ha mencionado, el núcleo helicasa es una región altamente conservada y representa la unidad mínima funcional, mientras que la mayor variación de estas proteínas se encuentra en el N- y C-terminal que flanquea a este “core”. Con base a lo anterior Banroques y col. en el 2011 realizaron quimeras de 6 proteínas de caja Dex(H/D) de levadura, con la hipótesis de que las regiones modulares son intercambiables. Encontraron que en general los elementos de las secuencias del amino y carboxi son intercambiables entre proteínas relacionadas, y que existen regiones que probablemente forman estructuras discretas o dominios únicamente en la presencia de un ligando o cofactor. Sin embargo existe la interrogante de si en genes parálogos de un mismo organismo esta unidad funcional mínima puede ser intercambiable o contribuye a la especificidad de la función.

1.1.4.-Proteínas de caja DEAD en bacterias.

Es común que las bacterias de vida libre posean al menos una helicasa de la familia DEAD, pero existen casos en los que existen varias copias, siendo el extremo el género *Shewanella*, donde algunos de sus miembros tienen 12 genes codificantes, en su mayoría parálogos de la helicasa *rhIE* (López-Ramírez, Alcaraz, Moreno-Hagelsieb, & Olmedo-Álvarez, 2011). Se ha observado, en el caso de bacterias, que las proteínas de caja DEAD pueden ser dispensables en condiciones óptimas. Esto se vio para las RNA helicasas de *B. subtilis*, en condiciones de

laboratorio (Lehnik-Habrink et al., 2013). Esto contrasta con *S. cerevisiae*, en el cual 17 de los 26 genes son esenciales, y para el virus de la hepatitis C la única helicasa NS3 es necesaria para su replicación (Iost, 2006 ; Lehnik-habrink, Rempeters, Kovács, & Wrede, 2012).

Entre las bacterias más ampliamente estudiadas se encuentra *Escherichia coli*. Ésta tiene cinco genes que codifican para proteínas de caja DEAD (*csdA* o *deaD*, *dbpA*, *rhIB*, *rhIE* y *srnB*). El alineamiento de las secuencias deducidas de estos cinco genes mostró que el núcleo DEAD es de 350 aminoácidos aproximadamente, flanqueado por el C-terminal, que varía en su extensión desde 70 a 290 aminoácidos. Esta región en *DbpA* y *CsdA* tienen una gran similitud (Iost, 2006).

Tabla 1.- Las RNA helicasas de *Escherichia coli* tienen diferentes funciones y tamaños.

Nombre		Número de aminoácidos
RhIB	Degradación de ARNm	420
SrmB	Ensamblaje de ribosomas	444
RhIE	Modula a <i>srnB</i> y <i>csdA</i>	454
DbpA	Biogénesis de ribosomas	457
CsdA	Ensamblaje de ribosomas y degradación de ARNm	629

Detallando la información mostrada en la Tabla 1, se sabe que RhIB participa en un complejo multiproteico, denominado degradosoma, conformado por la RNasa E, la polinucleótido fosforilasa y una exoribonucleasa 3'--5' (Py, Higgins, Krisch, & Carpousis, 1996). La RNA helicasa *CsdA*, está involucrada en la estabilización del mRNA, también se asocia al degradosoma después de choque frío. No se ha determinado si tanto la RhIB como la *CsdA* pueden asociarse al degradosoma al mismo tiempo, lo que se sabe es que el sitio de unión es distinto. Una idea es que *CsdA* es direccionada a sus blancos específicos (y regulada), y lo mismo ocurriría con RhIB dirigida por la RNAasa E (Jones, Mitta, Kim, Jiang, & Inouye, 1996). También la *DeaD* sería direccionada a un blanco, pero en este caso su actividad es determinada por la estructura de tallo y asa de la región 92 del ribosoma (Kossen, Karginov, & Uhlenbeck, 2002). En pruebas *in vitro* se ha observado que *SrmB* y *RhIE* poseen también la habilidad de unirse a la RNasa E, sin embargo, no existe evidencia que esto ocurra *in vivo* (Jain, 2008a). Es interesante el caso de dos RNA helicasas que actúan en la biogénesis de

ribosomas. Tanto SrmB como CsdA participan uniéndose a la subunidad grande del ribosoma a bajas temperaturas, pero al analizar las mutantes $\Delta srmB$ y $\Delta csdA$ se encontró que SrmB actúa antes que CsdA. Para estas mutantes se observaron fenotipos a bajas temperaturas y la sobre-expresión de *srmB* no complementa $\Delta csdA$ ni viceversa, tal vez debido a que su función es requerida en diferentes condiciones (Charollais, Dreyfus, & Iost, 2004). Para probar si alguna de las helicasas puede ser sustituida por otra se han probado dobles mutantes ($\Delta csdA \Delta srmB$, $\Delta csdA \Delta rhIE$, $\Delta csdA \Delta dbpA$, $\Delta rhIE \Delta dbpA$, $\Delta rhIE \Delta srmB$ y $\Delta srmB \Delta dbpA$). De las 10 combinaciones posibles se probaron 6 en medio de cultivo rico a baja temperatura y en ningún caso el crecimiento fue menor a las mutantes simples (Iost, 2006). En otro trabajo realizado por Jain en el 2008 se observó que al sobre-expresar el gen *rhIE* se modificó el tiempo de duplicación a 16 °C de *E. coli*. En la cepa silvestre hubo una discreta disminución en el crecimiento, mientras que para $\Delta deaD$ el tiempo de duplicación disminuyó y para $\Delta srmB$ tuvo un efecto letal. Se cree que RhIE juega un rol en la inter-conversión de dos formas estructurales de la subunidad 23S durante la maduración del ribosoma (Jain, 2008). Una conformación A favorecería un sustrato para CshA (DeaD) y una conformación B sería sustrato para SrmB, la ausencia de RhIE cambia la conformación hacia A incrementando la dependencia de CshA (DeaD) y aliviando los requerimientos para SrmB. La sobre-expresión de RhIE tiene un efecto contrario. Estos datos sugieren que hay una función específica de cada helicasa en *E. coli*. Por otro lado, se ha sugerido que las RNA helicasas (DexD/H) pueden tener una función específica más relajada y pueden participar en forma general como chaperonas (Russell R. 2008). En *E. coli* se encontró que CshA (DeaD), RhIB, RhIE y SrmB muestran una función ATP independiente, ya que tienen el potencial disociar cadenas de RNA, pueden estimular el intercambio de cadenas entre duplex de RNA y cadenas sencillas y poseen actividad de chaperonas. Estas observaciones proveen evidencia de una multifuncionalidad de estas proteínas y sugieren fuertemente que la actividad ATP-independiente contribuye a la función dentro de la célula (Zhao & Jain, 2011).

Resulta importante ampliar la información existente sobre las proteínas de caja DEAD en bacterias filogenéticamente lejanas a *E. coli*, ya que esto hace posible establecer diferencias o generalidades de su mecanismo de acción y su regulación. Además, es importante poder relacionarlo a condiciones ambientales en las cuales son expresadas. En el caso de *B. subtilis*, se ha encontrado que poseen cuatro genes que codifican para proteínas de caja DEAD (Tabla

2). Estas helicasas están involucradas en el ensamble de ribosomas, y formando parte del degradosoma (Ando & Nakamura, 2006; Hunger, Beckering, Wiegeshoff, Graumann, & Marahiel, 2006b; Kossen & Uhlenbeck, 1999; Lehnik-Habrink et al., 2010). La helicasa DeaD (anteriormente conocida como YxiN) es similar a la DbpA de *E. coli*, ya que ambas poseen una secuencia conservada de 70 aminoácidos del extremo carboxi terminal conocida como dominio DbpA. Se tiene conocimiento de que este dominio le confiere la capacidad de unión a RNA (Lehnik-Habrink *et al.*, 2010). En estudios realizados por Lehnik-Habrink y Col. en el 2012 se observó que al mutar este gen no hubo afectación en el crecimiento a 37 °C ni 16 °C, además el perfil de ribosomas fue similar al de la cepa silvestre.

Tabla 2.- Información general de proteínas de caja-DEAD en *B. subtilis*

Proteína	Tamaño	Función	DbpA-RBD
CshA (YdbR)	511	Ensamble de ribosomas, unión a degradosoma	
DeaD (XyiN)	479	Ensamble de ribosomas	Si
YfmL	376	Ensamble de ribosomas	
CshB (YqfR)	438	Ensamble de ribosomas	

López-Ramírez V. y col 2011

En cuanto a la proteína CshA (YdbR), fue encontrada en la fracción ribosomal y asociada con las subunidades 50S, 70S y a polisomas. Al analizar su comportamiento después de un choque frío se determinó que su expresión aumentaba 2.6 veces (Beckering, Steil, & Weber, 2002). La supresión de *cshA* resulta en un defecto de crecimiento ligero a 37 °C y más severo a bajas temperaturas (22 y 16°C). También existe afectación en la morfología celular. En esta proteína la región C-terminal confiere una función específica al mediar la interacción con la RNasa Y. La transferencia de este dominio a CshB confirió la habilidad a esta última de interactuar con la RNasa Y, que es el componente mayor del degradosoma en *B. subtilis* (Lehnik-Habrink et al., 2010). Al buscar genes que aumentaran su expresión en *B. subtilis* después de choque frío Beckering C, en el 2002, encontró que *cshB* (*yqfR*) aumentaba hasta 2.3 veces su expresión. También se sabe que es capaz de interactuar con la proteína CspB que es una RNA chaperona de choque frío, lo que permite el desdoblamiento de rRNA y su posterior traducción (Lehnik-Habrink M. 2010). En una cepa mutante de este gen se observó que existe sensibilidad a bajas temperaturas, pero no a 37 °C. Además el análisis del perfil de ribosomas mostró la disminución

de la unidad 70S madura (Lehnik-Habrink et al., 2013). Finalmente, RNA helicasa denominada YfmL comparte el 32-35% de los residuos de aminoácidos idénticos con las otras RNA helicasas y contiene treonina como aminoácido variable en el motivo DexD (Lehnik-Habrink et al., 2013). Es interesante que YfmL es significativamente más corta que las otras helicasas y parece truncada en el C-terminal. Hasta la fecha se ha visto que la mutación del gen tiene un efecto en la disminución de la subunidad 50S durante la biogénesis de ribosomas (Lehnik-Habrink et al. 2012). Existen reportes como el de Hunger, Beckering, Wiegeshoff, Graumann, y Marahiel en el 2006 los cuales difieren de lo anterior, ya que indican que no existen fenotipos de las mutantes $\Delta cshA$ ni $\Delta cshB$ a 37 °C o después de un choque frío. Se cree que éstos resultados pueden ser debidos a las diferencias en las técnicas de mutación.

Recientemente en un trabajo de Lehnik-Habrink y col. en el 2012 se cuantificaron las proteínas de las RNA helicasas de caja DeaD durante las fases de crecimiento y se observó que CshA permanece constante, por lo que se cree que su expresión es constitutiva. En contraste, CshB, YfmL y DeaD estuvieron presentes en niveles mayores durante la fase logarítmica, y su concentración decreció iniciada la fase estacionaria. En este mismo trabajo se logró demostrar, que aunque su crecimiento a 37 °C se ve afectado, es posible generar una cepa con mutación en los 4 genes que codifican para las RNA helicasas de caja DEAD.

1.1.5.- Respuesta de las RNA helicasas a estrés abiótico.

Recientes reportes indican que la expresión o actividad de las RNA helicasas es regulada no solo respecto a la participación en los procesos vitales de las células, sino también en respuesta al cambio en las variantes ambientales, incluyendo temperatura, luz, oxígeno y osmolaridad. Además la actividad de las proteínas resultantes de la traducción de los mRNA blancos pueden contribuir a la adaptación celular a condiciones de estrés inducidas (Owttrim, 2006).

La regulación de la expresión de las RNA helicasas es controlada probablemente por sensado y posterior activación de vías que son activadas por el mismo estrés. La regulación de la expresión por el ambiente puede resultar en la inducción de la actividad de las RNA helicasas proveyendo la capacidad de regular tanto la expresión como la actividad de mRNA o RNA

funcionales río abajo. Además la actividad de proteínas producto de la traducción de los mRNA pueden ayudar a la adaptación a la condición de estrés (Owtrim, 2006). Es escasa la información respecto a la expresión de RNA helicasas en arqueas y bacterias distintas a estrés por temperatura. La cantidad y calidad de luz es un estrés frecuentemente encontrado en organismo fotosintéticos, cuya habilidad para sensor las condiciones dinámicas de luz es indispensable para sobrevivir. El gen de la RNA helicasa *crhR* de *Synechocystis sp.* es regulado por el estado redox de la cadena de oxidación entre Q_A y Q_o en citocromo b_6f del fotosistema II. Estos componentes son reducidos en respuesta al flujo de electrones derivado la incidencia de luz o respiración (Chamot, Colvin, Kujat-choy, & Owtrim, 2005). *crhR* también es inducido por frío y concentración de sal, pero se desconoce el mecanismo (Prakash et al., 2010). En *Clostridium perfringens*, bacteria del phylum Firmicutes, se ha reportado que la inactivación de una RNA helicasa resulta en el aumento en la resistencia a estrés oxidativo, en lugar de actuar reduciendo la condición de estrés como es observado para la mayoría de las RNA helicasas (Briolat & Reysset, 2002).

Pandani y col. en el 2011 identificaron cinco RNA helicasas en el genoma de *B. cereus* (*cshA*, *cshE*, *cshB*, *cshD* y *cshC*) con una similitud del 50-70% a las cuatro presentes en *B. subtilis* (*cshA*, *cshB*, *deaD* y *yfmL*) al realizar la mutación de cada uno de los genes y al crecer a las cepas a dos temperaturas encontraron que a 37 °C el crecimiento fue similar al de la cepa silvestre, mientras que a 10 °C el crecimiento fue menor o ausente para el caso de $\Delta cshA$ y $\Delta cshC$ (*yfmL* en *B. subtilis*), respectivamente.

1.1.6.- Evolución de las RNA de caja DEAD

Para comprender mejor la evolución de esta familia de proteínas en Firmicutes y γ -proteobacterias se han realizado algunos estudios como el de Iost en el 2006 y Lopez-Ramirez y col. en el 2011, en los cuales mediante el análisis de sus secuencias buscan establecer relaciones filogenéticas, eventos de transferencia horizontal o duplicación y especialización entre los genes que codifican las proteínas de caja DEAD. Los análisis sugieren que los genes de las proteínas de caja DEAD son probablemente el resultado de más de un evento de duplicación y neo-funcionalización. Se cree que dominio DbpA es ancestral presente en la región C-terminal de los genes y que probablemente emergió como un dominio especializado

de las ATPasas dependientes del RNA. Probablemente CshA surgió de una helicasa que contenía el dominio DpbA y posteriormente lo perdió. En el caso de YfmL y CshB parece que surgieron de otra duplicación. Adicionalmente, YfmL de *Bacillus* no existe en las Proteobacterias, pero parece tener ortólogos en las familias de *Staphylococcus*, *Lactobacillus* y *Streptococcus* lo que sugiere su existencia antes de la especiación dentro de los Firmicutes.

1.2.- Robustez y duplicación genética

Los organismos vivos evolucionan adaptándose a condiciones ambientales hostiles y cambiantes, ruido molecular interno y variaciones genéticas. A tales habilidades se les denomina robustez. La redundancia genética es una fuente común de robustez, en la cual uno o más genes pueden realizar la misma función (Mendonça, Alves, & Pereira-Leal, 2011). La robustez también puede deberse a los fenómenos de auto-regulación y auto-balance de los procesos bioquímicos, existiendo procesos de retroalimentación positiva y negativa entre los distintos elementos conectados en la red. Estos procesos permiten reparar los productos defectuosos o desecharlos, si no es posible su reparación o si poseen un carácter tóxico para el organismo (Kitano, 2004) .

Las bacterias tienen un número de genes altamente variable que va desde 100 hasta alrededor de 10,000. Esto refleja lo dinámico de su material genético el cual puede sufrir variaciones mediante varias estrategias como transferencia horizontal, duplicación o pérdidas de genes. La transferencia horizontal puede llevarse a cabo por conjugación, transducción o transformación natural. La duplicación genética es un mecanismo por el cual se genera materia prima que puede ser usada para ampliar el repertorio de funciones (Ohno, 1970). Estas duplicaciones dentro del genoma de una misma especie son denominados genes parálogos. En ocasiones la duplicación persiste por la necesidad en el incremento en una función metabólica (dosis), pero al cesar la presión de selección los genes pueden sufrir mutaciones que los lleven, ya sea a la pérdida de la función o bien a su fijación por sub- o neo-funcionalización. Se han visto diferentes características entre genes adquiridos por transferencia horizontal y por duplicación. Se sugiere que los genes parálogos muestran mayor expresión, una tasa de evolución lenta, secuencias conservadas, comparten redes de regulación e interacciones físicas (Treangen & Rocha, 2011). En el caso de los genes xenólogos (genes adquiridos por transferencia horizontal) muestran un nivel de expresión cercano al promedio, difieren marcadamente en las interacciones físicas y genéticas de su par

y persisten más tiempo en las poblaciones. Esto sugiere que en bacterias la duplicación y transferencia de genes tienen muy distintos roles en la evolución de los sistemas biológicos: la transferencia permite la adquisición de nuevas funciones y la duplicación permite tener mayor dosis génica (Treangen & Rocha, 2011).

Existe un antiguo debate sobre el grado y mecanismo por el cual la duplicación genética contribuye en la robustez. En un estudio realizado por Gu y col. en el 2003, se sugiere que la compensación funcional entre duplicados puede amortiguar el efecto en la adecuación cuando existen mutaciones deletéreas. Sus resultados muestran que al suprimirse genes que poseen parálogos, el costo en la adecuación con frecuencia es moderado o pequeño, en cambio para genes únicos se observa un efecto fuerte o letal. Sin embargo, un porcentaje de genes no son capaces de compensar la supresión de su parálogo (Gu, Steinmetz, Gu, & Scharfe, 2003). Entre las posibles explicaciones a la compensación por redundancia está la que sugiere que los genes con efectos fuertes en el fenotipo son menos propensos a eventos de duplicación o que la especialización seguida del evento de duplicación pudo haber permitido a los parálogos la distribución de las funciones, por lo que cada duplicado es requerido en un grupo menor de condiciones que el gen original (Ihmels, Collins, Schuldiner, Krogan, & Weissman, 2007). En un trabajo de Li y col. en el 2010 se determinó que duplicaciones genéticas recientes en *S. cerevisiae* mantienen la redundancia funcional de manera transitoria y que la compensación mutua se atribuye principalmente al poco tiempo de divergencia. Con respecto a los genes duplicados con mayor antigüedad (duplicación completa del genoma) pueden ser estabilizados por el balance de dosis, que reduce la tasa de divergencia. Se observó que algunos genes pueden mantener la redundancia funcional por largo tiempo pero especializados en diferentes organelos (Li, Yuan, & Zhang, 2010).

1.3.-Interacciones epistáticas entre los genes.

Han pasado aproximadamente 100 años desde que William Bateson inventara el término “epistasis” para describir la discrepancia entre la predicción de segregación basada en la acción de genes individuales y el resultado de la cruce de un di-híbrido. El término epistasis desde entonces se ha extendido para describir casi cualquier conjunto de interacciones complejas entre genes en las cuales pasa algo diferente cuando un grupo de alelos de diferentes loci se encuentran en combinación a cuando están separados (Phillips, 2008). Dicho

de otra forma, el efecto combinado de dos o más mutaciones frecuentemente se desvía de lo que se esperaría analizando las mutaciones individuales. Esta epistasis, puede ser antagonista o sinérgica dependiendo de si la combinación de las mutaciones afecta el fenotipo de manera positiva o negativa, respectivamente. Midiendo la epistasis sinérgica entre parálogos se puede estimar la contribución del solapamiento de funciones sobre la adecuación (DeLuna *et al.*, 2008). Tal vez el mecanismo molecular más simple que puede causar epistasis entre dos genes es cuando sus productos proteicos interactúan directamente. Otra causa de epistasis, en este caso negativa, sería la redundancia funcional. Si dos o más genes realizan una función molecular en común entonces la pérdida de uno de los genes puede tener solo un modesto efecto en esta función, pero un efecto severo al perder ambos. La redundancia genética puede surgir a través de la duplicación, y estos genes muy probablemente tendrán una fuerte interacción epistática negativa. Aún en el caso de interacciones entre genes duplicados, el mecanismo molecular puede ser complejo. Puede existir algún mecanismo de compensación dependiente de la regulación entre los duplicados. Esto da origen al término “mezcla de efectos epistáticos” pudiendo existir variaciones en la expresión de diferentes genes blanco a través de las mutantes simples y dobles (Lehner, 2011).

En contraste con las interacciones epistáticas negativas, se ha propuesto que la epistasis positiva puede ocurrir más frecuentemente entre genes que funcionan en el mismo complejo molecular, en la misma vía metabólica o módulo. (Costanzo *et al.*, 2010; Lehner, 2011).

2. HIPÓTESIS

La evolución de los cuatro genes que codifican para RNA helicasas tipo DEAD en *Bacillus subtilis* ha conducido a especialización de funciones y de regulación, que permiten su expresión diferencial, pero la conservación de sus motivos funcionales permite la compensación genética y conduce a las relaciones epistáticas. La conservación de sus motivos permitirá que la RNA helicasa YfmL sea utilizado para la complementación de mutantes utilizando quimeras.

3. OBJETIVOS

3.1.- Objetivo general

Estudiar interacciones epistáticas y el grado de compensación genética de las RNA helicasas de caja DEAD en *Bacillus subtilis*.

3.2.- Objetivos específicos

3.2.1.- Investigar si existe compensación genética entre helicasas mediante la evaluación de mutantes dobles y analizando sus relaciones epistáticas

3.2.2.- Determinar si hay compensación por expresión en los fondos mutantes de las RNA helicasas

3.2.3.- Determinar si hay complementación cruzada entre RNA helicasas

3.2.4.- Determinar si el núcleo helicasa es intercambiable entre los genes.

4.- MATERIALES Y METODOS.

La fase experimental fue realizada según se muestra en la figura 3.

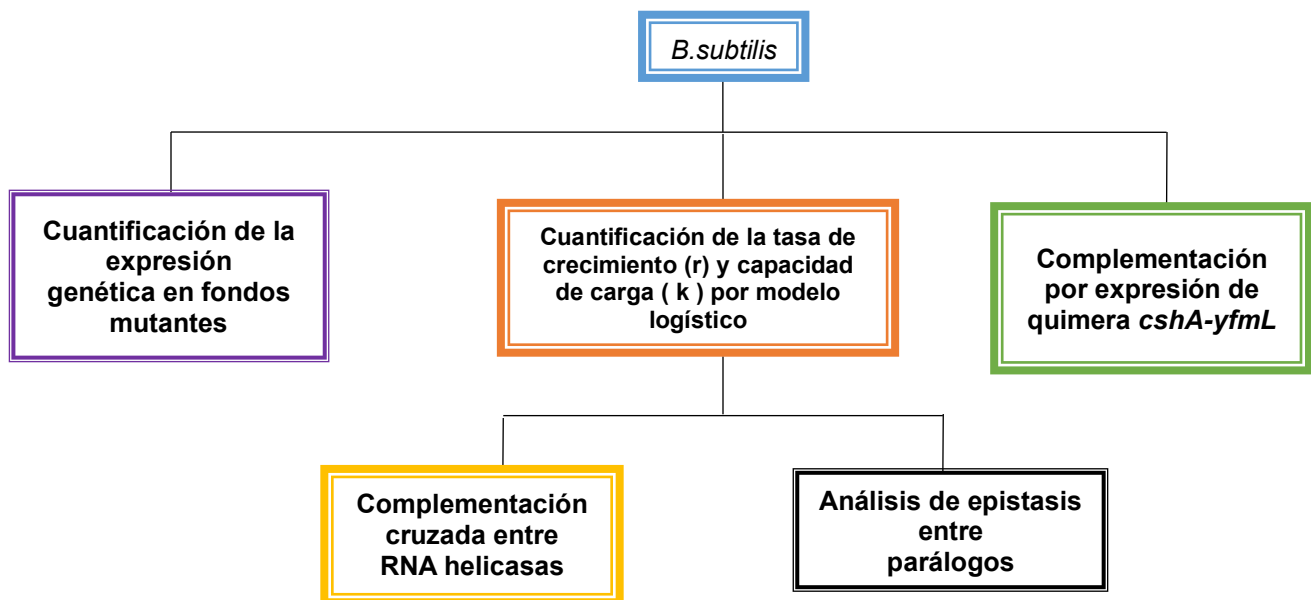


Figura 3.- Estrategia general de experimentación.

4.1.-Obtención y purificación de DNA.

Se centrifugó 10ml de cultivo incubado toda la noche a 4,000rpm por 20 min, a continuación se decantó el sobrenadante y se agregaron 2 ml de buffer (50mM EDTA, 0.1M NaCl, pH 7.5), 10mg de lizozima USB® y 300µl de sarkosyl 20% se incubó 10min at 37°C y se limpió con 2 volúmenes de fenol/cloroformo, finalmente se precipitó con 0.8 volumen de isopropanol y resuspendido en agua destilada estéril.

4.2.-Preparación de células competentes y transformación de *B. subtilis* por el método de “dos pasos”

Para la preparación de células competentes se estirió la cepa que se desea hacer competente en una caja Petri con agar LB, se dejó incubar toda la noche a 30°C. El siguiente día se recuperó el crecimiento y se inoculó 20ml el medio SpC preparado el mismo día, se mezcló 0.2 ml glucosa 50%, 0.3 ml MgSO₄·3H₂O 1.2%, 0.4 ml extracto de levadura 10%, 0.5 ml casaminoácidos 1% en 18 ml de T base (2 g (NH₄)₂SO₄, 18.3 g K₂HPO₄·3H₂O, 18.3 g K₂HPO₄·3H₂O, 6 g KH₂PO₄, 1g Citrato trisódico·2H₂O), se incubó a 37 °C y se tomaron lecturas periódicamente una OD₆₀₀ de 0.5. Cuando la tasa de crecimiento, celular comienza la fase estacionaria, pero aún en crecimiento (cambio menor al 20% en media hora) se inocularon 180ml de medio SpII (200 ml de T base, 2ml de glucosa 50%, 14 ml de MgSO₄·3H₂O 1.2%, 2 ml de extracto de levadura 10%, 2 ml de casamino ácidos 1%, 1 ml de CaCl₂ 0.1 M) con los 20ml de SpC. Después se continúa la incubación por 90 minutos. Se centrifugó el medio a 8000g por 5 min a temperatura ambiente. Cuidadosamente se decantó el sobrenadante a un recipiente estéril. Suavemente se re-suspendió el precipitado en 18ml del sobrenadante rescatado, se agregaron 2ml de glicerol estéril y se mezcla suavemente. Se realizaron alícuotas de células competentes (0.5ml) en tubos estériles, congelar rápidamente en nitrógeno líquido y almacenar a -70°C.

Para la transformación se descongelan los tubos e inmediatamente agregar un volumen de SpII + EGTA (medio SpII sin CaCl₂ y 4ml de EGTA 0.1M pH 8.0) se mezcla suavemente y se agrega la solución con el DNA, se incuba el tubo a 37 °C por media hora. Finalmente se extiende el cultivo en una caja Petri con agar LB.

Concentración selectiva de antibióticos comúnmente usados.

Cloramfenicol Cm 5 $\mu\text{g/ml}$ 95% etanol, Eritromicina Em 1 $\mu\text{g/ml}$ 95% etanol, Lincomicina Lm 25 $\mu\text{g/ml}$ 95% etanol, Neomicina Nm 5 $\mu\text{g/ml}$ dH₂O, Kanamicina Km 10 $\mu\text{g/ml}$ dH₂O, Pleomicina Pm 0.1-0.5 $\mu\text{g/ml}$ dH₂O, Tetraciclina Tc 20 $\mu\text{g/ml}$ 50% etanol, Spectinomycin Spc 100 $\mu\text{g/ml}$ dH₂O

4.3.-Extracción de DNA plasmídico por el método de Birnboim y Doly (lisis alcalina).

La cepa se incubó en 2.5 ml de caldo LB durante 18 h a 37°C. Después de la incubación 0.5 ml se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5ml. El tubo se centrifugó por 15 segundos y se removió el sobrenadante, enseguida el precipitado se resuspendió en 100 μl de solución I (Solución de lisozima 2 g/ml, 50nM glucosa, 10nM EDTA, 25 nM tris-HCl (pH8). Preparar en día de su uso), se incubó por 30 min a 0°C, luego se adicionó 200 μl de solución II (NaOH 0.2 N, dodecil sulfato de sodio (SDS) 1%) y se agita suavemente el tubo. La solución se apreció clara y viscosa. El tubo se mantuvo 5 min a 0°C y entonces se adicionó 150 μl de la solución III (acetato de sodio 3M (pH 4.8, puede ser ajustado con ácido acético glacial). El contenido del tubo se agitó ligeramente por inversión. El tubo se mantuvo a 0° por 60 min para permitir que la mayoría de las proteínas, RNA de alto peso molecular y DNA cromosomal precipiten. Se centrifugó 5 min, el sobrenadante es transferido a un segundo tubo. Se adicionó 1 ml de etanol frío. El precipitado se recuperó por centrifugación 2 min y se decantó el sobrenadante. El precipitado se re suspendió en 40 μl de agua.

4.4.- Obtención de cepa auto-complementate $\Delta\text{deaD}::\text{Tet } \text{amyE}:: \text{deaD cat}$

Se amplificó el gen *deaD* usando los oligos Px-deaD (Tabla 4) y se insertó bajo un promotor inducible a xylosa en el plásmido pX (Kim, Mogk, & Schumann, 1996), con el cual se transformaron las cepas de *E.coli* DH5 α por electroporación, posteriormente se extrajo el plásmido mediante la técnica de Birnboim y Doly, Método suplementario 2 y se transformó *E.coli* MC1061 (RecA +) quimiocompetente. Finalmente se transforma *B.subtilis* GP 1052 (*trpC2* $\Delta\text{deaD}::\text{tet}$) por la técnica de los “dos pasos” para obtener GOB 617 ($\Delta\text{deaD}::\text{Tet } \text{amyE}:: \text{deaD cat}$).

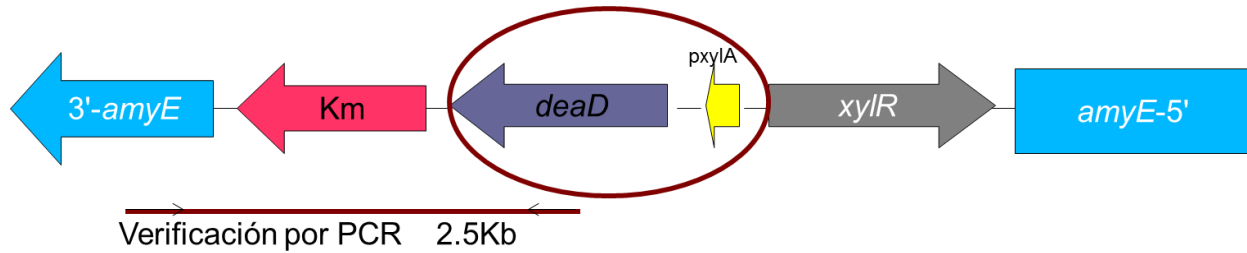


Figura 4.- Diseño de la construcción para la cepa auto complementante. El gen *deaD* queda bajo el promotor *pxylA*, integrado en la región que codifica el gen de la amilasa.

4.5.-El modelo de crecimiento logístico

Algunos modelos son usados para describir el comportamiento de microorganismos bajo diferentes condiciones físicas o químicas. Para describir esta curva y así reducir el número de mediciones es necesario adecuar los modelos (Zwietering, Jongenburger, Rombouts, & van 't Riet, 1990). Cuando la concentración de sustrato es el limitante, el modelo logístico tiene una perfecta aproximación (Lobry, Flandrois, Carret, & Pave, 1992).

El modelo de crecimiento logístico desarrollado por Verhulst en 1845 en el siglo XVII es el siguiente:

$$\frac{dN_i}{dt} = r_i N_i \left(1 - \frac{N_i}{K_i} \right)$$

El modelo logístico ya descrito fue ajustado a los valores de absorbancia obtenidos en las diferentes cinéticas de crecimiento mediante un algoritmo Gauss-Newton en el software R (R Development Core Team, 2008) del cual se obtuvo la tasa máxima de crecimiento (r) y la capacidad de carga (K).

4.6.- Modificación genética.

La cepa silvestre *B. subtilis* 168, las mutantes simples $\Delta cshA$, $\Delta cshB$, $\Delta deaD$, $\Delta yfmL$, las cepas auto-complementantes inducible $\Delta cshA lacA::cshA$, $\Delta cshB lacA::cshB$, $\Delta yfmL lacA::yfmL$ y silvestres marcadas con "FLAG-tag" *trpC2 cshA*-FLAG, *trpC2 cshB*-FLAG, *trpC2 deaD*-FLAG, *trpC2 yfmL*-FLAG fueron proporcionadas por Lehnik-Habrink y obtenidas según (Lehnik-Habrink et al., 2013)

4.6.1- Cambio de "cassette" de resistencia a cloranfenicol en cepas

mutantes simples $\Delta cshA$ y $\Delta cshB$.

Las cepas GP 1051 $\Delta cshA::Cm$ y GP 1083 $\Delta cshB::Cm$ (Lehnik-Habrink et al., 2013) fueron llevadas a su estado de competencia natural. Para cambiar su cassette de resistencia de cloranfenicol a eritromicina se utilizó el plásmido pIC 177 (Steinmetz & Richter, 1994), purificado por el método de Birnboim Doly. El plásmido posee dos regiones homologas para la doble recombinación en el cassette de cloranfenicol. Con el cambio de resistencia se generan las cepas GOB28 $\Delta cshA::Em$ y $\Delta cshB::Em$ GOB29.

4.6.2.- Dobles mutantes

Para la generación de las mutantes dobles se utilizó el método de “dos pasos”, (Anagnostopoulos & Spizizen, 1961). La transformación de las células se realizó con DNA genómico. Las colonias transformantes fueron seleccionadas en LB semisólido suplementado con antibiótico. Se obtuvieron al menos dos colonias para cada transformante y se verificó la interrupción de los genes por PCR.

4.6.3.- Sobre-expresantes inducibles con xilosa

Para llevar a cabo el experimento de complementación cruzada, se generó la cepa autocomplementante GOB 627 $\Delta deaD amyE::deaD$. El DNA genómico de las cuatro cepas auto-complementantes fue usado para transformar la cepa silvestre (WT) y los fondos mutantes simples $\Delta cshA$, $\Delta cshB$, $\Delta deaD$, y $\Delta yfmL$. Las combinaciones realizadas se muestran en la Figura 5.

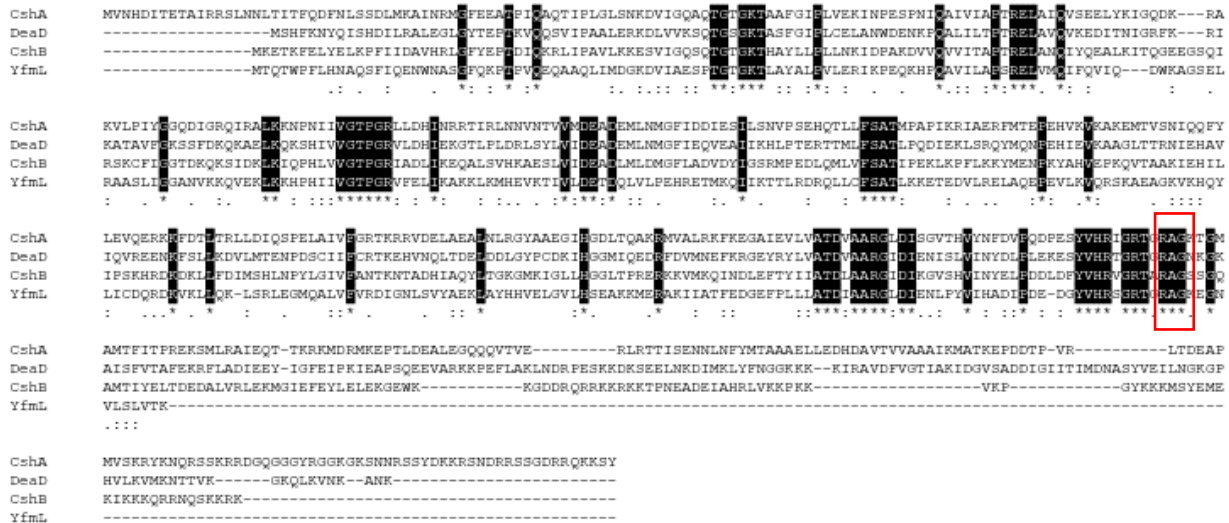
	WT	$\Delta cshA$	$\Delta cshB$	$\Delta deaD$	$\Delta yfmL$
<i>PxylA::cshA</i>	W	A	C	C	C
<i>PxylA::cshB</i>	W	C	A	C	C
<i>PxylA::deaD</i>	W	C	C	A	C
<i>PxylA::yfmL</i>	W	C	C	C	A

Figura 5.- Combinaciones de cepas generadas para analizar complementación cruzada.

Se diseñaron tres experimentos de auto-complementación (A), efecto de dosis en cepa silvestre (W) y sobre expresión en fondos mutantes (C). Las cepas fueron probadas con y sin inductor (xilosa) a 18 °C.

4.6.4.- Fusión de núcleo helicasa *yfmL* con región carboxi terminal de *cshA*

La quimera *yfmL-cshA* se contruyó, alineando las secuencias de aminoácidos de la región núcleo y estableciendo la región consenso de inicio y fin (Figura 6). Posteriormente se llevó a cabo la amplificación de ésta región núcleo del gen *yfmL* y la región carboxi-terminal de *cshA*, cada geny región a través de un primer PCR y posteriormente se fusionaron estas dos secuencias en un segundo PCR por la técnica de doble unión descrita por Yu et al., 2004 (Figura 7). Los oligonucleótidos utilizados quim-cshA y quim-yfmL se muestran en apéndice B. El protocolo para el PCR fue el siguiente: 95 °C, 3 min seguido de 35 ciclos de 95 °C por 10s; 55 °C por 30s; 72°C 1 min y una extensión final de 5 min. La correcta construcción fue verificada por secuenciación una vez integrada al plásmido pX (Kim et al., 1996). Se realizó la transformación en dos fondos genéticos, mutante $\Delta cshA$ y $\Delta yfmL$ por el método de dos pasos (Cutting, S.M and Vander Horn, 1990). Las pruebas de complementación se realizaron induciendo la expresión de la quimera con xilosa al 1%.



DBRH	Length C' end ^a	pl	Lys	Arg	Glu	Asp	Gly	Leu
CshA	158	10.03	10.1	11.4	7	7	6.3	5.1
CshB	98	10.03	23.5	9.2	12.2	5.1	5.1	6.1
DeaD	144	9.52	19.7	4.4	7.6	5.7	6.4	5.1
YfmL	41	9.76	24.4	0	12.2	0	9.8	17.1

Figura 6. El alineamiento de las cuatro secuencias de aminoácidos de las RNA helicases permitió identificar la región central conservada. La secuencia de aminoácidos conservada

RAG se encuentra en un giro de cadena, de acuerdo a la predicción de “secondary structure prediction method version IV”, (Garnier, Gibrat, & Robson, 1996)

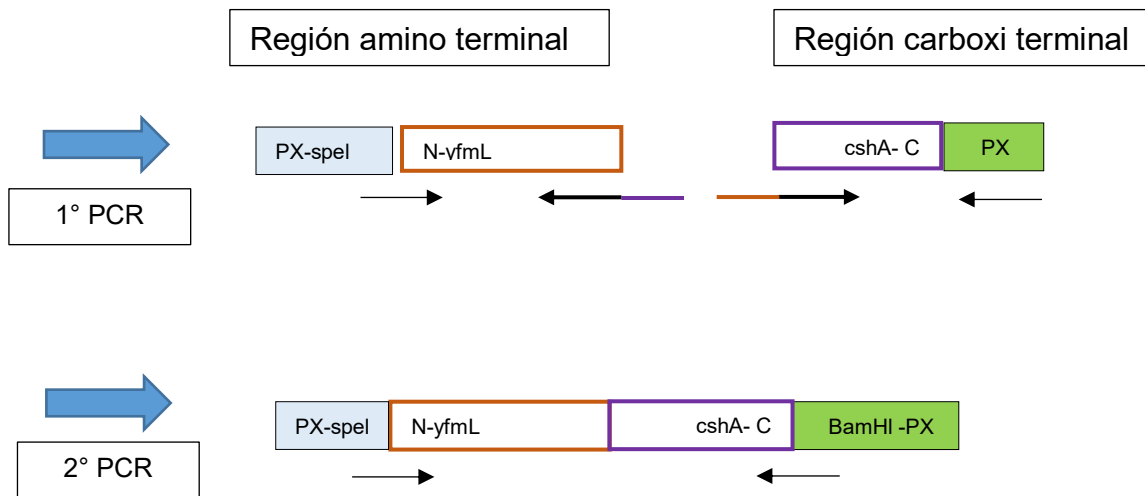


Figura 7.- Esquema de la construcción quimérica entre el núcleo helicasa de *yfmL* y carboxi-terminal de *cshA*.

4.6.5.- RNA helicasas con FLAG-tag

Para la generación de las cepas mutantes simples con marcaje FLAG en las RNA se utilizó el método de “dos pasos”, (Anagnostopoulos & Spizizen, 1961). La transformación de las células se realizó con DNA genómico de la cepa silvestre con marcaje en cada una de las RNA helicasas. Las colonias transformantes fueron seleccionadas en LB semisólido suplementado con antibiótico. Se obtuvieron al menos dos colonias para cada transformante y se verificó la interrupción de los genes por PCR.

4.7.- Cinéticas de crecimiento para las mutantes simples a 18 °C.

El procedimiento para realizar las cinéticas se muestra en la Figura 5. Se tomó del stock que se mantiene a -80 °C una asada y se propagó en caja Petri con medio Luria Bertani (LB)-agar y antibiótico, según la resistencia de cada cepa. Se dejó crecer 24 h a 37 °C y se tomó una colonia con crecimiento característico, se sembró en medio líquido y se incubó el pre-inóculo hasta una absorbancia de 100 Klett. De este cultivo se tomó 1 ml y se depositó en un matraz nefelométrico con 30 ml de medio LB (por triplicado) para realizar mediciones de absorbancia periódicamente. La datos de cada curva de crecimiento fueron ajustados al modelo logístico del cual se obtuvo la tasa máxima de crecimiento (r), de este valor se obtiene a su vez un

promedio del triplicado y es normalizado con el valor de la cepa silvestre, este representa el valor de la tasa máxima de crecimiento relativo (W)

4.8.- Cinéticas de crecimiento para cepas sobre-expresantes.

Del stock almacenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ se tomó una asada y se depositó en una caja Petrí con medio LB–agar y suplementado con el respectivo antibiótico, y se dejó crecer toda la noche a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se picó una colonia característica y se depositó en 10 ml de caldo LB, se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta una absorbancia de 100, y entonces se tomó 1 ml y se depositó en 30 ml de medio LB por triplicado con y sin xilosa (1%) por triplicado para incubar a 18° con agitación hasta la fase estacionaria. Los datos de la cinética de crecimiento se ajustaron al modelo logístico del cual se obtiene el valor de la tasa máxima de crecimiento (r) y para graficar se promediaron los valores del triplicado de cada cepa.

4.9- Cálculo de espistais entre los genes codificantes para RNA helicasas.

Para obtener las curvas de crecimiento, una colonia fue inoculada en caldo LB y se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta una absorbancia Klett de 100 y posteriormente se inoculó 1 ml en 30 ml de caldo LB y se incubó a $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ con agitación. Para calcular la tasa de crecimiento relativo (W) se obtuvo el promedio de la tasa máxima de crecimiento (r) obtenida del modelo logístico, descrito en métodos suplementarios. Este valor fue normalizado usando el valor de la cepa silvestre por lo que los valores se reportan de 0-1. El grado de epistasis entre parálogos fue evaluada como describe DeLuna *et al.* (2008). El grado de espistásis es definido como la diferencia entre el crecimiento de la doble mutante ($W_{x'x''}$) y el valor esperado, que resulta del producto de mutantes simples $W_{x'} W_{x''}$.

$$\epsilon = W_{x'x''} - W_{x'} W_{x''} \text{ (DeLuna et al., 2008).}$$

4.10.- Análisis del patrón de expresión genética de las mutantes simples en condiciones de estrés.

Para medir la expresión genética de las mutantes simples, se realizó la extracción total de ácidos nucleicos. Un pellet de 10 ml de cultivo de la fase log a $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ se lisó con 2 ml de buffer (0.3 M acetato de sodio, 10 mM EDTA pH 8.5), 10 mg de lisozima (USB® reagent) a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 7 min, se adicionó posteriormente 300 μl de SDS 0.4% y se incubó 3 minutos a temperatura

ambiente. Después, se agregaron 900 de TRIZOL® (Reagent Ambion) por cada 100 µl de lisado y se mantuvo por 5 min a temperatura ambiente. El RNA total fue extraída con 240 µl de cloroformo y recuperada por precipitación con isopropanol y se pasó por columna “PureLink® RNA Mini Kit Invitrogen” para su limpieza. El cDNA fue sintetizado siguiendo el protocolo de la transcriptasa reversa SuperScript III (Invitrogen) con variación en la síntesis de cDNA. La reacción se preparó con 1 µl de un coctel de iniciadores reversos específicos a una concentración de 2 pmol (*sigA*, *gyrA*, *csmA*, *csmB*, *deaD*, *yfmL*, secuencias en Tabla S2) (Liles, Kumar, & Weinschenker, 2004), 10 pg- 5 µg de RNA total, 2 µl 10 mM de dNTP mix, agua destilada estéril 13 µl. Todos los iniciadores fueron diseñados para incorporar la secuencia MYT4 (Gadkar & Fillion, 2013) para asegurar solo la amplificación de solo el transcrito deseado. El resto de la síntesis se hizo de acuerdo al manual del proveedor. La cuantificación de la expresión genética fue realizada en instrumento StepOne™ (Applied Biosystems) usando el kit EXPRESS SYB® (Invitrogen), usando los iniciadores directos *sigA*, *gyrA*, *csmA*, *csmB*, *deaD*, *yfmL* y Acopl como reversa, (ver secuencias en apéndice B). El protocolo para el PCR fue el siguiente: 95 °C 3 min seguido de 35 ciclos de 95 °C 10s y 60 °C 30s. El cálculo de la expresión relativa fue realizada con el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$, descrito por Biosystems Bulletin No. 2 (P/N 4303859). Usando en experimentos independientes dos genes endógenos *sigA* y *gyrA* como control. Arbitrariamente, se establecieron dos niveles de aumento relativo de expresión el primero de 2 hasta 5 veces y el segundo arriba de 5 veces.

4.11- Análisis de la expresión de las RNA helicas mediante Westernblot.

Las cepas que tienen las proteínas fusionadas al polipeptido “Flag-tag” fueron incubadas en medio LB a 37°C por toda la noche. Se tomó 1 ml y se inculó 30 ml de caldo LB en matraz nefelométrico y se incubó a 18 °C. Se tomaron muestras en la fase exponencial y en la fase estacionaria. Se centrifugó a 9,500 Xg, 10 min par formar una pastilla, posteriormente se lavó con Tris 50 mM, pH 8.4, KCl 1 M y nuevamene se centrifugó en las mismas condiciones.

Para la extracción de proteína total, se resuspendió la pastilla en 2.5 ml de Buffer Tris 50mM pH 8.4, KCl 1 M (Buffer A), se centrifugó a una velocidad de 9500 Xg 15 min a 4 °C. Se resuspendió la pastilla en el Buffer A con inhibidor de proteasas y DNasa y se incubó en hielo durante 15 min. Se agregó lisozima (50 µg/ml), se incubó a 37 °C durante 1 h, se agregaron perlas de vidrio y se agitó en vortex durante 30 segundos, enseguida se colocaron los tubos en hielo durante 5 minutos, y esto se repitió 5 veces. Se procedió a centrifugar a 12,000 X g

por 15 min a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y se transfirió a otro tubo nuevo. La muestra se cuantificó usando un NanoDrop en la opción de proteína A280, y cuando fue necesario su almacenamiento se congeló a -80 °C.

4.11.1.-Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Se preparó en el gel separado al 12% mezclando Stock acrilamida bis 5.1ml, Tris (15 mM, pH 5.1) 5.54ml, SDS 20% 82 µl, APS (persulfato de amonio 10%) 54µl, TEMED (Tretametilendiamina) 57.2 µl, Agua destilada 6.2 ml. Se vertió el gel ($\frac{3}{4}$ el tamaño del espejo) y se agregó etanol para evitar la formación de burbujas.

El gel concentrador se preparó mezclando Stock acrilamida-bis 938 µl, Tris 1.5 Mm pH 6.8 756 µl, SDS 20% 37.6 µl, Agua destilada 5.76µl, APS 10% 25µl, TEMED 28.2 µl. Con base a la cuantificación realizada en nanodrop de marca Biorad se cargaron 40mg de proteína previamente desnaturalizada en baño seco durante 5 min.

4.11.2.-Transferencia

Se utilizó papel filtro (Chromatography paper 3mm) y 1 de membrana de nitrocelulosa (Transfer-Blot Transfer Medium Pure Nitrocellulose Membrane 0.2 µm). Se colocaron dentro de la cámara, se agregó buffer de transferencia frío y se realizó la electro-transferencia a 100V durante 1 hora 20 minutos. Al terminar la transferencia se retiró el papel filtro y la membrana se colocó en un recipiente con rojo de Ponceau y se agitó lentamente durante 5 minutos.

4.11.3.- Inmunoblotting.

Se lavó la membrana con PBS (buffer de fosfato) para retirar el colorante. Posteriormente se bloqueó la membrana con 30 ml de PBS 1X y leche al 5% durante toda la noche a 4°C. A continuación, se lavó 5 veces con PBST (PBS 1X con 0.05% Tween 20) con agitación suavemente.

La membrana se incubó con el anticuerpo primario **F7425 Sigma ANTI-FLAG antibody produced in rabbit** usando una dilución en PBS 1X (5 µl de anticuerpo puro en 30 ml de PBS) durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, se lavó la membrana 3 veces durante 5 minutos con PBST agitando lentamente. Se incubó la membrana con el anticuerpo secundario **Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) (ab205718)** de Abcam diluido en PBST (1 µl de anticuerpo puro en 30 ml de PBST) durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavó la membrana

3 veces durante 5 minutos con PBST agitando lentamente, y un último lavado con PBS 1X durante 10 minutos.

4.11.4.- Revelado por el método de chemidoc.

Se mezcló 100 µl de la solución de detección Clarity Western ECL Substrate (Peroxide solution) y 100 µl de la solución de detección Clarity Western ECL Substrate (Luminol/enhancer solution) Bio-Rad en la zona a revelar. Posteriormente se detectó la señal en el Chemidoc con en el programa ImageLab de BioRad.

5.- RESULTADOS

5.1.- Estrés abiótico en mutantes simples.

Dada la función primordial que las RNA helicasas tienen en los organismos (Lehnik-Habrink et al., 2013), intriga el hecho de que ninguna de las mutantes de cada una de los cuatro genes de RNA helicasas exhiba un fenotipo al crecerlas en LB a 37 °C. Se realizaron ensayos en distintas condiciones a fin de buscar un efecto diferencial en el crecimiento de las mutantes de DBRH simples. Al probar diferentes condiciones causantes de estrés abiótico, tales como alta osmolaridad, pHs extremos, agentes oxidantes (no se muestran estos datos) y baja temperatura (18 °C), únicamente el estrés de baja temperatura permitió observar un fenotipo diferente en tres de las mutantes (Figura 8). Esto coincide con lo reportado por Lehnik-Habrink et al., 2013. La mutante CshA se ve mayormente afectada mientras que DeaD creció de forma similar a la cepa silvestre.

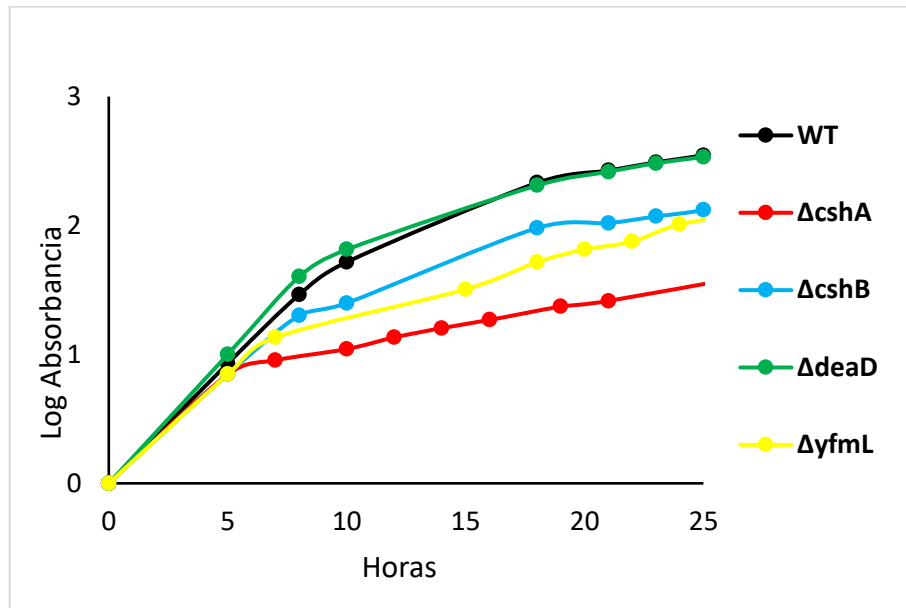


Figura 8.- Las cepas mutantes y silvestre muestran crecimiento diferencial a 18 °C. Para cada una de las mutantes simples y la cepa silvestre isogénica se realizaron cinéticas de crecimiento. Cada punto representa el promedio de dos muestras independientes.

5.2.-Crecimiento de las dobles mutantes en dos condiciones de temperatura y análisis de las relaciones epistáticas.

Una manera de explicar que las mutantes individuales crecieran bien a 37 °C en LB, sería que hubiera una compensación por parte de las otras RNA helicasas, después de todo, el core SF2 es muy conservado. Con la finalidad de evaluar la posible redundancia funcional entre las RNA helicasas se construyeron y evaluaron dobles mutantes. Primeramente, se probó su crecimiento en caldo LB a 37 °C, con la finalidad de explicar la falta de fenotipo de las mutantes simples.

Al analizar el crecimiento de las mutantes dobles a 37 °C se observó que éste fue muy parecido al de la cepa silvestre. Excepcionalmente, la mutante doble $\Delta cshB-\Delta deaD$ presentó una mayor tasa de crecimiento que la cepa silvestre (Figura 6, páneles B y D). A esta temperatura en ningún caso se vio un efecto drástico de alguna doble mutante que sugiriera compensación entre RNA helicasas.

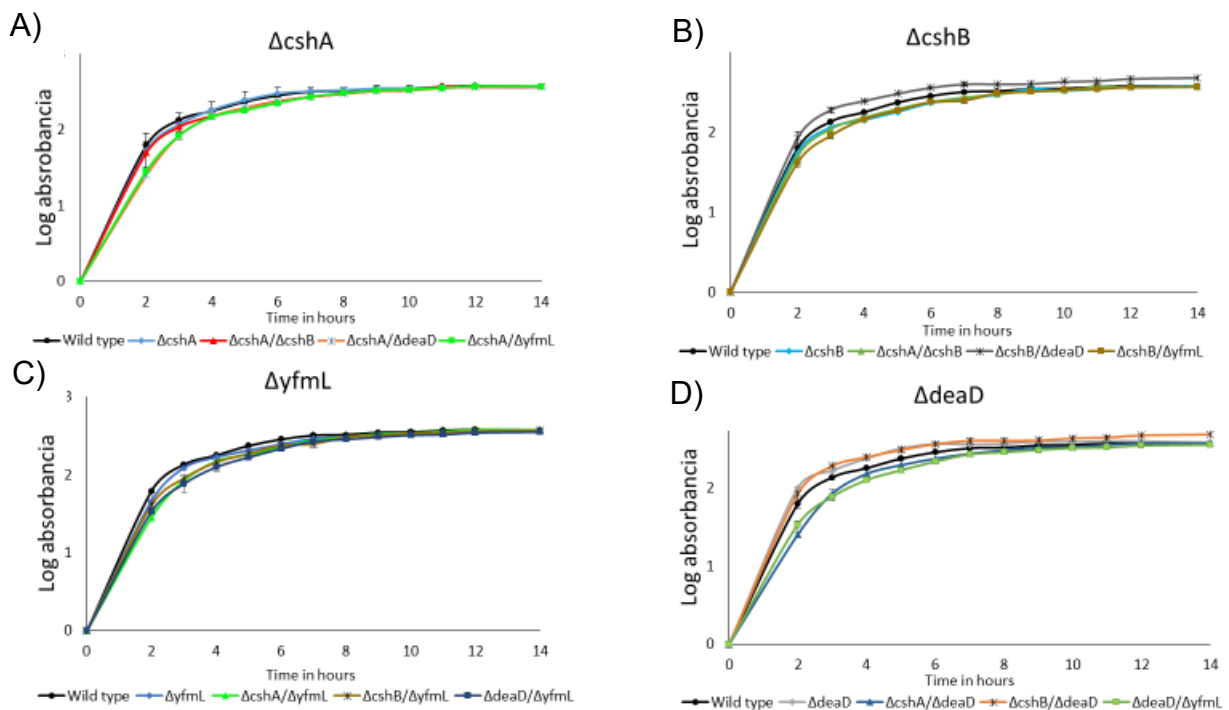


Figura 9.- Las dobles mutantes de genes de caja DEAD exhiben cinéticas de crecimiento a 37 °C similares a las de las mutantes sencillas. Para cada una de las mutantes simples y dobles se realizaron cinéticas de crecimiento a 37°C. Cada punto representa el promedio de tres muestras independientes y la barra la desviación estándar. Los paneles A, B, C y D muestran las cinéticas de las cepas wt y mutantes sencillas y dobles de CshA, CshB, YfmL y DeaD, respectivamente.

Dado que las RNA helicasas desdoblan estructuras secundarias en el RNA, es más importante su participación a baja temperatura. Cuando las mutantes de los genes DEAD se evaluaron a 18 °C se observó que las cinéticas de crecimiento son menores a la de la wt para las mutantes isogénicas CshA, CshB y YfmL. La mutante DeaD, sin embargo, no exhibe diferencias relativa a la cepa wt. Nuevamente, una explicación a la ausencia de fenotipo para mutante DeaD es la redundancia con alguna otra helicasa. Cuando se analizó el crecimiento a 18 °C mediante el cálculo de la tasa de crecimiento por el modelo logístico, se observó que en general el fenotipo de las dobles mutantes fue similar al de las mutantes simples (Figura 10), con excepción de la doble mutante $\Delta cshA-\Delta yfmL$ en el cual el efecto fue benéfico comparado con la mutante simple $\Delta cshA$.

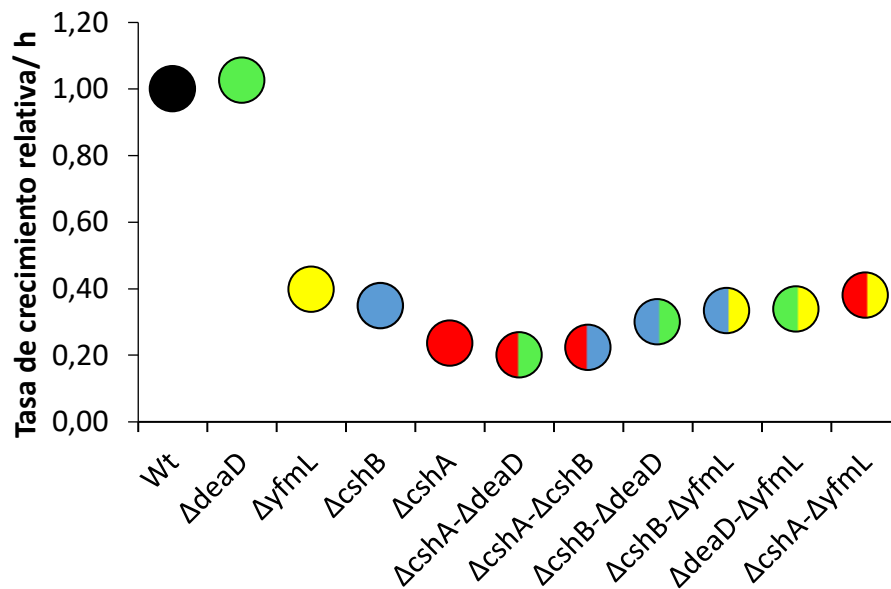


Figura 10.- Tasa de crecimiento relativa de mutantes dobles y simples. Cada círculo representa el promedio de la tasa máxima de crecimiento (r) de tres muestras independientes normalizadas con la cepa silvestre (**W**). El crecimiento fue evaluado a 18 °C en caldo LB.

Para entender de mejor manera las relaciones epistáticas entre los genes se calculó el valor de epistasis. Los valores de la tasa de crecimiento (r) de las mutantes simples y dobles fueron normalizados con el valor de la silvestre para calcular la tasa de crecimiento relativa (**W**). Estos valores fueron usados para calcular los valores de epistasis (**E**). Los valores positivos indican una relación antagónica en el efecto de la segunda mutación, esto es, la doble mutante disminuye o suprime el efecto negativo de la primera mutación. Los valores negativos, por otro lado, indican un efecto sinérgico entre las dos mutaciones, acentuando aún más el fenotipo de la mutante sencilla.

Para el caso de la temperatura a 37 °C se observó el mayor valor positivo para la doble mutante $\DeltachsB \Delta yfmL$. Lo anterior es reflejo de un efecto benéfico o antagónico entre las mutaciones, Figura 11.

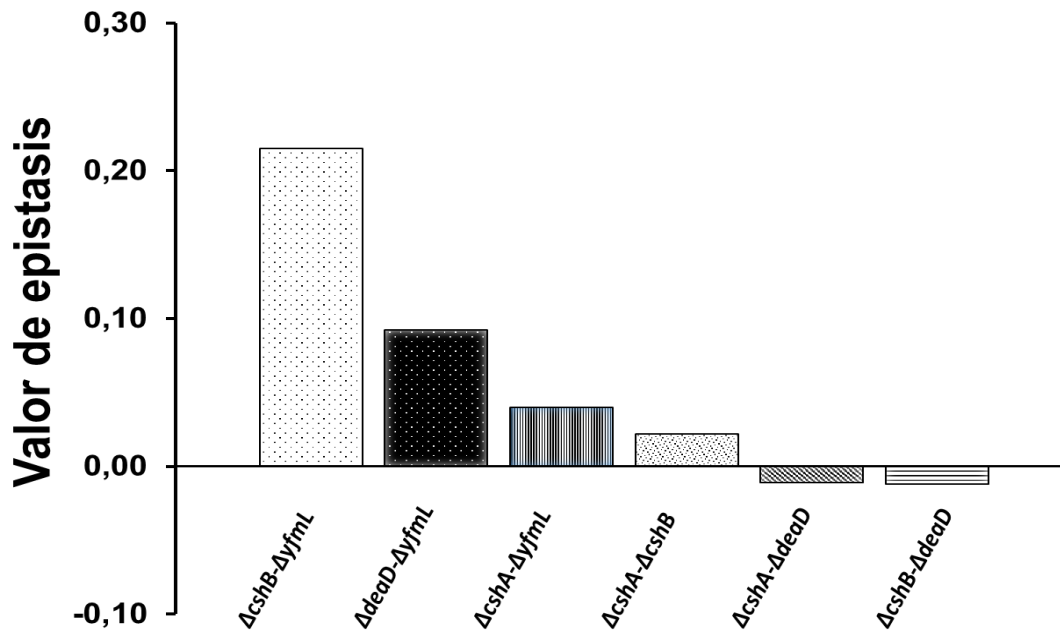


Figura 11.- Relación epistática entre los genes de las RNA helicasas a 37 °C. El grado de epistasia es expresado como la diferencia entre la tasa máxima de crecimiento (r) de la doble mutante ($Wx'x''$) y la tasa máxima de crecimiento esperada ($Wx' * Wx''$). Los valores positivos significan una epistasia antagónica y los valores negativos de cero significan una epistasia sinérgica.

Para el análisis a 18 °C, el mayor valor fue para la doble mutante $\Delta chsA \Delta yfmL$, y en menor grado la doble mutante $\Delta cshB \Delta yfmL$. Por el contrario, para las dobles mutantes del gen $\Delta deaD$ los valores fueron muy cercanas a cero, lo que indican una epistasia débil con este gen (Figura 12).

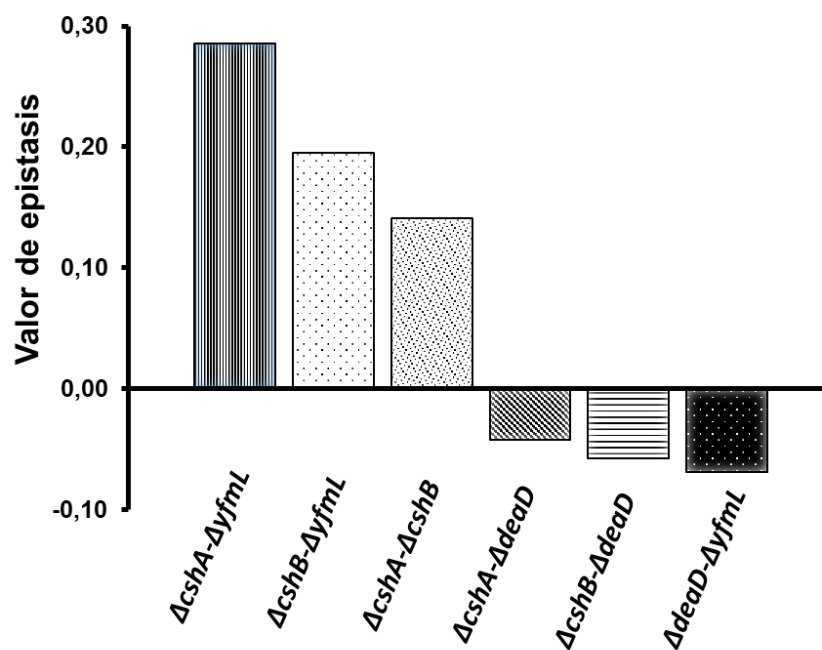


Figura 12.- Relación epistática diferencial entre genes de las RNA helicasas a 18 °C. Los valores positivos representan una epistasis antagónica (positiva) y los valores negativos representan una epistasis sinérgica.

Tabla 3. Tasa de crecimiento máxima y relativa de las mutantes simples y dobles a 37 °C y 18 °C.

	Tasa máxima de crecimiento 37 °C (r /h)	Tasa máxima de crecimiento 18 °C (r /h)	Crecimiento relativo 37 °C (W)	Crecimiento relativo 18 °C (W)
<i>Silvestre</i>	0.97	0.390	1.00	1.00
$\Delta cshA$	0.94	0.092	0.97	0.24
$\Delta cshB$	0.85	0.136	0.87	0.35
$\Delta deaD$	0.96	0.400	0.98	1.03
$\Delta yfmL$	0.92	0.155	0.95	0.40
$\Delta cshA-\Delta cshB$	0.84	0.087	0.87	0.22
$\Delta cshA-\Delta deaD$	0.92	0.078	0.94	0.20
$\Delta cshA-\Delta yfmL$	0.93	0.148	0.96	0.38
$\Delta cshB-\Delta deaD$	0.82	0.117	0.85	0.30
$\Delta cshB-\Delta yfmL$	1.01	0.130	1.04	0.33
$\Delta deaD-\Delta yfmL$	1.00	0.132	1.03	0.34

5.3.-Análisis del efecto de la mutación simple en la expresión del resto de los genes parálogos.

5.3.1.- Cuantificación de la transcripción por qPCR.

Con la finalidad de analizar una posible compensación debido a un aumento de expresión y poder relacionar los hallazgos de epistasis con las variaciones en la expresión, se llevó a cabo la cuantificación de los transcritos de cada una de las DBRHs por la técnica de qPCR a 37 °C y 18 °C. En la cuantificación relativa es necesario la selección de un gen control endógeno (“housekeeping”), el cual es usado como referencia y su característica principal es su poca variación entre las diferentes muestras.

Al analizar los resultados obtenidos a 37 °C se observó que la principal variación se observa en la expresión del gen *yfmL* en el fondo mutante $\Delta cshB$. Lo que se relaciona con el mayor valor de espistasis a esta temperatura (Figura 11).

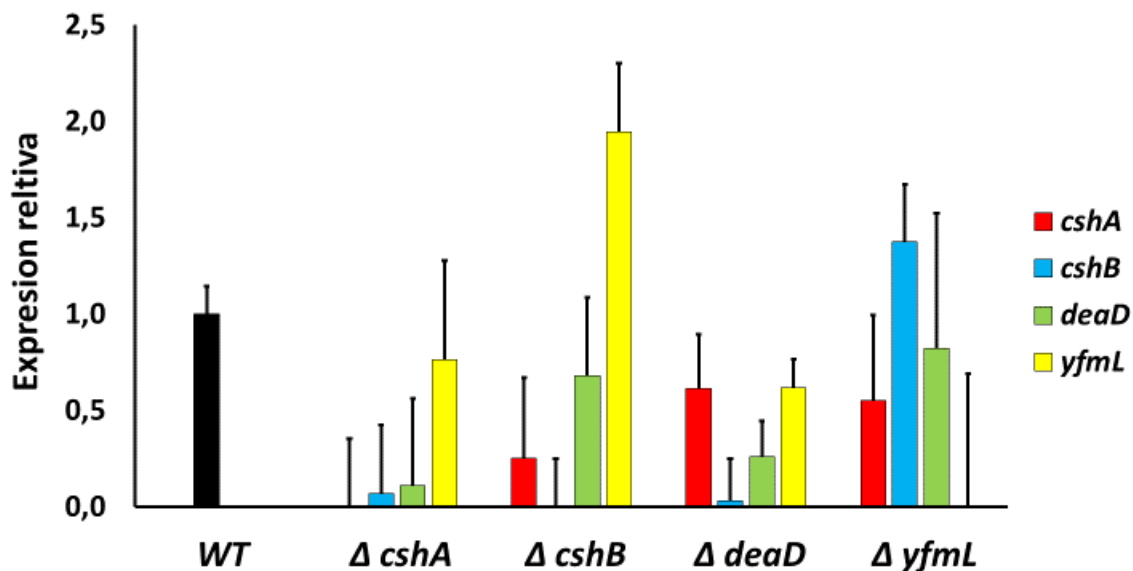


Figura 13.- Efecto diferencial en la expresión genética de las RNA helicasas en ausencia de un gen a 37 °C. La evaluación de la expresión de los mRNAs se hizo por qPCR. El cálculo de expresión relativa fue realizado con el gen *sigA* como control. Fondos mutantes $\Delta cshA$ (GP 1083), $\Delta cshB$ (GP1051), $\Delta deaD$ (GP 1052) y $\Delta yfmL$ (GP1053) en todos los casos el valor comparativo de la cepa silvestre es uno.

Para la temperatura de 18 °C, la principal variación fue mostrada por el gen *cshB*, en el fondo

mutante $\Delta cshA$, ya que su expresión incrementó notoriamente alcanzando lo que denominamos arbitrariamente el segundo nivel, que es mayor a 5 veces la expresión en la cepa silvestre (Materiales y Métodos). Para el gen *deaD* en esta misma mutante el efecto es menor, el incremento llega al primer nivel. En el caso de la mutante *CshB* el efecto principal es sobre *deaD* incrementando al primer nivel (Figura 14, Tabla 4). Para la mutante *DeaD* tanto el gen *cshA* como *yfmL* incrementa su expresión al primer nivel. Cuando *yfmL* está ausente los genes *cshA* y *deaD* alcanza el segundo nivel.

Tabla 4. Resumen de la expresión genética de los cuatro genes de RNA helicasas en los fondos mutantes evaluada por qPCR y usando *sigA* como control a 18 °C. Por columna se sombrea el valor más alto.

	$\Delta cshA$	$\Delta cshB$	$\Delta deaD$	$\Delta yfmL$
<i>cshA</i>	0.1 ± 0.02	1.7 ± 0.26	4.0 ± 0.85	5.5 ± 0.30
<i>cshB</i>	10.9 ± 0.02	0.0 ± 0.58	1.3 ± 0.91	2.9 ± 0.12
<i>deaD</i>	1.87 ± 0.02	4.4 ± 0.40	0.0 ± 0.29	6.9 ± 0.14
<i>yfmL</i>	0.6 ± 0.16	1.9 ± 0.21	2.7 ± 0.53	0.0 ± 0.45

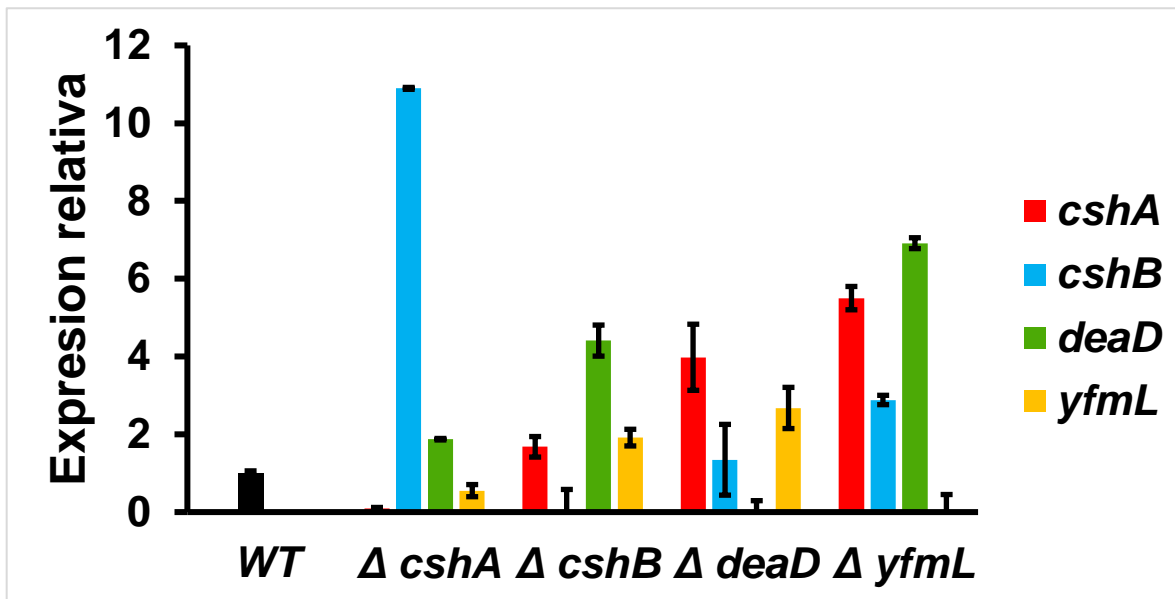


Figura 14.- Efecto diferencial en la expresión genética de las RNA helicasas en ausencia de un gen a 18 °C. El cálculo de expresión relativa fue realizada con el gen *sigA* como control.

Fondos mutantes $\Delta cshA$ (GP 1083), $\Delta cshB$ (GP1051), $\Delta deaD$ (GP 1052) y $\Delta yfmL$ (GP1053) en todos los casos el valor comparativo de la cepa silvestre es uno.

Con la finalidad de verificar el comportamiento de la expresión genética de las DBRHs en la condición de baja temperatura y descartar la variación debido a la expresión de *sigA* se decidió probar un segundo gen control, *gyrA*. Este gen tuvo una expresión constante todas las muestras, pero en menor nivel que *sigA*. El resumen de la expresión usando *gyrA* se muestra en la Tabla 5. Tanto para *sigA* como *gyrA* se observó el mismo comportamiento en la expresión genética en los fondos mutantes (Figura 14 y 15), lo que descarta variación debido al gen control. La diferencia observada en valores de expresión relativa es debido a la menor expresión de *gyrA* (mayor valor de CT) y su efecto en la normalización (ΔCT) de cada valor. Tanto CshA como CshB participan en el degradosoma, sin embargo, los efectos de aumento en la expresión de los otros genes no se concentran en estas mutantes. Independiente mente de la explicación ¿el aumento en la expresión de algunos mRNA de las helicasas tiene realmente consecuencias y esto puede verse reflejado a nivel proteínas? Es decir, el aumemnto en la expresión un gen es capaz de complementar al otro gen y es posible su compensación?. Estas preguntas nos llevaron a evaluar la expresión de proteínas y la posible complementación cruzada entre las distintas helicasas.

Tabla 5. Resumen de la expresión genética de los cuatro genes de RNA helicasas en los fondos mutantes usando *gyrA* como control. Por columna se sombrea el valor más alto, el valor representa el promedio de tres muestras independientes y su desviación estándar.

	$\Delta cshA$	$\Delta cshB$	$\Delta deaD$	$\Delta yfmL$
<i>cshA</i>	0.2 ± 0.023	4.8 ± 0.11	2.4 ± 0.39	1.4 ± 0.33
<i>cshB</i>	21.0 ± 0.024	0.0 ± 0.58	0.3 ± 0.70	0.7 ± 0.15
<i>deaD</i>	4.1 ± 0.019	9.6 ± 0.40	0.0 ± 0.15	1.8 ± 0.17
<i>yfmL</i>	1.2 ± 0.156	4.0 ± 0.21	0.9 ± 0.58	0.0 ± 0.12

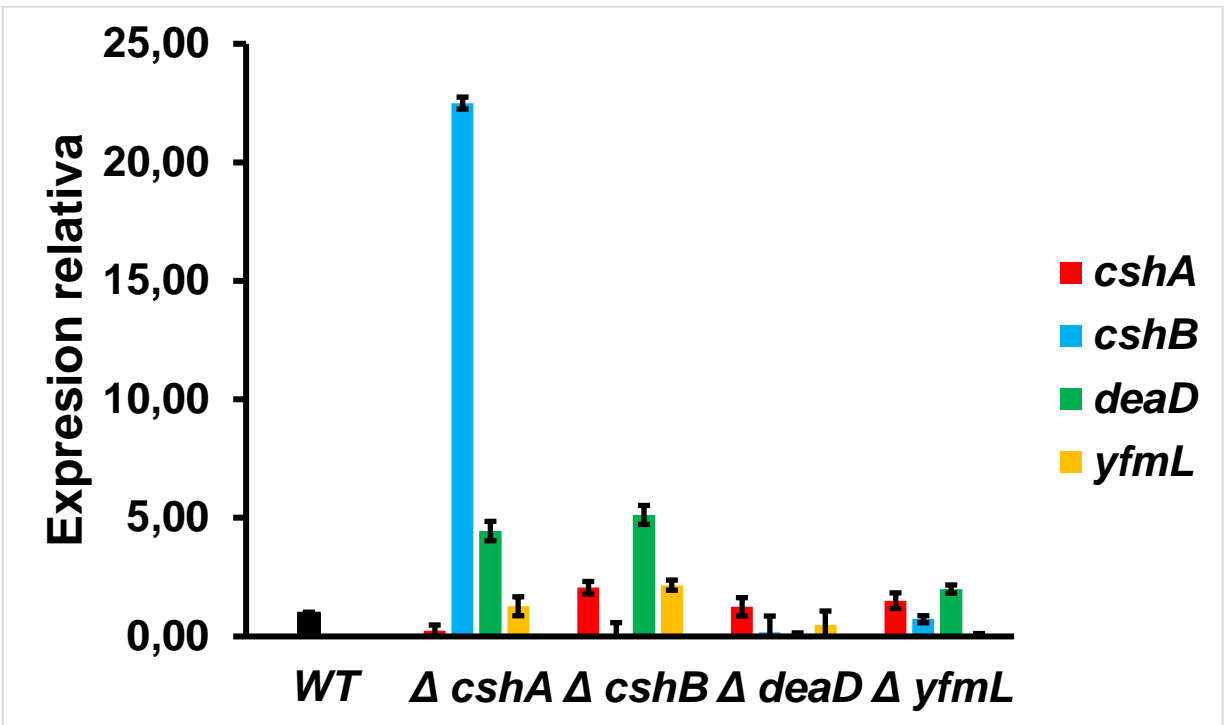


Figura 15.- Efecto diferencial en la expresión genética de las RNA helicasas en ausencia de un gen. El cálculo de la expresión relativa fue realizado con el gen *gyrA* como control. **A)** Fondos mutantes $\Delta cshA$ (GP 1083), $\Delta cshB$ (GP1051), $\Delta deaD$ (GP 1052) y $\Delta yfmL$ (GP1053) en todos los casos el valor comparativo de la cepa silvestre es uno.

5.3.2.- Analisis de la expresión mediante Westernblot

Contrastando los resultados obtenidos de la expresión de proteínas con los niveles de transcripción en la fase exponencial a 18 °C, observamos que no existe correlación. El nivel de proteína de CshB en la mutante $\Delta cshA$ es muy similar al nivel mostrado en la cepa silvestre y a nivel de transcrito fue el de mayor valor. Por otro lado, llama la atención la ausencia de CshA en las tres mutantes, esto no fue observado a nivel de transcritos de mRNA (Figura 16).



Figura 16. Las RNA helicasas no se sobreexpresan en los fondos mutantes. La expresión de las RNA helicasas marcadas con FLAG fue observada en fondo silvestre y en mutantes simples. La proteína fue extraída durante la fase exponencial a 18 °C, su detección se realizó con el anticuerpo monoclonal anti-FLAG.

Al ampliar la información sobre la expresión de las proteínas en fase estacionaria y a 37 °C los resultados diversos. Es importante resaltar el efecto de la ausencia de CshA, excepto en la fase estacionaria a 37 °C. Comparando la expresión de las proteínas en relación a la cepa silvestre tenemos casos en la cual la mutación reduce la expresión, como YfmL en la mutante $\Delta deaD$ en fase exponencial a 18 °C y YfmL en la mutante $\Delta cshA$ en fase exponencial a 37 °C. En el caso contrario en la fase estacionaria a 37 °C la proteína DeaD incrementa su expresión en la mutante $\Delta yfmL$ y $\Delta cshA$ (Figura 17). Llama la atención que la CshB presenta más de un tamaño, lo que sugiere que es modificada, tal vez por fosforilación.

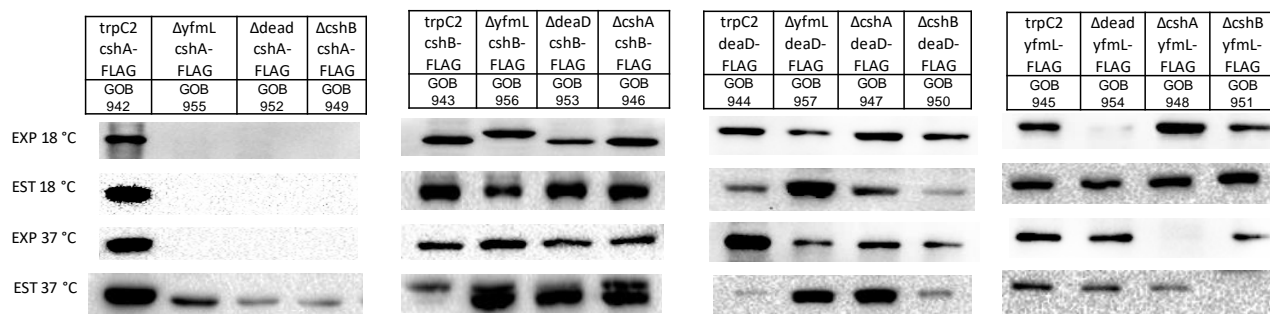


Figura 17. Expresión diferencial de las RNA helicasas en diferentes fases de crecimiento y temperatura. La proteína total fue extraída durante la fase exponencial (EXP) y estacionaria (EST) a 18 y 37 °C. 40 microgramos de proteína fue cargada en gel de poliácridamida al 12.5%. Las proteínas del gel se electrotransfirieron a membrana de nitrocelulosa y el epítotope FLAG fue detectado con anticuerpo monoclonal (Chemidoc).

5.4.- Evaluación de redundancia funcional

A continuación se buscó conocer el grado de redundancia funcional entre los genes DBRH y su posible complementación cruzada. Para este objetivo se buscó poder controlar la temporalidad y nivel de expresión utilizando un vector integrativo con un promotor inducible con xilosa, como se describe en la metodología. El método nos permite inducir la expresión de los diferentes genes de las DBRH en una misma fase de crecimiento y mantener la expresión a lo

largo del tiempo de crecimiento. Primeramente se realizó la auto-complementación para todos los genes, a fin de evaluar la funcionalidad de las construcciones y de la estrategia de inducción. La concentración experimental óptima fue 1% de inductor, lo que coincide con lo reportado por Kim, Mogk, & Schumann, 1996. Los valores se expresan en términos de la tasa máxima de crecimiento (r) calculada por el modelo logístico. Se observó que para todos los casos el nivel crecimiento alcanzado por las cepas mutantes que tenían las construcciones se recuperaba prácticamente al nivel de la cepa silvestre a 18 °C (Tabla 6, Figura 13).

Tabla 6.- Tasa máxima de crecimiento de cepas auto-complementantes con y sin inductor al 1 % a 18 °C.

	Tasa máxima de crecimiento (r / h)	Tasa máxima de crecimiento (r / h)
	Sin inductor	Con inductor
<i>Wild type</i>	0.27	0.27
$\Delta cshA$ <i>p_{xyl}::cshA</i>	0.09	0.23
$\Delta cshB$ <i>p_{xyl}::cshB</i>	0.17	0.25
$\Delta deaD$ <i>p_{xyl}::deaD</i>	0.26	0.27
$\Delta yfmL$ <i>p_{xyl}::yfmL</i>	0.18	0.23

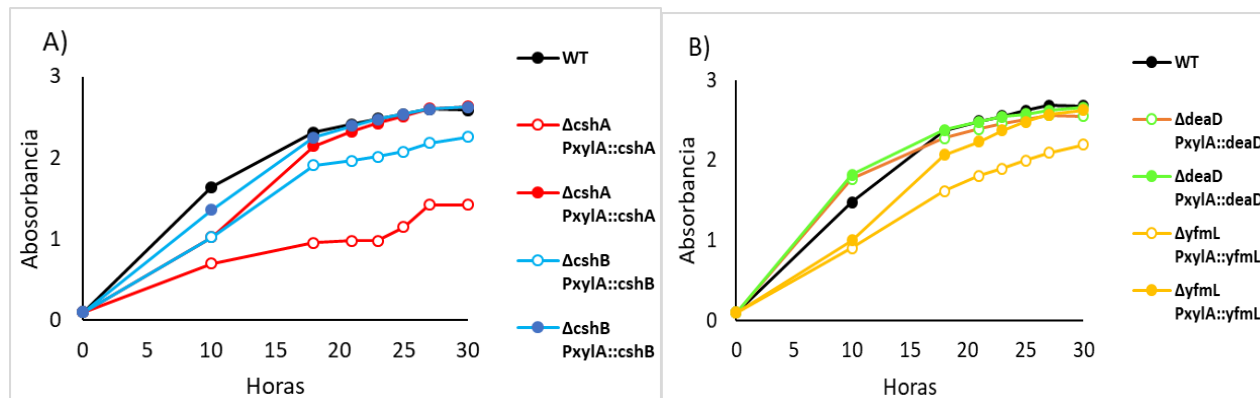


Figura 18.- Autocomplementación de RNA helicasas a 18°C. A) Cinéticas de crecimiento para las cepas mutantes $\Delta cshA$ y $\Delta cshB$ con y sin inductor. B) Cinéticas de crecimiento para las cepas $\Delta deaD$ y $\Delta yfmL$. Las figuras sin relleno indican crecimiento sin inductor y aquéllas

con relleno indican adición de inductor al 1%.

Cuando se sobre-expresaron los genes de las RNA helicasas en fondo silvestre, el efecto de dosis fue discreto. Analizando los valores de la tasa de crecimiento solo la sobreexpresión de *cshA* y *cshB* resultó en un decremento pequeño pero significativo (Figura 19).

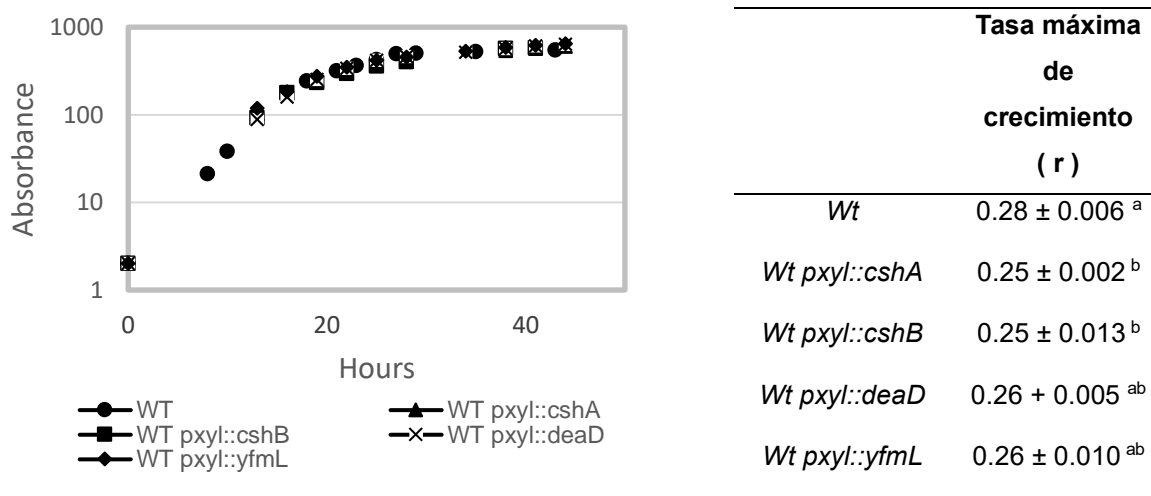


Figura 19. Efecto de dosis discreta al sobre-expresar los genes de las RNA helicasas en el fondo silvestre. Las cepas GOB 642, GOB 643, GOB 644, GOB 645 fueron incubadas con xilosa 1% a 18 °C. Las letras indican una diferencia significativa por el análisis de Tukey.

En los experimentos de complementación cruzada (Figura 20), se observó diferente comportamiento según cada fondo mutante (Tabla 7). Para la mutante $\Delta cshA$ en todos los casos la sobre-expresión tuvo un efecto negativo. En el caso $\Delta cshB$ la sobreexpresión de *yfmL* y *deaD* tuvo un efecto positivo, pero sin alcanzar el nivel de la cepa silvestre, el mayor efecto se alcanza en ausencia de inductor, esto es debido a que el promotor inducible no es reprimido completamente, por lo que existe una baja expresión del gen aún sin inductor (Kim et al., 1996). En la mutante $\Delta deaD$ la sobre-expresión de *cshB* y *yfmL* tiene una reducción significativa en su crecimiento. Y para el caso de $\Delta yfmL$ la sobreexpresión de *cshA* causa un ligero decremento mientras que la sobre-expresión de *deaD* y *cshB* mejora ligeramente el fenotipo a bajos niveles de sobre-expresión, pero no es estadísticamente significativo.

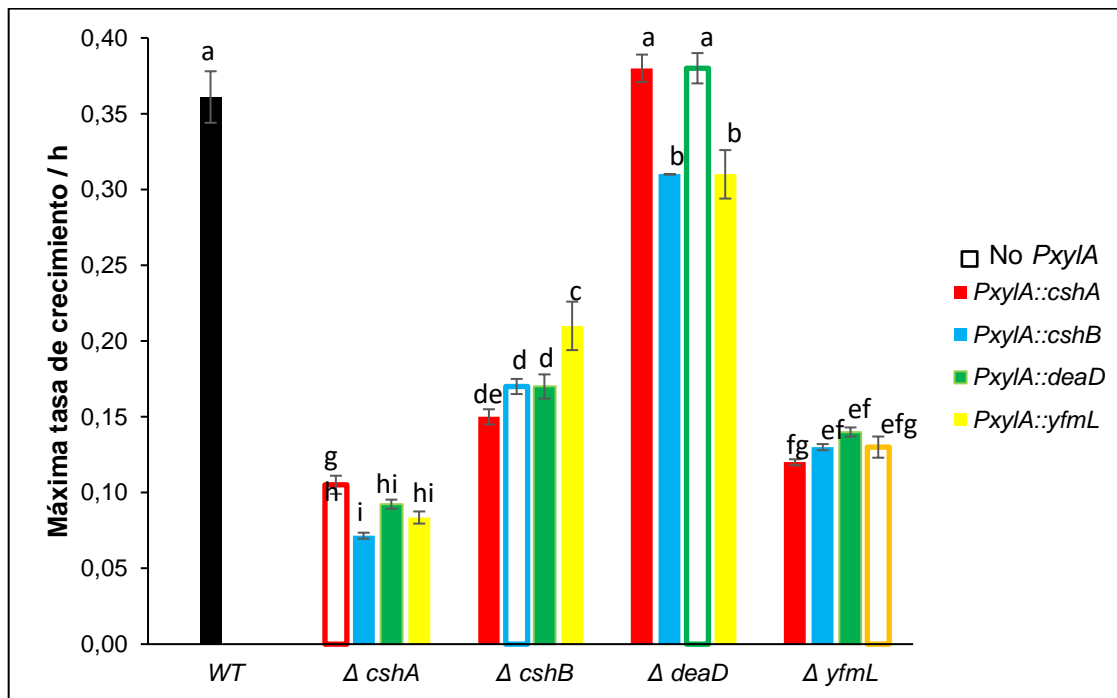


Figura 20.- No se observa complementación cruzada entre los genes de las RNA helicasa. La incubación fue realizada a 18 °C con xilosa como inductor al 1%, hasta la fase estacionaria. Se calculó la máxima tasa de crecimiento. La barra negra representa la cepa silvestre, $\Delta cshA$ (GP 1083) rojo, $\Delta cshB$ GOB 630 azul, $\Delta deaD$ GOB 631 verde, $\Delta yfmL$ GOB 632 amarillo. La barra vacía indica la mutante simple sin el promotor inducible *pxyIA*.

Tabla 7. Resumen de la máxima tasa de crecimiento en el análisis de complementación cruzada.

	Control sin <i>pxyIA</i>	<i>pxyIA::cshA</i>	<i>pxyIA::cshB</i>	<i>pxyIA::deaD</i>	<i>pxyIA::yfmL</i>
$\Delta cshA$ (-)	0.103 ± 0.006		0.062 ± 0.006	0.081 ± 0.003	0.077 ± 0.006
(+)	0.105 ± 0.006	-----	0.072 ± 0.002	0.092 ± 0.003	0.084 ± 0.004
$\Delta cshB$ (-)	0.168 ± 0.004	0.166 ± 0.011		0.202 ± 0.009	0.222 ± 0.011
(+)	0.174 ± 0.005	0.153 ± 0.005	-----	0.175 ± 0.008	0.215 ± 0.016
$\Delta deaD$ (-)	0.371 ± 0.012	0.376 ± 0.015	0.308 ± 0.007		0.321 ± 0.009
(+)	0.380 ± 0.009	0.375 ± 0.000	0.307 ± 0.010	-----	0.313 ± 0.016
$\Delta yfmL$ (-)	0.130 ± 0.002	0.137 ± 0.002	0.142 ± 0.003	0.143 ± 0.007	
(+)	0.129 ± 0.002	0.119 ± 0.002	0.132 ± 0.003	0.137 ± 0.007	-----

Sin inductor (-) con inductor (+).

5.5.- Complementación mediante quimera *csHA-yfmL* en mutantes simples $\Delta csHA$ y $\Delta yfmL$.

Este objetivo está enfocado a esclarecer el rol del núcleo helicasa (core SF2) en la especificidad de la función y la modularidad de las RNA helicasas SF2. Se esperaba que fuera posible el reemplazo de la región núcleo ya que es la región más conservada en estas proteínas (Figura 1). Lenick Habrink (2010) sugiere que inclusive la proteína YfmL, la más pequeña de las helicasas, carezca de especificidad y funcione sólo el núcleo, que posiblemente sea conducido a diferentes sustratos mediante interacción con otras proteínas.

Se eligió el core SF2 de la helicasa YfmL para verificar su función de unidad funcional genérica con baja especificidad. El alineamiento mostrado en la Figura 4 permitió establecer la región core para los cuatro genes y se utilizó la secuencia conservada RAG presente en las cuatro proteínas, que se encuentra en un giro a la derecha, de acuerdo a la predicción de “secondary structure prediction method version IV”, (Garnier, Gibrat, & Robson, 1996). El núcleo de YfmL fue probado con las regiones amino y carboxi de cada gen, los cuales se esperaba dieran la especificidad a la unidad funcional mostrando complementación de los fondos mutantes.

Al analizar el efecto de la sobre-expresión de las quimeras en los fondos silvestre y mutantes simples a 37°C, no se observó ningún efecto negativo en el fenotipo, siendo el crecimiento muy similar al de la cepa silvestre (wt). Figura 21.

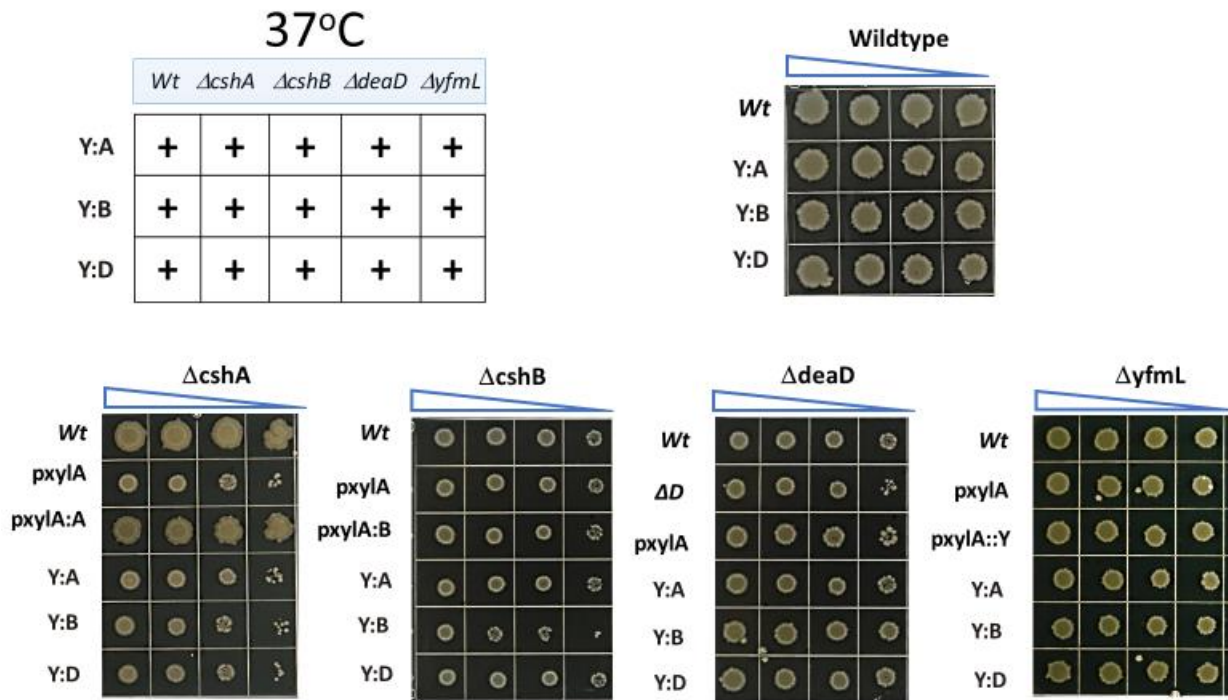


Figura 21. No se observa efecto por al sobreexpresar las quimeras en los difetentes fondos a 37 °C. Análisis funcional de las RNA helicasas *in vivo* a 37°C. La expresion de las helicasas fue inducida mediante xylosa y el crecimiento fue probado en la cepa silvestre y mutantes simples. Se realizaron diluciones decimales del cultivo y se plaquearon por gota en medio LB semisólido. Se incubaron a 37 oC por 18h. El símbolo (+) representa un crecimiento óptimo.

De igual forma se probó la complementación de la mutantes simples con cada una de las quimeras y su efecto en el fondo silvestre a 18°C. En ningún caso se observó complementación, contrario a lo esperado, existen diferentes efectos negativos dependiendo del fondo analizado. En la mutante $\Delta cshB$ la expresión de la quiera *yfm-cshB*, es letal, este mismo efecto, se observó al sobre-expresar la quimera *yfmL-cshA* en el fondo mutante $\Delta deaD$, aunque en menor grado. En el caso de la mutante $\Delta yfmL$ la expresión de las tres quimeras tiene un efecto negativo, únicamente se observó crecimiento en la muestra sin diluir. (Figura 22).

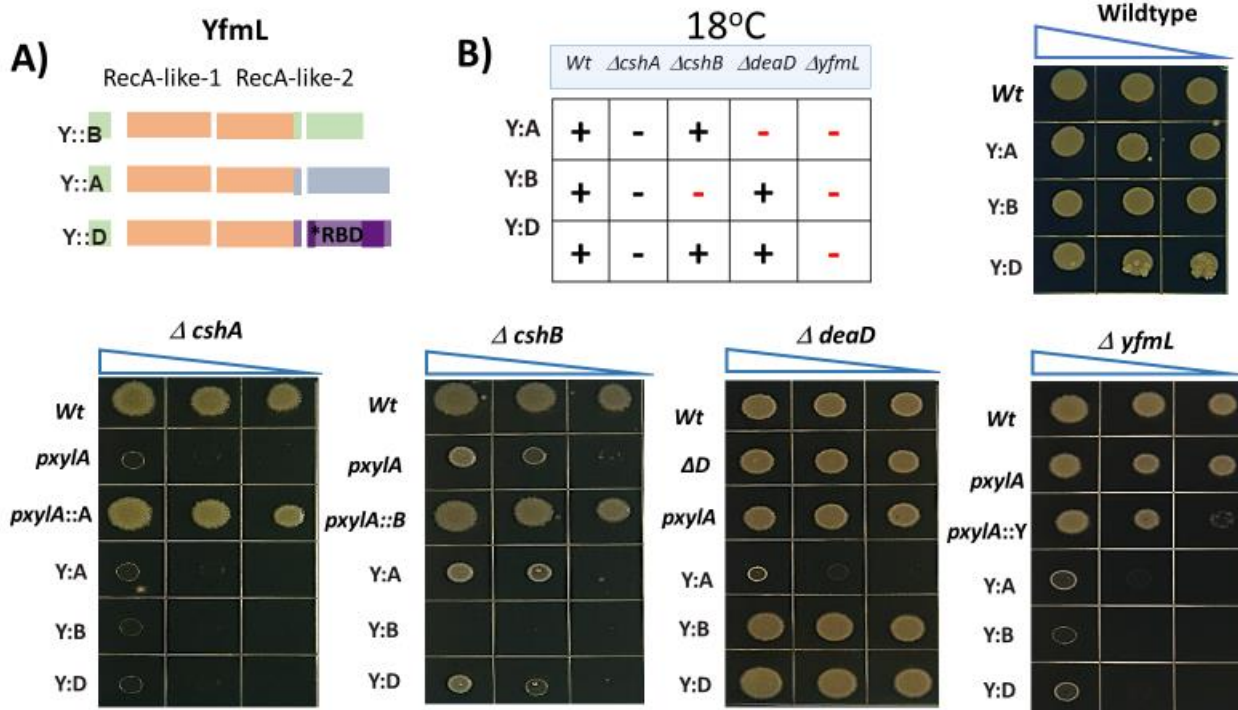


Figura 22.- La sobreexpresión de las quimeras fue negativo en algunos fondos a 18°C . Análisis funcional de las RNA helicasas *in vivo* a 18°C. A) Los 41 aminoácidos de la región carboxi terminal variable de *yfmL* fue remplazada por la respectiva región carboxi terminal de *cshA*, *cshB*, y *deaD*. B) La expresión de las quimeras fue inducida mediante xilosa y el crecimiento fue probado en la cepa silvestre y mutantes simples. Se realizaron diluciones decimales del crecimiento y se depositaron en agar LB. El símbolo (+) representa un crecimiento óptimo, (-) negro un bajo crecimiento, (-) rojo efecto negativo.

4. DISCUSION.

En el presente trabajo se ahonda en la comprensión del fenómeno de duplicación génica en bacterias, y del motivo por el cual varias copias de un gen ancestral del metabolismo del RNA pueden ser conservadas. Para abordar este tema se plantearon varias preguntas fundamentales: ¿Existe redundancia funcional entre las RNA helicasas?, ¿Existe compensación por cambio de expresión en la ausencia de algún gen?, ¿Existen relaciones epistáticas?, ¿Las mutantes pueden ser complementadas por sobreexpresión?

Una posible explicación de la dispensabilidad de las RNA helicasas tipo DEAD box sería sobrelape de funciones, pero esto sería contradictorio para explicar su conservación a través de la evolución, pues sería más fácil perderlas. Se pensaría entonces que juegan papeles independientes y esenciales, pero a pesar de ello tendrían manera de complementarse en

otras funciones. Al momento de realizar este trabajo no se cuenta con información respecto a relaciones entre estos genes parálogos. Se sabe que las mutantes no muestran fenotipo a 37°C y que tienen un crecimiento diferencial a 20°C. Esto se puede considerar como evidencia que sugiere una redundancia de funciones o una complementación de la función perdida por alguna vía.

Para comenzar el trabajo fue necesario la estandarización de las condiciones experimentales y el posterior análisis de las mutantes sencillas en varias condiciones de estrés entre ellas baja temperatura. Tomando en cuenta que la función de las DBRHs es ayudar al adecuado plegamiento del RNA mediante el uso de ATP, se explica un fenotipo de crecimiento pobre a 18 °C debido a una mayor estabilidad de las dobles cadenas de RNA a esta temperatura, y de aquí que ya se hubiera reportado la importancia de algunas RNA helicasas a esta temperatura (lost, 2006). Considerando que todos los RNAs estarían sujetos a la influencia de las RNA helicasas, podría ser posible que aun a 37 °C otros tipos de estrés también afectaran negativamente el crecimiento. Por ejemplo, cambiar la velocidad de traducción del mRNA usando antibióticos podría afectar el plegamiento. Sin embargo, no logramos ver ningún otro efecto en otras condiciones de estrés probadas, como cambios de pH, alta osmolaridad, bajas concentraciones de antibiótico. De las condiciones de estrés abiótico reportadas para la cepas silvestre de *B. subtilis* (Nicolas et al., 2012) sólo el crecimiento a bajas temperaturas (18 °C) permitió observar efectos de crecimiento diferencial en las mutantes simples. Sólo para la mutante $\Delta deaD$ no se observa fenotipo alguno lo que coincide con lo reportado por Lehnik-Habrink et al., 2013.

Dada la duplicación que dió origen a estos genes, cabe la posibilidad de que la presencia de una copia enmascare la ausencia de los otros genes, y que ésto explique que a 37 °C no se observe un fenotipo en las mutantes simples, como en $\Delta deaD$ o que el crecimiento se afecte muy levemente (*yfmL* y *cshB*). Al analizar el crecimiento para las dobles mutantes a 37 °C y a 18 °C, se observó viabilidad para todas las combinaciones probadas. Inclusive, en la mayoría de los casos la tasa de crecimiento fue similar a la de las mutantes simples. Contrario a lo esperado, en uno de los casos el efecto de la doble mutación fue benéfico en la tasa de crecimiento, lo cual es un típico efecto de epistasis. El valor que obtenemos del cálculo del valor de la epistasis no permite saber si la doble mutación revierte el efecto de la mutante simple (antagónico) o en su caso contrario el efecto de la doble mutante potencia el efecto negativo de mutación simple (cinérgica). He y col en el 2010 reporta que los valores

negativamente comúnmente están relacionados con solapamiento de funciones en reacciones no esenciales y en su contraparte los valores positivos se dan en ausencia de redundancia de función en reacciones esenciales.

La mutante doble $\Delta cshA-\Delta yfmL$ a 18 °C mostró mejora en el crecimiento. Al calcular el valor de epistasis mostró valor positivo. Existe evidencia experimental que soporta la potencial formación de dímeros de una sola helicasa o entre algunas de ellas (Lehnik-Habrink et al., 2010). Lo anterior, pudiera explicar una relación funcional estrecha en alguna vía en común. En los estudios de epistasis el hecho de ver una mejora en una doble mutación sugiere que hay una vía alterna que se puede tomar cuando dos genes están ausentes. Un fenómeno similar fue descrito para *E. coli* (Jain, 2008b), donde la supresión de *RhlE* atenúa el defecto por la ausencia de *SrmB*. El gen *rhlE* es propuesto como un regulador conformacional en la síntesis de ribosomas.

Al analizar los valores de epistasis entre *cshA* y *cshB* se observó que tiene valor positivo. Ambos genes se han relacionado directamente al metabolismo del RNA, síntesis de ribosomas y en respuesta a condiciones de estrés por choque frío (Hunger et al., 2006; Lehnik-Habrink et al., 2013). Sin embargo, no existe evidencia de formación de dímeros entre ellas (Lehnik-Habrink et al., 2010). Al analizar la expresión genética en el fondo mutante $\Delta cshA$ se observó un considerable incremento del gen *cshB*, pero no existe evidencia que el efecto sea directo. Haría falta monitorear un mayor número de genes para comprender mejor este efecto. Otra limitante para comprender este fenómeno es que una mayor expresión a nivel de mRNA no necesariamente implica un aumento proporcional a nivel de proteína. Esto fue verificado mediante el análisis la expresión de proteínas, lo que sugiere un mecanismo de regulación postranscripcional hasta ahora no descrito. En resumen de estos experimentos podemos concluir que el fenotipo observado a baja temperatura no es debido a una compensación por expresión entre las RNA helicasas.

Únicamente *deaD* no mostró valores de epistasis significativos con sus parálogos, lo cual refuerza la idea de una divergencia funcional a lo largo de su evolución, ya que este gen se considera el más ancestral. Sin embargo, analizando la expresión genética en la mutante simple $\Delta deaD$, el principal efecto fue el incremento en la expresión del gen *cshA*, por lo que la interacción entre ellos puede ser a nivel de regulación.

Evaluando el efecto de dosis al sobre-expresar los genes en el fondo silvestre, se obtuvo un efecto muy discreto. No así para los fondos mutantes en los que se observaron efectos

diversos. En la mutante $\Delta cshA$ la sobreexpresión resultó en una afectación negativa. Al estar ausente *cshA* puede verse comprometido el reciclado del mRNA, y haber problemas por acumulación de transcrito. Por otro lado, se observó un efecto positivo en el caso de la sobreexpresión de *yfmL* en el fondo mutante $\Delta cshB$, pero sin alcanzar los niveles de la cepa silvestre. Este estudio permitió esclarecer que la falta de complementación no es debido a una expresión diferencial en las fases de crecimiento.

Recientemente Diana Fabiola Díaz, en nuestro grupo, mostró que los genes DBRH cumplen un rol importante en la esporulación de *B. subtilis*. Al analizar el porcentaje de esporulación de la cepa silvestre y mutantes simples observó un retraso desde las ocho horas de crecimiento. La cepa mutante $\Delta deaD$ fue la más afectada con un claro efecto de retraso aún pasadas 12 horas. Nicolas y col. en el 2012 reportaron un aumento en la expresión de los cuatro genes DBRH con un pico máximo a las 5 horas en condiciones de esporulación. Los genes con valores mayores de expresión fueron *cshA* y *deaD*. Es importante mencionar que hasta el momento no se ha reportado información al respecto, y será necesario mayor investigación para entender la relación que guardan estos genes con el inicio a la esporulación.

Dada la conservación de los dominios DEAD-helicC en la región central de las cuatro DBRH se esperaba que fuera posible la complementación de las mutantes simples mediante la expresión de la quimeras formada por la región conservada del gen *yfmL* y la región carboxi terminal de los genes *cshA*, *cshB* y *yfmL*. En ninguno de los casos fue posible la complementación de las mutantes. Por el contrario, en el fondo de la mutante *yfmL* la expresión de las quimeras tiene un claro efecto negativo, empeorando aún más el fenotipo. Este fenómeno se puede atribuir a una competencia por el mismo sustrato entre las quimeras y las proteínas de los otros genes. De igual forma se observa un efecto letal en el fondo mutante $\Delta cshB$ al sobre-expresar la quimera *yfmL-cshB* y en el fondo $\Delta deaD$ al sobre-expresar *yfmL-cshA*. Estos hallazgos permiten entender cómo los dominios adicionales tienen gran importancia en la función de las proteínas y que la evolución de los genes ha sido posible debido al cambio/pérdida en la región variable carboxi terminal.

A diferencia de los numerosos reportes del fenómeno de espitasis para organismo eucariotas como *S.cerevisiae* (DeLuna et al., 2008; Greig, Borts, Louis, & Travisano, 2002; He et al., 2010; Schuldiner, Collins, Weissman, & Krogan, 2006) los reportes de este tema en bacterias son mucho menor, una de las principales diferencias reportadas como ejemplo es la importancia de las RNA helicasas en eucariotas, en las que su delección son letales. Nuestro trabajo aporta

valiosa información sobre la evolución de estos genes en *B.subtilis* y permite contrastar el comportamiento de estos genes de la misma familia en *E.coli* se comportan de manera distinta. Algo que llamo la atención es la coherencia entre el árbol filogenético de la evolución de estos genes propuesto por López-Ramírez y col en 2011 con lo observado al probar las quimeras. Al haber perdido la región del carboxi terminal para el caso de yfmL su nueva reincorporación conlleva serios conflictos dentro del metabolismo.

En conclusión, nuestro estudio nos permitió corroborar en parte nuestra hipótesis planteada acerca de una especialización de funciones, pero en contraste a lo esperado no se observa algún efecto de redundancia funcional debido a la conservación del core central.

A pesar de las actividades bioquímicas y sustratos comunes (RNA) las relaciones epistáticas observadas entre las RNA helicasas son resultado de interacciones indirectas y la conservación de los genes es debido a su especialización y distintos roles en metabolismo del RNA y en respuesta a condiciones de estrés. La conservación de las RNA helicasas tipo DEAD en *Bacillus subtilis* ha sido posible mediante la modificación o pérdida de la región carboxilo y su intercambio origina interferencias negativas a bajas temperaturas.

5. PERSPECTIVAS.

Un dato reciente mostró el efecto de las RNA helicasas en el inicio de la esporulación, lo que abre un amplio panorama de estudio, para entender si la interacción a nivel de regulación genética, transcripción de mensajeros o interacción funcional entre proteínas.

Es importante ahondar sobre las funciones bioquímicas de cada una de las RNA helicasas sobre todo YfmL de la que se conoce poco.

Trabajar con las proteínas de las quimeras permitirá analizar cambios en las características de especificidad y procesividad de YfmL.

Sería interesante esclarecer el mecanismo por el cual la proteína CshA disminuye en las mutantes simples,

6. INFORMACIÓN BIBLIOGRÁFICA.

- ABDEL-MONEM, M., DÜRWARD, H., & HOFFMANN-BERLING, H. (1976). Enzymic Unwinding of DNA: 2. Chain Separation by an ATP-Dependent DNA Unwinding Enzyme. *European Journal of Biochemistry*. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1976.tb10359.x>
- Anagnostopoulos, C., & Spizizen, J. (1961). Requirements for Transformation in *Bacillus Subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 81(5), 741–6. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=279084&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Ando, Y., & Nakamura, K. (2006). *Bacillus subtilis* DEAD protein YdbR possesses ATPase, RNA binding, and RNA unwinding activities. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70(0916–8451 (Print)), 1606–1615. <https://doi.org/10.1271/bbb.50678>
- Banroques, J., Cordin, O., Doère, M., Linder, P., & Tanner, N. K. (2011). Analyses of the functional regions of DEAD-box RNA “helicases” with deletion and chimera constructs tested in vivo and in vitro. *Journal of Molecular Biology*, 413(2), 451–472. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.08.032>
- Beckerling, C. L., Steil, L., & Weber, M. H. W. (2002). Genomewide Transcriptional Analysis of the Cold Shock Response in *Bacillus subtilis*, 6395–6402. <https://doi.org/10.1128/JB.184.22.6395>
- Bourgeois, C. F., Mortreux, F., & Auboeuf, D. (2016). The multiple functions of RNA helicases as drivers and regulators of gene expression. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.50>
- Briolat, V., & Reysset, G. (2002). Identification of the *Clostridium perfringens* genes involved in the adaptative response to oxidative stress. *J. Bacteriol.*, 184(9), 2333–2343. <https://doi.org/10.1128/JB.184.9.2333>
- Chamot, D., Colvin, K. R., Kujat-choy, S. L., & Owttrim, G. W. (2005). RNA Structural Rearrangement via Unwinding and Annealing by the Cyanobacterial RNA Helicase , CrhR *, 280(3), 2036–2044. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409700200>
- Charollais, J., Dreyfus, M., & Iost, I. (2004). CsdA, a cold-shock RNA helicase from *Escherichia coli*, is involved in the biogenesis of 50S ribosomal subunit. *Nucleic Acids Research*, 32(9), 2751–2759. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh603>
- Cordin, O., Banroques, J., Tanner, N. K., & Linder, P. (2006). The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene*, 367(1–2), 17–37. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.10.019>
- Costanzo, M., Baryshnikova, A., Bellay, J., Kim, Y., Spear, E. D., Sevier, C. S., ... Boone, C. (2010). The genetic landscape of a cell. *Science (New York, N.Y.)*, 327(5964), 425–431. <https://doi.org/10.1126/science.1180823>
- Cutting, S.M and Vander Horn, P. . (1990). In Harwood, C.R. and Cutting, S.M. (eds). In *Molecular Biological Methods for Bacillus*. John Wiley & Sons, New York, NY , pp. 27–74.
- DeLuna, A., Vetsigian, K., Shores, N., Hegreness, M., Colón-González, M., Chao, S., & Kishony, R. (2008). Exposing the fitness contribution of duplicated genes. *Nature Genetics*, 40(5), 676–681. <https://doi.org/10.1038/ng.123>

- Fairman-Williams, M. E., Guenther, U.-P., & Jankowsky, E. (2010). SF1 and SF2 helicases: family matters. *Current Opinion in Structural Biology*, 20(3), 313–324. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2010.03.011>
- Gadkar, V. J., & Fillion, M. (2013). Development of a versatile TaqMan™ real-time quantitative PCR (RT-qPCR) compliant anchor sequence to quantify bacterial gene transcripts from RNA samples containing carryover genomic DNA. *BMC Biotechnology*, 13(1), 7. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-13-7>
- Garnier, J., Gibrat, J. F., & Robson, B. (1996). GOR secondary structure prediction method version IV. *Methods Enzymol*, 266(August), 540–553. <https://doi.org/10.1002/146518>
- Greig, D., Borts, R. H., Louis, E. J., & Travisano, m. (2002). Epistasis and hybrid sterility in *Saccharomyces*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 269(1496), 1167–1171. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.1989>
- Gu, Z., Steinmetz, L. M., Gu, X., & Scharfe, C. (2003). Role of duplicate genes in genetic robustness against null mutations, 63–66. <https://doi.org/10.1038/nature01226.1>.
- He, X., Qian, W., Wang, Z., Li, Y., & Zhang, J. (2010). Prevalent positive epistasis in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* metabolic networks. *Nature Genetics*, 42(3), 272–276. <https://doi.org/10.1038/ng.524>
- Hunger, K., Beckering, C. L., Wiegeshoff, F., Graumann, P. L., & Marahiel, M. a. (2006a). Cold-induced putative DEAD box RNA helicases CshA and CshB are essential for cold adaptation and interact with cold shock protein B in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 188(1), 240–248. <https://doi.org/10.1128/JB.188.1.240-248.2006>
- Hunger, K., Beckering, C. L., Wiegeshoff, F., Graumann, P. L., & Marahiel, M. A. (2006b). Cold-induced putative DEAD box RNA helicases CshA and CshB are essential for cold adaptation and interact with cold shock protein B in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 188(1), 240–248. <https://doi.org/10.1128/JB.188.1.240-248.2006>
- Ihmels, J., Collins, S. R., Schuldiner, M., Krogan, N. J., & Weissman, J. S. (2007). Backup without redundancy: genetic interactions reveal the cost of duplicate gene loss. *Molecular Systems Biology*, 3, 86. <https://doi.org/10.1038/msb4100127>
- Iost, I. (2006). DEAD-box RNA helicases in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 34(15), 4189–4197. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl500>
- Jain, C. (2008a). The *E. coli* RhIE RNA helicase regulates the function of related RNA helicases during ribosome assembly. *RNA (New York, N.Y.)*, 14(2), 381–9. <https://doi.org/10.1261/rna.800308>
- Jain, C. (2008b). The *E. coli* RhIE RNA helicase regulates the function of related RNA helicases during ribosome assembly. *RNA (New York, N.Y.)*, 14(2), 381–389. <https://doi.org/10.1261/rna.800308>
- Jankowsky, E. (2011). RNA helicases at work: Binding and rearranging. *Trends in Biochemical Sciences*, 36(1), 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.07.008>
- Jarmoskaite, I., & Russell, R. (2011). DEAD-box proteins as RNA helicases and chaperones. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 2(1), 135–152. <https://doi.org/10.1002/wrna.50>
- Jones, P. G., Mitta, M., Kim, Y., Jiang, W., & Inouye, M. (1996). Cold shock induces a major

ribosomal-associated protein that unwinds double-stranded RNA in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(1), 76–80. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.1.76>

- Kim, L., Mogk, A., & Schumann, W. (1996). A xylose-inducible *Bacillus subtilis* integration vector and its application. *Gene*, 181(1–2), 71–76. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(96\)00466-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(96)00466-0)
- Kitano, H. (2004). Biological robustness. *Nature Reviews Genetics*, 5(11), 826–837. <https://doi.org/10.1038/nrg1471>
- Korolev, S., Hsieh, J., Gauss, G. H., Lohman, T. M., & Waksman, G. (1997). Major domain swiveling revealed by the crystal structures of complexes of *E. coli* Rep helicase bound to single-stranded DNA and ADP. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80525-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80525-5)
- Kossen, K., Karginov, F. V, & Uhlenbeck, O. C. (2002). The Carboxy-terminal Domain of the DEx D H Protein YxiN is Sufficient to Confer Specificity for 23 S rRNA, 2836(02), 625–636. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)01140-3](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)01140-3)
- Kossen, K., & Uhlenbeck, O. C. (1999). Cloning and biochemical characterization of *Bacillus subtilis* YxiN, a DEAD protein specifically activated by 23S rRNA: Delineation of a novel sub-family of bacterial DEAD proteins. *Nucleic Acids Research*, 27(19), 3811–3820. <https://doi.org/10.1093/nar/27.19.3811>
- Lehner, B. (2011). Molecular mechanisms of epistasis within and between genes. *Trends in Genetics*, 27(8), 323–331. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2011.05.007>
- Lehnik-Habrink, M., Pförtner, H., Rempeters, L., Pietack, N., Herzberg, C., & Stülke, J. (2010). The RNA degradosome in *Bacillus subtilis*: Identification of *csa* as the major RNA helicase in the multiprotein complex. *Molecular Microbiology*, 77(4), 958–971. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07264.x>
- Lehnik-habrink, M., Rempeters, L., Kovács, Á. T., & Wrede, C. (2012). The DEAD-box RNA helicases in *Bacillus subtilis* have multiple functions and act independent from each other, (November). <https://doi.org/10.1128/JB.01475-12>
- Lehnik-Habrink, M., Rempeters, L., Kovács, Á. T., Wrede, C., Baierlein, C., Krebber, H., ... Stülke, J. (2013). Dead-box RNA helicases in *Bacillus subtilis* have multiple functions and Act independently from each other. *Journal of Bacteriology*, 195(3), 534–544. <https://doi.org/10.1128/JB.01475-12>
- Li, J., Yuan, Z., & Zhang, Z. (2010). The Cellular Robustness by Genetic Redundancy in Budding Yeast, (November). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001187>
- Liles, C., Kumar, M. A., & Weinshenker, D. (2004). Use of Gene-Specific Primer Cocktails for First-Strand cDNA Synthesis With a Reverse Transcriptase Kit. *American Biotechnology Laboratory*, 2(December), 20–21.
- Linder, P., Lasko, P. F., Ashburner, M., Leroy, P., Nielsen, P. J., Nishi, K., ... Slonimski, P. P. (1989). Birth of the D-E-A-D box. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/337121a0>
- Lobry, J. R., Flandrois, J. P., Carret, G., & Pave, a. (1992). Monod's bacterial growth model revisited. *Bull. Math. Biology*, 54(1), 117–122. <https://doi.org/10.1007/BF02458623>
- López-Ramírez, V., Alcaraz, L. D., Moreno-Hagelsieb, G., & Olmedo-Álvarez, G. (2011).

- Phylogenetic distribution and evolutionary history of bacterial DEAD-box proteins. *Journal of Molecular Evolution*, 72(4), 413–431. <https://doi.org/10.1007/s00239-011-9441-8>
- Mendonça, A. G., Alves, R. J., & Pereira-Leal, J. B. (2011). Loss of genetic redundancy in reductive genome evolution. *PLoS Computational Biology*, 7(2), e1001082. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1001082>
- Nicolas, P., Mäder, U., Dervyn, E., Rochat, T., Leduc, A., Pigeonneau, N., ... Jarmer, H. (2012). Condition-Dependent Transcriptome Architecture in *Bacillus subtilis*. *Science*, 1103(March), 1103–1106. <https://doi.org/10.1126/science.1206848>
- Owtrim, G. W. (2006). RNA helicases and abiotic stress. *Nucleic Acids Research*, 34(11), 3220–3230. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl408>
- Phillips, P. C. (2008). Epistasis--the essential role of gene interactions in the structure and evolution of genetic systems. *Nature Reviews. Genetics*, 9(11), 855–867. <https://doi.org/10.1038/nrg2452>
- Prakash, J. S. S., Krishna, P. S., Sirisha, K., Kanesaki, Y., Suzuki, I., Shivaji, S., & Murata, N. (2010). An RNA helicase, CrhR, regulates the low-temperature-inducible expression of heat-shock genes groES, groEL1 and groEL2 in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microbiology*, 156(2), 442–451. <https://doi.org/10.1099/mic.0.031823-0>
- Py, B., Higgins, C. F., Krisch, H. M., & Carpousis, A. J. (1996). A DEAD-box RNA helicase in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/381169a0>
- R Development Core Team. (2008). R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, ISBN 3-900*. Retrieved from <http://www.r-project.org>.
- Schuldiner, M., Collins, S. R., Weissman, J. S., & Krogan, N. J. (2006). Quantitative genetic analysis in *Saccharomyces cerevisiae* using epistatic miniarray profiles (E-MAPs) and its application to chromatin functions. *Methods*, 40(4), 344–352. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2006.07.034>
- Steinmetz, M., & Richter, R. (1994). Plasmids designed to alter the antibiotic resistance expressed by insertion mutations in *Bacillus subtilis*, through in vivo recombination. *Gene*, 142(1), 79–83. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90358-1](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90358-1)
- Subramanya, H. S., Bird, L. E., Brannigan, J. A., & Wigley, D. B. (1996). Crystal structure of a DExx box DNA helicase. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/384379a0>
- Theis, K., Chen, P. J., Skorvaga, M., Van Houten, B., & Kisker, C. (1999). Crystal structure of UvrB, a DNA helicase adapted for nucleotide excision repair. *The EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.24.6899>
- Treangen, T. J., & Rocha, E. P. C. (2011). Horizontal Transfer, Not Duplication, Drives the Expansion of Protein Families in Prokaryotes. *PLoS Genetics*, 7(1), e1001284. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001284>
- Velankar, S. S., Soutlanas, P., Dillingham, M. S., Subramanya, H. S., & Wigley, D. B. (1999). Crystal structures of complexes of PcrA DNA helicase with a DNA substrate indicate an inchworm mechanism. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80716-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80716-3)
- Verhulst, P.-F. (1845). “Recherches mathématiques sur la loi d’accroissement de la

population" [Mathematical Researches into the Law of Population Growth Increase]. *Nouveaux Mémoires de l'Académie Royale Des Sciences et Belles-Lettres de Bruxelles*, 18, 14–54.

Yu, J.-H., Hamari, Z., Han, K.-H., Seo, J.-A., Reyes-Domínguez, Y., & Scazzocchio, C. (2004). Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 41(11), 973–981.
<https://doi.org/10.1016/j.fgb.2004.08.001>

Zhao, X., & Jain, C. (2011). DEAD-box proteins from *Escherichia coli* exhibit multiple ATP-independent activities. *Journal of Bacteriology*, 193(9), 2236–2241.
<https://doi.org/10.1128/JB.01488-10>

Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., & van 't Riet, K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), 1875–1881.

APÉNDICE A

Cepas utilizadas de *B.subtilis*.

Strain	Genotype	Reference
168	<i>trpC2</i>	(Lehnik-Habrink et al., 2013)
GP 1051	<i>trpC2 ΔcshB ::cat</i>	(Lehnik-Habrink et al., 2013)
GP 1052	<i>trpC2 ΔdeaD ::tet</i>	(Lehnik-Habrink et al., 2013)
GP 1053	<i>trpC2 ΔyfmL::mls</i>	(Lehnik-Habrink et al., 2013)
GP 1083	<i>trpC2 ΔcshA::cat</i>	(Lehnik-Habrink et al., 2013)
GOB 628	<i>trpC2 ΔcshB ::mls</i>	Este trabajo
GOB 629	<i>trpC2 ΔcshA::mls</i>	Este trabajo
GOB 661	<i>trpC2 ΔcshA::cat ΔcshB::mls</i>	Este trabajo
GOB 662	<i>trpC2 ΔcshA::cat ΔdeaD ::tet</i>	Este trabajo
GOB 663	<i>trpC2 ΔcshA::cat ΔyfmL::mls</i>	Este trabajo
GOB 664	<i>trpC2 ΔcshB::cat ΔdeaD ::tet</i>	Este trabajo
GOB 665	<i>trpC2 ΔcshB::cat ΔyfmL::mls</i>	Este trabajo
GOB 666	<i>trpC2 ΔdeaD::tet ΔyfmL::mls</i>	Este trabajo
GP1084	<i>trpC2 ΔcshA ::cat lacA::cshA aphA3</i>	(Lehnik-Habrink et al., 2013)
GP1086	<i>trpC2 ΔcshB ::cat lacA::cshB aphA3</i>	(Lehnik-Habrink et al., 2013)
GP1087	<i>trpC2 ΔyfmL ::mls lacA::yfmL aphA3</i>	(Lehnik-Habrink et al., 2013)
GOB 627	<i>trpC2 ΔdeaD::tet amyE:: deaD cat</i>	Este trabajo
GOB 630	<i>trpC2 ΔcshA ::cat lacA::cshB aphA3</i>	Este trabajo
GOB 631	<i>trpC2 ΔcshA ::mls amyE:: deaD cat</i>	Este trabajo
GOB 632	<i>trpC2 ΔcshA ::cat lacA::yfmL aphA3</i>	Este trabajo
GOB 633	<i>trpC2 ΔcshB ::cat lacA::cshA aphA3</i>	Este trabajo
GOB 634	<i>trpC2 ΔcshB ::mls amyE:: deaD cat</i>	Este trabajo
GOB 635	<i>trpC2 ΔcshB ::cat lacA::yfmL aphA3</i>	Este trabajo

GOB 636	<i>trpC2 ΔdeaD ::tet lacA::cshA aphA3</i>	Este trabajo
GOB 637	<i>trpC2 ΔdeaD ::tet lacA::cshB aphA3</i>	Este trabajo
GOB 638	<i>trpC2 ΔdeaD ::tet lacA::yfmL aphA3</i>	Este trabajo
GOB 639	<i>trpC2 ΔyfmL ::mls lacA::cshA aphA3</i>	Este trabajo
GOB 640	<i>trpC2 ΔyfmL ::mls lacA::cshB aphA3</i>	Este trabajo
GOB 641	<i>trpC2 ΔyfmL ::mls lacA::deaD aphA3</i>	Este trabajo
GOB 642	<i>trpC2 lacA::cshA aphA3</i>	Este trabajo
GOB 643	<i>trpC2 lacA::cshB aphA3</i>	Este trabajo
GOB 644	<i>trpC2 amyE:: deaD cat</i>	Este trabajo
GOB 645	<i>trpC2 lacA::yfmL aphA3</i>	Este trabajo
GOB 662	<i>trpC2 amyE</i>	Este trabajo
GOB 663	<i>trpC2 ΔcshA::mls amyE</i>	Este trabajo
GOB 664	<i>trpC2 ΔyfmL::mls amyE</i>	Este trabajo
GP1010	<i>trpC2 cshA-FLAG spc</i>	(Lehnik-Habrink et al., 2013)
GP1011	<i>trpC2 cshB-FLAG spc</i>	(Lehnik-Habrink et al., 2013)
GP1066	<i>trpC2 yfmL-FLAG spc</i>	(Lehnik-Habrink et al., 2013)
GP1068	<i>trpC2 deaD-FLAG spc</i>	(Lehnik-Habrink et al., 2013)
GOB946	<i>trpC2 ΔcshA::cat cshB-FLAG spc</i>	Este trabajo
GOB947	<i>trpC2 ΔcshA::cat deaD-FLAG spc</i>	Este trabajo
GOB948	<i>trpC2 ΔcshA::cat yfmL-FLAG spc</i>	Este trabajo
GOB949	<i>trpC2 ΔcshB ::cat cshA-FLAG spc</i>	Este trabajo
GOB950	<i>trpC2 ΔcshB ::cat deaD-FLAG spc</i>	Este trabajo
GOB951	<i>trpC2 ΔcshB ::cat yfmL-FLAG spc</i>	Este trabajo

GOB952	<i>trpC2 ΔdeaD ::tet cshA-FLAG spc</i>	Este trabajo
GOB953	<i>trpC2 ΔdeaD ::tet cshB-FLAG spc</i>	Este trabajo
GOB954	<i>trpC2 ΔdeaD ::tet yfmL-FLAG spc</i>	Este trabajo
GOB955	<i>trpC2 ΔyfmL::mls cshA-FLAG spc</i>	Este trabajo
GOB956	<i>trpC2 ΔyfmL::mls cshB-FLAG spc</i>	Este trabajo
GOB957	<i>trpC2 ΔyfmL::mls deaD-FLAG spc</i>	Este trabajo

APÉNDICE B

Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Gene	Primer directo (5' - 3')	Primer reverso (5' - 3')
PX-deaD	<u>GGTGGATCCTGAGAACATCTGCAAGAG</u>	<u>CCCGGATCCCACAGATGTCAGCCAGCA</u>
Quim yfmL	<u>CCCCGACTAGTGCATGACGCAA</u> ACTTGGCCA TTT	CGTCATCGCCATACCTGTTTTTCCGGCCCCGGCCTG TTCG
Quim cshA	GGACGAACAGGCCGGGCCGAAAAACAGGT ATGGCGATG	<u>AGACCAGGATCCATCAAAT</u> TAGTAAGATTTTTTC
sigA	GAAATTGCTGAGCGTATGTCCAGC	CAGCTTGGTAGAATCGATCAGCTACCACTAATTAAT TCAACACCTTGTTCCACC
gyrA	ATCCATGGTCAGAATGGCTCAGG	CAGCTTGGTAGAATCGATCAGCTACTGAGTCTCCG TCAACAGAACCG
cshA	CGAATATTATTGTCGGAACACCTGG	CAGCTTGGTAGAATCGATCAGCTACTCATCCGCTTC ATCCATTACAACGG
cshB	GCAACTGACCTTGCCGCAAGAGG	CAGCTTGGTAGAATCGATCAGCTACATCGCTTGTC CTGATGAGCCGG
deaD	CATCTGCCGACTGAGCGTACG	CAGCTTGGTAGAATCGATCAGCTACTTTGACCTCG ATATGCTCGGGG
yfmL	CTCAAAATGCATGAAGTAAAAACGATCG	CAGCTTGGTAGAATCGATCAGCTACGATTTGCTTCA TCGTTTCGCGATGC
Acopl		CAGCTTGGTAGAATCGATCAGCTAC