



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**“Caracterización del gen putativo antiterminador del  
bacteriófago mEp021”**

Tesis que presenta

**IBQ. Elissa Paulina Ballinas Turrén**

Para obtener el Grado de

**Maestra en Ciencias**

En la Especialidad de

**Genética y Biología Molecular**

**Director de Tesis**

Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe

Ciudad de México

Agosto 2016

## **ASESORES**

Dra. Rosa Ma. Del Refugio Bermúdez Cruz

Departamento de Genética y Biología Molecular

Dr. Gabriel Guarneros Peña

Departamento de Genética y Biología Molecular

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio 5 del Departamento de Genética y Biología Molecular a cargo del Dr. Luis Y. Kameyama Kawabe, en el Centro de Investigación y de Estudio Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Zacatenco.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante el periodo de Marzo 2014 a Febrero 2016 (No. becario 535549).

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Kameyama por sus consejos y por brindarme su apoyo durante la maestría.

A mis asesores, la Dra. Bermúdez y el Dr. Guarneros

A mis compañeros de laboratorio, a Rox y Lupis por esos días tan singulares que pasamos en el laboratorio, por su amistad y su apoyo mutuo. Igualmente a Gerson y a la Dra. Eva Martínez por su apoyo en los experimentos.

A Yessika (Cheesy) por brindarme su amistad y sus anécdotas divertidas, incluyendo nuestras sesiones de karaoke.

A todos los miembros del laboratorio 3 y 8, especialmente a mis compañeros de generación Irais y Rick.

A la secretaria de Coordinación, Gabriela Mora por su paciencia, amabilidad y el gran apoyo hacia los alumnos del departamento.

## DEDICATORIAS

*A Dios por estar siempre conmigo y sobre todo por brindarme sabiduría y paciencia en los momentos necesarios.*

*A mis padres, Julio Ballinas Díaz y Ma. Elida Turrén Zavala por su educación y forjarme un carácter. Por su gran amor y su inalcanzable perseverancia para ser las personas que son hoy. Los quiero demasiado. Gracias*

*A mi hermana, Julissa por su confianza, por ser auténtica y mantenerse firme. Te quiero mucho hermanita.*

*A mi abuelita Trini, principalmente por su gran sabiduría, sencillez y el gran amor incondicional.*

*A mis amigas de toda la vida, Sandra y Pao por estar siempre en los momentos más importantes, a Brisita por estar siempre allí, dándome consejos y por su gran valentía ante los obstáculos que se han presentado. Gracias por ser grandes seres humanos, las quiero mucho.*

# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	II
ÍNDICE DE APÉNDICES	II
ÍNDICE DE ANEXOS	II
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	III
RESUMEN	V
ABSTRACT	VI
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Sistemas de Antiterminación	2
1.2 Antiterminadores pasivos	3
1.2.1 Antiterminación por proteína de unión a RNA	3
1.2.2 Antiterminación mediada por tRNA a través de un mecanismo T box	5
1.2.3 Antiterminación por la posición del ribosoma	6
1.2.4 Antiterminación por traducción	7
1.3 Antiterminadores procesivos	8
1.3.1 Antiterminación en operones de rRNA	8
1.3.2 Antiterminación por la proteína N en el fago $\lambda$	10
1.3.3 Antiterminación por la proteína Q en el fago $\lambda$	12
II. ANTECEDENTES	13
III. JUSTIFICACIÓN	17
IV. HIPÓTESIS	18
V. OBJETIVOS	19
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	20
6.1 Cepas, fagos, plásmidos y medios	20
6.2 Propagación del fago mEp021 en un tapiz bacteriano de W3110	21
6.3 Obtención de lisado del fago mEp021	21
6.4 Titulación del fago mEp021	21
6.5 Extracción de DNA del fago mEp021 mediante DEAE-celulosa	22
6.6 Caracterización del fago mEp021 mediante restricción enzimática	22
6.7 Análisis <i>in silico</i> del putativo gen antiterminador e46	23
6.8 Amplificación del gen putativo antiterminador e46	23
6.9 Clonación del gen e46 en el vector de transición pJET/blunt1.2	24
6.10 Clonación del gen e46 en el vector pKQV4	25
6.11 Transformación de células quimiocompetentes DH5 $\alpha$ por choque térmico	26
6.12 Extracción del DNA plasmídico	27
6.13 Secuenciación de DNA	28
6.14 Curva de crecimiento de W3110 en presencia de pE46	29
6.15 Expresión de la proteína E46 en geles de acrilamida Tris-glicina al 12.5%	29

6.16	Crecimiento del fago mEp021 en mutantes <i>nus</i> en presencia de pE46	30
VII.	RESULTADOS	31
7.1	Análisis <i>in silico</i> del gen putativo antiterminador e46	31
7.2	Caracterización del fago mEp021	34
7.3	Clonación del gen putativo antiterminador e46	34
7.4	Inducción de pE46 y su efecto sobre la viabilidad celular	39
7.5	Expresión del gen e46 en geles de acrilamida	39
7.6	Evaluación del efecto de pE46 en las mutantes <i>nus</i>	40
VIII.	DISCUSIÓN	44
IX.	CONCLUSIONES	51
X.	PERSPECTIVAS	52
XI.	BIBLIOGRAFÍA	53
XII.	APÉNDICES	59
XIII.	ANEXOS	64

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema general del proceso de antiterminación efectuada por el fago $\lambda$	1
<b>Figura 2.</b> Antiterminación por proteína de unión a RNA	4
<b>Figura 3.</b> Antiterminación mediada por el sistema T-Box	6
<b>Figura 4.</b> Mecanismo de antiterminación controlado por el ribosoma	7
<b>Figura 5.</b> Antiterminación mediada por traducción	8
<b>Figura 6.</b> Antiterminación en el operón <i>rri</i>	10
<b>Figura 7.</b> Antiterminación del fago $\lambda$ efectuada por la proteína N	11
<b>Figura 8.</b> Antiterminación efectuada por $\lambda$ Q	12
<b>Figura 9.</b> Antiterminación del fago P23-45 regulada por Gp39	14
<b>Figura 10.</b> Interacción de <i>Psu</i> con el factor rho, modula la antiterminación del fago P4	15
<b>Figura 11.</b> p7 regula la antiterminación del fago Xp10 mediante la interacción con la subunidad $\omega$ de la RNA polimerasa	15
<b>Figura 12.</b> Mapa del genoma del fago mEp021	23
<b>Figura 13.</b> Análisis <i>in silico</i> del putativo antiterminador E46	32
<b>Figura 14.</b> Dominio conservado analizado por Interpro	33
<b>Figura 15.</b> Identidad del fago mEp021	34
<b>Figura 16.</b> Clonación del gen e46 en el vector pJET1.2/blunt	35
<b>Figura 17.</b> Secuencia de e46 en el vector pJET1.2/blunt	36
<b>Figura 18.</b> Clonación del gen e46 en el vector pKQV4	37
<b>Figura 19.</b> Secuencia de e46 en el vector de expresión pKQV4	38
<b>Figura 20.</b> Viabilidad celular de la cepa W3110 en presencia del pE46	39
<b>Figura 21.</b> Expresión de pE46 en geles de acrilamida Tris-glicina al 12.5 %	40
<b>Figura 22.</b> Crecimiento del fago mEp021 en la mutante nusB5/pE46	41
<b>Figura 23.</b> Crecimiento del fago mEp021 en la mutante nusE71/pE46	42
<b>Figura 24.</b> Título de fagos (ufp/ml) en presencia de pE46	43
<b>Figura 25.</b> Sustitución de la función de $\lambda$ Q por E46 en las mutantes nusB y nusE	47
<b>Figura 26.</b> Posible sitio <i>qut</i> del fago mEp021	47
<b>Figura 27.</b> Modelo hipotético de antiterminación del fago mEp021	49
<b>Figura 28.</b> Montaje del gel separador y concentrador	62

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Antiterminadores pasivos y procesivos en bacterias y fagos	2
<b>Tabla 2.</b> Lista de cepas, bacteriófagos y plásmidos empleados	20
<b>Tabla 3.</b> BLAST a nivel de nucleótidos	31
<b>Tabla 4.</b> BLAST a nivel de aminoácidos	31

## ÍNDICE DE APÉNDICES

<b>Apéndice 1.</b> Soluciones para bacterias y fagos	59
<b>Apéndice 2.</b> Soluciones para extracción de plásmido con miniPREP	60
<b>Apéndice 3.</b> Preparación de DEAE-Celulosa	60
<b>Apéndice 4.</b> Preparación de células quimiocompetentes con 0.1 M CaCl <sub>2</sub>	61
<b>Apéndice 5.</b> Preparación de Geles de Tris-glicina al 12.5%	61

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Electroferogramas de la construcción de pJET1.2/blunt_e46	64
<b>Anexo 2.</b> Electroferograma de la construcción de pKQV4_e46	68

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>ATR-C</b>	Región C-terminal de antiterminación
<b>ATR-N</b>	Región N-terminal de antiterminación
<b>BLAST</b>	Herramienta básica de búsqueda de alineamientos locales
<b>Csp</b>	Proteínas de choque frío
<b>DEAE-celulosa</b>	Dietilaminoetil-celulosa
<b>DIR</b>	Región de interacción con el DNA
<b>dNTPs</b>	Desoxinucleótidos trifosfatados
<b>dsRNA</b>	RNA de doble cadena
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>FIR</b>	Región de interacción con la subunidad $\beta$ de la RNAP
<b>hut</b>	utilización de histidina
<b>HutP</b>	Proteína de utilización de histidina
<b>IPTG</b>	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>lac</b>	lactosa
<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>mRNA</b>	RNA mensajero
<b>nut</b>	utilización de N
<b>nutR</b>	sitio nut correspondiente al operón derecho
<b>O/N</b>	Toda la noche “Overnight”
<b>ORF</b>	Marco de Lectura Abierta
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PRD-I</b>	Dominio de regulación del PTS
<b>PTS</b>	Sistema de fosfotransferasa
<b>put</b>	utilización de la polimerasa
<b>QBE</b>	Elemento de unión de Q
<b>qut</b>	utilización de Q
<b>RAT</b>	Antiterminador de RNA
<b>RNAP</b>	RNA polimerasa
<b>rrn</b>	RNA ribosomal
<b>rut</b>	utilización de rho
<b>SD</b>	Shine-Dalgarno
<b>SIR</b>	Región de interacción con el factor sigma $\sigma_{70}$
<b>TEC</b>	Complejo de Elongación de la Transcripción
<b>TEMED</b>	Tetrametiletilenediamina
<b>TMG</b>	Tris- MgSO <sub>4</sub> -gelatina
<b>Trp</b>	Triptofano
<b>UFP</b>	Unidades formadoras de placa
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>ZF</b>	Dedos de zinc

$\alpha$	alfa
$\beta$	beta
$\lambda$	lambda
$\lambda N$	Antiterminador N del fago lambda
$\lambda Q$	Antiterminador Q del fago lambda
$\sigma$	sigma
$\phi$	phi
$\omega$	omega

## RESUMEN

El colifago mEp021 fue aislado de heces humanas y pertenece a un nuevo grupo de fagos no relacionados con el grupo de fagos lamboide. No es inducido por la luz UV y crece principalmente en 37°C. Sin embargo, ambos grupos requieren de factores Nus de la célula huésped para desarrollarse. Se ha reportado que el fago lambda utiliza estos factores para llevar a cabo el proceso de antiterminación, que consiste en suprimir el efecto de terminadores transcripcionales. Por lo tanto, se sugiere que el fago mEp021 utiliza un mecanismo de antiterminación. Se realizó un análisis *in silico* del genoma mEp021, el cual presenta un antiterminator putativo, nombrado E46, que tiene un dominio rico en cisteínas y está conservado como en el antiterminador Q de  $\lambda$ . Ambas proteínas comparten una estructura 3D similar, por lo que es probable que E46 pueda tener una función equivalente. Para analizar su función, en primer lugar el gen *e46* se clonó en el vector de expresión pKQV4, inducible por IPTG. A continuación, se evaluó su efecto en el crecimiento de la bacteria W3110, presentando una baja toxicidad en su viabilidad. La expresión de E46 (26,4 kDa) se confirmó mediante un gel SDS-PAGE. La construcción pE46 también se probó en diferentes mutantes *nus*, con la finalidad de restaurar su defecto en el desarrollo. Sin embargo, no se observó ningún efecto del desarrollo de mEp021 por E46 en las mutantes, concluyendo que los factores Nus podrían estar actuando de diferente forma al complejo  $\lambda$ N, pero no directamente con E46. Por otro lado, pE46 mostró un efecto positivo en el desarrollo de lambda, incrementando el título de partículas virales, solamente en *nusE71* y *nusB5*. Se sugiere que E46 podría estar actuando como el antiterminador Q, reconociendo el sitio *qut* en el genoma de  $\lambda$ .

**Palabras claves:** fago mEp021, factores nus, antiterminación, antiterminador Q

## ABSTRACT

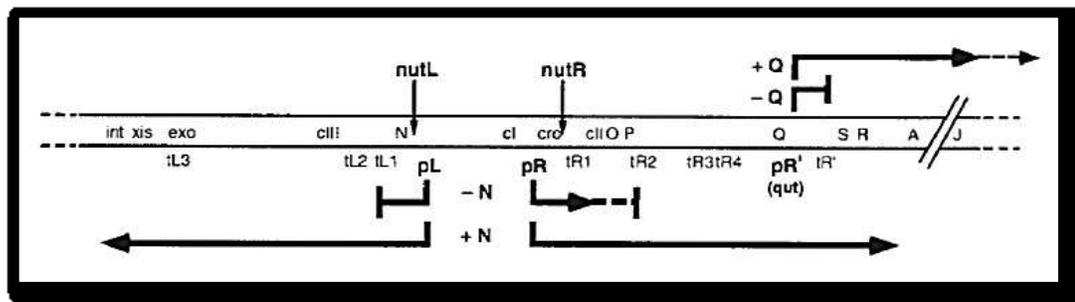
mEp021 coliphage was isolated from human feces and it belongs to a new group of phages non-related to lambdoid phage group. It cannot be induced by UV light and grows mainly at 37°C. However, both groups require of Nus factors from the host cell to develop. It has been reported, that lambda phage employs these host factors to achieve the antitermination process, which consists in suppressing the effect of transcription terminators. Hence, it is suggested that mEp021 phage has an antitermination mechanism. *In silico* analysis of mEp021 genome shows a putative antiterminator, called E46, which has a conserved cysteine-rich domain similar to lambda Q antiterminator. Both share a similar 3D structure, so it is likely that E46 may have an equivalent function. To analyze its function, firstly the e46 gene was cloned in the expression vector pKQV4, inducible by IPTG. Then, we measured its effect in the bacteria growth of W3110, showing a low toxicity in its viability. In addition, expression of E46 (26.4 kDa) was confirmed by a SDS-PAGE. This construction has also been tested in different mutant Nus, looking for restoring of the antitermination defect. However, we did not observed any effect of pE46 in all the mutants, concluding that Nus factors could be acting in another way different to  $\lambda$ N complex, but not directly with E46. On the other hand, pE46 shows an effect in lambda development, increasing the viral particles only in nusE71 and nusB5 mutant. It suggested that E46 could act as Q antiterminator, recognizing the qut site in  $\lambda$  genome.

**Key words:** mEp021 coliphage, nus factors, antitermination, Q antiterminator

## I. INTRODUCCIÓN

En el ambiente natural, los bacteriófagos son las entidades más abundantes, superando a las bacterias coexistentes [1,2]. Estos virus bacterianos poseen un material genético en forma de DNA o RNA, que son encapsulados por una cubierta proteica. Los fagos han adquirido diversas estrategias para explotar a sus células hospederas, con el fin de reproducirse [3]. Por una parte, se encuentran los fagos temperados y filamentosos que son capaces de formar asociaciones de larga duración con las células bacterianas mediante lisogenia y pseudolisogenia, mientras que los fagos con vida lítica son asesinos obligados de su huésped, requiriendo lisis para infectar a la siguiente célula [4,5].

Para ejecutar las diferentes funciones implicadas en su desarrollo y supervivencia, se requiere de un programa de regulación de la expresión génica, mediado principalmente por la transcripción. Este proceso se ve afectado por señales específicas del organismo, como la formación de terminadores. Se puede evitar mediante un mecanismo conocido como antiterminación, el cual suprime el efecto de estos terminadores y de factores que intervienen en la terminación de la transcripción, orientando a la RNA polimerasa a expresar los genes que se encuentran río abajo. Este proceso fue descubierto en el colifago lambda (Fig. 1) [7].



**Fig.1 Esquema general del proceso de antiterminación efectuada por el fago  $\lambda$  [7].** En ausencia del antiterminador N, el 50% de los transcritos generados por el promotor pR, expresan los genes tempranos tardíos (cII, O, P). En presencia de N, éste actúa en los sitios nut, suprimiendo el efecto de los terminadores que se encuentran consecutivos y distales en ambos operones (pL y pR), se requiere de la participación de los factores nus para fortalecer este mecanismo. Se expresa un segundo antiterminador Q, el cual reconoce un sitio qut en el promotor pR' y permite la transcripción de los genes tardíos (S, R, A, J) involucrados en la estructura del fago y en la lisis celular.

A continuación, se presentan algunos ejemplos de antiterminación en fagos y bacterias.

### 1.1 Sistemas de antiterminación

Los antiterminadores se clasifican en dos grandes grupos: pasivos y procesivos (Tabla 1). En los primeros, la señal de terminación se compromete sin alterar a la RNA polimerasa. Aquellos que son procesivos, inducen a la RNA polimerasa a suprimir terminadores consecutivos [6].

**Tabla 1.** Antiterminadores pasivos y procesivos en bacterias y fagos [6].

Antiterminador	Secuencias de DNA o RNA requeridas	Sitios de acción	Cofactores y mecanismos
<b>Antiterminadores procesivos codificados por bacteria</b>			
<b>RfaH</b>	Secuencia ops	Operones horizontalmente adquiridos	Ningún cofactor
<b>S4</b>	nut y boxA	Operones rrn	NusA, nusB, S10 y NusG
<b>Antiterminadores procesivos codificados por fagos</b>			
<b>Proteína <math>\Delta n</math></b>	Nut	$\lambda_{t_L}$ y $t_R$	Puede funcionar solo; NusA, NusB, S10 y NusG promueven procesividad
<b>Proteína <math>\lambda Q</math></b>	Qut	$\lambda_{t_R}$	Puede funcionar solo; NusA puede estimular la actividad
<b>Secuencias put (RNA) del fago HK022</b>	Ninguna	$t_L$ y $t_R$ del fago HK022	Ningún cofactor
<b>P7 del fago Xp10</b>	Ninguna	Operones Xp10	Unión directa a la RNAP ( <i>Xanthomonas oryzae</i> )
<b>Antiterminadores pasivos codificados por bacteria</b>			
<b>YaeO</b>	Ninguna	Se une directamente a Rho, bloqueando las interacciones Rho-RNA	Ningún cofactor
<b>HutP</b>	Secuencias de RNA intergénicas (río debajo de hutP)	Operón hut ( <i>Bacillus subtilis</i> )	La unión de His es necesario para la unión de RNA
<b>GlcT</b>	Secuencia líder de pstG	pstG	Sólo GlcT no fosforilado puede unirse al RNA líder

<b>LicT</b>	Elemento RAT en el líder licS	Secuencia de terminación río arriba de licS	La unión del $\beta$ -glucano es necesario para permitir la unión de RNA
<b>BglG</b>	Secuencia líder del operón bgl	Operón bgl	Fosforilación mediada por BglF dicta la dimerización y la unión de RNA
<b>Riboswitches y sistema T-box</b>	RNA líder	Diversos	Moléculas pequeñas, cationes, proteínas, metabolitos y tRNAs.
<b>Atenuación por posición del ribosoma</b>	RNA líder	Operones de biosíntesis de aminoácidos	El ribosoma detenido bloquea la formación del terminador
<b>Inhibición de Rho por posición del ribosoma</b>	RNA líder	Operones de biosíntesis de aminoácidos	El ribosoma ocluye la secuencia rut o dificulta las interacciones Rho-NusG
<b>Proteínas Csp</b>	Hairpins (RNA)	Actividades celulares globales	Interacciones directas entre Csp-RNA desestabilizan las estructuras de RNA
<b>Antiterminadores pasivos codificados por fagos</b>			
<b>Psu</b>	Ninguna	Se une directamente a Rho y reduce la hidrólisis de ATP y la translocación	Ningún cofactor

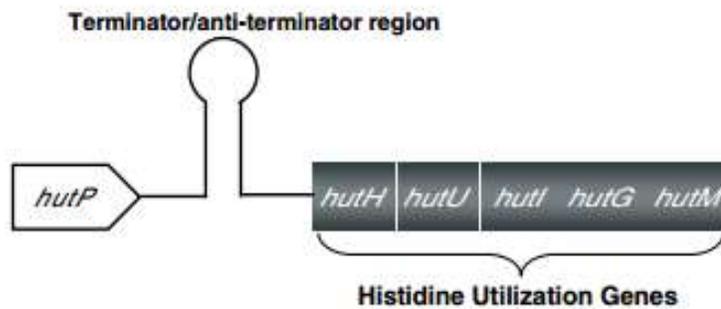
## 1.2 Antiterminadores pasivos

### 1.2.1 Antiterminación por proteína de unión a RNA

Existen varias proteínas que se unen al RNA y evitan la formación de “hairpins”. Entre estas proteínas antiterminadoras se encuentra HutP, que regula el operón hut en *Bacillus subtilis* en respuesta al aminoácido histidina y a iones divalentes como el  $Mg^{2+}$ . HutP existe en forma de hexámero, el cual se une a la región de terminación que se encuentra entre el gen *hutP* y los genes *hut* que codifican enzimas que degradan la histidina, estabilizando la estructura del antiterminador, y en consecuencia permitiendo la expresión de los genes *hut* [8,9]. Esta bacteria, también emplea este mecanismo de

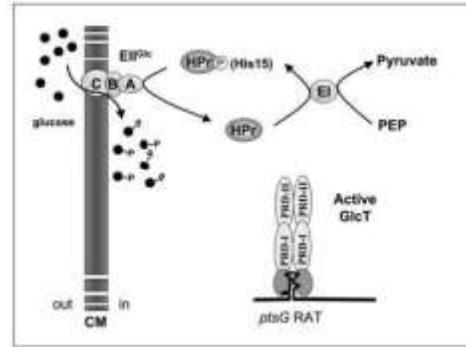
antiterminación para mediar la expresión de los genes necesarios para el transporte de glucosa. Esto se lleva a cabo a partir del sistema fosfotransferasa (PTS) cuyos genes son codificados en el operón ptsGHI. El sistema está constituido por la enzima I (EI) y HPr (fosfoportador), y varias permeasas como la Enzima II (EII) cuyos dominios están fusionados en un solo polipéptido (EIICBA). En la ausencia de glucosa, EIIGlc fosforilada se acumula en la célula. En este caso, el fosfato es transferido al dominio PRD-I (Dominio de regulación del PTS) de GlcT, inactivando a este antiterminador, y por lo tanto no hay transcripción (Fig. 2.B.2). En presencia de glucosa, el grupo fosforil es transferido del HPr(His<sub>15</sub>-P) a la glucosa que ingresa por EIIGlc. Bajo estas condiciones GlcT no es fosforilado y se une a RAT (UUACUGAUUCGAUCAGGCAUGAGUGA), un sitio antiterminador de RNA, estabilizando ésta estructura y permitiendo la transcripción del operón ptsGHI [10].

A)

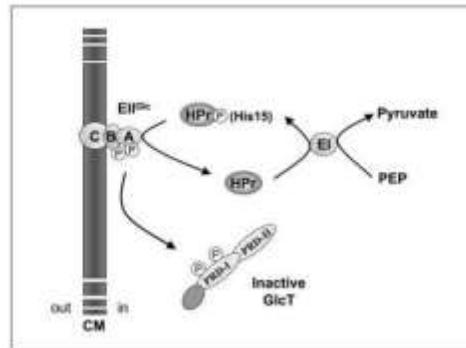


B)

1.



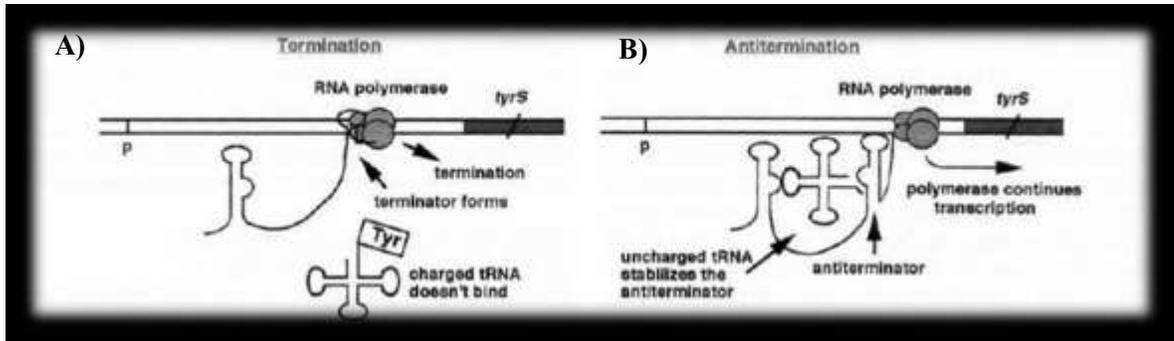
2.



**Fig. 2. Antiterminación por proteína de unión a RNA.** A) Región de antiterminación donde actúa HutP en el operón hut de *Bacillus subtilis* [8]. B) Regulación de la proteína de antiterminación GlcT [10]. **B.1.** En presencia de glucosa, HPr fosforila la glucosa entrante y activa el antiterminador GlcT que se une al sitio de RNA <RAT>, transcribiéndose los genes ptsGHI. **B.2.** En ausencia de glucosa, el dominio PRD de GlcT se fosforila, inactivando su función.

### 1.2.2 Antiterminación mediada por tRNA a través de un mecanismo T box

Los genes que participan en el metabolismo de aminoácidos en ciertas bacterias Gram positivas poseen regiones “líder” en sus transcritos. Estas regiones monitorean la tasa de carga del tRNA correspondiente. Cuando los tRNAs se encuentran vacíos, interactúan con el RNA líder, estabilizando a su vez a la estructura de antiterminador y permitiendo que la RNA polimerasa exprese los genes que están río abajo (Fig. 3b) [11]. Este mecanismo se conoce como T-box y es ampliamente usado para la regulación de los genes que codifican para la aminoacil tRNA sintetasa, biosíntesis de aminoácidos y genes transportadores (Fig. 3).

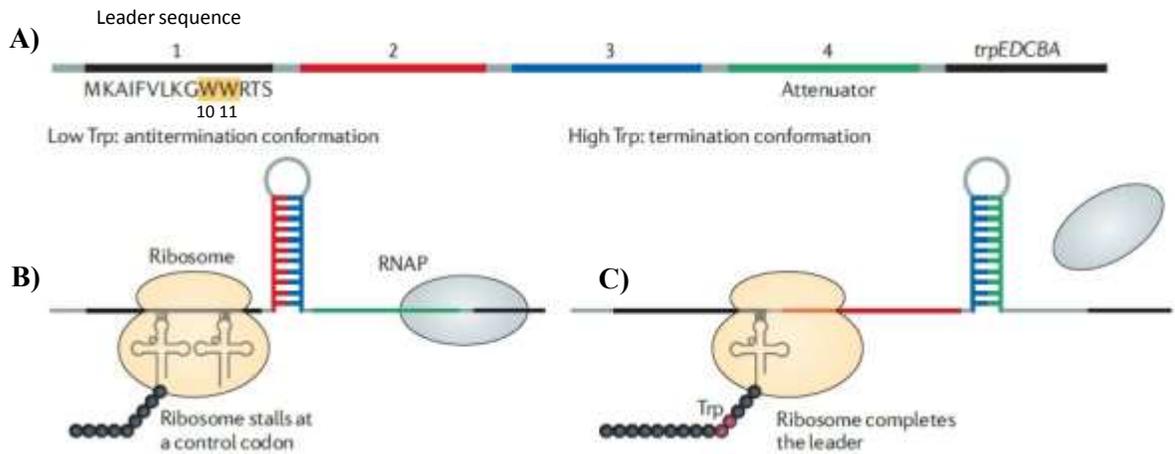


**Fig.3. Antiterminación mediada por el sistema T-box [12]. A)** Cuando el tRNA está ocupado por un aminoácido (Tyr), no se une al RNA generándose un terminador y con ello no permite la expresión de los genes necesarios para la biosíntesis de aminoácidos (Tyr). **B)** Si el tRNA se encuentra vacío, estabiliza la estructura de antiterminación y la RNA polimerasa es capaz de continuar con la transcripción de los genes río abajo.

### 1.2.3 Antiterminación por la posición del ribosoma

El ribosoma juega un papel en el monitoreo del nivel de tRNAs cargados en respuesta a la disponibilidad de los aminoácidos afines. En la Fig. 4, se ilustra el operón *trp* de *E. coli*, que posee un péptido líder pequeño constituido por catorce aminoácidos, presenta también regiones que darán lugar a una estructura de antiterminación o terminación, además de los genes necesarios para la biosíntesis del triptófano. Cuando los niveles del aminoácido Trp y los tRNA<sup>trp</sup> cargados son altos, el ribosoma completa la síntesis del péptido líder, la estructura del terminador se forma y la RNA polimerasa es liberada [6].

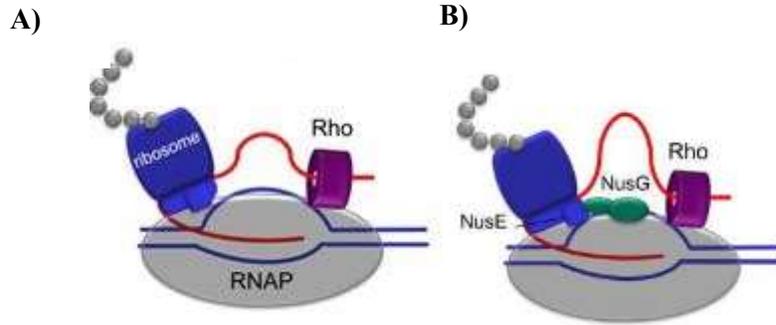
A bajos niveles de tRNA<sup>trp</sup>, el ribosoma que traduce el TrpL (péptido líder) se detiene en uno de los codones localizados en la posición 10 u 11 de esta región, permitiendo que la secuencia adyacente se pliegue inmediatamente, formando una estructura de antiterminador y bloqueando la formación del terminador [12].



**Fig. 4. Mecanismo de antiterminación controlado por el ribosoma [6].** A) Operón del triptófano de *E. coli*. B) Cuando los niveles del aminoácido Trp son bajos, el ribosoma se detiene en el péptido líder y permite la formación de una estructura de antiterminación (regiones 2 y 3), favoreciendo a la RNA polimerasa a continuar con la transcripción. C) Si los niveles de Trp son altos, se favorece la formación de una estructura de terminación (regiones 3 y 4), el ribosoma termina de traducir el péptido líder y la RNA polimerasa se libera.

#### 1.2.4 Antiterminación por traducción

Tanto el proceso de transcripción y traducción están acoplados en las bacterias, permitiendo una coordinación en su desplazamiento a través del ribosoma. En el modelo I, los ribosomas ocluyen el transcrito naciente, bloqueando la unión del factor Rho al elemento rut (Fig. 5A). Por otra parte, se esquematiza al ribosoma compitiendo con Rho para unirse con NusG. Las interacciones entre Rho y NusG, juegan un papel clave en la terminación, esto no se establece si NusG forma un complejo con la proteína S10, también conocida como NusE, permitiendo unir el ribosoma al complejo de elongación, e impidiendo que Rho se una al mRNA (Fig. 5B) [13]. Es decir, el ribosoma funciona como un antiterminador, induciendo a la RNA polimerasa a inhibir la pausa y el arresto transcripcional [14].



**Fig. 5 Antiterminación mediada por traducción [13]. A) Modelo I:** El ribosoma ocluye al transcrito, impidiendo a Rho unirse a rut. **B) Modelo II:** NusG y NusE forman un complejo, promoviendo la unión del ribosoma al transcrito, evitando el establecimiento de la terminación por Rho.

### 1.3 Antiterminadores procesivos

#### 1.3.1 Antiterminación en operones de rRNA

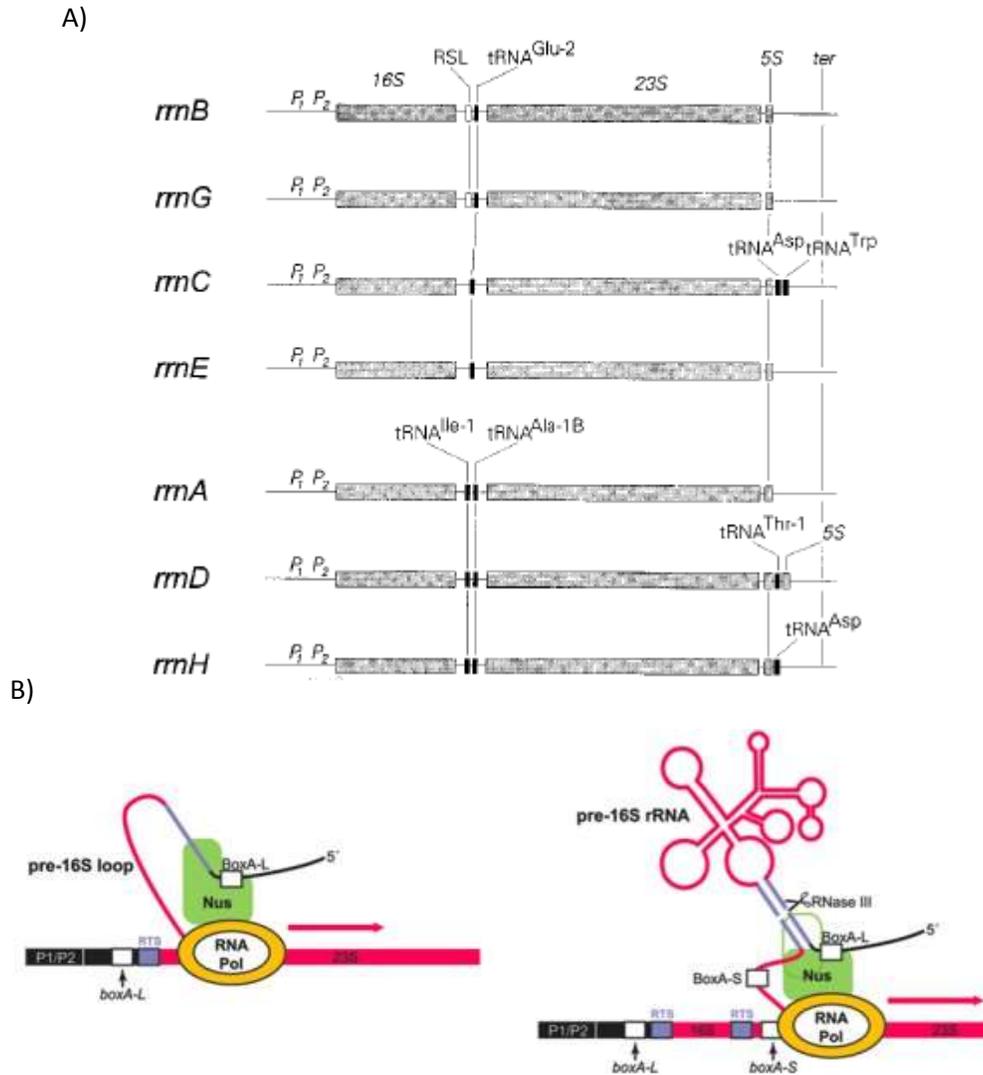
El rRNA de *E. coli* es sintetizado a partir de siete operones (rrnA-E y rrnG-H) distribuidos de forma no contigua [15]. Su multiplicidad se debe probablemente a que permite a la *E. coli* iniciar la síntesis de ribosomas rápidamente al encontrarse en condiciones más favorables [16].

Por cada operón rrn, se generan tres especies de rRNA: 16S RNA, 23S RNA, 5S RNA. Los genes tRNA se pueden encontrar en la región espaciadora entre los RNAs 16S y 23S y al final de algunos operones *rrn*. En el caso de rrnB y rrnG contienen una secuencia que forma una estructura secundaria llamado “bucle espaciador ribosomal”, RSL (Fig. 6A).

Se han encontrado secuencias homólogas al sitio *nut* de lambda en los operones rrn y se ha demostrado que promueven antiterminación en la transcripción de rRNA *in vivo*. Estas secuencias se presentan 10 pb río abajo de los promotores P2 (región líder) y una segunda estructura “nut-like”, se forma en la región espaciadora entre 16S y 23S. La región líder y espaciadora se caracteriza por dos subdominios, boxB y boxA. La secuencia boxA se encuentra conservada, TGCTCTTTAACA, mientras que boxB no. Ensayos de eliminación de secuencias parecida a nut demostraron que la región boxA y quizás otra región “boxC” eran requeridas para efectuar la antiterminación rrn *in vivo*.

También, se sugirió que este sistema comparte con lambda los cuatro factores nus y se consideró que la unión de NusB y nusE a la región boxA es el evento central para el ensamble del complejo de antiterminación. Posteriormente, se reclutan nusA, nusG y proteínas ribosomales como S4 para reducir la terminación de los transcritos dependientes de Rho [17].

Junto con los factores Nus, la RNasa III específica de dsRNA, contribuye a la biogénesis de la subunidad ribosomal pequeña. La RNasa III produce el corte inicial del rRNA en las regiones líder y espaciadores, mientras la RNAP transcribe los genes 16S y 23S, los cuales son posteriormente procesados por otras ribonucleasas para generar los rRNAs maduros. En la Fig. 6B se tiene la formación del complejo Nus-RNA, el cual genera un bucle creciente del rRNA pre-16S. La RNAP transcribe más allá de la región boxA-S y nusA es desplazado (línea verde) de su sitio de unión debido al alineamiento del dsRNA, el cual es sustrato de la RNasa III. Después, el complejo Nus restante es liberado para unirse a la región espaciadora que incluye boxA-S, generando otro bucle necesario para la transcripción del 23S ribosomal [18]. También, se han identificado genes “heat shock” asociados a traducción, entre los cuales se encuentra *ybeY*. En *E. coli*, esta proteína es requerida para una eficiente traducción a todas las temperaturas, esencialmente a altas temperaturas. Se ha demostrado que YbeY está implicada en la antiterminación de rRNA, idealmente cuando la temperatura se aumenta, ya que se dificulta el plegamiento y maduración del rRNA [19].



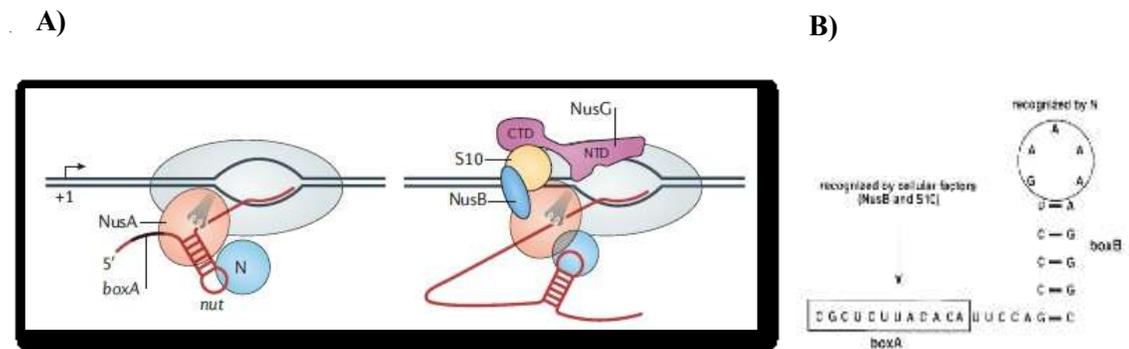
**Fig. 6. Antiterminación en el operón *rrn*.** A) Operones *rrn* de *E. coli* generan tres especies de rRNA (16S RNA-23S RNA-5S RNA) [15]. B) Los factores Nus y la RNasa III contribuyen a la síntesis de los rRNA. La región *boxA* es esencial para la antiterminación [18].

### 1.3.2 Antiterminación por la proteína N en el fago $\lambda$

El bacteriófago  $\lambda$  codifica para dos proteínas antiterminadoras, N y Q. La proteína N suprime los terminadores intrínsecos y los dependientes de Rho, permitiendo que se expresen los genes indispensables para generar progenie [20].

Sin embargo, para que esto se lleve a cabo, N requiere de factores Nus del huésped para estabilizar el complejo elongación de la transcripción y realizar su función de antiterminación. Se ha demostrado *in vitro*, que NusA y N pueden efectuar esta

actividad por sí solos, cuando la señal de terminación se encuentra cercana al sitio nut (Fig. 7B). Este sitio (boxA y boxB) se genera en el transcrito y es reconocido por el heterodímero NusB-NusE(S10) y la proteína N respectivamente. Dicho sitio nut está localizado río abajo de los promotores pL y pR que corresponden al operón izquierdo y derecho, respectivamente. N reconoce específicamente a la región boxB mediante sus motivos de arginina. La interacción entre N y NusA en el sitio nut, induce a una remodelación de NusA, evitando que este factor no se encuentre disponible para interactuar con Rho, ya que su interacción con la subunidad  $\beta$ -flap parece ser instrumental para que Rho ingrese al interior del complejo de elongación [21]. Sin embargo, *in vivo*, la antiterminación es altamente procesiva, y N impide la terminación en sitios localizados más allá de los sitios nutL o nutR [20]. Entorno a esto, se ha demostrado que junto a N, NusA, NusB-NusE y NusG permiten una transcripción sustentiva a través de múltiples terminadores, y en la ausencia de factores del huésped, N exhibe una actividad basal (Fig. 7A) [20].

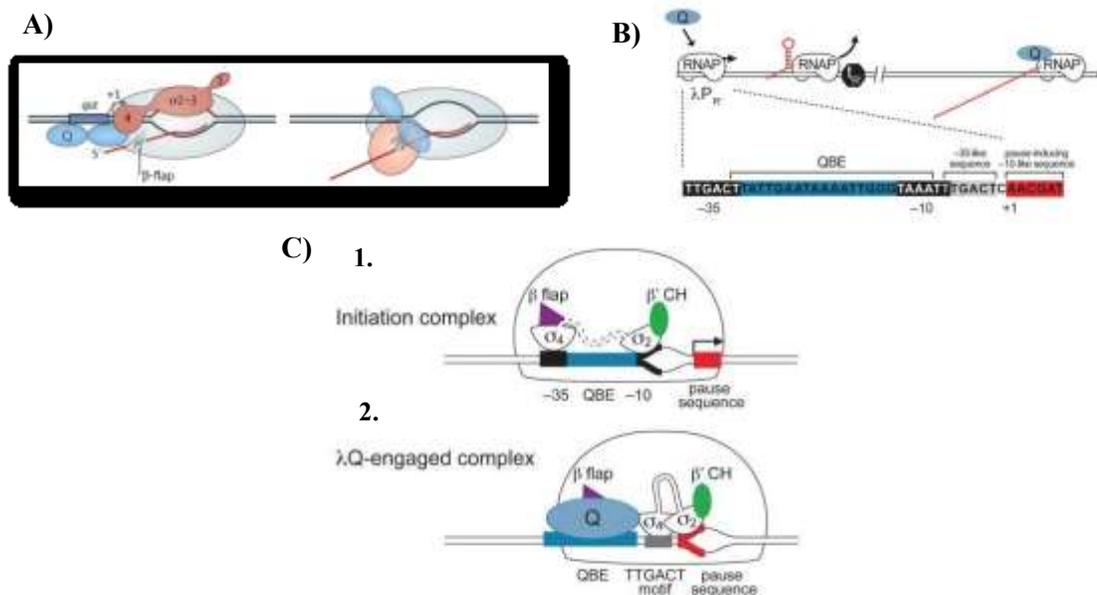


**Fig. 7. Antiterminación del fago  $\lambda$  efectuada por la proteína N.** A) Antiterminación procesiva efectuada por la proteína  $\lambda$ N y los factores Nus del huésped [6]. B) Sitio *nut* conformado por la región boxA, boxB y un espaciador [20].

### 1.3.3 Antiterminación por la proteína Q en el fago $\lambda$

El antiterminador  $\lambda N$  y los factores Nus facilitan la expresión de  $\lambda Q$ . La proteína Q activa la expresión de los genes tardíos, permitiendo a la RNA polimerasa suprimir el terminador tR' para prolongar la transcripción [22].

Esto lo realiza actuando sobre un sitio 'qut' que consiste de un elemento de unión a DNA, localizado entre las regiones del promotor -35 y -10 (Fig. 8B). Existe además, un segmento río abajo de +1, el cual contiene una secuencia semejante a -10 que facilita la captura de la RNA polimerasa al inicio de la elongación, generando un transcrito de aproximadamente 16 a 25 nucleótidos, dicho estado de pausa es favorecido por el factor  $\sigma^{70}$  (Fig. 8.C.1) [23]. Este factor establece competencia directa mediante una de sus regiones conservadas ( $\sigma 4$ ) con la proteína Q, la cual requiere además del sitio qut, mantener contacto con la subunidad  $\beta$  de la RNA polimerasa para efectuar su actividad antiterminadora [24]. Cuando Q se une a tal sitio, desplaza al factor  $\sigma^{70}$  lo que implica un desprendimiento de energía por la ruptura de los enlaces del  $\sigma^{70}$  de la secuencia promotora (Fig. 8.C.2) [25].



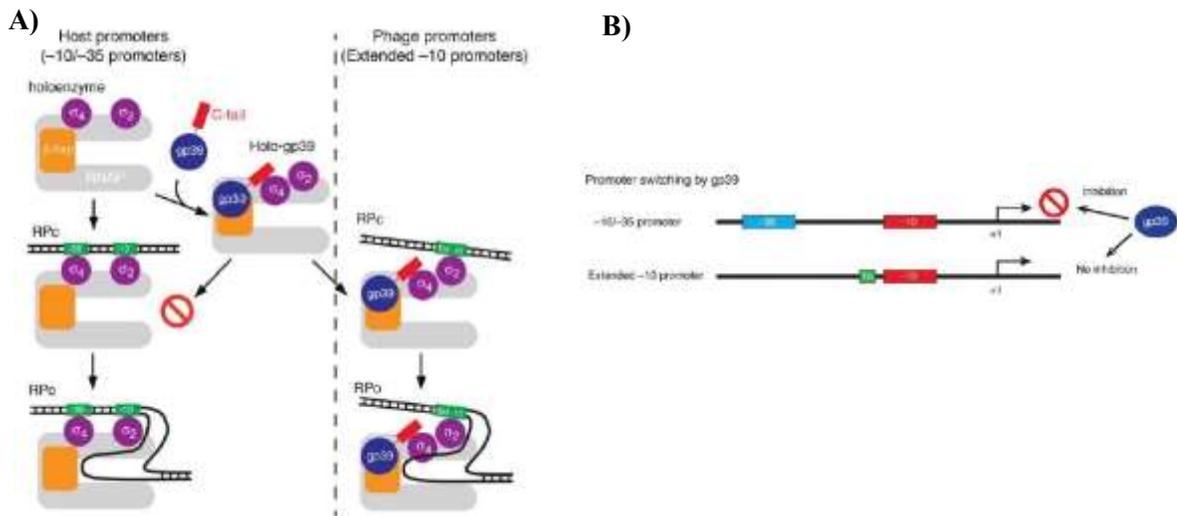
**Fig. 8. Antiterminación efectuada por  $\lambda Q$ .** A)  $\lambda Q$  (en azul) reconoce el sitio qut en el promotor pR' y permite la expresión de los genes tardíos (lisis y estructurales), NusA (en rojo) contribuye a esta actividad *in vitro* [6]. B) Secuencia qut localizada entre los elementos promotores -35 y -10 [43]. C) Modo de acción de Q [43]. C.1 Q se une al sitio qut/QBE cuando la RNA polimerasa se encuentra en un estado de pausa; es decir, cuando las regiones del factor  $\sigma_{70}$  mantienen contacto con los elementos promotores pR'. C.2. Q desplaza al factor  $\sigma_{70}$ , e interactúa con la subunidad  $\beta$  de la RNA polimerasa y el sitio qut/QBE.

## II. ANTECEDENTES

Los genomas de fagos comúnmente exhiben mosaicismo con la de otros fagos, debido al papel que juega en la transferencia vertical y horizontal de sus genes. Los bacteriófagos temperados son los principales vehículos para transferir la información genética entre bacterias, siendo esto determinante para desarrollarse en diferentes condiciones [26]. Existen fagos clasificados dentro del grupo lambdoide que llevan a cabo procesos de antiterminación en una tendencia *no canónica* a pesar que comparten una organización estructural y funcional. Es así que el fago HK022 contiene terminadores transcripcionales en su operón izquierdo, a pesar de que su primer gen no es análogo al gen N de  $\lambda$ . En su lugar, este fago posee el gen *nun*, cuyo producto previene la infección del fago  $\lambda$  en una lisógena HK022. La evidencia del mecanismo de antiterminación se encontró al insertar terminadores foráneos en tándem en el gen *nun*, y se observó que no disminuía la expresión de los genes distales al promotor pL. En contraste, la inactivación del promotor pL, disminuyó la expresión de esos genes, confirmando que *Nun* no es requerido para la expresión de genes del fago HK022 [27]. Posteriormente, se reportó que los sitios *put* (*polymerase-utilization*) son las regiones que determinan la antiterminación intrínseca del fago y que difieren de los sitios *nut*, *gut* y de la región *boxA* del operon ribosomal [28,29]. Por otro lado, no se tenía el conocimiento si HK022 requería de las funciones Nus del huésped. Se evaluó el crecimiento de HK022 en mutantes Nus de *E. coli*, y únicamente la mutación nusC60 en rpoB (rpoB60) que interfiere con la subunidad  $\beta$  de la RNA polimerasa, bloqueó la propagación del fago. El análisis de un fago híbrido HK022- $\lambda$  sugirió que una función de HK022 análoga a Q de  $\lambda$ , fue inhibida por rpoB60 [30].

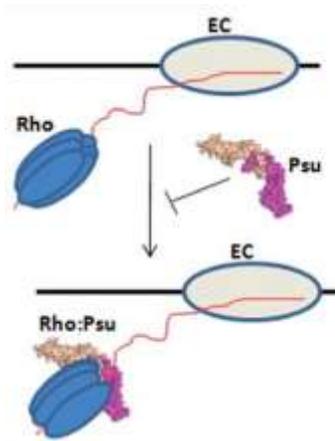
Existen otros mecanismos de antiterminación en fagos, que son muy específicos y que involucran otro tipo de productos génicos capaces de realizar esta función. Gp39, es una proteína pequeña (16 kDa) codificada por el fago P23-45 de *Thermus thermophilus*, que se une específicamente a la RNA polimerasa del huésped e inhibe el inicio de la transcripción en los promotores con consenso -10/-35 del huésped. Se demostró que Gp39 genera un “switch” actuando como un antiterminador a partir de

los promotores con el elemento -10 extendido y que carecen del elemento -35 (Fig. 9) [62]. Su actividad se basa en eliminar la pausa transcripcional en los trectos de poli-U y además potencializa la elongación, disminuyendo el “backtracking”. A diferencia de Q y N, Gp39 no depende de NusA u otros factores auxiliares para llevar a cabo su función. Se ha nombrado como el primer factor de transcripción codificado por fago que afecta cada paso involucrado en la transcripción y que evita la terminación por la actividad anti-pausa [31].



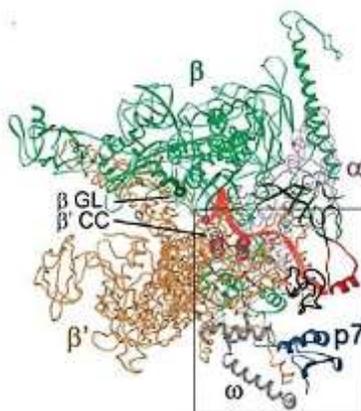
**Fig. 9 Antiterminación del fago P23-45 regulada por Gp39 [62]. A)** Switch entre los promotores del huésped y los promotores de fagos. La región C-terminal de Gp39 impide que el factor  $\sigma_{70}$  reconozca los promotores de la célula huésped y desplaza su interacción a los promotores de fagos. **B)** Promotores de la bacteria (-10/-35) y promotores de fago (-10 extendido).

*psu*, es un gen tardío del fago P4 que codifica para un componente de la cápside del bacteriófago. Resulta interesante saber que además de ser un gen estructural, su producto eficientemente inhibe la terminación dependiente de Rho *in vivo*. Se demostró una interacción específica y directa entre Rho y *Psu*, afectando la actividad ATPasa de Rho, y en consecuencia, reduciendo la tasa de liberación del RNA del complejo de elongación (Fig. 10) [32]. A diferencia del antiterminador N, *Psu* no depende de secuencias específicas del mRNA [33].



**Fig. 10 Interacción de Psi con el factor rho, modula la antiterminación del fago P4 [63].**

p7, es una proteína de antiterminación codificada por el fago lítico Xp10 que infecta a *Xanthomonas oryzae*. Al igual que Gp39 realiza un switch, inhibiendo el reconocimiento de los promotores del huésped y favoreciendo la transcripción de los genes tempranos del fago Xp10. Sin embargo, se sugiere que el mecanismo de antiterminación efectuada por p7 difiere de otros antiterminadores de fagos, debido a que su actividad depende de la interacción con la subunidad  $\omega$  de la RNA polimerasa, induciendo un efecto alostérico sobre el complejo de transcripción (Fig. 11). El factor nusA incrementa la afinidad de p7 por el complejo de elongación (TEC), previniendo el desprendimiento del transcrito, actuando en la  $\beta$ -flap de la RNA polimerasa como regularmente lo hace, por lo que no actúa directamente con p7 [60].



**Fig. 11 p7 regula la antiterminación del fago Xp10 mediante la interacción con la subunidad  $\omega$  de la RNA polimerasa [60].**

En este proyecto, se empleó el fago mEp021, clasificado como “no lambdoide”, aislado a partir de muestras fecales, perteneciente a un grupo de inmunidad específico, del cual forman parte alrededor de 48 fagos [34]. Crece exclusivamente a temperatura del tracto intestinal y no es inducido por luz UV, además de conferir un fenotipo hemolítico a la bacteria [35]. También, se ha caracterizado el gen represor implicado en el establecimiento y mantenimiento de la lisogenia a partir de un análisis *in silico* del genoma anotado por el M. en C. Adrián Cázares y mediante ensayos de mutagénesis química al azar y recombineering realizado por la M. en C. Leonor Lastra Vargas, en 2013 [36].

Además, existe la posibilidad de que el fago mEp021 tenga un mecanismo de antiterminación ya que la única característica que comparte con el fago lambda  $\lambda$ , es que requiere de factores Nus del huésped [34].

### **III. JUSTIFICACIÓN**

Debido a las diferentes propiedades que posee el fago mEp021 y que se encuentra comúnmente en la flora intestinal del ser humano, resulta interesante estudiar los mecanismos y factores implicados en su regulación, ya que son vitales para el ciclo replicativo del fago. Uno de ellos, es el posible proceso de antiterminación ya que requiere de factores Nus del huésped para crecer y por presentar además un gen putativo antiterminador.

#### **IV. HIPÓTESIS**

Dado que el fago mEp021 requiere de factores Nus y además presenta un gen putativo antiterminador, es posible que presente una función de antiterminación.

## V. OBJETIVOS

### Objetivo general

- ❖ Caracterizar el gen putativo (antiterminador) del fago mEp021.

### Objetivos específicos

- ❖ Analizar *in silico* el gen putativo antiterminador
- ❖ Clonar el gen putativo antiterminador en un vector de expresión.
- ❖ Analizar la expresión del gen y evaluar su efecto en mutantes *nus*.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Cepas, fagos, plásmidos y medios

Las características principales de las cepas de *Escherichia coli*, bacteriófagos y plásmidos, se enlistan en la Tabla 2. Los bacteriófagos mEp021 y  $\lambda$  fueron proporcionados por el Dr. Luis Kameyama del Depto. de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV, Unidad Zacatenco. Los plásmidos pJET 1.2/blunt y pKQV4 fueron proporcionados por la Dra. Eva Martínez Peñafiel de este Departamento. El medio de cultivo Luria-Bertani (LB) y TMG para la dilución de los fagos fueron preparados con base a lo descrito por Sambrook et al. (1989) y Silhavy et al. (1986) respectivamente (Apéndice 1).

**Tabla 2.** Lista de cepas, bacteriófagos y plásmidos empleados.

Cepas, bacteriófagos y plásmidos	Genotipo/ Marcador relevante	Fuente/Referencia bibliográfica
<b>Cepas</b>		
W3110	F <sup>-</sup> $\lambda$ rph <sup>-</sup>	[37], [38]
TAP159	W3110 nusB5	T. A. Patterson
TAP176	W3110 nusE71 zhb511::Tn10	T. A. Patterson
TAP180	W3110 nusA1	T. A. Patterson
TAP189	W3110 nusD026 o rho026	T. A. Patterson
K1881	W3110 nusC60	Friedman
DH5 $\alpha$	supE44 $\Delta$ (lacIZYA-argF)U169 deo R ( $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1	[39]
BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	<i>E. coli</i> B F <sup>-</sup> ompT hsdS(rB – mB –) dcm <sup>+</sup> Tetr gal $\lambda$ (DE3) endA Hte [argU ileY leuW Camr	Facultad de Química (UNAM)
<b>Bacteriófagos</b>		
mEp021	No lambdoide, <i>imm</i> <sub>1</sub>	Luis Kameyama
Lambda ( $\lambda$ )	<i>imm</i> <sub><math>\lambda</math></sub>	CSH Collection
<b>Plásmidos</b>		
pJET 1.2/blunt	Vector de transición, Amp <sup>r</sup>	ThermoFisher Scientific
pKQV4	Vector de expresión, bajo número de copias, Amp <sup>r</sup>	[40]
pJET 1.2_e46	Construcción de pJET 1.2 con e46	En este trabajo
pE46	Construcción de pKQV4 con e46	En este trabajo

## 6.2 Propagación del fago mEp021 en un tapiz bacteriano de W3110.

A partir de un stock de mEp021, se gotearon 10  $\mu$ l sobre una caja con medio T $\phi$ , la cual se inclinó con el fin de extender la gota. En un tubo, se colocaron 300  $\mu$ l de cultivo bacteriano W3110 (O/N) y 3ml de medio T $\phi$  suave (Apéndice 1.2) previamente derretido y temperado. Se mezcló mediante un breve toque en el vórtex y se vertió en la caja T $\phi$  que había sido goteado con el fago de tal forma que se distribuyera uniformemente en toda la caja. Se dejó secar y se incubó a 37°C toda la noche.

## 6.3 Obtención de lisado del fago mEp021

Para obtener un título de  $10^{10}$  UFP/ml, se extrajeron alrededor de 10 placas provenientes del fago mEp021 propagado en un tapiz bacteriano mediante una pipeta pasteur. Se depositaron en un matraz Erlenmeyer de 250 ml con 1ml de cultivo O/N, y se agregó 1ml de una solución MgCl<sub>2</sub> 0.4M/CaCl<sub>2</sub> 0.1M. Se dejó reposar por 10 min y se agregaron 50 ml de medio LB. El matraz se incubó a 37°C con una agitación constante de 220 rpm por 5 horas ó hasta que se observara lisis celular. Por último se agregaron 5ml de cloroformo al cultivo con la finalidad de lisar las células y liberar los fagos. Se agitó por 10 min a 220 rpm y se centrifugó en tubo falcon de 50 ml a 4000 x g por 10 min. El sobrenadante se transfirió a otro tubo falcon y se realizó la titulación del fago obtenido.

## 6.4 Titulación del fago mEp021

Se hizo una serie de diluciones de un lisado de mEp021 ( $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$ ) iniciando con el factor de dilución 1:100. A 990  $\mu$ l de buffer TMG (Apéndice 1.3) se agregaron 10  $\mu$ l de lisado y a partir de esta dilución se hicieron las siguientes. Se gotearon 10  $\mu$ l de cada dilución sobre un tapiz de W3110, se dejaron secar y se incubó la caja a 37°C toda la noche. Al día siguiente, se calculó el título viral con esta fórmula:

$$\text{Unidades formadoras de placas (UFP)/ml} = \frac{\text{No. de placas en una gota} \times \text{Factor de dilución}}{\text{Volumen goteado (ml)}}$$

### 6.5 Extracción de DNA del fago mEp021 mediante DEAE-celulosa (Silhavy, 1984)

Para realizar este protocolo se requiere un título de  $10^{10}$  UFP/ml aproximadamente. A 20 ml de lisado fágico, se agregaron 20 ml de DEAE-celulosa (Apéndice 3). Se agitó por inversión de 20 a 30 veces suavemente y se retiró la DEAE-celulosa por centrifugación a 4000 x g por 15 min a 4°C. Se repitió este paso una vez más para remover la celulosa restante y el sobrenadante se transfirió a un tubo falcon estéril. A 800 µl de sobrenadante, se adicionaron 100 µl de 5M NaCl y 540 µl de isopropanol, se mezcló por inversión y se incubó por 20 min a -20°C. Se centrifugó a 4000 x g por 10 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. Se añadió 1ml de etanol 70% y se homogenizó por inversión. Se centrifugó a 12,000 x g por 5 min a 4°C, y se descartó el sobrenadante. La pastilla obtenida se resuspendió en 200 µl de TE. Se adicionaron 200 µl de fenol y se mezcló brevemente por vórtex. Se centrifugó por 5 min a T°C ambiente a máxima velocidad y se transfirió la fase acuosa, en la cual se encuentra el DNA del fago. Este paso se repitió una vez más y se procedió a precipitar. Se agregaron 15 µl de NaCl 5M y dos volúmenes de etanol al 95%. Se incubó por 5 min en hielo y se centrifugó a máxima velocidad por 5 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se dejó secar la pastilla hasta que el etanol se evaporara. Finalmente, se resuspendió en 50 µl de buffer TE.

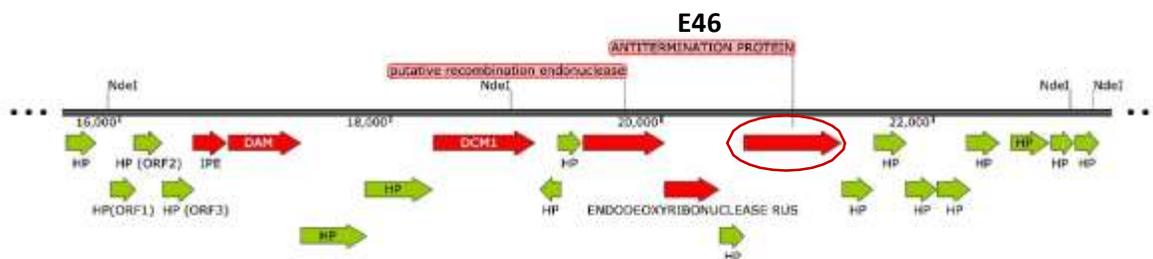
### 6.6 Caracterización del fago mEp021 mediante restricción enzimática

Se empleó 1 µg de DNA de fago y se incubó con 10 U de *NdeI* a 37°C toda la noche. También, se realizó la restricción del genoma del fago λ como control.

<i>Reacción</i>	<b>Volumen (µl)</b>
<i>DNA fágico (1µg)</i>	2
<i>Enzima NdeI (10 U)</i>	1
<i>Buffer 4 (10X)</i>	2
<i>H<sub>2</sub>O inyectable</i>	15
<i>Volumen total</i>	20

## 6.7 Análisis *in silico* del putativo gen antiterminador e46

Se realizó una búsqueda bioinformática mediante los servidores BLASTn y BLASTp del gen e46 (Fig. 12). Se investigaron los dominios conservados por Interpro y se modeló la estructura tridimensional de E46 por I-TASSER. También, se alinearon las secuencias aminoacídicas de E46 y λQ por Clustal Omega.



**Fig. 12** Mapa del genoma del fago mEp021. Análisis *in silico* del gen putativo antiterminador e46 (en círculo rojo).

## 6.8 Amplificación del gen putativo antiterminador e46

Se diseñaron oligos que amplifican el gen e46 con los sitios de corte para *EcoRI* y *HindIII*, así como la incorporación de bases extras en los extremos para cada enzima según las recomendaciones de New England Biolabs ([www.neb.com](http://www.neb.com)).

Oligos	Secuencia 5'→3'
<b>Fwd_46_C</b>	ccggaattcAATGAATTTGGAATCTATTC <i>EcoRI</i> Codón de inicio
<b>Rv_46_C</b>	cccgaagcttGATTTTTAGCTCCATTATTC <i>HindIII</i> Codón de paro

La reacción y las condiciones de PCR para obtener el fragmento esperado (745 pb) son las siguientes:

<i>Reacción de PCR</i>	<i>Volumen (µl)</i>
<i>H<sub>2</sub>O</i>	10.5
<i>Buffer Taq 10X</i>	2
<i>dNTP's</i>	1
<i>Fwd</i>	2
<i>Rv</i>	2
<i>Dream Taq polimerasa</i>	0.5
<i>DNA</i>	2
<i>Volumen total</i>	20



Esta reacción de PCR se llevó a cabo en el termociclador BioRAD T100.

### 6.9 Clonación del gen e46 en el vector de transición pJET/blunt1.2

Debido a que la polimerasa Dream Taq genera productos de PCR con extremos 3'-dA, se realizó el siguiente protocolo especificado en el Kit CloneJET PCR Cloning:

<i>Reacción</i>	<i>Volumen (µl)</i>
<i>Buffer 2X</i>	5
<i>Producto de PCR (sin purificar)</i>	0.5
<i>H<sub>2</sub>O inyectable</i>	3
<i>Enzima Blunting</i>	0.5
<i>Volumen total</i>	9

Se mezcló brevemente en vórtex y se dio un spin. La reacción se incubó por 5 min a 70°C e inmediatamente se colocó en hielo. Se agregaron los reactivos correspondientes para la ligación:

<b>Reacción de ligación</b>	<b>Volumen (μl)</b>
<i>Vector de clonación pJET1.2/blunt (50 ng/μl)</i>	0.
<i>T4 Ligasa</i>	5
	0.
	5
<i>Volumen final</i>	10

Igualmente, se mezcló brevemente y se dio un spin. La ligación se incubó a 22°C por 5 min. Posteriormente, se transformaron 5 μl de la reacción de ligación en células quimiocompetentes DH5α.

### 6.10 Clonación del gen e46 en el vector pKQV4

Se realizó una doble digestión para el vector de expresión pKQV4 y de la construcción de pJET1.2\_e46 con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* a 37°C por 3 horas. Se hicieron 4 reacciones por cada restricción:

<b>Restricción enzimática</b>	<b>Volumen (μl)</b>
<i>Vector pKQV4 (1μg)</i>	6
<i>Buffer 2.1 (10X)</i>	2.5
<i>EcoRI (10U)</i>	1
<i>HindIII (20U)</i>	1
<i>H<sub>2</sub>O</i>	14.5
<i>Volumen final</i>	25

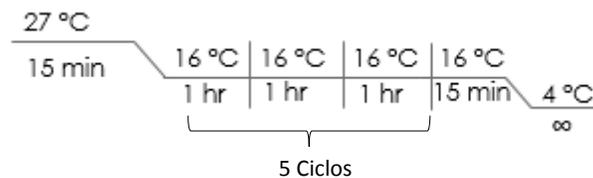
<b>Restricción enzimática</b>	<b>Volumen (μl)</b>
<i>Plásmido pJET1.2_e46 (1μg)</i>	2
<i>Buffer 2.1 (10X)</i>	2.5
<i>EcoRI (10 U)</i>	1
<i>HindIII (20 U)</i>	1
<i>H<sub>2</sub>O</i>	18.5
<i>Volumen final</i>	25

Se verificó la liberación del fragmento y la linearización del vector debido al corte en un gel de agarosa al 1%. Se cargó el resto de la muestra en un gel de agarosa al 0.8% para su posterior purificación. Se cortó la banda de gel correspondiente al fragmento liberado y al vector cortado. La purificación se realizó mediante el kit QIAquick® Gel Extraction.

Se procedió a ligar el vector y el inserto cortado de la siguiente manera:

<i>Reacción de Ligación</i>	<i>Cantidad</i>
<i>Vector cortado</i>	150 ng
<i>Inserto</i>	200 ng
<i>Buffer T4 Ligasa (10X)</i>	2 µl (1X)
<i>T4 Ligasa</i>	1 µl (80 U)
<i>H<sub>2</sub>O</i>	Para un vol. final de 20 µl

Alternativamente, se hizo un control de vector cortado con ligasa para descartar su circularización. Las condiciones de ligación fueron:



Posteriormente, se transformó toda la reacción de ligación en células quimiocompetentes DH5α.

### **6.11 Transformación de células quimiocompetentes DH5α por choque térmico.**

De las células DH5α preparadas con CaCl<sub>2</sub> (Apéndice 4), se transfirieron 80 µl a tubos eppendorf. Se les agregó un volumen de plásmido o ligación y se resuspendieron adecuadamente (en frío). Se dejaron incubar por 30 min en hielo. Se preparó el termoblock a 42°C, y a cada suspensión se le dio un choque térmico por 45 seg a esta temperatura y 2 min en hielo. A cada tubo se le agregó 300 µl de medio LB para la recuperación de las células transformadas y se incubaron en agitación por 1h a 37°C.

Se centrifugaron a máxima velocidad por 1 min para empastillarlas, y se resuspendieron en 100 µl del sobrenadante. Se espatularon en cajas de LB con ampicilina (100 µg/ml) previamente temperadas. Al terminar de plaquearlas, se incubaron a 37°C por toda la noche.

## **6.12 Extracción del DNA plasmídico**

Se inoculó una colonia fresca que contiene al plásmido deseado, en un tubo con 5ml de LB con ampicilina (100 µg/ml) y se incubó toda la noche en agitación a 37°C. Al otro día, se empastilló todo el cultivo y se retiró todo el sobrenadante. La extracción se realizó siguiendo el protocolo descrito en el kit High Pure Plasmid Isolation de Roche Applied Science y/o por miniPrep.

Para la extracción por miniPrep, se resuspendió muy bien la pastilla en 100 µl de solución I (Apéndice 2.1). Después, se agregó 200 µl de la solución II (Apéndice 2.2) y se mezcló por inversión, en este paso se observa una consistencia mucosa y traslúcida. A esto se le agregó 150 µl de la solución III (Apéndice 2.3) y se vortexeó gentilmente en una posición invertida por 10 seg. Se incubó en hielo por 5 min y se centrifugó a 12,000 x g por 5 min a 4°C. Se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo y se agregó un volumen igual de Fenol:Cloroformo:Alcohol isoamílico (25:24:1). Se le dio un breve vórtex y se centrifugó a 12,000 xg por 2 min a 4°C. Se transfirió el sobrenadante y se le agregó 2 volúmenes de etanol absoluto, se mezcló por inversión y se incubó por 5 min a T°C ambiente. Se centrifugó nuevamente a 12,000 x g por 5 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. Se realizaron 3 lavados con etanol al 70% frío (con 1ml, 1ml, 200 µl) y por cada uno se agitó el tubo hasta observar que la pastilla se despegara. En el último lavado, se retiró el sobrenadante y se dejó secar la pastilla. Se resuspendió en 20 µl de H<sub>2</sub>O inyectable y se incubó con 1µl de RNasa (2mg/ml) por 15 min a temperatura ambiente, para degradar el RNA presente en la muestra.

### 6.13 Secuenciación de DNA

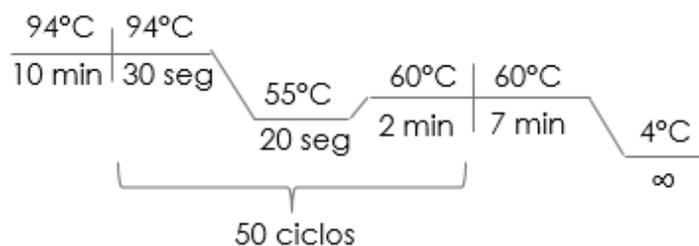
De las candidatas seleccionadas por liberación del inserto deseado, se extrajo el plásmido y se secuenciaron realizando la siguiente reacción con el kit BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing:

<i>Reacción</i>	<i>Volumen (µl)</i>
<i>H<sub>2</sub>O</i>	10
<i>Buffer 5x</i>	4
<i>Primer Fwd ó Rv</i>	1 (1 µM)
<i>Betaina 5%</i>	1
<i>DMSO 5%</i>	1
<i>DNA</i>	1 (500 ng)
<i>Mix 1.1</i>	2
<i>Volumen total</i>	20

Los oligos empleados para secuenciar son:

<i>Oligos</i>	<i>Secuencia 5' → 3'</i>
<i>pJET1.2 Forward Sequencing Primer</i>	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC
<i>pJET1.2 Reverse Sequencing Primer</i>	AAGAACATCGATTTTCCATGGCA
<i>Fwd_pKQV4</i>	G ATCGGCTCGTATAATGTG
<i>Rv_pKQV4</i>	ATCAGGCTGAAAATCTTCTC

La reacción de secuenciación se sometió bajo las siguientes condiciones:



#### **6.14 Curva de crecimiento de W3110 en presencia de pE46**

Se inoculó una colonia fresca de la cepa W3110 (WT), W3110 + pKQV4 (Vector vacío), W3110 + pE46 en 5ml de LB con y sin ampicilina. Se incubó toda la noche en agitación a 37°C y al día siguiente se hizo una dilución 1:100 por cada cepa evaluada. Se crecieron hasta alcanzar una densidad óptica de 0.09. A este punto se le llamó tiempo cero (t=0) y se indujeron con 1mM de IPTG, cada ensayo se hizo por triplicado y se monitorearon por (0.3, 1, 2, 3 y 4) horas. Igualmente, se realizó el ensayo con las cepas sin inducir como controles.

#### **6.15 Expresión de la proteína E46 en geles de acrilamida Tris-glicina al 12.5%**

Se puso un cultivo de la cepa BL21-CodonPlus(DE3)-RIL que contiene a la construcción pE46 así como la cepa sola y la cepa con el vector pKQV4 (vector vacío) como controles. Se hizo la inducción con 1mM de IPTG cuando las células crecieron a una densidad óptica de 0.2. Se recolectaron muestras en los tiempos 0.3, 1, 2 y 3 horas y se colocaron en hielo. Se normalizaron cada una de las muestras a una densidad de 0.3 y se empastillaron. El sobrenadante de cada muestra fue descartado y la pastilla fue resuspendida en 100µl de buffer de tratamiento 2X (Apéndice 5.6) y 100µl de H<sub>2</sub>O inyectable, para una concentración final del buffer de 1X. Las muestras fueron calentadas por 5 min en agua hirviendo e inmediatamente se enfriaron en hielo. Se centrifugaron a máxima velocidad por 15 min a 4°C y se cargaron 15 µl de cada una de las muestras en geles de acrilamida al 12.5% (Apéndice 5). Se corrieron a 100 volts por 2 hr y los geles se tiñeron con una solución de azul de coomasie (Apéndice 5.10). Para visualizar las bandas, se agregó un volumen de solución desteñidora (Apéndice 5.11) y se mantuvo en agitación suave. Este último paso se repitió 3 veces más o hasta que se logaran ver las bandas con mayor resolución.

#### **6.16 Crecimiento del fago mEp021 en mutantes *nus* en presencia de pE46.**

Se crecieron 5ml de las cepas mutantes *nus* (Tabla 1) transformadas con pE46, en LB ampicilina, toda la noche a 37°C en agitación constante. En diferentes tubos se agregaron 300 µl de cada cultivo O/N, se indujeron a 0.5mM de IPTG y se adicionaron

3ml de medio T $\phi$  suave (Apéndice 1.2). Se mezclaron rápidamente por vórtex y se vertieron en cajas de medio T $\phi$  con ampicilina.

Se hicieron diluciones del fago mEp021 y de  $\lambda$  (control) en buffer TMG (Apéndice 1.3) y se gotearon 5 $\mu$ l sobre el tapiz de cada mutante. Las gotas se dejaron secar y luego se incubaron a 37°C toda la noche. Este experimento se hizo por triplicado y equivalentemente con los controles: mutantes *nus* con pKQV4 (vector vacío), mutantes *nus* sin plásmido y la cepa control (WT) W3110.

## VII. RESULTADOS

### 7.1 Análisis *in silico* del gen putativo antiterminador e46

Al analizar la secuencia de nucleótidos del gen putativo antiterminador e46 por BLASTn, se observó que la secuencia presenta un alto porcentaje de identidad con una región de un contig-4.0\_1\_284808 de *E. coli* proveniente de heces humanas de Noruega, con un 87% de identidad con una región genómica de la cepa de *E. coli* enterotoxigénica UMNK88 y por último con una cepa de *E. coli* patógena transmitida por alimentos (Tabla 3).

**Tabla 3.** BLAST a nivel de nucleótidos

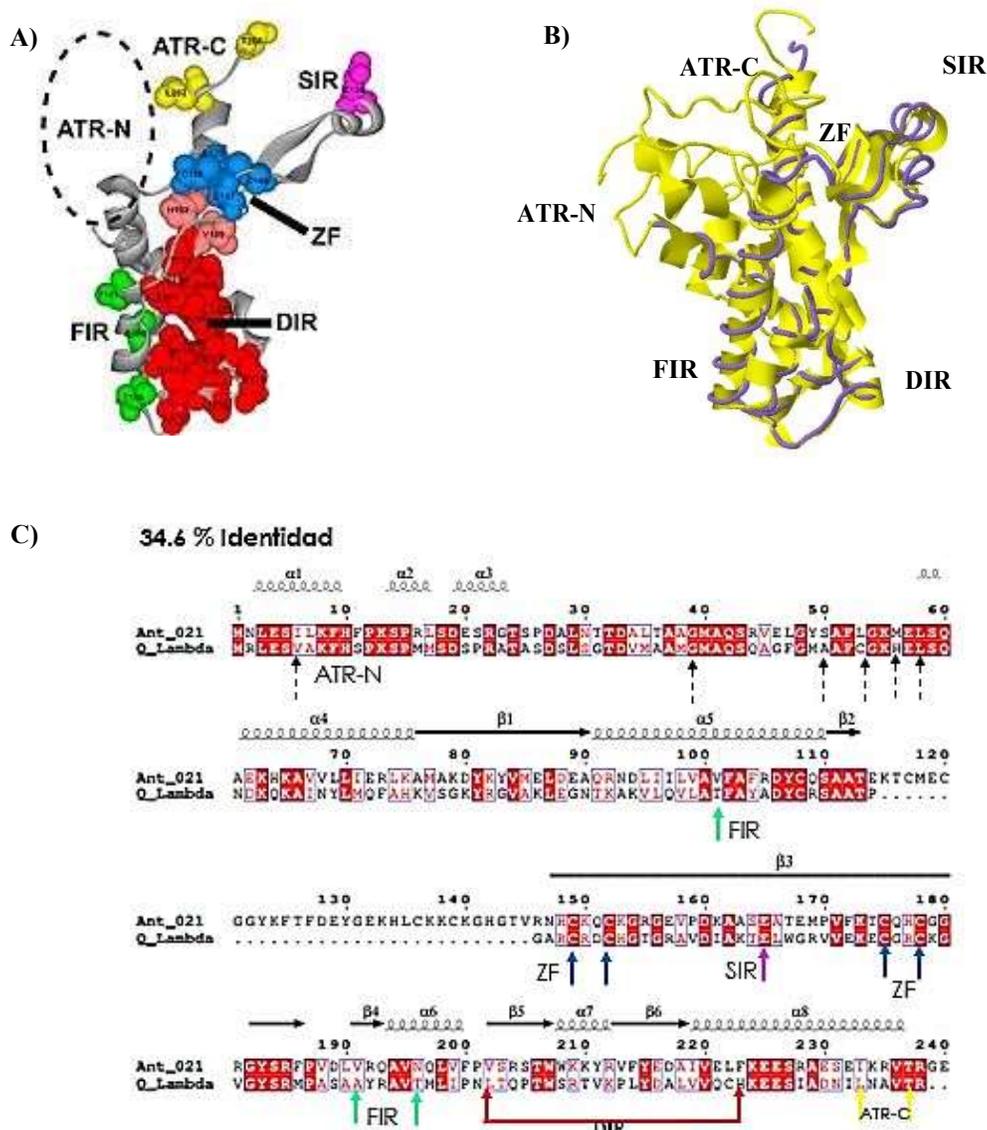
Descripción	Query cover	E-value	% Identidad
<i>Escherichia coli</i> genome assembly FHI99, scaffold scaffold-28_contig-4.0_1_284808	92%	0.0	91 %
<i>Escherichia coli</i> UMNK88, complete genome	94%	0.0	87%
<i>Escherichia coli</i> strain 09-00049, complete genome	92%	1e-146	82%

Asimismo, se analizó la secuencia de aminoácidos por BLASTp, y se observó que presenta un 97% y 87% de identidad con una proteína putativa de antiterminación proveniente de la cepa de *E. coli* upec-155 y UMNK88 respectivamente, y en menor porcentaje con antiterminadores provenientes de otras bacterias (Tabla 4).

**Tabla 4.** BLAST a nivel de aminoácidos

Descripción	Query cover	E-value	% Identidad
Proteína de antiterminación <i>E.coli</i> upec-155	100%	5e-173	97%
Proteína de antiterminación <i>E.coli</i> (UMNK88)	100%	5e-153	87%
Ant <i>Salmonella</i>	99%	3e-54	40%
Ant <i>Klebsiella N.</i>	98%	2e-53	39%
Ant <i>Enterocloacae</i>	99%	2e-52	39%

Por otro lado, se determinó el modelo tridimensional por I-TASSER de la proteína putativa E46, la cual presentó cierta similitud estructural con el antiterminador  $\lambda$ Q (Fig. 10B). Además, se identificaron los módulos funcionales involucrados en antiterminación con respecto a lo reportado para el antiterminador  $\lambda$ Q (Fig. 13A,C) en 2014 [43].



**Fig. 13 Análisis *in silico* del putativo antiterminador E46. A)** Estructura tridimensional del antiterminador  $\lambda$ Q (PDB: 4MO1) [43]. **B)** Alineamiento 3D del modelo estructural de E46 (amarillo) con un TM-score: 0.573 y  $\lambda$ Q (morado, 62-207 a.a) realizado por I-TASSER. **C)** Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de E46 Y  $\lambda$ Q. Localización de los módulos funcionales implicados en antiterminación de  $\lambda$ ; ATR-N, Región N-terminal de antiterminación (negro); FIR, Región de interacción con la subunidad  $\beta$  de la RNAP (verde); ZF, Dedos de zinc (azul); SIR, Región de interacción con el factor sigma  $\sigma_{70}$  (magenta); DIR, Región de interacción con el DNA (rojo); ATR-C, Región C-terminal de antiterminación (amarillo).

La secuencia de aminoácidos de E46 comparte un 34.6 % de identidad con  $\lambda$ Q, en gran parte se debe a una región central que presenta E46 y que carece  $\lambda$ Q, siendo esta región parte del dominio de cisteínas, encontrado en E46 (Fig. 14A). Este dominio es característico del antiterminador Q del fago lambda  $\lambda$  y de otros fagos lambdoides (Fig.14B)

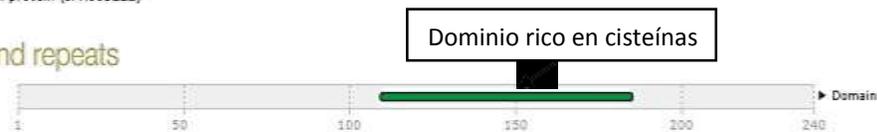
#### A) Putativo antiterminador E46

Length 240 amino acids

##### Protein family membership

Antitermination protein (IPR003222)

##### Domains and repeats



#### B) Antiterminador $\lambda$ Q

Length 207 amino acids

##### Protein family membership

Antitermination protein (IPR003222)

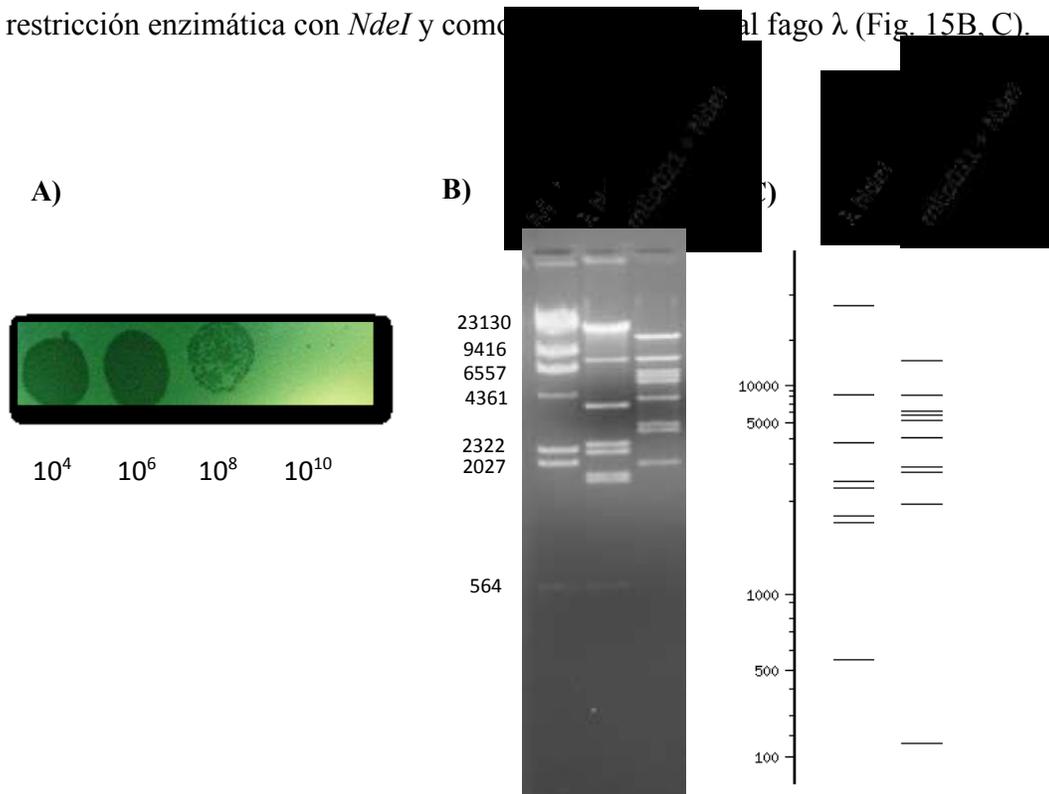
##### Domains and repeats



**Fig. 14 Dominio conservado analizado por Interpro. A)** Dominio central rico en cisteínas de E46, característico del **B)** antiterminador  $\lambda$ Q.

## 7.2 Caracterización del fago mEp021

A partir de un título de  $7 \times 10^{10}$  ufp/ml (Fig. 15A), se extrajo el DNA fágico de mEp021 mediante DEAE-celulosa. Se corroboró la identidad del fago mEp021 mediante una restricción enzimática con *NdeI* y como patrón de restricción el fago  $\lambda$  (Fig. 15B, C).

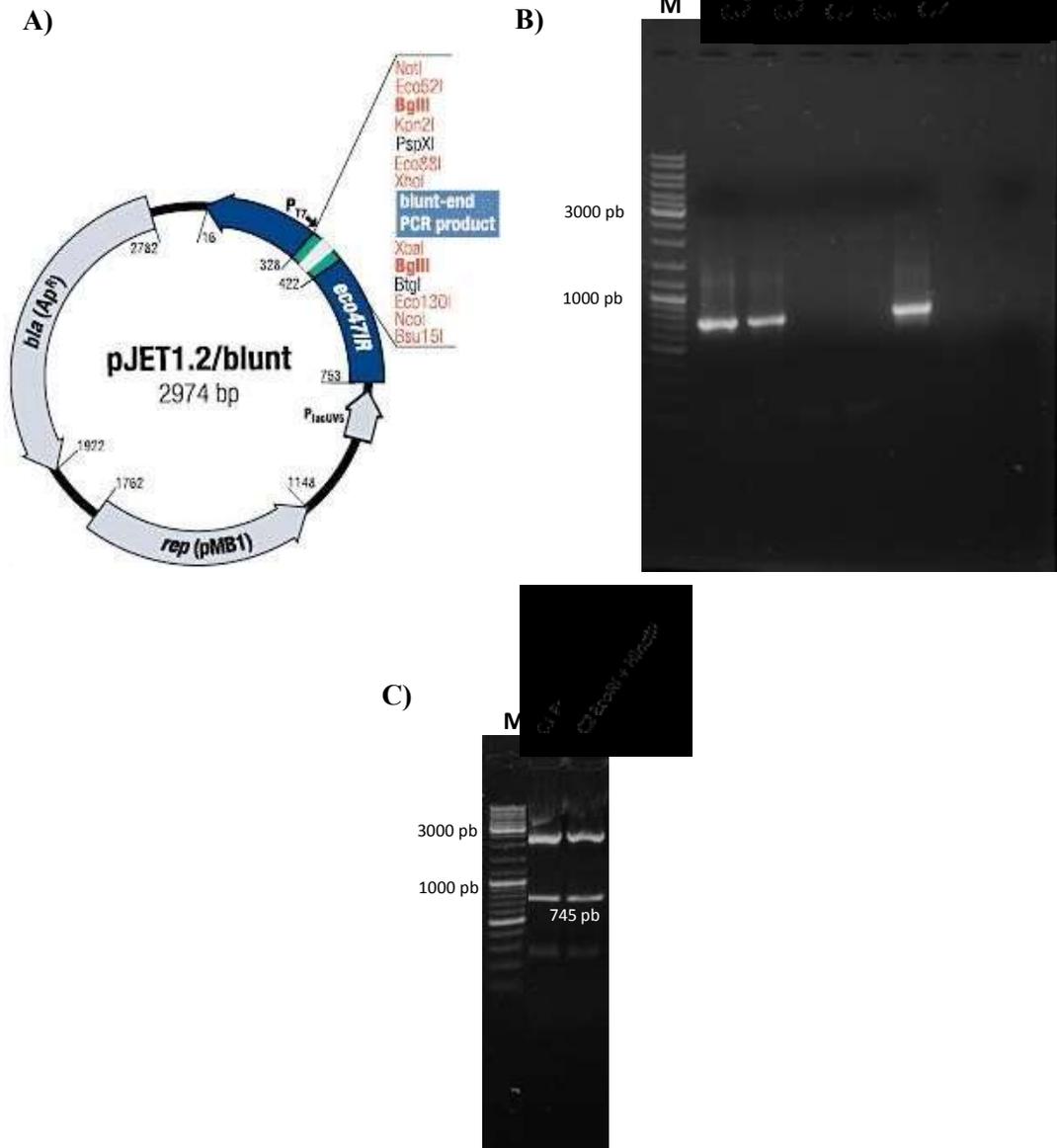


**Fig. 15 Identidad del fago mEp021.** A) Título y fenotipo del fago mEp021. B) Patrón de restricción del fago mEp021 con *NdeI* (10U) en gel de agarosa 1%. Carril 1; M: Marcador  $\lambda$  *HindIII*, carril 2; DNA del fago  $\lambda$  cortado con *NdeI*, carril 3; DNA del fago mEp021 cortado con *NdeI*. C) Gel *in silico* del patrón de restricción de ambos fagos (NEBcutter V2.0)

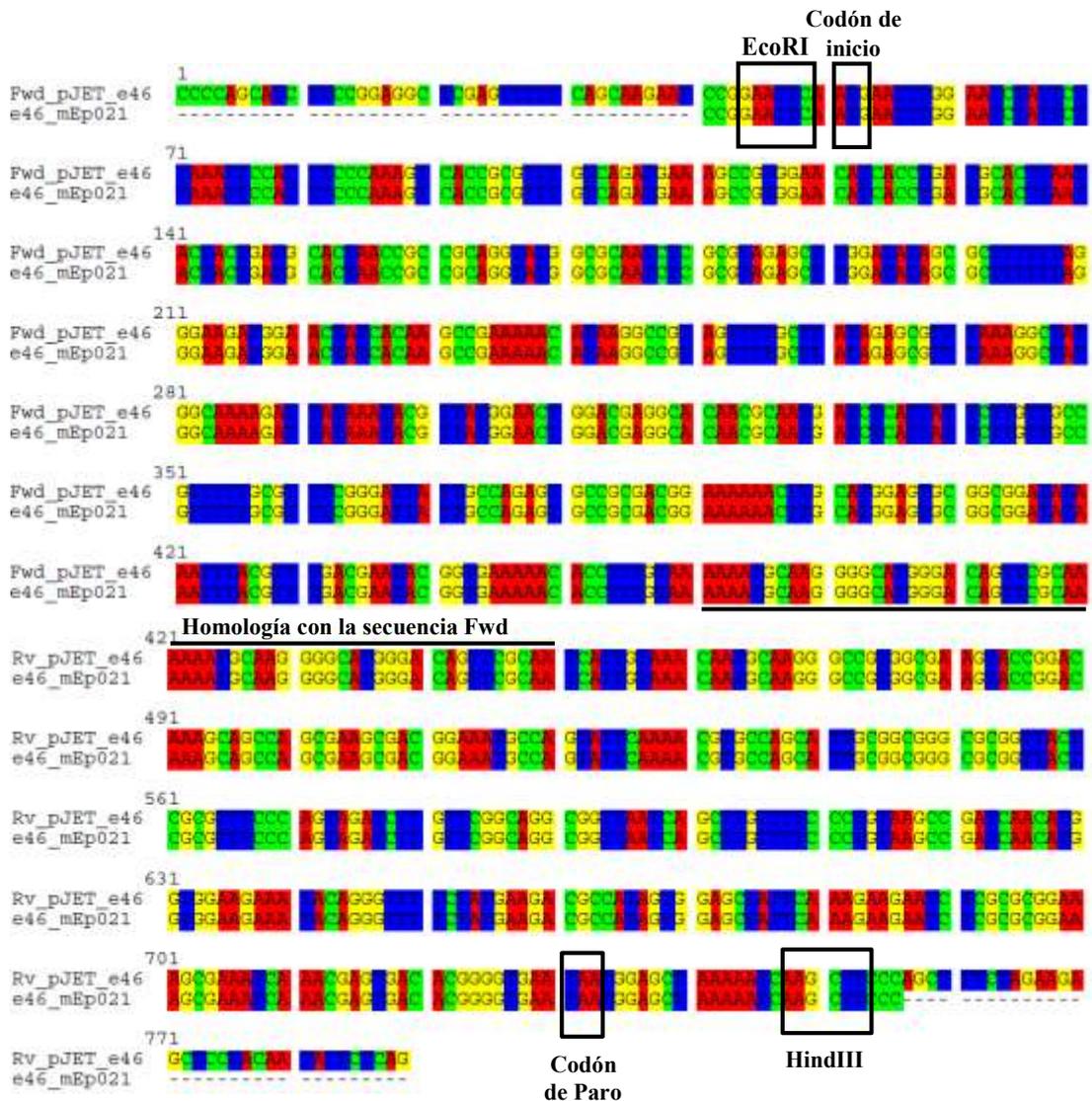
## 7.3 Clonación del gen putativo antiterminador e46

Una vez caracterizado al fago mEp021, se procedió a amplificar el gen correspondiente al putativo antiterminador con primers que poseen sitios de corte en los extremos para las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*. Con el fin de obtener un óptimo corte, se optó por clonar el fragmento e46 de aproximadamente 745 pb en el vector de transición pJET 1.2/blunt. Inmediatamente se transformó en células quimiocompetentes, y al día siguiente se obtuvieron 371 colonias. De estas candidatas, se analizaron cinco de ellas

por PCR, de las cuales únicamente tres contenían el inserto (745 pb). Posteriormente, se analizaron dos de estas últimas por liberación del inserto mediante doble digestión con *EcoRI* y *HindIII*, dando lugar al fragmento esperado (Fig. 16) se secuenciaron (ver ANEXOS) y no se observó ningún



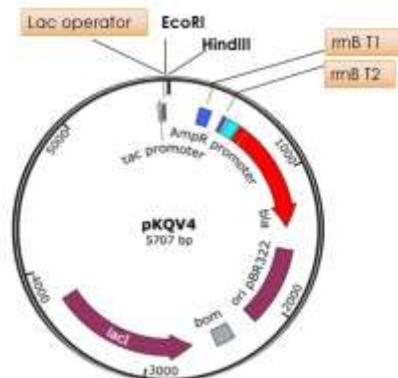
**Fig. 16 Clonación del gen e46 en el vector pJET1.2/blunt.** **A)** Esquema del vector de transición pJET1.2/blunt. **B)** PCR de colonia de las candidatas que presentan el inserto (745 pb). **C)** Doble restricción con *EcoRI* (10U) y *HindIII* (20U) de las candidatas. M: Marcador GeneRuler™ (ThermoFisher Scientific)



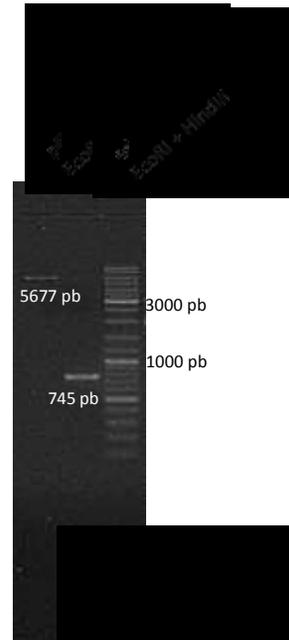
**Fig.17** Secuencia de e46 en el vector pJET1.2/blunt. Se señalan los sitios de corte *EcoRI* y *HindIII* así como el codón de inicio y el codón de paro.

Para analizar la expresión de e46, se empleó el vector pKQV4 que está regulado bajo un promotor inducible por IPTG. Se realizó la doble restricción del vector de expresión con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* para linearizarlo. Tanto el vector cortado como el fragmento liberado se purificaron por gel de agarosa. Se llevó a cabo la ligación y su posterior transformación en DH5 $\alpha$ , obteniéndose únicamente cuatro candidatas, de las cuales dos presentaban el fragmento deseado (Fig. 18D). Finalmente, se secuenciaron las candidatas para corroborar su integridad (Fig. 19).

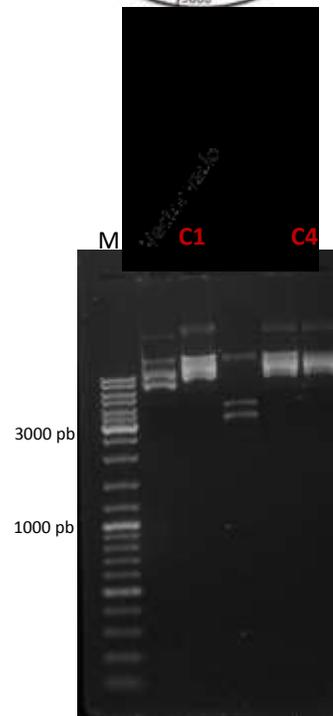
A)



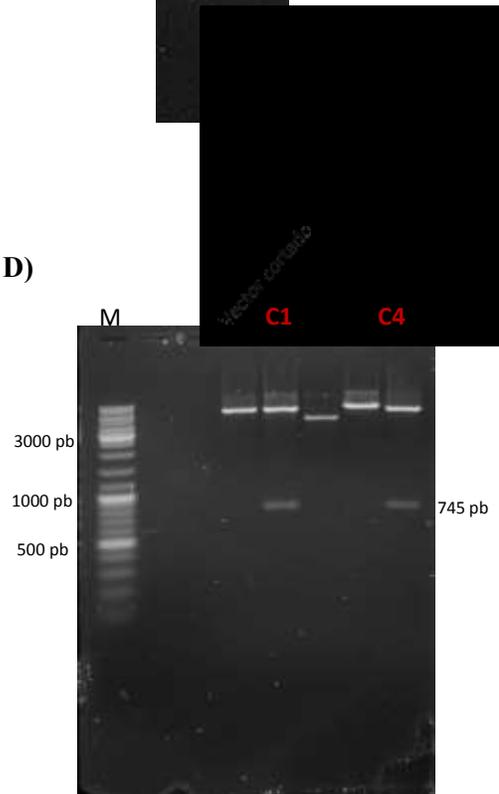
B)



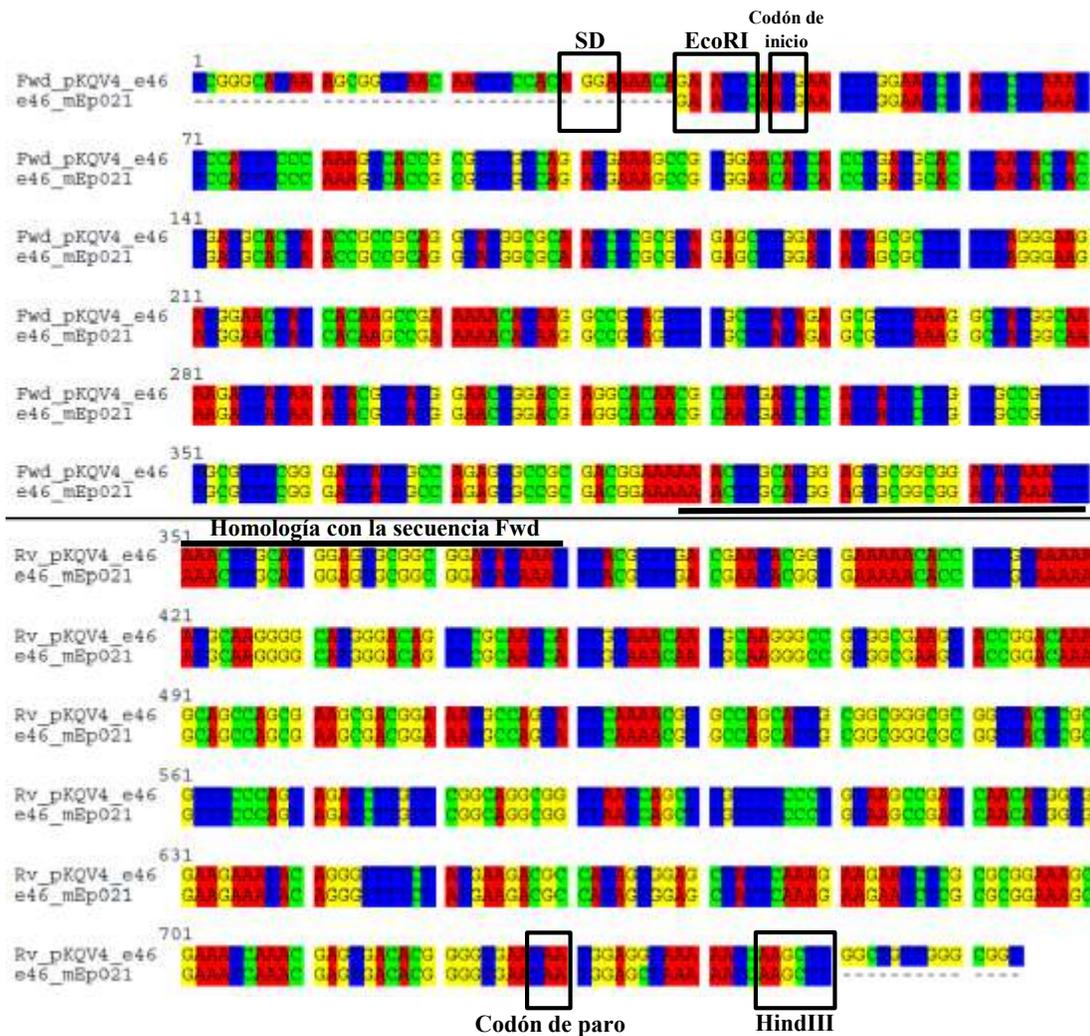
C)



D)



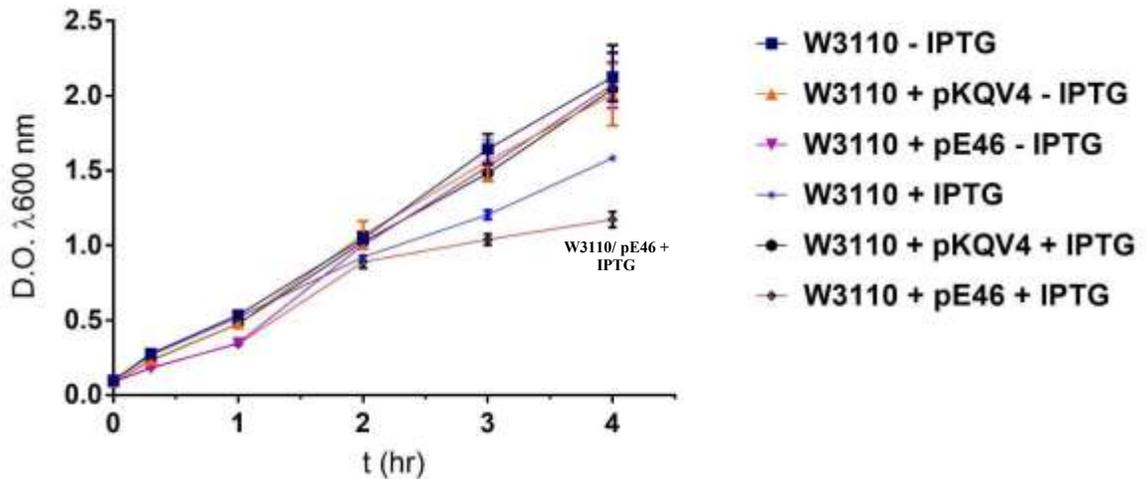
**Fig. 18 Clonación del gen e46 en el vector pKQV4.** A) Características del vector de expresión pKQV4. B) Purificación del vector cortado y el inserto liberado por las enzimas *EcoRI* (10U) y *HindIII* (20U). C) Extracción del plásmido por miniPREP de las candidatas obtenidas; pKQV4, vector vacío (control). D) Doble restricción de las candidatas con las enzimas *EcoRI* (10U) y *HindIII* (20U). M: Marcador GeneRuler™ (ThermoFisher Scientific).



**Fig. 19** Secuencia de e46 en el vector de expresión pKQV4. Se señalan los sitios de corte *EcoRI* y *HindIII*, así como el SD (Shine-Dalgarno) y los codones de inicio y paro.

## 7.4 Inducción de pE46 y su efecto sobre la viabilidad celular

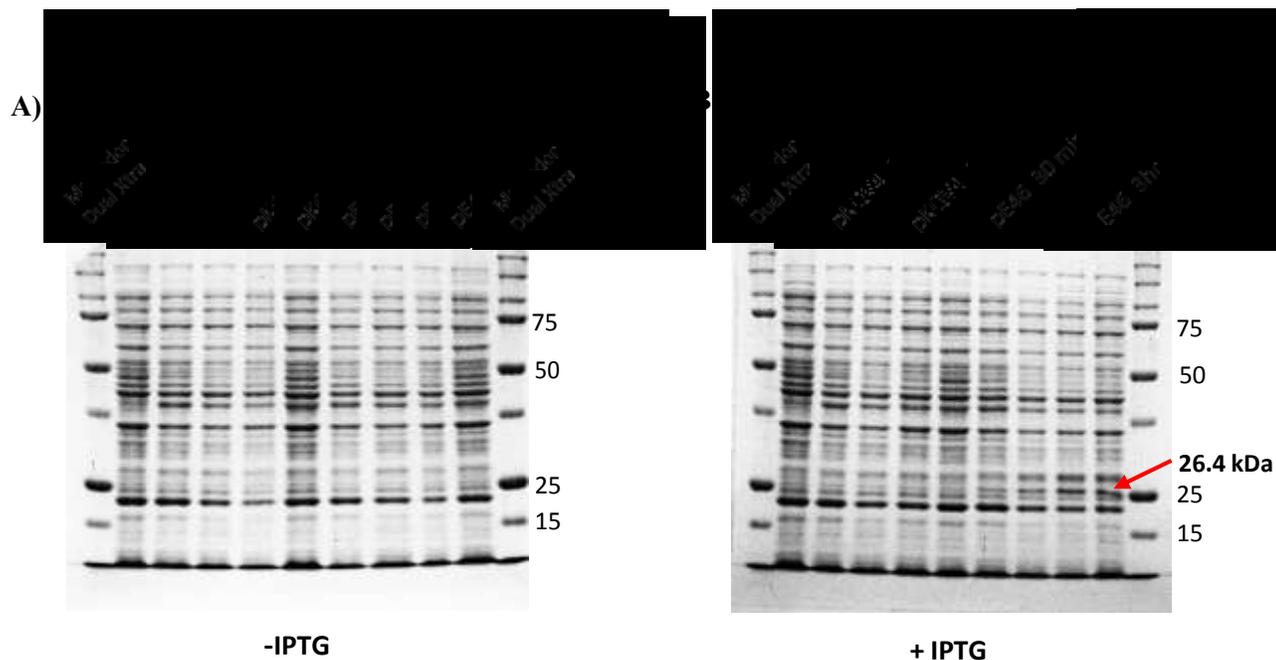
Se evaluó el efecto de pE46 sobre la cepa prototipo W3110 por 4 horas (Fig. 20). Se observa una leve toxicidad de pE46 sobre el crecimiento de W3110 a partir de las 2 horas después de la inducción con IPTG. La concentración de IPTG parece afectar la viabilidad de la cepa sin plásmido.



**Fig. 20 Viabilidad celular de la cepa W3110 en presencia del pE46.** Se describe el comportamiento de las cepas W3110 (WT), W3110 + pKQV4, W3110 + pE46 sin inducir e inducidas con IPTG 1mM.

## 7.5 Expresión del gen e46 en geles de acrilamida

Para visualizar su expresión, la construcción pE46 se transformó en la cepa BL21-CodonPlus (DE3)-RIL, que contribuye a expresar niveles altos de la proteína. pE46 se indujo con IPTG a partir de una densidad óptica de 0.2. En la Figura 21B, se observa la expresión de E46 con un peso molecular de 26.4 kDa; a los 30 min, 1, 2, y 3 horas.

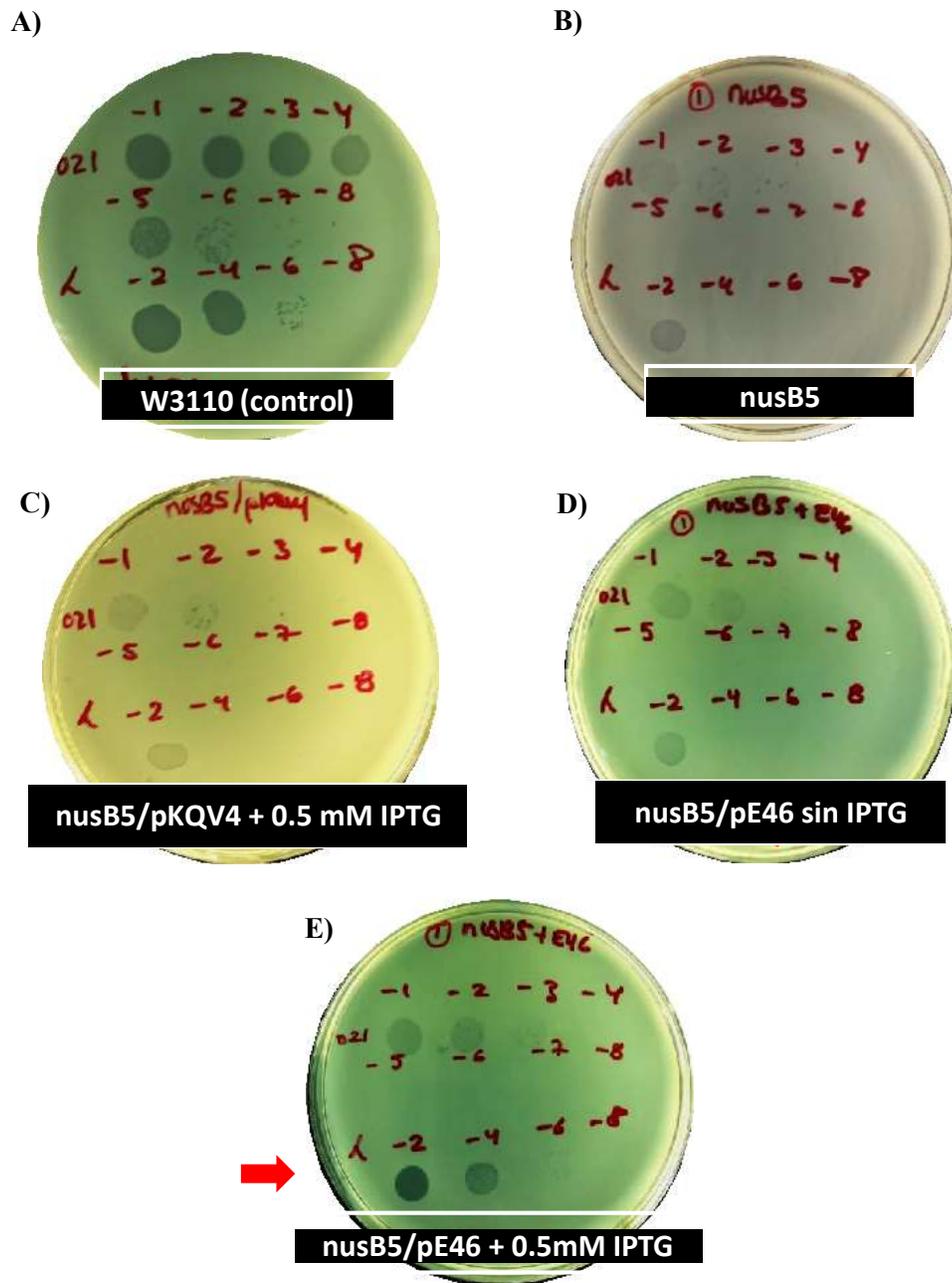


**Fig.21 Expresión de pE46 en geles de acrilamida Tris-glicina al 12.5 %.** **A)** Muestras sin inducir, **B)** Muestras inducidas con 1mM de IPTG. Controles: Cepa BL21-CodonPlus (DE3)-RIL (WT), RIL + pKQV4 (vector vacío). Marcador Precision Plus Protein™ Dual Xtra (BIO-RAD).

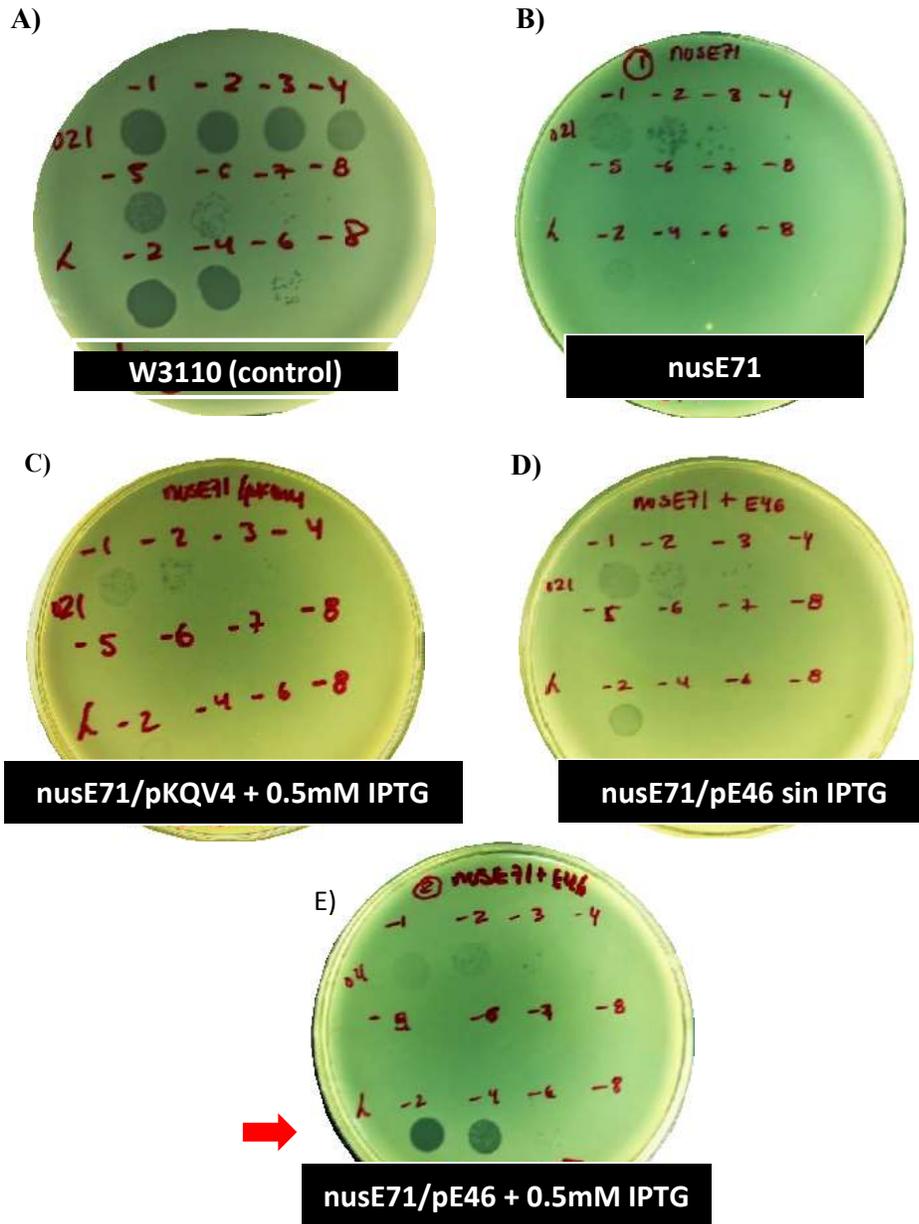
### 7.6 Evaluación del efecto de pE46 en las mutantes *nus*

Los factores Nus participan principalmente en la antiterminación efectuada por N y Q en el fago lambda, favoreciendo este mecanismo. Por otro lado, se ha reportado que el fago mEp021 requiere de dichos factores para su desarrollo, posiblemente contribuyendo a algún tipo de mecanismo efectuado por el putativo antiterminador E46 [34]. Debido a esto, se analizó el efecto de pE46 sobre el crecimiento de mEp021 en mutantes *nus* (Fig. 22 y 23).

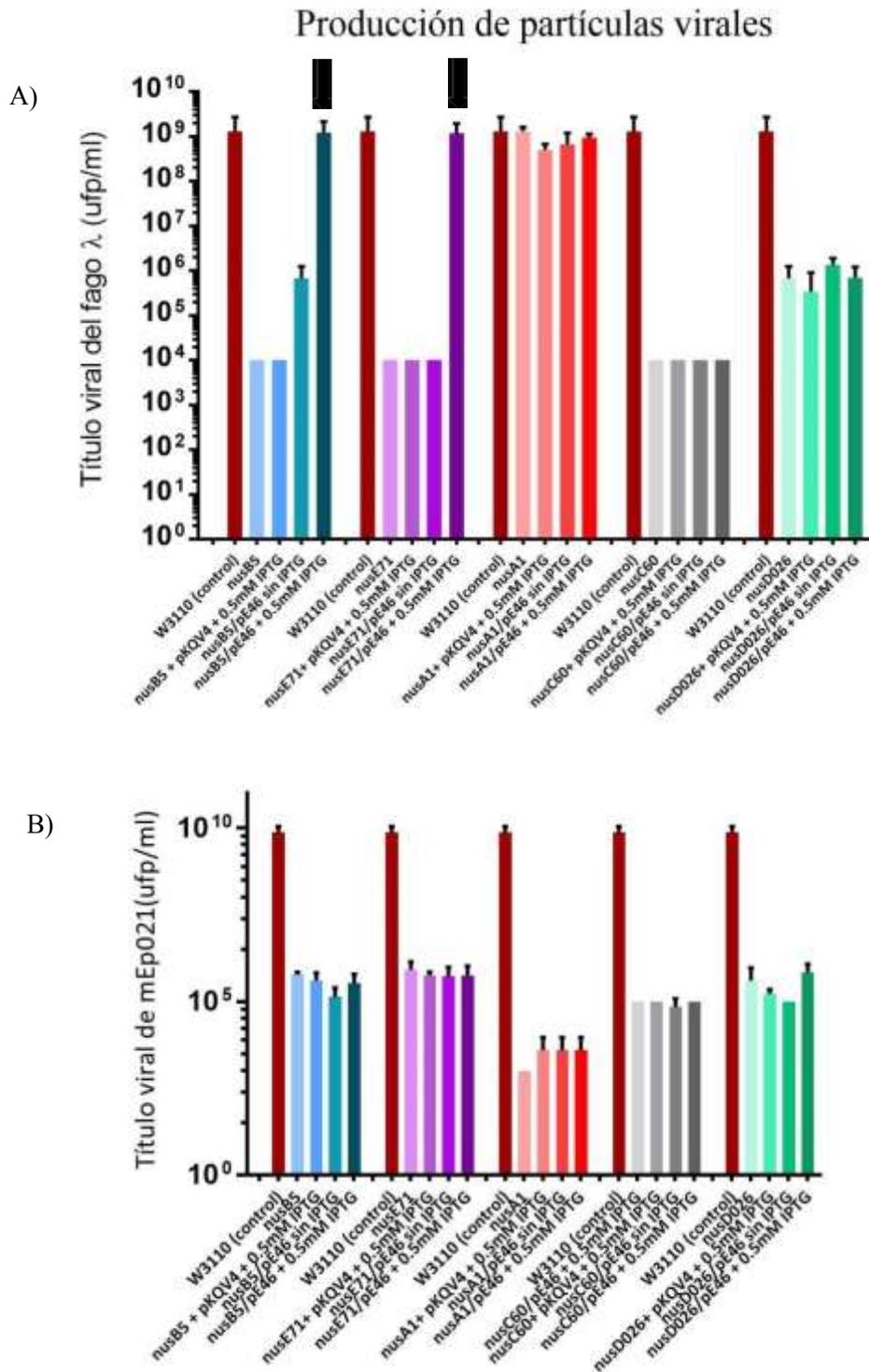
En ninguna de las mutantes *nus* analizadas, se observó efecto de pE46 sobre el crecimiento de mEp021. Sin embargo, en las mutantes nusB5 y nusE71 se observó un aumento en el título de partículas del fago λ (barras azules y moradas), en comparación a los controles (Fig. 24).



**Fig. 22** Crecimiento del fago mEp021 en la mutante nusB5/pE46; Fago  $\lambda$  (control). **A)** Goteo del fago mEp021 y  $\lambda$  en sus diluciones correspondientes en un tapiz de la cepa W3110 (control), **B)** Tapiz de la cepa mutante nusB5, **C)** Tapiz de la mutante nusB5 + pKQV4 (vector vacío) inducido con 0.5 mM de IPTG, **D)** Tapiz de la mutante nusB5 + pE46 sin inducir, **E)** Tapiz de la mutante nusB5 + pE46 inducido con 0.5 mM de IPTG.



**Fig. 23 Crecimiento del fago mEp021 en la mutante nusE71/pE46; Fago  $\lambda$  (control).** **A)** Goteo del fago mEp021 en sus diluciones correspondientes en un tapiz de la cepa W3110 (control), **B)** Tapiz de la cepa mutante nusE71, **C)** Tapiz de la mutante nusE71 + pKQV4 (vector vacío) inducido con 0.5 mM de IPTG, **D)** Tapiz de la mutante nusB5 + pE46 sin inducir, **E)** Tapiz de la mutante nusE71 + pE46 inducido con 0.5 mM de IPTG.



**Fig. 24** Título de fagos (ufp/ml) en presencia de pE46. **A)** Producción de partículas del fago  $\lambda$ . **B)** Producción de partículas del fago mEp021. Las barras de colores representan: W3110 (control), marrón; nusB5 y sus variantes, escala de azules; nusE71 y sus variantes, escala de morados; nusA1 y sus variantes, escala de rojos; nusC60 y sus variantes, escala de grises; nusD026 y sus variantes, escala de verdes.

## VIII. DISCUSIÓN

Al realizar una búsqueda bioinformática de la secuencia de e46, se observó que presenta similitud con secuencias de cepas provenientes de heces humanas, de alimentos y de una cepa enterotoxigénica porcina UMNK88 [41]. Esta última cepa presenta genes asociados a profago a lo largo de su genoma, que comparten similitud con genes del fago mEp021. A nivel de aminoácidos, E46 presenta el mayor porcentaje de identidad con una proteína de antiterminación perteneciente a la cepa de *E. coli* UPEC-155 aislada del tracto urinario de un paciente. Esta proteína está asociada al bacteriófago ES18 que infecta a *Salmonella* anotada como Gp73 que tiene similitud con el antiterminador Q [42]. Aunado a esto, se analizó si la proteína e46 compartía cierto patrón estructural con alguna proteína almacenada en la base de datos, aproximándose con mayor fiabilidad topológica a la proteína de antiterminación Q del fago  $\lambda$  (PDB: 4MO1).

Para el antiterminador  $\lambda$ Q se reportaron los módulos funcionales que intervienen en este mecanismo de antiterminación [43]. Previamente, se describió que sustituciones en ocho residuos de  $\lambda$ Q (V6E, G39R, A50P, C53R, H56R, L58P, L202S, y T206P) impedían su capacidad para antiterminar la transcripción [61]. Tales aminoácidos se localizan en la región N- y C-terminal. Estas regiones se encuentran adyacentes en la estructura 3D, colaborando como un único módulo de antiterminación. Al menos, tres de éstos aminoácidos (A50, C53 y H56) no se conservan en E46. Los residuos que se encuentran en la región N- y C-terminal en E46 están alineados espacialmente con las regiones correspondientes en  $\lambda$ Q, dando lugar a una conformación estructural similar. También, se han establecido los aminoácidos de  $\lambda$ Q que participan en la interacción con la subunidad  $\beta$  de la RNA polimerasa y con la región  $\sigma R_4$  del factor  $\sigma_{70}$  son fundamentales para antiterminar. Se determinó que cambios en T101I, A160V y T165A de  $\lambda$ Q fortalecen la interacción con la subunidad  $\beta$ , a pesar que se encuentran en posiciones separadas en la estructura primaria, éstos residuos forman un clúster en la estructura terciaria [24]. Dichos aminoácidos se encuentran parcialmente conservados en E46.

Cuando  $\lambda$ Q se une al sitio de unión a DNA (QBE/qut) interactúa con la región  $\sigma_{R_4}$ , desplazando de esta manera al factor  $\sigma_{70}$  de su posición inicial. Se reportó que un cambio del residuo E134K incrementa la afinidad de  $\lambda$ Q por el sitio QBE/qut y que además interrumpe la interacción con  $\sigma_{R_4}$  [23]. El aminoácido E134 está altamente conservado en la proteína putativa E46.

Se identificaron los residuos L171, Q173, T175, W176, S177, R178, V180, K181, L183, Y184, D185, L187 y V188 como los principales responsables de la unión al sitio QBE en el promotor pR' [23]. Además, se describió que sustituciones en V189 y H192 aumentaban la afinidad de  $\lambda$ Q por el sitio QBE. A lo largo de esta región de aminoácidos en E46, existe variación en el grado de conservación con respecto a  $\lambda$ Q, desde residuos que mantienen propiedades fisicoquímicas similares hasta aquellos que no los conservan. Únicamente, T175, W176, Y184 y V189 se mantienen intactos en E46.

Es importante mencionar que existe un repetido de cisteínas (Cys118, Cys121, Cys144 y Cys147) que forma parte del dominio conservado de  $\lambda$ Q, y que contribuye a la flexibilidad estructural de  $\lambda$ Q. Sustituciones de serina e histidina en estas cuatro cisteínas impide la capacidad de Q de funcionar como antiterminador. Dichas cisteínas se encuentran conservadas en el putativo antiterminador E46. Sin embargo, se observó que el dominio conservado en ésta proteína es más grande con respecto al dominio de  $\lambda$ Q, y que consta además de otro de repetido de cisteínas. Esta región adicional en E46, es el factor principal que limita el grado de conservación entre E46 y  $\lambda$ Q, proporcionando solamente un 34.6% de identidad.

Por otro lado, se evaluó la expresión de E46 en la viabilidad celular de W3110, observándose una inhibición del crecimiento a partir de las 2 horas con respecto a los controles. Sin embargo, en la cepa W3110 inducida con IPTG se observó una disminución en la velocidad de crecimiento, posiblemente por un retraso en el metabolismo celular debido a que solo contiene un promotor lac en su cromosoma. Además, la molécula de IPTG no es metabolizada por la enzima  $\beta$ -galactosidasa ocasionando un estrés adicional, al no generar suficiente energía para las células [44, 45].

Las mutantes nus (nusA1, nusB5, nusC60, nusD026 y nusE71) se distinguen por presentar mutaciones puntuales y están localizados en 5 diferentes loci: nusA (min 69), nusB (min 11), nusC (min 88), nusD (min 84), y nusE (min 72) en el genoma de *E. coli*. Se identificaron inicialmente por restringir el crecimiento del fago  $\lambda$  y disminuir la actividad del antiterminador  $\lambda$ N particularmente [46,47]. Se ha reportado que la antiterminación efectuada por  $\lambda$ N requiere de la participación de los factores Nus para fortalecer el complejo de transcripción y suprimir terminadores distales eficientemente [48, 49]. Sin embargo, en el genoma del fago mEp021 no se identificó ningún gen que diera lugar a una proteína similar a  $\lambda$ N. A pesar de su ausencia, este fago requiere de los factores Nus para su desarrollo.

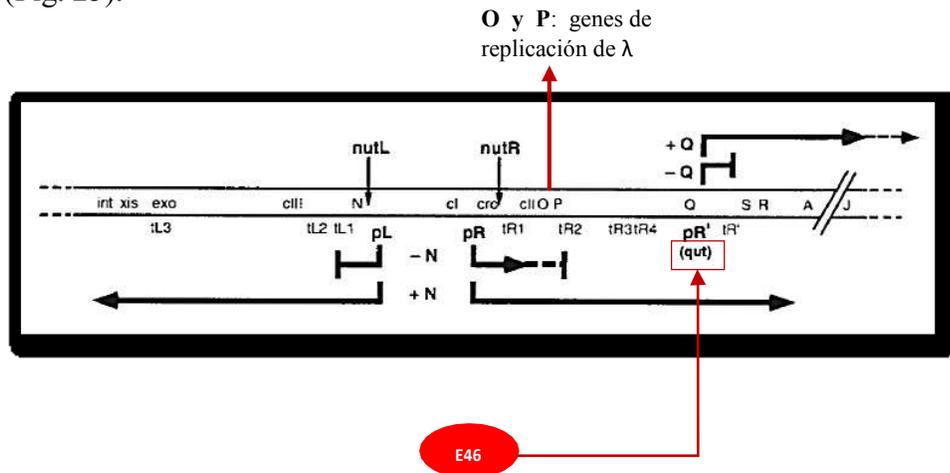
Considerando las características de E46 detalladas por el análisis *in silico*, se evaluó su capacidad de suprimir el efecto de las mutaciones de los factores Nus mediante una posible función de antiterminación, estimulando de esta manera el desarrollo del fago mEp021.

Sin embargo, no se observó efecto de la expresión de pE46 en la producción de partículas del fago mEp021 en ninguna de las mutantes nus, sugiriendo que la actividad de E46 es independiente de estos factores. No obstante, la función de E46 logró asociar un incremento del título viral con el fago  $\lambda$ , restaurando el defecto de antiterminación ocasionado por las mutantes nusB5 y nusE71.

La proteína nusB5 contiene una mutación Y18D que debilita el proceso de antiterminación. Esta mutación se localiza en la interface de NusB-NusE, manteniendo una débil interacción con NusE [50]. Posiblemente, la sustitución de Tyr por Asp desestabiliza la estructura de la proteína, reduciendo el número de contactos hidrofóbicos entre la hélice  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 5 de NusB. Además, se cree que Tyr 18 esté involucrada en una interacción específica con el RNA [51].

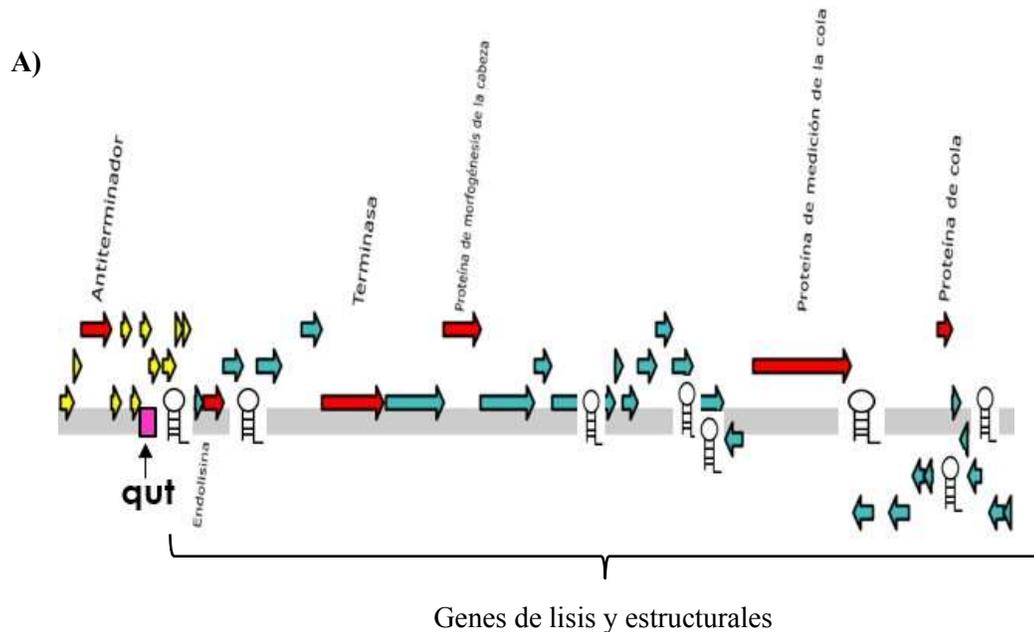
Las propiedades de la superficie local de NusE/S10 son modificadas cuando se encuentra presente el cambio A86D en la mutante nusE71 [50, 52]. Este residuo se encuentra distante de la interface de NusB y de la región de unión a RNA, bloqueando al antiterminador  $\lambda$ N. Se conoce que NusE/S10 interactúa directamente con la RNA polimerasa y es posible que el residuo 86 participe en esta asociación [53]. El fenotipo restrictivo producido por ambas mutaciones es debido entonces a un efecto en la acción

antiterminadora de la proteína  $\lambda$ N y no en su síntesis, manteniéndose en un estado intacto y funcional [54]. De tal forma que el restablecimiento del crecimiento del fago  $\lambda$  en éstas mutantes probablemente se deba al reconocimiento de un sitio de DNA o *qut* en la región promotora *pR'* por la proteína E46, simulando una función equivalente a  $\lambda$ Q (Fig. 25).



**Fig. 25** Sustitución de la función de  $\lambda$ Q por E46 en las mutantes *nusB* y *nusE*, actuando en el sitio *qut* de  $\lambda$ .

Realizando una búsqueda de promotores, se encontró una posible región *qut* en el genoma de mEp021 río arriba de los genes implicados en lisis y en la morfogénesis del fago, compartiendo un 70% de identidad con el sitio *qut* del fago  $\lambda$  (Fig. 26).



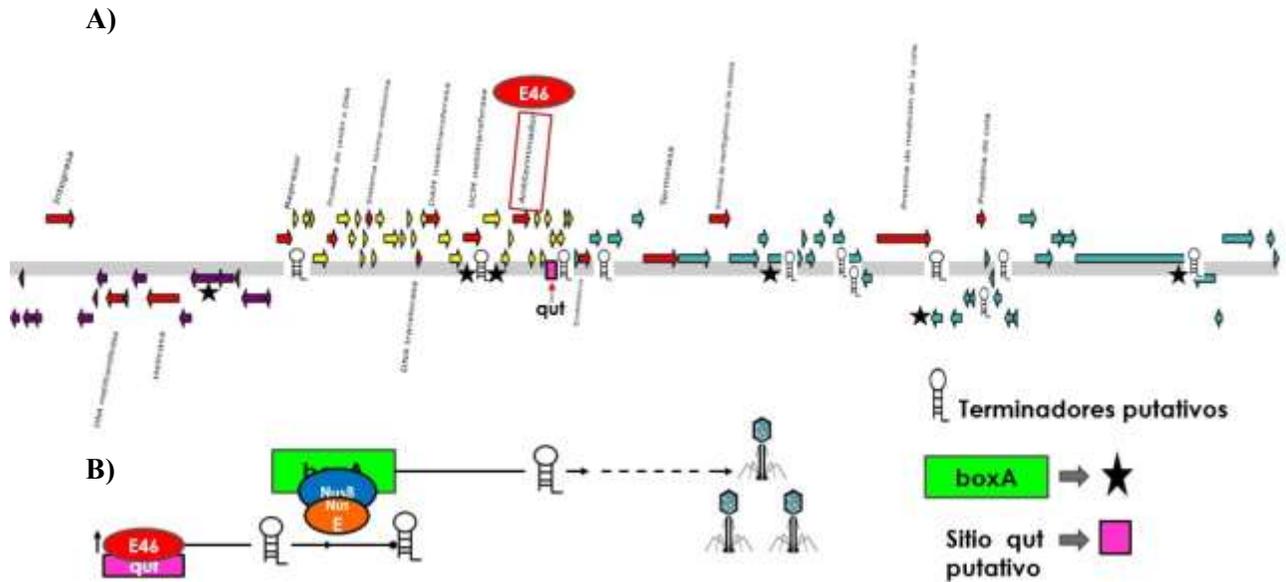
B)

Putativo	706	tattaaaaatgaaaatcagggtaa	729
Qut_021		.   .      .	
Qut_λ	1	TATTGAA---TAAAAT-TGGGTAA	20

**Fig. 26 Posible sitio qut del fago mEp021.** A) Localización del sitio qut putativo (recuadro rosa) río arriba de los genes de lisis y estructurales. B) Alineamiento del sitio qut del fago λ y el sitio qut putativo de mEp021.

La deficiente capacidad de λN para suprimir los terminadores que se encuentran 7kb más allá del sitio nut [48] debido a defectos en los factores NusB y NusE, permitiría que la concentración de λQ expresado sea nula o casi nula. El antiterminador λN sólo es capaz de suprimir terminadores cercanos al sitio nutR, alrededor de 100 pb río abajo de este sitio, en presencia de nusA según ensayos *in vitro* [48, 49]. Independientemente de ello, es necesario que la región λqut se encuentre disponible para que E46 actúe. La presencia de esta región es favorecida por la replicación del genoma del fago λ. En ausencia de λN, cerca del 50% de los transcritos generados a partir del promotor pR, continúan a través del terminador tR1, el cual forma una estructura inestable, dando lugar a la expresión de los genes O y P implicados en replicación, [55, 56]. Esto nos indica que en presencia o no de λN, se generarían copias que presentan este sitio qut, facilitando su reconocimiento por moléculas de E46 (Fig. 25).

Por otro lado, se encontraron secuencias conservadas de la región boxA a lo largo del genoma de mEp021. Se ha observado que la región consenso boxA (C/TGCTCTT(T)A) es indispensable y suficiente para realizar la antiterminación del *rrn* en *E. coli*. No requiere de un antiterminador como N, y únicamente participan los factores Nus del huésped y proteínas ribosomales como S4 para facilitar este proceso [57, 17, 18]. Es posible que el fago mEp021 haya adquirido este tipo ventaja, en el cual el complejo NusB-NusE interactúa con la región boxA y con la polimerasa, contribuyendo a la expresión de genes estructurales esenciales para la generación de progenie (Fig. 27).



**Fig. 27 Modelo hipotético de antiterminación del fago mEp021.** A) Localización de terminadores putativos y de las regiones boxA conservadas en el fago  $\lambda$ , 21, H19-B y en el operón de *rrn* de *E. coli* en el genoma del fago mEp021. B) La expresión de E46 no favorece el desarrollo del fago en las mutantes nusB5 y nusE71, sugiriendo que su actividad es independiente de la acción de estos factores Nus. Debido a que no hay una proteína como N, es probable que el complejo nusB-nusE actúe en las regiones boxA como en el operón *rrn*, fortaleciendo el mecanismo de antiterminación procesiva del fago.

La mutante nusC (gen *rpoB*) que presenta una sustitución en la subunidad  $\beta$  de la RNA polimerasa, restringe la capacidad de mEp021 para desarrollarse a pesar de la sobreexpresión de E46, sugiriendo que este gen es fundamental no sólo para llevar a cabo la antiterminación sino porque interviene en diferentes puntos del proceso de transcripción.

En cuanto a la expresión de E46 en las mutantes nusA1 y nusD026, no se observó efecto alguno. nusD026 o *rho026*, es una mutación en el factor de terminación rho, la cual presenta cierta plasticidad en el crecimiento de  $\lambda$  [58]. Equivalentemente, mEp021 se desarrolla mejor en nusD026 que en las demás mutantes.

La proteína generada por la mutación en nusA permite parcialmente el desarrollo del fago  $\lambda$  a 37°C, a diferencia del mEp021. En ensayos *in vitro*, se ha observado que la adición de varias concentraciones de  $\lambda$ Q en el extracto de la mutante nusA1 (a 37°C) solamente permitió el 25% de su actividad, representado en unidades de galactocinasa, con respecto al extracto de nus<sup>+</sup>, nusB5 y nusE71 (100%). Esta actividad fue restaurada,

cuando se adicionó la proteína nusA, complementando la actividad de nusA1 [59]. Sin embargo, la participación de nusA en la actividad de E46 no se puede deducir en el experimento realizado en este trabajo ya que no se observó un efecto de su expresión en el desarrollo del fago  $\lambda$  y mEp021 en la mutante. Quizás la evaluación de la expresión de pE46 en condiciones con mayor restricción (a 42°C para  $\lambda$ ) para esta mutante, podría darnos alguna pista sobre su actividad.

## IX. CONCLUSIONES

- ❖ E46 presenta características similares al antiterminador Q por análisis bioinformático.
- ❖ La construcción pE46 tiene un efecto poco tóxico sobre el crecimiento de W3110.
- ❖ Se observó la expresión de pE46 en geles de proteínas con un peso molecular de 26.4 kDa.
- ❖ pE46 no tuvo efecto sobre el desarrollo del fago mEp021 en ninguna de las mutantes *nus* evaluadas. Sin embargo, aumentó el título viral del fago  $\lambda$  en las mutantes *nusB5* y *nusE71*.

## X. PERSPECTIVAS

- ❖ Generar la mutante no funcional de E46 y complementarla con la construcción de e46.
- ❖ Evaluar el título de fagos proveniente de la mutante y de la complementación.
- ❖ Evaluar los transcritos de genes estructurales.
- ❖ Realizar un ensayo de complementación con una mutante de  $\lambda$ Q.
- ❖ Implementar un sistema de antiterminación *in vitro*

## XI. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Thomas R, Berdjeb L, Sime-Ngando T & Jacquet S (2011) Viral abundance, production, decay rates and life strategies (lysogeny versus lysis) in Lake Bourget (France). *Environ Microbiol* 13: 616–630
- [2] Koskella, B., & Brockhurst, M. A. (2014). Bacteria–phage coevolution as a driver of ecological and evolutionary processes in microbial communities. *FEMS microbiology reviews*, 38(5), 916-931.
- [3] Clark, Jason R., March, John B. (2006); Bacteriophages and biotechnology: vaccines, gene therapy and antibacterials. *Trends Biotechnol* 24(5): 212–218. doi: 10.1016/j.tibtech.2006.03.003
- [4] Clokie MRJ, Millard AD, Letarov AV & Heaphy S (2011) Phages in nature. *Bacteriophage* 1: 31–45.
- [5] Haq, I. U., Chaudhry, W. N., Akhtar, M. N., Andleeb, S., & Qadri, I. (2012). Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review. *Virology Journal*, 9, 9. doi:10.1186/1743-422X-9-9
- [6] Santangelo, T. J., & Artsimovitch, I. (2011). Termination and antitermination: RNA polymerase runs a stop sign. *Nature Reviews. Microbiology*, 9(5), 319–329. doi:10.1038/nrmicro2560
- [7] Roberts, J.W. (1969) *Nature* 224:1168-1174
- [8] Kumarevel, T., Mizuno, H., & Kumar, P. K. R. (2005). Characterization of the metal ion binding site in the anti-terminator protein, HutP, of *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Research*, 33(17), 5494–5502. doi:10.1093/nar/gki868
- [9] Oda, M., Kobayashi N., Fujita M., Miyazaki Y., Sadaie Y., Kurusu Y., Nishikawa S., (2004). Analysis of HutP-dependent transcription antitermination in the *Bacillus subtilis* hut operon: identification of HutP binding sites on hut antiterminator RNA and the involvement of the N-terminus of HutP in binding of HutP to the antiterminator RNA. *Mol Microbiol.* 51(4): 1155–1168
- [10] Schmalisch, Matthias H., Bachem, S., Jörg, S., (2003). Control of the *Bacillus subtilis* antiterminator protein GlcT by phosphorylation. Elucidation of the phosphorylation chain leading to inactivation of GlcT. *J Biol Chem.* 278(51): 51108–51115. doi: 10.1074/jbc.M309972200
- [11] Grundy F. J., Henkin T. M., (1993). tRNA as a positive regulator of transcription antitermination in *B. subtilis*. *Cell.* 74(3): 475–482.

- [12] Henkin, T. M., & Yanofsky, C. (2002). Regulation by transcription attenuation in bacteria: how RNA provides instructions for transcription termination/antitermination decisions. *Bioessays*, 24(8), 700-707.
- [13] Burmann, B. M. et al. (2010) A NusE:NusG complex links transcription and translation. *Science* 328, 501–504
- [14] Proshkin, S., Rahmouni, R., Mironov, A., & Nudler, E. (2010). Cooperation between Translating Ribosomes and RNA Polymerase in Transcription Elongation. *Science* (New York, N.Y.), 328(5977), 504–508. doi:10.1126/science.1184939
- [15] Condon, C., Squires, C., & Squires, C. L. (1995). Control of rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*, 59(4), 623–645.
- [16] Condon, C., Liveris D., Squires C., Schwartz, I., and Squires C. L. (1995). rRNA operon multiplicity in *Escherichia coli* and the physiological implications of *rrn* inactivation. *J. Bacteriol.* 177:4152–4156
- [17] Greive, Sandra J., Lins August, F., von Hippel, Peter H. (2005). Assembly of an RNA-protein complex. Binding of NusB and NusE (S10) proteins to boxA RNA nucleates the formation of the antitermination complex involved in controlling rRNA transcription in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 280(43): 36397–36408. doi: 10.1074/jbc.M507146200
- [18] Bubunencko, M., Court, D. L., Refaii, A. A., Saxena, S., Korepanov, A., Friedman, D. I., Alix, J.H. (2013). Nus Transcription Elongation Factors and RNase III Modulate Small Ribosome Subunit Biogenesis in *E. coli*. *Molecular Microbiology*, 87(2), 382–393. doi:10.1111/mmi.12105
- [19] Grinwald, M., & Ron, E. Z. (2013). The *Escherichia coli* Translation-Associated Heat Shock Protein YbeY Is Involved in rRNA Transcription Antitermination. *PLoS ONE*, 8(4), e62297. doi:10.1371/journal.pone.0062297
- [20] Greenblatt, J., Nodwell, J.R., Mason, S.W. (1993) Transcriptional antitermination. *Nature*; 364(6436): 401–406. doi: 10.1038/364401a0
- [21] Muteeb, G., Dey, D., Mishra, S., & Sen, R. (2012). A multipronged strategy of an anti-terminator protein to overcome Rho-dependent transcription termination. *Nucleic Acids Research*, 40(22), 11213–11228. doi:10.1093/nar/gks872
- [22] Yang, X. J., Hart, C. M., Grayhac, E. J., Roberts, J. W. (1987). Transcription antitermination by phage lambda gene Q protein requires a DNA segment spanning the RNA start site *Genes Dev.*; 1(3): 217–226.

- [23] Guo, J., & Roberts, J. W. (2004). DNA Binding Regions of Q Proteins of Phages  $\lambda$  and  $\phi 80$ . *Journal of Bacteriology*, 186(11), 3599–3608. doi:10.1128/JB.186.11.3599-3608.2004
- [24] Deighan, P., Diez, C. M., Leibman, M., Hochschild, A., & Nickels, B. E. (2008). The bacteriophage  $\lambda$  Q antiterminator protein contacts the  $\beta$ -flap domain of RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(40), 15305–15310. doi:10.1073/pnas.0805757105
- [25] Strobel, E. J., & Roberts, J. W. (2014). Regulation of promoter-proximal transcription elongation: enhanced DNA scrunching drives  $\lambda$ Q antiterminator-dependent escape from a  $\sigma 70$ -dependent pause. *Nucleic Acids Research*, 42(8), 5097–5108. doi:10.1093/nar/gku147
- [26] Plunkett, G., Rose, D. J., Durfee, T. J., & Blattner, F. R. (1999). Sequence of Shiga Toxin 2 Phage 933W from *Escherichia coli* O157:H7: Shiga Toxin as a Phage Late-Gene Product. *Journal of Bacteriology*, 181(6), 1767–1778.
- [27] Oberto, J., Clerget, M., Ditto, M., Cam, K., Weisberg, R. A. (1993). Antitermination of early transcription in phage HK022. Absence of a phage-encoded antitermination factor; *J Mol Biol.*, 229(2): 368–381. doi: 10.1006/jmbi.1993.1040
- [28] King, R. A., & Weisberg, R. A. (2003). Suppression of Factor-Dependent Transcription Termination by Antiterminator RNA. *Journal of Bacteriology*, 185(24), 7085–7091. doi:10.1128/JB.185.24.7085-7091.2003
- [29] Banik-Maiti, S., King, R. A., Weisberg, R. A. (1997). The antiterminator RNA of phage HK022. *J Mol Biol*; 272(5): 677–687. doi: 10.1006/jmbi.1997.1251
- [30] B. L. Atkinson, M. E. Gottesman (1992). The *Escherichia coli* rpoB60 mutation blocks antitermination by coliphage HK022 Q-function. *J Mol Biol.* September 5; 227(1): 29–37.
- [31] Berdygulova, Z., Esyunina, D., Miropolskaya, N., Mukhamedyarov, D., Kuznedelov, K., Nickels, B. E., ... Minakhin, L. (2012). A novel phage-encoded transcription antiterminator acts by suppressing bacterial RNA polymerase pausing. *Nucleic Acids Research*, 40(9), 4052–4063. doi:10.1093/nar/gkr1285
- [32] Pani, B., Banerjee, S., Chalissery, J., Abishek, M., Loganathan, R. M., Suganthan, R. B., & Sen, R. (2006). Mechanism of Inhibition of Rho-dependent Transcription Termination by Bacteriophage P4 Protein Psi. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(36), 26491–26500. doi:10.1074/jbc.M603982200
- [33] Linderoth, N. A., Tang, G., Calendar, R. (1997). In vivo and in vitro evidence for an anti-Rho activity induced by the phage P4 polarity suppressor protein Psi. *Virology*; 227(1): 131–141. doi: 10.1006/viro.1996.8325
- [34] Kameyama, L., Fernández, L., Calderón, J., Ortiz-Rojas, A., Patterson, T. A. (1999). Characterization of wild lambdoid bacteriophages: detection of a wide

distribution of phage immunity groups and identification of a nus-dependent, nonlambdoid phage group. *Virology*. ; 263(1): 100–111. doi: 10.1006/viro.1999.9888

[35] Martínez-Peñafiel, E., Fernández-Ramírez, F., Ishida, C., Reyes-Cortés, R., Sepúlveda-Robles, O., Guarneros-Peña, G., Kameyama, L. (2012). Overexpression of Ipe protein from the coliphage mEp021 induces pleiotropic effects involving haemolysis by HlyE-containing vesicles and cell death. *Biochimie*, 94(6), 1262–1273. doi:10.1016/j.biochi.2012.02.004

[36] Lastra, Vargas, (2013). Caracterización del gen del represor del bacteriófago mEp021 de *Escherichia coli*. Tesis de Maestría (datos no publicados).

[37] Bachmann, B. J. (1972). Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12. *Bacteriological Reviews*, 36(4), 525–557.

[38] Jensen, K. F. (1993). The *Escherichia coli* K-12 “wild types” W3110 and MG1655 have an rph frameshift mutation that leads to pyrimidine starvation due to low pyrE expression levels. *Journal of Bacteriology*, 175(11), 3401–3407.

[39] D. Hanahan (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.*; 166(4): 557–580.

[40] Strauch, M. A., Perego, M., Burbulys, D. and Hoch, J. A. (1989). The transition state transcription regulator AbrB of *Bacillus subtilis* is autoregulated during vegetative growth. *Molecular Microbiology*, 3: 1203–1209. doi:10.1111/j.1365-2958.1989.tb00270.x

[41] Shepard, S. M., Danzeisen, J. L., Isaacson, R. E., Seemann, T., Achtman, M., & Johnson, T. J. (2012). Genome Sequences and Phylogenetic Analysis of K88- and F18-Positive Porcine Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 194(2), 395–405. <http://doi.org/10.1128/JB.06225-11>

[42] Casjens, S. R., Gilcrease, E. B., Winn-Stapley, D. A., Schicklmaier, P., Schmieger, H., Pedulla, M. L., Ford, M. E., Houtz, J. M., Hatfull G. F., Hendrix, R. W. (2005). The Generalized Transducing *Salmonella* Bacteriophage ES18: Complete Genome Sequence and DNA Packaging Strategy. *Journal of Bacteriology*, 187(3), 1091–1104. <http://doi.org/10.1128/JB.187.3.1091-1104.2005>

[43] Vorobiev, S. M., Gensler, Y., Vahedian-Movahed, H., Seetharaman, J., Su, M., Huang, J. Y., Xiao, R., Kornhaber, G., Montelione, G. T., Tong, L., Ebright, R. H., Nickels, B. E. (2014). Structure of the DNA-binding and RNA polymerase-binding region of transcription antitermination factor  $\lambda$ Q. *Structure* (London, England : 1993), 22(3), 488–495. <http://doi.org/10.1016/j.str.2013.12.010>

- [44] Kosinski, M.J., Rinas, U. & Bailey, J.E. (1992) Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside influences the metabolism of *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 36: 782. doi:10.1007/BF00172194
- [45] Law, J., Lee, S., Tseng, A., Tsui, K. W., & Yu, N. (2002). The role of glycerol and isopropyl thiogalactoside in *Escherichia coli* growth and lactose induction of  $\beta$ -galactosidase. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEMI)* Vol, 2, 97-102.
- [46] Friedman, D. (1971). A bacterial mutant affecting  $\lambda$  development. In *The Bacteriophage Lambda*, A. D. Hershey, ed. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory), pp. 733-738.
- [47] Georgopoulos, C. P. (1971 a). A bacterial mutation affecting N function. In *The Bacteriophage Lambda*, A. Hershey, ed. (Cold Spring Harbor), New York: Cold Spring Harbor Laboratory), pp. 639-645.
- [48] Mason, S. W., Li, J., Greenblatt, J. (1992). Host factor requirements for processive antitermination of transcription and suppression of pausing by the N protein of bacteriophage lambda. *J Biol Chem.* 267(27): 19418–19426.
- [49] DeVito, J., & Das, A. (1994). Control of transcription processivity in phage lambda: Nus factors strengthen the termination-resistant state of RNA polymerase induced by N antiterminator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(18), 8660–8664.
- [50] Luo, X., Hsiao, H.-H., Bubunenko, M., Weber, G., Court, D. L., Gottesman, M. E., Urlaub, H., Wahl, M. C. (2008). Structural and Functional Analysis of the *E. coli* NusB-S10 Transcription Antitermination Complex. *Molecular Cell*, 32(6), 791–802. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.10.028>
- [51] Altieri, A. S., Mazzulla, M. J., Horita, D. A., Coats, R. H., Wingfield, P. T., Das, A., Court, D. L., Byrd, R. A. (2000) The structure of the transcriptional antiterminator NusB from *Escherichia coli*. *Nat Struct Biol.* 7(6): 470–474. doi: 10.1038/75869
- [52] Court, D. L., Patterson, T. A., Baker, T., Costantino, N., Mao, X., & Friedman, D. I. (1995). Structural and functional analyses of the transcription-translation proteins NusB and NusE. *Journal of Bacteriology*, 177(9), 2589–2591.
- [53] Mason, S. W. & Greenblatt J. (1991). Assembly of transcription elongation complexes containing the N protein of phage lambda and the *Escherichia coli* elongation factors NusA, NusB, NusG, and S10. *Genes Dev.* 5(8): 1504–1512.
- [54] Das, A., Ghosh, B., Barik, S., & Wolska, K. (1985). Evidence that ribosomal protein S10 itself is a cellular component necessary for transcription antitermination by phage lambda N protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(12), 4070–4074.

- [55] Court, D., Brady, C., Rosenberg, M., Wulff, D. L., Behr, M., Mahoney, M. & Izumi, S. (1980). Control of transcription termination: a rho dependent termination site in bacteriophage lambda. *J. Mol. Biol.* 738, 231-254.
- [56] Dambly-Chaudière, C., Gottesman, M., Debouck, C., Adhya, S. (1983). Regulation of the pR operon of bacteriophage lambda. *J Mol Appl Genet.* ; 2(1): 45–56.
- [57] Torres, M., Condon, C., Balada, J.-M., Squires, C., & Squires, C. L. (2001). Ribosomal protein S4 is a transcription factor with properties remarkably similar to NusA, a protein involved in both non-ribosomal and ribosomal RNA antitermination. *The EMBO Journal*, 20(14), 3811–3820. <http://doi.org/10.1093/emboj/20.14.3811>
- [58] Das, A., Gottesman, M. E., Wardwell, J., Trisler, P., & Gottesman, S. (1983). A mutation in the Escherichia coli rho gene that inhibits the N protein activity of phage λ. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(18), 5530–5534.
- [59] Barik, S., Das, A. (1990). An analysis of the role of host factors in transcription antitermination in vitro by the Q protein of coliphage lambda. *Mol Gen Genet.* 222(1): 152–156
- [60] Esyunina, D., Klimuk, E., Severinov, K., & Kulbachinskiy, A. (2015). Distinct pathways of RNA polymerase regulation by a phage-encoded factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(7), 2017–2022. <http://doi.org/10.1073/pnas.1416330112>
- [61] Deighan P., Hochschild A. (2007). The bacteriophage lambda Q anti-terminator protein regulates late gene expression as a stable component of the transcription elongation complex. *Mol Microbiol.* 63(3): 911920. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05563.x
- [62] Tagami, S., Sekine, S., Minakhin, L., Esyunina, D., Akasaka, R., Shirouzu, M., ... Yokoyama, S. (2014). Structural basis for promoter specificity switching of RNA polymerase by a phage factor. *Genes & Development*, 28(5), 521–531. <http://doi.org/10.1101/gad.233916.113>
- [63] Ranjan, A., Sharma, S., Banerjee, R., Sen, U., & Sen, R. (2013). Structural and mechanistic basis of anti-termination of Rho-dependent transcription termination by bacteriophage P4 capsid protein Psi. *Nucleic Acids Research*, 41(14), 6839–6856. <http://doi.org/10.1093/nar/gkt336>

## XII. APÉNDICES

### Apéndice 1

#### **Soluciones para bacterias y fagos**

##### *1. Medio Luria-Bertani (LB)*

Para 1 L:

Bacto-triptona            10 g

Extracto de levadura    5 g

NaCl                        5 g

Para *Medio Agar*, adicionar a lo anterior 15 g de Bacto-agar

##### *2. Medio Tφ suave*

Triptona                  10 g

Agar                        10 g

NaCl                        2.5 g

NaOH                      concentración final 2M

MgSO<sub>4</sub> 1M                10 ml

-Aforar a 1L

##### *3. Buffer TMG (para diluciones de fagos)*

Para 1L:

Tris base                1.21 g

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O            1.20 g

Gelatina                0.10 g

Ajustar a un pH 7.4 con HCl. Esterilizar en autoclave

## Apéndice 2

### **Soluciones para extracción de plásmido con miniPREP**

#### ***1. Solución I***

50 mM glucosa

25 mM Tris-Cl (pH 8.0)

10 mM EDTA (pH 8.0)

Esterilizar en autoclave. Guardar a 4°C

#### ***2. Solución II***

0.2 N NaOH

1% SDS

#### ***4. Solución III***

5M Acetato de potasio      60 ml

Ácido acético glacial      11.5 ml

H<sub>2</sub>O                              28.5 ml

## Apéndice 3

### **Preparación de DEAE-Celulosa**

Para 1L:

Pesar 200 gr de resina DEAE-celulosa. A esto, agregar 800 ml de HCl 0.05N (pH < 4.5). Neutralizar con una solución de NaOH concentrado hasta alcanzar un pH 6.8, manteniendo la celulosa en agitación. Dejar que la resina precipite y decantar el sobrenadante. Realizar lavados con medio LB (pH 6.8-7) al menos 3 veces o hasta que el pH sea equivalente a la del medio. Colocar esta suspensión en frascos de vidrio en una proporción de 75% de celulosa y 25% de medio LB. Se puede añadir azida de sodio

(0.1%) para prevenir la contaminación o en este caso, se esterilizó la solución. Los frascos de celulosa se almacenan a 4°C hasta su uso.

#### Apéndice 4

##### **Preparación de células quimiocompetentes con 0.1 M CaCl<sub>2</sub>**

Añadir 500 µl de cultivo O/N en 50 ml de medio LB (Dil. 1:100) en un matraz erlenmeyer de 250 ml. Crecer la bacteria (DH5α) hasta alcanzar una densidad óptica entre 0.3 y 0.5. Colocar rápidamente en hielo e incubar por 15 min. Transferir el cultivo a un tubo falcon preenfriado y centrifugar a 4000 x g por 10 min a 4°C. Decantar el sobrenadante y mezclar gentilmente la pastilla en 25 ml de 0.1 M CaCl<sub>2</sub> frío e incubar por 1h en hielo. Centrifugar a 2700 x g por 10 min a 4°C y descartar el sobrenadante. Resuspender la pastilla cuidadosamente en 2.5 ml de 0.1M CaCl<sub>2</sub> frío y agregar el 15% glicerol (v/v). Hacer alícuotas de 200 µl en tubos eppendorf y almacenar a -70°C hasta su uso.

#### Apéndice 5

##### **Preparación de Geles de Tris-glicina al 12.5%**

Montar y ajustar bien los moldes (separadores de vidrio) con el fin de prevenir una fuga al verter el gel. Preparar el gel separador y concentrador con los siguientes reactivos:

##### ***Gel separador***

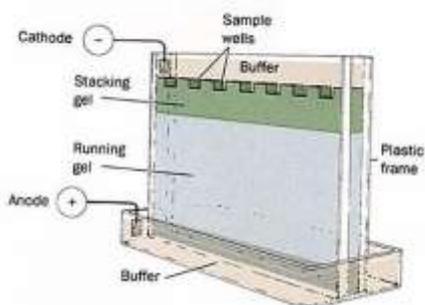
<b><i>Reactivos</i></b>	<b><i>12.5 % (en ml)</i></b>
<i>Acrilamida</i>	2.5
<i>Buffer pH 8.8</i>	1.875
<i>SDS 10%</i>	0.075
<i>H<sub>2</sub>O</i>	3
<i>Persulfato</i>	0.05
<i>TEMED</i>	0.015
<i>Vol. Total</i>	7.515

Vaciar el gel rápidamente en los moldes de vidrio y dejar que se solidifique. Preparar el gel concentrador y verter inmediatamente en los moldes. Colocar los peines y esperar que se polimerice adecuadamente.

### ***Gel concentrador***

<b><i>Reactivos</i></b>	<b><i>5% (en ml)</i></b>
<i>Acrilamida</i>	0.83
<i>Buffer pH 6.8</i>	1.56
<i>SDS 10%</i>	0.062
<i>H<sub>2</sub>O</i>	5
<i>Persulfato</i>	0.031
<i>TEMED</i>	0.00313
<i>Vol. Total</i>	6.2351

**Nota:** Los últimos dos reactivos que se agregan en la preparación de los geles, son el persulfato y el TEMED, ya que son necesarios para catalizar la polimerización de la acrilamida.



**Fig. 28** Montaje del gel separador y concentrador.

### **Soluciones:**

#### **1.- Acrilamida 30% T, 2.7 % bis**

Pesar 292 g de Acrilamida y 8 g de Bis-acrilamida. Disolver y aforar a 1L. Guardar a 4°C.

#### **2.- Buffer 4X para el gel separador. (Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8)**

Pesar 36.3 g de Trisma base. Disolver y ajustar el pH con HCl y aforar a 200 ml con H<sub>2</sub>O destilada.

**3.- Buffer 4X para el gel concentrador. (Tris-HCl 0.5M, pH 6.8)**

Pesar 60 g de Trisma base. Disolver y ajustar el pH con HCl. Aforar a 1000 ml con H<sub>2</sub>O destilada.

**4.- SDS 10%**

Disolver 50 g de SDS y aforar a 500 ml con H<sub>2</sub>O destilada.

**5.- Persulfato de amonio 10%**

Disolver 0.05 g de persulfato de amonio en 500  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O. Guardar a -20°C.

**6.- Buffer de tratamiento 2X. (Tris-HCl 0.125 M, pH 6.8; SDS 4%; Glicerol 20%; 2-mercaptoetanol 10 %)**

Agregar 2.5 ml de solución (3), 4 ml de solución (4), 2 ml de glicerol y 1 ml de 2-mercaptoetanol. Mezclar y aforar a 10 ml con H<sub>2</sub>O destilada. Disolver una pizca de azul de bromofenol.

**7.- Tris-glicina (Tris 0.25 M, pH 8.3; Glicina 1.92 M)**

Pesar y disolver 30 g de Trisma base y 150 g de glicina. Aforar a 1000 ml con H<sub>2</sub>O destilada. Guardar a temperatura ambiente en frasco ámbar.

**8.- Buffer de tanque (Tris 0.025 M, pH 8.3; Glicina 0.192 M; SDS 0.1%)**

Agregar 100 ml de la solución (7) y 10 ml de la solución (4). Mezclar y aforar a 1000 ml con H<sub>2</sub>O destilada.

**9.- Solución stock de azul coomasie**

Disolver 2 g de azul coomasie R250 en H<sub>2</sub>O destilada y aforar a 200 ml.

**10.- Solución de tinción (Azul coomasie R-250 0.125%, metanol 50%, ácido acético 10%)**

Agregar 62.5 ml de solución (9), 250 ml de metanol y 50 ml de ácido acético. Disolver y aforar con H<sub>2</sub>O destilada a un volumen final de 500 ml.

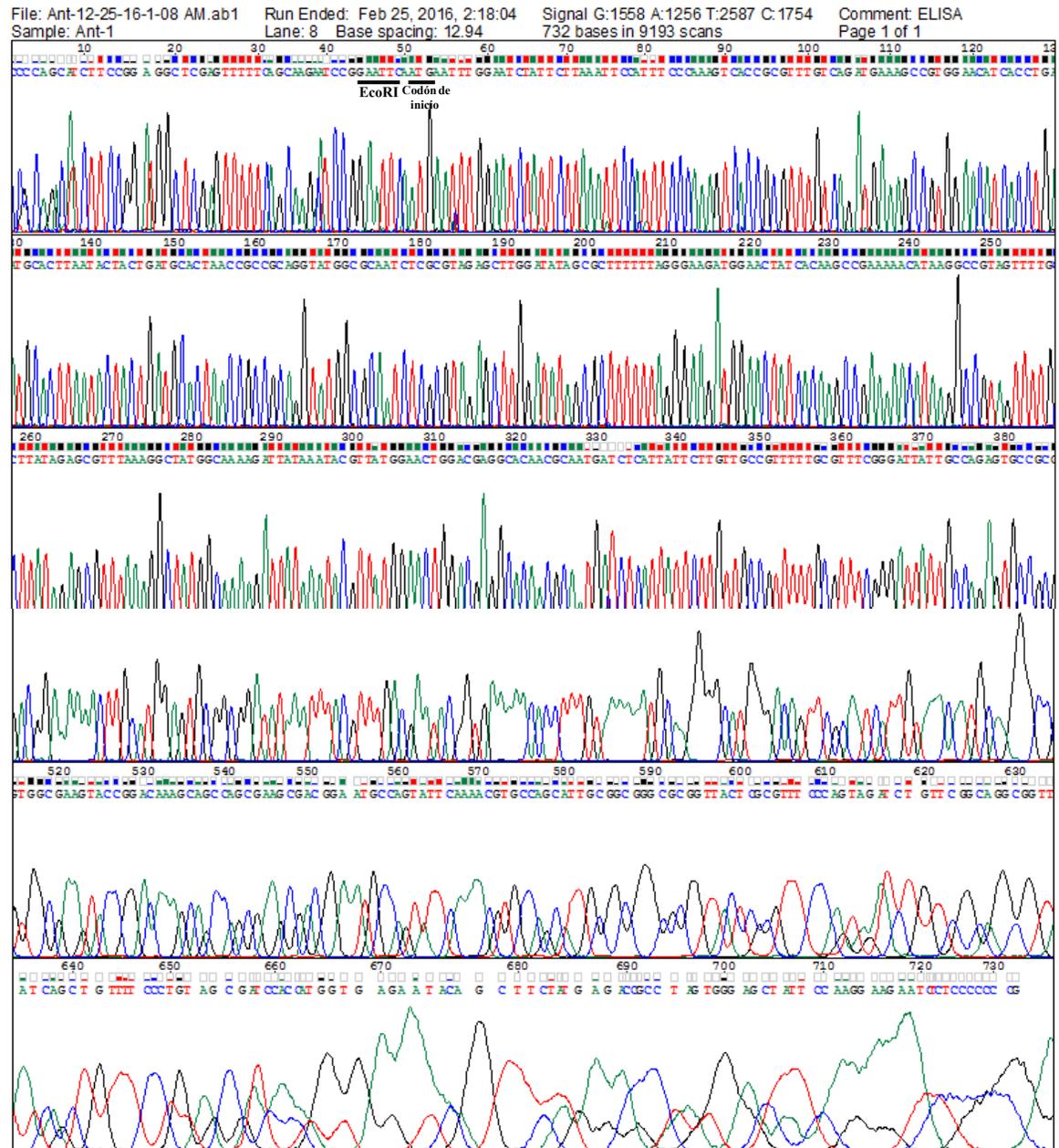
**11.- Solución desteñidora**

Disolver 250 ml de metanol y 50 ml de ácido acético. Aforar a 500 ml con H<sub>2</sub>O destilada.

### XIII. ANEXOS

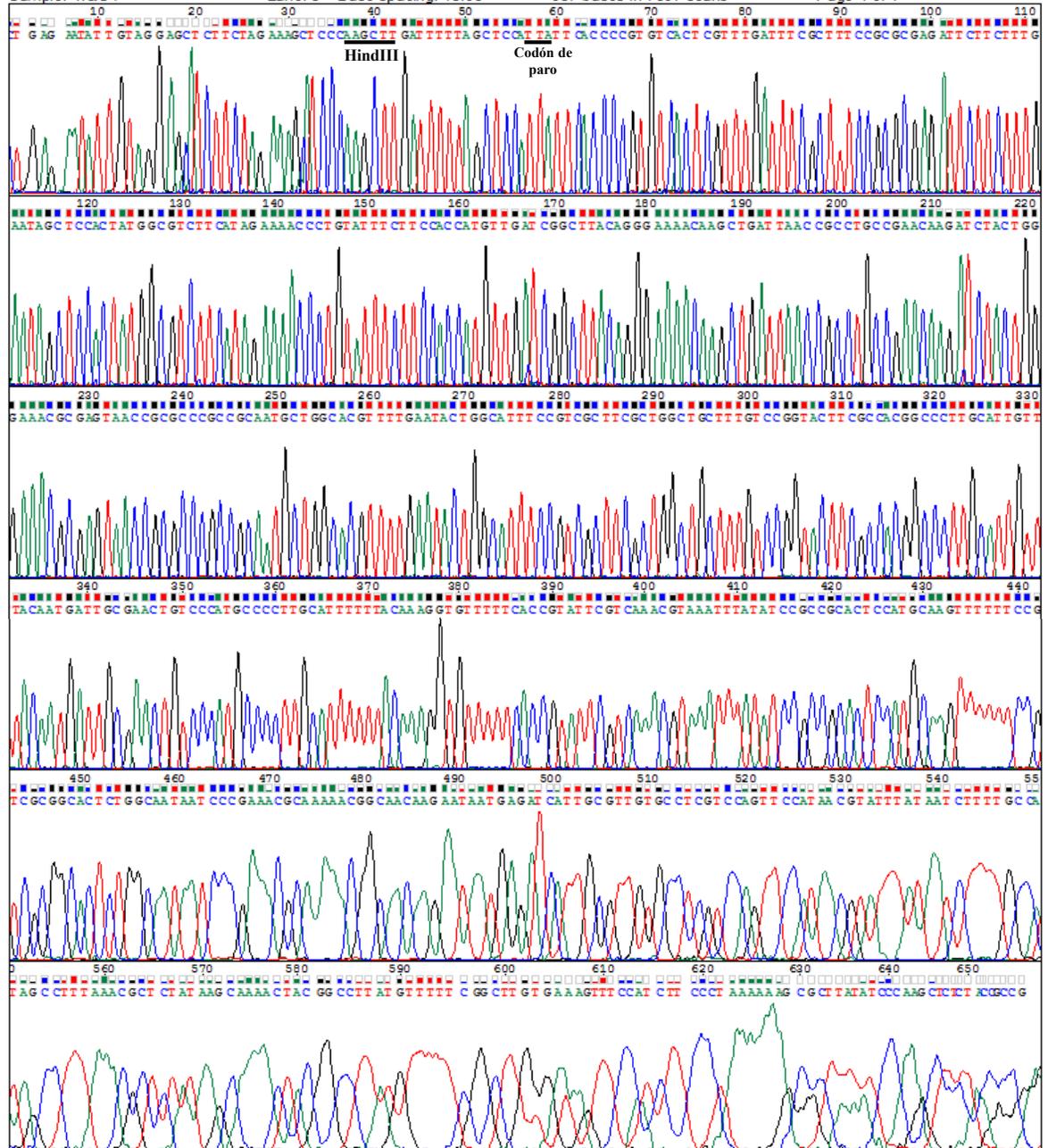
#### **Anexo 1.** Electroferograma de la construcción de pJET1.2/blunt\_e46 (Fwd)

*Candidata 1*



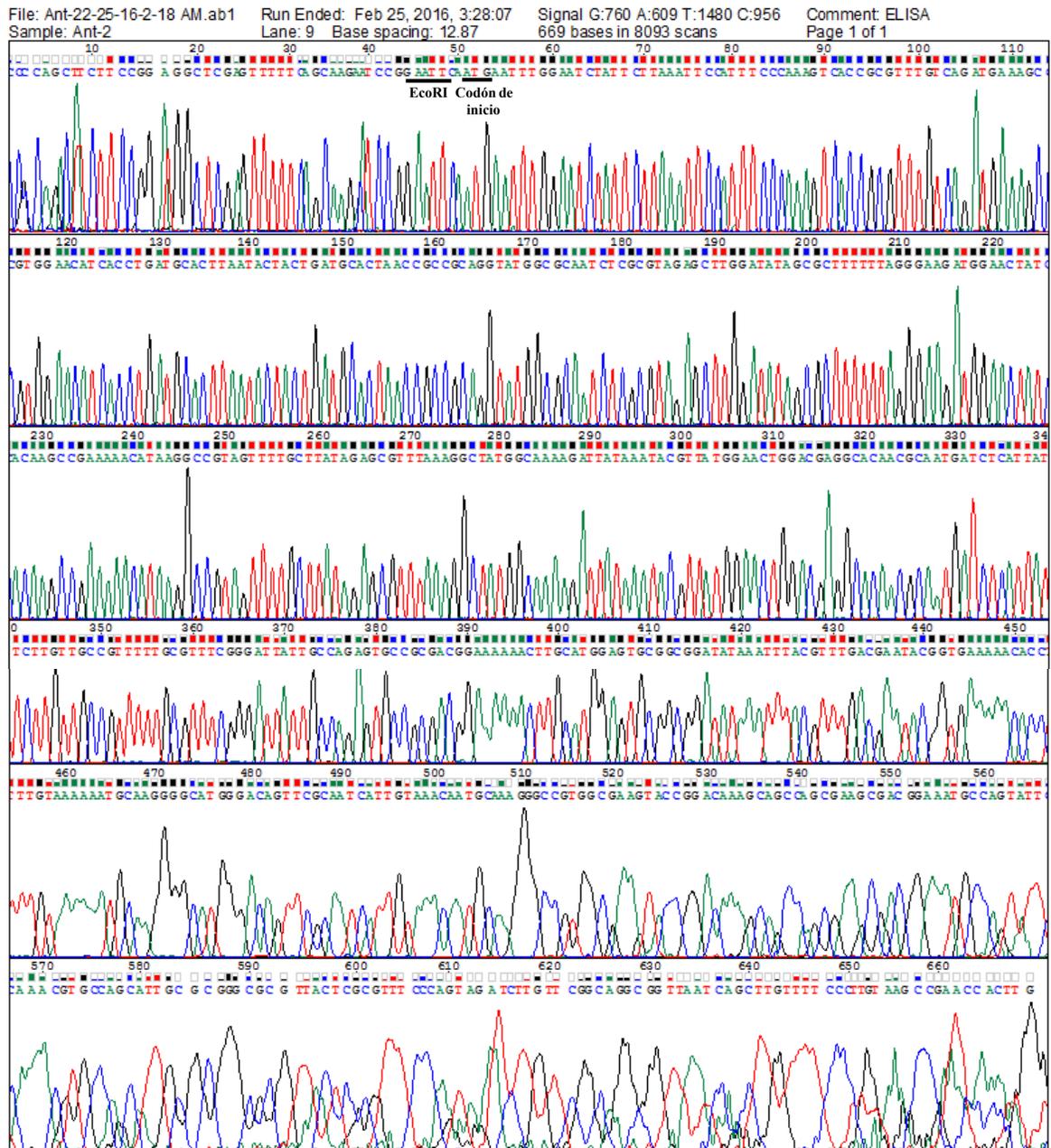
# Electroferograma de la construcción de pJET1.2/blunt\_e46 (RV)

File: 1.QC42-22-16-4-15 PM.ab1 Run Ended: Feb 22, 2016, 17:25:01 Signal G: 600 A: 467 T: 1411 C: 865 Comment: ELISA  
Sample: 1.QC4 Lane: 3 Base spacing: 13.68 657 bases in 7897 scans Page 1 of 1



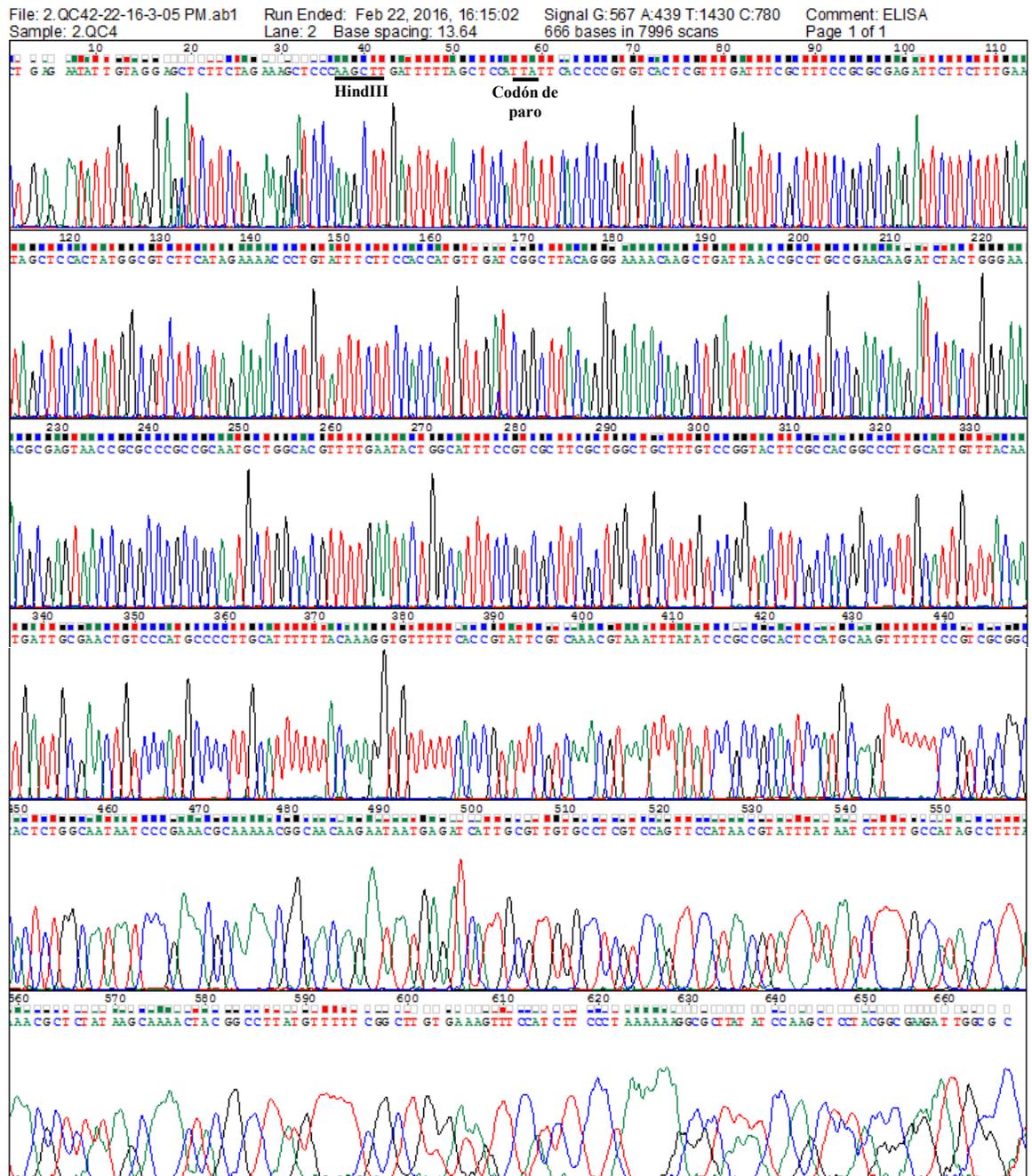
Candidata 2

Electroferograma de la construcción de pJET1.2/blunt\_e46 (Fwd)

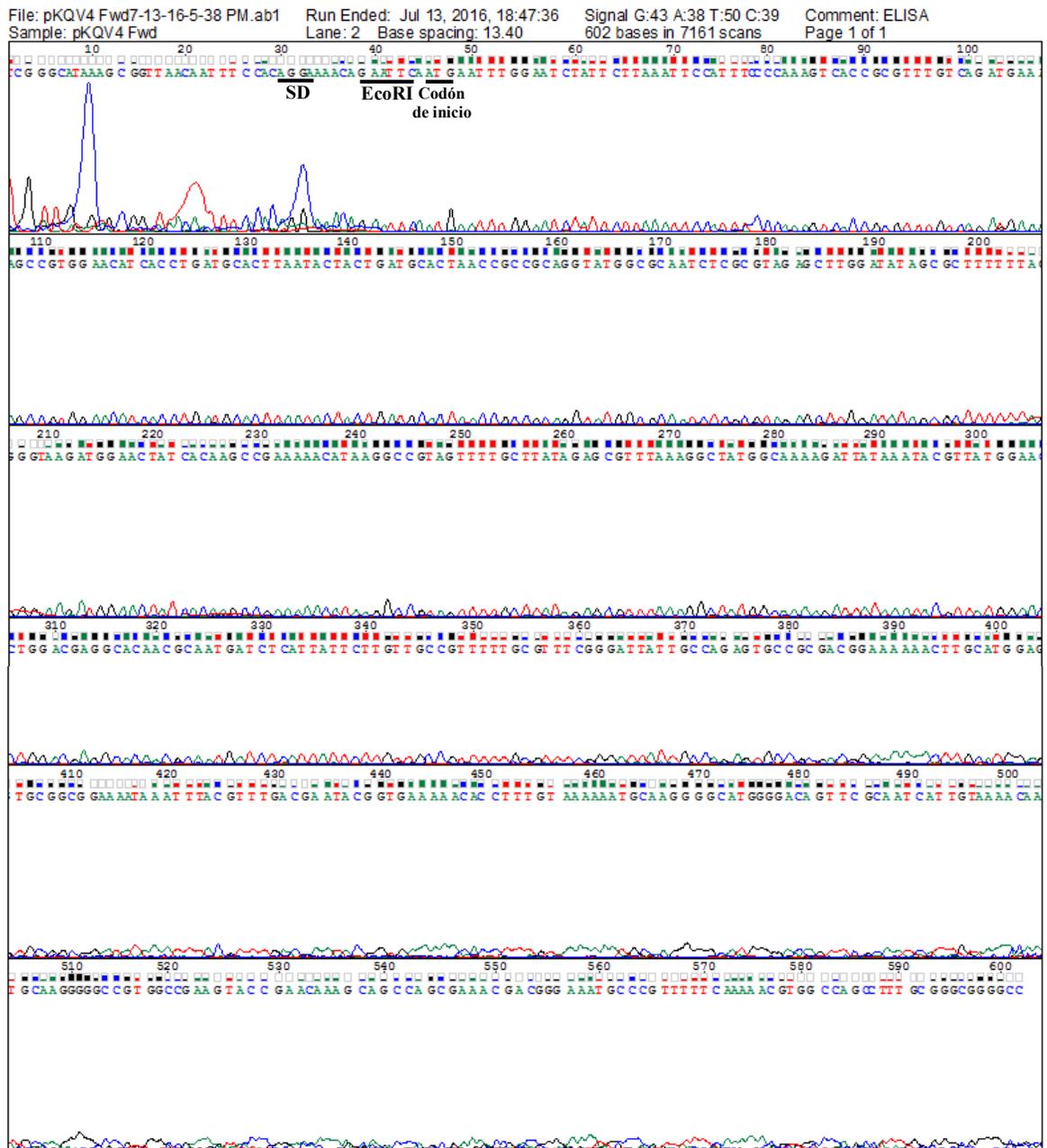


Candidata 2

Electroferograma de la construcción de pJET1.2/blunt\_e46 (Rv)



**Anexo 2.** Electroferograma de la construcción de pKQV4\_e46 (Fwd)



# Electroferograma de la construcción de pKQV4\_e46 (Rv)

