



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

**Unidad Zacatenco**

**Departamento de Genética y Biología Molecular**

**“Estudio de la interacción de RNasa II y RNasa PH con el  
RNasa E de *Escherichia coli in vivo*”**

**TESIS**

Que presenta

**LBT Emmanuel Solís Romo**

Para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

En la especialidad de

**Genética y Biología Molecular**

Director de Tesis: Dr. Jaime García Mena

## **Comité tutorial**

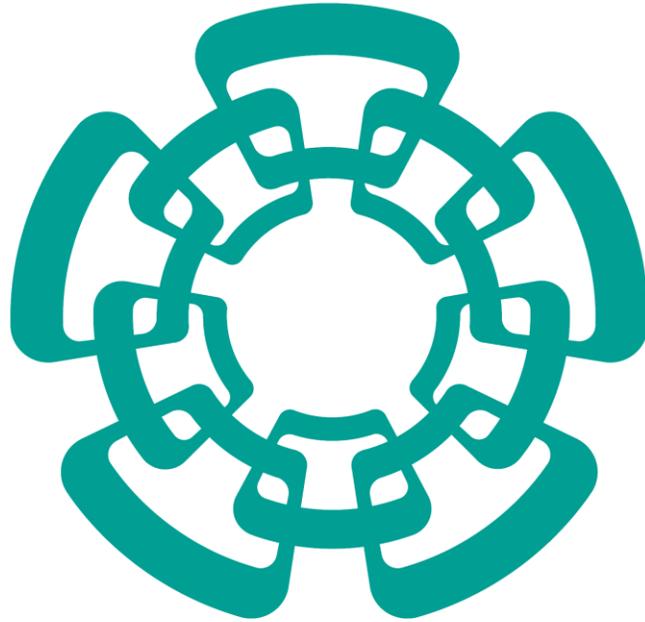
### **ASESORES**

Dr. Bulmaro Cisneros Vega  
Departamento de Genética y Biología Molecular  
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN

### **ASESOR EXTERNO AL DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

Dr. Carlos Hoyo Vadillo  
Departamento de Farmacología  
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Genómica Ambiental del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Zacatenco, bajo la dirección del Dr. Jaime García Mena.



# Cinvestav

Se agradece el apoyo del Biol. Alberto Piña Escobedo por su asistencia con los reactivos, al Sr. Rodrigo García Gutiérrez por su asistencia con el material del laboratorio y a la Lic. Viridiana Rosas Ocegueda por su asistencia administrativa.

Este trabajo fue financiado por Cinvestav, CONACyT 163235 INFR-2011-01 y CONACyT-255374 CB-2015-01.

Emmanuel Solis Romo (CVU: 919105) recibió una Beca de Maestría del CONACyT 726434.

## **Agradecimientos académicos**

A Alberto Piña por los consejos y supervisión experimental

A Rodrigo García por la asistencia técnica

A Viridiana Rosas y Gabriela Mora por la asistencia administrativa y académica

A los Doctores Carlos Hoyo y Bulmaro Cisneros como asesores de tesis.

A todos los profesores investigadores del departamento de Genética y Biología Molecular por sus enseñanzas.

Al Dr. Jaime García Mena por su paciencia, sugerencias y dirección para la realización de este trabajo.

## **Agradecimientos personales**

A mi familia, mi hermana Isabel y mi madre Leticia por todo el cariño y la comprensión, mis tíos: Carmen, Manuel, Carlos, Rosy, Bertha y Raquel por la motivación y apoyo.

A mis amigos: Luisa, Irving y Jairo, por los buenos momentos y por los consejos.

A la Dra. Yolanda Romo Lozano, maestra y amiga quien me motivó a seguir adelante y mejorar como profesionista.

## Resumen

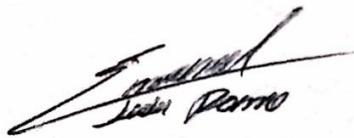
El degradosoma de RNA (RNAD) en *Escherichia coli* es un complejo enzimático esencial en la degradación de especies de RNA como consecuencia del metabolismo o condiciones ambientales particulares. Éste posee cuatro elementos canónicos: RNasa E, Helicasa dependiente de RNA (RhIB), PNPasa y Enolasa. Además de estos componentes, existen algunos componentes menores capaces de interactuar en el RNAD, entre ellos se encuentran otras RNasas como RNasa II y RNasa PH, estas dos enzimas son capaces de modificar la interacción y la especificidad del RNAD. En trabajos previos se ha demostrado la interacción entre la RNasa E y las RNasas II y PH, mediante ensayos *in vitro*, sin embargo, esto aún no se ha confirmado mediante estudios *in vivo*. En este trabajo se pretendió realizar un estudio *in vivo* empleando la técnica FRET para determinar la interacción entre RNasas que fueron fusionadas con los fluoróforos CFP y phi-YFP mediante un proceso de recombinación conocido como *recombineering*. Se generaron pares de proteínas de fusión siendo las RNasa II y RNasa PH fusionadas a la proteína phi-YFP, mientras que la RNasa E, tanto en su versión completa como trunca (701) fue fusionada a la proteína CFP. Las cepas generadas en este trabajo (LBY y LHY) y las cepas obtenidas previamente fueron comprobadas por Fluorimetría y PCR. Debido al tiempo limitado y condiciones extraordinarias, el trabajo no pudo concluirse mediante la comprobación de FRET, sin embargo, las cepas LBY y LHY se consideran listas para ser empleadas en trabajos futuros.

## Abstract

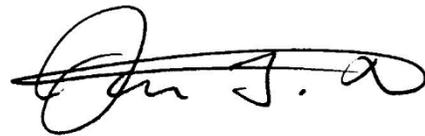
The RNA degradosome (RNAD) in *Escherichia coli* is an enzymatic complex essential for the turnover of distinct species of RNA as consequence of metabolism or environmental conditions. This complex possesses 4 canonical factors: RNase E, an RNA dependent helicase (RhlB), PNPase and Enolase. Besides these components, other enzymes can interact with the RNAD; among them we can found RNase II and RNase PH, these two enzymes are able to modify the interaction and specificity of the RNAD. Previous *in vitro* work showed that an interaction exists between the RNase E and these two RNases. There is a lack of information regarding these interactions *in vivo*. In this work we pretended to realize an *in vivo* analysis applying the FRET technique to determine obtain evidence of proximity of RNases fused with the fluorophores CFP and phi-YFP applying a homologue recombination technique called *Recombineering*. Two proteins RNase II and RNase PH were fused with the phi-YFP fluorophore, and the RNase E or the truncated version (701) were fused with the CFP fluorophore. The strains generated in this work (LBY and LHY) and the previously generated strains were confirmed with fluorimetry and PCR. Due to the limited time and extraordinary worldwide health conditions, this work could not be brought to completion, however, the strains LBY and LHY are ready to be used in future works.

## Manifiesto

El trabajo completo de este proyecto no se pudo realizar debido a la situación de emergencia y confinamiento declarado por las autoridades en todo el país y como consecuencia en el Cinvestav, que obligó el cierre de instalaciones y suspensión de actividades a partir del miércoles 18 de marzo del año 2020. A la fecha no se ha pido regresar a las actividades.



L. B. T. Emmanuel Solis Romo



Dr. en C. Jaime García Mena

Ciudad de México, miércoles 14 de Julio del año 2020.

## Índice

1. Introducción	1
1.1 Ribonucleasas Bacterianas.	1
1.2 Componentes principales del degradosoma	4
1.3 Componentes minoritarios del degradosoma.	6
1.4 La ribonucleasa PH (RNasa PH)	8
1.5 La ribonucleasa II (RNasa II)	10
1.6 RNAs pequeños (sRNAs) y su interacción con el degradosoma	11
1.7 Fröster Resonance Emission Transfer (FRET).	13
1.8 Sistema RED	14
2. Antecedentes	15
3. Justificación	17
4. Hipótesis	17
5. Objetivos	17
5.1 General	17
5.2 Objetivos Específicos	18
6. Estrategia general	18
7. Metodología	19
7.1 Preparación de cepas bacterianas	19
7.2 Aislamiento de plásmido mediante el protocolo de lisis alcalina	19
7.3 Extracción orgánica de DNA	20
7.4 Reacción en cadena de la polimerasa	20
7.5 Fraccionamiento electroforético en gel	20
7.6 Generación de células competentes	21
7.7 Transformación bacteriana con plásmidos	21
7.8 Purificación de casetes recombinantes	21

7.9 Inducción del sistema de recombinación RED y preparación de células recombinantes.	22
7.10 Electroporación	22
7.11 Tratamientos de estrés celular	23
7.12 Cálculo de FRET y ensayos fluorimétricos	23
8. Resultados	24
8.1 Diseño experimental	24
8.2 Caracterización de cepas	25
8.3 Generación de las cepas LHY y LBY	27
9. Discusión	28
10. Conclusiones	31
11. Bibliografía	31

## Índice de tablas

Tabla 1. Cepas empleadas en este trabajo	40
Tabla 2. Plásmidos empleados en este trabajo	40
Tabla 3. Oligonucleótidos empleados en este trabajo	41
Tabla 4. Protocolo empleado para amplificaciones por PCR	42
Tabla 5. Fórmulas para cálculo de FRET	42

## Índice de figuras

Figura 1. Productos de PCR para el gen piruvato quinasa en todas las cepas	43
Figura 2. Productos de PCR para RNasa E en todas las cepas	43
Figura 3. Productos de PCR para RNasa PH en todas las cepas	44
Figura 4. Productos de PCR para RNasa II en todas las cepas	44
Figura 5. Cepa LHY con diferentes productos de PCR	45
Figura 6. Espectrofluorimetría de las cepas para CFP	45
Figura 7. Espectrofluorimetría de las cepas para phi-YFP	46
Figura 8. Amplificaciones de casetes phi-YFP-Cloranfenicol para RNasa II y RNasa PH	46
Figura 9. Digestión de productos de casete phi-YFP-Cloranfenicol y plásmido pL05CtY con la enzima de restricción DpnI	47
Figura 10. Esquema del plásmido pL05CtY	47
Figura 11. Mapa de restricción del plásmido pL05CtY por la enzima DpnI	48
Figura 12. Esquema del procedimiento de patching plating para selección de colonias transformantes.	48
Figura 13. Esquema de la técnica Toothpicking para confirmación de colonias transformadas.	49
Figura 14. Selección de transformantes para cepa LBY.	49
Figura 15. Selección de transformantes para cepa LHY	50
Figura 16. Ensayo espectrofluorimétrico para las candidatas de la cepa LBY	51
Figura 17. Ensayo espectrofluorimétrico para las candidatas de la cepa LH	51

## Abreviaciones

<b>RNAD</b>	Degradosoma de RNA
<b>CFP</b>	Proteína cian fluorescente
<b>YFP</b>	Proteína amarillo fluorescente
<b>RNasa PH</b>	Ribonucleasa PH
<b>RNasa II</b>	Ribonucleasa II
<b>RNasa E</b>	Ribonucleasa E
<b>RNasa G</b>	Ribonucleasa G
<b>RhIB</b>	Helicasa B de RNA dependiente de ATP
<b>mRNA</b>	RNA mensajero
<b>tRNA</b>	RNA de transferencia
<b>rRNA</b>	RNA ribosomal
<b>sRNA</b>	RNA pequeño
<b>AR RBD</b>	Dominio de unión a RNA abundante en arginina
<b>RppH</b>	RNA Pirofosforilasa
<b>RNaseq</b>	Secuenciación de RNA
<b>PAP</b>	Poli A Fosforilasa
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>RBP</b>	Proteína de unión a RNA

# 1.- Introducción

## 1.1 Ribonucleasas Bacterianas

La cantidad de RNA en la célula está en un flujo constante, éste es generado como respuesta a estímulos, regulando el metabolismo y como parte normal del crecimiento celular, de igual manera puede ser degradado al encontrarse la célula en una fase estacionaria, durante condiciones de estrés o cuando la bacteria está por morir. La regulación de mRNA permite hacer un ajuste en la cantidad de proteínas como respuesta a cambios ambientales o diferentes etapas del desarrollo. La duración de un transcrito antes de ser degradado va en función del requerimiento de la proteína que codifica (Janga & Babu, 2009). En la mayoría de las bacterias, el recambio es generalmente rápido y en el caso de *Escherichia coli*, la vida media de un mRNA suele ser de entre 2 y 25 minutos dependiendo de la función y la proteína codificada (Carpousis, 2007). En el decaimiento de RNA, éste es degradado secuencialmente por enzimas llamadas ribonucleasas o RNasas, las cuales se encargan de realizar cortes en segmentos de RNA; éstos pueden ser a partir de sus extremos 3' o 5', así como en el interior de la molécula, las enzimas que realizan dichas actividades se llaman exoribonucleasas y endoribonucleasas respectivamente. En *E. coli* se han encontrado cerca de 15 enzimas con actividad de RNasa, por ejemplo, RNasa III se encarga de cortar los transcritos precursores de los RNAs ribosomales (rRNAs). También, la RNasa III procesa cerca del 10% de los mRNAs de *E. coli* en la etapa de crecimiento exponencial, resultando en estabilización o desestabilización de los transcritos (Gordon *et al.*, 2017), mientras que otra ribonucleasa, la RNasa P, es considerada una ribozima, ya que cuenta con un sitio catalítico formado por RNA y es responsable de generar extremos 5' de tRNA y también se encarga de cortar en regiones intercistrónicas de algunos mRNAs policistrónicos (Li & Altman, 2003). Por otra parte, RNasa T es requerida para procesar el extremo 3' de la fracción 5S ribosomal. Además, las enzimas RNasa II y el enzima polinucleótido fosforilasa (o PNPasa) son importantes para la degradación de mRNA.

Un participante crucial en el inicio de la degradación de mRNA es la RNasa E, la cual procesa RNA de cadena sencilla haciendo cortes endorribonucleolíticos (Deutscher, M., 2015). Específicamente para la maduración de precursores de RNA ribosomal 5S, 16S, tRNAs y el fragmento M1 de la ribozima RNasa P, sin embargo, su función principal va enfocada a la maduración y degradación de mRNAs, esta función puede ser apoyada por RNAs pequeños (sRNAs) (Vanderpool, C.K., 2007). Esta RNasa de 1061 aminoácidos es crucial para la viabilidad en *E. coli*; la enzima se presenta como un homo-tetrámero, el cual está codificado en el gen *rne* de 3.6 kb, que se transcribe gracias a 3 promotores. La expresión de *rne* es autorregulada, debido a que posee un sitio 5' sin traducir (5'-UTR) el cual es sustrato de reconocimiento para ella misma, gracias a su propio reconocimiento esta región se escinde y el mensajero es inactivado (Schuck, Diwa & Belasco, 2009). Existen otros mecanismos de regulación como la fosforilación del extremo C-terminal de la enzima debida a la infección por el bacteriófago T7, quien inhibe a la RNasa E para estabilizar sus propios mRNAs. Por otro lado, la proteína Srd del bacteriófago T4 estimula a la RNasa E, lo que lleva a la degradación de los mensajeros de la bacteria, además de virus, existen elementos trans-activadores como RraA y RraB los cuales regulan la funcionalidad del RNA degradosoma (RNAD) (Bechhofer & Deutscher, 2019). Esta enzima tiene un sitio de reconocimiento capaz de identificar el extremo 5' de la cadena sencilla de RNA y que tiene una especificidad por sitios ricos en adeninas y uracilos; la dependencia del extremo 5' se debe a que el sitio catalítico se une con extremos 5' monofosfatados (Callaghan, *et al.*, 2005). La RNasa E tiene una región N-terminal altamente estructurada con actividad catalítica y que posee el sitio de reconocimiento antes mencionado, localizada entre los aminoácidos 1-529 de la proteína que promueve el ensamble de la holoenzima tetramérica. Los residuos 1-35 y 215-279 forman un subdominio con homología a RNasa H, pero carece de los aminoácidos críticos del sitio catalítico de la misma, sin embargo, los residuos 39-118 y 119-214 perteneciente al subdominio S1 y a un sensor de extremos 5' correspondientemente, están embebidos en el subdominio RNasa H y son críticos para la orientación y corte del RNA sustrato. Los residuos 280-400 forman el

subdominio DNasa I y comparten homología con esta enzima, la cual tiene preferencia por DNA de doble cadena (Koslover, *et al.*, 2008). La otra región o extremo C-terminal comprendido entre los aminoácidos 530-1061 está poco estructurado. No obstante, permite la asociación con la membrana interna y contiene los sitios donde ocurre la unión con otras enzimas o RNAs pequeños (sRNAs), pueden ser considerados como “microdominios”. El primero de ellos llamado “Segmento A” corresponde a los residuos 568 a 582 (Khemici, *et al.*, 2008), los cuales forman un dominio anfipático corto en forma de  $\alpha$ -hélice que se une a fosfolípidos, esto le permite localizarse en la parte citoplasmática de la membrana celular. Los residuos 604-683 se conocen como el sitio de unión a RNA abundante en argininas (AR-RBD) y es el dominio que permite mejorar su actividad *in vivo* (Taraseviciene, *et al.*, 1995). Existe además un segundo sitio rico en argininas (AR2), comprendido entre los residuos de aminoácidos 796-819; este segmento también está involucrado en la unión a RNA. A partir del residuo 701-1061 se forma el sitio de andamiaje que permite la unión con diferentes proteínas: la helicasa de RNA B (RhIB), la enolasa, y la PNPasa. (Vanzo, *et al.*, 1998). Se sabe que RNasa E puede procesar sustratos en más de una forma, la primera es mediante el reconocimiento del extremo 5' monofosfatado, éste es producido por la enzima RNA pirofosforilasa (RppH), al remover un pirofosfato en el extremo 5' (Deana *et al.*, 2008). Aunque se ha demostrado que RNasa E también puede actuar en el corte de mRNAs y tRNAs empleando un mecanismo directo (Garrey & Mackie, 2011). Además, esta enzima tiene preferencia por RNA de cadena sencilla especialmente en regiones ricas en A/U y se ha podido determinar que estas regiones se localizan generalmente antes o después de estructuras secundarias como los “tallos-burbuja” (Stem-loop). Estudios de secuenciación de RNA (RNAseq) recientes han comprobado que existe un sitio consenso mínimo de corte 5'-RNWUU-3', donde R representa A/G, W indica A/U y N equivale a cualquier ribonucleótido. Sin embargo, como requisito indispensable se remarca una fuerte preferencia por el uracilo en la posición +2 (Chao *et al.*, 2017).

Existe un ortólogo de la RNasa E en otras bacterias Gram negativas, llamado RNasa G. La diferencia principal entre estas dos enzimas es que la

segunda no posee la región C-terminal de unión a otras enzimas y es específica de algunos mRNAs. RNasa G es capaz de trabajar en conjunto con la RNasa E (Ow & Kushner, 2003) y de manera similar también tiene preferencia por regiones ricas en A/U, aunque es 5' dependiente, en comparación con RNasa E, RNasa G es menos abundante (Lee & Cohen, 2002). *In vitro* ambas enzimas tienen especificidad de sustrato similar, aunque los sitios de unión suelen ser diferentes, como ocurre durante el procesamiento del rRNA ribosomal 16S (Wachi *et al.*, 1999).

Las exoribonucleasas 3'→5', tales como la polinucleótido fosforilasa (PNPasa), RNasa R o RNasa II, actúan degradando secuencialmente el RNA. Como ayuda a estas enzimas, existen algunas enzimas asociadas, como las helicasas, las cuales ayudan a desnaturalizar o remodelar sustratos, la poli A polimerasa (PAP), la cual adiciona residuos de adenina A en extremos 3' que son degradados por enzimas procesivas como la PNPasa (Xu *et al.*, 1993). Después de este proceso, quedan oligonucleótidos remanentes de 2 a 4 nucleótidos, estos son degradados a nucleótidos sencillos por oligoribonucleasas. A pesar de que RNasa E es generalmente la ribonucleasa principal, existen bacterias, como *Bacillus subtilis*; que no presentan esta enzima es sustituida por la RNasa Y, un análogo funcional de la RNasa E (Shahbadian *et al.*, 2009). Algunos tipos estables de RNA también deben pasar por un proceso de maduración, como parte de un proceso de control de calidad, evitando así que sufran cambios con el tiempo y se altere su función, para este efecto se ven involucradas las exoribonucleasas PNPasa y RNasa R (Cheng & Deutscher, 2003). La maduración de las partículas ribosomales se lleva a cabo cuando las subunidades 30S y 50S se encuentran libres para ser procesadas por cortes endo nucleolíticos, en este proceso se encuentran involucradas las RNasas E y III, lo cual confirma su actividad para también degradar rRNA (Zundeï *et al.*, 2009).

## **1.2 Componentes principales del Degradosoma.**

Todos los organismos poseen herramientas especializadas para la modificación de mRNA, algunas de las enzimas que llevan a cabo estas funciones

son ribonucleasas, helicasas, 3' nucleotidil-transferasas, enzimas de *capping* y *decapping* de extremos 5' y proteínas de unión a RNA (RBPs). Algunas de estas proteínas y enzimas se asocian en complejos funcionales que trabajan de manera ordenada y cooperativa. El ejemplo más representativo de esta clase de complejos es el degradosoma de RNA, el cual posee 4 componentes canónicos: una endo-ribonucleasa, una exo-ribonucleasa, una helicasa dependiente de ATP y una enzima glucolítica (Carpousis, A.J., 2007).

Los degradosomas que contienen RNasa E se encuentran ampliamente distribuidos entre las gamma-proteobacterias. Los componentes medulares del metabolismo de RNA en *Escherichia coli* son: la endo ribonucleasa hidrolítica, RNasa E; la exo-ribonucleasa fosforolítica, PNPasa; la helicasa de RNA dependiente de ATP, Helicasa B (RhIB) y la enzima glucolítica, enolasa (Carpousis *et al.*, 1994). La PNPasa es un homotrímero de 711 aminoácidos codificado por el gen *pnp*, su función *in vivo* es catalizar la degradación fosforolítica de RNA, liberando nucleósidos 5' difosfato del extremo 3' del sustrato de RNA *in vitro* puede polimerizar nucleósidos 5' difosfato con liberación de un grupo fosfato. Esta enzima posee dos dominios de unión a RNA: KH y S1 localizados en su extremo C-terminal, además cuenta con dos dominios RNasa PH unidos por un dominio alfa-hélice, estos últimos son los responsables de sus propiedades catalíticas, así como de su trimerización. PNPasa posee tres funciones diferentes: fosforolisis, polimerización e intercambio de grupos fosfato, todas estas residen en su dominio de RNasa PH (Awano *et al.*, 2008). RhIB es una helicasa dependiente de ATP, la cual se une al extremo C-Terminal de la RNasa E en un dominio que comprende los aminoácidos 734-752. RhIB desata el "stem-loop" de los RNAs para posteriormente ser degradado por la PNPasa. Se ha determinado que RhIB no solo puede unirse a RNasa E, sino que además es capaz de unirse independientemente a PNPasa, los cuales interactúan gracias al extremo C-terminal de RhIB, para permitir que la doble cadena de RNA se separe y pueda ser degradada por la PNPasa, mostrando su importancia para la degradación de mRNA únicamente por actividad de PNPasa o por el degradosoma (Liou *et al.*, 2002). El último componente canónico del degradosoma es la enolasa, una

enzima glucolítica que también cataliza la interconversión de 2-fosfo-D-glicerato y fosfoenolpiruvato. Sin embargo, el papel de la enolasa en el degradosoma era desconocido, hasta que Morita *et al.*, (2004) concluyeron que la enolasa asociada al degradosoma está involucrada en la respuesta al bloqueo de la glucolisis, lo que ocasiona la degradación del mRNA de *ptsG*. Este mensajero codifica para el transportador de glucosa IICB<sup>Glc</sup> y es degradado en respuesta a la acumulación de Glucosa-6-fosfato o fructosa-6-fosfato. Prueba de esto es que existe una correlación entre la acumulación del mRNA *ptsG* cuando el extremo C-terminal de la RNasa E es eliminado. De esto último se puede concluir que la enolasa es importante para el ensamblaje del degradosoma que degrada el mRNA de *ptsG* y está estrechamente relacionado con el metabolismo de azúcares.

Además de estas proteínas, en degradosomas aislados de extractos celulares, se han encontrado proteínas chaperonas de RNA como: Host factor protein Q (Hfq), Ribonuclease R (RNasa R), Poli-A Polimerasa I (PAPI) (Carabetta *et al.*, 2010), polifosfato quinasa y proteínas ribosomales. En fase estacionaria o en condiciones de cultivo a bajas temperaturas se favorece la expresión de otras helicasas que son reclutadas hacia el degradosoma (RhlE, SrmB y CsdA) (Prud'homme-Généreux *et al.*, 2004). En *E. coli*, la RNasa E es responsable de la mayor parte del recambio de mRNA al hacer cortes en los transcritos y evitar su traducción (Carpousis, 2007). RNasa E también participa en la degradación de mRNA mediada por RNAs pequeños (sRNA) en respuesta a un bloqueo en la traducción (Morita *et al.*, 2005), o por reclutamiento directo mediante chaperonas como Hfq (Pfeiffer *et al.*, 2009).

### **1.3 Componentes minoritarios del degradosoma.**

Las enzimas RNasa E, PNPasa, RhlB y Enolasa, las cuales están en concentraciones estequiométricas equivalentes y que son reconocidos como los componentes canónicos del degradosoma, actúan al inicio del decaimiento de transcritos (Régnier & Arraino, 2000). Sin embargo, no son los únicos componentes de este complejo enzimático, algunos participantes menores del degradosoma están involucrados en la modulación y composición de éste, así

como su respuesta rápida a cambios ambientales. Estudios previos han indicado que la disminución en la temperatura resulta en una nueva conformación del degradosoma donde la helicasa RhlB es sustituida por la helicasa de choque térmico CsdA (Prud'homme-Généreux, 2004). Esto es interesante ya que denota la capacidad adaptativa del degradosoma que funciona bajo condiciones de estrés como es la baja temperatura. Además de CsdA existen otros componentes que afectan la composición y modulan la actividad enzimática, entre estos se encuentran dos reguladores de RNasa E: RraA y RraB, estas proteínas interactúan con el extremo C-terminal de la RNasa E. El nuevo cambio conformacional del degradosoma lleva a una acumulación de transcritos dirigidos a la RNasa E incluyendo el mismo transcrito que codifica para la RNasa E, lo que señala que existe auto regulación (Gao & Taghbalout, 2006). Existen proteínas homologas a RraA, las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en otros grupos bacterianos incluyendo arqueobacterias. Los homólogos de RraB solo se encuentran en las *Gammaproteobacterias*, indicando que esta proteína posiblemente tenga un papel más especializado en la modulación de la degradación de RNA. Además de estos dos inhibidores, la chaperona Hfq y la proteína ribosomal L4 interactúan con el degradosoma para afectar la estabilidad de grupos particulares de transcritos, Hfq es conocida por su importancia en el mecanismo antisentido empleando sRNAs (Yeom *et al.*, 2008). La proteína ribosomal L4 también se une al extremo C-terminal del degradosoma, pero su actividad inhibitoria es específica para evitar el corte de transcritos relacionados a estrés (Singh *et al.*, 2009). La liberación de L4 y de otras proteínas ribosomales ocurre en condiciones de inanición, ya sea por carencia de aminoácidos o por ausencia de una fuente de carbono. Esto permite la selectividad de mRNAs codificantes para proteínas de respuesta a estrés, este mecanismo es crítico para la adaptación de las bacterias a condiciones ambientales desfavorables. Algunas proteínas adicionales como DnaK y GroEL se han encontrado unidas al degradosoma, éstas son chaperonas que favorecen el doblamiento adecuado de las proteínas que conforman el degradosoma. Se han descrito otras proteínas que interactúan con el degradosoma como la enzima poli-A polimerasa (PAP I), la

proteína de unión a RNA CspE y la proteína ribosomal S1 (Regonesi *et al.*, 2006). Todos estos componentes menores demuestran que el degradosoma presenta plasticidad y versatilidad al asociarse con proteínas bajo diferentes condiciones.

#### **1.4 La Ribonucleasa PH (RNasa PH)**

Codificado por el gen *rph*, esta enzima es un polipéptido de 238 aminoácidos, esta proteína tiende a agregarse formando anillos hexaméricos formados por un trímero de dímeros de forma similar a la PNPasa (Symmons, *et al.*, 2002). El gen *rph* existe en forma de operón junto al gen *pyrE* el cual codifica para la orotato fosforibosiltransferasa, esta última se requiere para la síntesis de pirimidinas. Ambos genes están acoplados debido a que la traducción del transcrito de *rph* es necesaria para transcribir el atenuador de *PyrE*. En consecuencia, los niveles de mensajero de *rph* dependen del metabolismo de pirimidinas, cuando hay carencia de UTP se produce el mRNA policistrónico *pyrE-rph*, de manera contraria al incrementar la concentración intra bacteriana de UTP, se produce un mensajero monocistrónico *rph* para limitar la expresión de *PyrE* (Jensen, K.F., 1993). En las cepas de *E. coli* derivadas de W3110 y MG1655, un par de bases GC están ausentes en el extremo 3' cerca del final del gen *rph*, cambiando el marco de lectura. Esto trae como consecuencia una leve disminución en el tamaño de RNasa PH, es debido a esto que su función se ve inhibida ya que la proteína se expresa muy poco. (Conrad, *et al.*, 2009). RNasa PH pertenece la familia de ribonucleasas de unión a RNA (RNB) y junto con la Ribonucleasa R forman el par más representativo de este grupo. Ambas proteínas presentan una organización característica: poseen un dominio de choque térmico (CSD) en la región N-terminal que se encarga del reconocimiento y unión al RNA, un dominio central RNB que es responsable de la catálisis y un dominio S1 terminal también involucrado en el reconocimiento de RNA (Amblar *et al.*, 2006). RNasa PH es una exo-ribonucleasa fosforolítica estrechamente relacionada a la PNPasa y tiene un papel crucial en la degradación y reciclamiento de ribosomas durante estrés generado por inanición (Basturea *et al.*, 2011). Muchas nucleasas poseen una doble función al degradar mRNA y otras moléculas de RNA más estables, tales

como rRNA o tRNA (Deutscher M, 2009). La PNPasa y la RNasa PH se relacionan tanto estructural como funcionalmente, ya que ambas procesan los extremos 3' de tRNAs y otras especies pequeñas de RNA (Kelly *et al.* 1992., Li & Deutscher, 1994, Basturea *et al.*, 2011). La RNasa PH solo degrada RNA cuando hay fosforo inorgánico (Pi) presente, tiene actividad de polimerasa con la propiedad de adicionar un nucleósido difosfato en el extremo 3' de la cadena de RNA. *In vitro* actúa sobre homopolímeros de RNA o particularmente en tRNA, en este último su sustrato característico está dado por unos cuantos residuos precedentes a la secuencia -CCA de la cual remueve nucleótidos para formar la molécula madura tRNA-CCA. Además, esta enzima tiene la característica de reconocer sustratos que poseen citocinas adyacentes, lo que la diferencia de otras RNasas 3' como la RNasa T (Bechhofer & Deutscher, 2019). Adicionalmente RNasa PH puede participar en la maduración de RNAs pequeños en *E. coli*, debido a las similitudes entre PNPasa y RNasa PH, se ha comprobado que ambas trabajan en conjunto para estabilizar y promover la función de sRNAs tales como RyhB, CyaR y MicA durante la fase estacionaria (Cameron & De Lay, 2016). Durante condiciones de inanición o como consecuencia de control de calidad, ocurre la degradación de ribosomas. Este mecanismo es dependiente de la RNasa PH ya que ésta inicia la remoción de nucleótidos desde el extremo 3' del fragmento 16S ribosomal, lo que tiene como consecuencia el término del corte endonucleolítico por RNasa E, indicando su cooperatividad para degradar totalmente el rRNA (Basturea *et al.*, 2011. Sulthana *et al.*, 2017). Además de esto, también se ha comprobado su función no solo para degradar rRNAs, también es capaz de ayudar a su maduración de éstos. Específicamente remueve 33 nucleótidos presentes en el extremo 3' del fragmento 16S ribosomal, efectuando una actividad regulatoria del fragmento 23S, así como estabilizando la unión de ciertos sRNAs unidos a la proteína Hfq, previniendo la degradación prematura. En diferentes experimentos también se ha determinado la regulación de la expresión de RNasa PH con ayuda de RNasa II, comprobando que efectivamente existe cooperatividad entre RNasa PH con otras RNasas (Basturea *et al.*, 2011). Poco se sabe sobre la regulación de RNasa PH salvo que ésta decreta su expresión hasta en un 90% cuando las

células se encuentran en estrés por inanición debido a la poca estabilidad de esta proteína. La reducción en su expresión trae como consecuencia una baja degradación de los rRNAs, además se ha determinado que RNasa II puede regular la estabilidad de RNasa PH, aunque este mecanismo aún no se ha determinado con precisión (Sulthana *et al.*, 2017).

### **1.5 La Ribonucleasa II (RNasa II).**

RNasa II es una proteína de 644 aminoácidos con un peso de aproximadamente 72.5 kDa, es producto del gen *rnb* de 1,794 pb el cual es monocistrónico. Es la mayor exoribonucleasa hidrolítica en *E. coli*, su expresión depende de 2 promotores, es una enzima monomérica y se encuentra dividida en un extremo C-terminal y uno N-terminal (Zilhão *et al.*, 1993). Esta proteína se encuentra asociada a la membrana gracias a un dominio alfa-hélice en su extremo N-terminal. Actúa de manera progresiva desde el extremo 3' → 5' de RNA monocatenario y aporta cerca del 95% de la actividad exo-ribonucleolítica en extractos celulares cuando el sustrato predominante es la cadena de poli adeninas (Poli A) (Deutscher & Reuven. 1991). Posee 4 dominios: dos de choque térmico (CSD1 y CSD2) en el extremo N-terminal, que se encargan de la unión al RNA, un dominio central catalítico (RNB) y un dominio C-terminal S1, el cual es el encargado de su unión a sustrato (Amblar *et al.*, 2006). Para que RNasa II pueda actuar requiere de un extremo 3' de cadena sencilla disponible, ésta se detiene al encontrarse con un rizo del RNA (stem-loop) y se disocia unos cuantos nucleótidos antes de esta estructura secundaria debido a su conformación en doble cadena (Spickler & Mackie, 2000). RNasa II es capaz de hidrolizar una amplia variedad de RNAs, para realizar esto requiere de  $Mg^{+2}$  el cual funciona como cofactor. La función principal de la RNasa II es la degradación de mRNA; en ausencia de esta enzima y otras exoribonucleasas como la PNPasa, ocurre una acumulación de mensajeros y la célula pierde viabilidad. En algunas condiciones esta enzima también puede ayudar a estabilizar a los mensajeros debido a su eficacia para remover extremos poli-A. Otra de las funciones de la RNasa II es su cooperación en el procesamiento de tRNAs y rRNAs, aunque esta actividad la realiza en

conjunto con otras RNAsas como PH, T y R (Li *et al.* 1996. Li *et al.*, 1998). La actividad de RNasa II está modulada por la respuesta al ambiente siendo más activa cuando las células se encuentran bajo condiciones de estrés como son la fase estacionaria o el choque térmico, lo que sugiere una función importante de la enzima bajo estas condiciones particulares (Moreira *et al.*, 2012). Cuando la RNasa II está presente en condiciones de inanición o fase estacionaria prolongada, la RNasa PH es inestable y las bacterias sobreviven, pero cuando RNasa II está ausente, en las mismas condiciones la RNasa PH es estable, degrada los rRNAs, los ribosomas se degradan también y las bacterias mueren (Sulthana *et al.*, 2017). Ya que la acetilación de proteínas incrementa bajo estas condiciones particulares y el crecimiento celular se ve disminuido, se genera en consecuencia una baja actividad de RNasa II, esta reacción es reversible, pero está intrínsecamente relacionada con las condiciones ambientales, por lo que la actividad de RNasa II es dependiente del medio y los parámetros de crecimiento (Song, *et al.*, 2016).

Debido a que el corte proteolítico por RNasa E está confinado a sitios específicos, se cree que el total de la degradación de RNA dependiente del degradosoma se encuentra mediada por la PNPasa, sin embargo, la degradación encontrada en extractos celulares parecer ser predominantemente hidrolítica, esto puede ser gracias a la actividad de RNasa II o RNasa R (Deutscher & Reuven, 1991). Esto sugiere que son enzimas hidrolíticas las que tienen un papel importante en el recambio de RNA (Carpousis *et al.* 1994. Py *et al.* 1994).

### **1.6 RNAs pequeños (sRNAs) y su interacción con el degradosoma**

La regulación de la transcripción por RNAs pequeños es la base de la respuesta celular y comportamiento en todos los organismos. La RNasa E es un componente importante en la regulación mediada por sRNA tanto en *E. coli* como en *Salmonella* (Afonyushkin *et al.*, 2005; Morita *et al.*, 2005). De forma similar a los miRNAs en eucariotas, los sRNA bacterianos se transcriben generalmente a partir de su propio promotor y actúan mediante complementariedad de bases con su mRNA blanco. La secuencia de bases donde une el sRNA al mensajero para

impedir su traducción generalmente se encuentra entre el sitio de inicio de la traducción (TSS) el cual abarca desde la secuencia Shine-Delgarno hasta el codón de inicio, al inhibirse este sitio se impide el inicio de la traducción (Bouvier *et al.*, 2008). Este bloqueo traduccional expone el mRNA a la actividad de ribonucleasas, lo que resulta en una rápida degradación de mRNA y sRNA, involucrando principalmente a la RNasa E y RNasa III (Massé *et al.* 2003). Cuando el sitio de complementariedad del sRNA no se encuentra en el TSS, estos no interfieren con el comienzo de la traducción, sino que comienzan el proceso de degradación directamente (Papenfort *et al.*, 2009; Pfeiffer *et al.*, 2009). Inversamente los sRNA también pueden ayudar al inicio de la traducción, en este caso interfiriendo apareamientos intracatenarios del mRNA que impiden el libre acceso al TSS del complejo de inicio de la traducción (Roth & Breaker, 2009). La transcripción de sRNA está relacionada con la activación de genes en respuesta a condiciones ambientales, además estos pueden poseer más de un RNA blanco, como es el caso del RyhB, el cual es un sRNA que inhibe la expresión de genes de proteínas que unen hierro en respuesta a estrés por carencia de hierro (Massé *et al.*, 2007). Las bacterias también responden al estrés generado por especies reactivas de oxígeno, muchas de las proteínas de respuesta a esta clase de estímulo son controladas por el activador transcripcional OxyR. Para el caso particular de este gen, aproximadamente 200 bases río arriba de la secuencia se encuentra OxyS el cual es un sRNA que es inducido en presencia de peróxido de hidrogeno a concentraciones cercanas 60mM (Altuvia, 1997). El apareamiento de sRNA con su blanco trae como consecuencia el reclutamiento de RNasas principalmente RNasa E (Chao *et al.* 2017), sin embargo, también se ha demostrado que los sRNA pueden activar a la RNasa E mediante la presentación de un extremo 5' monofosforilado, este reconocimiento es seguido de cortes exo-ribonucleolíticos, generalmente realizados por PNPasa (De Lay & Gottesman. 2011). Aunque los sRNAs no requieren de un procesamiento previo para ser funcionales mediante la RNasa E, el procesamiento del extremo 5' trifosfato a 5' monofosfato en los sRNAs es crucial para el incremento en el decaimiento de mRNAs mediado por su sRNA correspondiente (Bandyra *et al.*, 2012). La asociación de los sRNAs con la proteína

Hfq es crítica para su funcionamiento, por ejemplo, RyhB promueve directamente la inestabilidad del mRNA al formar un complejo RNA/proteína con Hfq el cual atrae a la RNasa E, en algunos casos la RNasa E es sustituida por la RNasa III (Viegas *et al.*, 2011). Si bien los sRNAs son relativamente pequeños y están altamente estructurados, no se espera que su degradación sea iniciada por ataques endo nucleolíticos, sin embargo, RNasa E y RNasa III juegan un papel importante cuando estos sRNAs se encuentran unidos a su mRNA blanco. La asociación entre Hfq y el complejo sRNA/mRNA facilita el proceso de degradación (Andrade *et al.*, 2012).

### **1.7 Fröster Resonance Emission Transfer (FRET)**

El RNAD es un complejo dinámico que puede cambiar los elementos que lo componen en respuesta a cambios ambientales (Marcaida *et al.* 2006). Estudios de ensamblaje del RNAD *in vivo* muestran que varía de acuerdo con cambios en el medio de cultivo, por ejemplo, en el trabajo de Domínguez-Malfavón *et al.*, (2013) se demostró que tan solo el cambio de medio LB a medio M9 resulta en cambios en el patrón de expresión de estas proteínas de manera individual. Además, los cambios en la estructura y composición del degradosoma cambian los patrones de expresión y regulación de los mRNAs (Gao *et al.*, 2006) Una técnica empleada para dar evidencia de proximidad entre proteínas es la técnica FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), ésta se basa en la construcción de proteínas fusión con una fracción fluorescente, esta técnica depende de la transferencia de energía entre estas moléculas cuando al menos un par de ellas se encuentra en proximidad. Las condiciones bajo las cuales se da esta técnica es cuando la molécula donadora (floróforo) tenga suficiente tiempo de vida para transferir la energía, además tanto el fluoróforo donador como el receptor deben estar a una distancia de aproximadamente 1-10 nm. El espectro de absorción del fluoróforo receptor debe traslaparse con el espectro de emisión fluorescente del fluoróforo donador (al menos en un 30%). Para la transferencia de energía, el donante y el receptor deben tener una orientación bipolar aproximadamente paralela. La transferencia de energía se demuestra apagando

la fluorescencia donante junto con una reducción en el tiempo de vida fluorescente y un incremento de la emisión fluorescente en el receptor. El FRET es sensible a la distancia entre los fluoróforos y se puede usar para estimar distancias intermoleculares (Hoppe *et al.* 2013, Bajar *et al.* 2016). De manera regular se emplea las proteínas cian (CFP) y amarillo fluorescentes (YFP), debido a que el espectro de emisión de CFP y el espectro de excitación de YFP permiten que ocurra el FRET, además ambos fluoróforos poseen eficiencias de emisión elevadas (Stanisavljevic *et al.*, 2015) Debido a que el FRET facilita el estudio de la interacción proteína-proteína en células vivas y estos ensayos son realizados en muestras intactas, esto representa una ventaja de estudio considerable, porque permite adquirir información espacial que generalmente se pierde cuando se emplean otras técnicas bioquímicas tales como SDS-PAGE, coimmunoprecipitación o espectrometría de masas (Broussard & Green, 2017).

### **1.8 Sistema de recombinación RED**

*Escherichia coli* realiza recombinación homóloga de manera continua, es un proceso natural y común que permite restaurar horquillas de replicación, reparar daño por ruptura de doble cadena de DNA y mantenimiento de la integridad genética del cromosoma (Myers & Stahl, 1994, Kuzminov, 1999). El estado basal de recombinación de la célula se ve alterado cuando esta se encuentra bajo la influencia de bacteriófagos como el fago lambda ( $\lambda$ ). Esta condición lleva a la bacteria a un estado de "Hiper recombinación" y puede ser mantenida de forma transitoria o permanente, siempre y cuando la bacteria no se encuentre bajo la influencia de otros fagos. La recombinación de moléculas de DNA con aproximadamente 40 pb de secuencia homóloga al cromosoma es sumamente eficiente, lo que ha sido aprovechada como método alternativo al uso de enzimas de restricción y ligasas como herramientas de ingeniería genética (Zhang *et al.*, 1998, Sawitzke *et al.*, 2007).

A diferencia de otros organismos como las levaduras, las cuales pueden ingresar DNA de cadena sencilla a la célula, las bacterias no pueden ser transformadas con DNA lineal. En el caso de *Escherichia coli* esta transformación

es impedida debido a la presencia de exo-nucleasas que degradan DNA. Sin embargo, algunas mutantes carentes de la exo-nucleasa V del complejo de recombinación RecBCD si pueden ser transformadas. Se sabe que los bacteriófagos poseen sus propios sistemas de recombinación homóloga, como es el caso del sistema RED (*Recombination defective*) del fago  $\lambda$ . En éste participan 3 genes: *gam*, *beta* y *exo*, así como sus respectivos productos proteicos: Gam, Bet y Exo, los cuales se encuentran regulados bajo el operón  $P_L$  del fago. La proteína Gam impide la actividad de la enzima RecBCD del hospedero al unirse a la misma, inhibiendo su función y evitando que el cromosoma del fago o el DNA externo sea digerido (Court *et al.*, 2007). La proteína Exo es una exonucleasa que degrada DNA de doble cadena de manera progresiva en sentido 5'  $\rightarrow$  3', generando como resultado una extensión de ssDNA-3' libre. La proteína Beta actúa de manera coordinada con la enzima Exo ya que la primera se une al DNA de cadena sencilla, cumpliendo dos funciones, la primera es proteger las regiones de DNA de cadena sencilla y su función principal es que permite el alineamiento entre dos moléculas de DNA (Poteete, 2001, Caldwell & Bell, 2019). Para que este proceso se pueda llevar a cabo en el laboratorio, se diseña el producto de PCR de tal manera que posea una extensión de cadena de DNA homóloga al gen blanco de aproximadamente 35 a 50 nucleótidos, lo que permite una alta selectividad hacia el gen para la recombinación, esta técnica es conocida como *recombineering* (Yu *et al.*, 2000).

## 2.- Antecedentes

Como se mencionó con anterioridad, la mayor parte de la degradación de RNA es principalmente hidrolítica (Deutscher *et al.*, 1991) lo que sugiere que RNasa II podría formar parte de complejo RNAD. Las células bacterianas requieren de la cooperación de distintas ribonucleasas para que la degradación sea óptima. En células carentes de RNasa II, así como de PNPasa se observa una acumulación de diferentes especies de RNA *in vivo*, así como de un incremento en la vida media de los transcritos (Donovan & Kushner, 1986). En el

trabajo presentado por Lu & Taghbalout (2014) se demostró que la asociación entre RNasa II y RNasa E requiere a la helicasa RhlB y el dominio C-terminal de RNasa E, las cuales contienen los sitios de unión para otras proteínas del RNAD. Por otro lado, la asociación de RNasa PH y RNasa E no está mediada por la unión de las proteínas a sustratos de RNA, sino que es una interacción directa entre ambas proteínas. Algunos análisis transcriptómicos comprobaron que una eliminación en los genes de RNasa II, RNasa R y PNPasa cambian la expresión de genes relacionados a la supervivencia, la formación de biopelícula, ensamblaje de flagelo y movilidad (Pobre & Arraino, 2015), lo que implica que existe una importante cooperatividad entre diferentes RNasas, cuyas interacciones determinan la función.

La evidencia sugiere que existe una interacción entre RNasa PH *in vitro* e *in vivo*, esta se da entre 80 aminoácidos de la región N-terminal de la RNasa PH y 16 aminoácidos (1021-1036) de la región C-terminal de la RNasa E, interfiriendo con el sitio de unión de la PNPasa (Pérez-Medina *et al.*, 2014, Durán-Figueroa *et al.*, 2006). Estudios demuestran que RNasa PH es esencial para el procesamiento de tRNAs que cataliza el corte del extremo 3' de estas especies de RNA (Kelly *et al.*, 1992). RNasa PH no solo participa en la maduración de tRNA, además está involucrada en la degradación de rRNA, siendo una función primordial, ya que su carencia en la célula puede alterar del metabolismo ribosomal (Zouh & Deutscher, 1997). Esto es más notorio durante inanición por ausencia de glucosa, específicamente para el fragmento 16S ribosomal ya que éste se acumula cuando RNasa PH no se encuentra en la célula (Basturea *et al.* 2011). Previamente se presentó evidencia de que la PNPasa, la enzima RhlB y enolasa interactúan *in vivo* con RNasa E. Estas enzimas se encuentran en una proporción estequiométrica dispar, siendo dos veces mayor la enolasa respecto a los demás componentes del degradosoma canónico. Este análisis fue realizado empleando la técnica FRET usando variantes de cada enzima fusionadas a proteínas fluorescentes CFP y phi-YFP. Para esto también se generaron cepas que carecían del extremo C-terminal de la RNasa E para analizar si es en esta región donde se unen estas proteínas. Al carecer de este extremo disminuyó la expresión de todas

las proteínas incluyendo RNasa E, con este estudio se logró proponer un modelo para del RNAD (Domínguez-Malfavón, 2013).

### **3.- Justificación**

Los procesos de regulación génica son fundamentales para el cambio de los organismos en el ambiente, en el caso de las bacterias como *Escherichia coli* este proceso es relativamente rápido, lo que permite observar los fenómenos de adaptación en poco tiempo. Uno de los efectores más importantes para que esto se lleve a cabo es RNAD, ya que éste permite degradar diferentes tipos de mRNA de forma rápida y eficiente. A pesar de que su estructura canónica está muy bien definida, se ha determinado que no es la única composición que puede tomar *in vivo*. Algunas otras RNasas que también pueden interactuar con este complejo son las RNasas PH y II, aunque este efecto no se ha observado *in vivo*. En este trabajo se planea estudiar las interacciones que pueden ocurrir entre estas dos RNasas con el degradosoma. Además, se plantea la posibilidad de que estas interacciones sean mayores bajo condiciones de estrés. Éste trabajo será relevante para definir las interacciones *in vivo* de RNasas no canónicas con el degradosoma de *Escherichia coli* bajo determinadas condiciones ambientales.

### **4.- Hipótesis**

Las enzimas RNasa PH y RNasa II interactúan *in vivo* con la enzima RNasa E, incrementándose esta interacción en condiciones de estrés.

### **5.- Objetivos**

#### **5.1 General**

Probar que las enzimas RNasa PH y RNasa II interactúan *in vivo* con la enzima RNasa E y que esta interacción se incrementa en condiciones de estrés.

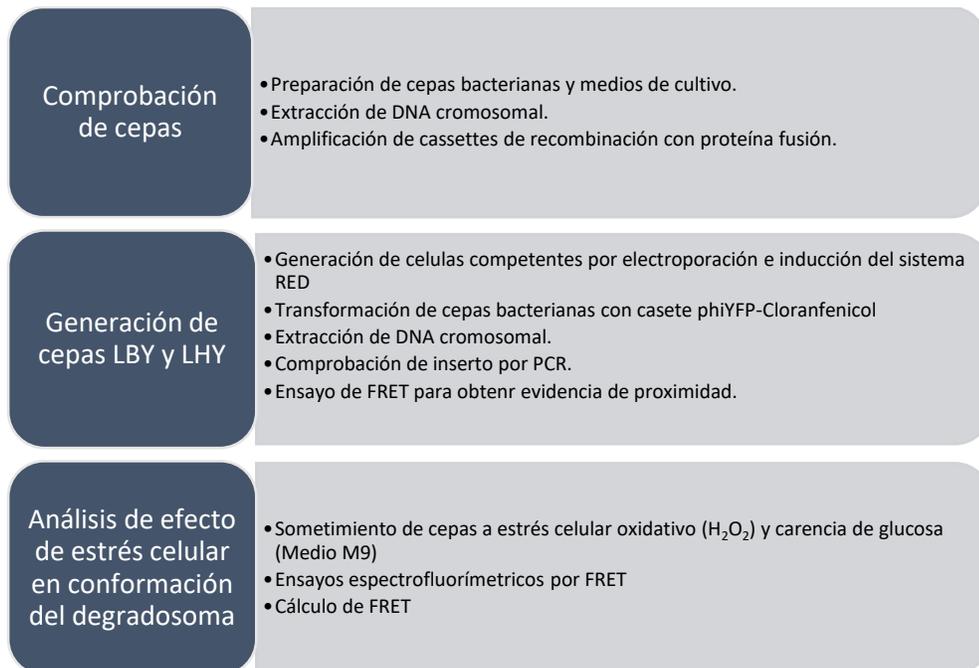
## 5.2 Específicos

5.2.1 Comprobar todas las cepas generadas durante los trabajos realizados previamente para caracterizar interacción de proteínas con la RNasa E.

5.2.2 Generar las cepas LHY (RNasa PH-phiYellow) y LBY (RNasa II-phiYellow) que contienen RNasa E-CFP y ensayar FRET.

5.2.3 Analizar *in vivo* el efecto de factores de estrés celular, tales como estrés oxidativo y carencia de glucosa como fuente principal de carbono, en la conformación del degradosoma mediante la técnica FRET.

## 6.- Estrategia general.



Primeramente, se comprobarán las cepas previamente construidas (LEC, LE701C, LECBY, LECHY, LE701CBY y LE701CHY) mediante PCR en donde se amplificará el casete de las proteínas fusión correspondientes a RNasa PH y RNasa II. Posteriormente se generarán las cepas faltantes (LBY y LHY) transformando por electroporación el inserto phiYFP-cloranfenicol para cada RNasa, posteriormente se realizará “recombineering”, se seleccionarán, se

comprobará el inserto por PCR y se realizará FRET. Si lo anterior funciona, las cepas nuevas, así como las previamente construidas serán sometidas a estímulos de estrés oxidativo a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno (10, 20, 30 y 40 nM) y estrés por carencia de glucosa (Medio M9), después del tratamiento se realizará el ensayo FRET para determinar el acercamiento entre las RNasa PH y RNasa II con RNasa E.

## **7.- Metodología**

### **7.1.- Preparación de cepas bacterianas**

Las cepas empleadas, plásmidos y oligonucleótidos están descritos en las Tabla 1, 2 y 3 respectivamente. La formulación del medio LB es de acuerdo con Sambrook and Russell (2011). La incubación se realizó a 32° C, con excepción de DH5- $\alpha$  la cual se incubó a 37° C. Cuando fue necesario, se adicionó al medio 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ampicilina.

### **7.2 Aislamiento de plásmido mediante el protocolo de lisis alcalina (Domínguez-Malfavón, 2013).**

Se seleccionó una colonia individual la cual se transfirió a 5mL de medio LB, cuando fue necesario se adicionó ampicilina al medio y se incubó a 32° C toda la noche. El cultivo fue centrifugado a 700 rpm durante 2 min a 4° C en un tubo de polipropileno con tapa de 1.5 mL. La pastilla resultante se resuspendió en 150  $\mu\text{L}$  de solución I fría (50 mM Glucosa, 25 mM Tris Cl pH 8.0, 10 mM EDTA), se agitó en vortex hasta resuspensión y se dejó incubando en hielo durante 5 min. Posteriormente se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de solución II (1% SDS, 0.2N NaOH, preparada al momento) para la lisis celular, se homogeneizó por inversión y se mantuvo en hielo por 5 min. Finalmente se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de solución III (3M CH<sub>3</sub>COOK pH 5.2, 12.03% CH<sub>3</sub>COOH glacial), se mezcló por inversión y se mantuvo nuevamente en hielo por 5 min. Después se centrifugaron los tubos a 13,500 rpm por 5 min a 4° C. Se recuperó el sobrenadante y a este se le adicionó 20  $\mu\text{L}$  RNasa A (10 mg/mL), se le dejó reposando 30 min a temperatura ambiente.

### **7.3 Extracción orgánica de DNA (Domínguez-Malfavón, 2013)**

Se adicionaron 200 µL de fenol frío equilibrado con Tris-HCl a pH 8.0 y 200 µL de cloroformo (100%). Se realizó una centrifugación en la centrifuga Eppendorf 5415R a 13,500 rpm por 15 min, el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se precipita con etanol absoluto y 40 µL de acetato de sodio 3M pH 5.2, se empastilla por centrifugación durante 30 min a 13,500 rpm a 4°C. Finalmente la pastilla se dejó secar y se resuspendió en agua estéril desionizada libre de DNAsas.

### **7.4 Amplificaciones por PCR**

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µL de reacción 1X [1X Taq Buffer (75mM Tris-HCl pH 8.8, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.01% Tween20), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs, 0.025 U/µL de Taq polimerasa, 0.2 µM de primer Sentido, 0.2 µM de primer Antisentido, ~50 ng de DNA molde]. Se emplearon las temperaturas de alineamiento predichas en el programa Vector NTI v.6.0 (Invitrogen). Se realizaron 25 ciclos de amplificación en todas las reacciones. Las condiciones específicas de cada reacción se describen en la Tabla 4.

### **7.5 Fraccionamiento electroforético en gel**

Para la visualización y separación de DNA genómico, DNA plasmídico y productos de PCR, se emplearon geles de agarosa al 0.8%, adicionados con 0.8 µL de solución Midori Green® (Bulldog Bio) para geles de 20 mL. Los geles se colocaron en una cámara de electroforesis con solución 0.5X TBE (89 mM Tris pH 8.0, 89 mM Ácido Bórico y 2 mM EDTA pH 8.2). Se empleó un marcador de peso molecular de 1 kb. Las imágenes para el análisis se tomaron en el transiluminador Gel Doc XR+ System (BioRad) y las fotografías procesadas por Imagen Lab Software (BioRad).

## **7.6 Preparación de bacterias competentes por Ca<sup>2+</sup> (Adaptado de Sambrook y Russell, 2001)**

Se tomó una colonia bacteriana la cual fue incubada en 5 mL de medio LB a 32° C en agitación de 100 rpm durante 12 horas. Al día siguiente se tomaron 1 mL de éste y se inocularon en 50 mL de medio LB contenido en un frasco Erlenmeyer de 250 mL, se incubó a 32° C hasta obtener una DO<sub>600</sub> de 0.5. El cultivo fue enfriado en hielo y centrifugado en frío a 4° C a 7000 rpm durante 5 min en una centrífuga Centrifuges 5804/R. Las células fueron resuspendidas en 5 mL de 100 mM CaCl<sub>2</sub> previamente enfriado e incubadas durante 10 min. Posteriormente las células se centrifugaron nuevamente a 7000 rpm durante 5 min, a esto le adicionó 1 mL de 100mM CaCl<sub>2</sub> con incubación final de 30 min en hielo.

## **7.7 Transformación de bacterias Ca<sup>2+</sup>-competentes con plásmidos (Modificado de Domínguez-Malfavón, 2013)**

Se adicionaron 70 ng de DNA plasmídico a 200 µL de bacterias Ca<sup>2+</sup>-competentes, se mezclaron por inversión y se incubaron en baño de hielo durante 30 min, después de esto las bacterias fueron sometidas a choque térmico, 42° C durante 60 s, inmediatamente colocadas en baño de hielo durante 2 min. Las bacterias se recuperaron en 0.8 mL de medio LB precalentado a 32° C, se incubaron en agitación a 32° C durante 1 hora, finalmente fueron sembradas por espatulación en cajas de medio LB con ampicilina (50 µg/mL).

## **7.8 Purificación de casetes recombinantes (Modificado de Domínguez-Malfavón, 2013).**

Los casetes fueron amplificados de acuerdo con lo descrito en la sección 7.4. empleando la temperatura de alineamiento calculada para cada par de primers. Después de la amplificación todos los productos de PCR fueron usados empleando el kit Wizard SV Gel and Clean-Up System (Promega) de acuerdo con las indicaciones del proveedor, después de esto fueron resuspendidas en agua

libre de nucleasas. Las muestras se digirieron con 5 unidades de la enzima de restricción Dpn I (New England Bio Labs Inc.) durante 1 hora a 37° C.

El DNA fue purificado empleando un volumen de fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló vigorosamente con vortex y se centrifugó a 6000 rpm durante 5 min. La fase acuosa fue recuperada y transferida a un tubo nuevo, para precipitación se adicionaron 1 µL de glucógeno por cada µg de DNA, después fueron adicionados 2 volúmenes de etanol absoluto y se mezclaron por inversión. Los tubos se colocaron a -20° C toda la noche y el DNA recuperado por centrifugación a máxima velocidad durante 5 min, Los pellets resultantes fueron lavados con 1 mL de etanol al 70%. Se dejó secar la pastilla y se resuspendió en 50 µL de agua desionizada.

### **7.9 Inducción del sistema de recombinación RED y preparación de células recombinantes. (Modificado de Domínguez-Malfavón, 2013).**

Una colonia aislada fue incubada en 5 mL de medio LB a 32° C por 14-16 horas. Al día siguiente, 1 mL se colocó en un matraz Erlenmeyer de 500 mL con 50 mL de medio LB y se dejó en crecimiento hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0.5. 10 mL de este medio fueron transferidos a un matraz Erlenmeyer de 125 mL, el sistema RED se indujo incubando a 42° C durante 15 min. Inmediatamente después de la inducción, el frasco se enfrió rápidamente en baño de hielo. 10 mL de bacterias no inducidas también fueron enfriadas en hielo como control. Las células se centrifugaron a 7000 rpm durante 8 min a 4° C. Finalmente se resuspendieron en 100 µL de agua desionizada.

### **7.10 Electroporación (Modificado de Domínguez-Malfavón, 2013).**

300 ng de casete para recombinación se adicionaron en una celda de electroporación de 0.1 mL (BioRad®) enfriada previamente. Posteriormente se adicionaron 50 µL de células competentes y se generó rápidamente un pulso eléctrico con un voltaje de 1.8 kV y 200 Ohm por 5 ms. Después esto las células se recuperaron en 1 mL de medio LB y se incubados a 32° C por una hora. 200 µL de bacterias fueron sembradas por dispersión con una espátula en cajas de

Petri con diferentes antibióticos, para un total de 5 cajas por reacción. La selección de bacterias recombinantes se hizo en cajas de Petri con medio LB y cloranfenicol (30 µg/mL), ampicilina (50 µg/mL) y tetraciclina (10 µg/mL), se incubaron a 32° C durante 48 horas.

### **7.11 Tratamientos de estrés celular.**

Para inducir el estrés celular por oxidación se crecerán todas las cepas mutantes, incluyendo a *E. coli* DY329 como control en 5mL de medio LB a 32 °C durante 12-14 horas; cada cepa se crecerá por duplicado y se someterá a diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mM, 20 mM, 30 mM y 40 mM) durante 5 minutos. Uno de los duplicados se usará para extracción de DNA total con la metodología anteriormente descrita y otro se empleará para el ensayo espectrofluorimétrico.

Para inducir estrés por carencia de glucosa se crecerán las cepas mutantes, incluyendo a *E. coli* DY329 como control en 5 mL de medio LB a 32° C durante 12-14 horas por duplicado; se tomará 1 mL de este medio y se colocarán en 50 mL de medio mínimo M9 suplementado con glucosa (0.4%) hasta una DO<sub>600</sub> de 0.5. Posterior a esto se tomará uno de los duplicados para extracción de DNA total y otro para los ensayos espectrofluorimétricos.

### **7.12 Cálculo de FRET y ensayos espectrofluorimétricos.**

Para el cálculo de FRET la eficiencia aparente ( $E_{ap}$ ) será determinada como sigue: “ $A_0$ ” se calculará como el cociente de la excitación del aceptor a la longitud de onda de excitación del donador (458 nm) y la excitación del aceptor a la longitud de onda de excitación del aceptor (514 nm). Todas las cepas serán estimuladas con la longitud de onda de CFP (Donador – FRET) de 458 nm para obtener el espectro de emisión de phi-YFP (Aceptor – FRET). Para determinar la sensibilidad de la señal de emisión del aceptor en presencia del donador, el espectro de emisión normalizado del donador será el espectro medido en presencia de las diferentes proteínas de fusión (phiYFP – FRET). El valor “A” será determinado

como el cociente entre el espectro sustraído previamente y el espectro de emisión obtenido del aceptor. La eficiencia del FRET se calculará como  $E_{ap} = A - A_0$

Para la fluorimetría a punto final, la medición de eficiencia aparente de FRET se realizará en bacterias crecidas por 12 horas en medio LB. Los cultivos serán centrifugados, lavados y resuspendidos en 500  $\mu$ L de PBS 1x pH 7.4. Las muestras de 200  $\mu$ L serán leídas a las longitudes de onda de excitación/emisión del donador (458/505 nm) “canal donador”, del aceptor (514/537 nm) “canal aceptor” y a las longitudes de onda para FRET (458/537) “canal de FRET” empleando el espectrofluorimetro lector de microplacas híbrido Synergy™ H4 (BioTek Instruments Inc). FRET aparente será calculado adaptando el método de espectro con fluorimetría de punto final:  $E_{ap} = A - A_0$  donde  $A_0$  es dado por el cociente entre la señal de fluorescencia en el canal de FRET y la señal de fluorescencia en el canal aceptor con solo las proteínas de fusión.  $A$  es el cociente de la diafonía del canal de señal FRET y la señal del canal aceptor en cepas que contienen fusiones con fluoróforos aceptores y donadores. La diafonía será calculada por el cociente de la señal FRET y la señal del canal donador de cepas que contienen únicamente las fusiones donadoras. (Las fórmulas para cada cálculo se encuentra en la Tabla 5).

## 8- Resultados

### 8.1. Diseño experimental

Para poder determinar las interacciones entre la RNasa E y RNasa PH, así como RNasa E y RNasa II, se diseñó un experimento basado en la técnica FRET empleando un par de fluoróforos, en este experimento se fusionó la proteína cian fluorescente (CFP) con la RNasa E en su versión completa o aquella en la que el extremo C-terminal fue truncado (RNasaE701), en ambos casos, éstos sirven como donadores, mientras que la proteína amarilla fluorescente (phi-YFP) fue fusionada al extremo C-terminal de las RNasas PH y II, las cuales funcionaron como aceptores.

En este caso las cepas donadoras previamente generadas fueron llamadas LEC para aquella que posee la RNasa E completa fusionada con CFP, la versión con la RNasa E trunca fusionada con CFP fue nombrada LE701C, ambas proteínas fueron unidas con una bisagra de 6 glicinas (6xGly), éstas fueron obtenidas de la cepa de *E. coli* DY329. Para las cepas aceptoras se generaron las fusiones, tanto de la RNasa PH como la de la RNasa II con la proteína phi-YFP, generando las cepas LHY y LBY respectivamente. De la misma manera se produjeron cepas con doble mutación, las cuales derivaron de las cepas LEC o LE701C, dando como resultado las cepas: LECHY (RNasa E-CFP y RNasa PH-phiYFP), LECBY (RNasa E-CFP y RNasa II-phiYFP), LE701CHY (RNasa E701-CFP y RNasa PH-phiYFP) Y LE701CBY (RNasa E701-CFP y RNasa II-phiYFP)

## 8.2. Caracterización de cepas

Para este trabajo se emplearon las cepas generadas anteriormente (Tabla 1) para lo cual se caracterizó su genotipo mediante PCR. Para esto las cepas fueron sembradas en medio LB líquido, incubadas durante 14 horas a 32° C, la pastilla bacteriana fue recuperada y se realizó una extracción de DNA empleando Fenol (Metodología - 7.3 Extracción orgánica de DNA). El DNA extraído fue conservado y preparado para un ensayo de PCR con los pares de oligonucleótidos CMJpyF/CMJpyR, LDM42R/LDM46F, NAV01F/H2 RNase PH, NAV03F/H2 Rnase II (Tabla 3), los cuales amplifican para el gen constitutivo piruvato quinasa (*pyk*), la RNasa E (*rne*), la RNasa PH (*rph*) y la RNasa II (*rnb*). La temperatura de alineamiento para todas las reacciones fue de 60° C, el tiempo de extensión fue de 90 segundos. Las secuencias amplificadas fueron analizadas en un gel de agarosa con una concentración de 0.8%, disuelta en buffer Tris-Borato-EDTA (TBE), 3 µL de reacción fueron colocados en cada carril del gel. Las cepas LEC y LE701C presentan una inserción en el gen *rne* con la proteína CFP, para el caso de LEC *rne* se encuentra completo, mientras que para LE701C el gen se encuentra reducido en su tamaño por 1000 pb. Las cepas LHY y LBY presentan una inserción de la proteína phi-YFP en los genes *rph* y *rnb* únicamente, mientras que las cepas LECHY y LECBY contienen la construcción *rne-6xGly-cfp*, así como la inserción de la proteína phi-YFP en los genes *rnb* (LECBY) y *rph* (LECHY), de

igual manera las cepas LE701CHY y LE701CBY, aunque éstas presentan la variante trunca del gen *rne* (*rne701-6xGly-cfp*). Se obtuvieron los productos de 400 pb correspondientes a *pyk* en todas las cepas (Fig. 1). Para el gen *rne* se obtuvieron los productos de 1570 pb para DY329 la cual contiene el gen *rne* sin modificar, 2600 pares de bases para aquellas que tienen la fusión *rne-6xGly-cfp* y 1600 pb para aquellas con la versión trunca del gen *rne701-6xGly-cfp* (Fig. 2). Para el gen *rph* se obtuvieron productos de 2600 pb en aquellas cepas que poseen la fusión *rph-6xGly-phiyfp*, las cepas que no poseen esta modificación presentaron un tamaño de 400 pb (Fig. 3). Finalmente, aquellas con el gen *rnb* fusionado a la proteína phi-YFP (*rnb-6xGly-phiyfp*) presentaron un producto de 2600 mientras que aquellas que no presentaron la modificación tuvieron un tamaño de 400 pb (Fig. 4).

Para comprobar el análisis de PCR se procedió a realizar la fluorescencia de todas las cepas mediante espectrofluorimetría como se describió en la metodología (7.12 Cálculo de FRET y ensayos espectrofluorimétricos). Las muestras fueron sometidas a una excitación a 458 nm y la fluorescencia se midió a 505 nm para determinar fluorescencia en el canal de CFP, así como una excitación a 514 nm y medición de fluorescencia a 534 para determinar fluorescencia en canal de phi-YFP. La fluorescencia fue normalizada midiendo la fluorescencia de PBS empleado como vehículo. LEC y LE701C presentaron mayor fluorescencia respecto a DY329 en la determinación de CFP, así como las cepas LECHY, LECBY, LE701CHY y LE701CBY, sin embargo, LHY y LBY presentaron fluorescencia mayor y presentan fluorescencia en el canal CFP (Fig. 6). Por otro lado, las cepas LHY, LBY, LECHY, LECBY, LE701CHY y LE701CBY presentaron fluorescencia en el canal para phi-YFP, esto respecto a DY329, LEC y LE701C.

### 8.3 Generación de las cepas LHY y LBY

Para generar las cepas correspondientes se realizó una transformación con el plásmido pL05CtY (Fig. 10) el cual comprende la secuencia de la proteína phi-YFP y el gen de resistencia cloranfenicol; el procedimiento se realizó de acuerdo con lo descrito en la metodología (7.7 Transformación bacteriana con plásmidos), mientras que la purificación del plásmido se realizó conforme a lo descrito en la sección 7.2 (Aislamiento de plásmido mediante el protocolo de lisis alcalina) del mismo apartado. Una vez obtenido y purificado el plásmido se procedió a realizar la amplificación de los casetes recombinantes correspondientes a RNasa II y RNasa PH. Para comprobar que los casetes tuvieran el tamaño adecuado (1900 pb) se procedió a realizar un fraccionamiento electroforético en gel de agarosa 0.8%. De cada casete se tomaron 4 reacciones, tanto el casete RNasa II-Cm como RNasa PH-Cm presentaron los tamaños adecuados (Fig. 8). Posteriormente se procedió a realizar un ensayo de restricción enzimática con la enzima Dpn I en las reacciones de PCR para eliminar el plásmido remanente y evitar que éste dé un falso positivo al momento de hacer la selección con antibiótico. Para comprobar que la enzima funcionara adecuadamente se sometieron las reacciones de cada casete, así como el plásmido empleado como molde en la reacción (Fig. 9). Como resultado se pudo eliminar la banda característica del plásmido, el cual tiene un tamaño de 4676 pb, al someter el plásmido al ensayo de restricción se eliminó completamente, dando como resultado una banda cercana a los 1000 pb que representa dos fragmentos producidos a consecuencia de la digestión, los demás fragmentos generados son menores a 100 pb, el mapa de restricción se detalla en la Figura 11. Una vez eliminado el plásmido de la reacción, se procedió a realizar la transformación de *E. coli* mediante electroporación como se detalla en las secciones 7.6 a 7.10 descritos en la metodología. Una vez realizada la electroporación, las células fueron sembradas en medio LB con cloranfenicol (30 µg/mL), pasadas 24 horas se realizó una réplica de cada caja de Petri empleando la técnica de *patching plating* (Fig. 12), la cual permite replicar el patrón de crecimiento sobre la placa para posteriormente seleccionar aquellas colonias que crezcan en cloranfenicol, pero no en el antibiótico de contra selección que en este caso se trata de ampicilina. Una vez que se seleccionaron las colonias candidatas,

éstas fueron tomadas y mediante la técnica de *toothpicking* (Fig. 13) fueron colocadas en cajas Petri con medio LB adicionado con cloranfenicol o ampicilina para poder asegurar que se trata de bacterias transformadas. Aquellas colonias que crecieron en medio LB con cloranfenicol, pero no en ampicilina se consideraron como transformantes, en el caso de la cepa LBY se obtuvieron 11 colonias positivas para resistencia a cloranfenicol (Fig. 14), mientras que para la cepa LHY se obtuvieron 51 (Fig. 15).

Para determinar que las candidatas seleccionadas presentaban fluorescencia, se sembraron en medio LB líquido simple a 32° C durante 14 horas y se les realizó un ensayo espectrofluorimétrico para determinar las fluorescencias en los canales de CFP (458 nm/ 505 nm) y phi-YFP (514 nm/537 nm) respectivamente, en el caso de la cepa LBY se seleccionaron las candidatas asignadas con los números 4, 5 y 10 (Fig. 16), mientras que para la cepa LHY se seleccionaron las candidatas asignadas con los números 11, 18 y 19 (Fig. 17).

## 9.- Discusión

En este trabajo se realizó el análisis de las cepas generadas en trabajos previos, las cepas originales mantenían su genotipo característico, las cepas LEC, LE701C, LECBY, LECHY, LE701CBY, LE701CHY, LBY y LHY presentaron valores de fluorescencia en el canal de CFP, todas las cepas debían presentar valores en este canal, con excepción de LBY y LHY las cuales presentaron valores de 25,000 y 29,000 RFU para CFP, sugiriendo que presentaban este fluoróforo en su genoma, esto fue comprobado mediante PCR, ya que presentaron los tamaños de 2,600 pb para el gen *rne* en el caso de LBY, lo que indica que esta cepa posee la fusión *rne-6xGly-cfp*, mientras que LHY presentó un tamaño de 1,600 pb, el cual coincide con el genotipo de *rne701-6xGly-cfp*. Esto confirma que respecto a este fluoróforo las cepas presentaban CFP y phi-YFP, lo que sugiere que estas fueron construidas a partir de la cepa LEC para LBY y LE701C para LHY y no a partir de DY329. Al determinarse que las cepas LHY y LBY estaban construidas erróneamente se procedió a generarlas nuevamente, para esto se amplificó el casete phi-YFP-Cm a partir del plásmido pL05CtY con los primers diseñados para

recombinación en los genes *rnb* y *rph*, posterior a la amplificación se comprobó el tamaño de 1,900 pb esperado para este producto de recombinación, para eliminar el plásmido remanente de la reacción se empleó la enzima Dpn I, la cual restringe en 25 sitios diferentes y de esta manera garantiza la eliminación del plásmido y evita interferencias por el mismo, ya que este posee resistencia a ampicilina, sumado al gene de resistencia a cloranfenicol contenido en el casete. Se confirmó la eliminación del plásmido ya que posterior a la reacción de restricción se obtuvieron únicamente 2 fragmentos de 1,000 pb correspondientes a 4 sitios de restricción separados por ese número de bases, uno al inicio del sitio f1(IG), otro antes del sitio de resistencia a cloranfenicol, el tercero al inicio del gen codificante de phi-YFP y otro más embebido en el sitio de inicio de replicación rep(pMB1), los demás sitios de restricción se encuentran separados por 50 pb o menos. Posterior a la purificación del casete de recombinación se procedió a realizar el proceso de recombineering de acuerdo con lo descrito en la metodología de Yu, *et al.* (2000), durante este proceso pudimos obtener bacterias transformadas tanto para LHY como LBY, las cuales al presentar únicamente resistencia a cloranfenicol solo crecieron en medio LB suplementado con este antibiótico y mientras que no hubo crecimiento en medio LB suplementado con ampicilina, lo que confirma que este casete se encuentra en el genoma y se expresa adecuadamente, además, el proceso se realizó sin la interferencia del plásmido pL05CtY. De las colonias transformantes fueron seleccionadas diez candidatas para cada RNasa, estas fueron analizadas mediante fluorimetría para los canales de CFP y phi-YFP, tres candidatas de cada RNasa se consideraron aptas debido a la diferencia considerable entre la fluorescencia en el canal de CFP y phi-YFP. Aquellas cuyos valores de fluorescencia de CFP y phi-YFP fueron cercanos se descartaron inmediatamente, en el caso de RNasa II fueron seleccionadas las candidatas 4, 5 y 10, con valores de 86, 112 y 66 RFU, mientras que para RNasa PH las candidatas seleccionadas fueron la 11, 18 y 19, con valores de 166, 70 y 75 RFU, los bajos valores en las fluorescencias se pueden deber a bajos niveles de transcripción, desajuste en el ensamblaje de las proteínas o interacciones inespecíficas entre phi-YFP y sitios dentro de las mismas RNasas. Además de

estos efectos se ha detallado en trabajos previos que la eliminación o baja expresión de RNasa II puede desencadenar en la disminución de los niveles de transcritos relacionados con varias genes de sobrevivencia (Pobre, *et al.* 2005), sobre todo durante periodo estacionario e inanición (Sulthana, *et al.* 2017), además, tanto RNasa PH como RNasa II son esenciales en el desarrollo celular en temperaturas inferiores a 37° C (Awano *et al.*, 2017). Por último, se considera el efecto de *selfquenching* producido cuando dos moléculas marcadas con fluoróforos se encuentran muy cerca entre sí, como la RNasa II se presenta en forma de dímero y RNasa PH como un trímero, se produce este efecto debido a la cercanía entre moléculas (Zheng, 2006), todos estos factores pueden afectar la función de estas RNasas, a pesar de los valores bajos de RFU que presentan, se consideran aceptables para su utilización como fluoróforos en el ensayo de FRET. Estas bacterias fueron purificadas y conservadas mediante congelación a -70° C. En este punto del trabajo se debía proceder con la extracción de DNA de cada cepa para confirmar mediante PCR que tuvieran el inserto en el genoma, sin embargo, debido a las condiciones sanitarias extraordinarias este paso no se pudo concretar, a partir de la fluorimetría no se pudo continuar con los pasos posteriores como es el análisis FRET entre RNasas, debido a esto se describirán los resultados esperados para este proyecto.

En el trabajo realizado en nuestro laboratorio por Rodríguez-Malfavón (2013) se elaboraron proteínas fusión para los componentes canónicos del degradosoma: RNasa E, PNPasa, la helicasa RhIB y la enolasa, empleando recombinación y los fluoróforos phi-YFP y CFP, se midieron los valores de fluorescencia para cada una de las proteínas y se determinó que el extremo C-Terminal de la RNasa E es esencial para el ensamblaje de éste, además Pérez-Medina Martínez *et al.* (2014) determinaron que se requiere de este extremo C-Terminal para la interacción entre RNasa E y RNasa PH, por lo que se puede predecir que la interacción entre la versión completa de RNasa E y la RNasa PH se puede presentar, mientras que esto no ocurrirá en la versión trunca de la RNasa E al carecer del dominio de unión entre proteínas. De la misma manera se sabe que este extremo también es requerido para la unión entre RNasa E y RNasa II

(Lu & Taghbalout, 2014) por lo que se espera un comportamiento similar entre ambas RNasas.

## 10.- Conclusiones

Las cepas LBY y LHY se encuentran listas para ser empleadas en un análisis FRET para determinar si existe acercamiento entre RNasas y poder comprobar la hipótesis de que esta interacción se da *in vivo*. Además, se estima que bajo determinadas condiciones de estrés esta interacción se verá afectada.

Recombineering es una técnica eficiente, rápida y sencilla para realizar modificaciones cromosómicas en *E. coli*, lo que permite obtener diferentes cepas para una amplia variedad de ensayos.

## 11.- Bibliografía

- Afonyushkin, TV., Vecerek, B., Moll, I., Bläsi, U & Kaberdin, V. (2005). Both RNase E and RNase III control the stability of *sodB* mRNA upon translational inhibition by the small regulatory RNA RyhB. *Nucleic Acids Research*. 33(5):1678-1689.
- Awano, N., Inouye, M. & Phadtare, S. (2008). RNase activity of Polynucleotide Phosphorylase is critical at low temperature in *Escherichia coli* and is complemented by RNase II. *J. of Bacteriology*. 190(17):5924-5933.
- Carpousis, AJ. (2007). The RNA Degradosome of *Escherichia coli*: An mRNA Degrading Machine Assembled on RNase E. *Annu Rev Microbiol*. 61:71-87.
- Altuvia, S., Winstein-Fischer, D., Zhang, Postow, L & Storz, G. (1997). A small, stable RNA induced by oxidative stress: Role as a pleiotropic regulator and antimutator. *Cell*. 90 (1):43-53.
- Amblar, M, Barbas, A., Fialho, AM & Arraino CM (2006). Characterization of the functional domains of *Escherichia coli* RNase II. *J. Mol. Biol*. 360(5): 921-933.
- Andrade, J. P. (2012). The crucial Role of PNPase in the degradation of small RNAs that are not associated with Hfq. *RNA*. 844-855.
- Arroyo, N. (2017). Análisis de la interacción *in vivo* de Ribonucleasa II, Ribonucleasa PH, y Degradosoma de RNA con *Escherichia coli*. (Tesis de maestría CINVESTAV).
- Bajar, BT., Wang, ES., Zhang, S., Lin, MZ & Chu, J. (2016). A guide to fluorescent protein FRET pairs. *Sensors*. 16 (9):1-24.

- Bandyra, KJ., Said, N., Pfeiffer, V., Gorná MW, Vogel, J. & Luisi, BF. (2012). The seed region of samII RNA drives the controlled destruction of the target mRNA by endoribonuclease RNase E. *Mol Cell* 47(6):943-953.
- Bandyra, KJ., Sinha, D., Syrjanen, J., Luisi, BF & De Lay, NR. (2016). The ribonuclease polynucleotide phosphorylase can interact with small regulatory RNAs in both protective and degradative modes. *RNA*. 22(23):360-372.
- Basturea, GN., Zundel, MA. & Deutscher, MP. (2011). Degradation of ribosomal RNA during starvation: comparison to quality control during steady-state growth and a role for RNase PH. *RNA*. 17(2):338-345.
- Bechhofer D.H.& Deutscher M.P. (2019) Bacterial ribonuclease and their roles in RNA metabolism. *Crit Rev Biochem. Mol. Biol.* 54(3): 242-300.
- Bouvier, M. Sharma, CM., Mika, F., Nierhaus, KH & Vogel, J. (2008). Small RNA binding to 5' mRNA coding region inhibits translational initiation. *Molecular Cell* 32(6): 827-837.
- Broussard, JA & Green KJ. (2017). Research Techniques Made Simple: Methodology and applications of Förster Resonance Energy Transfer (FRET) Microscopy. *Journal of investigative Dermatology*. 137(11):185-191.
- Caldwell, B.J. & Bell, C.E. (2019). Structure and mechanism of the Red recombination system of bacteriophage lambda. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 147:33-46.
- Callaghan, A.J., Maracida, M.J., Stead, J.A., McDowall, K.J., Scott, W.G. & Luisi, B.F. (2005) Structure of *Escherichia coli* RNase E catalytic domain and implications for RNA turnover. *Nature*. 437:1187-1191.
- Cameron, TA & De Lay, NR. (2016). The phosphorolytic exoribonucleases polynucleotide phosphorylase and RNase PH stabilize sRNAs and facilitate regulation of their mRNA targets. *Journal of Bacteriology*. 198(24):3309-3317.
- Carabetta, VJ., Silhavy, Tj & Cristea, IM. (2010). The response regulator SprE (RssB) is required for maintaining poly (A) polymerase I-degradosome association during stationary phase. *Journal of bacteriology*192(42): 3713-3721.
- Carpousis, AJ., Van Houwe, G., Ehretsman, C. & Krisch, HM. (1994). Copurification of E. coli RNase and PNPase: evidence for specific association between two enzymes important in RNA processing and degradation. *Cell*. 76(5): 3277-3280.
- Carpousis, A.J., Van Houwe, G., Ehretsmann, C. & Krisch, HM. (1994). Copurification of E. coli RNase E and PNPase: evidence for specific

- association between two enzymes important in RNA processing and degradation. *Cell*. 76(5): 889-900.
- Carpousis, A.J. (2007). The RNA degradosome of *Escherichia coli*: an mRNA-degrading machine assembled of RNase E. *Annual Review of Microbiology*. 71-87.
- Chao, Y. L., Li, L., Girodat, D., Förstner, KU., Said, N., Corcoran, C., Smiga, M., Papenfort, K., Reinhardt, R., Wieden, HJ., Luisi, BF. & Vogel, J. (2017). In vivo cleavage map illuminates the central role of RNase E in coding and non-coding RNA pathway. *Mol. Cell*. 65(1): 39-51.
- Cheng, Z. & Deutscher, MP. (2003). Quality control of ribosomal RNA mediated polynucleotide phosphorylase and RNase R. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100(11): 6388-6393.
- Cherepanov, P. & Wackernagel, W. (1995). Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistant determinant. *Gene*. 158(1) 9-14.
- Conrad, T.M., Joyce, A.R., Applebee, M.K., Barret, C.L., Xie, B., Gao, Y., Palsson, B.O. (2009) Whole-Genome resequencing of *Escherichia coli* K-12 MG1655 undergoing short-term laboratory evolution in lactate minimal media reveals flexible selection of adaptative mutations. *Genome Biol*. 10(10): R118.
- Court, D.L., Cook, N., Saikrishnan, K. & Wigley, D. (2007). The crystal structure of lambda-Gam protein suggests a model for RecBCD inhibition. *J Mol Biol*. 371: 25-33
- De Lay, N. & Gottesman. (2011). Role of polynucleotide phosphorylase in sRNA function in *Escherichia coli*. *RNA*. 17(6): 1172-1189.
- Deana, AC., Celesnik, H & Belasco, JG. (2008). The bacterial enzyme RppH triggers messenger RNA degradation by 5' pyrophosphate removal. *Nature*. 451(7176):355-358.
- Deutscher, M. & Reuven, NB. (1991). Enzymatic basis for hydrolytic versus phosphorolytic mRNA degradation in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 88(8): 3277-3280.
- Deutscher, M. (2009). Maturation and degradation of ribosomal RNA in bacteria. *Progress on Molecular Biology and Translational Science*. 369-391.
- Deutscher, M. (2015). Twenty years of bacterial RNases and RNA processing: how we have matured. *RNA*. 21:597-600
- Domínguez-Malfavón, L. (2013). Estudio de la interacción proteína-proteína de los componentes del RNA del degradosoma canónico de *Escherichia coli*. (Tesis doctoral).

- Donovan WP & Kushner SR. (1986). Polynucleotide phosphorylase and ribonuclease II are required for cell viability and mRNA turnover in *Escherichia coli* K-12. *National academy of science*. 83:120-124
- Durán-Figueroa, NV., Piña-Escobedo, A., Schroeder, J., Simons, RW & García-Mena, J. (2006). Polynucleotide phosphorylase interacts with ribonuclease E through betabetaalphabetabetaalpha domain. *Biochem*. 88(6): 725-735.
- Feng, L. & Taghbalout, A. (2014). The *Escherichia coli* major exoribonuclease RNase II is a component of the RNA degradosome. *Biosci Rep*.34(6): 879-891.
- Gao, J. L. (2006). Differential modulation of *E. coli* mRNA abundance by inhibitory proteins that alter the composition of the degradosome. *Molecular Microbiology*. 34(6): 394-406.
- Garrey, SM & Mackie, GA. (2011). Roles of the 5' -phosphate sensor domain in RNase E. *Mol Microbiol*. 1613-1624.
- Gordon, GC., Cameron, JC & Pflieger, BF. (2017). RNA sequencing identifies new RNase III cleavage sites in *Escherichia coli* and reveals increased regulation of mRNA. *MBio*.1- 8.
- Hoppe, AD., Scott, BL., Welliver, TP., Straight, SW & Swanson, JA. (2013). N-Way FRET microscopy of multiple protein-protein interactions in live cells. *Plos One*, 1-15.
- Janga, S. & Babu, MM. (2009). Transcript stability in the protein interaction network of *Escherichia coli*. *Molecular biosystems*. 5(2): 154-162.
- Jensen, K.F. (1993). The *Escherichia coli* K-12, W3110 and Mg1655 have a rph frameshift that leads to pyrimidine starvation due to low PyrE expression levels. *J Bacteriol*. 175:3401-3407.
- Kelly, K. R. (1992). RNase PH is essential for tRNA processing and viability in RNase-deficient *Escherichia coli* cells. *J Biol Chem*. 16015-16018.
- Khemici, V., Poljak, L., Toesca, I. & Carpousis, A.J. (2008) The RNase E of *Escherichia coli* is a membrane-binding protein. *Mol. Microbiol*. 70:799-813.
- Koslover, D.J., Callaghan, A.J., Maracaida, M.J. Garman, E.F., Martick, M., Scott, W.G. & Luisi, B.F. (2008). The crystal structure of *Escherichia coli* RNase E Apoprotein and a Mechanism for RNA degradation. *Structure*. 16(8): 1238-1244.
- Kuzminov, A. (1999). Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage  $\lambda$ . *Microbiol. Mol. Rev*. 63: 751-813.

- Lee, K., Bernstein, JA & Cohen, SN. (2002). RNase G complementation of rne null mutation identified functional interrelationships with RNase E in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 43(6): 1445-1456.
- Leroy, A., Vanzo, NF., Sousa, S., Dreyfus, M & Carpousis, AJ. (2002). Function in *Escherichia coli* of the non-catalytic part of RNase E: role in the degradation of ribosome mRNA. *Molecular Microbiology.* 45(5): 1231-1243.
- Li, Y. & Altman, S. (2003). A specific endoribonuclease, RNase P, affects gene expression of polycistronic operon mRNAs. *Proc Natl Accad Sci.* 100(23): 13213-13218.
- Li, Z. & Deutscher, MP. (1994). The role of individual exoribonucleases in processing the 3' end of *Escherichia coli* tRNA precursors. *J Biol Chem.* 269(8): 6064-6071.
- Li, Z. & Deutscher, MP. (1996). Maturation pathways for *E. coli* tRNA precursors: a random multienzyme process in vivo. *Cell.* 86(3): 503-512.
- Li, Z., Pandit, S & Deutscher, MP. (1998). 3' exoribonucleolytic trimming is a common feature of the maturation of small, stable RNAs in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95(6): 2856-2861.
- Liou, G.G., Chang, H.Y., Lin, C.S. & Lin-Chao, S. (2002). DEAD box RhlB RNA helicase physically associates with exoribonuclease PNPase to degrade double-stranded RNA independent of the degradosome-assembling region of RNase E. *J of Biol Chem.*
- Lu, F. & Taghbalout, A. (2014). The *Escherichia coli* major exoribonuclease RNase II is a component of the RNA degradosome. *Biosci. Rep.* 34(6) : 879-891. 273(43) :41157-41162.
- Marcaida, MJ., DePristo, MA., Chandran, V., Carpousis, AJ & Luisi, BF. (2006). The RNA degradosome: life in the fast lane of adaptive molecular evolution. *Trends in Biochemical Science.* 31(7):359-365.
- Martínez, VP., Dehó, H., Simons, RW & García-Mena, J. (2014). Ribonuclease PH interacts with acidic ribonuclease E site through a basic 80-amino domain. *FEMS Microbiology Letters.* 355(1) 51-60.
- Massé, E., Escorica, FE. & Gottesman, S. (2003). Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes and Development.* 17(19): 2374-2383.
- Massé, E., Salvail, H., Desnoyers, G. Arguin, M. (2007). Small RNAs controlling iron metabolism. *Current opinion in Microbiology.* 10(2): 140-145.

- Moreira, R. D. (2012). Synergies between RNA degradation and Trans-translation in *Streptococcus pneumoniae* cross regulation and co-transcription of RNase R and SmpB. *BMC Microbiol*, 1471.
- Morita, T., Kawamoto, H., Mizota, T., Inada, T. & Aiba, H. (2004). Enolase in the RNA degradosome plays a crucial role in the rapid decay of glucose transporter mRNA in the response to phosphosugar stress in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 54(4):1063-1075.
- Morita, T, Maki, k. & Aiba, H. (2005). RNase E-based ribonucleoprotein complexes: mechanical basis of mRNA destabilization mediated by bacterial noncoding RNAs. *Genes and development*. 19(18): 2176-2186.
- Myers, R.S. & Stahl, F.W. (1994) Chi and the RecBCD enzyme of *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet*. 28: 49-70.
- Ow, M. Perez, T & Kushner, SR. (2003). RNase G of *Escherichia coli* exhibits only limited functional overlap with its essential homologue, RNase E. *Mol Microbiol*. 49(3): 607-622.
- Papenfort, K., Said, N., Welsink, T., Lucchini, S., Hinton, JCD & Vogel, J. (2009). Specific and pleiotropic patterns of mRNA regulation by ArcZ, a conserved, Hfq dependent small RNA. *Molecular Microbiology*. 74(1): 139-158.
- Pérez-Medina Martínez, V., Dehò, G., Simons, R. W., & García-Mena, J. (2014). Ribonuclease PH interacts with an acidic ribonuclease E site through a basic 80-amino acid domain. *FEMS microbiology letters*, 355(1), 51–60. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12448>
- Pfeiffer, V., Papenfort, K., Lucchini, S., Hinton, JC & Vogel J. (2009). Coding sequence targeting by MicC RNA reveals bacterial mRNA silencing downstream of translational initiation. *Nature Structural and Molecular Biology*. (16(8): 840-846.
- Poteete, AR. (2001). What makes the bacteriophage lambda Red system useful for genetic engineering: molecular mechanism and biological function. *FEMS Microbiol Lett*. 201(1):9-14.
- Prud'homme-Généreux, A., Beran, RK., Iost, I., Ramey, CS., Mackie, GA & Simons, RW. (2004). Physical and functional interactions among RNase E, polynucleotide phosphorylase and cold shock protein, CsdA: evidence for cold shock degradosome. *Mol Microbiol*. 54(5): 1409-1421.
- Py, B., Higgins, CF., Krisch, HM & Carpousis, AJ. (1996). A DEAD-box RNA helicase in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Nature*. 381(6578): 913-922.

- Régnier, P. & Arraino, CM. (2000). Degradation of mRNA in bacteria: emergence of ubiquitous features. *Bioessays*. 22(3): 235-244.
- Regonesi, M. Del Favero, M., Basilico, F., Luisi, BF., Benazzi, L., Tortora, P., Mauri, P. & Dehó, G. (2006). Analysis of the *Escherichia coli* RNA degradosome composition by a proteomic approach. *Biochemie*. 88(2):151-161.
- Roth, A. & Breaker, RR. (2009). The structural and functional diversity of metabolite-binding riboswitches. *Annual Review of Biochemistry*. 78: 305-334.
- Sambrook, J. & Green, MR. (2011). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sawitzke, A.J., Thomason, N., Constantino, M., Bubunencko, S., Datta, S. & Court, D.L. (2007). Recombineering: *in vivo* genetic engineering in *E. coli*, *S. enterica* and beyond. *Methods Enzymol*. 421:171-199
- Schu, D. Zhang, A., Gottesman, S. & Storz, G. (2015). Alternative Hfq-sRNA interaction modes dictate alternative mRNA targets. *EMBO J*. 34(20): 2557-2573.
- Schuck, A., Diwa, A. & Belasco, J.G. (2009). RNase E regulates its synthesis in *Escherichia coli* by binding directly to a stem-loop in the *rne* 5' untranslated region. *Mol. Microbiol*. 72:470-478.
- Shahbadian, K, Jamalli, A, Zig, L & Putzer, H. (2009). RNase Y, a novel endoribonuclease, initiates ribo-switch turnover in *Bacillus subtilis*. *EMBO Journal*. 28(22):2523-2533.
- Singh, D., Chang, SJ., Lin, PH., Averina, OV., KAberdin, VR. & Lin-Chao, S. (2009). Regulation of ribonuclease E activity by the L4 ribosomal protein of *Escherichia coli*. *Proc Natl Accad Sci*. 106(3): 864-869.
- Sokhi, UK., DeSalle, R., Bacolod, MD., Das, SK., Dasgupta, S., Sarkar, D & Fischer, PB. (2014) Evolutionary dynamics of polynucleotide phosphorylases. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 73:77-86.
- Song, L., Wang, G., Malhotra, A., Deutscher, M.P. & Liang, W. (2016) Reversible acetylation on Lys501 regulates the activity of RNase II. *Nucleic Acids Res*. 44(5):1979-1988.
- Spickler, C. & Mackie, G.A. (2000). Action of RNase II and polynucleotide phosphorylase against RNAs containing stem-loops of defined structure. *J of Bacteriol*. 182:2422-2427
- Stanisavljevic, M., Krizkova, S., Vaculovicova, M., Kizek, R & Adam, V. (2015). Quantum dots-fluorescence resonance energy transfer based nanosensors and their application. *Biosens Bioelectron*. 74:562-574.

- Sulthana, S., Quesada, E. & Deutscher, MP. (2017). RNase II regulates RNase PH and is essential for cell survival during starvation and stationary phase. *RNA*. 23(9):1456-1464.
- Symmons, M.F., Williams, M.G., Luisi, B.F., Jones, G.H., Carpousis, A.J. (2002) Running rings around RNA: a superfamily of phosphate-dependent RNases. *Trends Biochem Sci*. (27(1):11-18
- Taraseviciene, L., Björk, G.R. & Uhlin, B.E. (1995) Evidence for and RNA binding region in the *Escherichia coli* processing endoribonuclease RNase E. *J. Biol. Chem*. 270:26391-26398.
- Vanderpool, C.K. (2007). Physiological consequences of small RNA-mediated regulation of glucose-phosphate stress. *Curr. Opin. Microbiol*. 10:146-151.
- Vanzo, N.F. Li, Y.S., Py, B., Blum, E., Higgins, C.F., Raynal, L.C., Krisch, H.M. & Carpousis, A.J. (1998). Ribonuclease E organizes the protein interactions in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Genes Dev*. 12:2770-2781.
- Viegas, SC., Silva, IJ., Saramago, M., Domingues, S & Arraino, C., (2011). Regulation of the small regulatory RNA MicA by ribonuclease III: a target-dependent way. *Nucleic Acids Res*. 39(7): 2918-2930.
- Wachi, M., Umitsuki, G., Shimizu, M., Takada, A & Nagai, K. (1999). *Escherichia coli* cafA gene encodes a novel RNase, designated as RNase G, involving in processing of the 5' endo of 16S rRNA. *Biochimie Biophys Res Comm*. 259(2): 483-488.
- Xu, F., Lin-Chao, S & Cohen, SN. (1993). The *Escherichia coli* pcnB gene promotes adenylation of antisense RNAI of ColE1-type plasmids in vivo and degradation of RNAI decay intermediates. *Proceedings of the Academy of Sciences of the United States of America*. 90(14): 6756-6760.
- Yeom, JH., Go., Shin, E., Kim, HL., Han, SH., Moore, CJ., Bae, J & Lee, K. (2008). Inhibitory effects of RraA and RraB on RNase E-related enzymes imply conserved functions in the regulated enzymatic cleavage of RNA. *FEMS Microbiol Lett*. 285(1): 10-15.
- Yu, D., Ellis, HM., Lee, EC., Jenkins, NA., Copeland, NG & Court, DL. (2000). An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc Natl Accad Sci*. 97(11): 5978-5983.
- Zhang, Y., Buchholz, F., Muyrers, J.P.P. & Stewart, A.F. (1998). A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nature Genet*. 20: 123-128.

- Zhang, A., Schu, DJ., Tjaden, BC., Storz, G & Gottesman, S. (2013). Mutations in interactions surfaces differentially impact E. coli Hfq association with small RNAs and their mRNA targets. *J Mol Biol.* 425(19): 3678-3297.
- Zheng J. (2006). Ion channels methods and protocols. *Humana press Inc.* 331:65-75
- Zhou, Z & Deutscher, MP. (1997). An essential function for the phosphate-dependent exoribonucleases RNase PH and polynucleotide phosphorylase. *Journal of bacteriology.* 179: 4391-4395.
- Zilhão, R., Camelo, L.& Arriano, C.M. (1993). DNA sequencing and expression of the *rnb* gene encoding *Escherichia coli* ribonuclease II. *Mol Microbiol.* 8(1):43-51.
- Zundel, MA., Basturea, GN & Deutscher, MP. (2009). Initiation of ribosome degradation during starvation in *Escherichia coli*. *RNA.* 15(5) 977-983.

## Tablas

**Tabla 1. Cepas empleadas en este trabajo**

cepa	Genotipo relevante	Referencias
<b>DY329</b>	<i>W310 Δ lacU169 nadA::Tn10gal490 pgIΔ8[cl185 Δcro bioA]</i>	Yu et al 2002
<b>LEC</b>	<i>DY329 rne::rne-6xGly-cfp</i>	Domínguez-Malfavón L.2013
<b>LE701C</b>	<i>DY329 rne::rne701-6xGly-cfp</i>	Domínguez-Malfavón L.2013
<b>LECBY</b>	<i>DY329 rne::rne-6xGly-cfp, rnb::rnb-6xGly, rph-1</i>	Arroyo-Vélez N. 2017
<b>LECHY</b>	<i>DY329 rne::rne-6xGly-cfp, rhb::rnh-6xGly, rnb</i>	Arroyo-Vélez N. 2017
<b>LE701CBY</b>	<i>DY329 rne::rne701-6xGly-cfp, rnb::rnb-6xGly, rph-1</i>	Arroyo-Vélez N. 2017
<b>LE701CHY</b>	<i>DY329 rne::rne701-6xGly-cfp, rph::rph-6xGly, rnb</i>	Arroyo-Vélez N. 2017
<b>LBY</b>	<i>DY329 rnb::rnb-6xGly-Phiyfp, rph-1</i>	Este trabajo
<b>LHY</b>	<i>DY329 rph::rph-6xGly-Phiyfp, rnb</i>	Este trabajo

**Tabla 2. Plásmidos empleados en este trabajo**

Plásmido	Características	Referencias
<b>pCP20</b>	Expresa la enzima flipasa (FLP) de forma termoinducible.	Cherepanov and Wackernagel, 1995
<b>pL05CtY</b>	Posee la construcción phiYFP río arriba del gen de resistencia a cloranfenicol	Domínguez-Malfavón <i>et al</i> 2013.
<b>pL07CtPYC</b>	Posee la construcción phiYFP-6xGly-CFP bajo el promotor bacteriano T5 río arriba del gen de resistencia a cloranfenicol	Domínguez-Malfavón <i>et al</i> 2013.
<b>pL08CtPC</b>	Posee la construcción phiYFP bajo el promotor bacteriano T5 río arriba del gen de resistencia a cloranfenicol.	Domínguez-Malfavón <i>et al</i> 2013.
<b>pL09CtPY</b>	Posee CFP bajo el promotor bacteriano T5 río arriba del gen de resistencia a cloranfenicol.	Domínguez-Malfavón <i>et al</i> 2013.

**Tabla 3. Oligonucleótidos empleados en este trabajo**

Primer	Secuencia (5'-3')	Notas
<b>NAV01F</b>	GAG GGG GAA TCG AAT CCA TTG TAG CGA CGC AGA AGG CGG CGC TGG CAA ACG GCG GTG GCG GCG GTG GCA TGA GAG GAT CGG GAT CCA GCG GCG CCC TG	Amplifica phi-YFP del plásmido pL05CtY, adiciona 6 gly y región H1 para recombinación en el gen de RNasa PH
<b>H2-Rnase PH</b>	CTT ACT TTT CTA CAG ACA AAA AAA AGG CGA CTC ATC AGT CGC CTT AAA AAG GCA AAC CAG CAA TAG ACA TAA GCG	Amplifica casete de cloranfenicol de pL05CtY. Adiciona región H2 para recombinación en gen de RNasa PH
<b>NAV03F</b>	TTG CCG AAG TCC GCA TGG AAA CCC GCA GCA TTA TTG CGC GCC CGG TCG CGG GCG GTG GCG GCG GTG GCA TGA GAG GAT CGG GAT CCA GCG GCG CCC TG	Amplifica la secuencia phi YFP de pL05CtY. Adiciona 6 gly y región H1 para recombinación con el gen de RNasa II
<b>H2-Rnase II</b>	GAG CGG GGA AAT AAA CGG CCC ATC CAT GAG GAA TGG GCC GTG AAA GGA GAG GCA AAC CAG CAA TAG ACA TAA GCG	Amplifica el casete de cloranfenicol de pL05CtY. Adiciona una región de H2 para recombinación con el gen de RNasa II
<b>NAV05F</b>	ACG CGC CCA CAG GAT GAA AT	Amplifica 208 pb río arriba del codón de inicio.
<b>NAV06R</b>	ACG AAG GTA GAG CGG GGA AA	Amplifica la región después del gen de RNasa II
<b>NAV07F</b>	GCG CTG GGT GAG TTC ACC AT	Amplifica 400 pb de bases río arriba del gen de RNasa PH
<b>NAV08R</b>	TGG TTT CAT GCC TTC GCT CC	Amplifica la región después del gen de la RNasa PH
<b>LDM42R</b>	CAG GGC TTG ATT ACT TTG AGC	Amplifica la región posterior al gen de RNasa E.
<b>LDM46F</b>	CCA ACG CCA GCT GAA CCT GC	Amplifica 500 pb después del gen de RNasa E 701
<b>CMJpyF</b>	AAT CTG TTA TCG GCA ACA GC	Forward. Amplifica para el gen de piruvato quinasa
<b>CMJpyR</b>	TTC GTC GAA GTT GTT GAG GC	Reverse. Amplifica para el gen de piruvato quinasa.
<b>ESR01galKF</b>	CGT CGT GAA CAG TGC GAA AC	Forward. Amplifica para gen de galactoquinasa.
<b>ESR02galKR</b>	CGC CCA TAC GTT TCA GGT C	Reverse. Amplifica para gen de galactoquinasa
<b>ESR03ybayF</b>	GGA TCC GTC AGA AAG TCG CA	Forward. Amplifica para gen de lipoproteína de estrés celular.
<b>ESR04ybayR</b>	CCG CAC TCA ACA GAA TAC GC	Reverse. Amplifica para gen de lipoproteína de estrés celular.

**Tabla 4. Protocolo empleado para amplificaciones por PCR**

Etapa	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión final
Temperatura/ tiempo	94°C/5 min	94°C/30s	Variable	72° C/30s	72° C/5 min

**Tabla 5. Fórmulas para cálculo de FRET**

<b>Eficiencia aparente</b>	$FRET_{ap} = A - A0$	
<b>Componente directo de excitación del aceptor (Cepas phi YFP)</b>	$Cociente A0 = (Ff_{directo})/(Fa)$	Ff <sub>directo</sub> = Fluorescencia del aceptor en canal FRET Fa= Fluorescencia del aceptor en el canal aceptor
<b>Diafonía* del donador (Cepas CFP)</b>	$Diafonía = (FfD/FdD)$	FfD= Fluorescencia del donador en canal FRET FdD= Fluorescencia del donador en el canal donador
<b>Cociente FRET</b>	$Cociente A = ((FfAD - (FdAD * Diafonía)) / FaDA)$	FfAD= Fluorescencia del aceptor en presencia del donador en canal FRET FdAD= Fluorescencia del donador en presencia del aceptor en canal FRET
<i>FaDA, fluorescencia del aceptor en el canal del aceptor (514/537 nm); *, cross-talk.</i>		

## Figuras

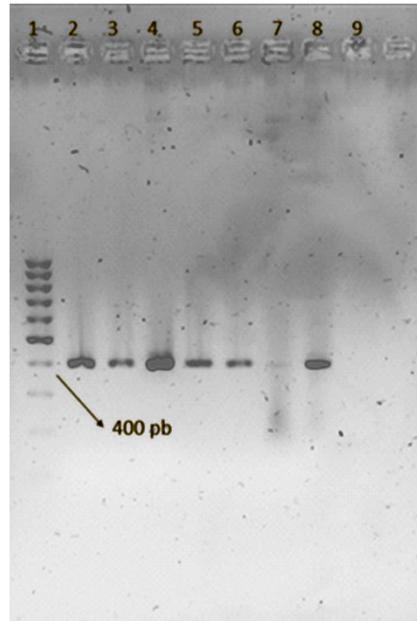


Figura 1. Productos de PCR para el gen de piruvato quinasa en todas las cepas. Carril 1 MPM 100 pb. Carriles 2-9 cepas DY329, LEC, LE701C, LECHY, LECBY, LE701CHY, LE701CBY, LHY y LBY. Carril 10, control negativo. todas presentan el producto de 400 pb correspondiente al gen *pyk*.

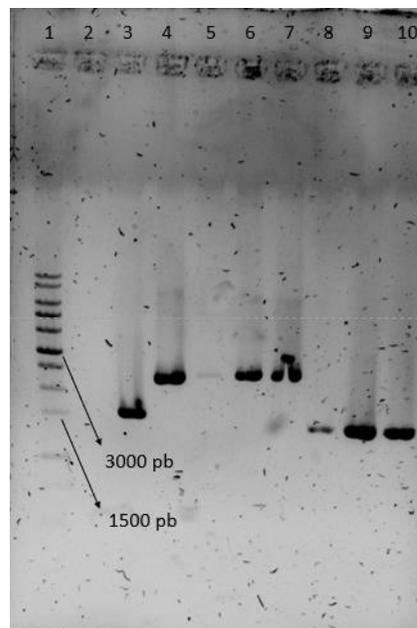


Figura 2. Productos de PCR para RNasa E en todas las cepas. Carril 1 MPM de 1. Carril 2, control negativo. Carril 3, cepa DY329 (1570 pb). Carriles 4-7, cepas LEC, LBY, LECHY y LECBY (2600 pb). Carriles 8-10 cepas LE701C, LE701CHY Y LE701CBY (1600 pb). Todas presentan el tamaño adecuado para el gen *rne* correspondiente, con excepción de LBY, el cual presento un tamaño de 2600 pb para *rne*.

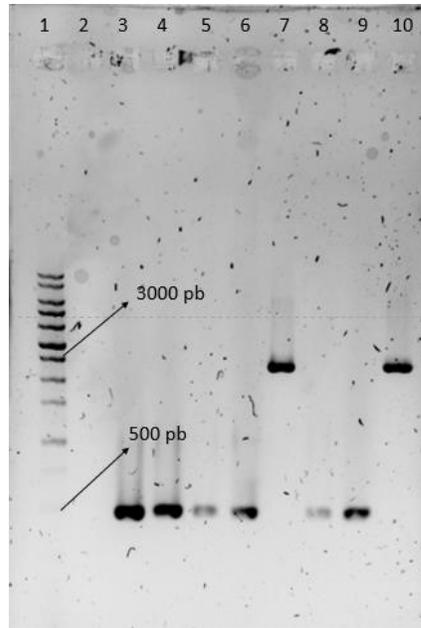


Figura 3. Productos de PCR RNasa PH en todas las cepas. Carril 1, MPM 1 kb. Carril 2, control negativo. Carriles 3-6, cepas DY329, LBY, LEC y LECBY (400 pb). Carril 7, cepa LECHY (2600 pb). Carriles 8 y, cepas LE701C y LE701CBY (400 PB). Carril 10, cepa LE701CHY (2600 PB). Todas presentan el tamaño correspondiente al gen *rph*.

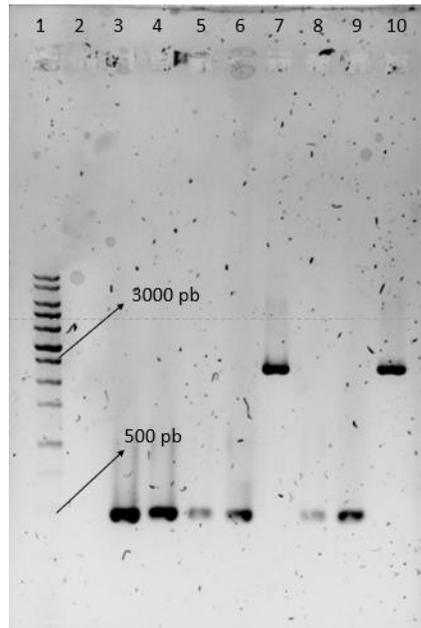


Figura 4. Productos de PCR RNasa II. Carril 1, MPM 1 kb. Carril 2, control negativo. Carril 3, DY329 (400 pb). Carril 4, cepa LBY (2400 pb). Carriles 5 y 6, cepas LEC y LECHY (400 pb). Carril 7, cepa LECBY (2400 pb). Carril 8, cepa LE701C (400 pb). Carril 9, cepa LE701CBY (2400 pb). Carril 10, cepa LE701CHY (400 pb). Todas las cepas presentan el tamaño correspondiente.

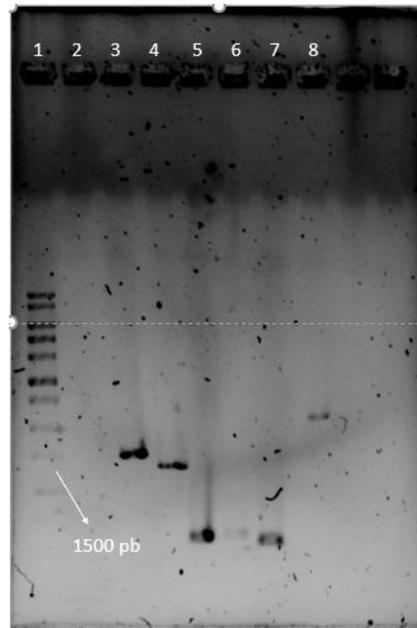


Figura 5. Cepa LHY con diferentes productos de PCR. Carril 1, MPM 1 kb. Carril 2, control negativo. Carril 3, cepa DY329 gen *me* (1570 pb). Carril 4, cepa LHY gen *me* (1300 pb). Carril 5, cepa DY329 gen *rnb* (400 pb). Carril 6, cepa LHY gen *rnb* (400 pb). Carril 7, cepa DY329 gen *rph* (400 pb). Carril 8, cepa LHY gen *rph* (2400 pb). Todos los tamaños corresponden al tamaño esperado, excepto el carril 4 el cual presenta genotipo *me701*.

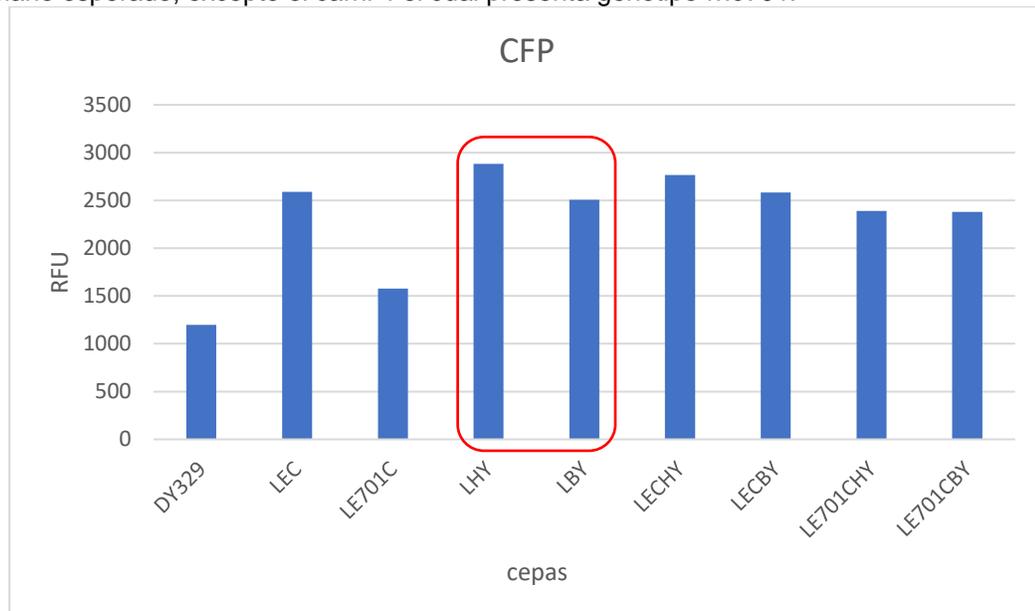


Figura 6. Espectrofluorimetría de las cepas para CFP. Cada cepa fue analizada en el canal correspondiente a CFP con excitación a 458 nm y emisión a 505 nm. Todas las cepas con CFP presentaron una fluorescencia mayor a DY329, sin embargo, LHY y LBY presentaron fluorescencia mayor a la cepa de referencia (DY329). Las unidades se presentan como unidades de Fluorescencia relativa (RFU).

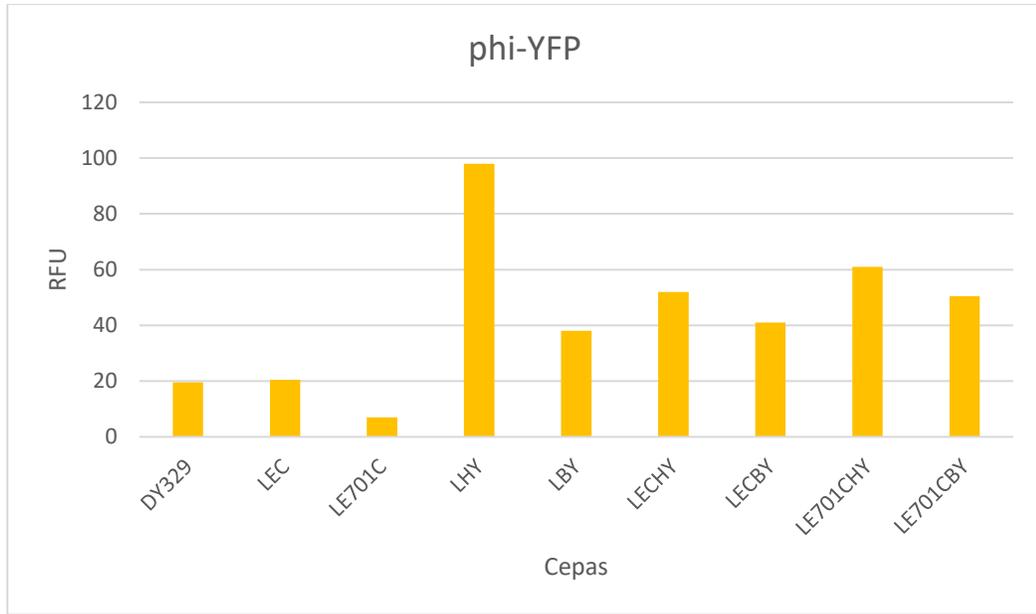


Figura 7. Espectrofluorimetría de las cepas para phi-YFP. Cada cepa fue analizada en el canal correspondiente a phi-YFP con excitación a 514 nm y emisión a 537 nm. Todas las cepas con phi-YFP presentan una fluorescencia mayor respecto a la cepa control (DY329) y las cepas control de CFP (LEC y LE701C). Las unidades se presentan como unidades de Fluorescencia relativa (RFU).

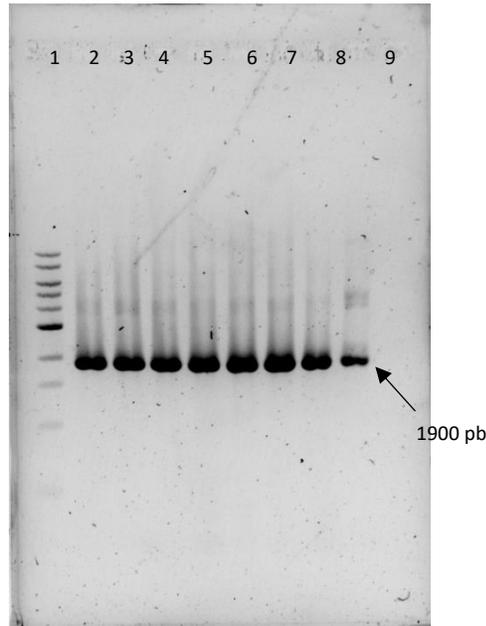


Figura 8. Amplificación de casetes phi-YFP-cloranfenicol para RNasa II y RNasa PH. Casete para recombinación con RNasa II con los pares de oligonucleótidos NAV01F-H2 RNase II (Carriles 2-5). Casete para recombinación con RNasa PH con los pares de oligonucleótidos NAV03F-H2 RNase PH (Carriles 6-9). Se colocaron 3  $\mu$ L de la reacción en cada carril. Gel de agarosa 0.8%.

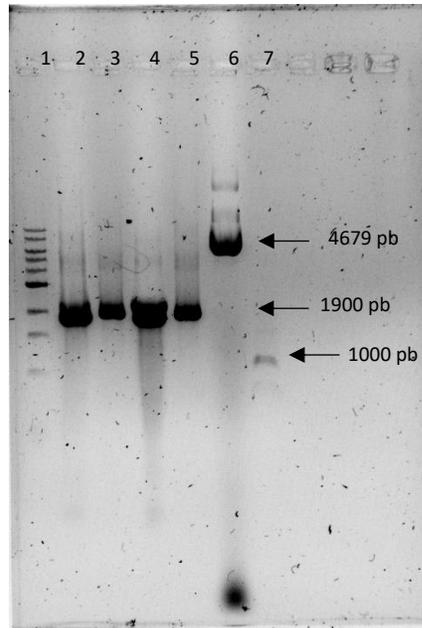


Figura 9. Digestión de producto casete phi-YFP-Cloranfenicol y plásmido pL05CtY con la enzima de restricción DpnI. Carril 1 MPM 1 kb. Carril 2 casete recombinación RNasa II antes de digestión (260 ng/μL). Carril 3 casete recombinación RNasa II después de digestión con DpnI (35 ng/μL). Carril 4 casete recombinación RNasa PH antes de digestión (165 ng/μL). Carril 5 casete recombinación RNasa PH después de digestión con DpnI (29 ng/μL). Carril 6 Plásmido pL05CtY antes de digestión (1090 ng/μL). Carril 7 Plásmido pL05CtY después de digestión enzimática con DpnI.

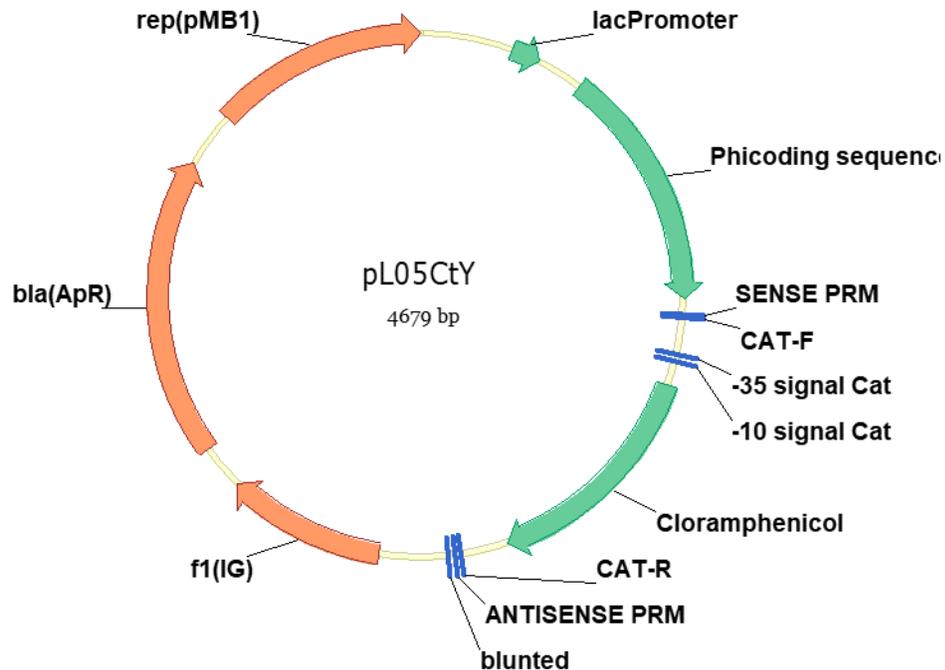


Figura 10. Esquema del plásmido pL05CtY empleado para obtener los casetes de recombinación para RNasa II y PH. Este incluye la proteína phi-YFP (*phi coding sequence*) y el gen de resistencia a cloranfenicol como marcador de selección.

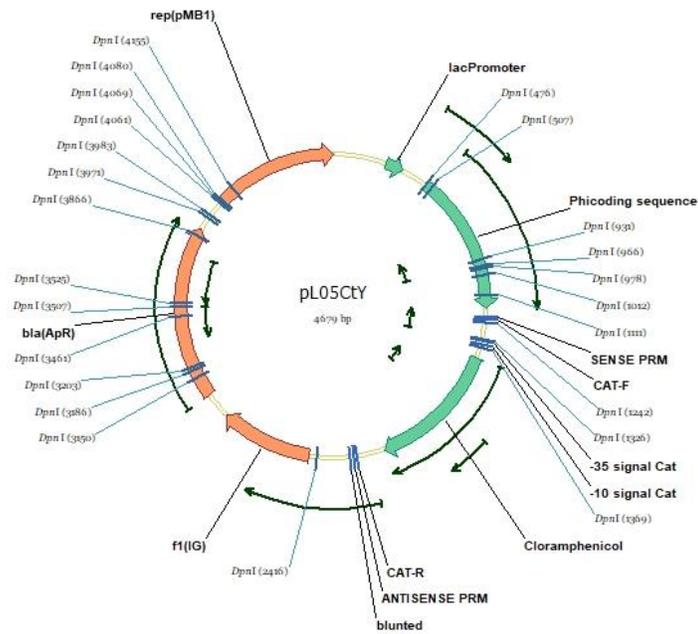


Figura. 11. Mapa de restricción del plásmido pL05CtY por la enzima DpnI.

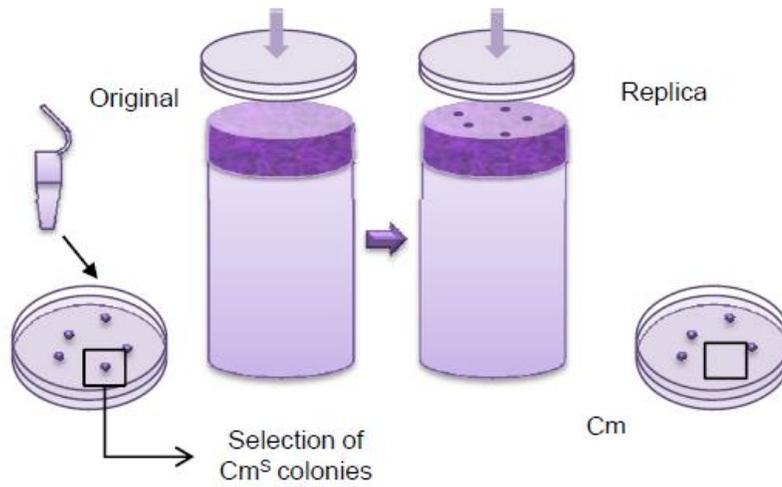


Figura 12. Esquema del procedimiento de *patching plating* para selección de colonias transformantes.

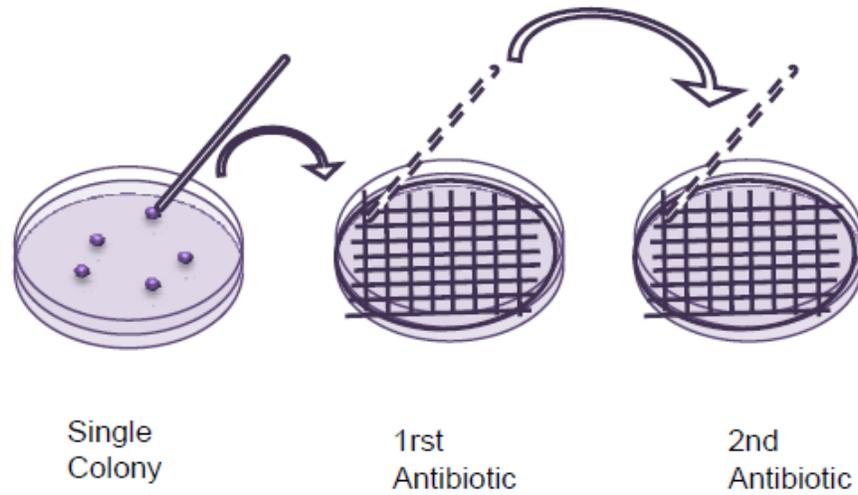


Figura 13. Esquema de la técnica *toothpicking* para confirmación de colonias transformadas

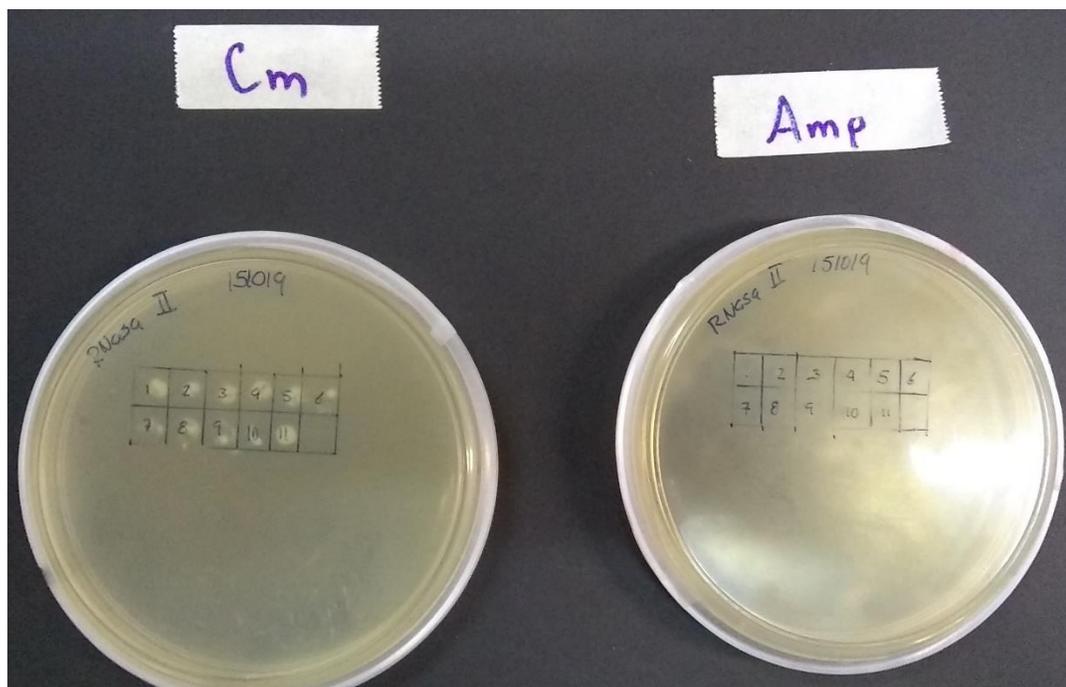


Figura 14. Selección de transformantes para cepa LBY. 11 colonias seleccionadas crecieron en medio LB con cloranfenicol (lado izquierdo), mientras que en medio LB con ampicilina no creció ninguna (lado derecho).

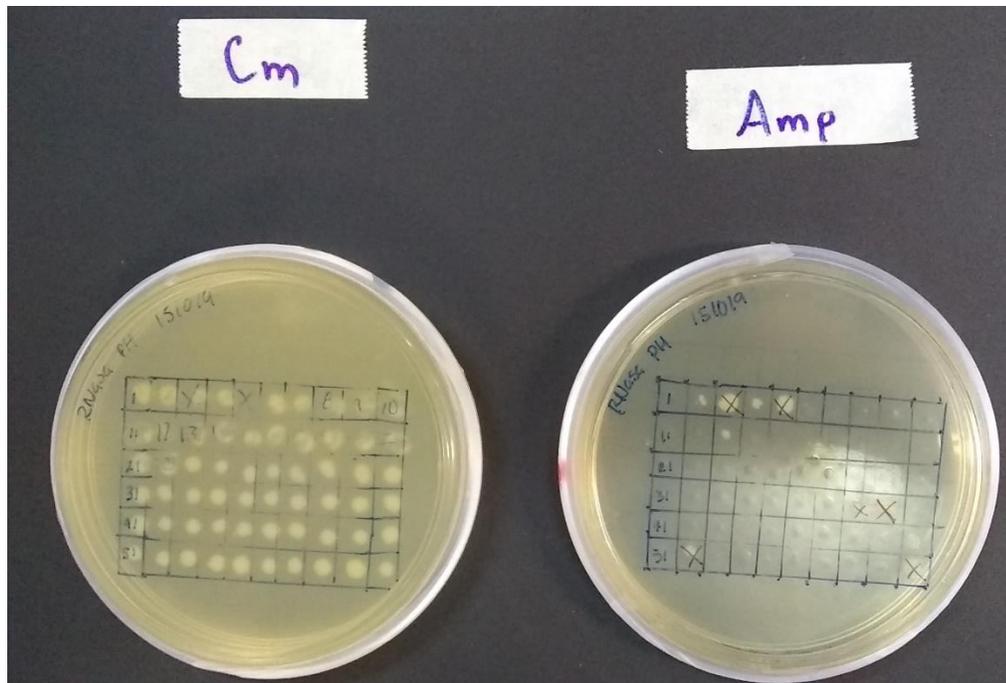


Figura 15. Selección de transformantes para cepa LHY. 60 colonias seleccionadas crecieron en medio LB con cloranfenicol (lado izquierdo), mientras que en medio LB crecieron 9, estas fueron descartadas como transformantes (lado derecho).

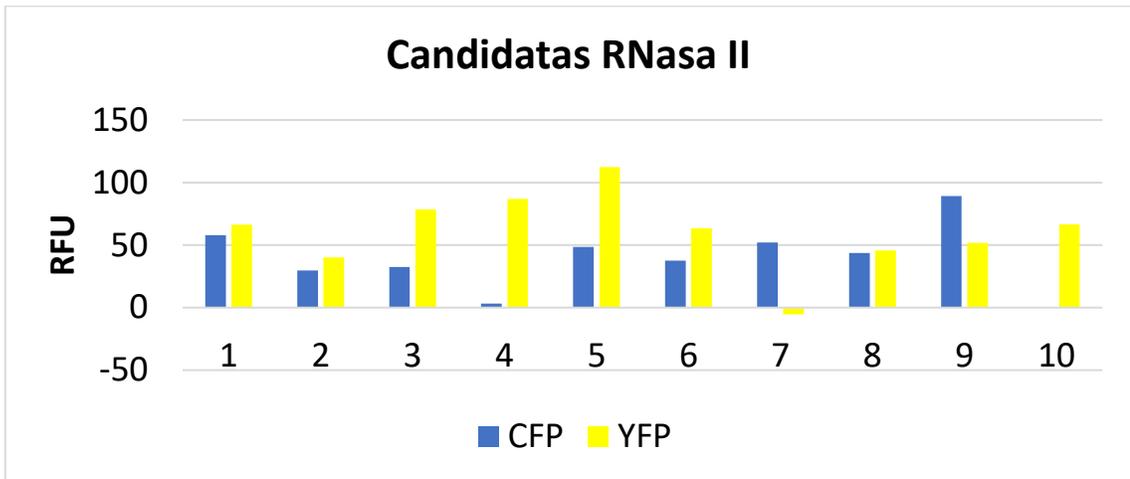


Figura 16. Ensayo espectrofluorimétrico para las candidatas de la cepa LBY. El análisis para los canales de CFP y phi-YFP muestran una diferencia considerable en ambas fluorescencias para las candidatas denotadas con los números 4, 5 y 10. Las unidades se reportan como unidades relativas de fluorescencia (RFU).

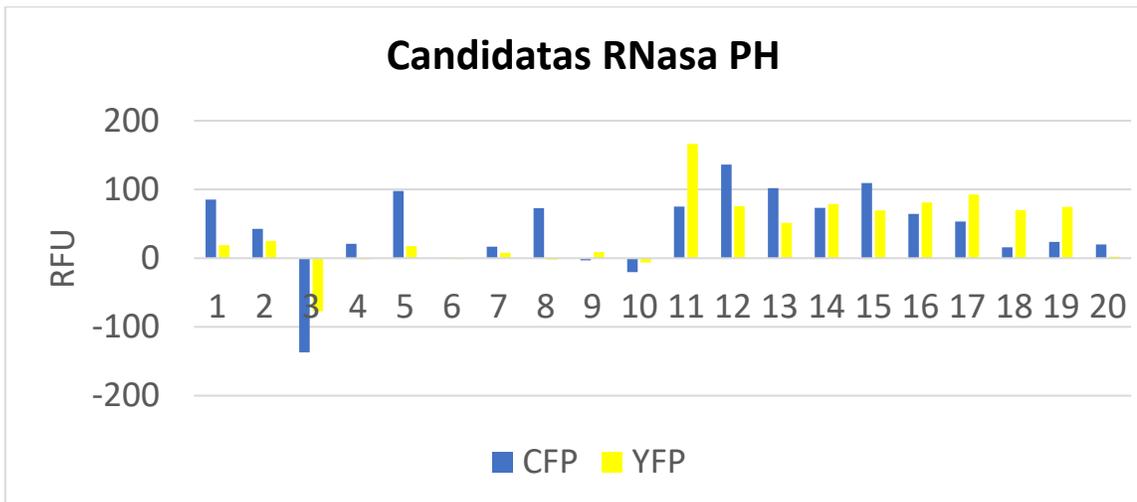


Figura 17. Ensayo espectrofluorimétrico para las candidatas de la cepa LHY. El análisis para los canales de CFP y phi-YFP muestran una diferencia considerable en ambas fluorescencias para las candidatas denotadas con los números 11, 18 y 19. Las unidades se reportan como unidades relativas de fluorescencia (RFU)

-fin-de-texto-