

Secuencias requeridas para la terminación de transcripción en el terminador intrínseco λtI

Miguel Martínez Trujillo¹, Rosa María Bermúdez Cruz², Alejandra Sánchez Trujillo², Yazmín Carreón Abud¹ y Cecilia Montañez Ojeda²

¹ Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

² Departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV-IPN, Unidad Zacatenco.

RESUMEN

El terminador λtI se localiza aproximadamente a 280 bases hacia delante del gen λint y presenta la estructura típica de un terminador intrínseco. Con el propósito de identificar las secuencias que se requieren para la terminación por λtI se generaron deleciones tanto del extremo 3' como del 5' en la región de este terminador. La eficiencia de terminación se determinó midiendo los niveles de galactocinasa (*galK*) y por ensayos de Northern blot, así como por la terminación de la transcripción *in vitro*. El ADN no transcrito hacia el extremo 3' afecta la terminación de la transcripción y la sustitución de secuencias ricas en TA por otras ricas en GC disminuyen la eficiencia de la terminación por 25%. Además, las secuencias hacia el extremo 5' refuerzan ligeramente la terminación de la transcripción.

Palabras clave: lambda, terminación, transcripción.

ABSTRACT

The λtI terminator is located approximately 280 bp beyond the λint gene and it has a typical structure of an intrinsic terminator. In order to identify sequences required for λtI transcription termination a set of deletion mutants were generated by *in vitro* enzymatic digestion, either from the 5' or the 3' ends onto the λtI region. The termination efficiency was determined by measuring the levels of galactokinase (*galK*), by Northern blot assays and *in vitro* transcription termination. The importance of the uridines and the stability of the stem structure in the transcription termination were demonstrated. The non-transcribed DNA in the 3' end affects the termination and substitution of TA rich sequences by GC rich ones diminishes the termination efficiency by 25%. Additionally, sequences upstream have a slightly effect reinforcing the transcription termination.

Key words: lambda, transcription, termination.

INTRODUCCIÓN

Existen dos tipos de terminadores de transcripción en *Escherichia coli*: terminadores dependientes de Rho y terminadores intrínsecos. Los últimos no requieren de factores además de la ARN polimerasa para tener una terminación eficiente *in vitro* (Richardson 1993). Los terminadores intrínsecos tienen una región simétrica rica en bases GC seguida por un trecho de timinas (Rosenberg y Court 1979). Se ha propuesto que la región simétrica de GC forma una estructura de horquilla en el ARN con una serie de uridinas terminales (Farnham y Platt 1980). Se han reportado 135 terminadores intrínsecos en *E. coli* y otras 960 posibles secuencias de estos terminadores en el extremo 3' de las unidades de transcripción, lo cual representa alrededor de la mitad de las secuencias de terminadores (Lesnik *et al.* 2001). La importancia del apareamiento de la hilera de uridinas en el ARN con las adeninas en el ADN es apoyada por estudios que utilizan análogos de bases (Farnham y Platt 1980) y sugiere que la inestabilidad de estas uniones puede facilitar la terminación de la transcripción (Martin y Tinoco 1980). En los primeros modelos se proponía que la horquilla producía una pausa y posteriormente las interacciones rU-dA entre el ARN y el ADN facilitaban la disociación del transcrito (Platt 1986). Una versión diferente a la anterior es el “modelo termodinámico”, el cual considera

como características importantes las interacciones entre las proteínas y los ácidos nucleicos dentro del complejo de alargamiento (Reynolds *et al.* 1992, von Hippel 1998). Se ha estimado que la eficiencia de λI es de 95-99% en condiciones *in vivo* (Montañez *et al.* 1986, Cisneros *et al.* 1996). Se ha demostrado que la proteína nusA es importante en la terminación, ya que la terminación en la cepa mutante *nusA1* es sólo del 60% (Bermúdez-Cruz *et al.* 1999).

En el presente trabajo se definieron las secuencias mínimas requeridas por la región de λI para terminar la transcripción. Se generaron una serie de deleciones tanto hacia atrás y hacia delante de la región que codifica para la horquilla del terminador y se determinó la eficiencia de terminación mediante la actividad de galactocinasa y por ensayos de transcritos *in vivo* (Northern blots) e *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Para los ensayos *in vivo* se utilizó la cepa de *Escherichia coli* SA1943 *galK* (Adhya *et al.* 1968). Los plásmidos y fagos utilizados se presentan en la Tabla 1. Las enzimas de restricción, exonucleasa *Bal31* y la polimerasa Klenow se utilizaron de acuerdo a las especificaciones de los fabricantes. Los nucleótidos radioactivos para la secuenciación del

ADN y para la transcripción *in vitro*, así como la ¹⁴CGalactosa fueron adquiridos de Amersham. Las bacterias se crecieron en medio LB (triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%). Las células transformadas con los plásmidos que confieren resistencia a ampicilina fueron seleccionadas en placas de agar MacConkey adicionadas con galactosa al 5% y ampicilina (50 µg/ml). Para aislar el ARN las bacterias fueron crecidas en medio mínimo M56 con glucosa.

Métodos

Generación de las deleciones en los extremos 5' y 3' de λI

Para generar las deleciones hacia atrás de λI se utilizó pUS6 (Schmeissner *et al.* 1984), el cual fue digerido con *HindIII* y tratado con la exonucleasa *Bal31* para remover el ADN a partir de los extremos generados por el corte con *HindIII*. Los extremos del ADN fueron reparados con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa y para unir los extremos se insertaron linkers de *HindIII*, los cuales se pegaron con T4 ADN ligasa. Se transformaron células competentes y las colonias fueron seleccionadas por su resistencia a ampicilina. Los extremos finales de cada deleción en los plásmidos construidos, se determinaron mediante la secuenciación a partir del sitio *HindIII*.

Los plásmidos de la serie pMS se construyeron para medir la eficiencia de terminación de las deleciones 5' de λI , y se obtuvieron mediante la inserción de los fragmentos *HindIII*-

PstI con las diferentes deleciones, en el fragmento *HindIII*-*Pgal*-*PstI* de pKG1800. Las deleciones del extremo 3' fueron generadas por Court *et al.* (1983) y en este trabajo los fragmentos *AluI*-*AluI* de aproximadamente 230 pb (con la región de λI) se subclonaron en el sitio *SmaI* de pKG1800 (McKenney *et al.* 1981). En todos los casos las versiones de λI quedaron ubicadas entre el promotor *Pgal* y el gen *galk*. Para secuenciar las deleciones se hicieron subclonaciones en M13mp8 y se utilizó el método descrito por Sanger (1977). Para predecir las estructuras secundarias del ARN se utilizó el programa RNAstructure versión 4.2 (Mathews *et al.* 2004), considerando una temperatura de 37°C.

Ensayos *in vivo*

Los ensayos enzimáticos de galactocinasa fueron realizados utilizando D-[¹⁴C] galactosa de acuerdo al protocolo descrito por McKenney *et al.* (1981). Las unidades de galactocinasa se expresaron como nmol de galactosa fosforilada por minuto por mililitro de células crecidas a una absorbancia de 1.0 a 650 nm.

Para realizar los ensayos de Northern blot se extrajo el ARN total de acuerdo al protocolo descrito por Mackie *et al.* (1985). Las sondas de ARN se prepararon por transcripción *in vitro*, marcando con ³²P, mediante el procedimiento descrito por Promega. Se prepararon sondas antisentido para los transcritos de β -lactamasa, *galk* y λI , con tamaños de 813, 149 y 152 bases, respectivamente. El ARN

desnaturalizado fue separado por electroforesis en agarosa al 1.8%, con formaldehído al 37% y se transfirió a membranas Hybond (Amersham). Los extractos de ARN fueron calentados a 65°C durante toda la noche e hibridados a 55°C por 6 h en solución 2XSSC, 0.1% SDS, con las sondas antisentido *galK*, *tI* y β -lactamasa [α -³²P] (1 X 10⁶ cpm). Después de la hibridación las membranas fueron lavadas dos veces con solución 0.1X de SSC y 0.1% de SDS, durante 15 min a 68°C y posteriormente fueron secadas para ser expuestas en películas fotográficas. Los auto radiogramas fueron escaneados a una absorbancia de 420 nm en un sistema digital IS-1000 y la absorbancia relativa de la relación *galK*/ β -lactamasa se usó para determinar el porcentaje de terminación de las versiones de λ *tI*.

Terminación de la transcripción *in vitro*.

Para medir la transcripción *in vitro* se construyeron los plásmidos insertando los fragmentos *Hind*III-*Eco*RV derivados de los plásmidos pMC119, pMC21, pMC112, pMS634, pMS635, pMS325 y pMS337 (con las diferentes deleciones de λ *tI*), en el plásmido pBSKS+ (STRATAGENE), para así generar los transcritos a partir del promotor T3. El terminador silvestre se obtuvo a partir de pUS6. Para los ensayos de transcripción los plásmidos fueron linearizados previamente con *Eco*RI. Se utilizaron las condiciones de transcripción recomendadas por el fabricante (INVITROGEN). Para remover los

plásmidos que se usaron como templados se adicionó DNasaI libre de RNasa (INVITROGEN). Los transcritos detenidos y no detenidos en los terminadores fueron precipitados con etanol y resuspendidos en buffer desnaturalizante para resolverlos posteriormente en electroforesis. La eficiencia de terminación se determinó mediante la siguiente fórmula: [cpm de los transcritos terminados en λ *tI* x 100]/[cpm de los transcritos terminados + cpm de los transcritos no terminados].

RESULTADOS

Deleciones

Las deleciones 3' y 5' obtenidas en la región de λ *tI* se presentan en la Figura 1. Se obtuvieron seis deleciones del extremo 3', Δ 11, Δ 28 y Δ 119 se localizan 28, 19 y 3 nucleótidos hacia delante del trecho de uridinas, por lo que estas regiones no se transcriben. La Δ 21 elimina el trecho de uridinas y dos adeninas de la horquilla del transcrito de ARN y disminuye la estabilidad a -15.6 kcal/mol (Tabla 1). Las deleciones Δ 112 y Δ 53 afectan notablemente la estructura de la horquilla y las estabilidades son de -2.1 y 0.0 kcal/mol, respectivamente. Respecto a las deleciones 5', Δ 326, Δ 337 y Δ 325 se localizan 60, 46 y 18 nucleótidos hacia atrás de la estructura de la horquilla. Las deleciones Δ 635, Δ 634 y Δ 626 afectan la estructura de la horquilla y disminuyen la estabilidad de ésta a -15.0, -1.5 y -0.3 kcal/mol, respectivamente. Las diferentes versiones de λ *tI* fueron subclonadas entre el promotor *Pgal* y el gen *galK*

(Figura 2) y ensayadas para determinar la eficiencia de terminación en condiciones *in vivo*.

Ensayos de terminación *in vivo* con galactocinasa

Para determinar la eficiencia de terminación de la transcripción para las diferentes deleciones de λtI , se utilizó un ensayo enzimático. Se transformó la cepa SA1943 *galK* de *E. coli* con los diferentes plásmidos y la actividad de galactocinasa se determinó de acuerdo a materiales y métodos. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 2. La eficiencia de terminación de la transcripción no se modificó en las deleciones $\Delta 11$ y $\Delta 28$ del extremo 3' y $\Delta 326$ y $\Delta 337$ del extremo 5', mientras que las otras deleciones disminuyeron la eficiencia de terminación de la transcripción en diferentes magnitudes.

Ensayos de Northern blot

Se utilizaron ensayos de Northern blot para determinar la eficiencia de terminación directamente a partir de los transcritos, en condiciones *in vivo*. El ARN total fue aislado de la cepa SA1943 *galK* de *E. coli*, la cual fue transformada previamente con los plásmidos que llevaban las diferentes deleciones de λt . El ARN total fue hibridado con cada una de las sondas antisentido (figura 2). La sonda *galK* detectó los transcritos que no se detuvieron en λtI y por lo tanto transcribieron al gen *galK*. Se utilizó la sonda de β -lactamasa para estandarizar la cantidad de ARN que se utilizó en cada caso. La región de λtI se detectó con la sonda antisentido *tI*.

La figura 3 muestra auto radiogramas típicos de los productos de transcripción *in vivo*, detectados por las sondas *galK* ó *tI*. Los transcritos de *galK* son mayores a 2 kilobases, mientras que los que se detienen en λtI son de aproximadamente 800 nucleótidos. En la tabla 3 se presenta la cuantificación de los transcritos de *galK* estandarizados con los transcritos de β -lactamasa. De manera similar a lo ocurrido en los ensayos enzimáticos, las deleciones $\Delta 11$ y $\Delta 28$ de 3' y $\Delta 326$ y $\Delta 337$ de 5' no modificaron la eficiencia de terminación de la transcripción. Las deleciones que eliminaron la terminación de la transcripción fueron $\Delta 21$, $\Delta 112$ y $\Delta 53$ del extremo 3'.

Terminación de la transcripción *in vitro*

Se determinó el efecto de algunas de las deleciones de λtI con el sistema de transcripción *in vitro* de la ARN polimerasa del fago T3. En la figura 4 se muestra un auto radiograma típico de la transcripción *in vitro*. Los productos de ARN de menor tamaño en cada carril son los que terminaron la transcripción en λtI , mientras que los de mayor tamaño son los que continuaron la transcripción hasta llegar al borde del ADN cortado con *EcoRI*. En la tabla 3 se presentan los porcentajes de terminación para cada una de las deleciones estudiadas. Las deleciones tienen un efecto similar en la eficiencia de terminación de la transcripción con respecto a los ensayos de tipo Northern, con la diferencia de que en los ensayos *in*

in vitro los valores son menores debido al sistema utilizado.

DISCUSIONES

El terminador λI presenta la estructura típica de un terminador intrínseco, con una simetría de diada seguida por un trecho de uridinas (Luk *et al.* 1982, Guarneros *et al.* 1982). Aunque se ha determinado la importancia de la horquilla y del trecho de uridinas en varios terminadores intrínsecos, los papeles específicos asignados a estas regiones han cambiado. En el primer modelo se propuso que la horquilla ocasionaba una pausa en la ARN polimerasa y las uridinas participaban en la disociación del híbrido débil dADN-rARN (Rosenberg y Court 1979, Farnham y Platt 1980, Platt 1986). En el modelo más reciente se considera que las interacciones entre los ácidos nucleicos y la ARN polimerasa son más importantes. Se han caracterizado bioquímicamente los tres sitios en los cuales los ácidos nucleicos interaccionan con la ARN polimerasa y estabilizan el complejo de alargamiento ternario (TEC): a) El sitio de unión heteroduplex ARN:ADN (HBS), b) El sitio de unión a ARN de cadena sencilla (RBS) y c) El sitio de unión a ADN de doble cadena (Korzheva *et al.* 2000, Nudler *et al.* 1997, Nudler *et al.* 1996). En este último modelo la horquilla no induce la pausa en la ARN polimerasa y en cambio es inducida por el trecho de uridinas, probablemente reforzado por secuencias en el ADN ubicadas hacia adelante, lo cual proporciona tiempo adicional para que se forme la

horquilla y consecuentemente desestabilice al TEC. Lo anterior produce un debilitamiento de las interacciones en el sitio de unión al ARN y el sitio heteroduplex, lo cual conduce a la disociación de la ARN polimerasa (Nudler *et al.* 1995, Nudler *et al.* 1997, Nudler *et al.* 1998, Komissarova y Kashlev 1997, Nudler 1999, Gusarov y Nudler 2001, Nudler y Gottesman 2002).

Se ha estudiado el papel de la estructura secundaria de la horquilla de λI mediante la generación de mutaciones puntuales que disminuyen la estabilidad de la horquilla a la mitad, ocasionando que la eficiencia del terminador se reduzca de 99 a 81% en condiciones *in vivo* (Cisneros *et al.* 1996). Sin embargo, no existe una correlación simple entre la eficiencia de terminación de la transcripción y la estabilidad de la estructura de horquilla (Reynolds *et al.* 1992). En cambio se ha demostrado que las mutaciones puntuales del tallo de λI afectan en mayor proporción la estabilidad de los transcritos debido a la actividad exonucleolítica de una polinucleótido fosforilasa (Cisneros *et al.* 1996). Esta protección exonucleolítica se ha demostrado también para el terminador *crp* (Abe and Aiba 1996).

La delección $\Delta 21$ del extremo 3' de λI demuestra la importancia de las uridinas, ya que cuando se analiza la producción de transcritos de *galk* tanto *in vivo* como *in vitro* se elimina la terminación de la transcripción (figuras 3 y 4 y tabla 3) y en el caso de los ensayos enzimáticos sólo se conserva una actividad residual (tabla 2). La

diferencia observada con los métodos enzimáticos y de transcritos puede ser debida a la estabilidad de la enzima galactocinasa. Estos resultados coinciden con los reportados para los terminadores *thr* y *trp*, en los cuales la remoción de 4 uridinas elimina por completo la terminación en el primer caso y en el segundo la reduce hasta el 3% (Lynn *et al.* 1988, Christie *et al.* 1981).

Se ha reportado para algunos terminadores que el ADN no transcrito hacia delante de las uridinas, refuerza la eficiencia de terminación (Telesnitsky y Chamberlin 1989, Reynolds *et al.* 1992). Lee *et al.* (1990) demostraron que estas secuencias del ADN modulan las pausas de la ARN polimerasa de *E. coli*. En la delección $\Delta 119$ de *λtI*, se disminuyó la eficiencia de terminación a 56% en el ensayo enzimático, a 51% en el ensayo *in vitro* y a 74% en los ensayos de transcritos *in vivo* (tablas 2 y 3). La importancia de las secuencias de ADN no transcritas es probablemente una consecuencia de la interacción de la ARN polimerasa con una región de ADN de doble cadena (Nudler *et al.* 1996, Korzheva *et al.* 2000), la cual puede reforzar la pausa inducida por el trecho de uridinas (Gusarov y Nudler 2001). En la delección $\Delta 119$ la secuencia ATCAAA, rica en AT fue cambiada por una secuencia rica en GC (CGGGCA). En el terminador T7, el cambio de nucleótidos entre 3 y 7 bases hacia delante del sitio de liberación fueron críticos para determinar la fuerza del terminador, y el cambio de TATAAG (3-8) por CCGAGG (3-8) disminuyó la

eficiencia de terminación de 65% a sólo 3% (Telesnitsky y Chamberlin 1989). Esto sugiere que en algunos terminadores la presencia de timinas y adeninas hacia delante del sitio de terminación del transcrito pueden reforzar la eficiencia de terminación de la transcripción. Se han descrito secuencias ricas en AT 9 bases hacia delante de la estructura de horquilla en los terminadores *trp t*, *S10* y *5S* en *E. coli*, y *λ6S* y *G4* en fagos (Rosenberg y Court 1979), sin embargo, no existen estudios de la función de estas secuencias en estos terminadores.

Las delecciones 5' $\Delta 634$ y $\Delta 626$ que desestabilizan la estructura de horquilla (tabla 1) reducen drásticamente la eficiencia de terminación de la transcripción, de 98% en el terminador silvestre a 45% y 28%, en cada una de las delecciones, respectivamente, en los ensayos enzimáticos y 44% y 21%, respectivamente, en los ensayos de transcritos *in vivo*, así como 3% para $\Delta 626$ en los ensayos de transcritos *in vitro* (tablas 2 y 3). La terminación de la transcripción remanente en las delecciones 5' $\Delta 634$ y $\Delta 626$ puede ser debida a la presencia de las uridinas, combinada con una estructura secundaria débil. En el terminador *crp* se ha observado una terminación de la transcripción residual (9%), aún cuando se eliminó la estructura de horquilla y sólo cuando adicionalmente se eliminaron las uridinas, la terminación de la transcripción se perdió por completo (Abe y Aiba 1996).

En el terminador *trp* se ha demostrado que las secuencias hacia atrás de la horquilla pueden afectar la terminación de la transcripción, ya que al cambiar 23 bases de la secuencia original por la secuencia correspondiente del terminador T7, se reduce la eficiencia de terminación de la transcripción de 68 a 46% (Reynolds y Chamberlin 1992). En la delección 5' Δ 325 de *λ I* se afecta la secuencia 18 bases hacia atrás de la estructura de horquilla (figura 1). Esta delección redujo la eficiencia de terminación de 96% a 80% en los ensayos enzimáticos, a 81% en los ensayos de transcritos *in vivo* y a 10% en los ensayos de transcritos *in vitro*. Es interesante hacer notar que se puede predecir una estructura estable de -11.4 kcal/mol en el ARN hacia atrás de la horquilla, la cual es impedida en la delección Δ 325. Además, la secuencia izquierda que forma parte de la horquilla de *λ I* puede formar por predicción una estructura secundaria de -7.3 kcal/mol con los nucleótidos hacia atrás (Figura 5). Sin embargo, la importancia de estas estructuras secundarias no ha sido determinada, así como otros mecanismos posibles que involucren las secuencias hacia atrás de la horquilla.

La terminación de la transcripción *in vitro* se llevó a cabo con el sistema de la polimerasa del fago T3. Aunque es una polimerasa monomérica, ésta termina la transcripción en una estructura de horquilla rica en GC (Sengupta *et al.* 1989) y se ha utilizado de manera exitosa para analizar mutaciones puntuales (Cisneros *et al.* 2000). El porcentaje de terminación de

λ I⁺ en este sistema *in vitro* es de 65%, el cual es menor con respecto al sistema de terminación de transcritos *in vivo* (98%). Se ha reportado que los terminadores T3 y T7 tienen una menor eficiencia de terminación en condiciones *in vitro* (Telesnitsky y Chamberlin 1989), sin embargo, el sistema de transcripción *in vitro* con la polimerasa T3 mostró el mismo patrón en la eficiencia de terminación con respecto al obtenido con los ensayos de transcripción *in vivo*, en los que la ARN polimerasa de *E. coli* es la responsable de la transcripción. Lo anterior refuerza los resultados obtenidos *in vivo* sobre los efectos que las delecciones de la región del terminador *λ I* tienen en la terminación de la transcripción.

Considerados de manera global, el análisis de las eficiencias de terminación de la transcripción de las delecciones generadas, confirma que el trecho de uridinas y la horquilla son los determinantes más importantes del terminador de transcripción intrínseco *λ I* y además proporcionan evidencia de que el ADN no transcrito hacia delante de la estructura de horquilla y el ARN ubicado hacia atrás de la horquilla (5') son elementos que tienen una influencia en la terminación de la transcripción.

REFERENCIAS

- Abe, H. y H. Aiba. 1996. **Differential contributions of two elements of rho-independent terminator to transcription termination and mRNA stabilization.** *Biochimie* 78: 1035-1042.

- Adhya, S., P. Cleary y A. Campbell. 1968. **A deletion analysis of prophage lambda and adjacent genetic regions.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 61:956-962.
- Bermúdez-Cruz, R. M., M. J. Chamberlin y C. Montañez-Ojeda. 1999. **Nus A is involved in transcriptional termination on lambda tI.** Biochimie 81:757-764.
- Cisneros, V. B., D. Court, A. Sánchez-Trujillo y C. Montañez-Ojeda. 1996. **Point mutations in a transcription terminator, λ tI, that affect both transcription termination and RNA stability.** Gene 181:127-133.
- Cisneros, B., R. M. Bermúdez-Cruz, A. Sánchez-Trujillo y C. Montañez-Ojeda. 2000. **Effect of λ tI point mutations on T3 RNA polymerase-mediated transcription termination.** Revista Latinoamericana de Microbiología 42: 95-100.
- Christie, G. E., P. J. Farnham y T. Platt. 1981. **Synthetic sites for transcription termination and a functional comparison with tryptophan operon termination sites *in vitro*.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:4180-4184.
- Court, D., T. F. Huang y A. B. Oppenheim. 1983. **Delección analysis of the retroregulatory site for the lambda *int* gene.** J. Mol. Biol. 166:233-240.
- Farnham, P. J. y T. Platt. 1980. **A model for transcription termination suggested by studies on the *trp* attenuator *in vitro* using base analogs.** Cell 20:739-748.
- Guarneros, G., C. Montañez-Ojeda, T. Hernández y D. Court. 1982. **Posttranscriptional control of bacteriophage λ *int* gene expression from a site distal to the gene.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:238-242.
- Gusarov, I. y E. Nudler. 2001. **Control of transcription intrinsic termination by N and NusA: the basic mechanisms.** Cell 107:437-449.
- Komissarova, N. y M. Kashlev. 1997. **Transcriptional arrest: *Escherichia coli* RNA polymerase translocates backward, leaving the 3' end of the RNA intact and extruded.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 1755-1760.
- Korzheva, N., A. Mustaev, M. Kolzov, A. Malhotra, V. Nikiforov, A. Goldfarb y S.A. Darst. 2000. **A structural model of transcription elongation.** Science 289:619-625.
- Lee, D. N., L. Phung, J. Stewart y R. Landrick. 1990. **Transcription pausing by *Escherichia coli* RNA polymerase is modulated by downstream DNA sequences.** J. Biol. Chem. 265:15145-15153.
- Lesnik, E. A., R. Sampath, H. V. Levene, T. J. Henderson, J.A. Mcneil y D.J. Ecker. 2001. **Prediction of rho-independent transcriptional terminators in *Escherichia coli*.** Nucleic Acids Res. 23:370-376.
- Luk, K. C., P. Dobrzanski y W. Szybalski. 1982. **Cloning and**

- characterization of the termination site tI for the gene *int* transcript in phage λ .** *Gene* 17:259-262.
- Lynn, S. P., L.M. Kasper y J. F. Gardner. 1988. **Contributions of RNA secondary structure and length to the thymidine tract to transcription termination at the *thr* operon attenuator.** *J. Biol. Chem.* 263:472-479.
- Mackie, G. A. 1985. **Stabilization of the 3' one-third of *Escherichia coli* ribosomal protein S20 mRNA in mutants lacking polynucleotide phosphorilase.** *J. Bacteriol.* 171:4112-4120.
- Martin, F. H. y J. J. Tinoco. 1980. **DNA-RNA hybrid duplexes containing oligo (dA:rU) sequences are exceptionally instable and may facilitate termination of transcription.** *Nucleic Acids Res.* 8:2295-2299.
- Mathews, D.H., M. Zuker y D.H. Turner. 2004. **RNAstructure version 4.2.** Rensselaer Polytechnic Institute.
- Mckenney, K., H. Shimatake, D. Court, U. Schmeissner, C. Brady y M. Rosenberg. 1981. **Analysis of nucleic acids by enzymatic methods.** In Chirikjian, J.C. and Papas, T.S. (Eds), *Gene amplifications and analysis.* Elsevier/North-Holland, New York, pp. 383-415.
- Montañez, C., J. Bueno, U. Schmeissner, D. Court y G. Guarneros. 1986. **Mutations of bacteriophage lambda that define independent but overlapping RNA processing and transcription termination sites.** *J. Mol. Biol.* 191: 29-37.
- Nudler, E., M. Kashlev, V. Nikiforov y B. Godfarb. 1995. **Coupling between transcription termination and RNA polymerase inchworming.** *Cell* 81: 351-357.
- Nudler, E., E. Avetisova, V. Markotsov y B. Gordfarb. 1996. **Transcription processivity: protein-DNA interactions holding together the elongation complex.** *Science* 273:211-217.
- Nudler, E., A. Mustaev, E. Lukhtanov y A. Goldfarb. 1997. **The RNA-DNA hybrid maintains the register of transcription by preventing backtracking of RNA polymerase.** *Cell* 89:33-41.
- Nudler, E., I. Gusarov, E. Avetisova, M. Kozlov y A. Goldfarb. 1998. **Spatial organization of transcription elongation complex in *Escherichia coli*.** *Science* 281:424-428.
- Nudler, E. 1999. **Transcription elongation: structural basis and mechanisms.** *J. Mol. Biol.* 288:1-12.
- Nudler, E. y M. E. Gottesman. 2002. **Transcription termination and antitermination in *E. coli*.** *Genes to Cells* 7:755-768.
- Platt, T. 1986. **Transcription termination and the regulation of gene expression.** *Annu. Rev. Biochem.* 55:339-372.
- Reynolds, R. y M. Chamberlin. 1992. **Parameters affecting transcription termination by *Escherichia coli* RNA. II.**

- Construction and analysis of hybrid terminators.** J. Mol. Biol. 224:53-63.
- Reynolds, R., R. M. Bermúdez y M. Chamberlin. 1992. **Parameters affecting transcription termination by *E. coli* RNA polymerase. I. Analysis of 13 rho-independent terminators.** J. Mol. Biol. 224: 31-51.
- Richardson, J. P. 1993. **Transcription termination.** Crit. Rev. Biochem. Biol. 28: 1-30.
- Rosenberg, M. y D. Court. 1979. **Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription.** Annu. Rev. Genet. 13: 319-353.
- Sanger, F., S. Nicklen y A. Coulson. 1977. **DNA sequencing with chain termination inhibitors.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5466.
- Schmeissner, U., K. Mckenney, M. Rosenberg y D. Court. 1984. **Transcription terminator involved in the expression of the *int* gene of phage lambda.** Gene 28:343-350.
- Sengupta, D., D. Chakravarti y U. Maitra. 1989. **Relative efficiency of utilization of promoter and termination sites by bacteriophage T3 RNA polymerase.** J. Biol. Chem. 264: 1424614255.
- Telesnitsky, A.P. y M.J. Chamberlin. 1989. **Terminator-distal sequences determine the *in vitro* efficiency of the early terminators of bacteriophages T3 and T7.** Biochemistry 28: 5210-5218.
- Von Hippel, P.H. 1998. **An integrated model of the transcription complex in elongation, termination and editing.** Science 281:660-665.
- Zinder, D. y J. Boeke. 1982. **The filamentous phage (Ff) as vector for recombinant DNA.** Gene 19:1-16.

Tabla 1. Plásmidos y fagos utilizados

Plásmido ó fago	Características relevantes	ΔG (kcal/mol a 37°C)*	Referencia
pKG1800	ampR, <i>galK</i> ⁺ , sin terminador entre <i>Pgal</i> y <i>galK</i> .	-----	MacKenney <i>et al.</i> (1981)
pUS6	ampR, <i>galK</i> ⁺ , con el terminador silvestre <i>λI</i> entre <i>Pgal</i> y <i>galK</i> .	-18.2	Schmeissner <i>et al.</i> (1984)
pMC11	Delección 3' Δ11 en <i>λI</i>	-18.2	Este trabajo
pMC28	Delección 3' Δ28 en <i>λI</i>	-18.2	Este trabajo
pMC119	Delección 3' Δ119 en <i>λI</i>	-18.2	Este trabajo
pMC21	Delección 3' Δ21 en <i>λI</i>	-15.6	Este trabajo
pMC112	Delección 3' Δ112 en <i>λI</i>	-2.1	Este trabajo
pMC53	Delección 3' Δ53 en <i>λI</i>	0.0	Este trabajo
pMS326	Delección 5' Δ326 en <i>λI</i>	-18.2	Este trabajo
pMS337	Delección 5' Δ337 en <i>λI</i>	-18.2	Este trabajo
pMS325	Delección 5' Δ325 en <i>λI</i>	-18.2	Este trabajo
pMS635	Delección 5' Δ635 en <i>λI</i>	-15.0	Este trabajo
pMS634	Delección 5' Δ634 en <i>λI</i>	-1.5	Este trabajo
pMS626	Delección 5' Δ626 en <i>λI</i>	-0.3	Este trabajo
pMS1	Mutación puntual en el tallo de <i>λI</i>	-12.0	Montañez <i>et al.</i> (1986)
M13mp8	<i>Lac I'</i>	-----	Zinder y Boeke (1982)

*La estabilidad fue calculada considerando que el trecho de uridinas del ARN forma un híbrido con la cadena de adeninas del ADN.

Secuencias requeridas para la terminación de transcripción...

Tabla 2. Eficiencia de terminación *in vivo* del terminador Silvestre λtI y sus deleciones, cuantificada mediante la actividad de galactocinasa

Plásmido	Unidades de Galactocinasa \pm e.e.*	Porcentaje de terminación**
pKG1800	1642 \pm 213	0
pUS6 (tI ⁺)	30 \pm 3	98
pMC11	62 \pm 8	96
pMC28	53 \pm 6	97
pMC119	730 \pm 110	56
pMC21	1260 \pm 202	23
pMC112	1269 \pm 190	23
pMC53	1282 \pm 203	22
pMS326	65 \pm 9	96
pMS337	62 \pm 7	96
pMS325	329 \pm 48	80
pMS635	593 \pm 77	64
pMS634	904 \pm 140	45
pMS626	1182 \pm 170	28

*La cuantificación de las unidades de galactocinasa fueron en nanomoles de galactosa fosforilada por minuto por ml de células crecidas a una absorbancia de 1.0 a 650 nm. El error estándar se determinó para 3 mediciones.

**El porcentaje de terminación para las construcciones con las diferentes eliminaciones fue calculado restando las unidades de galactocinasa obtenidas para cada construcción a las obtenidas por pKG1800, dividiendo entre las unidades obtenidas para pKG1800 y multiplicando por 100.

Tabla 3. Eficiencias de terminación del terminador silvestre λI y sus delecciones determinadas mediante los niveles de transcritos

Plásmido	Absorbancia relativa a 420 nm galK/ β -lactamasa*	Porcentaje de terminación <i>in vivo</i> **	Porcentaje de terminación <i>in vitro</i> ***
pKG1800	52.0	0	n.d.
pUS6 (tI ⁺)	1.0	98	65
pMC11	4.0	92	n.d.
pMC28	3.6	93	n.d.
pMC119	13.4	74	51
pMC21	52.1	0	18
pMC112	52.3	0	8
pMC53	52.3	0	n.d.
pMS326	3.1	94	n.d.
pMS337	4.3	92	32
pMS325	9.9	81	10
pMS635	10.6	80	6
pMS634	29.2	44	3
pMS626	41.1	21	n.d.

* El promedio se calculó utilizando 3 pares de auto radiogramas.

** El porcentaje de terminación *in vivo* se calculó restando las unidades de absorbancia relativa de cada plásmido de las obtenidas de pKG1800 y posteriormente divididas por las unidades obtenidas para pKG1800 y multiplicando por 100.

*** El porcentaje de terminación *in vitro* fue calculado de la siguiente manera: [cpm de los transcritos que terminaron en la región de λI X100/ (cpm de los transcritos terminados + cpm de los transcritos no terminados)].

Secuencias requeridas para la terminación de transcripción...

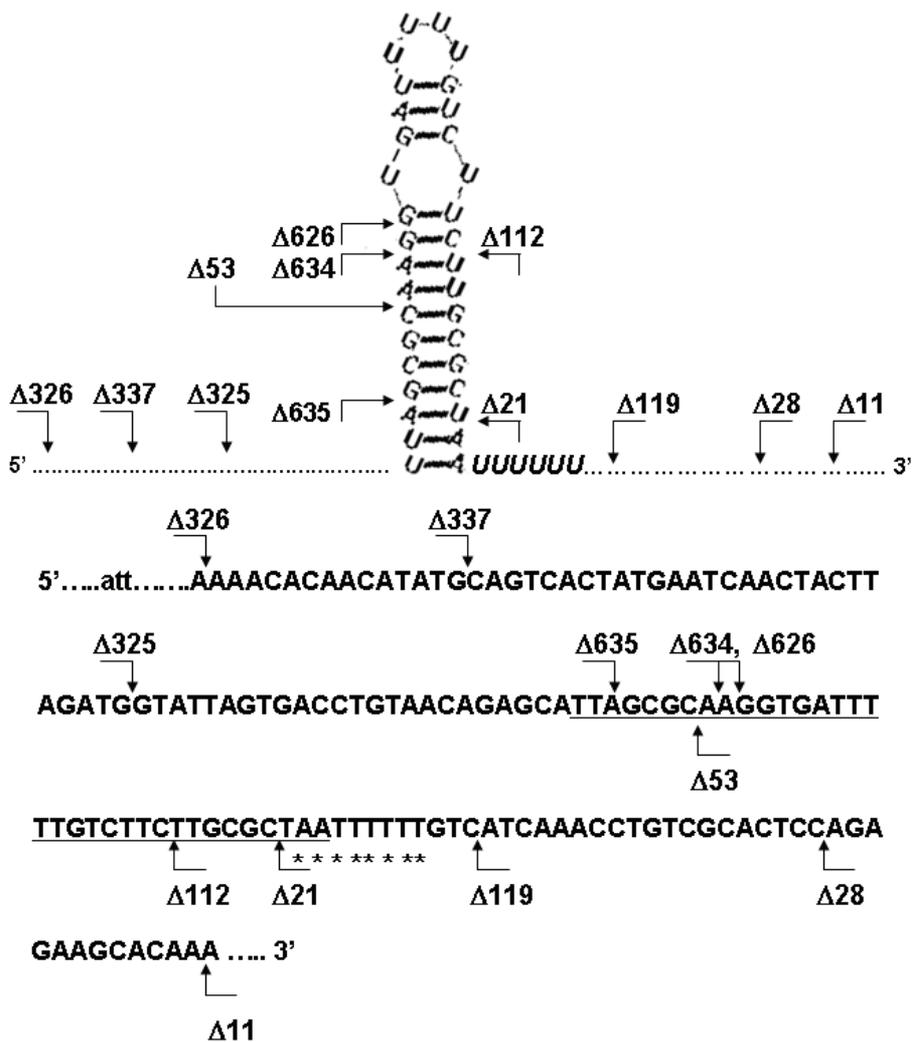


Figura 1. Deleciones en la región del terminador λtI . Las flechas que se encuentran sobre la secuencia del ADN muestran el sitio donde terminan las deleciones 5', mientras que las flechas que están debajo de la secuencia del ADN indican los extremos de las deleciones 3'. En la figura superior las deleciones se ubican con relación a la predicción de la estructura secundaria que forma la horquilla en el ARN. Los asteriscos indican los diferentes sitios de la terminación de los transcritos.

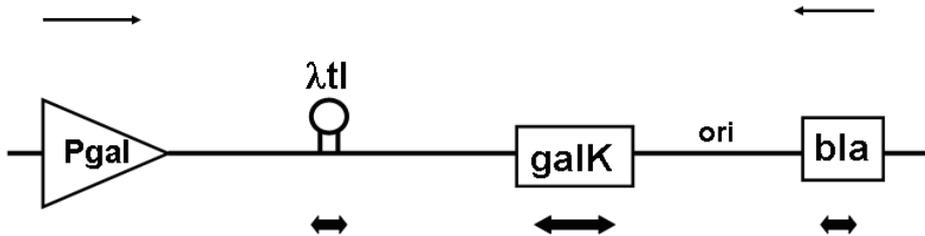


Figura 2. Mapa lineal de los plásmidos que contienen las diferentes regiones de λtl . *Pgal*, *galK* y *bla* representan al promotor y a los genes de galactocinasa y β -lactamasa, respectivamente. Las flechas superiores indican la dirección de transcripción de *Pgal* y *bla*. La estructura de horquilla representa a la región del terminador λtl . Las flechas con doble dirección (\leftrightarrow) indican la posición de las sondas antisentido de ARN.

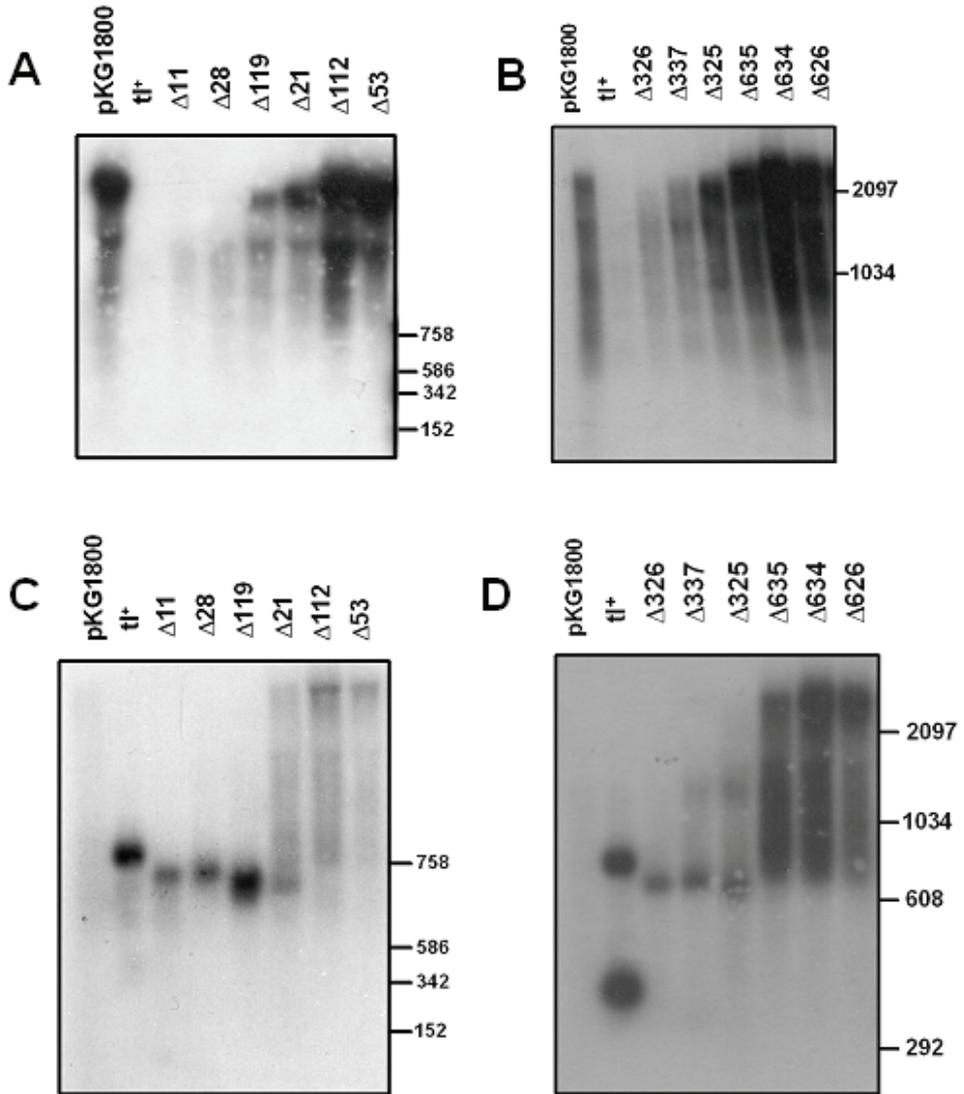


Figura 3. Auto radiogramas de los ensayos tipo Northern. A y B fueron hibridados con la sonda anti-*galK* y C y D con la sonda anti-*tl*. Las deleciones 3' fueron utilizadas en A y C y las deleciones 5' en B y D. La deleción se indica arriba de cada carril. *tl*⁻ corresponde a pUS6 y los marcadores de tamaño de ARN se indican a la derecha de cada auto radiograma.

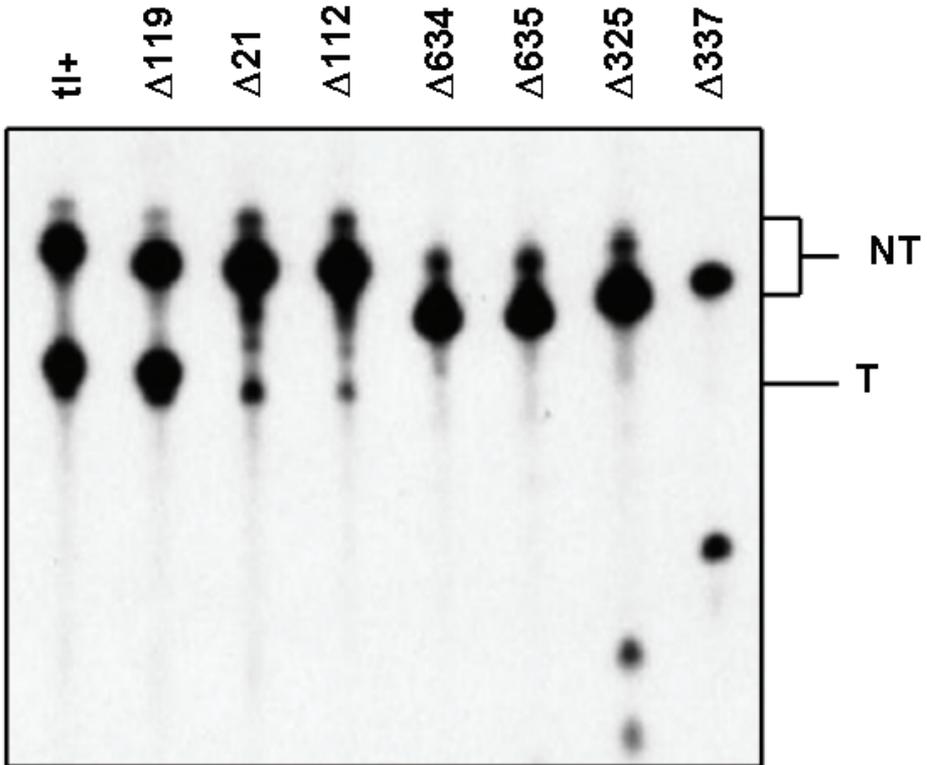


Figura 4. Auto radiograma de los ensayos de terminación *in vitro*. Las deleciones 5' y 3' que se utilizaron para llevar a cabo los ensayos de transcripción *in vitro* se indican arriba de cada carril. Los transcritos terminados en λtI se indican con la T mientras que los que continuaron y no terminaron en esta región se indican con NT.

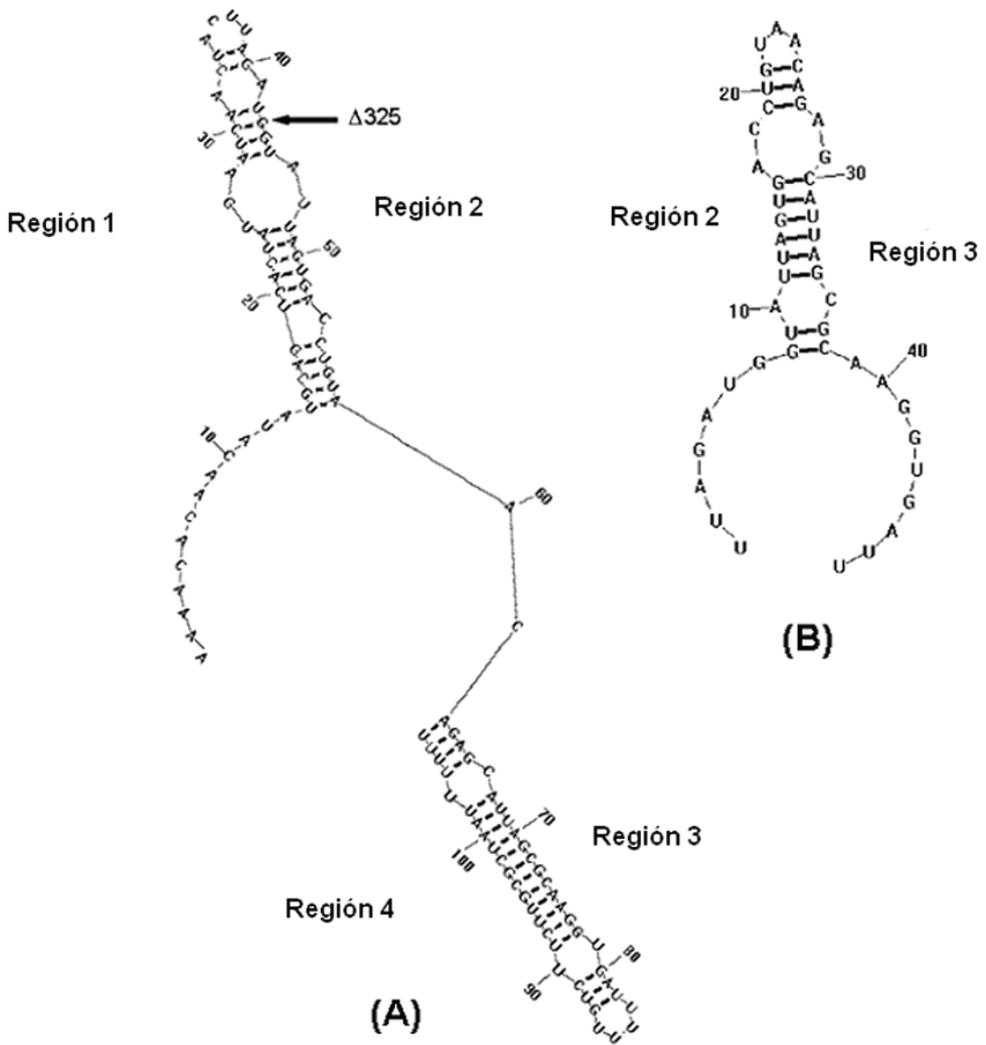


Figura 5. Predicción de las estructuras secundarias en el ARN de la región del terminador λtI . A. Las regiones 3 y 4 corresponden a la estructura de horquilla del terminador λtI y tiene una estabilidad de -18.2 kcal/mol, y las regiones 1 y 2 tienen una predicción de estructura secundaria con una estabilidad de -11.4 kcal/mol. Se indica la posición de la delección 5' $\Delta 325$. B. Predicción de la estructura secundaria con las regiones 2 y 3 con una estabilidad de -7.3 kcal/mol.