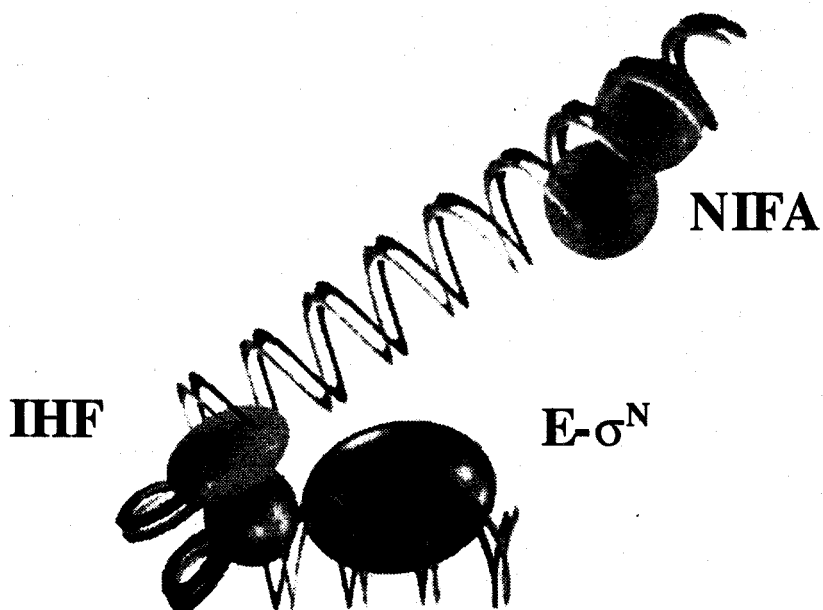


UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE GENETICA

GEOMETRIA DEL INICIO DE LA TRANSCRIPCION
DE PROMOTORES DEPENDIENTES DEL FACTOR σ^N



José Antonio Molina López

TESIS DOCTORAL

Sevilla, agosto de 1998

TD

205

R.16.736



GEOMETRIA DEL INICIO DE LA TRANSCRIPCION DE PROMOTORES DEPENDIENTES DEL FACTOR σ^N

Memoria presentada por el licenciado **José Antonio Molina
López** para optar al grado de Doctor en Biología.

Fdo: José Antonio Molina López

Sevilla, agosto de 1998

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARIA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 66 número 123 del libro
correspondiente. **07 SET. 1998**
Sevilla, _____

El Jefe del Negociado de Tesis.

Vº Bº. El Director

Fdo: Eduardo Santero Santurino.
Profesor titular del Departamento de Genética
Facultad de Biología. Universidad de Sevilla.

TD-422



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE BIOLOGIA
BIBLIOTECA

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para que mi Tesis Doctoral Geometría del inicio de la transcripción de promotores dependientes de sigma-N sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

- Consulta en depósito.
- Préstamo interbibliotecario.
- Reproducción parcial.
- Reproducción total.
- Tipo de Usuarios.
- Otros términos.

Firmado:

Sevilla, a 4 de Mayo de 1999

Jose Antonio Morino Lopez

A mis padres y hermanos.

A lo largo de estos años han sido muchas las personas que me han ayudado a realizar este trabajo, a todas ellas me gustaría darles mi más sincero agradecimiento.

A Edu por permitirme trabajar con él durante todos estos años y ser un buen amigo además de un gran "jefe".

A Fernando por su inestimable colaboración en la mayor parte de este trabajo y compartir esfuerzos e interés por llevarlo a cabo.

A todos mis compañeros de grupo Pepi, Elo, Olga y Emilia por la colaboración y amistad que me han ofrecido durante todo este tiempo.

A Paco Mal por tantos y tantos cafés con partida de tenis incluida.

Al resto de miembros del departamento, a los que están y a los que ya se han marchado, por estar ahí cuando los he necesitado.

Al Dr. Howard Nash por permitirme trabajar con él y enseñarme lo poquito que sé sobre proteínas.

Al Dr. Erwin Knecht por todos nuestros intentos fallidos de ver dobleces en el ADN al microscopio electrónico.

Y como todo no es ciencia, agradezco a mis amigos Arturo, María, Alesito, la Modito, Fina, Carínín, el Nono, Belen, Ara, Paqui, Irene, Habibi, Gloria, Nuria, Frank y Pepa el compartir conmigo los buenos y malos ratos durante todo este tiempo. Y en especial a Lucía por sufrir los cambios de planes (sobre todo de fin de semana) debido a la escritura de esta tesis y por su apoyo incondicional.

A todos ellos muchas gracias.

INDICES

INDICE GENERAL

INDICE DE FIGURAS	4
INDICE DE TABLAS	6
ABREVIATURAS	7
INTRODUCCION	9
1. El factor σ^N y el promotor.	11
2. Las proteínas activadoras y sus sitios de unión.	14
3. La proteína IHF (Integration Host Factor).	20
4. Inicio de la transcripción.	22
5. Sistemas de regulación dependientes de σ^N .	27
5.1. NTRC y NIFA (Regulación de la fijación de nitrógeno en <i>Klesiella pneumoniae</i>).	27
5.2. XYLR y DMPR.	31
5.3. DCTD.	32
OBJETIVOS	33
MATERIALES Y METODOS	34
1. Estirpes bacterianas.	34
2. Plásmidos.	35
3. Medios y condiciones de cultivo.	42
4. Antibióticos y otras adiciones.	43
5. Conservación de estirpes bacterianas.	43
6. Preparación de células competentes y transformación de <i>E. coli</i> .	43
7. Preparación de células electrocompetentes y electroporación de <i>E. coli</i> y <i>K. pneumoniae</i> .	45
8. Movilización de marcadores cromosómicos por conjugación.	46
9. Preparación de ADN plasmídico a pequeña escala.	46

10. Preparación de ADN plasmídico a gran escala	48
11. Electroforesis convencional de ADN en gel de agarosa.	49
12. Electroforesis de ADN en gel de poliacrilamida.	50
13. Aislamiento y purificación de fragmento de ADN a partir de geles de agarosa y poliacrilamida.	50
14. Digestión, modificación y ligación de fragmentos de ADN.	51
15. Secuenciación de ADN.	52
16. Ensayos de actividad β -galactosidasa.	53
17. Mutagénesis dirigida.	54
18. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).	54
19. Preparación de ARN a pequeña escala.	55
20. Determinación del extremo 5' de ARN mensajeros.	56

RESULTADOS 58

1. Geometría del inicio de la transcripción del promotor <i>nifH</i> de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	58
1.1. Alteración de la posición relativa entre los tres elementos del promotor.	58
1.1.1. Construcción de variantes posicionales del promotor <i>nifH</i> de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	59
1.1.2. Ensayo de actividad de las distintas versiones posicionales.	61
1.2. Reemplazamiento funcional del sitio de unión de IHF	62
1.2.1. Estrategia de aislamiento de promotores artificiales <i>nifH</i> , que contienen un fragmento de ADN intrínsecamente doblado.	63
1.2.2. Expresión de los promotores artificiales.	65
1.2.3. Estructura de los promotores artificiales.	68
2. Diseño de un potenciador transcripcional bacteriano, que contiene un elemento de respuesta múltiple	72
2.1. Construcción de un elemento de respuesta múltiple.	73
2.2. Activación de los promotores híbridos mediada por NTRC.	76

2.3. Transcripción mediada por diferentes activadores dependientes de σ^N .	78
2.3.1. Construcción de plásmidos productores de los activadores.	79
2.3.2. Niveles de expresión mediados por NIFA, XYLR, DMPR y DCTD.	80
2.3.2.1. Niveles basales no dependientes de σ^N .	80
2.3.2.2. Efecto de la concentración de activador.	81
2.3.2.3. Efectos posicionales del MRE en proceso de transcripción.	83
2.4. Punto de inicio de la transcripción de los promotores híbridos.	87
DISCUSION	90
1. Geometría del inicio de la transcripción del promotor <i>nifH</i> de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	90
2. Diseño de un potenciador transcripcional bacteriano, que contiene un elemento de respuesta múltiple.	93
CONCLUSIONES	100
BIBLIOGRAFIA	101

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Representación esquemática de un factor σ^N .	12
Figura 2.	Esquema modular de los activadores de promotores dependientes de factor σ^N .	14
Figura 3.	Esquema de promotores dependientes de factor σ^N , con y sin sitio de unión para IHF.	20
Figura 4.	Isomerización de complejo cerrado a abierto en el promotor <i>glnA</i> .	22
Figura 5.	Representación de la formación de bucle al azar en la activación del promotor <i>glnA</i> y de un doblez inducido por IHF en el promotor <i>nifH</i> .	24
Figura 6.	Esquema de la regulación del sistema general de control del nitrógeno (<i>ntr</i>).	29
Figura 7.	Esquema de la regulación en cascada en <i>K. pneumoniae</i> del sistema general <i>ntr</i> y el específico <i>nif</i> .	30
Figura 8.	Esquema de la estrategia de aislamiento de los promotores <i>nifH</i> artificiales, que se les ha sustituido el sitio de IHF por los fragmentos "A-tracts".	64
Figura 9.	Cinética de inducción del promotor <i>nifH</i> silvestre y el artificial pIZ297, en las estirpes ET8000 y SE1000.	67
Figura 10.	Análisis de cambio de movilidad en gel de poliacrilamida de los promotores <i>nifH</i> artificiales por acción de la distamicina A.	69
Figura 11.	Representación esquemática del promotor <i>nifH</i> silvestre y los artificiales.	70
Figura 12.	Análisis con el programa de ordenador DNA* de las posibles estructuras tridimensionales de los promotores <i>nifH</i> artificiales.	71

Figura 13. Secuencia y solapamiento de los oligonucleótidos utilizados para la construcción del MRE.	74
Figura 14. Representación esquemática de la construcción del MRE.	75
Figura 15. Representación esquemática de las versiones posicionales de promotores híbridos.	76
Figura 16. Cinética de inducción mediada por NTRC de las versiones posicionales de promotores híbridos en la estirpe ET8000.	77
Figura 17. Representación esquemática de los plásmidos productores de los activadores.	79
Figura 18. Efecto de la concentración de activador sobre la expresión del promotor sin MRE y el híbrido pIZ425.	81
Figura 19. Niveles de expresión mediados por cada activador en las diferentes versiones posicionales de promotores híbridos.	84
Figura 20. Efecto de la concentración de activados sobre los niveles de expresión mediados por XYLR, en el promotor sin MRE y el híbrido pIZ428.	86
Figura 21. Sensibilidad de la activación mediada por XYLR a los cambios en la posición del MRE, en concentraciones limitantes de activador.	87
Figura 22. Determinación del punto de inicio de la transcripción mediada por NTRC en los diferentes promotores híbridos, y por el resto de activadores en el promotor pIZ425.	89

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Estirpes bacterianas utilizadas en este trabajo.	34
Tabla 2.	Plásmidos utilizados en este trabajo.	35
Tabla 3.	Concentraciones de agentes selectivos u otros compuestos químicos.	43
Tabla 4.	Variantes posicionales del promotor <i>nifH</i> de <i>K. pneumoniae</i> .	60
Tabla 5.	Niveles de expresión de las variantes posicionales del promotor <i>nifH</i> de <i>K. pneumoniae</i> en las estirpes de <i>E. coli</i> ET8000 y SE1000, y en la estirpe de <i>K. pneumoniae</i> VJSK014.	62
Tabla 6.	Expresión de los promotores artificiales que contienen la secuencia "A-tract ₆ " en el vector de alto número de copias, en las estirpes de <i>E. coli</i> ET8000 y SE1000.	65
Tabla 7.	Expresión de los promotores artificiales que contienen la secuencia "A-tract ₆ " en el vector de copia simple, en las estirpes de <i>E. coli</i> ET8000 y SE1000.	66
Tabla 8.	Activación de los promotores híbridos mediada por NTRC, en las estirpes de <i>E. coli</i> ET8000 ET8045 y ET8556	78
Tabla 9	Niveles de expresión obtenidos con los promotores híbridos en medio M9 en ausencia de activador.	80

ABREVIATURAS

'	Minutos
"	Segundos
Ala	Alanina
Amp ^r	Resistencia a la ampicilina
Arg	Arginina
Asn	Asparragina
Asp	Acido aspártico
ATP	Trifosfato de adenosina
Cm ^r	Resistencia al cloranfenicol
Cys	Cisteína
DO	Densidad óptica
dATP	Trifosfato de desoxiadenosina
dCTP	Trifosfato de desoxicitidina
dGTP	Trifosfato de desoxiguanosina
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfatos
dTTP	Trifosfato de desoxitimidina
EDTA	Sal sódica del ácido etilendiaminotetraacético
Gln	Glutamina
Glu	Glutámico
Gly	Glycina
His	Histidina
Ile	Isoleucina
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactopiranosido
Kb	Miles de pares de bases
Leu	Leucina
Lys	Lisina
MCS	Sitio múltiple de clonación
Met	Metionina
ONPG	<i>orto</i> -nitrofenil β -D-galactopiranosido
pb	Pares de bases
Phe	Fenilalanina
PIPES	Piperazina-N,N'-bis (ácido 2-etanol sulfónico)
Pro	Prolina
rpm	Revoluciones por minuto

SDS	Dodecil sulfato de sódio
Ser	Serina
Str ^r	Resistencia a la estreptomicina
Tc ^r	Resistencia a la tetraciclina
Thr	Treonina
TRIS	Tris(hidroximetil) aminometano
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina
UTP	Trifosfato de uridina
V	Volumen
v/v	Volumen/volumen
Val	Valina
w/v	Peso/volumen
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-galactopiranosido

INTRODUCCION

En Eubacterias, un único tipo de ARN-polimerasa es el responsable de toda la síntesis de ARNm, ARNr y ARNt. El núcleo enzimático de la ARN-polimerasa consta de 4 subunidades, dos α , β y β' ; éste tiene la capacidad de sintetizar ARN desde un ADN molde, pero lo hace de forma inespecífica y le falta la capacidad de reconocer las señales de inicio de la transcripción en un sitio determinado. La especificidad la confiere el factor σ , que se une al núcleo enzimático para formar la holoenzima, la cual adquiere la capacidad de unirse a una secuencia específica y tiene reducida la capacidad de transcripción inespecífica.

Además del factor σ principal utilizado para el reconocimiento de la mayoría de los promotores, las bacterias disponen de una batería de factores σ alternativos que, tras su asociación con el núcleo enzimático de la ARN-polimerasa, dan lugar a diversas formas de holoenzima, cada una de las cuales tiene afinidad por una secuencia promotora característica. La bacteria utiliza las diversas formas de holoenzima ARN-polimerasa para transcribir una serie de operones no reconocidos por la holoenzima ARN-polimerasa principal.

El factor σ^N es un factor σ alternativo que ha sido identificado en 18 géneros distintos pertenecientes a grupos taxonómicos de bacterias Gram negativas poco relacionados evolutivamente y en *Bacillus subtilis*. La nomenclatura del gen que lo rige es confusa puesto que ha sido designado con nombres tales como *glnF*, *ntrA*, *hno*, *rpoN* y *sigL*, en función del grupo investigador y de la especie bacteriana. Para el propio factor se utiliza también la denominación de σ^{54} , por la masa molecular de la proteína en enterobacterias. Una propuesta de nomenclatura unitaria sugiere la utilización de *rpoN* para el gen y de σ^N para el producto proteico, que es la utilizada en esta tesis (Merrick, 1993).

σ^N presenta unas características peculiares que lo distinguen del resto de factores σ . En general, cada forma alternativa de ARN-polimerasa transcribe una serie de operones cuyos productos génicos están involucrados en la misma función o en funciones similares. Su expresión está regulada de forma conjunta en respuesta a una señal determinada, y su mecanismo regulador

reside en el control de la síntesis y/o la actividad del factor σ necesario para la transcripción de todos ellos. Por el contrario, σ^N no es específico, sino que es necesario para transcribir operones de distintos sistemas que tienen funciones fisiológicas muy diversas y que pueden estar regulados en respuesta a señales diferentes. Los mutantes carentes de σ^N son pleiotrópicos y están afectados en funciones tan dispares como utilización de diversas fuentes de nitrógeno, transporte de ácidos dicarboxílicos, oxidación de hidrógeno, formación de los pili, síntesis del flagelo, utilización de solventes orgánicos como fenol, xilenos y tolueno, fitopatogénesis, etc., según la especie bacteriana (Kustu *et al*, 1989; Merrick, 1993).

Por otra parte, los factores σ^N de las distintas especies no tienen homología estructural con ningún otro factor σ conocido. Esta diferencia estructural también tiene un reflejo funcional. Mientras que las formas de ARN-polimerasa asociadas a cualquier otro factor σ son transcripcionalmente competentes, no se conoce ningún promotor desde el que la ARN-polimerasa con σ^N ($E-\sigma^N$) pueda iniciar la transcripción por sí misma. $E-\sigma^N$ es capaz de reconocer las secuencias promotoras en el ADN y formar un complejo cerrado con ellas. Sin embargo, éste no es transcripcionalmente activo, y requiere el concurso de un activador para iniciar la transcripción. Cada sistema dependiente de σ^N dispone de una proteína activadora que actúa específicamente sobre los distintos operones que constituyen ese determinado sistema. La regulación diferencial de los distintos sistemas reside en el control de la actividad de su regulador específico, en respuesta a una señal determinada.

La iniciación de la transcripción implica un proceso de activación de $E-\sigma^N$, que parece ser similar en todos los sistemas y que presenta características similares en cierto sentido a la iniciación de la transcripción por la ARN-polimerasa II de eucariontes, características que iremos destacando a lo largo de esta introducción (Magasanik, 1989).

1. El factor σ^N y el promotor

Las secuencias promotoras que reconoce E- σ^N son diferentes a las que reconoce la holoenzima principal E- σ^{70} . Los promotores dependientes de σ^{70} poseen 2 zonas conservadas centradas en las regiones -35 y -10 respecto al inicio de la transcripción, con las secuencias consenso TTGACA y TATAAT, respectivamente. Sin embargo, las regiones conservadas entre los promotores dependientes de σ^N se localizan en las regiones -24 y -12, con secuencias consenso TGGCAC-N₅-TTGCa/t, respectivamente (Morett y Buck, 1989). Las secuencias más conservadas son el dinucleótido GG en la región -24, casi universalmente conservado, y el dinucleótido GC en la región -12. Solo se conoce un cambio de G a T en la posición -25 del promotor *fixRnifA* de *Bradyrhizobium japonicum*, mientras que el dinucleótido GC está menos conservado. Esta región proximal es reconocida por un dominio hélice-vuelta-hélice del factor σ^N , el cambio más frecuente es al dinucleótido GA, el cual no es reconocido eficazmente por la ARN-polimerasa- σ^N (Merrick y Chambers, 1992). Cuatro de los cinco promotores naturales con esta sustitución en la región -12,-13 tienen timinas por delante del dinucleótido GA. Esto puede ser debido a que la presencia de timinas entre las posiciones -14 y -17, que preceden al dinucleótido GC, mejoran la afinidad de E- σ^N por el promotor (Hoover et al, 1990; Buck y Cannon, 1989); de esta forma compensarían el cambio a adenina del nucleótido -12 y explicaría por que este dinucleótido puede tolerar cambios.

De forma similar a lo que ocurre en los promotores dependientes de σ^{70} , la distancia entre las secuencias conservadas y el inicio de la transcripción puede variar en 2 ó 3 nucleótidos, lo que probablemente refleja una preferencia de la ARN-polimerasa por el primer nucleótido que incorpora en el ARNm. Sin embargo, para que el promotor sea funcional, los dinucleótidos GG y GC deben estar orientados en la misma cara de la doble hélice, puesto que la distancia que los separa en todos los promotores es de 10 nucleótidos. La alteración de esta distancia en un solo nucleótido provoca la inactivación del promotor (Merrick, 1993), lo que probablemente refleja una rigidez de E- σ^N . Esto contrasta con E-

σ^{70} , que tolera cambios de 2 ó 3 nucleótidos en la distancia que separa las regiones -35 y -10.

El análisis de la secuencia de los factores σ indica que se pueden dividir en dos familias: la familia de σ^{54} o σ^N , constituida por los factores σ^N de las distintas especies, y la familia de σ^{70} , que debe su nombre al factor sigma principal de *E. coli* e incluye al resto de los factores σ conocidos (Gross, *et al* 1992). Entre los miembros de la familia de σ^{70} se reconocen 4 regiones de homología, a su vez divididas en subregiones, numeradas desde el extremo amino. La región amino terminal es propia de los factores σ principales de distintas especies, mientras que las otras son compartidas por todos los factores σ . Se conoce la secuencia de 17 genes *rpoN* y el único parecido de sus productos con los miembros de la otra familia se restringe a una pequeña subregión, muy conservada en estos, denominada 2.2 (Gross, *et al* 1992).

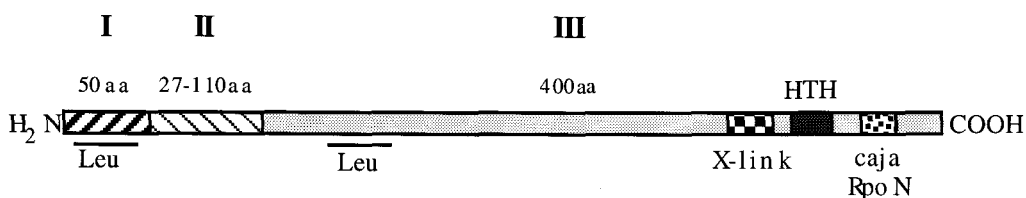


Figura 1. Representación esquemática de un factor σ^N que muestra las tres regiones conservadas y los motivos incluidos en éstas. Leu: posibles cremalleras de leucina. HTH: motivo hélice-giro-hélice. x-link: región de la proteína que queda unido covalente al ADN del promotor al tratar con agentes enlazadores.

El factor σ^N está bastante conservado en las distintas especies. Funcionalmente son intercambiables, incluso entre *E. coli* y *B. subtilis*. A nivel de secuencia se distinguen claramente 3 regiones (Figura 1) (Merrick *et al*, 1987). La región I, que tiene un grado de conservación alto, está constituida por los 50 primeros aminoácidos. Tiene un contenido en glutamina muy superior a la media y presenta un posible motivo de cremallera de leucina (Merrick, 1993). La región II está poco conservada, aunque se caracteriza por su riqueza en aminoácidos ácidos. Su tamaño fluctúa entre 27 y 110 aminoácidos y esta variabilidad es la responsable de que la masa molecular de los distintos σ^N fluctúe entre 47 y 59 kilodáltones (Wong y Gralla, 1992). La región III consta de 400 aminoácidos aproximadamente y presenta un posible motivo de cremallera de leucina, otro de hélice-giro-hélice

y un bloque de 10 aminoácidos extraordinariamente conservados, que constituyen la denominada caja RpoN (Merrick, 1993).

La región rica en glutaminas constituye un dominio funcional con una estructura secundaria en α -hélice, que recuerda a los dominios ricos en glutaminas de varios factores de transcripción de mamíferos. Como ocurre con éstos, las deleciones dentro de esta región de σ^N imposibilitan la formación del complejo abierto, aunque la holoenzima ARN-polimerasa resultante es capaz de reconocer y formar un complejo cerrado con el promotor. La sustitución de más de una glutamina en esta región produce alteraciones en el tamaño de la zona de ADN desnaturalizada alrededor del inicio de la transcripción en los complejos abiertos. Sin embargo, el tamaño de la región desnaturalizada no afecta a los niveles de transcripción. La función que se atribuye a este dominio es la de transducir la señal enviada por la proteína activadora, la cual produciría un cambio conformacional que estimula la formación del complejo abierto (Hsieh *et al*, 1994).

Se ha tratado de equiparar la región acídica de σ^N a los dominios glóbulos ácidos de los factores de transcripción de eucariontes, pero su función aún no es evidente. Se cree que puede estar también implicada en la desnaturalización local del ADN, ya que deleciones de esta zona reducen la tasa de formación del complejo abierto y duplicaciones de la misma la incrementan (Wong y Gralla, 1992). Sin embargo, algunos miembros de esta familia tienen una región II muy pequeña y con poca carga negativa neta, lo que indica que no es esencial para la función de un factor σ^N .

Los factores σ^N , como el resto de factores σ , poseen un motivo hélice-giro-hélice que los capacita para reconocer secuencias específicas en el ADN. El factor σ^{70} no reconoce la secuencia promotora por sí solo, sino que tiene que estar asociado con el núcleo enzimático formando la holoenzima. La existencia de deleciones en σ^{70} que permiten que éste reconozca al promotor por sí solo indica que la capacidad de reconocimiento radica en este factor, aunque ésta se encuentre enmascarada. Por el contrario, σ^N puede unirse a la secuencia promotora sin estar

asociado a la ARN-polimerasa (Buck y Cannon, 1992). Se especula que su forma de actuación podría ser similar a la del factor de transcripción TFIID de eucariontes, que se une independientemente a la caja TATA, lo que sirve de anclaje a la ARN-polimerasa II. Sin embargo, hay que reconocer que la afinidad de la holoenzima E- σ^N por el promotor es un orden de magnitud mayor que la de σ^N por sí solo y que en presencia del núcleo enzimático solo se detecta unión de E- σ^N y no de σ^N por separado (Cannon *et al*, 1993). Sustituciones en el motivo hélice-giro-hélice de σ^N suprimen mutaciones en la región -13 del promotor, lo que indica que este motivo reconoce la región proximal del promotor, al contrario que su equivalente en σ^{70} , que reconoce la región distal -35 (Merrick, 1993).

La caja RpoN es una secuencia de 10 aminoácidos (Ala Arg Arg Thr Val Ala Lys Tyr Arg Glu) extraordinariamente conservada en todos los factores σ^N . Sin embargo, su función no está clara. Sorprendentemente, a pesar de su conservación, algunos de los aminoácidos pueden ser sustituidos sin afectar drásticamente la función del factor. El defecto provocado por las sustituciones que sí afectan a su función, no ha sido aún caracterizado en detalle (Merrick, 1993).

2. Las proteínas activadoras y sus sitios de unión

La iniciación de la transcripción desde todos los promotores dependientes de σ^N conocidos requiere el concurso de una proteína activadora que se une a la región reguladora de cada promotor. Cada sistema dispone de un activador específico necesario para expresar de forma coordinada todos los operones del mismo sistema.

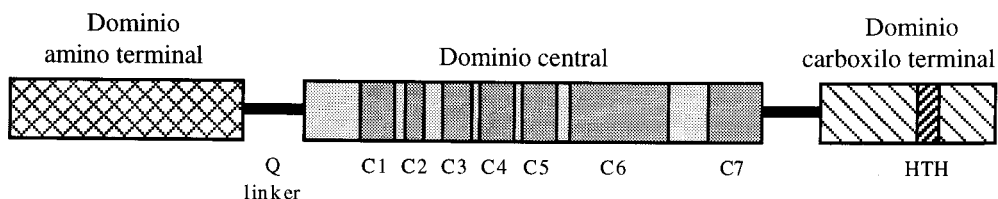


Figura 2. Esquema de la estructura modular de las proteínas activadoras de promotores dependientes de σ^N . C1 a C7 designan las siete regiones de homología del dominio central. HTH: dominio hélice-giro-hélice.

Los activadores de $E-\sigma^N$ presentan una estructura modular semejante a la de algunos reguladores de eucariontes (North *et al*, 1993). Constan típicamente de tres dominios (Figura 2). El dominio amino terminal es el más variable, tanto en tamaño, que fluctúa entre los 12 aminoácidos de NIFA de *Rhizobium leguminosarum* bv trifolii hasta los cerca de 400 de FHLA, como en secuencia, ya que no existen regiones conservadas entre todos los miembros de la familia. Este dominio está implicado en la modulación de la actividad de la proteína y su variabilidad indica que el mecanismo que regula la actividad de las distintas proteínas puede ser diferente.

Algunos activadores como NTRC, DCTD, HYDG, ALGB, HOXA y FLBD tienen en esta región una similitud del 38% de aminoácidos (Moret y Segovia, 1993). Estas proteínas pertenecen a su vez a una familia de proteínas que operan como "sistemas de dos componentes". Estos sistemas consisten en una proteína "ejecutora" y otra "sensora", que modula mediante fosforilación la actividad de la primera, en respuesta a una señal. El sistema de dos componentes es una forma de comunicación de proteínas que es utilizada no solo por algunos activadores de $E-\sigma^N$, sino también por reguladores de $E-\sigma^{70}$ o por proteínas no involucradas en el control de la expresión génica (Parkinson, y Kofoid, 1992). De los activadores de $E-\sigma^N$, el sistema de dos componentes mejor estudiado es el formado por el par NTRB y NTRC. NTRB, el elemento sensor, se autofosforila y fosforila a NTRC como respuesta a un aumento en el balance carbono/nitrógeno (Magasanik, 1988). La forma fosforilada de NTRC activa a una serie de operones dependientes de σ^N implicados en la utilización de diversas fuentes de nitrógeno. La fosforilación de NTRC se realiza en un residuo de aspártico en el dominio amino terminal, que está conservado en todos los miembros "ejecutores" de los sistemas de dos componentes, excepto en FLBD (Moret y Segovia, 1993). Sin embargo, ésta no es la única forma de modular la función de los activadores de $E-\sigma^N$. Por ejemplo, la proteína NIFA que activa los operones de fijación de nitrógeno en *Klebsiella pneumoniae* es inhibida por NIFL en respuesta a oxígeno y a

concentraciones no limitantes de nitrógeno, presumiblemente a través de la formación de un complejo (Henderson *et al*, 1989). Tampoco es necesaria la existencia de una proteína sensora, sino que el propio activador puede reconocer directamente la señal, como parece ocurrir con XYLR y DMPR.

La actividad de las proteínas truncadas carentes de su extremo amino indica que este dominio es necesario para activar algunas proteínas como NTRC (Drummond *et al*, 1990), mientras que en otras como XYLR, DMPR y DCTD es necesario para inactivarlas (Fernandez *et al*, 1995; Shingler y Pavel, 1995; Gu *et al*, 1994 ; Shingler, 1996). Su función en el caso de NIFA de *K. pneumoniae* es algo más compleja puesto que no es necesario para su actividad, pero su carencia permite que NIFL inactive a NIFA en todas las condiciones (Drummond *et al*, 1990).

El dominio amino terminal de los activadores está separado del dominio central por una región conectora sensible a proteasas (Q-linker) de 15 a 25 residuos, cuya función parece ser la de mantener físicamente unidos ambos dominios en una conformación apropiada (Wooton y Drummond, 1989).

El dominio central contiene unos 240 residuos muy conservados en todos los activadores. Los residuos conservados se agrupan en siete bloques, denominados C1 a C7 (Figura 2) (Moret y Segovia, 1993). Está considerado el dominio catalítico de la proteína. En esta región reside una actividad ATPasa esencial para su función activadora (Weiss *et al*, 1991; Lee *et al*, 1993; Lee *et al*, 1994; Pérez-Martín y de Lorenzo, 1996d).

La región C1 es rica en glicina y contiene una secuencia Gly X₂ Gly X Gly Lys X, presente en otras proteínas que unen ATP. Se han aislado mutantes en esta región de NIFA de *K. pneumoniae* que son incapaces de activar la transcripción sin tener afectada su unión a las UAS. En NTRC se ha demostrado que esta región es necesaria para la actividad ATPasa (Weiss *et al*, 1991). A unos 80 residuos se encuentra la región C5, rica en aminoácidos hidrofóbicos, que presenta homología con el segmento 3 de la adenilato kinasa de *Escherichia coli*, implicado en la hidrólisis de ATP (Moret y Segovia, 1993). La región C3 se pliega formando dos

hélices separadas por un giro. En NTRC de *Salmonella typhimurium* la sustitución del residuo gly219 por lys en la segunda hélice produce una proteína con actividad ATPasa pero deficiente en activación de la transcripción (Weiss *et al*, 1991). Se cree que esta región está implicada en la interacción con la ARN polimerasa. Aún no se ha atribuido ninguna función a las regiones conservadas C2, C4, C6 y C7 del dominio central.

El extremo carboxilo terminal de los activadores tiene una longitud de 65 a 130 aminoácidos, excepto en LEVR de *Bacillus subtilis*, que tiene 600 aminoácidos. Contiene un dominio hélice-giro-hélice con una región conservada (Ala Leu X₉ Ala Ala X₂ Leu Gly), entre la primera hélice y el giro. Este dominio es el responsable de la unión de la proteína a las UAS. Se han aislado mutaciones que afectan a la unión a ADN en NTRC y NIFA de *Klebsiella pneumoniae*, y éstas se localizan en la segunda hélice, que es la responsable del reconocimiento específico de la UAS (Contreras y drummond, 1988; Morett *et al*, 1988).

Se han construido mutantes de *dctD*, *nifA* y *pspF* que rigen proteínas carentes del dominio carboxilo terminal. En ambos casos las proteínas retenían parte de su actividad, lo que indica que este dominio no es esencial para la activación (Huala y Ausubel, 1989 ; Huala *et al*, 1992 ; Dworkin *et al* 1997). Por el contrario, una delección del dominio carboxilo terminal de NTRC inactiva a la proteína. El dominio carboxilo terminal aislado de NTRC aún es capaz de unirse a la UAS (Drummond *et al*, 1990). Este dominio contiene una región no conservada en otras proteínas de la familia que es homóloga a una región de la proteína FIS de *E. coli*, implicada en la formación de dímeros. De hecho, el dominio carboxilo de NTRC es un dímero en solución y es capaz de formar heterodímeros con formas no truncadas de la proteína. Se ha propuesto, por tanto, que los determinantes de la dimerización de NTRC se localizan en el dominio carboxilo y que la falta de dimerización es la responsable de que versiones de NTRC truncadas en este dominio no sean capaces de activar la transcripción (Klose *et al*, 1994; North *et al*, 1993).

Se han construido también versiones de varios activadores consistentes únicamente en el dominio central y algunos de estos dominios aislados, como los de NIFA y DCTD, son activos *in vivo* (Huala y Ausubel, 1989 y Huala *et al*, 1992). El dominio central de NIFA de *K. pneumoniae* purificado también es capaz de activar *in vitro* la transcripción a partir del promotor *nifH*. Lo mismo que ocurre con una delección del extremo amino, la activación por el dominio central es inhibida por NIFL (Berger *et al*, 1994).

La construcción de híbridos consistentes en la unión de módulos de distintas proteínas de la familia también se ha llevado a cabo con éxito. La proteína quimérica resultante de la unión de los dominios amino y central de DCTD con el dominio carboxilo de NIFA de *R. meliloti* mantiene la especificidad de unión al ADN de NIFA y activa la transcripción *in vivo*, lo que demuestra que al menos los dominios de unión al ADN y de activación son separables e intercambiables (North *et al*, 1993). Se han construido también híbridos activos entre VNFA y ANFA, los activadores de los sistemas de fijación de nitrógeno alternativos de *Azotobacter vinelandii*, forzando *in vivo* la recombinación entre los genes que rigen estas proteínas. Estas proteínas quiméricas llevan el dominio amino terminal de VNFA, un dominio central híbrido que varía según el punto donde se produjo la recombinación y el dominio carboxilo de ANFA. Todas ellas mantienen la especificidad de activación de ANFA, aunque no necesitan la presencia de la Fe-proteína, un requerimiento característico para la actividad de ANFA (Frise *et al*, 1994). La actividad de diversas proteínas truncadas y la construcción de proteínas quiméricas activas, indica claramente que las tres regiones de las proteínas activadoras constituyen dominios funcionales independientes.

Las secuencias reconocidas por estos activadores consisten en pequeños palíndromos interrumpidos en su eje de simetría por un fragmento de ADN espaciador, lo que permite suponer que estos activadores se unen al ADN al menos en forma dimérica. A diferencia de las secuencias de los activadores de E- σ^{70} , que se localizan generalmente en las posiciones -40 y -60, las de los activadores de E- σ^N se localizan a más de 100 pb por delante del sitio de iniciación de la transcripción de los promotores que

regulan, por lo que también se las denomina UAS (upstream activating sequences) (Collado-Vides *et al*, 1991). Pueden estar incluso tan separadas como 260 pb del inicio de la transcripción. Curiosamente, se ha descrito una UAS activa situada por detrás del inicio de transcripción del gen *flaN* de *Caulobacter crescentus* (Mullin y Newton, 1993).

La función de las UAS se ha caracterizado en detalle en el promotor del gen *glnA*. Esta es la de capturar al activador y mantenerlo en las cercanías del promotor, incrementando su concentración local en la zona de actuación (Wedel *et al*, 1990). De hecho, no son esenciales para la activación, pues un promotor de *glnA* con una delección de sus UAS puede activarse si se incrementa suficientemente la concentración de su activador NTRC. Estas UAS comparten algunas características con los potenciadores de la transcripción eucarióticos. Son activas independientemente de su orientación y su posición, pues pueden funcionar cuando se colocan varias kilobases por delante, o por detrás del inicio de la transcripción (Reitzer y Magasanik, 1986; Ninfa *et al*, 1987). Por el contrario, las UAS no son funcionales si se sitúan demasiado cerca del promotor, lo que implica que el mecanismo de activación es a distancia. A su vez, las UAS son específicas del activador, pero no parecen ser específicas del promotor que activan, puesto que el promotor *nifH* puede ser activado por una proteína de otro sistema como NTRC, si se sustituye la UAS natural de ese promotor por una UAS de NTRC (Santero *et al*, 1992). Esta característica se observa también con los potenciadores de eucariontes, que pueden actuar sobre distintos promotores, si éstos se emplazan dentro de su radio de acción.

La región reguladora de la mayoría de los promotores contiene más de una copia de la UAS de su activador. La eliminación de una copia de la UAS puede reducir sustancialmente la eficacia de transcripción. En el promotor de *glnA*, en el que son necesarios al menos dos UAS, se ha demostrado que se produce la unión cooperativa de las moléculas del activador NTRC por su sitios de unión (Porter *et al*, 1993). La oligomerización de NTRC no se restringe a un dímero por UAS (tetrámero) sino que debe ser mayor, y proponen la hipótesis de un tetrámero por UAS, es decir

un octámero; ambos eventos son necesarios para una activación eficaz (Wyman *et al*, 1997; Rippe *et al*, 1998). Sin embargo en el promotor *Pu* de *Pseudomonas putida* no ocurre esta unión cooperativa en sus sitios de unión, sino que la unión de XYLR a cada uno de sus dos sitios parecen ser hechos independientes (Pérez-Martín y de Lorenzo, 1996b). En este mismo promotor la oligomerización de las moléculas de activador (XYLR) es dependiente de la unión de ATP sin que sea su hidrólisis necesaria para la oligomerización (Pérez-Martín y de Lorenzo, 1996d) (ver “Inicio de la Transcripción”). Para la activación del promotor *nifH* de *Klebsiella pneumoniae* se necesita una sola UAS, esto parece indicar que NIFA no necesita para activar eficientemente la transcripción esta multimerización observada con NTRC, o por el contrario, que es capaz de llevarla a cabo con una sola UAS.

3. La proteína IHF (Integration Host Factor)

La caracterización de la región promotora reguladora de *nifH* de *Klebsiella pneumoniae* reveló la existencia de un tercer módulo regulador, localizado entre el sitio de reconocimiento de E- σ^N y la UAS. La proteína que se une a este módulo fue identificada como IHF (Santero *et al*, 1989). Posteriormente se ha identificado en las regiones promotoras de muchos otros operones y podemos decir en la actualidad que son pocos los casos en los que se ha demostrado que este módulo no está presente. El módulo de IHF se localiza en la misma posición relativa en todas ellas, más cerca del sitio de unión de E- σ^N que de la UAS (Figura 3). La secuencia consenso de este módulo es de 13 pares de bases (WATCAAN₄TTR. W=A o T, R=A o G), aunque varias sustituciones son tolerables sin que aparentemente se afecte su función, y está localizada en un entorno rico en pares A-T.

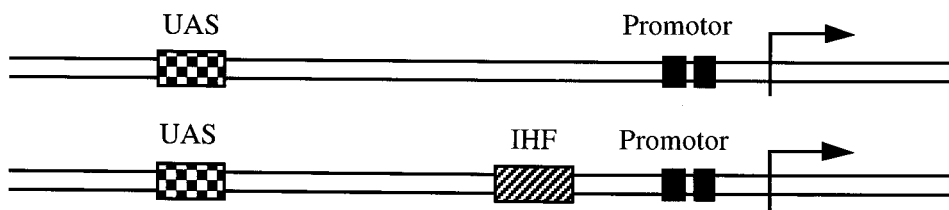


Figura 3. Esquema de los dos tipos de promotores dependientes de σ^N , que se diferencian en la existencia de un módulo para IHF.

IHF es una proteína muy bien caracterizada en *Escherichia coli*. Fué identificada inicialmente como un factor del hospedador necesario para la integración del bacteriófago λ , función que le da su nombre. IHF de *E. coli* es una pequeña proteína básica muy abundante. Su concentración llega a ser de 1 μg por mg de proteína total de la célula en fase exponencial, mientras que en fase estacionaria esta concentración se multiplica por cinco. Está formada por dos subunidades diferentes, regidas por dos genes no ligados, *himA* y *himD* (*hip*), aunque actualmente también denominadas *ihfA* e *ihfB* (Weisberg *et al*, 1996). IHF produce un doblez en ángulo agudo en la región de ADN donde se une. Esta característica es utilizada durante la integración de λ para generar una geometría adecuada para que la recombinación específica de sitio sea eficaz. La sustitución funcional de un sitio de unión de IHF por secuencias de ADN intrínsecamente dobladas permite suponer que la formación de dobleces es la única función de IHF en este proceso (Goodman y Nash, 1989).

IHF es una proteína multifuncional involucrada en multitud de procesos tales como replicación, transferencia y control de la segregación de plásmidos, replicación del cromosoma de *E. coli*, encapsidamiento de fagos, transposición y regulación de la expresión de diversos genes (Friedman, 1988; Nash, 1996). La función asignada a IHF en todos estos procesos es estructural, derivada de su capacidad de doblar el ADN, aunque se ha descrito un posible contacto directo de IHF con la subunidad α de la ARN-polimerasa en la regulación del promotor *pL1* del fago λ (Giladi *et al*, 1992).

IHF estimula la transcripción desde diversos promotores dependientes de $E\text{-}\sigma^N$. La característica general de IHF y la posición relativa de su módulo en todas las regiones promotoras permiten suponer que el papel fundamental de IHF en estos promotores es el de coactivador, facilitando el contacto del activador con $E\text{-}\sigma^N$ por medio de la formación de un doblez en el ADN que los separa (Hoover *et al*, 1990).

4. Inicio de la transcripción

El inicio de la transcripción por $E-\sigma^N$ se ha caracterizado principalmente en la región promotora de *glnA*, que carece de módulo para IHF. $E-\sigma^N$ se une con gran afinidad a su secuencia específica en el promotor, formando el denominado complejo cerrado. Sin embargo, este complejo es transcripcionalmente inactivo. Para que se inicie la transcripción se necesita la forma fosforilada de NTRC, la cual es capaz de oligomerizar y entonces catalizar la isomerización del complejo cerrado en un complejo abierto mucho más estable, caracterizado por una desnaturalización local de las cadenas de ADN alrededor del sitio de inicio de la transcripción (Figura 4). Este complejo abierto es ya transcripcionalmente activo y solo necesita los ribonucleótidos sustratos; el activador puede ser eliminado sin que se afecten las etapas posteriores de la transcripción. La reacción de isomerización es estrictamente dependiente de la hidrólisis de ATP, catalizada por el activador (Weiss *et al*, 1991). Esta dependencia de ATP es una característica exclusiva de la iniciación de la transcripción por $E-\sigma^N$, que de nuevo recuerda a la iniciación de la transcripción en eucariontes. En el promotor *Pu* de *Pseudomonas putida* la unión del ATP a su activador XYLR parece ser necesario para la oligomerización de este activador y no su hidrólisis, que es necesaria para la isomerización de complejo cerrado a abierto (Pérez-Martín y de Lorenzo, 1996d). Las etapas posteriores del proceso son similares a las llevadas a cabo por otras formas de holoenzima ARN-polimerasa: tras una etapa de transcripción abortiva, el factor σ se libera cuando la polimerasa se desliza al entrar en la etapa de elongación (Popham *et al*, 1989).

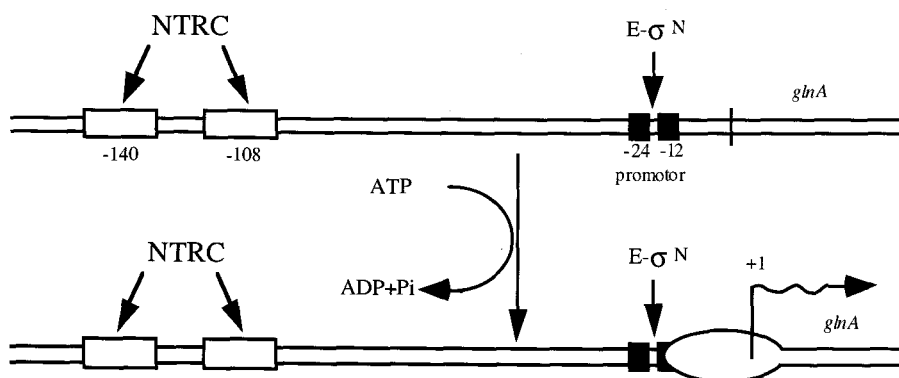


Figura 4. Isomerización del complejo cerrado en el promotor *glnA* hasta un complejo abierto transcripcionalmente activo.

Aunque no son estrictamente necesarias para la activación, la presencia de las UAS mejora sustancialmente la capacidad activadora de NTRC. La funcionalidad de las UAS es independiente de su distancia y posición, se pueden situar a grandes distancias y diferentes orientaciones, tanto corriente arriba como abajo respecto al inicio de la transcripción, sin que la activación se afecte drásticamente (Reitzer y Magasanik, 1986). Su efecto se observa incluso cuando las UAS y el promotor se encuentran en dos moléculas de ADN distintas, aunque entrelazadas formando un concatenado, lo que descarta que el mecanismo de activación requiera el desplazamiento del activador por la hebra de ADN, o la transmisión a lo largo de ésta de alguna distorsión en el ADN producida por el activador (Wedel *et al*, 1990). Esta versatilidad en la geometría del proceso, ha hecho que se llame a NTRC proteína de unión a potenciadores bacterianos por comparación con los eucariotas, este término se ha generalizado a todos los activadores de promotores dependientes de σ^N , aunque en estos esta versatilidad posicional no ha sido demostrada. El contacto entre NTRC y E- σ^N se realiza estando éstos unidos a sus respectivos módulos en el ADN, formándose entonces un bucle constituido por el ADN que separa ambos módulos (Figura 5A). Estos lazos en el ADN producidos durante la activación se han observado al microscopio electrónico (Kustu *et al*, 1991).

Un aspecto importante en el inicio de la transcripción, es como se realiza el contacto entre el activador y la ARNpolimerasa- σ^N . Se ha visto que la activación del promotor *nifH* de *K. pneumoniae* no requiere el contacto con el sitio I de la subunidad α de la ARNpolimerasa (Lee *et al*, 1993). Con el activador DCTD de *Rhizobium meliloti*, se ha demostrado que existe una interacción de este activador con la subunidad β y con el factor σ^N , y que estas interacciones pueden ser importantes para la activación de la transcripción (Lee y Hoover, 1995).

Los datos disponibles en otros sistemas, la similitud que presentan todos los activadores en el dominio central y la capacidad de proteínas de distintos sistemas de activar la transcripción desde el promotor de *glnA* si se proporcionan en

suficiente concentración, permiten concluir que el mecanismo de activación descrito para NTRC es común a todos los activadores de $E-\sigma^N$. Sin embargo, existen muchos promotores con un sitio de unión de IHF, que necesitan a esta proteína para obtener sus niveles máximos de expresión. La intervención de IHF plantea dos preguntas cruciales: ¿porqué se necesita IHF en muchos de los promotores? y ¿cómo estimula IHF los niveles de expresión?

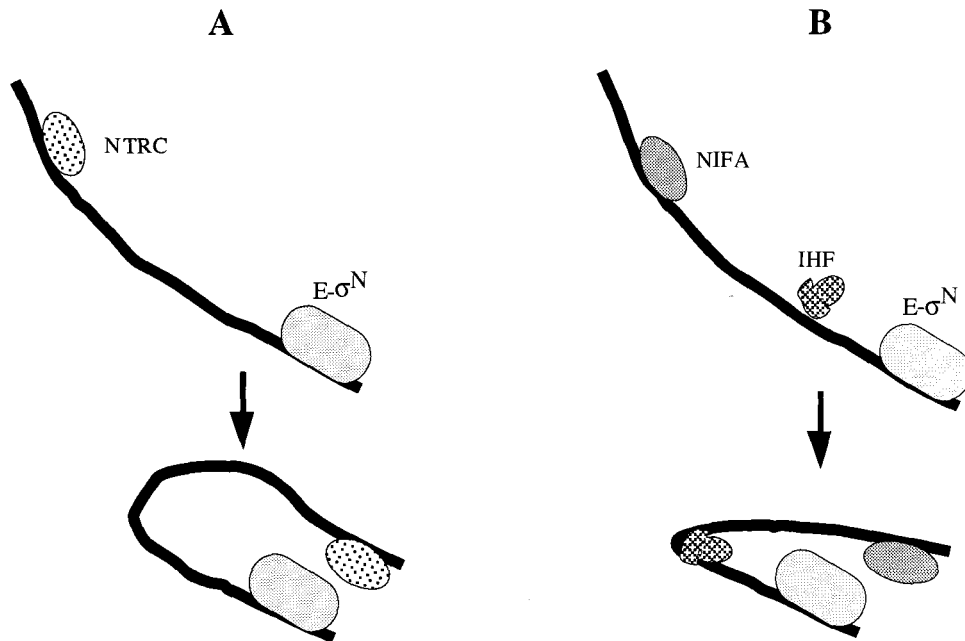


Figura 5. Activación de la transcripción desde un promotor como el de *glnA*, que no tiene módulo para IHF, y desde un promotor como el *nifH*, que requiere la participación de la proteína IHF. En el panel A, el contacto entre el activador y la polimerasa se produce al generarse un bucle al azar, mientras que en panel B, el contacto está favorecido por el doblez inducido por IHF.

Que IHF se necesite o no, parece depender de las características del propio promotor y no del tipo de proteína reguladora que lo activa. Una misma proteína como NTRC activa de forma natural a promotores independientes de IHF como el de *glnA*, así como a promotores que sí dependen de este factor, tal como el de *glnH*. Por otra parte, el promotor de *nifH*, cuyo activador natural es NIFA, puede ser activado eficazmente por NTRC si se sustituye la UAS de NIFA por una de NTRC. Esta activación es estimulada por IHF (Santero *et al*, 1992). El grado de dependencia de IHF para obtener unos niveles de expresión altos varía de unos promotores a otros. Analizando promotores mutantes de *nifH* de *K. pneumoniae* (Hoover *et al*, 1990), así como

promotores *nifH* naturales de otras especies (Santero *et al*, 1992), se ha observado una clara correlación inversa entre el grado de estimulación de IHF y la afinidad de E- σ^N por su secuencia promotora. IHF parece compensar una deficiencia consistente en una baja afinidad de E- σ^N por su promotor, de forma que esto no se traduzca en unos niveles bajos de expresión. La intervención de IHF podría entonces obviarse con una secuencia promotora de gran afinidad, como ocurre en el caso de *glnA*. Sin embargo, este incremento en la afinidad lleva consigo que estos promotores puedan ser activados por un regulador no fisiológico (Santero *et al*, 1992). La ventaja de la utilización de IHF en este tipo de promotores es la de conseguir unos niveles altos de transcripción, unidos a una gran fidelidad en su expresión, evitando que sean activados por reguladores de otros sistemas, en respuesta a otra señal.

El promotor *Pu* de *Pseudomonas putida* representa un ejemplo característico de la necesidad de IHF para conseguir una gran fidelidad en el proceso de activación. IHF no es necesario para estimular la transcripción desde este promotor, puesto que sus niveles de expresión son similares en un mutante carente de IHF. Sin embargo, en este mutante, la expresión debida a la activación no fisiológica por parte de activadores de otros sistemas aumenta sustancialmente. En este caso, el papel de IHF no es el de estimulador de la activación fisiológica, sino meramente el de "restringidor", evitando la activación no fisiológica (Pérez-Martín y de Lorenzo, 1995). Este mismo efecto se ha demostrado en los promotores *pspA* y *glnH* de *E. coli* (Dworkin *et al*, 1998). En el promotor *glnHp2* de *E. coli* se ha demostrado que IHF evita la transcripción desde éste por su activador NTRC, si las UAS del activador no están situadas adecuadamente respecto a el sitio de unión de IHF, y la ARN-polimerasa. Sin embargo, en ausencia de IHF si obtenemos activación (Claverie-Martín, y Magasanik 1992)

Con respecto a la forma en que IHF estimula la transcripción, cabría pensar que facilitase la formación del complejo cerrado entre E- σ^N y su secuencia promotora, puesto que ésta es la deficiencia observada en los promotores dependientes de IHF. Si fuese así, IHF estimularía los niveles de transcripción debidos a la

activación tanto por su regulador fisiológico como por los reguladores de otros sistemas, pues equivaldría a tener una secuencia promotora con gran afinidad por $E-\sigma^N$. Sin embargo, el efecto estimulador de IHF es específico para el activador fisiológico o, dicho de otra forma, para el activador cuyas UAS se encuentren en la posición apropiada en la región reguladora del promotor (Santero *et al*, 1992). En cualquier caso, los ensayos de unión de $E-\sigma^N$ al promotor indican que el efecto estimulador de IHF no parece residir en esta etapa.

Teniendo en cuenta las características de IHF, la posición relativa de su módulo en todas las regiones promotoras y la especificidad del efecto estimulador, el modelo actual de funcionamiento de IHF propone que la estimulación de la transcripción se produce por la formación de un doblez en el ADN que separa al promotor de las UAS, facilitando el contacto entre el activador y $E-\sigma^N$ (Figura 5B) (Hoover *et al*, 1990). Esto incrementaría la tasa de formación de complejos abiertos, ya que el doblez inducido por IHF emplazaría al activador en el lugar adecuado para que pudiese estabilizar a $E-\sigma^N$ en complejo abierto tan pronto como ésta se asocie con el promotor. En definitiva, se conseguiría un sistema de activación muy eficaz, aunque la afinidad de $E-\sigma^N$ por el promotor fuese baja. A su vez, la distorsión en el ADN podría dificultar el acceso de un activador no emplazado en el sitio adecuado, evitando que el promotor pueda ser activado por un regulador de otro sistema. El módulo de IHF ha sido sustituido funcionalmente en los promotores de *nifH* de *K. pneumoniae* (realizado en esta tesis) y *Pu* de *P. putida* por una secuencia de ADN con una curvatura intrínseca (Molina-López *et al*, 1994; Pérez-Martín *et al*, 1994). Estos promotores artificiales siguen teniendo las mismas características que los silvestres, aunque ya no requieren IHF, lo que descarta cualquier tipo de interacción específica entre IHF y el activador o $E-\sigma^N$, y confirma que su papel es meramente estructural.

La función de IHF predice que, a pesar de ser un mecanismo de activación a distancia, la geometría del proceso debe ser muy estricta, con lo que su eficacia se vería drásticamente reducida por alteraciones en la distancia y orientación relativa de los módulos

para las proteínas implicadas en la cara de la doble hélice. Esta predicción se cumple en las regiones promotoras estudiadas (Abril y Ramos, 1993; Claverie-Martín y Magasanik, 1992; Molina-López *et al*, 1994). Al estar el módulo de IHF localizado más cerca del promotor que de las UAS, el dobléz inducido por IHF genera una estructura asimétrica en forma de "V", en la que el activador se situaría en el brazo largo y E- σ^N en el brazo corto (Figura 5). Hemos de asumir que ésta es la geometría apropiada pues es la encontrada prácticamente en todas las regiones promotoras. Esta disposición asimétrica emplazaría al activador cerca de la región frontal de E- σ^N donde el factor σ se encuentra localizado, lo que permite especular con la posibilidad de que el activador contacte directamente con el factor σ durante el proceso de activación. En favor de esta idea, encontramos que en el único caso descrito en el que los sitios de unión para IHF y para el activador se encuentran por detrás del inicio de la transcripción, el módulo para IHF se encuentra más cerca del activador que de E- σ^N (Mullin y Newton, 1993).

5. Sistemas de regulación dependientes de σ^N .

Se han descrito más de 30 sistemas dependientes de este factor σ alternativo de la ARNpolimerasa de eubacterias, de los cuales 5 de ellos fueron estudiados en este trabajo. En este apartado describimos brevemente estos 5 sistemas de regulación (*xyl*, *dmp*, *dct*, *ntr* y *nif*), centrandonos en sus activadores. Desarrollamos con más detalle los sistemas *ntr* y *nif*, ya que en ellos se centra la mayor parte de esta tesis.

5.1. NTRC Y NIFA (Regulación de la fijación de nitrógeno en *K. pneumoniae*).

En Enterobacterias y otros grupos de bacterias la utilización de fuentes de nitrógeno alternativas al amonio (que es por lo general la fuente de nitrógeno preferida) está regulada por el sistema general de control de nitrógeno *ntr* (Merrick y Edwards,

1995). En este sistema de regulación, representado en la figura 6, están implicadas cuatro proteínas: una uridilil transferasa, producto del gen *glnD*, una pequeña proteína denominada PII, producto del gen *glnB*, y un par de proteínas, codificadas por los genes *ntrB* y *ntrC*, pertenecientes a la familia de reguladores de dos componentes (Parkinson y Kofoid, 1992; Stock *et al*, 1989). La uridilil transferasa cataliza la unión de UMP a PII y también la desuridililación de PII (Adler *et al*, 1975). La actividad uridilil transferasa se estimula *in vitro* por la presencia de glutamato y ATP, mientras que la presencia de glutamina estimula la actividad contraria (Engleman y Francis, 1978). PII es una proteína trimérica que une ATP, α -cetoglutarato o glutamato, lo que determina su estado de uridililación/desuridililación y, en último término, su interacción con NTRB (Kamberov *et al*, 1995). NTRB es una proteína dimérica con actividad proteín kinasa/fosfatasa. NTRB es capaz de autofosforilarse en un residuo de histidina y de fosforilar o desfosforilar a NTRC en un residuo de aspártico (Ninfa y Magasanik, 1986; Ninfa y Benett, 1991). Su actividad está modulada por PII de forma que, en su forma uridililada, PII estimula la actividad proteín kinasa, mientras que en su forma desuridililada, PII estimula la actividad fosfatasa (Atkinson *et al*, 1994). NTRC-fosfato es la proteína activadora de la transcripción de varios promotores implicados en la utilización de diversas fuentes de nitrógeno alternativas al amonio. Los promotores regulados por NTRC son dependientes del factor σ alternativo σ^N y NTRC presenta la estructura modular en tres dominios característica de los activadores de dichos promotores (Morett y Segovia, 1993). Las cuatro proteínas indicadas actúan en cascada, de manera que en condiciones de limitación de nitrógeno, la uridilil transferasa cataliza la uridililación de las tres subunidades de PII en un residuo de tirosina. La forma uridililada de PII actúa como señal en respuesta a la cual NTRB fosforila a NTRC, haciéndola activa y permitiendo así la expresión de los promotores regulados por el sistema. En exceso de nitrógeno, la uridil transferasa desuridilila a PII. PII se une a NTRB y estimula su actividad fosfatasa, lo que redundará en la desfosforilación de NTRC por parte de NTRB. La señal que controla el sistema parece ser el balance entre las concentraciones intracelulares de glutamina y α -

cetoglutarato (Engleman y Francis, 1978). Entre los operones regulados por el sistema *ntr* en Enterobacterias figuran *glnAntrBC* (glutamina sintetasa y el sistema regulador de dos componentes), *glnHPQ* (transporte de glutamina), *argT* (transporte de arginina), *hisJQMP* (transporte de histidina), *nasFEDCBA* (asimilación de nitrato y nitrito), *nifLA* (regulación de la fijación de nitrógeno en *K. pneumoniae*) y *nac* (regulación por nitrógeno en *K. aerogenes*) (Merrick y Edwards, 1995).

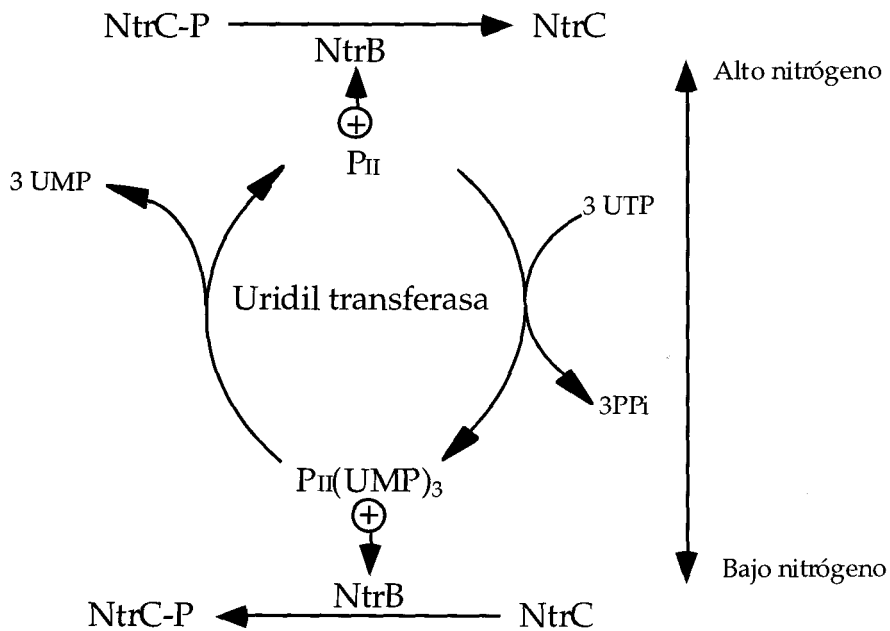


Figura 6. Esquema de la regulación del sistema general de control del nitrógeno (*ntr*).

Además del sistema general de regulación de la asimilación de nitrógeno descrito, los genes de fijación de nitrógeno de *K. pneumoniae* están sujetos a un sistema específico de regulación transcripcional (Figura 7). Este control específico es ejercido por las proteínas NIFL y NIFA (Merrick, 1992). NIFL y NIFA son los productos del operón *nifLA*. La transcripción desde el promotor de *nifLA* está controlada por el sistema *ntr* en la forma que se ha explicado anteriormente (Espin, *et al*, 1982). NIFL y NIFA forman un par sensor-regulador en el que NIFA es, al igual que NTRC, un activador de la transcripción de promotores dependientes de σ^N (Morett y Segovia, 1993). A diferencia de NTRC, NIFA se sintetiza en forma activa y su actividad no está controlada por fosforilación. NIFL inactiva a NIFA si la condición de limitación de nitrógeno no es muy severa (es decir, la concentración de nitrógeno necesaria

para la inactivación de NIFA es inferior a la necesaria para la inactivación de NtrC), o bien en presencia de oxígeno (Merrick *et al*, 1982 y Morett *et al*, 1990). En condiciones de deficiencia de nitrógeno y anaerobiosis, NIFA activa todos los promotores *nif* excepto el suyo propio (Buchanan-Wollaston *et al*, 1981).

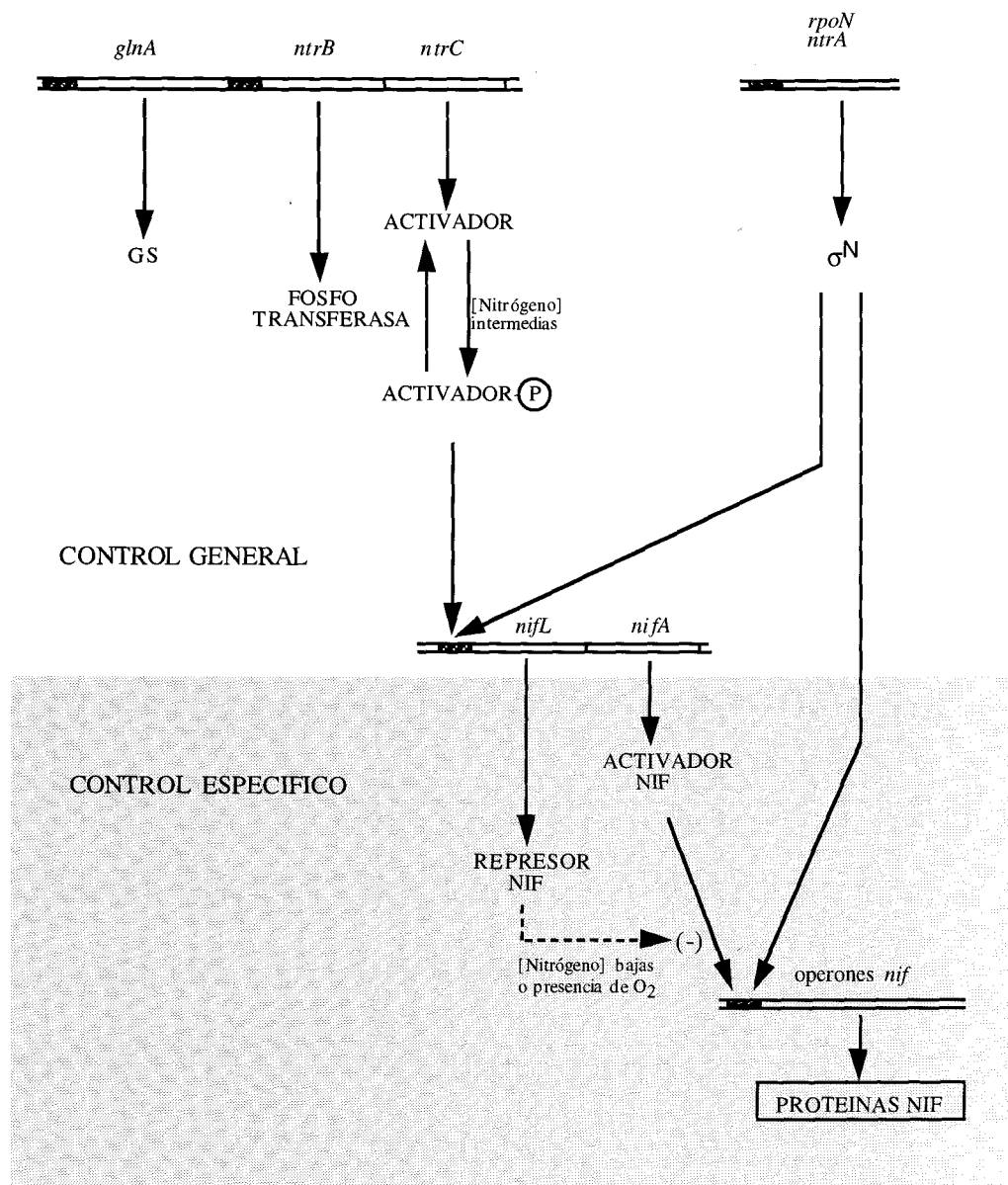


Figura 7. Esquema de la regulación en cascada en *K. pneumoniae* del sistema general de asimilación de nitrógeno (*ntr*), y su control sobre el sistema específico de fijación de nitrógeno (*nif*).

El mecanismo mediante el cual NIFL impide la activación por parte de NIFA es desconocido, aunque en base a datos de inmunoprecipitación se ha propuesto que NIFL y NIFA podrían interaccionar de forma no catalítica para dar un complejo inactivo (Henderson *et al*, 1989). Se ha sugerido que NIFL puede estar

interfiriendo con la posible interacción NIFA/ARNpolimerasa- σ^N , ya que NIFL es capaz de inhibir la actividad mediada por el dominio central de NIFA, aunque no su actividad ATPasa (Berger *et al*, 1994). Estas dos proteínas están producidas en cantidades estequiométricas, hecho que garantizaría una fidelidad en el posible proceso de interacción entre ambas proteínas para la inactivación del activador (Henderson *et al*, 1989). Un desbalance en la dosis génica *nifL-nifA* en proporción 1:2 produce una desrepresión de la síntesis de nitrogenasa en condiciones inapropiadas (Govantes *et al*, 1996). La existencia de acoplamiento traduccional en el operón *nifLA* garantiza un control estricto en la proporción en el que son sintetizadas ambas proteínas, control que es esencial para una regulación eficiente de la fijación de nitrógeno (Govantes *et al*, 1996; 1998).

5.2 XYLR y DMPR

Hemos agrupado a estos activadores por el gran parecido que existe entre ellos. Ambos son activadores de operones, cuyos productos están involucrados en el catabolismo de compuestos aromáticos de *Pseudomonas putida*, y que se inducen por la acción directa de un efector. Ambos forman parte del grupo de activadores cuyo dominio amino terminal (o dominio regulador) es un dominio represor, por lo cual la carencia de éste, proporciona un mutante constitutivo (Shingler, 1996). La identidad de amino ácidos en sus extremos amino-terminales supera el 62% de identidad de amino ácidos (Shingler, 1996), y sus extremos carboxilo-terminales incluso reconocen la misma UAS (Shingler *et al*, 1993; Fernández *et al*, 1994; Pérez-Martín y de Lorenzo, 1996b).

XYLR controla los promotores *Pu* y *Ps* del plásmido TOL pWWO de *P. putida* involucrados en la biodegradación de toluenos y xilenos, XylR es capaz de responder a una gran variedad de derivados de hidrocarburos aromáticos (Abril *et al*, 1989).

DmpR controla el promotor *Po* de *Pseudomonas sp.* CF600 (*Pseudomonas putida*), involucrado en la biodegradación de

derivados de fenoles, responde a la presencia de fenoles y metilfenoles.

5.3. DCTD

DctD es otro activador cuyo extremo amino-terminal está considerado como un dominio represor de la proteína (Gu *et al*, 1994), pero a diferencia de los dos anteriores, este activador forma parte, junto con DCTB, de un sistema de “dos componentes”. DCTD es la proteína “ejecutora” al ser fosforilada por DCTB, en presencia de ácidos dicarboxílicos como el succinato, fumarato y malato (Nixon *et al*, 1986). DCTD está involucrado en la regulación del transporte de estos compuestos en varias especies del género *Rhizobium* (Ronson, 1988). El sistema está compuesto por tres proteínas (DCTA, DCTB y DCTD), DCTB parece ser una proteína con un receptor transmembrana que fosforila a DCTD en presencia de ácidos dicarboxílicos (Ronson *et al*, 1987), DCTD-P activa el promotor de *dctA*, cuyo producto es el transportador de estos ácidos dicarboxílicos (Ronson, 1988).

OBJETIVOS

El trabajo presentado en esta memoria es un estudio sobre los requerimientos posicionales de los sitios de unión de activadores de promotores dependientes de la ARNpolimerasa- σ^N , para una activación eficiente de la transcripción, y el papel que puede jugar la proteína IHF en este proceso de transcripción. Los objetivos específicos abordados han sido los siguientes:

1. Estudiar la geometría del proceso de inicio de la transcripción del promotor *nifH* de *Klebsiella pneumoniae*, centrándonos en los siguientes aspectos:

1.1. Determinar las restricciones posicionales que puede imponer IHF a los sitios de unión de los otros dos factores (NIFA y ARNpolimerasa- σ^N) que se unen a la región promotora.

1.2. Comprobar si la función de IHF en este promotor se limita a un papel estructural, derivado de su función de doblar el ADN.

2. Comprobar si la versatilidad posicional descrita para los sitios de unión del activador NTRC es generalizable al resto de activadores de promotores dependientes de la ARNpolimerasa- σ^N .

MATERIALES Y METODOS

1. Estirpes bacterianas.

Las estirpes de *E. coli* y *K. pneumoniae* utilizadas en este trabajo están descritas en la Tabla 1.

Tabla 1. Estirpes bacterianas utilizadas en este trabajo.

ESTIRPE	GENOTIPO	ORIGEN/ REFERENCIA
<i>E. coli</i>		
CJ236	<i>dut ung thi relA</i> ; pCJ105 (Cm ^r)	Bio-Rad Laboratories
DH5 α	F ⁻ Φ 80dlacZ Δ M15 D(lacZYA-argF) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17(rk⁻ mk⁻)</i> <i>supE44 thi1 gyrA relA1</i>	Hanahan, 1983
ET8000	<i>rbs lacZ::IS1 gyrA hutCka</i>	MacNeil <i>et al</i> , 1982
ET8045	<i>rbs lacZ::IS1 gyrA hutCka</i> <i>ntrA208::Tn5</i>	MacNeil <i>et al</i> , 1982
ET8556	<i>rbs lacZ::IS1 gyrA hutCka</i> <i>ntrC1488</i>	MacNeil <i>et al</i> , 1982
NH274	<i>supE supF himD::Cam^r</i>	Flamm y Weisberg, 1985
SE1000	<i>ntr⁺ rbs lacZ::IS1 gyrA hutCka</i> <i>himD::Cam^r</i> (derivado IHF ⁻ de ET8000)	Molina-López <i>et al</i> , 1994
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
VJSK014	Δ <i>lac2001 Gal^r hsdR1 Tn7</i>	Cali <i>et al</i> , 1989

2. Plásmidos.

Las características más relevantes de los plásmidos utilizados en este trabajo aparecen reflejadas en la Tabla 2.

Tabla 2. Plásmidos utilizados en este trabajo.

PLASMIDO	CARACTERISTICAS	ORIGEN/ REFERENCIA
pACYC184	Vector de clonación de bajo número de copias, origen de replicación del plásmido p15A. Cm ^r y Tc ^r .	Chang y Cohen, 1978
pAW302	Plásmido que contiene el cassette <i>cat</i> procedente de Tn9 que le confiere resistencia a cloranfenicol.	Stalder y Arber, 1989
pBend1	Derivado de pBR322, contiene un MCS duplicado de ocho dianas de restricción. Ap ^r .	S. Adhya
pDO503	Plásmido de bajo número de copias que contiene el operón <i>nifLA</i> de <i>K. pneumoniae</i> , expresado desde su propio promotor. Tc ^r .	Ow y Ausubel, 1983
pHN1036	Derivado de pBend1, con un A-tracts ₆ entre un MCS duplicado de ocho dianas. Ap ^r .	Goodman y Nash, 1989
pIC552	Vector basado en pBR322, para fusiones transcripcionales con el híbrido <i>galK-lacZ</i> . Ap ^r y Str ^r .	Macián <i>et al.</i> , 1994
pIZ203	Vector de bajo número de copias derivado de pDO503, con una delección interna de 120 pb en <i>nifL</i> , que evita la inactivación de NIFA. También fueron eliminadas las secuencias de <i>nifBQ</i> . Tc ^r .	Molina-López <i>et al.</i> , 1994
pIZ237	Vector de fusiones traduccionales <i>lac</i> de una copia por cromosoma, MCS con las dianas <i>EcoRI</i> , <i>BamHI</i> y <i>SmaI</i> . Ap ^r . Replicación "runaway" a 42°C.	Molina-López <i>et al.</i> , 1994

- pIZ253 Derivado de pJES382, al cual se le crearon por mutagénesis dirigida con oligonucleótidos las dianas *SmaI* y *BglII*, flanqueando al sitio de unión de IHF del promotor *nifH*. Ap^r. Molina-López *et al*, 1994
- pIZ254 Fragmento *EcoRI-BamHI* de 200 pb de pIZ253, que contiene el promotor de *nifH* con los sitios *SmaI* y *BglII*, clonado en pJES379, vector de alto número de copias, para fusiones traduccionales lacZ. Ap^r. Molina-López *et al*, 1994
- pIZ255 pIZ254 al cual se la ha delecionado el fragmento *SmaI-BglII* del promotor *nifH*, que contiene el sitio de unión de IHF. Molina-López *et al*, 1994
- pIZ256 Inserción de 4pb en la diana *BglII* del promotor de *nifH* en pIZ254, la inserción fue generada rellenando con la polimerasa Klenow los extremos de la diana. Ap^r. Molina-López *et al*, 1994
- pIZ257 Inserción de 10 pb en la diana *BglII* del promotor de *nifH* en pIZ254, la inserción fue generada rellenando con la polimerasa Klenow los extremos de la diana e insertando un fragmento de ADN de 6 pb que contiene la secuencia de la diana *HpaI*. Ap^r. Molina-López *et al*, 1994
- pIZ259 Inserción de 4pb en la diana *SmaI* del promotor de *nifH* en pIZ254, la inserción fue generada rellenando con la polimerasa Klenow los extremos cohesivos generados por *XmaI*. Ap^r. Molina-López *et al*, 1994
- pIZ260 Inserción de 10 pb en la diana *SmaI* del promotor *nifH* de pIZ254, la inserción fue generada rellenando con la polimerasa Klenow los extremos cohesivos generados por *XmaI*, e insertando un fragmento de ADN de 6 pb que contiene la secuencia de la diana *HpaI*. Ap^r. Molina-López *et al*, 1994
- pIZ261 Inserción de 6pb en la diana *BglII* del promotor de *nifH* de pIZ254, la inserción fue generada rellenando con la polimerasa Klenow los extremos de la diana *ClaI* que se genera en pIZ256 con el inserto de 4 pb. Ap^r. Molina-López *et al*, 1994

- pIZ262 Inserción de 6pb en la diana *Bgl*II y 4 pb en *Sma*I en el promotor de *nifH* de pIZ254, las inserciones fueron generadas rellenando con la polimerasa Klenow los extremos cohesivos generados por *Xma*I en pIZ261. Ap^r. Molina-López *et al*, 1994
- pIZ263 Fragmento *Eco*RI-*Bam*HI de 200 pb de pJES384, que contiene el promotor de *nifH*, clonado en pIZ237 (vector de una sola copia) digerido con *Eco*RI y *Bam*HI. Ap^r. Molina-López *et al*, 1994
- pIZ264 Fragmento *Eco*RI-*Bam*HI de 200 pb de pIZ254, que contiene el promotor de *nifH* con los sitios *Sma*I y *Bgl*II, clonado en pIZ237 (vector de una sola copia) digerido con *Eco*RI y *Bam*HI. Ap^r. Molina-López *et al*, 1994
- pIZ266 Fragmento *Eco*RI-*Bam*HI de 200 pb de pIZ256, que contiene el promotor de *nifH* con el sitio *Sma*I y una inserción de 6 pb en la diana *Bgl*II, clonado en pIZ237 (vector de una sola copia) digerido con *Eco*RI y *Bam*HI. Ap^r. Molina-López *et al*, 1994
- pIZ267 Fragmento *Eco*RI-*Bam*HI de 200 pb de pIZ257, que contiene el promotor de *nifH* con el sitio *Sma*I y una inserción de 10 pb en la diana *Bgl*II, clonado en pIZ237 (vector de una sola copia) digerido con *Eco*RI y *Bam*HI. Ap^r. Molina-López *et al*, 1994
- pIZ269 Fragmento *Eco*RI-*Bam*HI de 200 pb de pIZ259, que contiene el promotor de *nifH* con el sitio *Bgl*II y una inserción de 4 pb en la diana *Sma*I, clonado en pIZ237 (vector de una sola copia) digerido con *Eco*RI y *Bam*HI. Ap^r. Molina-López *et al*, 1994
- pIZ270 Fragmento *Eco*RI-*Bam*HI de 200 pb de pIZ260, que contiene el promotor de *nifH* con el sitio *Bgl*II y una inserción de 10 pb en la diana *Sma*I, clonado en pIZ237 (vector de una sola copia) digerido con *Eco*RI y *Bam*HI. Ap^r. Molina-López *et al*, 1994
- pIZ274 Sustitución del sitio de unión de IHF por una secuencia "A-tract₆" en el promotor *nifH* de pIZ254. A este plásmido le fue eliminado el sitio de unión por digestión doble *Sma*I-*Bgl*II. Ap^r. (ver su selección en Resultados 1.2.1.) Molina-López *et al*, 1994

- pIZ275 Fragmento *EcoRI-BamHI* de 200 pb de Molina-López *et al*, 1994
pIZ261, que contiene el promotor de *nifH* con el sitio *SmaI* y una inserción de 6 pb en la diana *BglII*, clonado en pIZ237 (vector de una sola copia) digerido con *EcoRI* y *BamHI*. Ap^r.
- pIZ276 Fragmento *EcoRI-BamHI* de 200 pb de Molina-López *et al*, 1994
pIZ262, que contiene el promotor de *nifH* con una inserción 4 pb en el sitio *SmaI* y otra de 6 pb en la diana *BglII*, clonado en pIZ237 (vector de una sola copia) digerido con *EcoRI* y *BamHI*. Ap^r.
- pIZ281 Sustitución del sitio de unión de IHF por dos secuencias "A-tract₆" en el promotor *nifH* de pIZ254. A este plásmido le fue eliminado el sitio de unión de IHF por digestión *SmaI-BglII*. Ap^r. (ver su selección en Resultados 1.2.1.)
- pIZ283 Sustitución del sitio de unión de IHF por dos secuencias "A-tract₆" en el promotor *nifH* de pIZ254. A este plásmido le fue eliminado el sitio de unión por digestión *SmaI-BglII*. Ap^r. (ver su selección en Resultados 1.2.1.)
- pIZ285 Inserción de 10 pb en la diana *SmaI* y 10 pb en *BglII* del promotor *nifH* de pIZ254, las inserciones fueron generadas relleno con la polimerasa Klenow los extremos cohesivos generados por *XmaI*, e insertando un fragmento de ADN de 6 pb que contiene la secuencia de la diana *HpaI*, en el plásmido pIZ257 el cual contiene el primer inserto. Ap^r. Este trabajo
- pIZ294 Fragmento *ScaI-SacI* de pIZ274, que contiene el promotor *nifH* sustituido en sitio de IHF por una secuencia "A-tract₆", clonado en pIZ237 (vector de una sola copia) digerido con *ScaI* y *SacI*. Ap^r. Molina-López *et al*, 1994
- pIZ297 Fragmento *ScaI-SacI* de pIZ281, que contiene el promotor *nifH* sustituido en sitio de IHF por dos secuencias "A-tract₆", clonado en pIZ237 (vector de una sola copia) digerido con *ScaI* y *SacI*. Ap^r. Molina-López *et al*, 1994
- pIZ298 Fragmento *ScaI-SacI* de pIZ283, que contiene el promotor *nifH* sustituido en sitio de IHF por dos secuencias "A-tract₆", clonado en pIZ237 (vector de una sola copia) digerido con *ScaI* y *SacI*. Ap^r. Molina-López *et al*, 1994

- pIZ400 Fragmento *ScaI-SacI* de pIZ254 ,que contiene el promotor *nifH*, con los sitios *SmaI* y *BglII*, clonado en pIZ237 (vector de una sola copia) digerido con *ScaI* y *SacI*. Se diferencia de pIZ264 en que no contiene la misma secuencia entre la resistencia a ampicilina y al promotor. Ap^r. Molina-López *et al*, 1994
- pIZ402 Inserción de 6 pb en la diana *SmaI* del promotor de *nifH* en pIZ254, la inserción fue generada clonando un fragmento de ADN de 6 pb que contiene la secuencia de la diana *HpaI* en pIZ254 digerido con *SmaI*. Ap^r. Molina-López *et al*, 1994
- pIZ403 Inserción de 6 pb en la diana *SmaI* y 4 pb en *BglII* del promotor de *nifH* de pIZ254, la inserción fue generada clonando un fragmento de ADN de 6 pb que contiene la secuencia de la diana *HpaI* en pIZ256 digerido con *SmaI*. Ap^r. Molina-López *et al*, 1994
- pIZ404 Fragmento *EcoRI-BamHI* de 200 pb de pIZ402, que contiene el promotor de *nifH* con el sitio *BglII* y una inserción de 6 pb en la diana *SmaI*, clonado en pIZ237 (vector de una sola copia) digerido con *EcoRI* y *BamHI*. Ap^r. Molina-López *et al*, 1994
- pIZ405 Fragmento *EcoRI-BamHI* de 200 pb de pIZ403, que contiene el promotor de *nifH* con una inserción de 6 pb en el sitio *SmaI* y otra de 4 pb en la diana *BglII*, clonado en pIZ237 (vector de una sola copia) digerido con *EcoRI* y *BamHI*. Ap^r. Molina-López *et al*, 1994
- pIZ406 Fragmento *EcoRI-BamHI* de 200 pb de pIZ285, que contiene el promotor de *nifH* con una inserción de 10 pb en el sitio *SmaI* y otra de 10 pb en la diana *BglII*, clonado en pIZ237 (vector de una sola copia) digerido con *EcoRI* y *BamHI*. Ap^r. Este trabajo
- pIZ411 MRE (sin sitio de unión para NIFA) clonado en la diana *XbaI* de pBend1, flanqueado por el MCS duplicado. Ap^r. Este trabajo
- pIZ411-NIFA Fragmento *EcoRI-SmaI* de 50 pb de pIZ254, que contiene el sitio de unión de NIFA, clonado en la diana *EcoRI* del MRE de pIZ411. Ap^r. Este trabajo

- pIZ412 MRE (sin sitio de unión para NIFA) Este trabajo clonado en la diana *Xba*I de pBend1, flanqueado por el MCS duplicado, y en orientación opuesta a pIZ413. Ap^r.
- pIZ412-NIFA Fragmento *Eco*RI-*Sma*I de 50 pb de Este trabajo pIZ254, que contiene el sitio de unión de NIFA, clonado en la diana *Eco*RI del MRE de pIZ412. Ap^r.
- pIZ413 Fragmento *Eco*RI-*Hind*III de 136 pb de Este trabajo pJES725 (plásmido cedido por Sydney Kustu) que contiene los sitios de unión de la ARN-polimerasa- σ^N del promotor *glnAp2* de *S. typhimurium*, clonado en la diana *Bgl*III del vector pIC552, que sitúa al promotor delante de la fusión *galK-lacZ*. Ap^r.
- pIZ425 Fragmento *Xho*I de pIZ411-NIFA, que Este trabajo contiene el MRE clonado en el sitio *Nco*I de pIZ413, situando al MRE en dirección en la que los sitios de unión de DCTD están más cerca del promotor *glnAp2*, a 124 pb corriente arriba. Ap^r.
- pIZ426 Fragmento *Spe*I de pIZ411-NIFA, que Este trabajo contiene el MRE clonado en el sitio *Nco*I de pIZ413, situando al MRE en dirección en la que los sitios de unión de DCTD están más cerca del promotor *glnAp2*, a 130 pb corriente arriba. Ap^r.
- pIZ427 Fragmento *Spe*I de pIZ412-NIFA, que Este trabajo contiene el MRE clonado en el sitio *Nco*I de pIZ413, situando al MRE en dirección en la que los sitios de unión de XYLR están más cerca del promotor *glnAp2*, a 130 pb corriente arriba. Ap^r.
- pIZ428 Fragmento *Xho*I de pIZ411-NIFA, que Este trabajo contiene el MRE clonado en el sitio *Xho*I de pIZ413, situando al MRE en dirección en la que los sitios de unión de DCTD están más cerca del promotor *glnAp2*, a unas 120 pb corriente abajo. Ap^r.
- pIZ429 Fragmento *Xho*I de pIZ412-NIFA, que Este trabajo contiene el MRE clonado en el sitio *Eco*RI de pIZ413, situando al MRE corriente arriba de Ω , a unas 2.3 Kb del promotor *glnAp2*. Ap^r.

- pIZ430 Plásmido productor de NIFA, expresado desde el promotor *lac*. A pIZ231 le fue reemplazado el fragmento *HindII-ClaI* que contiene el gen *dctD*-L64, por el fragmento *EcoRI-ClaI* de pJES292 que contiene el operón *nifLA*, obteniéndose una fusión *lac::nifLA*. A esta construcción se le delecionó el fragmento *SmaI-NaeI* de *nifL*. Cm^r. Este trabajo
- pIZ431 Fragmento *PvuII* de pL64 que contiene una fusión *lac::DctD*-L64 fue clonado en pACYC184 en *EcoRV*. A esta construcción se le reemplazó el fragmento *SacI-BamHI* por el de pIZ514 que contiene el gen *lacI^q*. Cm^r. Este trabajo
- pIZ432 Plásmido productor de DCTD, expresado desde el promotor *tac*. Fragmento *PvuII* de pL64 que contiene una fusión *lac::DctD*-L64 fue clonado en pACYC184 en *EcoRV*. A esta construcción se le reemplazó el fragmento *ScaI-EcoRI* por el de pIZ514 que contiene el gen *lacI^q*, y el promotor *tac*. Cm^r. Este trabajo
- pIZ433 Plásmido productor de DMPR, expresado desde el promotor *tac*. El fragmento *SalI* de 1Kb de pAW302 fue clonado en pVI465 digerido con *PvuII* para reemplazar la resistencia a ampicilina por una a cloranfenicol. Cm^r. Este trabajo
- pIZ514 Plásmido derivado de pACYC184 que contiene el extremo 3' del gen del ARNr 23S, expresado desde el promotor *tac* y el gen *lacI^q*. Cm^r. Govantes et al, 1998
- pJES292 Plásmido productor de NIFL y NIFA, contiene el operón *nifLA* expresado desde el promotor T7. Ap^r. Govantes et al, 1996
- pJES379 Derivado de pBR322, para fusiones traduccionales *lacZ*, contiene las dianas *EcoRI BamHI* y *SmaI* delante del gen. Ap^r. Santero et al, 1992
- pJES382 Derivado de pTZ18R, contiene el promotor de *nifH* de *K. pneumoniae*. Ap^r. Santero et al, 1992
- pJES384 Derivado de pBR322, contiene una fusión traduccional del promotor silvestre *nifH* y el gen *lacZ*. Ap^r. Santero et al, 1992
- pJES725 Fusión traduccional promotor *glnAp2* de *S. typhimurium* gen *lacZ*. Ap^r. Sydney Kustu

pL64	Derivado de pUC13, contiene el gen <i>dctD</i> - Gu <i>et al</i> , 1994 L64 bajo el promotor <i>lac</i> . Ap ^r .
pVI465	Plásmido productor de DMPR desde el Sze <i>et al</i> , 1996 promotor <i>tac</i> . Derivado de RSF1010. Ap ^r
pVTRXylR	Plásmido productor de XYLR desde el Pérez-Martín y de Lorenzo, 1996c promotor <i>trc</i> . Derivado de pSC101. Cm ^r .

3. Medios y condiciones de cultivo.

El medio de Luria y Bertani, abreviado LB (Maloy, 1991), se usó como medio completo. El agar se añadió a una concentración de 16 g/l para el medio sólido.

Como medios mínimos se usaron el medio K (Brill *et al*, 1974) y el medio M9 (Maniatis *et al*, 1989). Al medio K se añadió cuando fue necesario como fuentes de nitrógeno cloruro de amonio (2 g/l), arginina (2 g/l), y al medio M9, succinato 20 mM como fuente de carbono. El agar se añadió a una concentración de 16 g/l para el medio sólido.

Los cultivos se realizaron habitualmente a 30 ó 37°C con 3-5 ml de medio en tubos de cultivo con agitación suave, los cultivos de mayor volumen se realizaron en matraces Erlenmeyer cuya capacidad excedía en al menos tres veces el volumen de medio utilizado, con objeto de garantizar una correcta aireación.

Los cultivos anaeróbicos de *K. pneumoniae* se realizaron en tubos de policarbonato de 12 ml de capacidad con 10 ml de medio K sin nitrógeno añadido o con cloruro de amonio (2 g/l). Los tubos inoculados se taparon con tapones de goma herméticos y se burbujearon durante al menos 15' con nitrógeno gaseoso a través de agujas de 9 cm de longitud.

4. Antibióticos y otras adiciones.

En la Tabla 3 se detallan las concentraciones a las que se usaron los antibióticos y otros agentes químicos añadidos a los medios de cultivo (a menos que se indique lo contrario).

Tabla 3. Concentraciones de agentes selectivos y otros compuestos químicos.

Compuesto	Concentración en medio
Kanamicina	25 mg/l
Ampicilina	30-100 mg/l
Tetraciclina	5-15 mg/l
Cloranfenicol	5-15 mg/l
Estreptomicina	50 mg/l
X-Gal	25 mg/l

5. Conservación de las estirpes bacterianas.

Las estirpes bacterianas se conservaron a corto plazo a 4°C. en placas de LB sólido. Para su conservación a largo plazo se congelaron en LB líquido con glicerol al 15% (v/v) y se mantuvieron a -80°C.

6. Preparación de células competentes y transformación de *E. coli*.

Método 1. Para transformaciones en las que sólo se pretendía transferir un plásmido a una estirpe se prepararon células competentes según el método descrito por Chung *et al* (1989), con pequeñas variaciones:

Un cultivo saturado de la estirpe receptora se diluyó 100 veces en medio LB y se incubó a 30 ó 37°C con agitación hasta fase exponencial temprana. Se repartieron alícuotas de 1 ml en tubos eppendorf. Se enfriaron en hielo y se centrifugaron 30" en una

microcentrífuga. Se desechó el sobrenadante y se añadieron 75 μ l de LB frío. Se incubó en hielo 5'. Se añadieron 75 μ l de 2X TSS frío. Se incubó otros 5' en hielo. Para transformar las células competentes así preparadas se añadió una alícuota de una preparación del plásmido deseado y se incubó en hielo durante 30'. A continuación se realizó un choque térmico a 42°C durante 45". Se incubó 1' a temperatura ambiente y se añadió 1 ml de LB. Se incubó a 30 ó 37°C durante 60-90 min, se sembró en placas de medio selectivo y se incubó toda la noche a la misma temperatura.

La composición del 2X TSS es la siguiente (cantidades para 1 l): 8 g triptona, 5 g extracto de levadura, 5 g de NaCl, 200 g polietilenglicol 8000, 100 ml DMSO, 100 ml MgSO₄ 1M , pH entre 6.2 y 6.8.

Método 2. Para transformar con ligaciones se prepararon células competentes según una variante del método de Inoue et al (1990), con el cual se consigue una alta frecuencia de transformación (5×10^7 a 10^9 transformantes por μ g de ADN plasmídico):

Un cultivo saturado de la estirpe receptora (normalmente DH5 α) se diluyó 100 a 1000 veces en 200 ml de medio SOB y se incubó con agitación a 22°C hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ aproximada de 0.5. El cultivo se transfirió rápidamente a hielo, donde se incubó durante 10', se recogieron las células mediante centrifugación a 2500xg a 4°C durante 10 min. El sedimento se resuspendió en 20 ml de TB a 0°C, se añadieron otros 60 ml de TB frío y se incubó 10' en hielo. Se recogieron las células en las mismas condiciones y se resuspendieron en 20 ml de TB a 0°C. Se añadieron 1.5 ml de DMSO y, tras incubar 10' en hielo se hicieron alícuotas de 0.4 y 1 ml, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C. Las células así preparadas mantuvieron su competencia durante varios meses.

El protocolo de transformación es idéntico al descrito en el Método 1, excepto en que tras el choque térmico las mezclas de transformación se diluyeron en 1 ml de medio SOC.

Las soluciones y medios utilizados en este método son los siguientes (cantidades para 1 l):

Medio SOB: 20 g de Triptona, 5 g de extracto de levadura, 0.5 g de NaCl, 5 ml. KCl 250 mM. Ajustar pH a 7.0 con NaOH y autoclavar. Añadir posteriormente 5 ml de MgCl₂ 2M.

Medio SOC: 20 g de Triptona, 5 g de extracto de levadura, 0.5 g. NaCl, 5 ml de KCl 250 mM. Ajustar pH a 7.0 con NaOH y autoclavar. Añadir posteriormente 5 ml de MgCl₂ 2M y 7.2 ml. de glucosa al 50%.

TB: Pipes (ácido libre) 10 mM, CaCl₂ 15 mM, KCl 250 mM. Ajustar a pH 6.7 con KOH. Añadir MnCl₂ hasta 55 mM. Esterilizar por filtración.

7. Preparación de células electrocompetentes y electroporación de *E. coli* y *K. pneumoniae*.

Como alternativa a los métodos químicos de transformación se prepararon células electrocompetentes de *E. coli* y de *K. pneumoniae* mediante uno de los métodos descritos para *E. coli* por BTX, Inc.

Un cultivo saturado de la estirpe deseada se diluyó 100 o 200 veces en 500 ml de LB y se incubó con agitación a 30 ó 37°C hasta una D.O.₆₀₀ aproximada de 0.5. El cultivo se enfrió rápidamente colocándolo en hielo 10' y se recogieron las células mediante centrifugación a 4000xg a 4°C durante 15'. Se lavaron las células de forma sucesiva en 500 y 250 ml de agua bsdetilada a 0°C y después en 10 ml de glicerol al 25% (v/v) a 0°C. Finalmente las células se resuspendieron en 1.5 ml de glicerol al 25% (v/v) a 0°C, se repartieron en alícuotas de 40 µl, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C. Las células de *E. coli* preparadas con este método alcanzaron frecuencias de transformación superiores a los 10⁹ transformantes por µg de ADN plasmídico. No se ha determinado la frecuencia de transformación de las células electrocompetentes de *K. pneumoniae*.

La electrotransformación se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cada alícuota de células electrocompetentes se mezcló con 1 a 5 μ l de ADN o de mezcla de ligación (las mezclas de ligación se precipitaron, lavaron con etanol al 70% (v/v) y resuspendieron en agua para minimizar la concentración de sales), manteniéndola siempre en hielo. Las suspensiones se transfirieron a cubetas de electroporación con una abertura de 2 mm y se sometieron a una diferencia de potencial de 2.5 kV con una resistencia en paralelo de 129 ohmios en un electroporador BTX Electro cell manipulator[®] 600. Inmediatamente después del pulso, las células se diluyeron en 1 ml de medio SOC (ver más arriba), se incubaron durante 60 a 90' a 30 ó 37°C, se sembraron en medio selectivo y se incubaron toda la noche a la misma temperatura.

8. Movilización de marcadores cromosómicos por conjugación.

Para movilizar un plásmido o marcadores cromosómicos por conjugación se cultivaron donador y receptor en 3 ml LB hasta una D.O.₆₀₀ aproximada de 0.5, se mezclaron los cultivos en proporción 1:1, se centrifugó la mezcla y se resuspendió en 0.1 volúmenes de LB. Se sembraron alícuotas de 100 μ l en filtros Millipore colocados sobre cajas de LB y se incubaron durante 30' a temperatura ambiente. Seguidamente, se introdujeron los filtros en tubos de 10 ml a los que se añadió 1 ml de LB y se separaron las células de los filtros mediante agitación vigorosa en vórtex. Tras retirar los filtros, se sembró en medio selectivo en las diluciones apropiadas.

9. Preparación de ADN plasmídico a pequeña escala.

Método 1. Para la extracción de ADN plasmídico se siguió el protocolo de la lisis alcalina de Ish-Horovicz y Burke (1981), de la forma recogida por Sambrook et al (1989), con ligeras modificaciones. Habitualmente se realizaron minipreparaciones de

3 ml de cultivo en tubos eppendorf. Las células se recogieron tras dos centrifugaciones sucesivas en una microcentrífuga de sobremesa a 13000 rpm durante 30". El sedimento se resuspendió en 100 μ l de GTE (glucosa 50mM, EDTA 10 mM, Tris HCl 25 mM pH8) y se incubó 5' a temperatura ambiente. Se añadieron 200 μ l de solución 2 (NaOH 0.2 N, SDS 1%) y se incubó 5' en hielo. Se añadieron con 150 μ l de solución 3 (Acetato potasico 3M ajustado a pH 4.8 con ácido fórmico) y se incubó al menos 15' en hielo. Los restos celulares se sedimentaron por centrifugación durante 5' en microcentrífuga a 13000 rpm. El sobrenadante se transfirió a otro tubo Eppendorf, se extrajo con igual volumen de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1 v/v) y se precipitó con 2 a 2.5 volúmenes de etanol al 96%. Tras incubar 5' en hielo, se centrifugó 5' en microcentrífuga a 13000 rpm, se lavó el precipitado con 1 ml de etanol al 70%, se secó al vacío y se resuspendió en 20 a 50 ml de TER (Tris HCl 10 mM pH 8, EDTA 1mM, pH 8 con 20 mg/l ribonucleasa).

Método 2. Para preparar ADN plasmídico de DH5 α se siguió el protocolo simplificado de lisis alcalina descrito por Stephen et al (1990), que permite la obtención de ADN de calidad suficiente como para ser usado en secuenciación. Las células de 3 ml de cultivo se recogieron por centrifugación en microcentrífuga a 13000 rpm durante 20". Se resuspendieron en 100 μ l de GTE y se incubaron 5' a temperatura ambiente. Se añadieron 200 μ l de solución 2 y se incubó 5' en hielo. Se añadieron 150 μ l de solución 3 y, tras 5' en hielo, se sedimentaron los restos celulares por centrifugación 10' a 13000 rpm en microcentrífuga. El sobrenadante se transfirió a otro tubo, se añadió 1 volumen (450 μ l) de etanol al 96% a -20°C y se centrifugó inmediatamente 5' a 13000 rpm en microcentrífuga. El precipitado se lavó con 1 ml de etanol al 70% a -20°C, se secó al vacío y se resuspendió en 20 a 50 μ l de TER.

10. Preparación de ADN plasmídico a gran escala y purificación mediante ultracentrifugación en gradiente de cloruro de cesio.

Para obtener grandes cantidades de ADN plasmídico se utilizó un método de extracción a gran escala basado en la lisis alcalina seguido de purificación del ADN obtenido en gradiente de cloruro de cesio.

Las células de un cultivo de 1 l en LB con el antibiótico apropiado se recogieron mediante tres sucesivas centrifugaciones en botes de 500 ml a 9000xg 10' a temperatura ambiente. El sedimento se resuspendió en 20 ml de GTE y se incubó 10' a temperatura ambiente. Se añadieron 40 ml de Solución 2 y se incubó 10' en hielo. Se añadieron 30 ml de Solución III y se incubó al menos 15' en hielo. Los restos celulares se sedimentaron por centrifugación a 9000xg 10' a temperatura ambiente. El sobrenadante se transfirió a un bote de 250 ml, haciendolo pasar por 2 capas de gasa estéril. Se añadieron 0.6 volúmenes de isopropanol (2-propanol) y se dejó precipitar durante 15 min a temperatura ambiente. El precipitado se obtuvo por centrifugación a 15000xg 10 min a temperatura ambiente, se secó en una campana de flujo laminar, se resuspendió en 2.5 ml de TE y se transfirió a un tubo de polipropileno de 10 ml. La suspensión resultante se extrajo con 2.5 ml de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1 v/v), se centrifugó 4 min a 4000 rpm en centrífuga de sobremesa y se transfirió la fase acuosa a otro tubo de 10 ml. Se añadieron 250 µl de acetato sódico 3 M pH 5.2 y se precipitó con 7 ml de etanol al 96%. Inmediatamente se centrifugó 5' a 4000 rpm en centrífuga de sobremesa, se desecó el precipitado en una campana de flujo laminar y se resuspendió en 3.5 ml de TE. Se disolvieron 4.85 g de cloruro de cesio, se añadieron 470 µl de una solución de bromuro de etidio a 10 g/l y se añadió TE hasta 5.8 ml. Se centrifugó 5' a 4000 rpm en centrífuga de sobremesa para aclarar la suspensión, se comprobó que el sobrenadante tenía una densidad aproximada de 1.6 g/ml, se rellenó un tubo de ultracentrífuga Quick-seal® (Beckman) con el sobrenadante y se selló por calor. Los tubos sellados se ultracentrifugaron a 45000 rpm durante unas 15 h a 20°C en un

rotor Vti65 instalado en una ultracentrífuga Beckman. La parada de la ultracentrífuga se realizó sin freno. Se recuperó la banda densamente teñida, correspondiente al ADN plasmídico, con una aguja de 19", se le eliminó el bromuro de etidio extrayendo la suspensión al menos tres veces con n-butanol saturado con agua, se añadieron 3 volúmenes de TE y 9 volúmenes (de la solución original) de etanol al 96% y se dejó precipitar 30' en hielo. El precipitado se recuperó por centrifugación a 17000xg durante 15', se desecó en una campana de flujo laminar, se resuspendió en 400 μ l de agua y se transfirió a un tubo Eppendorf. A esta suspensión se le añadieron 45 μ l de acetato sódico 3 M pH 5.2 y 1 ml de etanol al 96%, se precipitó en hielo 5' y se centrifugó 10' en microcentrífuga a 13000 rpm. El precipitado se resuspendió en 408 μ l de agua, se añadieron 192 μ l de NaCl 2.5 M y 600 μ l de PEG 8000 al 13% y se dejó precipitar en hielo 30'. Se centrifugó 10' en microcentrífuga a 13000 rpm, se lavó 2 veces con etanol al 70% y se resuspendió en 250 μ l de TE. La concentración y pureza de la preparación se comprobó de forma rutinaria midiendo su absorbancia a las longitudes de onda 260 y 280 nm (Sambrook et al 1989).

11. Electroforesis convencional de ADN en gel de agarosa.

La electroforesis convencional en un gel de agarosa sumergido en tampón se empleó para comprobar la eficiencia de las extracciones de ADN, para determinar el perfil de bandas tras la digestión de plásmidos, para estimar la eficacia de la digestión con una endonucleasa etc. Normalmente se empleó agarosa de baja electroendoósmosis al 0.6-1.2% en tampón TAE 1x (Tris-ácido acético 40 mM, 10 mM EDTA, pH 7,7).

Como patrones de peso molecular, se emplearon digestiones de ADN del bacteriófago λ , digerido con *Hind*III y/o *Eco*RI o el marcador 1 kb ladder (BRL). Las muestras se mezclaron con 1/6 volumen de tampón de carga.

Para visualizar el patrón de bandas de ADN se añadió a los geles bromuro de etidio a una concentración final de 5 mg/l o bien, tras la electroforesis, los geles se tiñeron sumergiéndolos en una solución de bromuro de etidio a 5 mg/l. Los geles teñidos se iluminaron con un transluminador de radiación ultravioleta y se fotografiaron empleando una película instantánea Polaroid ISO 3000/36°.

12. Electroforesis de ADN en gel de poliacrilamida.

Para resolver fragmentos de ADN de bajo peso molecular (menores de 0.5 kb) se corrieron las muestras en geles verticales no desnaturizantes de poliacrilamida en TBE 0.5X (Tris-ácido bórico 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8). La concentración de acrilamida osciló entre el 5 y el 12% según el intervalo de tamaños que se deseaba cubrir. Como marcadores de peso molecular se utilizaron los fragmentos *Msp*I de pUC19 o bien el marcador comercial 1 kb ladder (BRL). Los geles corridos se tiñeron con una solución de bromuro de etidio a 5 mg/l.

13. Aislamiento y purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa y poliacrilamida.

Los fragmentos de ADN necesarios para realizar clonaciones se aislaron por uno de los dos métodos, en función de su tamaño.

Fragmentos menores de 0.5 kb. Se aislaron de geles de poliacrilamida y se purificaron por simple difusión a un tampón de elución (acetato amónico 0.5 M, EDTA 1 mM). El ADN eluido se precipitó con 1/2 V de acetato amónico 7.5 M y 2.5 V (del total) de etanol al 96% durante al menos 30' a -20°C ó -80°C, se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en el volumen deseado de TE.

Fragmentos mayores de 0.5 kb. Se aislaron de geles de agarosa y se purificaron mediante el kit GeneClean (Bio 101), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Cuando fue necesaria una alta cantidad de fragmentos de ADN, éstos se purificaron con membranas de DEAE-celulosa (S&S NA45) desde geles de agarosa (Maniatis et al, 19XX).

Las membranas fueron activadas sumergiendolas durante 5' en EDTA 10 mM, a continuación otros 5' en NaOH 0.5 M, y fueron lavadas 6 veces con agua bidestilada. Se pueden conservar activas durante varias semanas en agua bidestilada a 4°C.

Los fragmentos de ADN fueron separados en geles de agarosa con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio. La banda a aislar fue visualizada con una lampara de ultravioleta de onda larga. Se realizó una incisión justo debajo de la banda y se insertó una pieza de DEAE-celulosa activa. Se continuó la electroforesis hasta que el ADN esté unido a la membrana. Se retiró la membrana y fue lavada con 10 ml de Tris-Cl 50 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8 y NaCl 150 mM. La membrana fue transferida a un tubo Eppendorf y suficiente tampón (Tris-Cl 50 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8, NaCl 1 M) para cubrirla completamente. Se incubó durante 30' a 65°C, se pasó el eluido a un tubo nuevo Eppendorf, se extrajo con igual volumen de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1 v/v) y se precipitó con 1/2 V de acetato amónico 7.5 M y 2.5 V (del total) de etanol al 96% durante al menos 30' a -20°C ó -80°C. Se lavó con etanol al 70%, se secó al vacío y se resuspendió en el volumen deseado de TE.

14. Digestión, modificación y ligación de fragmentos de ADN.

Las endonucleasas de restricción empleadas fueron adquiridas a las compañías Boehringer Mannheim, New England Biolabs o Promega Biotec. En cada caso se siguieron las recomendaciones de los fabricantes y, cuando estuvo disponible, se empleó el tampón de restricción suministrado por la casa comercial junto con la enzima de restricción.

Los extremos de fragmentos de restricción se hicieron romos cuando fue necesario utilizando la ADN polimerasa de T4 para eliminar los extremos 5' colgantes o la ADN polimerasa de Klenow para rellenar los extremos 5' retrasados, siguiendo las instrucciones de los fabricantes (Boehringer Mannheim).

Las ligaciones se realizaron en tampón quinasa con ATP a una concentración final de 1 mM cuando los fragmentos a ligar tenían extremos cohesivos o de 0.1 mM cuando al menos uno de los extremos a ligar era romo. A cada reacción se añadió 1 unidad de ligasa (Boehringer Mannheim) y se incubó por lo general un mínimo de 12 horas a 16°C.

15. Secuenciación de ADN.

La secuenciación de ADN de doble cadena se hizo mediante el método de terminación con didesoxinucleótidos utilizando las soluciones del kit de la enzima Sequenase (USB). 9 μ l de ADN plasmídico preparado según el método de Stephen *et al* (1990) se desnaturalizaron durante 15' a 37°C en presencia de NaOH 0.2M. Esta solución (10 μ l) se neutralizó con 3 μ l acetato de sodio 3 M pH 5.2 y se precipitó el ADN con 75 μ l de etanol al 96% durante al menos 30' a -20°C. El precipitado se lavó dos veces con etanol al 70%, se resuspendió en 7 μ l de agua y se le añadió 1 μ l del cebador apropiado a 10 mM y 2 μ l de tampón de secuenciación. La hibridación con el cebador se llevó a cabo durante 30' a 37°C, al cabo de los cuales se añadieron 1 μ l de ditiotreitol 100 mM, 2 μ l de 1/5X Labeling mix (mezcla de marcaje diluida 5 veces en agua), 0.5 μ l de α [³⁵S] dATP a 10 mCi/ml y 2 μ l de 1/8X Sequenase (Sequenase diluída 8 veces en su tampón de dilución y pirofosfatasa diluída 15 veces) y se incubó 5'a temperatura ambiente. Esta reacción se detuvo mezclando 3.5 μ l de la mezcla de reacción con 2.5 μ l de cada una de las soluciones de didesoxinucleótidos precalentadas a 37°C e incubando 5' a 37°C. Finalmente, se añadieron 4 μ l de solución de paro y se enfriaron las reacciones en hielo o bien se congelaron a -20°C. Antes de cargarlas, se calentaron a 80°C durante 2' y se enfriaron en hielo. La electroforesis se corrió a en gel de TBE/acrilamida 6%-urea 8 M

a 80 W durante el tiempo necesario (1-4 h). El gel se secó en un secador de geles DrygelSr SE1160 (Hoeffer) y se detectó la marca radiactiva tras su exposición a una película de rayos X.

16. Ensayos de actividad β -galactosidasa.

Los ensayos de la actividad β -galactosidasa de las fusiones construidas en este trabajo se realizaron según el método de Miller (1992) con algunas modificaciones. Un volumen apropiado de cultivo (5-200 μ l) se añadió a una mezcla de tampón Z con 15 μ l de SDS 0.1% y 30 μ l de cloroformo, para completar un volumen final de 800 μ l. Las células se permeabilizaron por agitación en vórtex y el lisado se preincubó unos minutos a 30°C, se le añadieron 200 μ l de solución de o-nitrofenil galactopiranosido (4 mg/l en tampón Z). Se prosiguió la incubación hasta que se observó un color amarillo en las muestras y se detuvo la reacción añadiendo 500 μ l de Na₂CO₃ 1M y colocando en hielo. Tras centrifugar 15' a temperatura ambiente en microcentrífuga se registró la A₄₂₀ del sobrenadante. La actividad se calculó según la fórmula

$$\text{Actividad} = \frac{A_{420}}{V \times \text{D.O.}_{600} \times t} \times 1000$$

A₄₂₀= Absorbancia de la reacción a $\lambda=420$ nm.

V= volumen de cultivo en la reacción (ml).

D.O.₆₀₀= Densidad óptica del cultivo a $\lambda= 600$ nm.

t= tiempo de reacción (minutos)

Tampón Z: 4.27 g Na₂HPO₄; 2,75 g NaH₂PO₄H₂O; 0.375 g KCl; 0.125 g MgSO₄•7H₂O. Agua hasta 500 ml. Antes de usar, añadir 2.7 ml β -mercaptoetanol por litro de tampón Z.

17. Mutagénesis dirigida.

La mutagénesis dirigida con oligonucleótidos se realizó según está descrito (Kunkel, 1985). Los oligonucleótidos se adquirieron de Boehringer Mannheim. Primeramente se clonaron los fragmentos a mutagenizar en un plásmido con el origen de replicación *f1* de M13. Estos plásmidos se transformaron en CJ236. Esta estirpe lleva las mutaciones *ung* y *dut*, que hacen que incorpore con cierta frecuencia uracilo al ADN en lugar de timina. Los transformantes se infectaron con el fago ayudador M13 K07 para inducir la síntesis y encapsidamiento del plásmido en cadena sencilla. Se recuperó el sobrenadante del cultivo y se le extrajo el ADN. Estos ADNs de cadena sencilla se hibridaron con los oligonucleótidos con las mutaciones deseadas, se sintetizó la cadena complementaria con la ADN polimerasa de T4 y se ligó con ligasa de T4. Con la mezcla de reacción se transformó *E. coli* DH5 α . La presencia de uracilos en la cadena sintetizada en CJ236 hace que esta cadena se pierda en un alto porcentaje de casos, fijándose así las mutaciones presentes en la cadena sintetizada *in vitro*. Todas las construcciones hechas por este procedimiento se secuenciaron para garantizar la presencia de las mutaciones y la ausencia de otras mutaciones no deseadas.

18. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

La reacción de PCR para amplificar fragmentos con secuencias "A-tracts" constó de 35 ciclos de 1' a 95°C, 1' a 65°C y 30'' a 72°C. La reacción se realizó en un volumen total de 50 μ l, ésta contenía unos 50 pmol cada oligonucleótido, de 0.1 a 0.2 ng del plásmido, los dNTP a una concentración 0.2 mM, 2.5 unidades de Taq-ADNpolimerasa (Boehringer Mannheim), 1.5 mM de Mg²⁺ y el tampón que proporciona la marca comercial.

Para la construcción del fragmento de ADN con el MRE, se utilizó el método de PCR recurrente descrito por Prodromou y Pearl (1992) con pequeñas modificaciones. La síntesis se realizó con cuatro oligonucleótidos solapantes que contiene la secuencia que se quiere crear; esta síntesis se realizó en una sola reacción de PCR que constó de 30 ciclos de 90'' a 95°C, 2' a 56°C y 3' a 72°C,

con una incubación final de 10' a 72°C. La reacción contenía 50 pmol de cada oligonucleótido externo, 0.5 pmol de los internos, 2.5 unidades de Taq-ADNpolimerasa (Boehringer Mannheim), 1.5 mM de Mg²⁺ y el tampón que proporciona la marca comercial.

19. Preparación de ARN a pequeña escala.

Las extracciones de ARN se realizan por el método del fenol/isocianato de guanidio caliente con algunas modificaciones (Marqués *et al.*, 1993). Para la extracción se partió de 10 ml de cultivo en fase exponencial de crecimiento. Las células se recogieron por centrifugación en un tubo de polipropileno y se congelaron en nitrógeno líquido. Las células congeladas fueron resuspendidas en 0.3 ml de solución de lisis previamente calentada a 65°C (isocianato de guanidio 4 M, β-mercaptoetanol 1% v/v, citrato sódico 25 mM pH 7 y N-laurylsarcosina 0.5 % w/v). Las células resuspendidas fueron agitadas fuertemente con un vortex durante 1' e incubadas posteriormente durante 10' a 60°C. Entonces se pasaron a tubos Eppendorf de 2 ml y se le añadió 0.3 ml de cloroformo a cada muestra, fueron agitadas con un vortex y se recogió la fase acuosa tras una centrifugación de 10' en microcentrífuga a 10000 rpm. A esta fase acuosa se le añadió 0.66 ml de isopropanol y se mantuvo a -20°C durante 15'. Después de este tiempo se centrifugó 15' en microcentrífuga a 10000 rpm y se lavó el sedimento con etanol al 70%, entonces se secó el sedimento a temperatura ambiente y se resuspendió en 75 µl de agua bidestilada. Seguidamente se incubó durante 1 hora a 37°C con la solución de tratamiento con DNAsaI, compuesta por lo siguiente: 21.5 µl de agua bidestilada, 1 µl de ditiotreitol 0.1 M, 1 µl de cloruro magnésico 1 M, 20 unidades de inhibidor de ARNasas (RNAsin de Boehringer Mannheim) y 2 unidades de DNAsaI libre de ARNasa (Boehringer Mannheim). Tras este tratamiento se volvió a incubar durante una hora a 37°C con la solución de tratamiento con proteinasa K, compuesta por lo siguiente: 100 µl de agua Tris 0.2 M pH 7 / NaCl 0.1 M, 4 µl de SDS al 10%, 4 µl de EDTA 0.5 M y 4 µl de proteinasa K libre de ARNasa (Boehringer Mannheim). Después se extrajo con igual volumen de

fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1 v/v) y a continuación con cloroformo-isoamílico (24:1 v/v), se precipitó con 1/10 V de acetato sódico 3 M pH 4.8 y 2.5 V (del total) de etanol al 96% durante al menos 30' a -80°C. Se lavó con etanol al 70%, se secó al vacío y se resuspendió resuspendió en un volumen de 20-30 µl de agua bidestilada. Estas preparaciones de ARN fueron conservadas a -80°C. La concentración y pureza de las preparaciones de ARN se determinó por la absorbancia a 260 nm y a 280 nm.

20. Determinación del extremo 5' de ARN mensajeros.

La determinación del extremo 5' de los transcritos se realizó por transcripción reversa, como se describe en Marqués *et al* (1993) con algunas modificaciones.

a. Marcaje de los cebadores con $\gamma[^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Los cebadores fueron marcados en su extremo 5' con $\gamma[^{32}\text{P}]\text{ATP}$ por acción de la polinucleótido kinasa de T4 (Boehringer Mannheim). Las reacciones de fosforilación se realizaron en un volumen de 10 µl que contenía 20 pmol del oligonucleótido, XXX de $\gamma[^{32}\text{P}]\text{ATP}$, una unidad de polinucleótido kinasa de T4 y el tampón que proporciona la firma comercial. tras una incubación de una hora a 37°C fueron filtrados en una columna de Sephadex G25 para eliminar los nucleótidos no unidos.

b. Hibridación del cebador con el ARN. La hibridación se realizó en un volumen total de 10 µl que contenía 5-10 µg de ARN total y el cebador marcado (mínimo 10^5 cpm), en un tampón 0.4 M de NaCl, 10 mM de PIPES pH 6.4. Se incubó 5' a 85°C, se pasó a 65°C y se dejó bajar la temperatura de forma pasiva hasta 42-44°C.

c. Reacción de extensión de la transcriptasa reversa. A cada muestra de 10 µl de ARN con el cebador marcado, se le añadió 40 µl de una mezcla de extensión precalentada a 42°C, con la siguiente composición: 2.5 mM de cada dNTP, 20 unidades de inhibidor de ARNasas (RNAsin de Boehringer Mannheim), 7

unidades de transcriptasa reversa (AMV RTranscriptase de Boehringer Mannheim) y tampón proporcionado por la marca comercial. La muestra con la mezcla de extensión se incubó durante una hora a 42°C. Cada muestra fue entonces precipitada añadiéndole 5 µl de acetato sódico 3 M pH 4.8 y 150 ml de etanol al 96% durante toda la noche -20°C. Se lavó con etanol al 70%, se secó y se resuspendió en un volumen de 3 µl de agua bidestilada.

d. Análisis en gel de secuenciación. Se realizaron reacciones de secuenciación de los plásmidos productores de los transcritos, con el mismo cebador que se utilizó para las reacciones de transcriptasa reversa. Esta secuenciación se realizó con el protocolo previamente descrito en este capítulo de la tesis, salvo que al utilizar el cebador ya marcado, se obvió en este protocolo la mezcla de marcaje y el α [³⁵S]dATP. Las muestras obtenidas en las reacciones de transcriptasa reversa se le añadieron 3 µl de solución de paro de secuenciación y se cargaron en el gel con las reacciones de secuenciación. Las bandas obtenidas por los distintos transcritos fueron cuantificadas en un analizador FUJIX de radiación β .

RESULTADOS

1. Geometría del inicio de la transcripción del promotor *nifH* de *Klebsiella pneumoniae*.

La región promotora del operón *nifHDK* de *K. pneumoniae*, contiene los sitios de unión para tres factores, la ARN-polimerasa- σ^N , el activador NIFA y para la proteína IHF. Este último elemento está localizado entre los otros dos, más cerca del sitio de la ARN-polimerasa que del sitio de NifA. La unión de IHF genera una estructura asimétrica en forma de "V", con un brazo corto de 32 pb hasta el sitio de la ARN-polimerasa y un brazo largo de 77 pb hasta el sitio de NifA. Las longitudes de los brazos son la distancia entre el centro del sitio de unión de IHF y el centro del sitio de unión de los otros factores.

Este promotor presenta la característica de poseer un sitio débil de unión para la ARN-polimerasa, hecho que le hace muy dependiente de la proteína IHF (Hoover *et al*, 1990), estimula la transcripción unas 20 veces (Santero *et al*, 1992). La función general que se ha asignado a IHF en la multitud de procesos en los que interviene, parece indicar que esta proteína podría estar facilitando el contacto de NIFA con la ARNpolimerasa, gracias a la formación del doblez que induce al unirse al ADN. De esta forma estaría compensando la baja afinidad de la ARN-polimerasa por su sitio de unión en este promotor.

El objetivo de este capítulo de la tesis, es conocer que restricciones posicionales que puede imponer IHF a los otros dos elementos del promotor, ya que la formación de un doblez por parte de IHF complicaría la geometría del proceso de activación. Por otra parte también queremos comprobar si la función de IHF en este promotor se limita a un papel estructural, derivado de su capacidad de doblar el ADN.

1.1. Alteración de la posición relativa entre los tres elementos del promotor *nifH* de *Klebsiella pneumoniae*.

La flexibilidad en el posicionamiento de los sitios de unión de NTRC en el promotor *glnA* de *E.coli*, para que desde ellos se pueda

activar la transcripción, contrasta con la restricción en el posicionamiento del sitio de unión de NIFA en el promotor *nifH*. A diferencia de NTRC, NIFA no es capaz de activar la transcripción desde el promotor *nifH*, cuando su sitio de unión está localizado corriente abajo del punto de inicio de la transcripción (Buck *et al*, 1987) y sus niveles de activación bajan 10 veces cuando se localiza a 1 Kb corriente arriba (Buck *et al*, 1986). Queremos conocer el efecto que tendrían sobre la funcionalidad de este promotor, alteraciones en las posiciones relativas entre cada uno de sus elementos. Para ello hemos generado inserciones entre cada uno de los sitios de unión, que alteran la fase relativa de la vuelta de la hélice entre ellos.

1.1.1. Construcción de variantes posicionales del promotor *nifH* de *K. pneumoniae*.

Para poder manipular este promotor, necesitamos crear dos sitios de restricción flanqueando al sitio de unión de IHF. Se ha elegido una diana *SmaI* en el brazo largo (entre los sitios de IHF y NIFA) y una diana *BglII* en el brazo corto (entre los sitios de IHF y la ARN-polimerasa). Estas dianas se generaron por mutagénesis dirigida con oligonucleótidos, en las posiciones -115 y -31 respecto al punto de inicio de la transcripción. Los oligonucleótidos empleados son : 5'-CACATTTGGTCCCGGGA-TTGTGCCGT-3' para la diana *SmaI* y 5'-ATAAACAGGCAGATCTGG-TATGTTCC-3' para la diana *BglII*. Una vez comprobada la mutagénesis por secuenciación, la región promotora *nifH* silvestre presente en el vector de fusión traduccional *lacZ* de alto número de copias pJES384, fue remplazada por la obtenida de las mutagénesis dirigida, generandose el plásmido pIZ254.

A partir de pIZ254 fue construida una batería de versiones posicionales del promotor de *nifH* (Tabla 4), inserciones de 4 pb, 6 pb y 10 pb en la diana *SmaI*, dieron lugar los plásmidos pIZ259, pIZ402 y pIZ260 respectivamente; de igual forma, inserciones en la diana *BglII* dieron lugar a pIZ256 (4 pb), pIZ261 (6 pb) y pIZ257 (10 pb). También se obtuvieron inserciones dobles, pIZ262 (4pb en *SmaI* y 6pb en *BglII*), pIZ403 (6pb en *SmaI* y 4pb en *BglII*) y

pIZ285 (10 pb en *Sma*I y 10pb en *Bgl*II). Todas estas regiones promotoras fueron transferidas posteriormente a un vector de fusión traduccional pIZ237, presente en la célula en una sola copia por cromosoma.

Plásmido	Número de copias	Estructura del promotor
pIZ254 pIZ264	Alto 1	
pIZ256 pIZ266	Alto 1	
pIZ261 pIZ275	Alto 1	
pIZ259 pIZ269	Alto 1	
pIZ402 pIZ404	Alto 1	
pIZ262 pIZ276	Alto 1	
pIZ403 pIZ405	Alto 1	
pIZ260 pIZ270	Alto 1	
pIZ257 pIZ267	Alto 1	
pIZ285 pIZ406	Alto 1	

Tabla 4. Variantes posicionales del promotor *nifH* de *K. pneumoniae*. La estructura del promotor nos indica las diferentes inserciones que fueron realizadas, y los cambios que éstas provocan en la orientación de NIFA y la ARNpolimerasa respecto del sitio de unión de IHF.

1.1.2. Ensayo de actividad de las distintas versiones posicionales

El efecto de los cambios de fase de la vuelta de la hélice en promotor *nifH* se determinó a partir de la actividad β -galactosidasa de las fusiones *nifH::lacZ* en copia simple. Estas fusiones fueron ensayadas en *K. pneumoniae* (su organismo natural) y en *E. coli* (donde podemos estimar la estimulación por IHF). Los ensayos en VJSK014 (*K. pneumoniae* comúnmente usada como silvestre) con las distintas versiones posicionales, fueron realizados tras la incubación de 16 a 20 horas a 30°C en condiciones de anaerobiosis en medio KN y en medio K con 2 g/l de arginina, ambos medios conteniendo 50 mg/l de ampicilina. La D.O.₆₀₀ de los cultivos era de 0.4 a 0.6 en el momento del ensayo.

Las estirpes de *E. coli* utilizadas en los ensayos son ET8000 y su isogénica IHF⁻ (SE1000), ambas estirpes con el plásmido productor de NIFA pIZ203. Este plásmido contiene el operón *nifLA* de *K. pneumoniae* con una delección interna de 120pb que inutiliza al represor NIFL. El operón se transcribe en condiciones de baja concentración de nitrógeno. Ambas estirpes fueron ensayadas en las mismas condiciones de cultivo que *K. pneumoniae*, pero en aerobiosis y las concentraciones de antibióticos utilizadas fueron de 30 mg/l de ampicilina y 5 mg/l de tetraciclina.

Los resultados obtenidos de estos ensayos, están representados en la tabla 5. Los datos obtenidos en condiciones de represión (medio KN) no se incluyen en la tabla, pero no superan las 10 unidades Miller. En este vector de bajo número de copias, se comprobó que las dianas creadas (*Sma*I y *Bgl*II) no afectan a la eficiencia del promotor (Tabla 5).

Inserciones de 10 pb, cercanas a una vuelta de hélice completa (pIZ267, pIZ270 y pIZ406), no tienen demasiado efecto sobre la actividad de este promotor, lo que nos indica que este promotor soporta pequeños aumentos en la distancia entre los sitios de unión. Sin embargo, todas las inserciones de 4 o 6 pb reducen drásticamente los niveles de expresión del promotor. Esto nos muestra la importancia de la fase de la vuelta de la hélice en este proceso de activación. Inserciones de 4 o 6 pb en el brazo largo

(pIZ269 y pIZ404), tienen menos efecto en la reducción de la actividad que las inserciones equivalentes en el brazo corto (pIZ266 y pIZ275), y las inserciones de 6 pb tienen un efecto más drástico (10 veces) que las de 4 pb. En estos casos de variaciones en media vuelta de hélice, IHF tiene un efecto muy suave y en algún caso inhibitorio sobre la expresión. El último dato importante sobre la orientación de los distintos elementos de esta región promotora en el proceso de activación, nos lo da las inserciones dobles de 4 y 6pb (pIZ276 y pIZ405). En estos casos la orientación de los sitios de NIFA y la ARN-polimerasa estarían en posición correcta, pero IHF induciría un dobléz en sentido opuesto. Como puede verse, IHF tiene incluso un efecto inhibitorio en estos promotores, poniendo de manifiesto la importancia de la orientación del dobléz inducido por IHF.

Plásmido	VJSK014	ET8000/ pIZ203	SE1000/ pIZ203
pIZ263 (silvestre) ^a	25210	14951	239
pIZ264 (ØS, ØB)	25480	16872	433
pIZ266 (ØS, 4B)	501	549	180
pIZ269 (4S, ØB)	1272	2405	124
pIZ275 (ØS, 6B)	36	45	76
pIZ404 (6S, ØB)	133	140	88
pIZ405 (6S, 4B)	32	26	50
pIZ276 (4S, 6B)	18	35	62
pIZ267 (ØS, 10B)	18865	11194	315
pIZ270 (10S, ØB)	12267	11940	185
pIZ270 (10S, 10B)	9004	7788	56

Tabla 5. Niveles de expresión de las versiones posicionales del promotor *nifH* de *K. pneumoniae*. ^a Entre paréntesis se indica el número de pares de bases que fueron insertadas en la diana *Sma*I (S) y en la diana *Bgl*III (B). Los valores de actividad β -galactosidasa están expresados en unidades Miller, y son la media de 4 ensayos de cultivos independientes.

1.2. Reemplazamiento funcional del sitio de unión de IHF

Como hemos comentado en la introducción, IHF está involucrado en multitud de procesos, y la función asignada a esta

proteína es estructural, derivada de la capacidad de ésta de doblar el ADN. Es lógico pensar que en este promotor, el papel de IHF se limitaría a proporcionar al proceso la geometría adecuada para que se lleve cabo. Sin embargo, se ha sugerido una posible interacción entre IHF y la ARN-polimerasa en el promotor pL del fago λ , basado en el requerimiento de un contacto en el sitio I de la subunidad α de la ARN-polimerasa, para ser activado por IHF (Giladi et al, 1992). Aunque la interacción con el sitio I de la subunidad α de la ARN-polimerasa no parece ser necesaria en la activación del promotor *nifH* de *K. pneumoniae* (Lee et al, 1993), este hecho y la cercanía de IHF a la ARN-polimerasa en el promotor, hace dudar de que el papel de IHF se limite a su capacidad de doblar el ADN.

Con objeto de comprobar que el papel de IHF es meramente estructural, quisimos reemplazar el sitio de unión de IHF por otro elemento que proporcione un doblar en el ADN. No elegimos para la sustitución el sitio de unión de otra proteína capaz de doblar el ADN, para evitar la duda de que el efecto sobre la transcripción se deba a una posible interacción de la proteína con la ARN-polimerasa, y no al doblar inducido. Elegimos entonces para la sustitución del sitio de unión de IHF un fragmento de ADN intrínsecamente doblado, secuencias con repeticiones de varias adeninas consecutivas ("A-tracts"), que forman un doblar estático (Koo y Crothers, 1988).

1.2.1. Estrategia de aislamiento de promotores artificiales *nifH*, que contienen un fragmento de ADN intrínsecamente doblado.

Si la función de IHF en el promotor es la de doblar el ADN, podríamos obtener un promotor artificial y funcional, sustituyendo el sitio de unión por un fragmento de ADN intrínsecamente doblado. El fragmento elegido es una secuencia de 6 repeticiones en fase de 6 adeninas 5'-[GGGC(A)₆CGGC(A)₆C]₃-3' (Atract₆). Este fragmento fue utilizado con éxito para sustituir uno de los sitios de unión de IHF en *attP*, involucrado en la recombinación del fago λ (Goodman y Nash 1989).

La estrategia general de selección del promotorers artificiales funcionales está representada en la figura 8. El fragmento con el "Atract₆" está contenido en el plásmido pHN1036, entre una secuencia duplicada, que contiene 8 dianas de restricción consecutivas. Se aisló una mezcla de fragmentos que contenían todas las variantes posibles por digestión de dos enzimas de la secuencia duplicada. De esta forma se pueden obtener variantes en el tamaño de las secuencias flanqueantes al "A-tract₆", que daran lugar a variantes posicionales de este ADN doblado con respecto a los sitios de unión de la ARN-polimerasa y NIFA, al reemplazar al sitio de IHF.

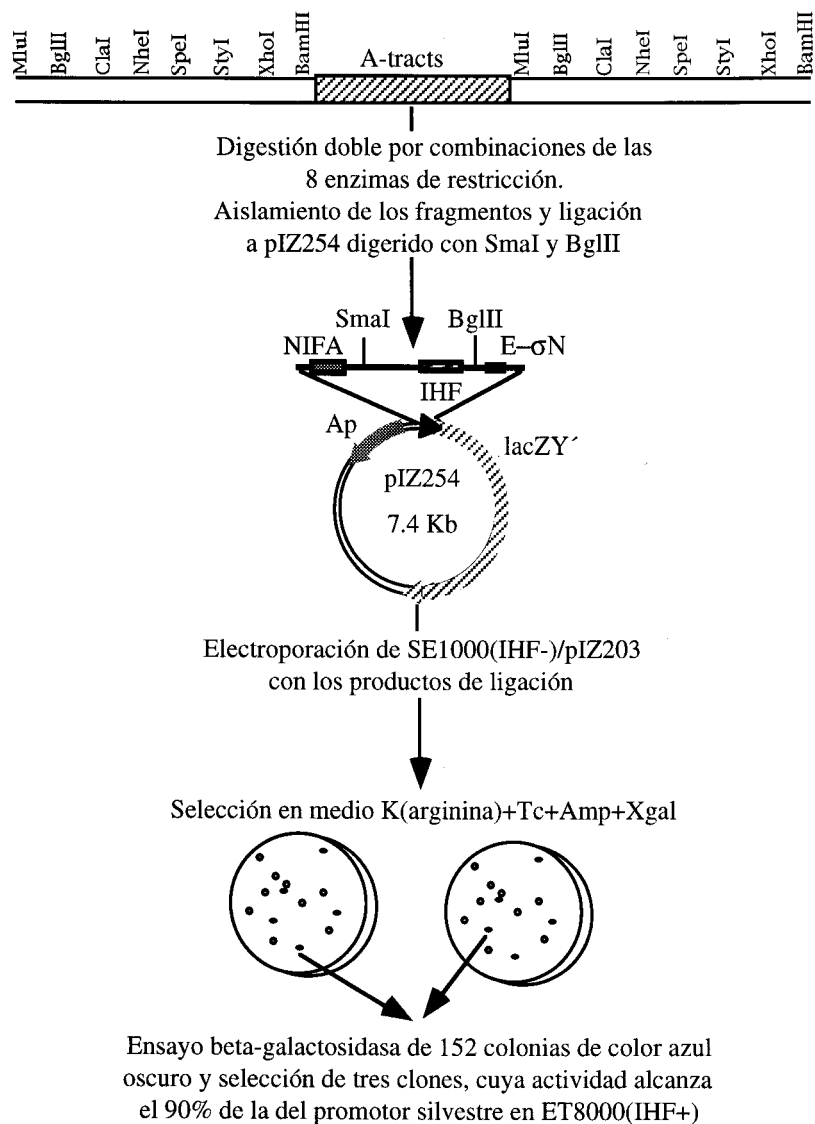


Figura 8. Representación esquemática de la estrategia de aislamiento de los promotores artificiales, en los cuales se ha sustituido el módulo de IHF por un fragmento de ADN intrínsecamente doblado.

La mezcla de fragmentos obtenida por la doble digestión de pHN1036, fue ligada a pIZ254, al que previamente se le había eliminado el fragmento *SmaI-BglIII* que contiene el sitio de unión de IHF. Este producto de ligación fué transformado por electroporación en SE1000/pIZ203, y después sembrado en placas de medio K sólido con 2 g/l de arginina y 25 mg/l de X-gal. Se obtuvieron unos 10^5 colonias transformantes, de las cuales, aproximadamente un 25% eran azules. Se seleccionaron 152 colonias azul oscuro, a las cuales se les midió la actividad β -galactosidasa, obteniendo entre el 10 al 100% de la actividad del promotor silvestre (pIZ254).

1.2.2. Expresión de los promotores *nifH* artificiales.

Entre estos 152 transformantes fueron seleccionados tres (pIZ274, pIZ281 y pIZ283), cuyo nivel de actividad β -galactosidasa era superior al 90% de la actividad obtenida por el promotor silvestre. Estos fueron ensayados en las dos estirpes de *E. coli* ET8000 y SE1000, de igual forma que las versiones con cambios en la vuelta de hélice (ver resultados 1.1.2), y se comprobó que esta actividad promotora respondía a las condiciones de limitación de nitrógeno, pero era independiente de la presencia de IHF (Tabla 6). Estas tres construcciones conjuntamente con el promotor silvestre (pIZ254), fueron transferidas al vector de una sola copia (pIZ237). Se obtuvo pIZ400 a partir de pIZ254, pIZ294 de pIZ274, pIZ297 de pIZ281 y pIZ298 de pIZ283.

Plásmido	ET8000/pIZ203		SE1000/pIZ203	
	Amonio	Arginina	Amonio	Arginina
pIZ254	13	30517 (100) ^a	36	2748 (9)
pIZ274	3	22015 (72)	6	28449 (93)
pIZ280	112	29282 (96)	154	31984 (105)
pIZ283	173	24684 (81)	254	29005 (95)

Tabla 6. Expresión de los promotores artificiales en el vector de alto número de copias. ^a Porcentaje de la actividad respecto a pIZ254 en la estirpe IHF⁺ en condiciones de inducción. La actividad β -galactosidasa está expresada en unidades Miller y son la media de 4 ensayos de cultivos independientes.

Los ensayos de actividad β -galactosidasa con los plásmidos de una sola copia se realizaron de igual forma, pero esta vez en fase exponencial del cultivo ($DO_{600}=0.4-0.6$) y en fase estacionaria. Como se observa en la tabla 7, la eficiencia relativa de estos promotores artificiales se reduce sorprendentemente en vectores de copia simple. En fase exponencial, oscila entre el 27 y el 47% de la obtenida en el promotor silvestre. Sin embargo, este porcentaje mejora en fase estacionaria alcanzando un 71% en pIZ297. Los niveles obtenidos en la estirpe IHF⁻ (SE1000), fueron similares a los obtenidos con ET8000 en fase exponencial, y un poco más altos en fase estacionaria. Los resultados obtenidos en SE1000 nos dan el nivel de inducción proporcionado por estos fragmentos de ADN doblado. Tanto en vectores multicopia (Tabla 6), como de copia simple en la diferentes fases de crecimiento (Tabla 7), se obtiene un grado de estimulación similar, que oscila entre 10 y 16 veces.

Plásmido	Fase exponencial		Fase estacionaria	
	ET8000/pIZ203	SE1000/pIZ203	ET8000/pIZ203	SE1000/pIZ203
pIZ400	14685 (100) ^a	335	19484 (100)	984
pIZ294	3950 (27)	3688	10405 (53)	10900
pIZ297	6847 (47)	5513	13877 (71)	16388
pIZ298	4633 (32)	4105	9523 (49)	12146

Tabla 7. Expresión de los promotores artificiales en vector de copia simple. ^aPorcentaje de la actividad respecto a pIZ400 en la estirpe IHF⁺ en condiciones de inducción. La actividad β -galactosidasa está expresada en unidades Miller y son la media de 4 ensayos de cultivos independientes. Los ensayos en medio KN (no inducción) no están representados en la tabla, ninguno de estos cultivos superaba las 20 unidades Miller.

Existe una diferencia significativa entre los niveles relativos obtenidos entre el promotor silvestre y los promotores artificiales, dependiendo de la fase de crecimiento en que se encuentren. Este hecho nos dificulta evaluar la eficiencia de estos promotores artificiales. Al desconocer la causa de esta diferencia, decidimos hacer una cinética de inducción a largo tiempo, con el promotor silvestre y el híbrido más eficiente (figura 9). La cinética de inducción se realizó con los plásmidos pIZ400 y pIZ297 en las estirpes de *E. coli* ET8000 y SE1000, con el plásmido productor de

NIFA (pIZ203). Se crecieron los cultivos en medio KN hasta una $DO_{600}=0.2$, entonces fueron lavados y resuspendidos en medio inductor (K con 2 g/l de arginina).

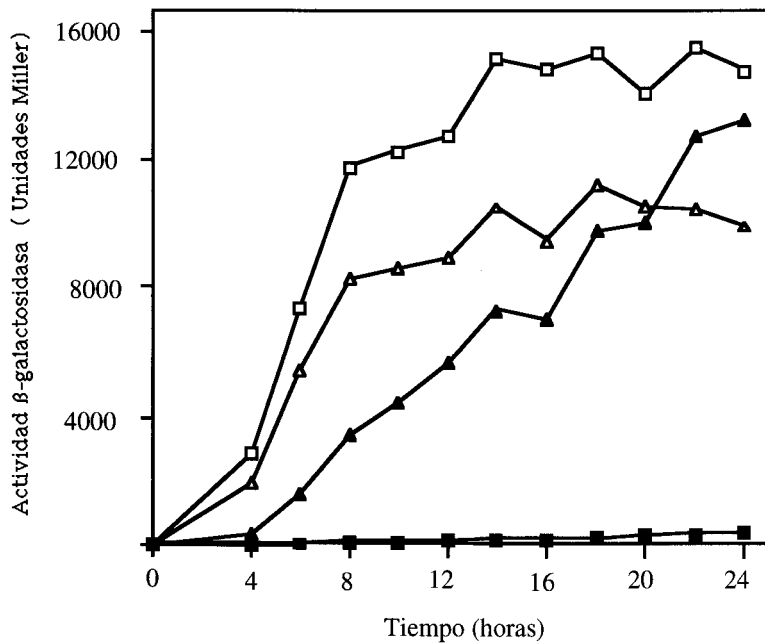


Figura 9. Cinética de inducción del promotor artificial pIZ297 (triángulos) y el silvestre pIZ400 (cuadrados), en ET8000 (símbolos blancos) y su isogénica IHF⁻ SE1000 (símbolos negros).

En la estirpe IHF⁺, ambos promotores responden de forma similar a la limitación de nitrógeno, alcanzándose el máximo de actividad a 14 horas de inducción. Curiosamente no se observa la diferencia en la eficiencia relativa de los promotores entre las distintas fases de crecimiento, observada en los ensayos anteriores, ya que los niveles de actividad del promotor artificial durante toda la cinética de inducción, oscilan alrededor de un 70% de los niveles del silvestre. Por otra parte, la cinética de inducción del promotor artificial en la estirpe IHF⁻ es diferente a la observada en la estirpe silvestre, ya que la actividad no se estabiliza en 24 horas, superando los niveles de actividad del promotor artificial en IHF⁺. A tiempos de inducción mayores de 24 horas, la actividad del promotor artificial en la estirpe IHF⁻, incluso supera los niveles obtenidos con el promotor silvestre en IHF⁺ (no mostrado). Podemos atribuir esta diferencia en la cinética de inducción, a los efectos pleiotrópicos provocados por la ausencia de IHF, al estar involucrado en multitud de procesos.

1.2.3. Estructura de los promotores *nifH* artificiales.

Hemos conseguido crear promotores artificiales funcionales, sustituyendo el sitio de unión de IHF por fragmentos de ADN intrínsecamente doblado. Estamos interesados en detectar empíricamente la existencia de estos dobleces en los promotores, y analizar la posible estructura que les permite ser funcionales.

Para la detección de dobleces elegimos un método simple, basado en el retardo de movilidad que tiene una secuencia doblada respecto de otra no doblada de su mismo tamaño, al correr a través de un gel de poliacrilamida, y en la acción de la distamicina A sobre el ADN. La distamicina A es un antibiótico que se une al ADN por su surco menor y elimina los dobleces (Wu y Crothers, 1984).

Los fragmentos a analizar, que contienen el promotor silvestre y los artificiales seleccionados, fueron aislados desde un gel de agarosa con filtros de DEAE-celulosa, tras ser amplificados por PCR desde los plásmidos pIZ254, pIZ274, pIZ281 y pIZ283 (ver materiales y métodos). Para la amplificación fueron utilizados los siguientes oligonucleótidos: 5'-ATGGCCCCGGCAGGTACCATTGTT-CTTGTT-3' y 5'-GTGTTTGCCAGCGGTACCGTGCA-GGGAACA-3'. El gel contenía una concentración del 4% de acrilamida y la carrera se realizó a una temperatura de 4°C. Se cargaron 75 ng de ADN de cada muestra, las muestras con distamicina A contienen 7.5 ng de este antibiótico, cantidad que es algo superior al equivalente de una molécula de distamicina A por cada 10 pares de bases.

Como podemos observar en la figura 10, la movilidad del fragmento que contiene el promotor silvestre (pIZ254) es mínimamente afectada por la presencia de distamicina A, y esta movilidad equivale a su tamaño real de 166 pb. El retardo de movilidad de los fragmentos que contienen secuencias "Atracts" es bastante evidente, dejando patente la presencia de dobleces en estos promotores artificiales. La movilidad de los fragmentos obtenidos desde pIZ274 y pIZ283 en ausencia de distamicina A,

corresponde a dos veces el tamaño observado en presencia de este antibiótico. Esta proporción es aún mayor, casi de tres veces, con el fragmento obtenido desde pIZ283.

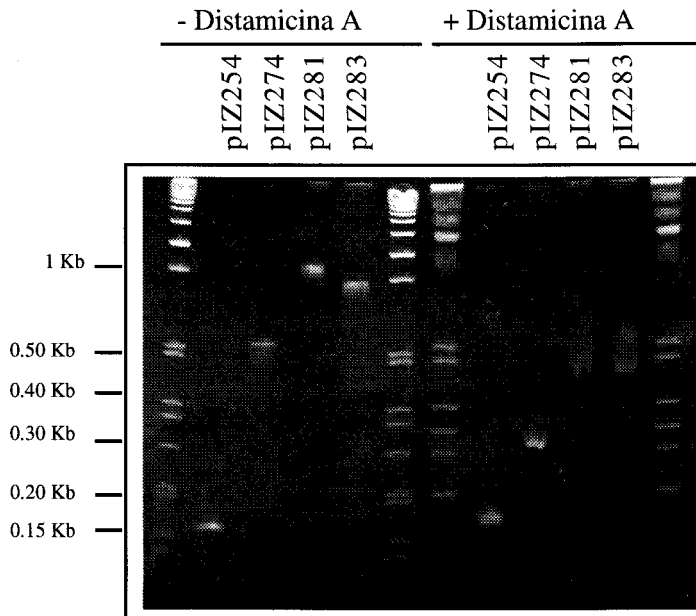


Figura 10. Análisis de cambio de movilidad en gel de poliacrilamida de los fragmentos que contienen los promotores artificiales y el silvestre, por acción de la distamicina A.

Estos tres promotores han sido secuenciados, y su posible estructura tridimensional analizada con el programa de ordenador DNASTAR. Estos análisis nos revelan dos tipos de estructura de los promotores artificiales, con uno o dos fragmentos de ADN curvados (Figura 11). Sólo pIZ294 contiene un fragmento de ADN doblado. Sorprendentemente, a pesar de que el ángulo predicho para el “Atract₆” es de 120° (Goodman y Nash 1989), el análisis por ordenador del promotor en pIZ294, nos predice un lazo con un ángulo superior a 180° (Figura 12). Esto se debe posiblemente a que en las secuencias flanqueantes del “Atract₆” también contengan un estructura ligeramente curvada que proporciona un ángulo más agudo.

Los otros dos promotores poseen dos fragmentos de ADN doblado. Parecen ser muy similares, ya que tienen la misma secuencia entre los fragmentos “A-tracts” y los sitios de unión de las proteínas, la misma direccionalidad de las secuencias “A-tracts”, y sólo difieren en la distancia que separa a estas dos secuencias

dobladas. El análisis por ordenador nos predice una estructura compleja, con la formación de un doble lazo. En pIZ298 los dos lazos parecen estar en un mismo plano, y las trece pares de bases menos que posee pIZ297 (el promotor más eficaz) le proporciona un giro entre los lazos, situandolos en planos casi perpendiculares. A pesar de la complejidad de las estructuras que predice el ordenador, no nos parece arriesgado decir qué función están ejerciendo estos dobleces para suplir la ausencia de IHF. Como se observa en la figura 12 aun cuando las estructuras son diferentes, en los tres casos tenemos una estructura estática que acerca los dos extremos del ADN, donde se localizarían los sitios de unión de la ARN-polimerasa y NIFA, facilitando el contacto entre ellos.

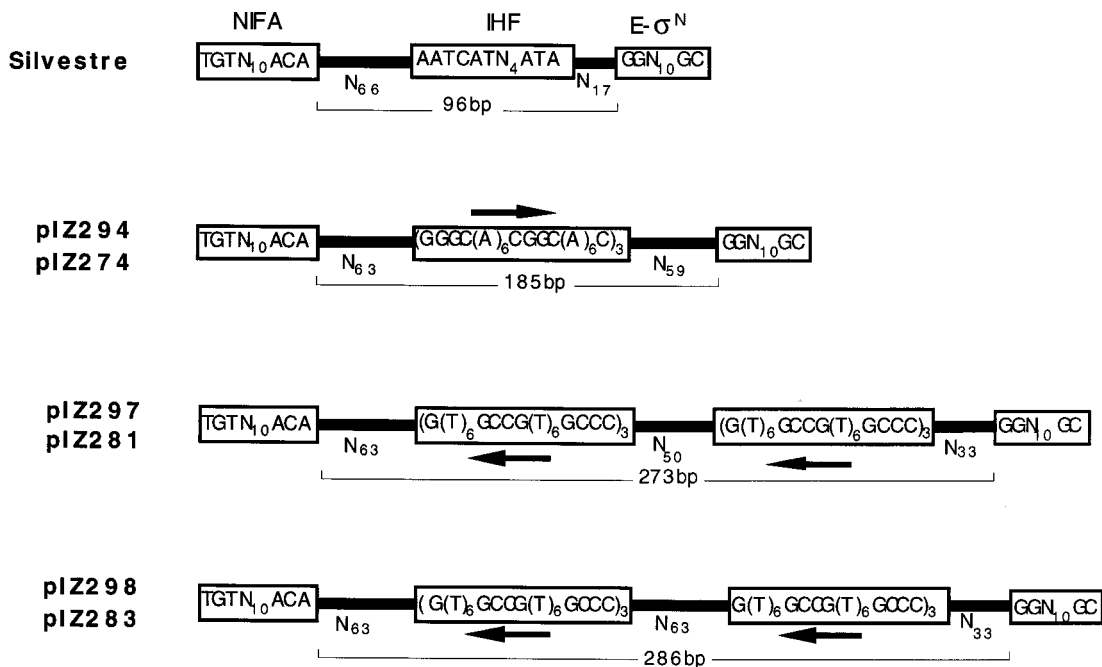


Figura 11. Representación esquemática del promotor silvestre y los promotores artificiales.

Un aspecto importante y sorprendente, es la diferencia entre la estructura del promotor silvestre y la que nos predice el ordenador en los promotores artificiales, siendo más eficaces las estructuras que más se alejan de la del silvestre (dos "Atracts"). Un promotor artificial con los brazos que flanquean a la secuencia "Atracts" más cortos, podría tener una estructura muy similar a la del promotor silvestre, y posiblemente se encontraría entre los 152 clones aislados inicialmente. Sin embargo, esta estructura no ha sido seleccionada como funcional. Posiblemente el ángulo y la

amplitud de la curvatura, imponga la necesidad de una gran distancia desde la curvatura a los sitios de unión de las proteínas, para que el promotor sea funcional. Recordemos que IHF induce un doblez de unos 140° en una zona pequeña de unas 30 pb (Nash, 1996), a diferencia de la secuencia utilizada para su sustitución, que forma un doblez de unos 120° a lo largo de unas 70 pb.

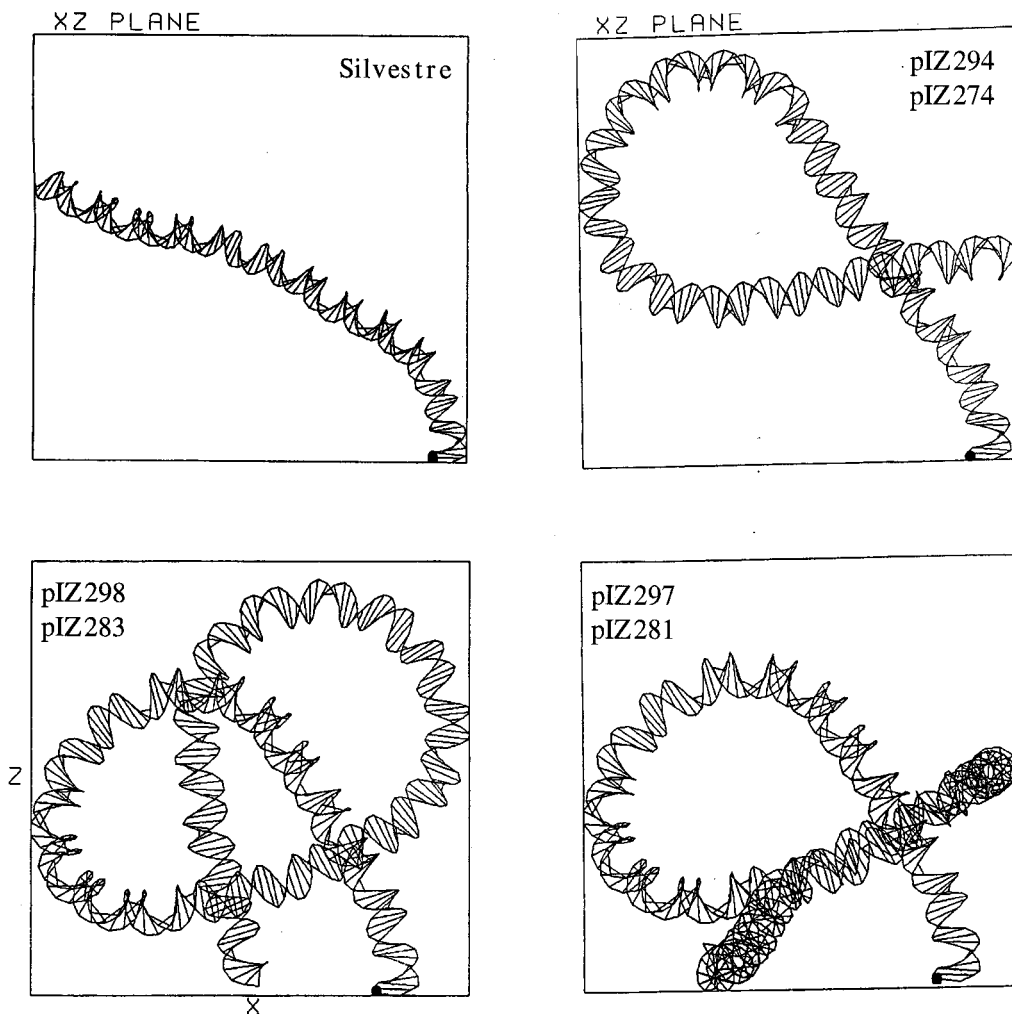


Figura 12. Análisis por ordenador con el programa DNA*, de las posibles estructuras de los promotores artificiales que contienen los fragmentos "A-tracts" y el promotor silvestre. Solamente está representado el plano XZ. La secuencia analizada comprende desde la primera base de la secuencia consenso del sitio de unión de NIFA (representada por un punto negro) hasta la última base de la del sitio de la ARNpolimerasa- σ^N .

2. Diseño de un potenciador transcripcional bacteriano, que contiene un elemento de respuesta multiple.

Los potenciadores transcripcionales eucarióticos se caracterizan por que su localización respecto a la de la ARN-polimerasa no requiere una situación precisa, ya que pueden actuar desde varias kilobases, corriente abajo, en diferentes orientaciones, y el potenciador seguirá siendo funcional. Esta versatilidad posicional le proporciona a un mismo promotor eucariota la capacidad de iniciar la transcripción en respuesta a muchos reguladores y señales diferentes. Sin embargo, en un promotor bacteriano está muy restringido el posicionamiento de los sitios de unión de los activadores. En promotores dependientes de factores de la familia σ^{70} , los sitios de unión de las proteínas activadoras suelen estar restringidos a las primeras 100 pares de bases por delante del punto de inicio de la transcripción, y la mayoría de éstos están centrados en dos zonas, una proximal en la región -41 y otra distal en -61 (Collado-Vides *et al*, 1991). Estas restricciones posicionales conllevan una gran limitación en el número de tipos de señales a la que puede responder activándose un promotor bacteriano.

Como hemos comentado a lo largo de toda la introducción, existen muchos aspectos en la regulación de promotores dependientes del factor σ^N , que se asemejan a la regulación transcripcional eucariótica. Uno de estos aspectos es la activación a grandes distancias y la versatilidad posicional de los sitios de unión de la proteína NTRC en el promotor *glnAp2* de *E. coli*. Por comparación con los potenciadores transcripcionales eucarióticos, se le ha llamado a NTRC proteína de unión a potenciadores bacterianos. Esta gran versatilidad posicional de los sitios de unión de su activador, parece que se debe a la gran afinidad de la ARN-polimerasa- σ^N por su sitio de unión y la ausencia de sitio de unión para IHF. Aunque generalmente se asume que el mecanismo de activación de la transcripción de todos los promotores dependientes de σ^N es común, de hecho se ha generalizado el término de potenciador bacteriano a todos los sitios de unión de los activadores

de distintos sistemas dependientes de σ^N , lo cierto es que la mayoría de los promotores son dependientes de IHF, y esta proteína impone una geometría muy estricta al proceso de activación de la transcripción. Por tanto, la capacidad de activar a grandes distancias y diferentes posiciones, no se ha podido demostrar con otros activadores.

Este capítulo pretende demostrar que cualquier activador de promotores dependientes de σ^N tiene la capacidad de funcionar a grandes distancias del inicio de la transcripción y en diferentes posiciones y orientaciones. A la vez, demostrar que se puede simular un sistema de potenciadores transcripcionales eucariótico que responda a distintos activadores, con maquinaria transcripcional bacteriana. Con este objeto, hemos construido variantes posicionales de un promotor híbrido que contiene los sitios de unión para 5 activadores de promotores dependientes de σ^N , lo que denominamos elemento de respuesta múltiple (MRE), y analizado sus niveles de expresión cuando se utilizan diferentes proteínas reguladoras. Este promotor híbrido está basado en el sitio de unión de la ARN-polimerasa- σ^N del promotor *glnAp2* de *S. typhimurium*.

2.1 Construcción de un elemento de respuesta múltiple (MRE)

El elemento de respuesta múltiple (MRE) fue sintetizado por PCR recurrente (Prodromou y Pearl, 1992), utilizando cuatro oligonucleótidos solapantes (Figura 13). Los oligonucleótidos tienen un tamaño entre 76 y 91 nucleótidos y el solapamiento es de 17 a 21. Estos fueron diseñados para que el producto de amplificación contenga las secuencias de unión para cuatro activadores de promotores dependientes del factor σ^N , los dos sitios de unión de XYLR del promotor Pu de *Pseudomonas putida* (Pérez-Martín y de Lorenzo, 1996b), los cuales también son reconocidos por DMPR (Fernández *et al*, 1994), los dos sitios de unión para DCTD del promotor *dctA* de *Rhizobium meliloti* (Ledebur y Nixon, 1992), y los sitios 1 y 2 para NTRC del promotor *glnA* de *Salmonella typhimurium* (Kustu *et al*, 1986). Esta última secuencia ha sido

modificada para eliminar la región -10 del promotor dependiente de σ^{70} *glnAp1*, para evitar posibles altos niveles basales de expresión. Este producto de amplificación fue diseñado para permitir modificaciones en los sitios de unión, para ello está flanqueado por dianas para la enzima de restricción *SpeI* y contiene diversas dianas para otras enzimas entre los sitios de unión de los activadores (Figura 14).

```

5'-GGACTAGTGTCTTATGCGTTTGTGGCCAAAAGCTGCAAGGCTAACAATGGTGCATGTTTGTGCCAGGACGCCAGCACTTCTGTGGGAAATC-3'...
.....3'-CGTGAAGACACGCCCTTTAGGGGIGT

.....5'-AGGTTTATTTTTTTGGTTACCAAGCACCAATGTGGTGCACACTCGTTTACA
ATACTTAAGATACTTGGACATAAATTTACCTTGTGGTAAAATTTATGTCCAATAAAAAACCAATGG-5'.....

TTAAAGCACTATTTTTGGTGCAGCTTTGGCTGCCTTG-3.....
.....3'-TTCGAAAGCGACGGAAGTATTTAGCTGTCCACCAATACGGCTAACTACTAAACGAGTTTATGTGGTGTATCAGG-5'

```

Figura 13. Secuencia y solapamiento de los oligonucleótidos utilizados en la construcción del elemento de respuesta múltiple.

El MRE fue clonado en ambas orientaciones en la diana *XbaI* del vector pBend1, que está flanqueada por un sitio múltiple de restricción duplicado, obteniendo los plásmidos pIZ411 y pIZ412. A estas dos construcciones se les insertó en la diana *EcoRI* entre el sitio de unión de DCTD y NTRC, el fragmento de 50 pb *EcoRI-SmaI* de pIZ254, que contiene el sitio de unión de NIFA de el promotor *nifH*, obteniendo pIZ411-NIFA y pIZ412-NIFA (Figura 14).

El MRE fue clonado en diferentes posiciones en pIZ413, plásmido que contiene el promotor *glnA* de *Salmonella typhimurium* sin los sitios de unión para NTRC, y con una fusión *galK-lacZ* (Figura 15). En pIZ425, pIZ426 y pIZ427, el MRE está localizado a una distancia similar del inicio de la transcripción a la que se encuentran los sitios de unión de los activadores en los promotores naturales. pIZ425 y pIZ426 difieren en 6 pb en la distancia hasta el punto de inicio de la transcripción, lo que nos permite ver el efecto de cambios en la fase de la hélice. En pIZ426 y pIZ427, los MRE tienen orientación opuesta, lo que a su vez altera la distancia de cada sitio de unión de activador al sitio de la ARN-polimerasa. En pIZ428, el MRE está localizado corriente abajo del inicio de la transcripción, dentro de la unidad transcripcional. En

pIZ429, el MRE fue clonado a 2.3 Kb corriente arriba del sitio de la ARNpolimerasa, separado de esta por el interposon Ω . En resumen, tenemos una serie de promotores híbridos que difieren en la localización de los sitios de unión de las proteínas activadoras respecto del sitio de la ARNpolimerasa- σ^N .

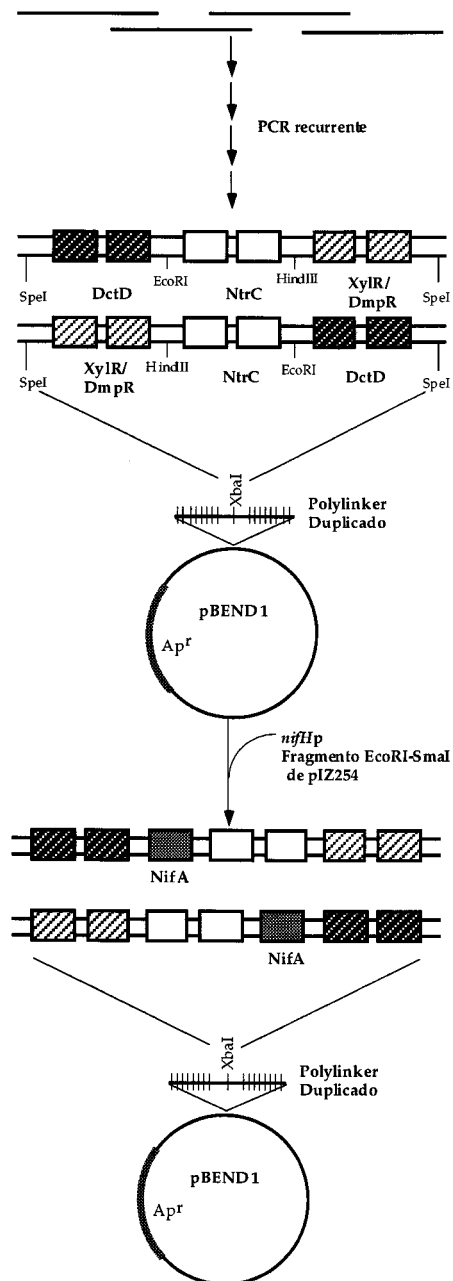


Figura 14. Representación esquemática de la construcción del elemento de respuesta múltiple.

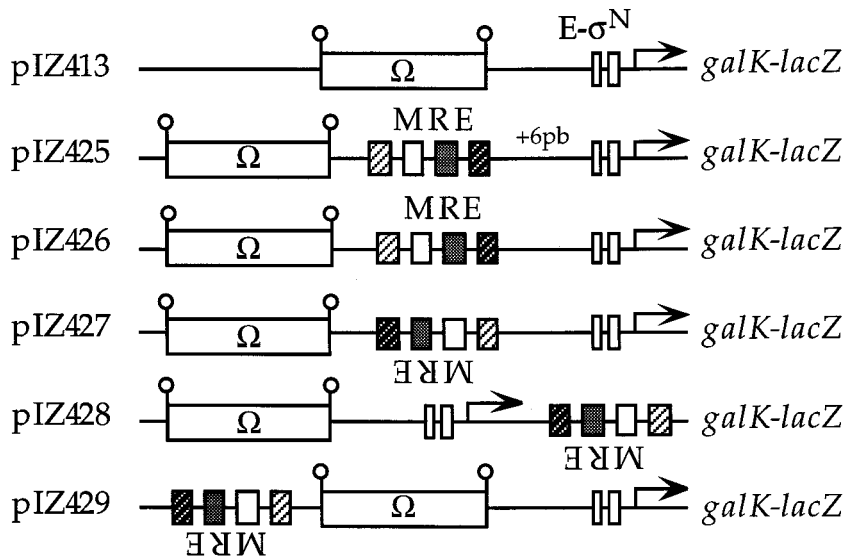


Figura 15. Representación esquemática de las versiones posicionales de promotores híbridos, donde se indica la posición relativa del MRE respecto de la ARNpolimerasa y el interposón Ω flanqueado por terminadores de la transcripción.

2.2. Activación de los promotores híbridos mediada por NTRC

La capacidad de NTRC de activar la transcripción desde estos promotores híbridos fue determinada por una cinética de inducción. Los ensayos β -galactosidasa se realizaron en la estirpe ET8000 transformada con las diferentes construcciones, en la que el activador NTRC es expresado desde el cromosoma. Los cultivos fueron crecidos en medio KN hasta una $D.O_{600}=0.3$, entonces fueron lavados y resuspendidos en medio inductor (K con 2 g/l de arginina), ambos medios contienen 100 g/l de ampicilina. Las muestras fueron tomadas a varios tiempos de inducción y medida la actividad β -galactosidasa

La cinética de inducción está representada en la figura 16. Las tres construcciones con el MRE corriente arriba del inicio de la transcripción y cercano a éste (pIZ425, pIZ426 y pIZ427), son las más eficaces. Las diferencias en los niveles de expresión no son demasiado grandes, aunque parece haber un pequeño efecto del cambio en la fase de la hélice. Cuando el MRE está situado a 2.3 Kb corriente arriba del promotor y separado de él por una unidad transcripcional (pIZ429), NTRC es capaz de activar eficientemente,

aunque a un 50% del promotor más eficaz (pIZ425). La situación del MRE dentro de la propia unidad transcripcional (pIZ428) es poco eficiente, pero tiene unos niveles de expresión unas dos veces superiores a los obtenidos con el promotor sin MRE (pIZ413). Hay que recordar que al estar el MRE situado dentro de la unidad transcripcional, puede hacer que la unión de NTRC al ADN interfiera con el proceso de transcripción.

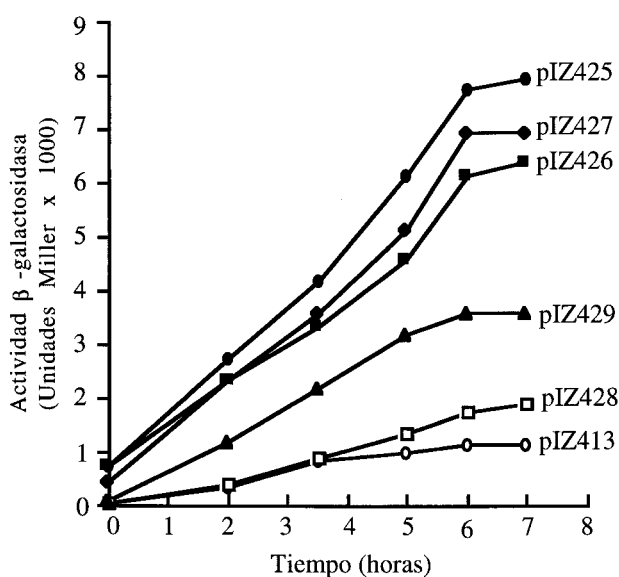


Figura 16. Cinética de inducción mediada por NTRC de las diferentes variantes posicionales de promotores híbridos.

Un último dato observado en la cinética de inducción, son los altos niveles basales que tienen los promotores híbridos más eficientes, es decir la actividad medida en condiciones de represión ($t=0$ en la figura 16). En pIZ425 y pIZ427 superan las 700 unidades Miller, y en pIZ426 las 400. Para conocer si estos niveles basales se deben a NTRC o otro activador de σ^N , se ha medido la acumulación de β -galactosidasa en las estirpes ET8000, ET8556(NtrC⁻) y ET8045(NtrA⁻) con los distintos promotores híbridos. Como podemos observar en la tabla 8, los niveles basales altos obtenidos con los tres promotores híbridos más eficientes se siguen obteniendo con las estirpes NtrC⁻ y NtrA⁻, por lo tanto estos valores son independientes del activador NTRC y del factor σ^N . La ausencia de estos niveles en pIZ413 nos elimina la posibilidad de un promotor en el vector que nos de estos altos niveles basales. La

existencia de un promotor en el propio MRE nos explicaría estos niveles de pIZ425 y pIZ426, pero la existencia de otro promotor en sentido opuesto para explicar los niveles de pIZ427, no es posible por la ausencia de estos niveles en pIZ428. Probablemente estos altos niveles basales se deban a la formación de un promotor débil (no dependiente del factor σ^N) en la propia clonación del MRE en la diana *NcoI* del vector, forma por la que han sido construidos estos tres plásmidos (pIZ425, pIZ426 y pIZ427).

Plásmido	ET8000		ET8045 (NtrA ⁻)		ET8556 (NtrC ⁻)	
	Amonio	Arg	Amonio	Arg	Amonio	Arg
pIZ413	25	1017	58	112	44	57
pIZ425	770	7948	996	1705	1024	1257
pIZ426	735	6423	930	1371	955	1086
pIZ427	441	6966	493	645	511	625
pIZ428	19	1925	30	44	28	39
pIZ429	26	3600	52	128	55	71

Tabla 8. Activación de los promotores híbridos mediada por NTRC, en la estirpe silvestre ET8000 y en las estirpes NtrC⁻ (ET8556) y NtrA⁻ (ET8045). Los valores de actividad β -galactosidasa están expresados en unidades Miller, y son la media de 4 ensayos de cultivos independientes.

2.3. Transcripción mediada por diferentes activadores dependientes de σ^N .

Queremos ver si otros activadores de promotores dependientes de σ^N , tienen la misma versatilidad en la localización de sus sitios de unión que NTRC. La imposibilidad de analizar esto en el organismo natural de cada activador (NIFA, XYLR, DMPR y DCTD), nos hizo construir una serie de plásmidos productores de los diferentes activadores para poder analizarlo en *E. coli*, estos plásmidos fueron diseñados para ser expresados en respuesta a la presencia de IPTG, todos se producen desde versiones del promotor *lac*.

2.3.1 Construcción de plásmidos productores de los activadores.

Los plásmidos productores están representados en la figura 16. Todos los activadores fueron clonados bajo el control de un promotor inducible por IPTG, en plásmidos que llevan el gen represor *lacI^q*. La concentración de activador producida puede ser controlada por la concentración de IPTG añadida. pVTRXylR es un plásmido derivado de pSC101 y produce el activador XYLR desde el promotor *trc* (Pérez-Martín y de Lorenzo, 1996c). pIZ430 es un derivado de pACYC184, que lleva bajo el control del promotor *lac* el operón *nifLA*. El gen *nifL* lleva una delección en fase *SmaI-NaeI* que evita que inactive a NIFA. pIZ433 produce el activador DMPR desde el promotor *tac*; este plásmido es un derivado de pVI465 (Sze *et al*, 1996), al cual se le ha sustituido el gen de la β -lactamasa por el cassette *cat* que le confiere resistencia a cloranfenicol. Para la activación por DCTD se ha utilizado un mutante constitutivo por delección de la región amino-terminal (Gu *et al*, 1994), ya que no se han encontrado las condiciones para que el silvestre sea funcional en *E. coli*. DctD-L64 está bajo el control de los promotores *lac* y *tac* en el plásmido pIZ432.

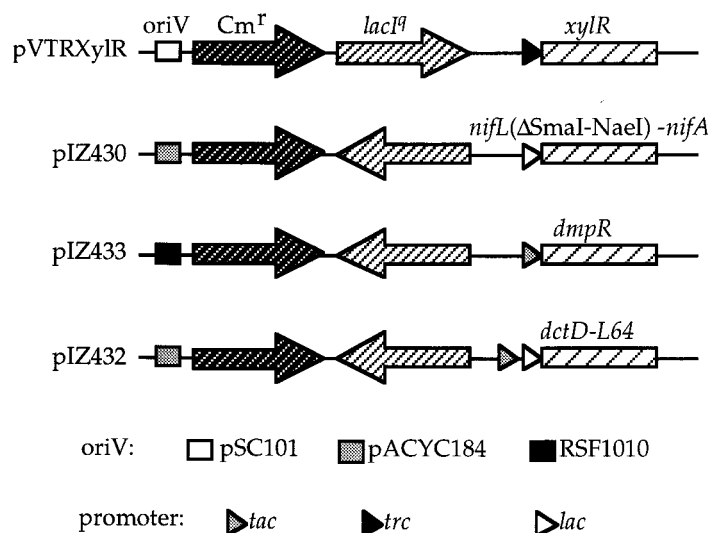


Figura 17. Representación esquemática de los plásmidos productores de los activadores, donde se indica el origen de replicación y el promotor inducible por IPTG que posee cada plásmido.

2.3.2. Niveles de expresión mediados por NIFA, XYLR, DMPR y DCTD.

Al analizar el efecto de estos activadores sobre los promotores híbridos, nos encontraremos con dos problemas que nos pueden enmascarar los resultados. El primero es el nivel basal alto que tienen los promotores más eficientes, que como hemos visto no dependen de σ^N . Decidimos estimar estos niveles basales y utilizarlos como un factor de corrección en los valores obtenidos por cada activador. El segundo problema viene dado por la capacidad de un activador de ser funcional a concentraciones altas en ausencia de sitios de unión. Esto hace que tengamos que ver el efecto del activador a diferentes concentraciones de IPTG, y elegir la concentración apropiada.

2.3.2.1. Niveles basales no dependientes de σ^N

Hemos de estimar de nuevo los niveles basales, ya que el medio K utilizado anteriormente no puede ser utilizado para analizar el resto de activadores. Necesitamos un medio libre de glucosa para evitar represión del promotor *lac*, y con una alta concentración de amonio para no inducir el sistema *ntr*. La estirpe ET8000 con las distintas construcciones de promotores híbridos, fueron cultivadas en medio M9 con 1.5 g/l de cloruro amónico y succinato sódico 20 mM. Cuando el cultivo llega a una D.O.₆₀₀ = 0.4 se le añade IPTG a una concentración de 0.5 mM. Los ensayos β -galactosidasa, fueron realizados 8 horas después de la adición de IPTG.

Plásmido	pIZ413	pIZ425	pIZ426	pIZ427	pIZ428	pIZ429
Unidades Miller	89	2148	1870	1125	47	93

Tabla 9. Niveles de expresión obtenidos con los promotores híbridos en medio M9 en ausencia de activador. Los valores indicados de actividad β -galactosidasa, son la media de 4 ensayos de cultivos independientes.

Los resultados están representados en la tabla 9 como podemos observar, estos valores son proporcionales pero

significativamente más altos que los obtenidos en medio KN (Tabla 8). Esto se deba probablemente a la velocidad de crecimiento del cultivo, ya que es bastante más lento en el medio M9 con succinato que en el medio KN utilizado para NTRC.

2.3.2.2. Efecto de la concentración de activador.

Cada plásmido productor fue introducido por transformación en las estirpes ET8000/pIZ413 y ET8000/pIZ425, para comparar el efecto de la concentración de los activadores sobre un promotor sin sitios de unión para los activadores, frente a uno de los promotores híbridos más eficientes. Las condiciones de cultivo para los ensayos fueron las mismas que para la obtención de los niveles basales, aunque hay que puntualizar algunas variaciones. En los ensayos de XYL R y DMP R, se le añadió a la vez que las diferentes concentraciones de IPTG, 1 mM de alcohol 3-metil bencílico y 5 mM *o*-cresol, respectivamente. Los resultados, que se muestran en la figura 18, están corregidos restándoles el valor basal obtenido desde el promotor híbrido correspondiente en ausencia de activador (Tabla 9). Los ensayos con NIFA se realizaron a 16 horas de inducción en vez de a 8 horas, ya que con este activador se necesita más tiempo de inducción para llegar al máximo de actividad.

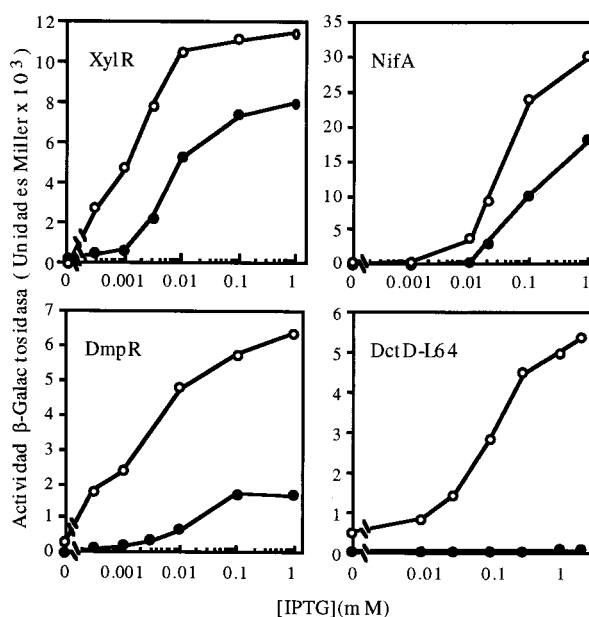


Figura 18. Efecto de la concentración de activador sobre la expresión del promotor híbrido pIZ425 (○) y el promotor sin MRE pIZ413 (●).

Como se observa en la figura 18, la activación mediada por XYLR en el promotor con MRE, se hace evidente desde concentraciones muy bajas de IPTG, aumentando significativamente la actividad en respuesta al incremento de concentración, hasta llegar a un máximo entre 10 y 100 μM . Sin embargo, con el promotor sin MRE no se detectó apenas mucha actividad a concentraciones bajas de IPTG, siendo a estas concentraciones, entre 0.3 y 3 μM a las que se hace más evidente la diferencia de actividad con el promotor con MRE. Por el contrario, a las concentraciones más altas de IPTG, los niveles de expresión de pIZ413 fueron muy altos, por lo que el efecto debido a la presencia del MRE se ve reducido pero sigue siendo detectable.

La transcripción activada por NIFA desde el promotor con MRE empieza a detectarse a partir 1 μM de IPTG, aunque esta no se hace muy evidente hasta 10 μM , concentración a partir de la cual incrementa rápidamente la actividad de ambos promotores. Esta falta de expresión a bajas concentraciones de IPTG, se debe probablemente a que el gen de este activador es transcrito desde el promotor silvestre *lac*, mucho más débil que el promotor *trc*, desde el que se transcribe *xylR*. Los niveles de expresión desde pIZ413 son muy elevados y cercanos a los producidos desde pIZ425, lo que hace que la presencia del MRE no parezca potenciar excesivamente la transcripción, y que no exista un intervalo de concentraciones de IPTG en el que el efecto de la presencia del MRE sea demasiado evidente. Todos estos datos aparentemente indican que NIFA a concentraciones no muy altas, tiene una mayor capacidad de activar la transcripción desde promotores sin sitios de unión para el activador. Sin embargo, esto se podría explicar de forma alternativa si existieran secuencias en el vector a las que se pudiera unir NIFA y enmascarar el efecto del MRE.

Los resultados obtenidos por DMPR siguen un patrón muy similar a los de XYLR, pero con unos niveles de expresión absolutos menores. Sin embargo, a altas concentraciones de IPTG la expresión desde pIZ413 es relativamente baja, y el efecto de el MRE es mayor que el observado con XYLR. El mayor efecto de la presencia del MRE, es observado al activar con DCTD-L64. Con este activador las

actividades obtenidas con pIZ425 son similares a las de DMPR, pero la actividad desde pIZ413 es apenas detectable.

Al comparar los niveles expresión de los diferentes activadores en un promotor con y sin MRE, observamos que pueden existir diferencias en la capacidad de un activador por iniciar la transcripción desde solución o desde sitios no específicos en el ADN. A pesar de estas diferencias, es evidente que todos los activadores pueden activar la transcripción desde un promotor con MRE, con niveles similares o incluso bastantes superiores a los obtenidos por NTRC desde el cromosoma. Por lo tanto, una región promotora bacteriana como la presente en pIZ425, puede ser activada por diversas proteínas reguladoras en respuesta a diferentes señales.

2.3.2.3. Efectos posicionales del MRE en el proceso de transcripción.

Con el fin de comparar la capacidad de cada regulador de activar la transcripción desde diferentes posiciones decidimos estimar los niveles de expresión desde los plásmidos en los que el MRE clonado en diferentes posiciones, usando concentraciones de IPTG con las que se obtuvieron niveles de expresión del 80-90% del máximo, cuando se utilizó pIZ425. A estas concentraciones, el efecto estimulador de la presencia de MRE es evidente con todos los activadores.

Las condiciones de cultivo para los ensayos de las distintas versiones posicionales, fueron las mismas que en el apartado anterior para ver el efecto de la concentración de IPTG. Las concentraciones de IPTG utilizadas en cada caso se indican en el pie de la figura 19, en la que se muestran los resultados obtenidos con cada activador. Estos resultados han sido corregidos con los niveles basales de cada construcción (Tabla 9).

Al igual que con el activador NTRC (Figura 16), en la activación mediada por XYLR, NIFA y DMPR los niveles más altos fueron obtenidos por las construcciones pIZ425, pIZ426 y pIZ427, en las cuales la situación del MRE respecto del sitio de la

ARNpolimerasa es muy similar. Para cada activador, Los niveles de transcripción con estas tres construcciones fueron muy similares, esto nos muestra que cambios en la fase de la hélice y la orientación del MRE no alteran la eficiencia en la activación por NTRC, XYLR, DMPR o NIFA.

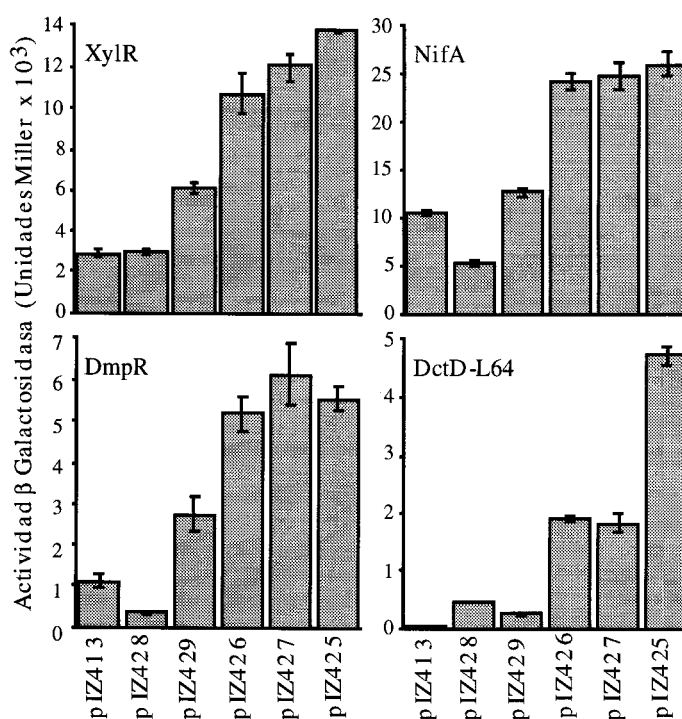


Figura 19. Niveles de expresión mediados por cada activador, en las versiones posicionales de promotor híbrido. Las concentraciones de IPTG utilizadas para cada activador fueron: 5 μ M para XYLR, 100 μ M para NIFA y DMPR, y 1 μ M para DCTD-L64.

Cuando el MRE está situado a 2.3 Kb, separado por el interposón Ω (pIZ429), los niveles de transcripción se vieron claramente reducidos, pero como ocurre con NTRC, tienen unos niveles relativamente altos y la estimulación debida a la presencia del MRE en esta posición es evidente. Esto nos muestra que estos activadores son capaces de funcionar desde sitios de unión situados a más de 2 kb corriente arriba del inicio de transcripción, incluso aunque la región que separa los sitios de unión del activador y la ARNpolimerasa esté siendo transcrita activamente.

Los niveles de transcripción obtenidos por los activadores XYLR, DMPR y NIFA desde el MRE situado dentro de la unidad

transcripcional (pIZ428), son iguales o menores que los obtenidos con pIZ413. Esto contrasta con los resultados obtenidos con NTRC (Figura 16), aparentemente estos tres activadores no son funcionales desde sitios de unión situados corriente abajo del inicio de transcripción. Esto podría deberse a estos activadores tengan diferente forma de funcionamiento que NTRC, pero podría también explicarse por una alta concentración de activador. A altas concentraciones de activador los niveles obtenidos en promotores sin sitios de unión son muy altos y enmascaran la actividad mediada por los sitios de unión, esto se ha visto con NTRC *in vivo* (Reitzer y Magasanik, 1986) e *in vitro* (Ninfa *et al*, 1987; Wedel y Kustu, 1990). La alta concentración de activador daría una alta ocupación de los sitios de unión que al estar situados dentro de la propia unidad transcripcional podría interaccionar con la maquinaria de transcripción, y en procesos posteriores de escape del promotor o elongación no se obtendrían unos niveles altos.

Si esta hipótesis fuera cierta, a concentraciones bajas de activador podríamos detectar niveles superiores de expresión desde el promotor con los sitios de unión situados dentro de la propia unidad transcripcional, que aquellos desde el promotor sin sitios de unión para el activador. Con objeto de verificar esta hipótesis, se realizó un ensayo con XYLR para ver mucho más en detalle el efecto de IPTG a bajas concentraciones, comparando las construcciones pIZ413 y pIZ428. Como se muestra en la figura 20, la expresión desde pIZ428 es superior a la obtenida desde pIZ413 a concentraciones bajas de IPTG, incluso llega a ser más de tres veces superior a 2 μ M. Sin embargo la respuesta al incremento de la concentración de IPTG es mucho mayor desde pIZ413, llegando a alcanzar el doble de la actividad obtenida desde pIZ428 a 100 μ M de IPTG. Estos resultados sugieren que el MRE situado corriente abajo dentro de la unidad transcripcional es funcional, pero su efecto estimulador sólo es detectable a concentraciones bajas de activador, ya que a altas concentraciones tiene un efecto negativo adicional sobre la transcripción.

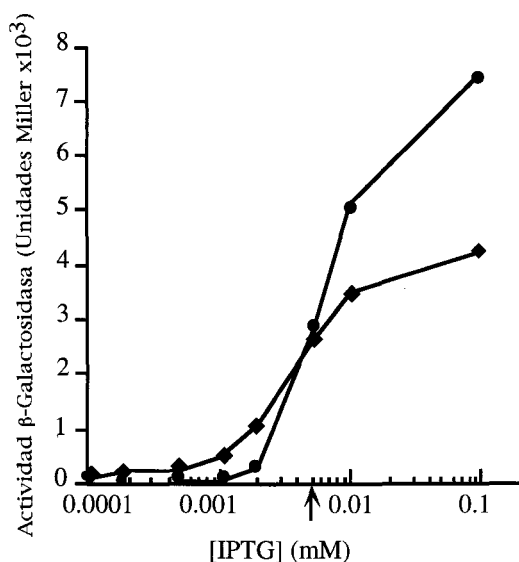


Figura 20. Efecto de la concentración de activador sobre los niveles de expresión mediados por XYLR en el promotor híbrido con el MRE situado en la propia unidad transcripcional (pIZ428 ◆) y el promotor sin MRE (pIZ413 ●). Los valores están corregidos con los niveles basales mostrados en la tabla 9 para cada plásmido. La flecha indica la concentración de IPTG usada para XYLR en la figura 19.

Los niveles de transcripción obtenidos por DCTD-L64 desde pIZ425 son similares a los obtenidos por DMPR y por NTRC. Sin embargo, DCTD-L64 no parece mostrar la relativa insensibilidad a la situación del MRE respecto del sitio de unión de la ARN-polimerasa, que muestran los otros activadores. Los cambios de fase de la hélice y de orientación (pIZ426 y pIZ427) muestran una reducción significativa en la actividad, más del 50%. Con el MRE situado a 2.3 Kb se obtienen niveles bajísimos. Esto puede indicar que el activador DCTD-L64 tenga una característica especial en comparación con el resto de activadores estudiados. Sin embargo, es muy evidente la expresión desde el MRE situado dentro de la unidad transcripcional respecto del promotor sin MRE, dato que podría indicar que estamos en unas condiciones limitantes de DCTD. Si esto fuera cierto, la sensibilidad posicional sería debido a una limitación en actividad de DCTD-L64, y no a una característica especial de éste.

Con el fin de conocer si esta sensibilidad a cambios en la geometría, se debe o no a una limitación en la concentración efectiva del activador, realizamos ensayos con todas las versiones de promotores híbridos a concentraciones de IPTG a las cuales la

actividad de XYLR sea limitante. De esta forma podemos analizar si XYLR muestra sensibilidad en la posición de sus sitios de unión en estas condiciones limitantes de concentración efectiva del activador. Tomando como referencia la figura 18, elegimos dos concentraciones de IPTG a las cuales se obtienen niveles de expresión desde pIZ425 ligeramente superiores e inferiores a los obtenidos con DCTD-L64 desde el mismo plásmido. Las concentraciones elegidas fueron 0.5 μM y 2 μM . Los resultados obtenidos están representados en la figura 21. Los bajos niveles absolutos y la actividad de pIZ428 mayor que de pIZ413, nos confirman la limitación en la concentración de XYLR. Sin embargo, la comparación de los tres paneles de la figura 21, nos indica que XYLR tiene la misma capacidad de activar desde diferentes localizaciones del MRE a concentraciones bajas. Estos resultados indican que la limitación en la localización de los sitios de unión exhibida por DCTD-L64 no se debe a su concentración, sino a una característica especial de éste.

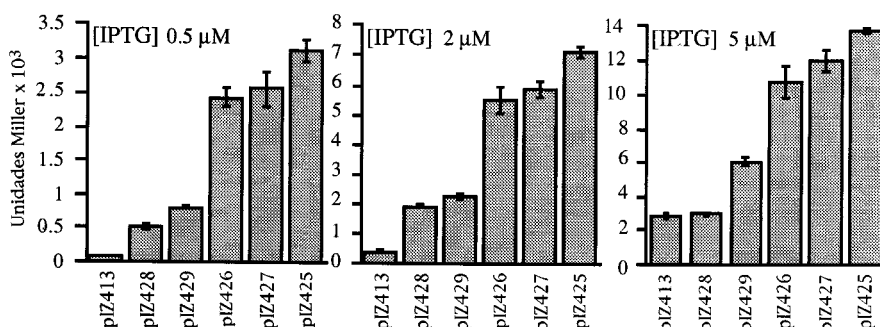


Figura 21. Sensibilidad de la activación mediada por XYLR a los cambios en la posición del MRE, en concentraciones limitantes del activador. Los valores están corregidos con los niveles basales mostrados en la tabla 9.

2.4. Punto de inicio de la transcripción de los promotores híbridos.

Puesto que la transcripción desde los promotores híbridos puede ser activada por los distintos activadores actuando desde diferentes posiciones, estos promotores permiten plantearnos la cuestión de si la selección del inicio de la transcripción podría verse afectada por el regulador utilizado para la activación o por la posición desde la cual funcionase. Con este objeto, determinamos el

extremo 5' de los transcritos obtenidos desde los diferentes promotores híbridos con NTRC, y desde pIZ425 con cada uno de los activadores.

El oligonucleótido empleado para la determinación del extremo 5' de todos los transcritos es el siguiente: 5'-GGTCTCGC-TGGGTCTCTGCC-3'. Los resultados obtenidos con NTRC se muestran en la figura 22 A. Las condiciones de cultivo para el aislamiento de ARN y posterior localización del extremo 5', son las mismas que las utilizadas en la figura 16 con 8 horas de inducción. Se observan dos puntos de inicio de la transcripción. El primero corresponde a una adenina, localizada 12 pb corriente abajo del dinucleótido GC característico de los promotores σ^N , y el segundo es una guanina localizada 2 pb después de la primera. Ambos transcritos se dan con la misma frecuencia. Esto confirma los estudios previos realizados en promotor *glnAp2* (Rippe et al, 1997; Klose et al, 1992; Wedel y Kustu, 1995). Todos los promotores analizados, incluido el que carece de MRE, producen estos dos tipos de transcritos en igual proporción, indicando que la localización del sitio de unión de NTRC en el proceso de transcripción no afecta al punto de inicio de ésta.

Para el resto de activadores, se localizó el inicio de transcripción en el promotor situado en pIZ425 (Figura 22 B). Todos los activadores utilizados inician la transcripción en los mismos nucleótidos, pero el primer tipo de transcrito (que comienza en adenina) es mucho más frecuente, del 80 al 90%. Esta diferencia podría deberse a una peculiaridad de NTRC, o a las diferencias en las condiciones de cultivo para la activación mediada por NTRC y las del resto de activadores. NTRC requiere para activar una alta proporción carbono/nitrógeno. Por el contrario, la activación mediada por el resto de activadores requiere una fuente pobre de carbono para evitar el "silenciamiento exponencial" (Sze et al, 1996; Hotel et al, 1994; Cases et al, 1996) y la represión catabólica del promotor *lac*, así como un exceso de amonio para evitar la activación por NTRC codificado en el cromosoma. Para comparar en las mismas condiciones fisiológicas la frecuencia de cada transcrito cuando se activa la transcripción con cada activador, se decidió usar para los cultivos el medio M9 con succinato 20 mM como fuente de carbono y 150 μ M de glutamina como fuente de

nitrógeno. Para evitar la activación por NTRC, con el resto de activadores se utilizó la estirpe isogénica NtrC⁻ ET8556. En estas condiciones los resultados que muestran en la figura 22 C, indican que el transcrito que comienza en adenina es más frecuente que el que comienza en guanina, entre un 62 a un 74%. Sin embargo, no se observa diferencia significativa en la selección de los dos transcritos de un activador a otro, lo que indica que la diferencia observada en la proporción de los transcritos entre NTRC y los demás activadores (Figura 22 B), es debida a diferencias en las condiciones fisiológicas y no a una particularidad de NTRC.

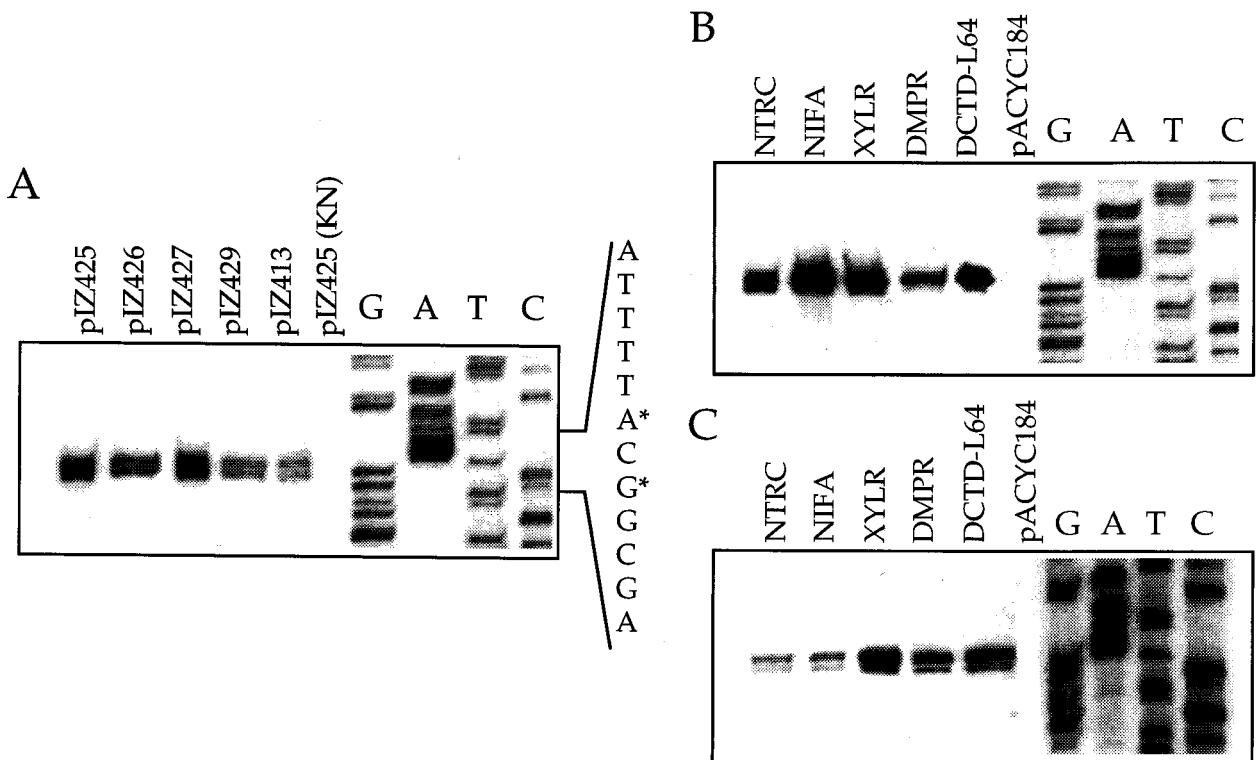


Figura 22. Efecto del activador o la posición desde la que actúa, sobre la selección del punto de inicio de la transcripción. Panel A: determinación del extremo 5' de los transcritos desde las diferentes versiones posicionales de promotores híbridos activados por NTRC en condiciones limitantes de nitrógeno (medio Karg). Panel B: determinación del extremo 5' de los transcritos desde el promotor híbrido pIZ425 activado por las diferentes proteínas reguladoras, en condiciones limitantes de nitrógeno (K arg) en el caso de NTRC y de exceso de nitrógeno (M9 amonio) para el resto de activadores. Panel C: determinación del extremo 5' de los transcritos desde el promotor híbrido pIZ425 activado por las diferentes proteínas reguladoras, en condiciones limitantes de nitrógeno (M9 gln) en la estirpe ET8556, menos para NTRC que se utilizó ET8000.

DISCUSSION

1. Geometría del inicio de la transcripción del promotor *nifH* de *Klebsiella pneumoniae*.

Hemos comprobado *in vivo* la alta dependencia de IHF que tiene el promotor *nifH* para una transcripción eficaz. Los sitios de unión del activador NIFA y de la ARN-polimerasa no son suficientes en este promotor para obtener unos niveles altos de expresión. Los resultados nos muestran que IHF en este promotor estimula la transcripción entre 35 y 40 veces, casi el doble que los resultados previos obtenidos *in vitro* (Hoover *et al*, 1990; Santero *et al*, 1992).

Mutaciones en los sitios de unión de IHF en el promotor *glnHp2* de *E. coli* y en *nifH* de *K. pneumoniae*, producen una bajada en la formación de complejo abierto (Claverie-Martín y Magasanik, 1992). Sin embargo, IHF no parece estar involucrado en estimular la unión de la ARN-polimerasa- σ^N por su sitio de unión (Claverie-Martín y Magasanik, 1991; de Lorenzo *et al*, 1991; Hoover *et al*, 1990). Basandonos en los datos sobre la función de IHF en otros sistemas, lo más lógico es pensar que IHF facilite la interacción entre el activador y la ARNpolimerasa, gracias a la formación de un dobléz en el ADN. Sin embargo, se ha descrito una posible interacción entre IHF y la ARN-polimerasa en el promotor *pL* del fago λ (Giladi *et al*, 1992), basado en el requerimiento de un contacto con el sitio I de la subunidad α . Aunque el contacto con el sitio I de la subunidad α de la ARNpolimerasa no es requerido para la función de IHF en el promotor *nifH* (Lee *et al*, 1993), la interacción proteína-IHF no puede ser descartada en el proceso de formación de complejo abierto en el inicio de la transcripción, más si pensamos en la cercanía entre el sitio de unión de IHF y el de la ARNpolimerasa.

La sustitución funcional del sitio de unión de IHF por un fragmento de ADN intrínsecamente doblado, nos muestra que podemos alcanzar niveles de un 70% de los obtenidos por el promotor silvestre. Estos niveles de transcripción son independientes de la proteína IHF y nos demuestran que IHF tiene un papel estructural en el inicio de la transcripción de este promotor. Esto apoya la teoría más generalizada sobre el papel

que puede estar ejerciendo IHF en todos los sistemas en los que participa. Aunque no podemos descartar una posible interacción IHF-proteína, si la hubiera no tendría un papel esencial.

El análisis por ordenador de los tres promotores artificiales nos predice unas estructuras bastante complejas y diferentes de la posible estructura del promotor silvestre con el doblez inducido por IHF. Esta complejidad no nos permite analizar la orientación de las proteínas respecto a la fase de la vuelta de hélice. La eficacia del promotor con una sola copia del fragmento "A-tract₆", junto con la eficiencia del método de selección que nos permitió aislar esta construcción más de una vez en aislamientos independientes, es lo que nos permite decir que los sitios de unión de las proteínas deben estar en orientación adecuada. Los promotores con dos secuencias "A-tracts" poseen una estructura más complicada pero, en definitiva la presencia de estos dobleces proporciona una estructura estática que acerca los extremos del ADN, reduciendo el efecto de la distancia entre ellos. Estas estructuras y su función en estos promotores artificiales se asemejan a las generadas por nucleosomas en la estimulación de la transcripción eucariótica (Schild *et al*, 1993)

Las alteraciones en la fase de la hélice nos proporcionan cambios en la orientación entre los tres elementos que componen la region promotora de *nifH*. Si asumimos que el papel de IHF se limita a ser estructural, los efectos de estas alteraciones pueden ser interpretados como probabilidad de contacto entre NIFA y la ARN-polimerasa. Los datos obtenidos nos confirman y amplian otros resultados sobre la gran restricción en la orientación relativa entre estos tres sitios de unión, en el promotor *nifH* (Buck *et al*, 1986; 1987) y en otros promotores dependientes de IHF (Claverie-Martín y Magasanik, 1992; Abril y Ramos 1993). Nuestros datos confirman que el promotor *nifH* requiere una geometría muy precisa para obtener unos niveles altos de activación y sólo admite pequeños cambios en la distancia entre sus elementos, siempre que mantengan la fase de la hélice.

Estos datos contrastan con la versatilidad posicional de los sitios de unión del activador NTRC en el promotor *glnAp2* de *E. coli* y *S. typhimurium* (Reitzer y Magasanik, 1986; Wedel *et al*,

1990). La diferencia entre estos promotores y el promotor *nifH* está en la presencia del sitio de unión de IHF, que compensaría la falta de una alta afinidad de la ARNpolimerasa por su sitio de unión. Independientemente de la afinidad de la ARNpolimerasa por su sitio, la presencia de sitio de unión para IHF es un hecho generalizado en promotores dependientes de σ^N , de hecho hay promotores con sitio de unión de IHF que no necesitan esta proteína para una activación eficaz. Se ha observado que la dependencia por la proteína IHF es inversamente proporcional a la afinidad de la ARNpolimerasa por su secuencia en el promotor (Santero *et al*, 1992). Estos hechos nos dicen que la función de IHF, no debe limitarse al mero efecto de la compensación de esta falta de afinidad. La estricta geometría en el proceso de activación impuesta por IHF, puede conllevar una alta fidelidad de éste, en el que IHF tendría entonces un papel restrictor, permitiendo la activación sólo desde una determinada localización de los sitios de unión del activador, e inhibiendo transcripción inespecífica por otros activadores dependientes de σ^N . Esto se ha observado claramente en promotores con sitio de unión de IHF pero que no tienen una baja afinidad de la ARNpolimerasa por su sitio (Claverie-Martín y Magasanik 1992; Perez-Martín y de Lorenzo 1995; Dworkin *et al*, 1998). A pesar de que el promotor *nifH* es muy dependiente de IHF debido a su baja afinidad por la ARNpolimerasa, observamos un ligero efecto restrictor en las construcciones donde IHF genera un dobléz en sentido contrario (pIZ276 y pIZ405), indicándonos que el dobléz inducido por IHF puede ser inhibitorio si el activador y la ARN-polimerasa no se encuentran en la orientación adecuada.

Al comparar la posible geometría en el inicio de la transcripción de diferentes regiones promotoras dependientes de σ^N , nos encontramos con que no nos podemos limitar a describir promotores con o sin sitio de unión de IHF, sino que dentro de estos últimos nos encontramos con organizaciones diferentes. Tanto en promotores artificiales como naturales, el sitio de unión de IHF es funcional situado en orientación opuesta (Hoover *et al*, 1990; Buck *et al*, 1986). Incluso se ha observado en *Caulobacter crescentus* sitios de unión para el activador e IHF funcionales, localizados corriente abajo del sitio de unión de la ARN-

polimerasa, (Mullin y Newton 1993). Los promotores artificiales seleccionados en este trabajo apoyan la teoría de que diferentes variantes en orientación, distancia y posición relativa de los sitios de unión podrían ser funcionales en este tipo de promotores, siempre que faciliten el contacto entre el activador y la ARNpolimerasa. A su vez, la adopción de una geometría más o menos adecuada puede representar una nueva forma de definir los niveles máximos de expresión de estos promotores.

Como último aspecto importante en las posibles estructuras que adoptan estos promotores, podemos destacar la cercanía del sitio de unión de IHF al de la ARNpolimerasa que hace que IHF forme una estructura asimétrica en "V". Teniendo en cuenta que se ha demostrado una interacción del activador DCTD con el factor σ^N (Lee y Hoover, 1995), y esta estructura asimétrica emplazaría el activador cerca de la región frontal de la ARNpolimerasa donde está situado el factor σ (Buck y Cannon, 1992), debemos asumir que ésta es la geometría más apropiada y no es de extrañar entonces que se encuentre prácticamente en todas las regiones promotoras. En favor de esta idea, encontramos que cuando los sitios de unión de IHF y el activador se encuentran corriente abajo del inicio de transcripción, el sitio para IHF se encuentra más cerca del activador que de la ARN-polimerasa (Mullin y Newton, 1993).

2. Diseño de un potenciador transcripcional bacteriano que contiene un elemento de respuesta múltiple.

Los mecanismos de inicio de la transcripción bacteriana en promotores naturales son demasiado simples si los comparamos con la regulación eucariótica. En este trabajo, vemos que la regulación transcripcional bacteriana puede ser más versátil y compleja que la que encontramos en promotores naturales. La construcción de estos promotores híbridos nos permite simular algunas características de promotores eucarióticos y a la vez comparar las posibles diferencias en el mecanismo de inicio de transcripción de distintos activadores dependientes de la

ARNpolimerasa- σ^N . Estos promotores están basados en la versatilidad posicional del sitio de unión del activador NTRC para iniciar la transcripción, si el promotor posee un sitio de unión de alta afinidad para la ARNpolimerasa y sin módulo de unión para IHF. Si esta capacidad de activar a distancia desde diferentes sitios es general a los activadores de σ^N y no una peculiaridad de NTRC, al construir un elemento que contenga sitios de unión para varios activadores, podríamos obtener un promotor bacteriano capaz de responder a multitud de señales fisiológicas.

Los datos obtenidos con NTRC confirman los obtenidos previamente en el promotor *glnAp2* de *E. coli* (Reitzer y Magasanik, 1986), lo que nos indica que nuestros promotores híbridos se comportan de forma similar al promotor *glnAp2*. Además, amplían esta información previa en dos aspectos importantes, que son la capacidad de activación cuando los sitios de NTRC y la ARNpolimerasa están separados por una unidad transcripcional, y cuando estos primeros están situados dentro de la propia unidad transcripcional.

Los resultados obtenidos con cada uno de los activadores en el promotor híbrido pIZ425, nos muestra que una forma de ARNpolimerasa bacteriana en un mismo promotor, puede ser activada por 5 reguladores diferentes en respuesta a distintas señales. Desde un punto de vista mecanístico, este hecho nos indica que la maquinaria transcripcional bacteriana posee una gran versatilidad y complejidad potencial, que se asemeja a características que posee la regulación transcripcional eucariota y que no es observada en promotores naturales bacterianos.

En la comparación de los niveles de los diferentes activadores en un promotor con y sin MRE (Figura 18), observamos que existen diferencias significativas en la capacidad de activar la transcripción en ausencia de sitios de unión específicos. Estas diferencias pueden ser explicadas por diferentes capacidades de unirse a secuencias no específicas. Sin embargo, los activadores unidos al ADN tienen que oligomerizar para adquirir la capacidad ATPasa y de activación de la transcripción, por lo que estas diferencias podrían ser explicadas por diferentes capacidades de oligomerizar en ausencia de dos sitios contiguos

de unión, que podrían favorecer esta oligomerización. Es importante resaltar que NIFA, el activador que muestra menos diferencia relativa entre los niveles de actividad obtenidos con y sin MRE a todas las concentraciones de IPTG ensayadas, es el único activador que no requiere dos sitios contiguos de unión para iniciar la transcripción en promotores naturales.

La activación mediada por NIFA, XYLR y DMPR en estos promotores híbridos es relativamente insensible a cambios de orientación, fase de la hélice y pequeñas distancias como ocurre con NTRC. A su vez, cuando el MRE está situado a más de 2 Kb, aunque el efecto potenciador de los sitios de unión se ve reducido sustancialmente, aún se obtienen unos niveles relativamente altos, cercanos al 50% de los obtenidos con el promotor más eficaz. Estos datos nos indican que estos activadores pueden activar la transcripción desde sitios de unión lejanos al punto de inicio de la transcripción e independientes de una posible proceso de transcripción en el fragmento de ADN que lo separa de este punto de inicio.

Sin embargo, el MRE clonado dentro de la propia unidad transcripcional, no mostró un efecto potenciador con los activadores NIFA, XYLR y DMPR, e incluso tuvo un efecto inhibitorio para NIFA y DMPR. Esto aparentemente nos sugiere que la activación mediada por estas proteínas podría no proceder desde estos sitios de unión localizados en la propia unidad transcripcional. Estos resultados contrastan con los obtenidos previamente con NTRC (Reitzer y Magasanik, 1986 y figura 16) y con la existencia de un promotor natural en que los sitios de unión del activador están situados corriente abajo (Mullin y Newton, 1993). Pero como mostramos en la figura 20, la activación desde estos sitios de unión puede ser detectada con XYLR a bajas concentraciones del activador. Sin embargo, a altas concentraciones la presencia de este MRE corriente abajo es inhibitorio. Este hecho nos indica que los activadores de σ^N pueden iniciar la transcripción desde sitios de unión situados dentro de la propia unidad transcripcional, pero no son eficientes a alta concentración de activador, ya que la alta ocupación de estos sitios interfiere con la propia maquinaria transcripcional.

Esta conclusión apoya los resultados obtenidos previamente con NTRC *in vivo* (Reitzer y Magasanik, 1986), en los que se observaba un ligero efecto potenciador de los sitios de unión clonados corriente abajo del inicio de la transcripción, e *in vitro* (Ninfa *et al.*, 1987), en los que se observaba que la activación desde sitios corriente abajo puede llegar a los niveles obtenidos desde la situación natural cuando se utilizan altas concentraciones de activador. Hay que tener en cuenta que en este último caso, la localización de los sitios de unión es distinta a la utilizada en nuestros experimentos, ya que están situados por detrás del terminador de la transcripción, con lo que se evita que la alta ocupación de los sitios de unión de NTRC interfieran con el proceso de transcripción.

La activación mediada por DCTD-L64 presenta unas características distintas al resto de activadores utilizados. Los niveles obtenidos desde el MRE en pIZ425 son bastantes altos, pero este activador no es eficiente desde el promotor sin sitio de unión, siendo los niveles casi nulos. La activación es sensible a cambios en la orientación, fase de la hélice y distancia. Desconocemos si estas diferencias las presenta el activador silvestre o se deben a la deleción amino terminal que posee esta versión constitutiva del activador. En cualquier caso, este resultado nos indica que la capacidad de activar a grandes distancias y en diferentes orientaciones, no sólo puede deberse al contexto en que se encuentre el promotor (formación de un complejo cerrado estable y ausencia de sitios para IHF), sino que también puede depender de las características del activador.

Creemos que la alta sensibilidad a cambios en la geometría de la región promotora que presenta la activación por DCTD-L64, no puede ser explicada por deficiencias de este activador en la afinidad por sus sitios de unión, ya que esto implicaría una baja concentración efectiva de activador. Los experimentos realizados con el activador XYLR a bajas concentraciones de activador (figura 21), nos indica que los niveles absolutos son menores, pero la proporción de estos entre las diferentes versiones posicionales se mantienen, lo que demuestra que una baja concentración efectiva de activador no tiene porque afectar a la capacidad relativa de

activar desde diferentes posiciones. Nosotros nos inclinamos a explicar este comportamiento de DCTD-L64 por un posible defecto en la oligomerización. Una baja concentración de XYLR reduciría la frecuencia de formación de estos oligómeros, pero una vez unido al ADN y formados los oligómeros, éstos serían suficientemente estables para activar la transcripción desde posiciones en las cuales la probabilidad de contactar con la ARNpolimerasa es baja. Si los oligómeros fueran menos estables, como podría ocurrir con DCTD-L64, la activación sería posible desde sitios favorables para contactar con la ARN-polimerasa. Sin embargo, la inestabilidad de estos oligómeros reduciría sustancialmente la probabilidad de este contacto desde posiciones desfavorables, como largas distancias o fase de la hélice inapropiada.

Esta posible inestabilidad en los oligómeros, explicaría a su vez la incapacidad de activar la transcripción desde el promotor sin MRE. Esta hipótesis está apoyada por las características que presenta este activador. Como comentamos en la introducción, DCTD es un activador que posee un dominio represor. DCTD-L64 es un mutante constitutivo gracias a una delección de 64 aminoácidos en este dominio, pero esta delección no es completa y el fragmento restante podría estar interfiriendo con el resto de la proteína reduciendo la estabilidad de los oligómeros. Es de resaltar que otro mutante de delección de extremo amino (DCTD-L143), que es casi completa, se caracteriza por tener unos niveles demasiados elevados en ausencia de sitios de unión (comunicación personal de T. R. Hoover), y con DCTD-L64 sorprenden los niveles casi nulos obtenidos desde pIZ413 incluso a altas concentraciones de IPTG. Si esto es cierto, aunque desconocemos como actuaría el activador silvestre, las diferencias observadas en DCTD-L64 se deberían a las características que le proporciona el tipo de mutación.

El punto de inicio de la transcripción respecto del sitio de unión de la ARN-polimerasa- σ^N , puede presentar variaciones en pocos nucleótidos de unos promotores a otros. Hemos analizado la capacidad de activación por diferentes activadores y posiciones de sus sitios de unión en un mismo contexto del promotor, para determinar si el punto de inicio de la transcripción se ve

influenciado por el activador, o por su posición respecto del sitio de unión de la ARN-polimerasa. Los resultados muestran claramente que el punto de inicio de la transcripción no depende de cual sea el activador ni desde que posición active, y apoyan la teoría de que el sitio de inicio de la transcripción es seleccionado de acuerdo a la posición del sitio catalítico de la ARN-polimerasa con respecto a la secuencia de ADN (Frederick and Helmann, 1997). Sin embargo, si puede verse influenciado por las condiciones metabólicas en las que se encuentre la bacteria, probablemente debido a cambios en las concentraciones relativas de dNTPs en la célula.

Todos estos resultados parecen indicar, salvo pequeñas diferencias y lo comentado sobre el activador DCTD-L64, que todos los activadores estudiados en condiciones de ausencia de sitio para IHF y un sitio de unión de alta afinidad para la ARN-polimerasa- σ^N , tienen la capacidad de activar la transcripción desde sitios de unión situados a grandes distancias, en diferentes orientaciones y posiciones respecto del sitio de unión de la ARNpolimerasa. Esta característica, que no podría observarse en sus promotores naturales por poseer estos un sitio de unión para la proteína IHF que restringe la geometría del proceso de activación, confirma la idea más generalizada de que el mecanismo de funcionamiento descrito para NTRC es común a todos los activadores dependientes del factor σ^N . Aunque sólo hemos estudiado algunos de estos activadores, no nos parece arriesgado generalizar esta característica a todos los activadores dependientes de σ^N . Ya que los activadores utilizados, además de ser los más estudiados, representan todas las variantes que se han descrito en cuanto a la forma de modulación de la actividad de los reguladores de σ^N (Shingler, 1996), que puede ser por fosforilación (NTRC y DCTD), por interacción proteína-proteína (NIFA), por unión directa de un efector (XYLR y DMPR). A su vez, su dominio modulador amino-terminal puede funcionar como dominio represor (DCTD, XYLR y DMPR), o como dominio activador (NTRC). Sin embargo, aunque nos inclinamos a pensar que las características diferentes que muestra el activador DCTD-L64 se deban a la delección que posee, por lo tanto no están presente en el activador silvestre, estos datos nos muestra la posibilidad de la

existencia de activadores naturales, que no posean esta versatilidad en la localización de sus sitios de unión desde la que podrían actuar.

Como se muestra en el trabajo anterior con el promotor *nifH*, un promotor con un sitio de unión débil para la ARNpolimerasa, necesita de la intervención de un doblez inducido por IHF para permitir una interacción del activador con la ARNpolimerasa. La activación desde el MRE en diferentes posiciones es posible gracias a que la ARNpolimerasa forma un complejo cerrado estable con su sitio de unión, al ser éste un sitio de alta afinidad. Los datos obtenidos con DCTD-L64 parecen indicar que el activador debe también formar un complejo estable para permitir la activación desde sitios poco favorables para interaccionar con la ARNpolimerasa. La necesidad de que la maquinaria transcripcional deba formar un complejo estable para permitir la transcripción desde grandes distancias, es una característica descrita en potenciadores transcripcionales eucarióticos. En promotores de ARNr de *Xenopus* se ha descrito que para que éstos sean activados desde potenciadores situados a grandes distancias, es necesario que previamente la ARNpolimerasa haya formado un complejo estable, este hecho no es estrictamente necesario si el potenciador está situado próximo al promotor (Krebs y Dunaway, 1998).

CONCLUSIONES

1. La transcripción desde el promotor *nifH* de *K. pneumoniae* es estrictamente dependiente de la proteína IHF, siendo esta dependencia más patente *in vivo* que *in vitro*.
2. Para una activación eficiente de la transcripción, desde la región promotora de *nifH* de *K. pneumoniae* se requiere un estricto posicionamiento de los factores implicados en el inicio de este proceso, siendo muy sensible a cambios en la orientación relativa de cada uno de estos factores.
3. El sitio de unión de la proteína IHF en el promotor *nifH* de *K. pneumoniae* puede ser reemplazado por una secuencia de ADN intrínsecamente doblada, sin verse afectado el nivel de activación ni la regulación por nitrógeno. Por lo tanto el papel fundamental que ejerce IHF en este promotor es estructural, debido a su capacidad de doblar el ADN.
4. La transcripción desde un determinado promotor dependiente del factor σ^N puede ser regulada por distintos activadores, y responde por lo tanto a diferentes señales ambientales.
5. Las proteínas reguladoras NIFA, NTRC, XYLR y DMPR pueden activar la transcripción desde grandes distancias y diferentes posiciones, respecto del sitio de unión de la ARNpolimerasa- σ^N , en un contexto adecuado.
6. La transcripción activa del ADN que separa los sitios de unión de los activadores y el de la ARNpolimerasa- σ^N no afecta sustancialmente a la activación mediada por estos activadores.
7. La transcripción mediada por el regulador DCTD-L64 se ve drásticamente afectada por la posición del sitio de unión del activador. Por lo tanto la capacidad de activar desde grandes distancias y diferentes posiciones no sólo puede depender del contexto en que se encuentre el promotor, sino que también puede depender de las características del activador.
8. La selección del punto de inicio de la transcripción es la misma independientemente del regulador que active la transcripción y de la posición desde la que actúe.

BIBLIOGRAFIA

- Abril, M.A., Michan, C., Timmis, K. N., y Ramos, J. L.** (1989) Regulator and enzyme specificities of the TOL plasmid-encoded upper pathway for degradation of aromatic hydrocarbons and expansion of the substrate range of the pathway. *J. Bacteriol.* **171**: 6782-6790
- Abril, M.A., y Ramos, J. L.** (1993) Physical organization of the *Pseudomonas* TOL plasmid upper pathway operon promoter. Sequence and positional requirements for XylR-dependent activation of transcription. *Mol. Gen. Genet.* **239**: 281-288.
- Adler, s. P., Purich, D. y Stadman, E. R.** (1975) Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase. Properties of PII regulatory protein and the uridyltransferase-uridylremoving enzyme. *J. Biol. Chem.* **250**: 6264-6272
- Arnott, M., Sidoti, C., Hill, S., y Merrick, M.** (1989) Deletion analysis of the nitrogen fixation regulatory gene, *nifL* of *Klebsiella pneumoniae*. *Arch. Microbiol.* **151**: 180-182.
- Atkinson, M. R., Kamberov, E. S., Weiss, R. L., y Ninfa, A. J.** (1994) Reversible uridylation of the *Escherichia coli* PII signal transduction protein regulates its ability to stimulate the dephosphorylation of the transcription factor nitrogen regulator I (NRI or NTRC). *J. Biol. Chem.* **269**: 28288-28293
- Berger, D.K., Narberhaus, F., y Kustu, S.** (1994) The catalytic domain of NifA, a bacterial enhancer-binding protein, activates transcription *in vitro*: activation is inhibited by NifL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 103-107.
- Brill, W.J., Steiner, A.L., y Shah. V.K.** (1974) Effect of molybdenum starvation and tungsten on the synthesis of nitrogenase components in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **118**: 986-989.
- Buck, M., Miller, S., Drummon, M., y Dixon, R.** (1986) Upstream activator sequences are present in the promoters of nitrogen fixation genes. *Nature.* (London) **320**: 374-378
- Buck, M., y Cannon, W.** (1989) Mutations in RNA polymerase recognition sequence of the *Klebsiella pneumoniae*. *nifH* promoter permitting transcriptional activation in absence of NifA binding to upstream activator sequences. *Nucleic. Acids Res.* **17**: 2597-2613.
- Buck, M., y Cannon, W.** (1992) Specific binding of the transcription factor σ^{54} to promoter DNA. *Nature.* **358**: 422-424

- Buck, M., Woodcock, J., Cannon, W., y Drummon, M.**, (1987) Positional requeriments for the funtion of nif-specific upstream activator sequences. *Mol. Gen. Genet.* **210**: 140-144
- Cali, B., Micca, J. L. y Stewart, V.** (1989). Genetic regulation of nitrate assimilation in *Klebsiella pneumoniae* M5a1. *J. Bacteriol.* **171**: 2666-2672
- Cases, I., de Lorenzo, V., y Pérez-Martín, J.** (1996) Involvement of σ^{54} in exponential silencing of the *Pseudomonas putida* TOL plasmid *Pu* promoter. *Mol Microbiol* **19**: 7-17.
- Chang, A. C. Y. , y Cohen, S. N.** (1978) Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.* **134**: 1141.
- Chung, C. Niemela, S. L., y Miller, R. H.** (1989) One-step preparation of competen *Escherichia coli* cells: Transformation and stoge of bacterial cells in same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **6**: 2172-2175
- Claverie-Martín, F., y Magasanik, B.** (1991) Role of integration host factor inb the regulation *glnHp2* promoter of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**: 1631-1635
- Claverie-Martín, F., y Magasanik, B.** (1992) Positive and negative effects of DNA bending on activation of transcription from a distant site. *J Mol Biol* **277**: 996-1008.
- Collado-Vides, J., Magasanik, B., Gralla, J. D.** (1991) Control site location and transcriptional regulation in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **55**: 371-394
- Contreras, A., y Drummond, M. H.** (1988) The effecto the function of the transcriptional activator NtrC from *Klebsiella pneumoniae*. of mutations in DNA-recognition helix. *Nucleic. Acid. Res.* **16**:4025-4039.
- de Lorenzo, V., Herrero, M., Metzke, M., y Timmis, K. N.** (1991) An upstream XylR- and IHF-induced nucleoprotein complex regulates the σ^{54} -dependent *Pu* promoter of TOL plasmid. *EMBO J.* **10**:1159-1167
- Drummond, M. H., Contreras, A., y Mitchenall, L.A.** (1990) The function of isolated domains and chimaeric proteins constructed from the transcriptional activators NifA and NtrC of *Klebsiella pneumoniae*. *Mol. Microbiol,* **4**: 37-44

- Dworkin, J., Jovanovic, G., y Model, P.** (1997) Role of upstream activation sequences and integration host factor in transcriptional activation by the constitutively active prokaryotic enhancer-binding protein PspF. *J. Mol. Biol.* **273**: 377-388.
- Dworkin, J., Ninfa, A.J., y Model, P.** (1998) A protein-induced bend increases the specificity of a prokaryotic enhancer-binding protein. *Genes & Dev.* **12**: 894-900
- Encleman, E. y Francis, S.** (1978) Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase. Metabolic regulation of the enzymes in the cascade. *Arch. Biochem. Biophys.* **191**: 602-612.
- Espin, G., Alvarez-Morales, A., Cannon, F., Dixon, R., y Merrick, M. J.** (1982) Cloning of the *glnA*, *ntrB* y *ntrC* genes of *Klebsiella pneumoniae* and studies of their regulation of the nitrogen fixation (*nif*) gen cluster. *Mol. Gen. Genet.* **186**: 518-524.
- Fernández, S., Pérez-Martín, J., y de Lorenzo, V.** (1995) Activation of the transcriptional activator XYLR of *Pseudomonas putida* by release of repression between functional domains. *Mol. Microbiol.* **16**: 37-44.
- Fernández, S., Shingler, V., y de Lorenzo, V.** (1994) Cross-regulation by XylR and DmpR activators of *Pseudomonas putida* suggests that transcriptional control of biodegradative operons evolves independently of catabolic genes. *J. Bacteriol.* **176**: 5052-5058.
- Flamm, E. L., y Weisberg, R. A.** (1985) Primary structure of the *hip* gene of *Escherichia coli*, and of its product, the β subunit of integration host factor. *J. Mol. Biol.* **183**: 117-128
- Fredrick, K., y Helmann, J. D.** (1997) RNA polymerase sigma factor determines start-site selection but is not required for upstream promoter element activation on heteroduplex (bubble) templates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**: 4982-4987.
- Friedman, D. I.** (1988) Integration host factor: a protein for all reasons. *Cell.* **55**: 545-554
- Frise, E., Green, A., Drummond, M.** (1994) Chimeric transcriptional activators generated *in vivo* from VnfA and AnfA of *Azotobacter vinelandii*: N-terminal domain of AnfA is responsible for dependence on nitrogenase Fe protein. *J. Bacteriol.* **176**: 6545-6549.

- Giladi, H., Koby, H., Gottesman, M. E., y Oppenheim, A.** (1992) Supercoiling, integration host factor, and a dual promoter system, participate in the control of the bacteriophage λ pL promoter. *J. Mol. Biol.* **224**: 109-121.
- Goodman, S., D., y Nash, H.** (1989) Functional replacement of a protein-induced bend in a DNA recombination site. *Nature* **341**: 251-254.
- Govantes, F. Andújar, E. y Santero, E.** (1998) Mechanism of translational coupling in the *nifLA* operon of *Klebsiella pneumoniae*. *EMBO J.* **17**: 2368-2377.
- Govantes, F., Molina-López, J.A., y Santero, E.** (1996) Mechanism of coordinated synthesis of the antagonistic regulatory proteins NifL and NifA of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **178**: 6817-6823.
- Gross, C., Loneto, M., y Losick, R.** (1992) Bacterial sigma factors. En *Transcripcional regulation*. Night, S.L., y Yamamoto, K.R., (eds) Cold Spring Harbor laboratory Press. pp. 129-176.
- Gu, B., Lee, J.H., Hoover, T.R., Scholl, D., y Nixon, B.T.** (1994) *Rhizobium meliloti* DctD, a σ^{54} -dependent transcriptional activator, may be negatively controlled by a subdomain in the C-terminal end of its two-component receiver module. *Mol. Microbiol.* **13**: 51-66.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**. 557-580
- Henderson, N., Austin, S., Dixon, R. A.** (1989) Role of metal ions negative in regulation of nitrogen fixation by the the *nifL* gene product from *Klebsiella pneumoniae*. *Mol. Gen. Genet.* **216**: 484-491
- Holtel, A., Marqués, S., Möhler, I., Jakubzik, U., y Timmis, K. N.** (1994) Carbon source-dependent inhibition of *xyl* operon during expression of the *Pseudomonas putida* TOL plasmid. *J. Bacteriol.* **176**: 1773-1776.
- Hoover, T., Santero, E., Porter, S., y Kustu, S.** (1990) Integration host factor stimulates interaction of RNA polymerase with NifA, the transcriptional activator for nitrogen fixation operons. *Cell.* **63**, 11-22.

- Hopper, S., y Böck, A.** (1995) Effector -mediated stimulation of ATPase activity by the σ^{54} -dependent transcriptional activator FhlA from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**: 2798-2803.
- Hsieh, M., Tintun, Y., y Gralla, J.** (1994) Functional roles for the glutamines within the glutamine-rich region of the transcription factor σ^{54} . *J. Bacteriol.* **269**: 373-378.
- Huala, E., Stigter, J., y Ausubel, F. M.** (1992) The central domain of *Rhizobium leguminosarum* DctD functions independently to activate transcription. *J. Bacteriol.* **174**: 1428-1431.
- Huala, E., y Ausubel, F. M.** (1989) The central domain of *Rhizobium meliloti* NifA is sufficient to activate transcription from the *R. meliloti nifH* promoter. *J. Bacteriol.* **172**: 3354-3365.
- Inoue, H., Nojima, H. y Okayama, H.** (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 4762-4766
- Ish-Horowicz, D., y Burke, J. F.** (1981) Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic. Acid. Res.* **9**: 2989
- Kamberov, E. S., Atkinson, M. R. y Ninfa, A. J.** (1995) The *Escherichia coli* PII signal transduction protein is activated upon binding 2-ketoglutarate and ATP. *J. Biol. Chem.* **270**: 17797-17807
- Keener, J., Wong, P., Popham, D., y Kustu, S.** (1987) A sigma factor and auxiliary proteins required for Nitrogen-regulated transcription in enteric bacteria. In *RNA Polymerase and the Regulation of Transcription*. Reznikoff, W. S., et al (eds.) Elsevier Science Publishing Co., Inc. pp. 159-175.
- Klose, K. E., North, A. T., Stedman, K. M., y Kustu, S.** (1994) The major dimerization determinants of nitrogen regulatory protein NtrC from enteric bacteria lie in its carboxy-terminal domain. *J. Mol. Biol.* **241**: 233-245.
- Klose, K. E., Weiss, D. S. y Kustu, S.** (1993) Glutamate at the site of phosphorylation of nitrogen-regulatory protein NtrC mimics aspartyl-phosphate and activates de protein. *J. Mol. Biol.* **232**: 67-78.
- Koo, H. S., y Crothers, D. M.** (1988) calibration of DNA curvature and a unified description of sequence-directed bendind. *Proc. natl. Acad. Sci. USA.* **85**: 1763-1767.

- Krebs, J. E., y Dunaway M. (1998)** The *scs* and *scs'* insulator elements impart a *cis* Requirement on enhancer-promoter interactions. *Mol. Cell* **1**: 301-308.
- Kunkel, T.A. (1985)** Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc. natl. Acad. Sci. USA.* **82**: 488-492
- Kustu, S., North, A. K., y Weiss, D. S. (1991)** Prokariotic transcriptional enhancers and enhancer-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* **16**: 397-402.
- Kustu, S., Santero, E., Keener, J., Popham, D. y Weiss, D. (1989).** Expression of σ^{54} (*ntrA*)-dependent genes is probably united by a common mechanism. *Microbiol. Rev.* **53**, 367-376.
- Kustu, S., Sei, K., y Keener, J. (1986)** Nitrogen regulation in enteric bacteria. In *Regulation of Gene Expression*. Booth, I., and Higgins, C. (eds.) Cambridge University Press. pp. 139-154.
- Ledebur, H., y Nixon, T. (1992)** Tandem DctD-binding sites of the *Rhizobium meliloti* *dctA* upstream activating sequence are essential for optimal function despite a 50- to 100-fold difference in affinity for DctD. *Mol. Microbiol.* **6**: 3479-3492.
- Lee, H.S., Berger. D.K., y Kustu, S. (1993)** Activity of purified NifA, a transcriptional activator of nitrogen fixation genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 2266-2270.
- Lee, J.H., Scholl, D., Nixon, T., y Hoover, T. (1994)** Constitutive ATP hydrolysis and transcription activation by a stable truncated form of *Rhizobium meliloti* DctD, a σ^{54} -dependent transcriptional activator. *J. Biol. Chem.* **269**: 20401-20409.
- Lee, J.H., y Hoover, T. (1995)** Protein- crosslinking studies suggest that *Rhizobium meliloti* C4-dicarboxylic acid transport protein D , a σ^{54} -dependent transcriptional activator, interacts with σ^{54} and the β subunit of RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 9702-9706.
- Macián, F., Pérez-Roger, I., y Armengod M.E. (1994)** An improved vector system for constructing transcriptional *lacZ* fusions: analysis of the regulation of *dnaA*, *dnaN*, *recF* and *gyrF* genes of *Escherichia coli*. *Gene* **145**: 17-24.

- MacNeil, T., MacNeil, D. y Tyler, B.** (1982) Fine-structure deletion map and complementation analysis of the *glnA-glnL-glnG* region in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.***150**: 1302-1313.
- Magasanik, B.** (1989) Gene regulation from sites near and far. *The New Biologist* **1**: 247-251.
- Marqués, S., Ramos, J. L. y Timmis, K. N.** (1993) Analysis of the mRNA structure of the *Pseudomonas putida* TOL *meta* fission pathway operon around the transcription initiation point, the *xylTE* and the *xylFJ* regions. *Biochim. Biophys. Acta.* **1216**: 227-236.
- Merrick, M.** (1992) Regulation of nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic bacteria. En: *Biological nitrogen fixation*. Stacey G., Burris R., y Evans H. (eds) Chapman&Hall. New York. pp. 835-876.
- Merrick, M.** (1993) In a class of its own - the RNA polymerase sigma factor σ^{54} (σ^N) *Mol. Microbiol.***10**: 903-909.
- Merrick, M. y Chambers, S.** (1992). The helix-turn-helix motif of σ^{54} is involved in recognition of the -13 promoter region. *J. Bacteriol.***174**: 7221-7226.
- Merrick, M. y Edwards, R. A.** (1995) Nitrogen control in bacteria. *Microbiol. Rev.* **59**: 604-622
- Merrick, M., Gibbins, J., y Toukdarian, A.** (1987) The nucleotide sequence of sigma factor gene *ntrA* (*rpoN*) of *Azotobacter vinelandii*: Analysis of conserved sequences in NtrA proteins. *Mol. Gen. Genet.* **210**: 323-330.
- Merrick, M., Hill, S., Hennecke, H., Hahn, M., Dixon, R. y Kennedy, C.** (1992) Repressor properties of the *nifL* gene product of *Klebsiella pneumoniae*. *Mol. Gen. Genet.* **185**: 75-81.
- Miller, J. H.** (1992) *A short course in bacterial genetics: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N.Y. pp. 72-74.
- Molina-López, J.A., Govantes, F., y Santero, E.** (1994) Geometry of the process of transcription activation at the σ^{54} -dependent *nifH* promoter of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* **269**: 25419-25425.
- Morett, E., Cannon, W., y Buck, M.** (1988) The DNA binding domain of the transcriptional activator protein NifA resides in its

carboxy terminus, recognises the upstream activator sequences if *nif* promoters and can be separated from the positive control functions of NifA. *Nucleic. Acids. Res.* **16**:11469-11488.

Morett, E., Kreutzer, R., Cannon, W., y Buck, M. (1990) The influence of the *Klebsiella pneumoniae* regulatory gene *nifL* upon transcriptional activator *nifA*. *Mol. Microbiol.* **4**, 1253-1254

Morett, E., y Buck, M. (1989) In vivo studies on the interaction of RNA polymerase- σ^{54} with the *Klebsiella pneumoniae* and *Rhizobium meliloti nifH* promoters. The role of NifA in the formation of an open promoter complex. *J. Mol. Biol.* **210**: 65-77.

Morett, E., y Segovia, L. (1993) The σ^{54} bacterial enhancer-binding protein family: mechanism of action and phylogenetic relationship of their functional domains. *J. Bacteriol.* **175**: 6067-6074.

Mullin, D. A., y Newton, A. (1993) A σ^{54} promoter and downstream sequences elements *ftr2* and *ftr3* are required for regulated expression of divergent transcription units *flaN* and *flaG* in *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* **175**: 2067-2076.

Nash, H. A. (1996) The *E. coli* HU and IHF proteins: accessory factors for complex protein-DNA assemblies. En *Regulation of gene expression in Escherichia coli*. Lin E. C. C. y Lynch A. S. (eds.). R. G. Landes Company, New York, N.Y. pp. 149-179.

Ninfa, A., Reitzer, L., y Magasanik, B. (1987) Initiation of transcription at the bacterial *glnAp2* promoter by purified *E. coli* components is facilitated by enhancers. *Cell* **50**: 1039-1046.

Ninfa, A., y Bennett, R. L. (1991) Identification of the site of autophosphorylation of the bacterial protein kinase/phosphatase NRII. *J. Biol. Chem.* **266**: 6888-6893

Ninfa, A., y Magasanik, B. (1986) Covalent modification of the *glnG* product NRI, by de the *glnL* product, NRII, regulated transcription of teh *glnALG* operon in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**: 5909-5913.

Nixon, B.T., Ronson, C. W., Ausubel, F. M. (1986) Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntrB* and *ntrC*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**: 7850-7854.

- North, A. K., Klose, K. E., Stedman, K. M., y Kustu, S.** (1993) Procaryotic enhancer-binding proteins reflect eukaryote-like modularity: The puzzle of nitrogen regulatory protein C. *J. Bacteriol.* **175**: 4267-4273.
- Ow, D. W., y Ausubel, F. M.** (1983) Regulation of nitrogen metabolism genes by *nifA* gene product in *Klebsiella pneumoniae*. *Nature* **301**: 307-313
- Parkinson, J., y Kofoid, E. C.** (1992) Communication modules in bacteria signaling proteins. *Ann. Rev. Genet.* **26**: 71-112.
- Pérez-Martín, J., Timmis, K.N., y de Lorenzo, V.** (1994) Co-regulation by bent DNA: functional substitutions of the IHF site at the σ^{54} -dependent promoter *Pu* of the upper-TOL operon by intrinsically curved sequences. *J. Biol. Chem.* **269**: 22657-22662.
- Pérez-Martín, J., y de Lorenzo, V.** (1995) Integration host factor supresses promiscuous activation of the σ^{54} -dependent promoter *Pu* of *Pseudomonas putida*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 7277-7281.
- Pérez-Martín, J., y de Lorenzo, V.** (1996a) *In vitro* activities of an N-terminal truncated for of XylR, a σ^{54} -dependent transcriptional activator of *Pseudomonas putida*. *J. Mol. Biol.* **258**: 575-587.
- Pérez-Martín, J., y de Lorenzo, V.** (1996b) Physical and functional analysis of the prokaryotic enhancer of the σ^{54} -promoters of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida*. *J. Mol. Biol.* **258**: 562-574.
- Pérez-Martín, J., y de Lorenzo, V.** (1996c) VTR expression cassettes for engineering conditional phenotypes in *Pseudomonas*: activity of the *Pu* promoter of the TOL plasmid under limiting concentrations of the XylR activator protein. *Gene* **172**: 81-86.
- Pérez-Martín, J., y de Lorenzo, V.** (1996d) ATP binding to the σ^{54} -dependent activator XylR trggers a protein multimerization cycle catalyzed UAS DNA. *Cell* **86**:331-339
- Popham, D., Szeto, D., Keener, J., y Kustu, S.** (1989) Function of a bacterial activator protein that binds to transcriptional enhancers. *Science* **243**: 629-935.
- Porter, S. North, A., Wedel, A., y Kustu, S.** (1993) Oligomerization of NtrC at the *glnA* enhancer is required for transcriptional activation. *Genes & Dev.* **7**: 2258-2273.

Prodromou, C. y Pearl L.H. (1992) Recursive PCR: a novel technique for total gene synthesis. *Protein Engineering* **5**: 827-829.

Reitzer, L., Moversusas, B., y Magasanik, B. (1989) Activation of *glnA* transcription by nitrogen regulator I (NRI)-phosphate in *Escherichia coli*: evidence for a long-range physical interaction between NRI-phosphate and RNA polymerase. *J. Bacteriol.* **171**: 5512-5522.

Reitzer, L., y Magasanik, B. (1986) Transcription of *glnA* in *E. coli* is stimulated by activator bound to sites far from the promoter. *Cell* **45**: 785-792.

Rippe, K., Guthold, M., von Hippel, P.H., y Bustamante, C. (1997) Transcriptional activation *via* DNA-looping: visualization of intermediates in the activation pathway of *E. coli* RNA polymerase- σ^{54} holoenzyme by scanning force microscopy. *J. Mol. Biol.* **270**: 125-138.

Ronson, C. W. (1988) Genetic regulation of C4-dicarboxylate transport in rhizobia. En: *Nitrogen Fixation: Hundred years after*. Bothe, H., deBruijn, F. J. y Newton, W. E.(eds.) Stuttgart: Gustav Fischer. pp.547-551

Ronson, C. W., Aswood, P. M., Nixon, B. T., y Ausubel, F. M. (1987) Deduced products of C4-dicarboxylate transport regulatory genes of *Rhizobium leguminosarum* are homologous to nitrogen regulatory gene products. *Nucl. Acid. Res.* **15**: 7921-7934

Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.

Santero, E., Hoover, T., Keener, J., y Kustu, S. (1989) *In vitro* activity of the nitrogen fixation regulatory protein NifA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 7346-7350.

Santero, E., Hoover, T., Noth, A. K., Berger, D. K., Porter, S. C., y Kustu, S. (1992) Role of integration host factor in stimulating transcription from the σ^{54} -dependent *nifH* promoter. *J. Mol. Biol.* **227**: 602-620.

Sasse-Dwight, S., y Gralla, J. D. (1988) Probing the *Escherichia coli glnALG* upstream activation mechanism *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**: 8934-8938.

- Schild, C., Claret, F. X., Wahli, W., y Wollfe A. P.** (1993) A nucleosome-dependent static loop potentiates estrogen-regulated transcription from *Xenopus vitellogenin* B1 promoter *in vitro*. *EMBO J.* **12**: 423-433
- Shingler, V.** (1996) Signal sensing by σ^{54} -dependent regulators: de-repression as a control mechanism. *Mol. Microbiol.* **19**: 409-416
- Shingler, V. Bartilson, M., y Moore, T.** (1993) Cloning and nucleotide sequence of the positive regulator DmpR, of the phenol catabolic pathway of pVI150: a member of the NtrC family of transcriptional activators. *J. Bacteriol.* **175**: 1595-1604.
- Shingler, V. y Pavel, H.** (1995) Direct regulation of the ATPase activity of the transcriptional activator DmpR by aromatic compounds. *Mol. Microbiol.* **17**: 505-513
- Stalder, R. y Arber, W.** (1989) Characterization of *in vitro* constructed IS30-flanked transposons. *Gene* **76**: 187-193.
- Stephen, D., Jones y Shofield, J.P.** (1990) A rapid method for isolation of high quality plasmid DNA suitable for DNA sequencing. *Nucleic. Acids Res.* **18**: 7463-7464
- Stock, J. B., Ninfa, A. J. y Stock, A. M.** (1989) Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol. Rev.* **78**: 450-490
- Su, W., Porter, S., Kustu, S., y Echols, H.** (1990) DNA-looping and enhancer activity: association between DNA-bound activator and RNA polymerase at the bacterial *glnA* promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 5504-5508.
- Sze, C.C., Moore, T., y Shingler, V.** (1996) Growth phase-dependent transcription of the sigma(54)-dependent *Po* promoter controlling the *Pseudomonas*-derived (methyl)phenol *dmp* operon of pVI150. *J. Bacteriol.* **178**: 3727-3735.
- Wedel, A. y Kustu, S.** (1995) The bacterial enhancer-binding protein NTRC is a molecular machine: ATP hydrolysis is coupled to transcriptional activation. *Genes & Dev.* **9**: 2042-2052.
- Wedel, A., Weiss, D., Popham, D., Droge, P., y Kustu, S.** (1990) A bacterial enhancer functions to tether a transcriptional activator near a promoter. *Science* **248**: 486-490.
- Weisberg, R. A., Freundlich, M., Friedman, D., Garner, J., Goosen, H., Nash, H. A., Oppenheim, A., Rouviere-Yaniv, J.**

(1996) Nomenclature of the genes encoding IHF. *Mol. Microbiol.* **19**: 462.

Weiss, D., Batut, L., Klose, K., Keener, J., y Kustu, S. (1991) The phosphorylated form of the enhancer-binding protein NtrC has an ATPase activity that is essential for activation of transcription. *Cell* **67**: 155-167.

Wong, C., y Gralla, J.D. (1992). A role for the acidic trimer repeat region of transcription factor σ^{54} in setting the rate and temperature dependence of promoter melting *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **267**: 24762-24768.

Wooton, J. C., y Drummond, M. H. (1989) The Q-linker: a class of interdomain sequences found in bacterial multidomain regulatory proteins. *Protein Eng.* **2**: 535-543.

Wu, H. M., y Crothers, D. M. (1984) The locus of sequence-directed and protein-induced DNA bending. *Nature* (London). **308**: 509-513

Wyman, C., Rombel, I., North, A., Bustamante, C., y Kustu, S. (1997) Unusual oligomerization required for activity of a bacterial enhancer-binding protein. *Science* **275**: 1658-1661.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

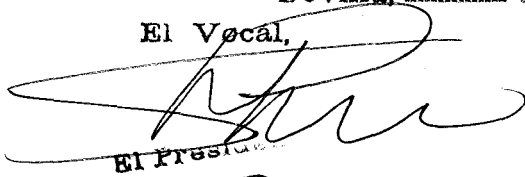
Reunido el Tribunal Ingeniería por los abajo firmantes
en el día de la fecha, para juzgar la tesis Doctoral de
D. José Antonio Melina López

titulada Genebrina del inicio de la transcripción
de promotores dependiente del factor σ_N

acordó otorgarle la calificación de sobresaliente con laude
por unanimidad

Sevilla, 15 de Diciembre 1998

El Vocal,



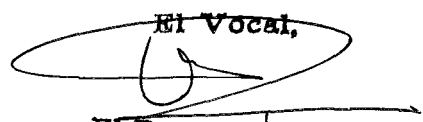
El Presidente

El Vocal,

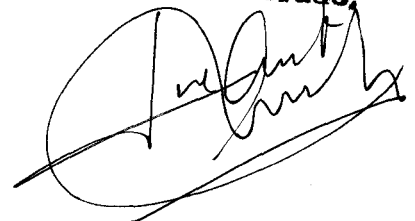


El Secretario,

El Vocal,



El Doctorado,



* 5 0 1 2 1 2 9 4 8 *

FBI E TD / 422