

TD/430

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE GENETICA

REGULACION DE LA SINTESIS COORDINADA DE NifL Y NifA EN
Klebsiella pneumoniae.

Fernando Govantes Romero

TESIS DOCTORAL

Sevilla, mayo de 1996

TD

R. 13821

REGULACION DE LA SINTESIS COORDINADA DE NifL Y NifA EN
Klebsiella pneumoniae.



Memoria presentada por el licenciado **Fernando Govantes Romero** para optar al grado de Doctor en Biología.

A handwritten signature in cursive script, reading "F. Govantes", underlined.

Sevilla, a 20 de mayo de 1996.

Vº Bº. El Director

A handwritten signature in cursive script, reading "E. Santero", with a large circular flourish around the name.

Fdo: Eduardo Santero Santurino.

Profesor titular del Departamento de Genética.

Universidad de Sevilla.

Queda registrada esta Tesis Doctoral
 al folio 104 número 304 del libro
 correspondiente.

INDICE

Sevilla, 10 de Mayo 1995
 El Jefe del Negociado de Tesis,

Alcira Raffill

INTRODUCCION

1

1. La fijación biológica del nitrógeno. Visión general.

1

2. El sistema de fijación de nitrógeno (*nif*) de *K. pneumoniae*.

3

3. Regulación de la fijación de nitrógeno en *K. pneumoniae*.

9

4. Mecanismo general de activación de los promotores dependientes de σ^N .

12

5. El operón *nifLA* y sus productos.

19

6. Polaridad y terminación dependiente de Rho.

23

7. Acoplamiento traduccional.

27

OBJETIVOS

33

MATERIALES Y METODOS

35

1. Estirpes bacterianas.

35

2. Plásmidos.

36

3. Medios y condiciones de cultivo.

41

4. Antibióticos y otras adiciones.

42

5. Conservación de las estirpes bacterianas.

43

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

43

7. Preparación de células electrocompetentes y electroporación de <i>E. coli</i> y <i>K. pneumoniae</i>	44
8. Transferencia de plásmidos y movilización de marcadores cromosómicos por conjugación.	45
9. Preparación de ADN plasmídico a pequeña escala.	46
10. Preparación de ADN plasmídico a gran escala y purificación mediante ultracentrifugación en gradiente de cloruro de cesio.	47
11. Preparación de ADN total de <i>K. pneumoniae</i>.	48
12. Electroforesis convencional de ADN en gel de agarosa.	48
13. Electroforesis de ADN en gel de poliacrilamida.	49
14. Aislamiento y purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa y poliacrilamida.	49
15. Digestión, modificación y ligación de fragmentos de ADN.	50
16. Preparación de ARN.	51
17. Detección de secuencias de ADN por hibridación en filtro (Southern blot).	52
18. Detección de secuencias de ARN por hibridación en filtro (Northern blot).	53
19. Secuenciación de ADN.	54
20. Ensayos de actividad β-galactosidasa.	54
21. Mutagénesis dirigida.	55
22. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida-SDS.	56

RESULTADOS	57
1. Efecto del desequilibrio de la dosis génica entre <i>nifL</i> y <i>nifA</i> sobre la expresión del promotor de <i>nifH</i>.	57
1.1. Construcción de duplicaciones del operón <i>nifLA</i> en el cromosoma de <i>K. pneumoniae</i> .	58
1.2. Cinética de expresión del promotor <i>nifH</i> en presencia de las duplicaciones del operón <i>nifLA</i> .	61
2. Efecto de la terminación prematura de la traducción de <i>nifL</i> sobre la expresión de <i>nifA</i>.	63
2.1. Construcción de fusiones <i>nifLA-lac</i> en bajo número de copias.	64
2.2. Ensayo de la actividad de las fusiones <i>nifLA-lac</i> .	67
2.3. Análisis por Northern blot del ARNm de <i>nifLA</i> .	69
3. Análisis de las señales implicadas en la polaridad en el operón <i>nifLA</i>.	71
3.1. Búsqueda por ordenador de posibles terminadores dependientes de Rho en el ARNm de <i>nifLA</i> .	71
3.2. Clonación de fragmentos del operón <i>nifLA</i> en un vector sonda de terminadores	72
3.3. Análisis de la actividad terminadora de la transcripción de los fragmentos del operón <i>nifLA</i> .	75
3.4. Correlación entre el tamaño de las "burbujas" C>G y la eficiencia de la terminación.	77

3.5. Construcción de fusiones <i>nifLA-lacZ</i> en alto número de copias.	79
3.6. Actividad de las fusiones <i>nifLA-lacZ</i> en alto número de copias.	81
4. Análisis del acoplamiento traduccional en <i>nifLA</i>.	83
4.1. Superproducción de los productos del operón <i>nifLA</i> con la ARN polimerasa de T7.	83
4.2. Análisis de las señales implicadas en el acoplamiento traduccional del operón <i>nifLA</i> .	89
4.2.1. Análisis estructural de la región de iniciación de la traducción de <i>nifA</i> .	89
4.2.2. Mutagénesis dirigida de la región de iniciación de la traducción de <i>nifA</i> .	90
4.2.3. Análisis de la traducción independiente de <i>nifA</i> en los mutantes contruidos.	90
DISCUSION	94
1. El desequilibrio de la dosis génica <i>nifL:nifA</i> provoca la desregulación de los genes <i>nif</i> .	95
2. La terminación prematura de la traducción de <i>nifL</i> es polar sobre <i>nifA</i> .	96
3. La traducción de <i>nifA</i> está acoplada a la de <i>nifL</i> .	100
CONCLUSIONES	105

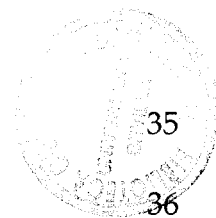
BIBLIOGRAFIA

107

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la agrupación <i>nif</i> de <i>K. pneumoniae</i> .	4
Figura 2. Esquema de la cascada regulatoria del sistema general de control del nitrógeno (<i>ntr</i>).	10
Figura 3. Regulación en cascada de la expresión de los genes <i>nif</i> en <i>K. pneumoniae</i> .	13
Figura 4. Estructura general de los activadores dependientes de σ^N .	15
Figura 5. Esquema de la activación de los promotores dependientes de σ^N .	18
Figura 6. Modelos de funcionamiento del desplazamiento de Rho a lo largo del ARNm.	26
Figura 7. Modelos de funcionamiento del acoplamiento traduccional.	31
Figura 8. Mapa físico del operón <i>nifLA</i> .	34
Figura 9. Esquema de la construcción de las duplicaciones del operón <i>nifLA</i> en el cromosoma de <i>K. pneumoniae</i> .	59
Figura 10. Esquema de las duplicaciones cromosómicas del operón <i>nifLA</i> .	60
Figura 11. Cinética de inducción de una fusión <i>nifH-lac</i> en estirpes de <i>K. pneumoniae</i> portadoras de duplicaciones cromosómicas del operón <i>nifLA</i> .	62
Figura 12. Esquema de las fusiones <i>nifLA-lac</i> .	65
Figura 13. Esquema de pJEL126 y pIZ237.	66
Figura 14. Efecto de la terminación prematura de la traducción de <i>nifL</i> sobre la actividad de las fusiones <i>nifLA-lac</i> .	68

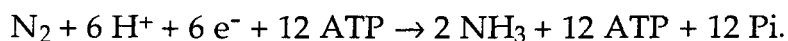
Figura 15. Northern blot del ARN total de <i>E. coli</i> ET8000 con los plásmidos portadores de las fusiones transcripcionales <i>nifLA-lac</i> .	70
Figura 16. Representación de los porcentajes de C y G en el operón <i>nifLA</i> .	73
Figura 17. Esquema del vector sonda de terminadores pIC551.	74
Figura 18. Análisis de la actividad terminadora de la transcripción en fragmentos del operón <i>nifLA</i> .	76
Figura 19. Perfil de los contenidos en C y G en las "burbujas" C>G de <i>nifLA</i> .	78
Figura 20. Fusiones <i>nifLA-lacZ</i> en alto número de copias.	80
Figura 21. Plásmidos utilizados en el sistema de expresión dependiente de la ARN polimerasa de T7.	84
Figura 22. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de los productos del operón <i>nifLA</i> silvestre y con desfases en <i>nifL</i> .	86
Figura 23. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de los productos del operón <i>nifLA</i> silvestre y con deleciones en fase en <i>nifL</i> .	88
Figura 24. Estructura secundaria predicha por ordenador de la TIR de <i>nifA</i> .	91
Figura 25. Análisis de la influencia de la estructura secundaria predicha para la TIR de <i>nifA</i> sobre la traducción independiente de este gen.	92
Tabla 1. Estirpes bacterianas utilizadas en este trabajo.	35
Tabla 2. Plásmidos utilizados en este trabajo.	36
Tabla 3. Concentraciones de agentes selectivos y otros compuestos químicos.	42
Tabla 4. Actividad de las fusiones <i>nifLA-lac</i> en alto número de copias.	82



INTRODUCCION

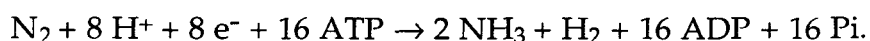
1. La fijación biológica de nitrógeno. Visión general.

La fijación biológica de nitrógeno es una reacción mediante la cual el nitrógeno molecular se reduce produciendo amonio con gasto de ATP, según la ecuación:



Esta reacción es catalizada por la metaloenzima nitrogenasa. El complejo nitrogenasa está compuesto por dos proteínas, la dinitrogenasa reductasa y la dinitrogenasa. La dinitrogenasa reductasa, también denominada Fe-proteína o componente II, es un homodímero de peso molecular aproximado 60 kDa, con cuatro átomos de hierro organizados en una agrupación Fe_4S_4 . Su función es la de donador de electrones para la dinitrogenasa. La dinitrogenasa, también denominada MoFe-proteína o componente I, es la responsable de catalizar la reacción de la fijación de nitrógeno. Estructuralmente es un heterotetrámero $\alpha_2\beta_2$ de peso molecular aproximado 250 kDa, que contiene treinta átomos de hierro y dos de molibdeno, organizados en dos pares de agrupaciones metálicas denominadas agrupaciones P y cofactores de hierro y molibdeno (FeMo-co) (Dean et al, 1993). Se han descrito en algunos organismos sistemas alternativos de fijación de nitrógeno que no utilizan molibdeno, pero las proteínas implicadas son estructural y funcionalmente muy similares a las del sistema de fijación de

nitrógeno convencional (Bishop y Premakumar, 1992). La nitrogenasa es una enzima con una baja especificidad y es capaz de reducir otros sustratos. En condiciones fisiológicas, la nitrogenasa reduce protones para producir hidrógeno molecular a razón de una molécula de hidrógeno producida por molécula de nitrógeno fijada, por lo cual, la ecuación descrita debe modificarse de la forma siguiente:



Los componentes de la nitrogenasa se sintetizan en forma inactiva. Se requiere la acción de toda una batería de proteínas para la conversión de estas apoproteínas en sus formas activas. Resulta particularmente llamativo que hacen falta al menos seis productos génicos específicos para la síntesis del FeMo-co y su incorporación a la dinitrogenasa (Dean et al, 1993). Los electrones necesarios para la reducción del nitrógeno son transferidos a través de una cadena de transporte de electrones que también es específica de la fijación de nitrógeno. En *K. pneumoniae* se ha determinado que el piruvato actúa como primer donador de electrones, y que éstos se transfieren secuencialmente a una sulfoferroproteína, a una flavodoxina, a la dinitrogenasa reductasa y finalmente a la dinitrogenasa (Dean y Jacobson, 1992).

Un aspecto de capital importancia para la fisiología de la fijación de nitrógeno es la extraordinaria sensibilidad a oxígeno de los dos componentes de la nitrogenasa. Entre los organismos fijadores de nitrógeno se encuentran bacterias anaerobias estrictas, anaerobias facultativas y aerobias estrictas. Los organismos fijadores aerobios o anaerobios facultativos han diseñado una serie de estrategias que les permiten evitar los efectos del oxígeno sobre la nitrogenasa (Hill, 1992). Entre éstas se encuentran una alta tasa respiratoria (*Azotobacter*, *Klebsiella*, *Azospirillum*), el confinamiento de la nitrogenasa en una estructura impermeable al oxígeno (cianobacterias formadoras de heterocistos), la presencia de proteínas transportadoras de oxígeno (leghemoglobina en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas), la inactivación reversible de la nitrogenasa (*Azotobacter*), o simplemente la represión por oxígeno de la expresión del sistema (*Klebsiella*).

En definitiva, la fijación de nitrógeno es un proceso energéticamente muy costoso, que requiere la síntesis de un gran número de proteínas y que es muy sensible a las condiciones ambientales. En este contexto no es descabellado afirmar que, al menos para los organismos fijadores en vida libre, la fijación de nitrógeno debe ser considerada una solución de emergencia en caso de no existir

otra fuente de nitrógeno disponible. Por tanto, la fijación de nitrógeno tiene que estar regulada de una manera muy estricta para evitar su expresión en condiciones en las cuales no es estrictamente necesaria (por ejemplo, en presencia de otra fuente de nitrógeno menos costosa), o no se puede llevar a cabo (por ejemplo, a concentraciones de oxígeno inhibitorias).

2. El sistema de fijación de nitrógeno (*nif*) de *Klebsiella pneumoniae*.

Los primeros trabajos que llevaron a la identificación de genes *nif* se llevaron a cabo en *K. pneumoniae*. Estudios genéticos, bioquímicos y de expresión permitieron la identificación de 17 genes de fijación de nitrógeno (Dixon et al, 1980; MacNeil et al, 1978; Roberts et al, 1980). Posteriormente, la secuencia completa de la región *nif* determinada por Arnold et al (1988) reveló que el sistema de fijación de nitrógeno de *K. pneumoniae* consta de veinte genes contiguos localizados en una región cromosómica de 24 kb. Estos veinte genes se organizan en siete operones, *nifJ*, *nifHDKTY*, *nifENX*, *nifUSVWZM*, *nifF*, *nifLA* y *nifBQ* (Figura 1). A continuación se describen algunos detalles de la estructura y función de estos genes y sus productos.

nifH, *nifD* y *nifK*. Los genes estructurales de la nitrogenasa son *nifH*, que codifica la Fe-proteína, *nifD*, que codifica la subunidad α de la MoFe-proteína y *nifK*, que codifica la subunidad β . Los tres genes son cotranscritos en el operón *nifHDKTY*.

El gen *nifH* codifica un polipéptido de 32 kDa. La Fe-proteína es un dímero de este polipéptido en el que se encuentra una agrupación sulfoférica del tipo [4Fe-4S], unida de forma simétrica entre las dos subunidades (Hausinger y Howard, 1983). Esta agrupación sulfoférica parece ser la responsable de la transferencia de electrones a la MoFe-proteína, proceso que requiere la hidrólisis de dos moléculas de ATP por cada electrón. La unión de ATP induce un cambio conformacional que disminuye el potencial redox de la agrupación sulfoférica y la hace más accesible, lo cual es coherente con que ésta sea la responsable de la transferencia de los electrones (revisado en Dean y Jacobson, 1992 y Dean et al, 1993). Se han secuenciado los genes *nifH* de una veintena de organismos. La comparación de las secuencias de los productos génicos muestra que hay cinco residuos de cisteína muy conservados, cuatro de los cuales se encuentran en regiones de alta identidad de aminoácidos. Cys-98 y Cys-133 son los ligandos de la agrupación sulfoférica y son esenciales para la actividad de la Fe-proteína

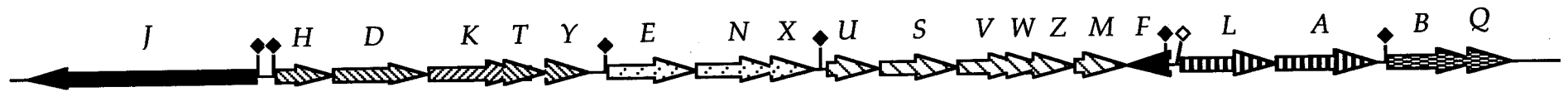


Figura 1. Esquema de la agrupación *nif* de *K. pneumoniae*. Los genes pertenecientes a un mismo operón están rellenos con el mismo patrón. Los rombos negros indican los promotores dependientes de NifA. El rombo blanco indica el promotor de *nifLA*, dependiente de NtrC.

(Howard et al, 1989). Otra característica muy conservada entre las Fe-proteínas conocidas es una secuencia semejante a los sitios de unión de ATP de las proteín-kinasas, con el consenso Gly-X-Gly-X₂-Gly-Lys-Ser, pero aún no se ha demostrado su funcionalidad. Se han encontrado también otras dos regiones conservadas con una similitud menor con sitios de unión de ATP. Además de su papel en la transferencia de electrones a la MoFe-proteína, la Fe-proteína es necesaria para el ensamblaje del cofactor de hierro y molibdeno de la MoFe-proteína (Roberts y Brill, 1980) (ver más adelante).

Los genes *nifD* y *nifK* codifican polipéptidos de 54 y 58 kDa, respectivamente, correspondientes a las subunidades α y β de la MoFe-proteína. Esta es un tetrámero con una estructura $\alpha_2\beta_2$ que contiene dos tipos de agrupaciones metálicas como grupos prostéticos. Las estructuras de estas agrupaciones se han estudiado detalladamente y su papel en la catálisis ha sido establecido. Una de las agrupaciones metálicas, denominada agrupación P, es un complejo de ocho átomos de hierro unidos a ocho de azufre en una estructura bicúbica (Kim y Rees, 1992). La otra, denominada cofactor de hierro y molibdeno o FeMo-co, contiene siete átomos de hierro y uno de molibdeno ligados a nueve átomos de azufre (Kim y Rees, 1992). El átomo de molibdeno está a su vez coordinado con un residuo de homocitrato. Cada molécula de nitrogenasa contiene dos cofactores de cada tipo. Las agrupaciones P se localizan en la interfase entre una subunidad α y una subunidad β , a las que están unidos a través de los residuos de cisteína α -Cys-62, α -Cys-88, α -Cys-154, β -Cys-70, β -Cys-95 y β -Cys-153. El FeMo-co está anclado entre los residuos Cys-275 e His-442 de la subunidad α y se localiza en el interior de ésta (Kim y Rees, 1992). Se ha propuesto un modelo para la transferencia de electrones en la nitrogenasa en el cual la agrupación sulfoférrica de la Fe-proteína dona electrones a la agrupación P en un proceso que requiere la hidrólisis de ATP y ésta los transfiere al FeMo-co, que es el sitio de reducción del sustrato (Dean et al, 1993). La comparación de las secuencias conocidas de los productos de los genes *nifD* y *nifK* de varios organismos ha revelado una alta conservación de los residuos implicados en la unión de los cofactores. Curiosamente, hay también una gran semejanza entre las regiones que rodean a los residuos de cisteína que unen a las agrupaciones P en las dos subunidades. Finalmente, hay regiones con un alto grado de identidad con los productos de los genes *nifE* y *nifN*. La importancia de esta similitud se discute más adelante.

nifF y *nifJ*. Los genes *nifF* y *nifJ* constituyen las dos unidades transcripcionales monocistrónicas presentes en los genes *nif*. Codifican los componentes de la

cadena de transporte de electrones específica del sistema *nif*. Los mutantes en *nifF* o *nifJ* son Nif⁻, pero los extractos de estas estirpes presentan actividad nitrogenasa in vitro cuando se usa el donador de electrones artificial ditionito (Hill y Kavanagh, 1980; Roberts et al, 1978). El producto de *nifF* es una flavodoxina con un peso molecular de 19 kDa. El producto de *nifJ* es una sulfoferroproteína de unos 120 kDa con actividad piruvato-flavodoxín oxidorreductasa. Su estado nativo es en forma dimérica. Se ha regenerado in vitro la cadena de transporte de electrones con las proteínas NifJ, NifF y los componentes de la nitrogenasa purificados y se ha demostrado la transferencia estequiométrica de electrones desde el piruvato, lo que establece que NifJ y NifF son los únicos componentes necesarios para el transporte de electrones (Shah et al, 1983). NifJ cataliza la descarboxilación del piruvato a acetyl-CoA acoplada a la reducción de la flavodoxina (NifF) del estado semiquinona al estado hidroquinona. No se han encontrado homólogos a *nifJ* en otros organismos, y el homólogo a *nifF* de *Azotobacter vinelandii* no es esencial para la fijación de nitrógeno, lo que indica que no hay conservación del sistema de transporte de electrones a la nitrogenasa.

***nifM*.** El gen *nifM* forma parte del operón *nifUSVWZM* y codifica un polipéptido de unos 31 kDa. Sólo ha sido identificado en *K. pneumoniae*, *A. vinelandii* y *Azotobacter chroococcum*. La homología entre las proteínas NifM de estos tres organismos es baja y está restringida al tercio carboxilo terminal, lo que sugiere que esta región contiene el sitio activo. Los mutantes *nifM* están afectados en la actividad de la Fe-proteína (Roberts et al 1978). En *E.coli*, la expresión de *nifH* en anaerobiosis produce una Fe-proteína inactiva. Cuando se expresa simultáneamente *nifM* se produce una Fe-proteína activa indistinguible de la nativa, efecto que no se observa al sustituir *nifM* por otros genes *nif* (Howard et al, 1986; Paul y Merrick, 1989). En consecuencia, NifM es el único producto *nif* necesario para la maduración de la Fe-proteína. La naturaleza de dicha maduración es desconocida hasta el momento, aunque se ha propuesto que NifM podría estar implicada en algún paso de la síntesis o la inserción de la agrupación sulfoférrica en la apoproteína (Dean et al, 1993).

***nifU* y *nifS*.** Los genes *nifU* y *nifS* se cotranscriben como parte del operón *nifUSVWZM*. Sus productos son polipéptidos de 30 y 43 kDa, respectivamente. *nifU* no parece ser esencial para la fijación de nitrógeno en *K. pneumoniae* (Roberts y Brill, 1980). Sin embargo, en *A. vinelandii* los mutantes *nifU* no son capaces de fijar nitrógeno (Jacobson et al, 1989) y estudios en este organismo sugieren que NifU está implicada en proporcionar el hierro para la formación de las agrupaciones sulfoférricas o en la protección de estas agrupaciones frente a la

inactivación oxidativa. Esta última hipótesis explicaría el hecho de que *nifU* sea esencial en *A. vinelandii*, dado que es un organismo aerobio estricto.

Los mutantes *nifS* presentan una reducción en la actividad de los dos componentes del complejo nitrogenasa (Roberts et al, 1978). La purificación de la proteína NifS ha revelado que ésta es un homodímero que contiene piridoxal fosfato y que cataliza la desulfurización de la L-cisteína, por lo que se ha propuesto que está implicada en la movilización de azufre para la síntesis de las agrupaciones sulfoférricas (Zheng et al, 1993). La posibilidad de que las funciones de NifU y NifS puedan ser desempeñadas por otros productos no específicos del sistema *nif* ha dificultado enormemente su caracterización.

nifB y *nifQ*. Los genes *nifB* y *nifQ* forman el operón bicistrónico *nifBQ*. Sus productos, de 51 y 20 kDa respectivamente, están implicados en la biosíntesis del cofactor de hierro y molibdeno (FeMo-co). La deficiencia en la síntesis del FeMo-co observada en los mutantes *nifQ* se compensa con la adición de cisteína, cistina o altos niveles de molibdeno (Ugalde et al, 1985). Este dato sugiere que NifQ está implicada en la síntesis de un precursor del FeMo-co que contiene azufre y molibdeno y que esta reacción puede ocurrir no enzimáticamente, aunque a una velocidad menor.

El gen *nifB* se ha encontrado en varios organismos diazotrofos. El análisis de las secuencias revela un agrupamiento de residuos de cisteína en el extremo amino terminal acompañados de residuos polares cargados, posiblemente implicados en la unión de un precursor del FeMo-co (Buikema et al, 1987). Los mutantes *nifB* son Nif⁻, pero la actividad nitrogenasa se regenera en extractos de estos mutantes cuando se les añade FeMo-co purificado (Shah y Brill, 1977). La idea de que NifB está involucrada en la transferencia del FeMo-co, o un precursor de éste, al complejo NifE-NifN (ver más adelante) está apoyada por el hecho de que en *Clostridium pasteurianum* las fases de lectura de *nifB* y *nifN* están fusionadas para producir un único polipéptido.

nifE y *nifN*. Los genes *nifE* y *nifN*, cotranscritos en el operón *nifENX*, codifican polipéptidos de aproximadamente 50 kDa. Los productos de ambos genes presentan una gran similitud con las subunidades de la MoFe-proteína. Se ha propuesto que, dado que la MoFe-proteína no es esencial para la síntesis del FeMo-co, NifE y NifN podrían proporcionar un contexto estructural semejante para su ensamblaje (Brigle et al, 1987). Los mutantes *nifE* y *nifN* son deficientes en la biosíntesis del FeMo-co. Al igual que los productos de *nifD* y *nifK*, ambas proteínas forman un heterotetrámero $\alpha_2\beta_2$ que contiene agrupaciones

sulfoféricas (Paustian et al, 1989). Se cree que la implicación de la Fe-proteína en la síntesis del FeMo-co es debida a la interacción con el complejo NifE-NifN para, de forma análoga a su interacción con la MoFe-proteína, catalizar un paso de reducción del precursor de FeMo-co acompañado de la hidrólisis de ATP (Robinson et al, 1987).

nifV. El gen *nifV* forma parte del operón *nifUSVWZM* y codifica un polipéptido de 41 kDa. Los mutantes *nifV* producen una MoFe-proteína con la especificidad de reconocimiento de sustrato alterada. Estudios in vitro han revelado que esta nitrogenasa tiene un FeMo-co modificado en el cual el residuo de homocitrato ha sido sustituido por un residuo de citrato (Shah et al, 1986). La comparación de la secuencia de NifV con la de algunas enzimas que utilizan acetil-CoA ha llevado a proponer que NifV es una homocitrato sintasa que cataliza la condensación de α -cetoglutarato y acetil-CoA.

nifW, *nifZ*, *nifT*, *nifY* y *nifX*. Los genes *nifW*, *nifZ*, *nifT*, *nifY* y *nifX* son los menos conocidos de todos los genes *nif*. *nifW* y *nifZ* forman parte del operón *nifUSVWZM* y codifican polipéptidos de 10 y 17 kDa, respectivamente. Se han encontrado genes homólogos en *A. vinelandii*, *A. chroococcum* y *R. capsulatus*. Ni *nifW* ni *nifZ* son necesarios para el crecimiento en condiciones de fijación de nitrógeno, aunque algunos alelos presentan una menor actividad de la MoFe-proteína (Paul y Merrick, 1989). Se ha propuesto que pueden catalizar alguna reacción en la síntesis del cofactor de molibdeno que también se puede llevar a cabo de forma no enzimática.

nifT codifica un pequeño polipéptido de 72 aminoácidos. Los mutantes *nifT* tienen fenotipo silvestre. *nifY*, el gen que lo sigue en el operón *nifHDKTY*, codifica una proteína de 25 kDa. En algunos mutantes deficientes en la biosíntesis del FeMo-co se ha observado que NifY copurifica con la apo-MoFe-proteína (Homer et al, 1993). Se ha propuesto que NifY mantiene a la apo-MoFe-proteína en una conformación apta para la inserción del FeMo-co. *nifX* se transcribe en el operón *nifENX* para producir un polipéptido de 18.2 kDa. Su producto presenta semejanzas con NifY.

nifL y *nifA*. Los productos del operón *nifLA* constituyen el sistema de control específico de los genes *nif*. Por ser el objeto fundamental de estudio en esta tesis, su estructura y función serán consideradas en detalle más adelante.

3. 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* (revisado en Merrick y Edwards, 1995). En este sistema de regulación 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 o σ^{54} 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 bajo 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 redundo en la desfosforilación de NtrC por parte de NtrB (Figura 2). 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

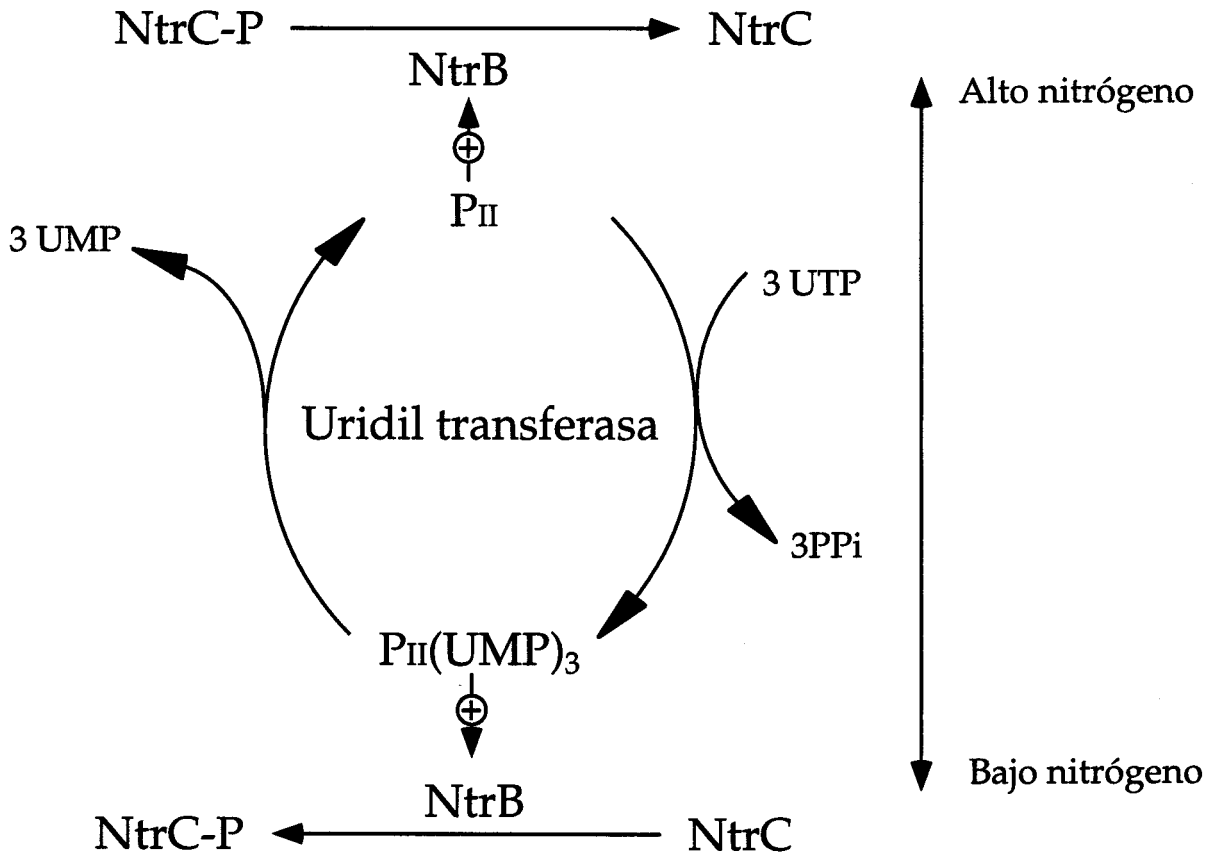


Figura 2. Esquema de la cascada regulatoria del sistema general de control del nitrógeno (*ntr*).

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).

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 3). Este control específico es ejercido por las proteínas NifL y NifA (revisado en 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; 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). 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). La estructura y función del operón *nifLA* y sus productos se discutirá en detalle más adelante.

4. Mecanismo general de activación de los promotores dependientes de σ^N .

El factor σ^N (también llamado σ^{54}) es un factor σ alternativo presente en 18 géneros pertenecientes a grupos taxonómicos de bacterias Gram negativas poco relacionados evolutivamente y en *Bacillus subtilis*. A diferencia de otros factores σ alternativos, σ^N no es específico de genes involucrados en la misma función o en funciones relacionadas, sino que es necesario para transcribir operones con

que tienen funciones fisiológicas muy diversas y están regulados por señales diferentes. Los mutantes carentes de σ^N 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 derivados de xilenos y tolueno, fitopatogénesis, etc., según la especie bacteriana (Kustu et al, 1989; Merrick, 1993).

Los factores σ^N de las distintas especies no tienen homología estructural con otros factores σ . Esta diferencia estructural tiene un reflejo funcional. Mientras que las formas de ARN-polimerasa asociadas a cualquier otro factor σ son transcripcionalmente competentes, la ARN-polimerasa con σ^N ($E-\sigma^N$) no puede iniciar la transcripción por sí misma. Cada sistema dependiente de σ^N dispone de una proteína activadora cuyo concurso es estrictamente necesario para iniciar la transcripción de los distintos genes. La regulación diferencial de los distintos sistemas reside en el control de la actividad de su regulador específico, en respuesta a una señal determinada.

Las regiones conservadas entre los promotores dependientes de σ^N se centran en las posiciones -24 y -12, con secuencias consenso TGGCAC y TTGCa/t, respectivamente (Merrick, 1993). Las secuencias más conservadas son el dinucleótido GG en la región -24, casi universalmente conservado, y el dinucleótido GC en la región -12. La presencia de timinas entre las posiciones -14 y -17, que preceden al dinucleótido GC, mejoran la afinidad de $E-\sigma^N$ por el promotor. Para que el promotor sea funcional, los dinucleótidos GG y GC deben estar orientados en la misma cara de la doble hélice. La distancia que los separa en todos los promotores es de 10 nucleótidos y la alteración de esta distancia en un solo nucleótido provoca la inactivación del promotor.

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. A diferencia de las secuencias de los activadores de $E-\sigma^{70}$, que se localizan generalmente en las posiciones -40 y -60, las de los activadores de $E-\sigma^N$ 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; Gralla, 1991). Pueden estar incluso tan separadas como 260 pb del inicio de la transcripción. Curiosamente, se ha descrito incluso una UAS activa situada por detrás del inicio de transcripción del gen *flaN* de *Caulobacter crescentus* (Mullin y Newton, 1993).

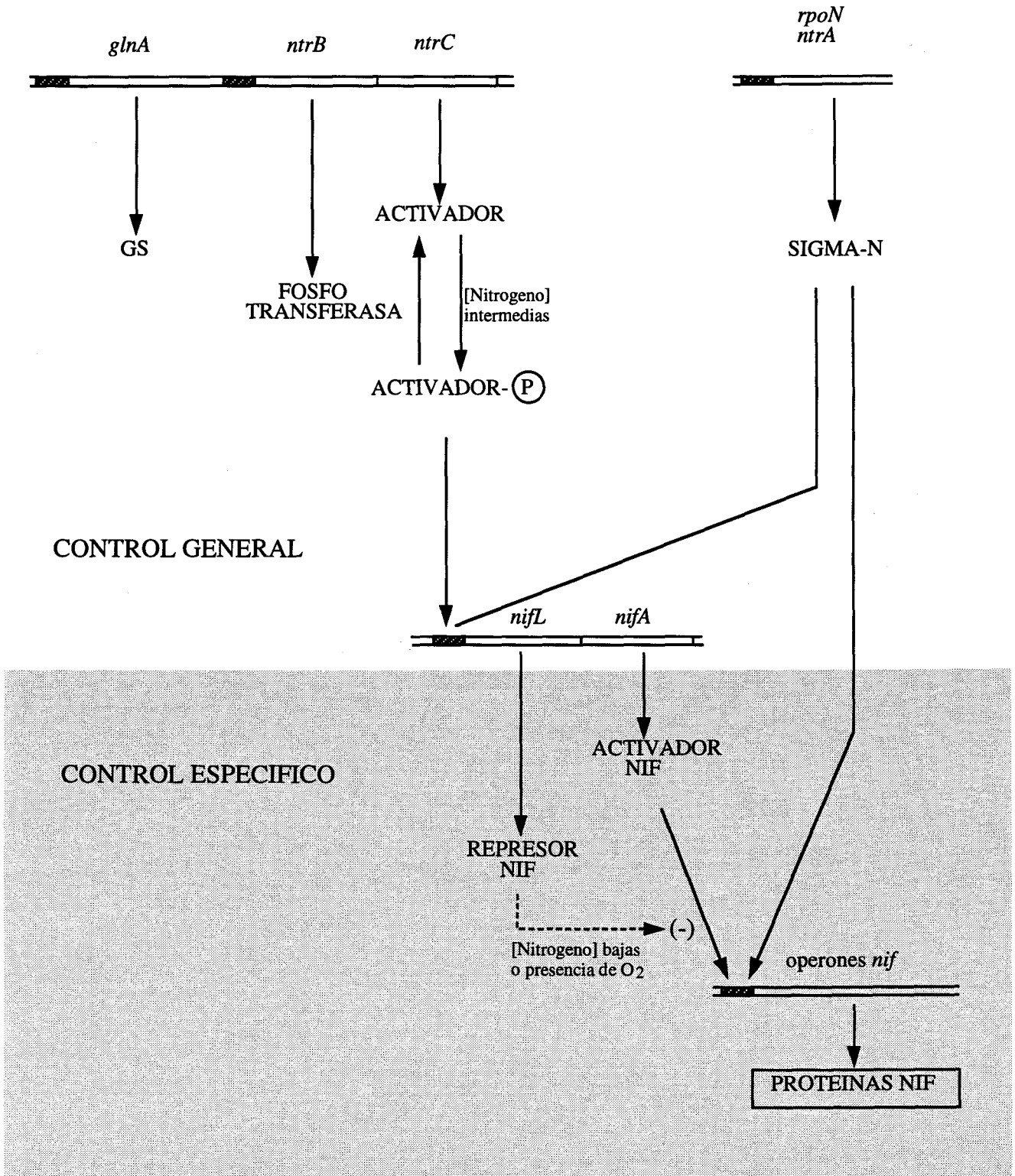


Figura 3. Regulación en cascada de la expresión de los genes *nif* en *K. pneumoniae*.

Los activadores de $E\text{-}\sigma^N$ presentan una estructura modular semejante a la de algunos reguladores de eucariontes (North et al, 1993). Constan típicamente de tres dominios (Figura 4). 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 gran similitud (Morett y Segovia, 1993). Estas proteínas pertenecen a su vez a la familia de proteínas reguladoras de los sistemas de dos componentes. El sistema de dos componentes es una forma de comunicación de proteínas que es utilizada no solo por algunos activadores de $E\text{-}\sigma^N$, sino también por reguladores de $E\text{-}\sigma^{70}$ o por proteínas no involucradas en el control de la expresión génica (Parkinson y Kofoid, 1992). Sin embargo, ésta no es la única forma de modular la función de los activadores de $E\text{-}\sigma^N$. Por ejemplo, la proteína NifA de *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 o las proteínas NifA de *Rhizobium*.

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 4) (Morett 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).

La región C1 es rica en glicina y contiene una secuencia Gly-X₂-Gly-X-G-K, presente en otras proteínas que unen ATP. En NtrC se ha demostrado que esta región es necesaria para la actividad ATPasa (Weiss et al, 1991). La región C5, también está implicada en la hidrólisis de ATP (Morett y Segovia, 1993). Algunas mutaciones en la región C3 producen una proteína con actividad ATPasa pero

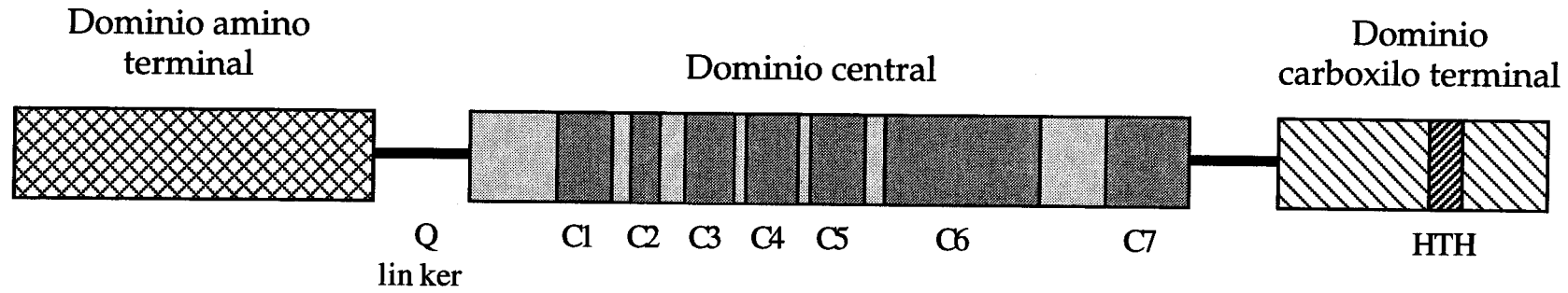


Figura 3. Estructura general de los activadores dependientes de σ^N , indicando las regiones conservadas.



deficiente en activación de la transcripción (Weiss et al, 1991). Se cree que esta región está implicada en la interacción con la ARN polimerasa.

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 que 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 (Morett y Segovia, 1993).

Se han realizado estudios con distintos activadores truncados carentes de dominios completos, con dominios aislados y la construcción de proteínas quiméricas activas. Los resultados indican claramente que las tres regiones de las proteínas activadoras constituyen dominios funcionales independientes y han permitido en muchos casos asignar a cada dominio su función correspondiente (Morett y Segovia, 1993).

El inicio de la transcripción por E- σ^N se ha caracterizado principalmente en la región promotora de *glnA*. E- σ^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 cataliza 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. Este complejo abierto es ya transcripcionalmente activo y solo necesita los ribonucleótidos sustrato; 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- σ^N , que de nuevo recuerda a la iniciación de la transcripción en eucariontes. 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 desplaza al entrar en la etapa de elongación.

La función de las UAS se ha caracterizado en detalle en el promotor del operón *glnAntrBC*. 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. Las 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 (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. La capacidad de activación de la transcripción se mantiene incluso cuando la UAS y el promotor se encuentran en dos moléculas de ADN distintas, aunque entrelazadas formando un concatenado. Este dato 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). El contacto entre el activador y E- σ^N se realiza estando éstos unidos a sus respectivos sitios de unión, formándose entonces un bucle constituido por el ADN que los separa (Figura 5, A). Estos lazos en el ADN producidos durante la activación se han observado al microscopio electrónico (Kustu et al, 1991).

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.

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- σ^N . Sin embargo, existen muchos promotores, como los de los operones estructurales *nif*, que presentan un sitio de unión de IHF y necesitan a esta proteína para obtener sus niveles máximos de expresión. El factor de integración del hospedador (IHF) de *E coli* es una pequeña proteína básica, formada por dos subunidades diferentes, regidas por dos genes no ligados, *himA* y *himD(hip)*. IHF se une a una región de ADN con la secuencia consenso WATCAAN₄TTR y produce un doblez en ángulo agudo en esta región. IHF ha sido involucrada en multitud de procesos tales como replicación, transferencia y control de la segregación de plásmidos, replicación del

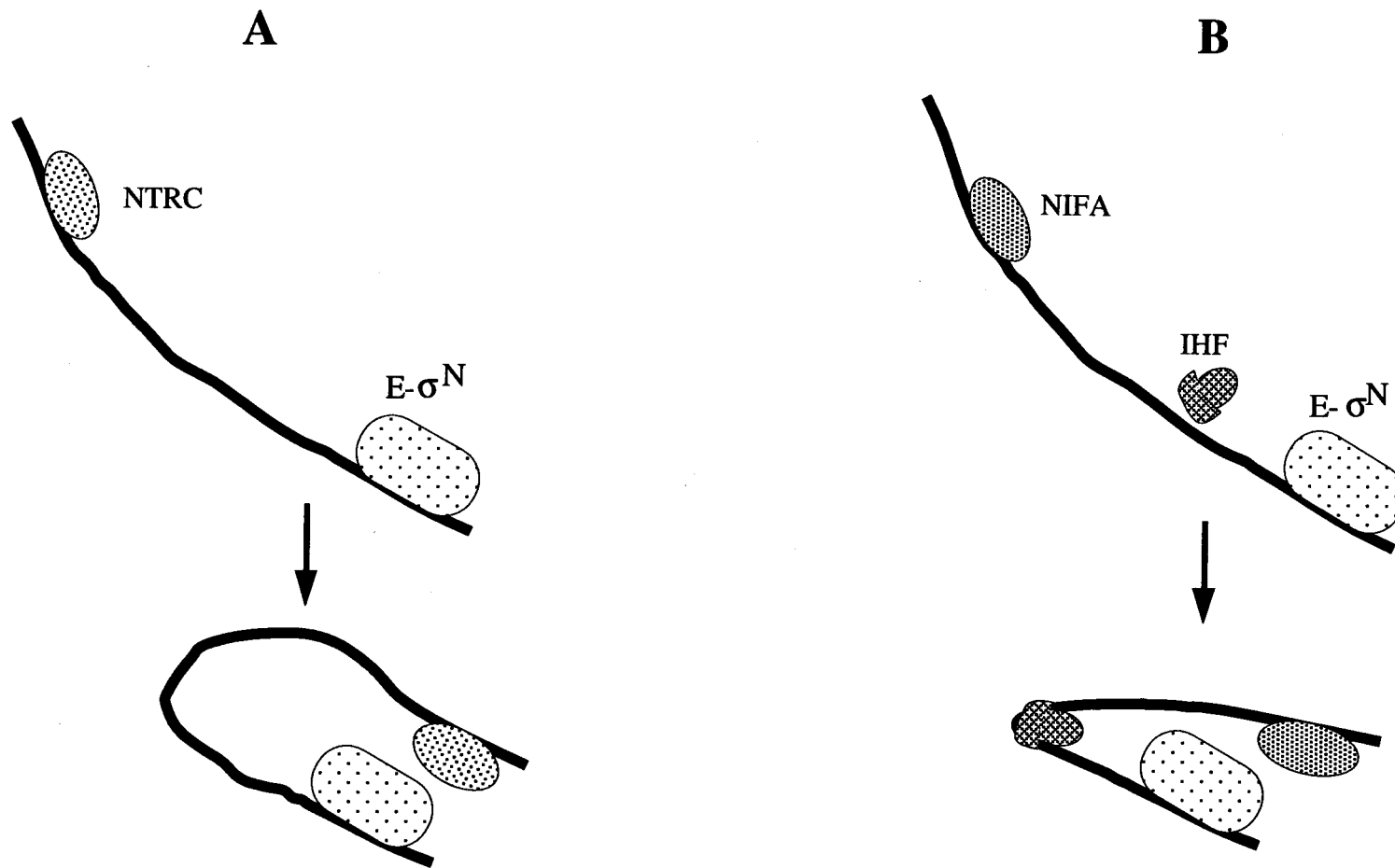


Figura 5. Esquema de la activación de los promotores dependientes de σ^N mediada por la formación de un bucle. **A.** Promotores independientes de IHF. **B.** Promotores dependientes de IHF.

cromosoma de *E. coli*, encapsidamiento de fagos, transposición y regulación de la expresión de diversos genes (Friedman, 1988). En numerosos promotores dependientes de σ^N se ha encontrado una secuencia de unión de IHF localizada entre el promotor y la UAS y se ha demostrado que IHF estimula la transcripción desde dichos promotores. El papel de IHF en estos promotores es el de coactivador, facilitando el contacto del activador con E- σ^N por medio de la formación de un doblez en el segmento de ADN que separa sus sitios de unión.

La necesidad de IHF parece depender de las características del propio promotor y no del tipo de proteína reguladora que lo activa (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 determinados promotores, evitando que ésto se traduzca en unos niveles bajos de expresión. 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- σ^N (Figura 5, B) (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- σ^N en complejo abierto tan pronto como ésta se asocia con el promotor. La sustitución funcional del sitio de unión de IHF por una secuencia de ADN con una curvatura intrínseca confirma este modelo (Molina-López et al, 1994; Pérez-Martín et al, 1994).

5. El operón *nifLA* y sus productos.

Como ya se ha dicho, el operón *nifLA* codifica las proteínas responsables de la regulación específica del resto de genes *nif* en respuesta a limitación de nitrógeno y oxígeno. Los primeros datos genéticos indicaban que *nifA* es esencial para la transcripción de todos los promotores *nif*, excepto el propio *nifLA* (Dixon et al, 1980; Buchanan-Wollaston et al, 1981), mientras que las mutaciones en *nifL* no polares sobre *nifA* conferían un fenotipo Nif⁺, pero perdían la represión por oxígeno y nitrógeno del resto de operones *nif* (MacNeil y Brill, 1980; Hill et al, 1981). Estos datos llevaron a proponer que *nifL* y *nifA* codifican respectivamente un regulador positivo y un regulador negativo específicos del sistema *nif* (Buchanan-Wollaston et al, 1981; Merrick et al, 1982).

El operón *nifLA* se localiza entre los operones operón *nifF* y *nifBQ*. El promotor que rige la transcripción de este operón es el único de los promotores *nif* que no está controlado por *nifA*. El promotor del operón *nifLA* presenta una secuencia de unión de E- σ^N localizada en las posiciones apropiadas (-12 y -24 respecto al inicio de la transcripción). La unión de E- σ^N a esta secuencia no es muy eficiente en comparación con el promotor de *glnA* (Austin et al, 1987). Centrados en las posiciones -142 y -163 se encuentran dos sitios de unión de NtrC. NtrC se une a estas dos UAS y estimula la transcripción de *nifLA*, acorde con el modelo de activación de promotores dependientes de σ^N descrito anteriormente (Minchin et al, 1989). No existe sitio de unión de IHF en este promotor. Se ha descrito un pequeño efecto del superenrollamiento sobre el promotor de *nifLA*, que sería responsable de una menor expresión en aerobiosis (Dixon et al, 1988).

La traducción de *nifL* se inicia probablemente a partir de la secuencia Shine-Dalgarno (AGGAG) situada entre las posiciones -11 y -7 con respecto al codón de iniciación. Los codones de terminación de *nifL* e iniciación de *nifA* están solapados (AUGA). *nifA* presenta una secuencia Shine-Dalgarno (GGAGG), situada entre las posiciones -11 y -7 respecto al codón de iniciación y, por tanto, dentro de la fase de lectura de *nifL*. Este solapamiento de señales se ha observado frecuentemente en pares de genes que presentan acoplamiento traduccional (McCarthy y Gualerzi, 1990).

NifA de *K. pneumoniae* es una proteína de 59 kDa que presenta la estructura en tres dominios característica de los activadores de promotores dependientes de σ^N (revisado en Morett y Segovia, 1993). Se han encontrado genes homólogos a *nifA* que rigen proteínas muy similares en un gran número de diazotrofos. NifA es una proteína extraordinariamente termosensible (Buchanan-Wollaston et al, 1981), lo que explica que la fijación de nitrógeno no se pueda llevar a cabo a 37°C. No ha sido posible purificar NifA de *K. pneumoniae* en forma activa, ya que se agrega en cuerpos de inclusión de los que no se recupera actividad NifA (Austin et al, 1990). El dominio amino terminal comprende unos 180 residuos con una baja conservación. La delección del dominio amino terminal disminuye la activación in vivo del promotor de *nifH* 3-4 veces y la hace sensible a la inhibición por NifL en todas las condiciones (Drummond et al, 1990), lo que sugiere que el papel del dominio amino terminal es liberar dicha inhibición en las condiciones apropiadas para la expresión de los genes *nif*. Sin embargo, estudios in vitro con proteínas de fusión MBP-NifA silvestre y sin el dominio amino-terminal muestran que ambas proteínas son igualmente sensibles a la inactivación por NifL (Berger et al, 1995). El dominio

central comprende 238 aminoácidos y está muy conservado. Presenta una región de unión a ATP que es necesaria para la activación in vivo (Cannon y Buck, 1992). Se ha purificado el dominio central de NifA y es capaz de activar la transcripción desde el promotor de *nifH*. Esta activación es independiente de la presencia de la UAS de unión y dependiente de la hidrólisis de NTP. Tanto la activación de la transcripción como la actividad NTPasa presentan la termosensibilidad característica de NifA (menos del 10% de actividad a 37°C) (Berger et al, 1994). El dominio carboxilo terminal presenta un dominio hélice-giro-hélice necesario para la unión a ADN in vivo (Morett et al, 1988). Se ha purificado este dominio en forma aislada y es capaz de unirse a la UAS de NifA. La unión del dominio carboxilo terminal no es termosensible y se lleva a cabo a pesar de que es un monómero en solución (Lee et al, 1993a).

El mecanismo de activación de la transcripción por parte de NifA se ajusta al propuesto para los promotores dependientes de σ^N . Se ha encontrado una familia de secuencias con el consenso TGTN₁₀AGA a más de 100 pb por delante de los promotores *nif* que son necesarias para la activación específica de dichos promotores por parte de NifA (Buck et al, 1986). Se ha demostrado mediante ensayos de protección in vivo que estas secuencias son el sitio de unión de NifA (Morett y Buck, 1988). Se ha encontrado un sitio de unión de IHF en la región comprendida entre la UAS y el sitio de unión de E- σ^N de los promotores de *nifH*, *nifE*, *nifU* y *nifB* (Beynon et al, 1983). Estudios realizados fundamentalmente en el promotor de *nifH* han demostrado que IHF estimula la activación por parte de NifA en promotores con una baja afinidad por E- σ^N (Hoover et al, 1990, Santero et al, 1992). IHF facilita los contactos productivos entre E- σ^N y la proteína activadora a través de la formación de un dobléz en el segmento de ADN que las separa (Hoover et al, 1990). El requerimiento de IHF impone unas restricciones a estos promotores en lo que respecta a la distancia de la UAS y la orientación en la cara de la hélice de ADN mucho mayores que las observadas en los promotores en los que la activación se produce a través de un bucle al azar (Molina-López et al, 1994).

NifL es una proteína de 55 kDa. Se ha propuesto una estructura en dos dominios separados por una región rica en glutaminas tipo "Q-linker" (Drummond y Wooton, 1987). El dominio amino terminal presenta una región homóloga a la proteína Bat de *Halobacterium halobium*, que es necesaria para la expresión sensible a oxígeno de la bacteriopsina (Leong et al, 1988). El dominio carboxilo terminal de NifL presenta una homología restringida a las proteínas quinasas de los sistemas de dos componentes, pero carece del residuo de histidina

que se fosforila en las proteínas de esta familia. In vivo, NifL inhibe la unión de NifA a su UAS y la activación de la transcripción (Morett et al, 1990). La inactivación de NifA parece estar mediada por la formación de un complejo inactivo NifL-NifA (Henderson et al, 1989). El modo en que NifL detecta las concentraciones de nitrógeno y oxígeno no está claro. Por lo que respecta al nitrógeno, se sabe que la respuesta no está mediada por PII, dado que las mutaciones en *glnB* no afectan a la capacidad de NifL de detectar el estado nitrogenado de la célula (Holtel y Merrick, 1989). En cuanto a la regulación por oxígeno, Henderson et al (1989) propusieron que la presencia de iones metálicos es necesaria para la inactivación de NifA. Recientemente, Schmitz et al (1996) han revisado estos resultados llegando a la conclusión de que la presencia de hierro es necesaria para liberar la inactivación de NifA por parte de NifL. El dominio carboxilo terminal de NifL mantiene la capacidad de inactivar a NifA in vivo, aunque se requiere una concentración mayor del dominio carboxilo terminal que de la proteína completa (Narberhaus et al, 1995). Al igual que NifA, NifL forma cuerpos de inclusión cuando se la somete a superexpresión, por lo cual también se ha mostrado extraordinariamente difícil de purificar. Sin embargo, se ha conseguido renaturalizar NifL en forma activa a partir de dichos cuerpos de inclusión y se ha observado la inhibición de la actividad de una fusión MBP-NifA in vitro (Lee et al, 1993b). Dicha inactivación es, sin embargo, insensible a la presencia de oxígeno. NifL también inhibe la activación por parte del dominio central de NifA, pero no su actividad ATPasa, lo que indica que NifL interfiere en la interacción de NifA con E- σ^N (Berger et al, 1994). Fusiones MBP con el dominio carboxilo terminal de NifL inactivan a NifA in vitro. Estas fusiones son dímeros en solución, lo que sugiere que ésta es la forma activa de NifL (Narberhaus et al, 1995). A pesar de que se ha sugerido que el hierro es necesario para la función de NifL, no se ha conseguido demostrar la presencia de hierro en la proteína purificada ni se ha observado que el hierro libere la inactivación de NifA por parte de NifL in vitro, por lo que se ha propuesto que el papel del hierro viene mediado por alguna otra proteína (Schmitz et al, 1996). Recientemente se ha purificado NifL de *A. vinelandii* y se ha demostrado que es una flavoproteína que responde al estado redox de la célula (Hill et al, 1996).

6. Polaridad y terminación dependiente de Rho.

La ARN polimerasa bacteriana está sujeta a dos tipos de procesos que provocan la terminación de la transcripción. El primero de ellos, denominado terminación simple, es una característica intrínseca a la ARN polimerasa, que detiene la transcripción en respuesta a determinadas secuencias, liberando una molécula de ARN. Este proceso ocurre *in vitro* en ausencia de otros factores proteicos. Las secuencias que promueven la terminación simple de la transcripción se caracterizan por contener un segmento palindrómico con potencialidad para la formación de una estructura estable en forma de horquilla seguido de varios residuos de uracilo. Este tipo de terminadores simples aparecen al término de las unidades transcripcionales, entre algunos pares de genes y en la mayor parte de los atenuadores (Yager y von Hippel, 1987).

El segundo modo de terminación de la transcripción, denominado terminación compleja, requiere el uso de la proteína de terminación Rho (Yager y von Hippel, 1987; Richardson, 1991 y 1996). Este tipo de terminación se encuentra igualmente al término de algunas unidades transcripcionales o en sitios de regulación por delante de algunos genes. Además, la terminación compleja es la responsable de los fenómenos de polaridad observados en numerosos operones bacterianos. La polaridad es un fenómeno que se caracteriza por la terminación prematura de la transcripción en sitios definidos del ARNm cuando ésta no está acoplada a la traducción. Estos sitios de terminación son secuencias terminadoras crípticas dependientes de Rho que se activan exclusivamente cuando el segmento del ARNm que las engloba no es traducido. El desacople entre transcripción y traducción puede producirse debido a un estrés metabólico, por ejemplo, la falta de un aminoácido, o puede inducirse a través de una mutación que provoque la terminación prematura de la traducción. En ambos casos, la función de la polaridad es impedir la síntesis de un transcrito que no puede ser utilizado (Richardson, 1991).

La proteína Rho consta de un único polipéptido de 419 aminoácidos que presenta dos regiones de homología significativa con otras dos clases de proteínas. Una zona común con varias proteínas de unión a ARN se encuentra en la región amino terminal, definida por un sitio sensible a tripsina en la posición 130. Esta región contiene la secuencia consenso Gly-Phe-Gly-Phe (residuos 61-64). Experimentos de cross-linking con ligandos de ARN confirman

que la capacidad de unión a ARN reside en esta región (Dolan et al, 1990; Brennan y Platt, 1991). Igualmente, se encuentra una región homóloga a los sitios de unión a ATP de otras proteínas en la región central de la proteína, comprendida entre los residuos sensibles a tripsina 130 y 283. Sin embargo, este dominio aislado no tiene actividad NTPasa (Dombroski y Platt, 1988). El corte en el residuo 130 es inhibido por la unión de ATP o ADP, lo que sugiere que la interacción entre los dominios amino y central es necesaria para la hidrólisis del ATP (Platt y Richardson 1992).

La estructura oligomérica de Rho es de un hexámero, aunque esta forma existe en equilibrio con otras de orden menor, siendo la forma dimérica particularmente estable. Datos *in vivo* e *in vitro* sugieren que el intercambio de subunidades entre hexámeros es frecuente (Platt y Richardson, 1992). La forma hexamérica se estabiliza fuertemente por la unión de ARN y es la forma predominante que participa en la hidrólisis de ATP (Finger y Richardson, 1982). La proteína Rho presenta "in vitro" actividades de unión a ARN, NTPasa y helicasa. La actividad de unión a ARN requiere un tamaño mínimo de 80 nucleótidos y parece estar influida positivamente por un bajo grado de estructura secundaria y la presencia de residuos de citosina desapareados (Ceruzzi et al, 1985; Morgan et al, 1985). Se ha propuesto que el hexámero de Rho presenta tres sitios de unión fuerte a ARN y tres de unión débil (Richardson, 1982). La actividad NTPasa es absolutamente dependiente de la presencia de ARN, y la máxima actividad se alcanza en presencia de poli(C), aunque otras especies de ARN ricas en C y pobres en G activan en menor grado. El nucleótido preferido es ATP, aunque puede usar los cuatro. Rho presenta actividad helicasa de híbridos ADN-ARN. La actividad helicasa es dependiente de la hidrólisis de NTPs, es específica para las especies de ARN que contienen señales de terminación de la transcripción dependiente de Rho y unidireccional (sólo es capaz de separar híbridos en el extremo 3' del ARN) (Platt y Richardson, 1992).

La naturaleza de las secuencias de ARN reconocidas por Rho, también denominadas sitios *rut*, de Rho utilization, sigue siendo un misterio. Se ha sugerido que los terminadores dependientes de Rho contienen secuencias ricas en citosina, con poca estructura secundaria y con una longitud mínima, localizadas inmediatamente por delante del sitio de terminación de la transcripción (Richardson, 1991). Se ha propuesto un consenso para los terminadores dependientes de Rho, consistente en una región con un alto contenido en citosinas y un bajo contenido en guaninas (Alifano et al, 1991). Estas regiones, denominadas "burbujas" C>G, aparecen en los terminadores

dependientes de Rho y su amplitud correlaciona bien con la eficiencia de la terminación. Los datos *in vitro* indican que la afinidad con que Rho se une a oligonucleótidos es función de su contenido en citosina, independientemente de la posición de éstas (Wang y von Hippel, 1993). Sin embargo, otros autores han usado mutagénesis para disminuir el contenido en citosinas de una secuencia terminadora dependiente de Rho o para aumentar el contenido en citosinas de una secuencia sin actividad terminadora. En ambos casos se concluyó que, aunque la presencia de un número mínimo de citosinas parece esencial, otros factores como la distribución de las citosinas tienen también importancia (Hart y Roberts, 1991; Zalatan y Platt, 1992). En cuanto a la longitud mínima de ARN necesaria para la terminación dependiente de Rho, se sabe que los sitios de unión a ARN de Rho se unen a un total de 78 nucleótidos (McSwiggen et al, 1988). La longitud mínima de los transcritos desnudos sobre los que Rho presenta actividad terminadora es de 85-90 nucleótidos, aunque dicha actividad aumenta considerablemente con longitudes de 100-115 nucleótidos (Hart y Roberts, 1994). Dado que Rho tiene que interactuar con la ARN polimerasa para terminar la transcripción, la velocidad de translocación de Rho a lo largo del ARN tiene que ser mayor que la de la ARN polimerasa. Se ha demostrado una buena correlación entre las posiciones de los sitios de terminación de los transcritos y los sitios de pausa de la ARN polimerasa (Yager y von Hippel, 1987), lo que indica que Rho utiliza los sitios de pausa para alcanzar al complejo de transcripción. En este sentido, la distribución de los sitios de pausa en la región de terminación determina la eficiencia de la terminación y la posición de los extremos 3' de los transcritos.

Se han propuesto dos modelos de funcionamiento de la terminación de la transcripción dependiente de Rho. El modelo de desplazamiento libre, basado en algunos de los datos *in vitro* apuntados (Figura 6, A), establece que Rho utiliza el sitio rut como punto de entrada al ARNm, se transloca en dirección 5'-3' a lo largo de la hebra de ARN utilizando la energía de sucesivas rondas de hidrólisis de ATP, desnaturaliza el fragmento de híbrido ARN-ADN que sigue a la ARN polimerasa y libera el ARNm del complejo de transcripción (Richardson, 1982; Seifried et al, 1992). Sin embargo, se ha detectado el contacto de Rho con su secuencia de unión en condiciones de hidrólisis de ATP, en las cuales debería estarse translocando a lo largo de la cadena de ARN. Se ha demostrado que Rho permanece unida al sitio rut en condiciones en las que presenta actividad helicasa sobre un sustrato situado en posición 3' respecto a su sitio de unión (Steinmetz y Platt, 1994). Estas observaciones han llevado a proponer un modelo alternativo denominado de "desplazamiento anclado" (Figura 6, B) según el cual Rho

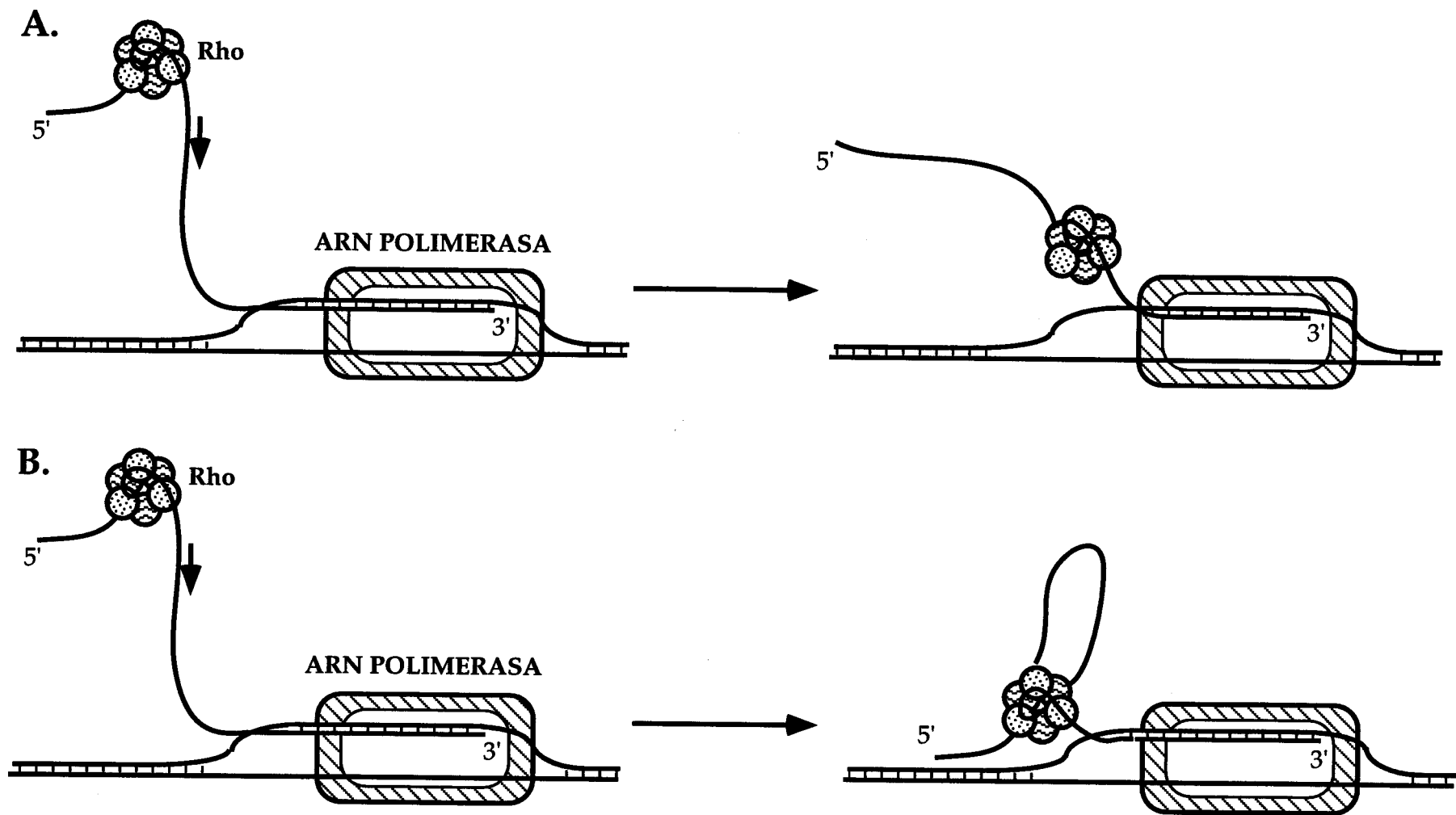


Figura 6. Modelos de funcionamiento del desplazamiento de Rho a lo largo del ARNm. **A.** Desplazamiento libre. **B.** Desplazamiento anclado.

permanece unida al sitio rut de unión a través de sus tres dominios de alta afinidad mientras se desplaza a lo largo de la hebra de ARN en dirección 5'-3'. La translocación se realizaría estableciendo contactos transitorios con el ARN a través de sus dominios de baja afinidad en una reacción dependiente de la hidrólisis sucesiva de moléculas de ATP (Platt, 1994).

Recientemente se ha descrito que la terminación por parte de Rho en algunos transcritos requiere el concurso de una proteína de 21 kDa asociada al complejo de transcripción llamada NusG (Sullivan y Gottesman, 1992). NusG se une a Rho y a la ARN polimerasa, aunque la unión es débil. El requerimiento de NusG ha permitido establecer un paralelismo entre la interacción de Rho con la ARN polimerasa con la formación del complejo de antiterminación por parte de la proteína N de λ (Platt, 1994).

7. Acoplamiento traduccional.

La tasa de traducción en los genes de los organismos procariotas viene determinada en términos generales por la eficiencia de las señales de iniciación (McCarthy y Gualerzi, 1990). El sitio de unión de ribosomas se caracteriza por dos secuencias que se han revelado esenciales para la iniciación de la traducción. El codón de iniciación es en la mayor parte de los casos AUG, aunque también se puede utilizar GUG, UUG y, en un caso, AUU. La iniciación es más eficiente a partir de AUG, y sólo es ligeramente mejor a partir de GUG que de UUG (Ringquist et al, 1992; Vellanoweth et al, 1992). El otro elemento importante es la secuencia Shine-Dalgarno (Shine y Dalgarno, 1974). Esta es una secuencia rica en purinas con el consenso GGAGG que es complementaria al extremo 3' del ARNr 16S. La secuencia Shine-Dalgarno se localiza en la región comprendida entre las posiciones -15 y -2 respecto al primer nucleótido del codón de iniciación, aunque el espaciado óptimo se encuentra entre los 7 y 9 nucleótidos (contados desde la última G de la Shine-Dalgarno) (Ringquist et al, 1992; Vellanoweth et al, 1992). La importancia del emparejamiento entre la Shine-Dalgarno y su secuencia homóloga del ARNr 16S (llamada comunmente anti-Shine-Dalgarno) se ha demostrado construyendo ARNr 16S mutantes con distinta especificidad por alteración de la secuencia anti Shine-Dalgarno (ribosomas especializados) (Hui y de Boer, 1987). Secuencias Shine-Dalgarno con mayor homología con el ARNr 16S, de hasta 10 nucleótidos, presentan mayor eficiencia (McCarthy y Gualerzi,

1990; Ringquist et al, 1992). Se han descrito otras secuencias como señales que determinan la eficiencia o el sitio de iniciación de la traducción. En particular, regiones adicionales de homología con el ARNr 16S, la presencia de residuos de adenina en la región comprendida entre la Shine-Dalgarno y el codón de iniciación y otros elementos de función desconocida identificados en base a comparación de secuencias. De todas estas secuencias la única cuya funcionalidad ha sido determinada empíricamente es la "downstream box". Se trata de una región con la secuencia consenso UCAUGAAUCACAAAG homóloga a los nucleótidos 1469-1483 del ARNr 16S, presente en el extremo 5' de la zona codificante de algunos genes que se traducen con gran eficiencia (Sprengart et al, 1990). Recientemente se ha demostrado que esta secuencia es capaz de promover la iniciación de la traducción en ausencia de una Shine-Dalgarno (Sprengart et al, 1996).

Además de los elementos de secuencia descritos, la eficiencia de la iniciación de la traducción está influenciada en gran medida por la capacidad del ARNm que rodea a la región de iniciación de formar estructuras secundarias estables. El emparejamiento de las secuencias de reconocimiento interfiere con el proceso de iniciación, y se ha establecido una clara relación cuantitativa entre la estabilidad de la estructura secundaria y la eficiencia de la iniciación (de Smit y van Duin, 1990 y 1994). Dado que el acoplamiento entre la transcripción y la traducción dificulta la existencia de efectos estructurales a larga distancia, se puede definir para cada cistrón una región localizada (TIR o región de iniciación de la traducción) en la cual están contenidos todos los elementos, tanto de secuencia primaria como estructurales, que determinan la eficiencia de traducción (McCarthy y Gualerzi, 1990).

Aunque la traducción independiente de cada gen puede estar determinada por las secuencias incluidas en su TIR, se ha observado frecuentemente que la traducción de un gen influye positivamente sobre la tasa de traducción del siguiente. Este fenómeno se denomina acoplamiento traduccional. El acoplamiento traduccional fue descrito por primera vez en el operón del triptófano (Oppenheim y Yanofsky, 1980). Aunque se ha demostrado su presencia en gran número de operones bacterianos, pocos autores han estudiado el mecanismo por el que se rige este fenómeno. El acoplamiento traduccional se ha asociado frecuentemente a pares de genes cuyas señales de terminación e iniciación de la traducción se encuentran solapadas y se ha apuntado como responsable de la síntesis estequiométrica de proteínas que forman un complejo (Oppenheim y Yanofsky, 1980; Yates y Nomura, 1981). Sin embargo, se ha

demostrado acoplamiento traduccional en pares de genes separados hasta 60 nucleótidos (Petersen, 1989), o solapados más de 40 (Berkhout et al, 1987) y con las estequiometrías más diversas, llegando incluso a traducirse el gen distal a una tasa mayor que el proximal (Hellmuth et al, 1991; Yates et al, 1981).

Para que ocurra acoplamiento traduccional entre dos genes contiguos tienen que aparecer simultáneamente dos fenómenos. En primer lugar, la traducción independiente del gen distal tiene que estar inhibida total o parcialmente. En segundo lugar, los ribosomas que traducen el gen proximal tienen que ser capaces de liberar dicha inhibición. Desde este punto de vista, el acoplamiento traduccional puede verse como una forma de regulación positiva a nivel de traducción mediada por los ribosomas (McCarthy y Gualerzi, 1990).

La falta de traducción del gen distal en ausencia de la traducción del gen proximal se ha demostrado frecuentemente introduciendo mutaciones de terminación prematura en el gen proximal o mutagenizando la Shine-Dalgarno de éste. El caso más frecuente es que una estructura secundaria suficientemente estable se forme en la TIR e impida el acceso de los ribosomas en solución a la Shine-Dalgarno. Mediante mutagénesis se ha demostrado el papel de una estructura de este tipo en las parejas de genes *atpHA* (Hellmuth et al, 1991; Pati et al, 1992; Rex et al, 1994), *atpDC* (Dallmann y Dunn, 1994), los genes de la envuelta y la lisis del fago MS2 (Kastelein et al, 1983; Berkhout et al, 1987; Schmidt et al, 1987). y los genes de replicación de varios plásmidos (Asano et al, 1991; Prazskier et al, 1992; Athanasopoulos et al, 1995) En algunos casos se ha demostrado la existencia de la estructura secundaria mediante mapeo in vitro con ARNasa (Dallmann y Dunn, 1994; Rex et al, 1994). Alternativamente, las señales de iniciación de la traducción pueden no ser apropiadas para permitir la traducción independiente. En el caso de los genes de la envuelta y la lisis del fago fr se ha demostrado que la falta de traducción independiente del gen distal es debida a la baja eficiencia del codón de iniciación UUG. La sustitución de este codón por AUG o GUG produce la traducción independiente del gen de la lisis (Adhin y van Duin, 1989).

Además de la inhibición de la traducción independiente del gen distal, tiene que existir un mecanismo que permita a los ribosomas que traducen el gen proximal liberar dicha inhibición. Dadas las características peculiares de los distintos pares de genes acoplados, el mecanismo no tiene por qué ser único. En este sentido, se han propuesto básicamente dos modelos que pueden explicar el funcionamiento del acoplamiento traduccional en los distintos sistemas estudiados.

El primer modelo, denominado de "reiniciación" o "traducción secuencial", implica que el ribosoma que traduce el gen proximal termina en las proximidades de la Shine-Dalgarno del gen distal y ésto facilita la unión de ese mismo ribosoma, que es el que lleva a cabo la traducción del gen distal. La Shine-Dalgarno debe estar ocluida por una estructura secundaria que impide la traducción independiente y que es eliminada por el paso del ribosoma (Figura 7, A). Este es el modelo propuesto para los pares de genes en los que las señales de terminación e iniciación de la traducción están solapadas (Oppenheim y Yanofsky, 1980; Yates y Nomura, 1981; Das y Yanofsky, 1984; Theisen y Neuhard, 1990; Blomberg et al, 1992). También se ha propuesto la reiniciación como el mecanismo que asegura la traducción acoplada del gen de la lisis del fago fr, que tiene UUG como codón de iniciación (Adhin y van Duin, 1989). No se ha demostrado en ningún caso la necesidad de que sea el mismo ribosoma el que traduce los dos genes. Se ha observado también la reiniciación de la traducción en el interior de genes y se ha propuesto que el ribosoma que termina la traducción registra los alrededores del sitio de terminación y, si encuentra unas señales apropiadas, reinicia la traducción sin que la subunidad 30S se separe del ARNm (Gold, 1988). La eficiencia de la reiniciación vendría determinada por las señales de iniciación de la traducción del gen distal y por la distancia que tiene que recorrer el ribosoma que termina hasta encontrar dichas señales. Con una Shine-Dalgarno suficientemente buena y un codón AUG espaciado apropiadamente y solapado al codón de terminación, la frecuencia de reiniciación sería del 100%, asegurando una síntesis estequiométrica de los dos productos (Gold y Stormo, 1987). Se ha demostrado por delección que la Shine-Dalgarno es necesaria en el par *trpBA* (Das y Yanofsky, 1984). Los genes de la envuelta y la lisis de los fagos MS2 y fr están solapados 34 y 47 nucleótidos, respectivamente. Se ha propuesto para ambos un mecanismo de reiniciación que, debido a la distancia, sería muy ineficiente, lo que explicaría la baja expresión de los genes de la lisis en estos fagos (Adhin y van Duin, 1989).

El modelo alternativo, denominado de "unión facilitada", propone que las señales de iniciación del gen distal están enmascaradas por algún tipo de estructura y que el ribosoma que traduce el gen proximal la desnaturaliza, permitiendo la entrada de ribosomas en solución (Figura 7, B). Los sistemas que funcionaran según este modelo no tendrían por qué ajustarse a una estequiometría estricta y, de hecho, este es el modelo propuesto para los sistemas en los cuales el gen distal se traduce mejor que el proximal, como es el caso de las proteínas ribosómicas L10 y L7/L12 (Yates et al, 1981) o el par *atpHA* (Gerstel y McCarthy, 1989). Sin embargo, en este último par de genes se ha comprobado

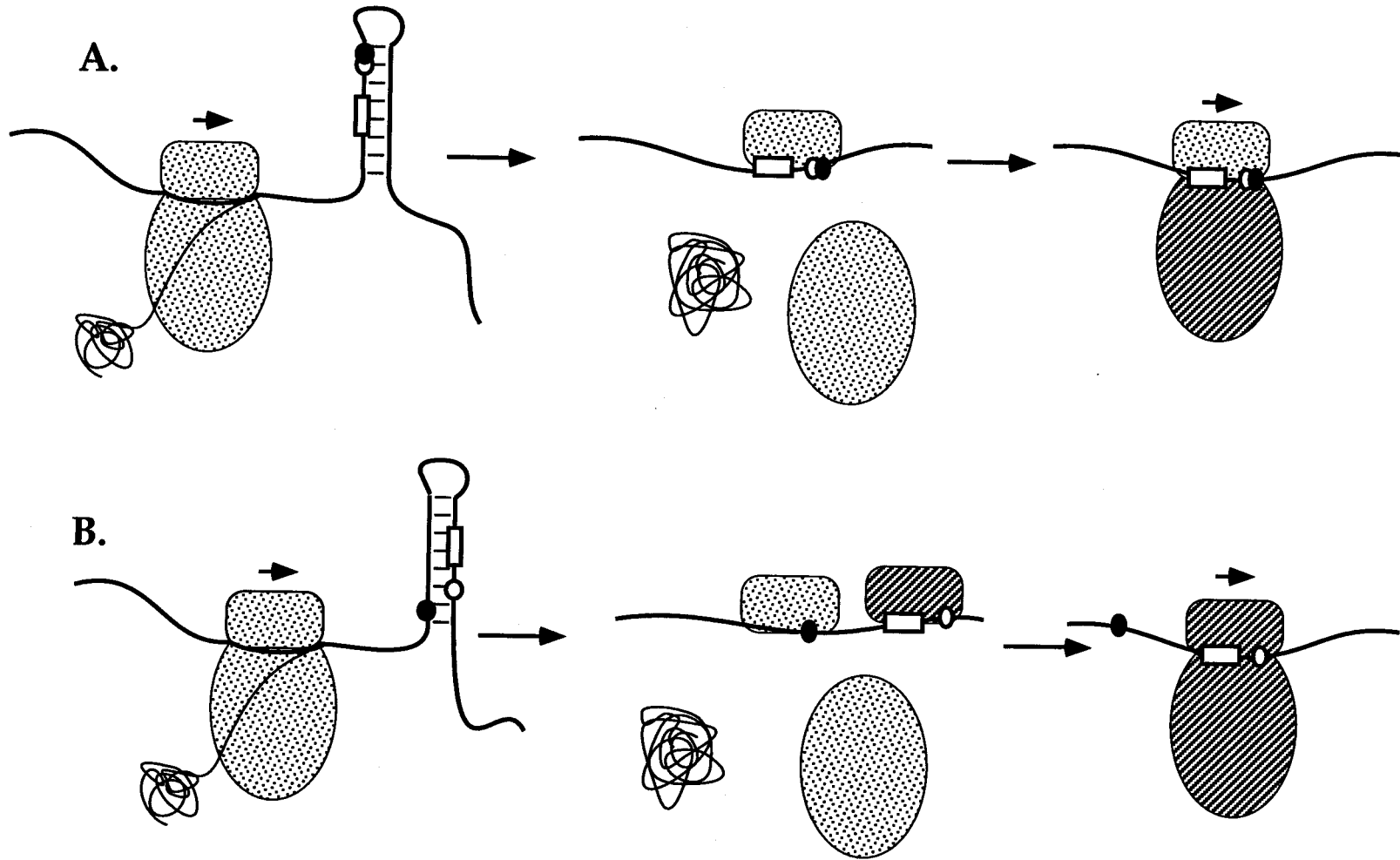


Figura 7. Modelos de funcionamiento del acoplamiento traduccional. **A.** Modelo de reiniciación. **B.** Modelo de unión facilitada. El círculo negro representa al codón de terminación del gen proximal. El círculo blanco representa al codón de iniciación del gen distal. El rectángulo blanco representa a la Shine-Dalgarno del gen distal.

mediante el uso de un sistema de ribosomas especializados que la reiniciación tiene un papel en el acoplamiento traduccional. Esta observación ha llevado a proponer un modelo mixto, en el cual un suceso de reiniciación facilita la formación de una estructura secundaria alternativa en el ARNm que permite la entrada de ribosomas en solución a la Shine-Dalgarno de *atpA* (Rex et al, 1994). Otros pares de genes para lo que se ha propuesto el modelo de unión facilitada son *atpDC* (Dallmann y Dunn, 1994) y *rpmI-rplT* (Lesage et al, 1992).

Una sofisticación adicional aparece en los genes de replicación de varios plásmidos (Asano et al, 1991; Prazskier et al, 1992; Athanasopoulos et al, 1995). En estos sistemas, el acoplamiento traduccional está regulado positivamente por una estructura a larga distancia de tipo "pseudoknot" que estabiliza una conformación abierta de la TIR. Esta estructura sólo se forma cuando hay traducción del gen proximal. Se ha comprobado que mutaciones en los nucleótidos implicados en el emparejamiento eliminan la traducción del gen distal y mutaciones compensatorias la restauran.

OBJETIVOS

El trabajo presentado en esta memoria es un estudio de los mecanismos que subyacen en el control de la síntesis de las proteínas NifL y NifA de *Klebsiella pneumoniae*. Los objetivos específicos abordados han sido los siguientes:

1. Determinar la importancia de la síntesis coordinada de las proteínas antagónicas NifL y NifA en el control fisiológico de la expresión de los genes de fijación de nitrógeno.
2. Identificar los procesos que regulan la síntesis coordinada de NifL y NifA tanto a nivel transcripcional como a nivel traduccional.
3. Caracterizar las señales implicadas en los procesos que controlan la síntesis coordinada de NifL y NifA y estudiar los mecanismos mediante los cuales se controlan dichos procesos.

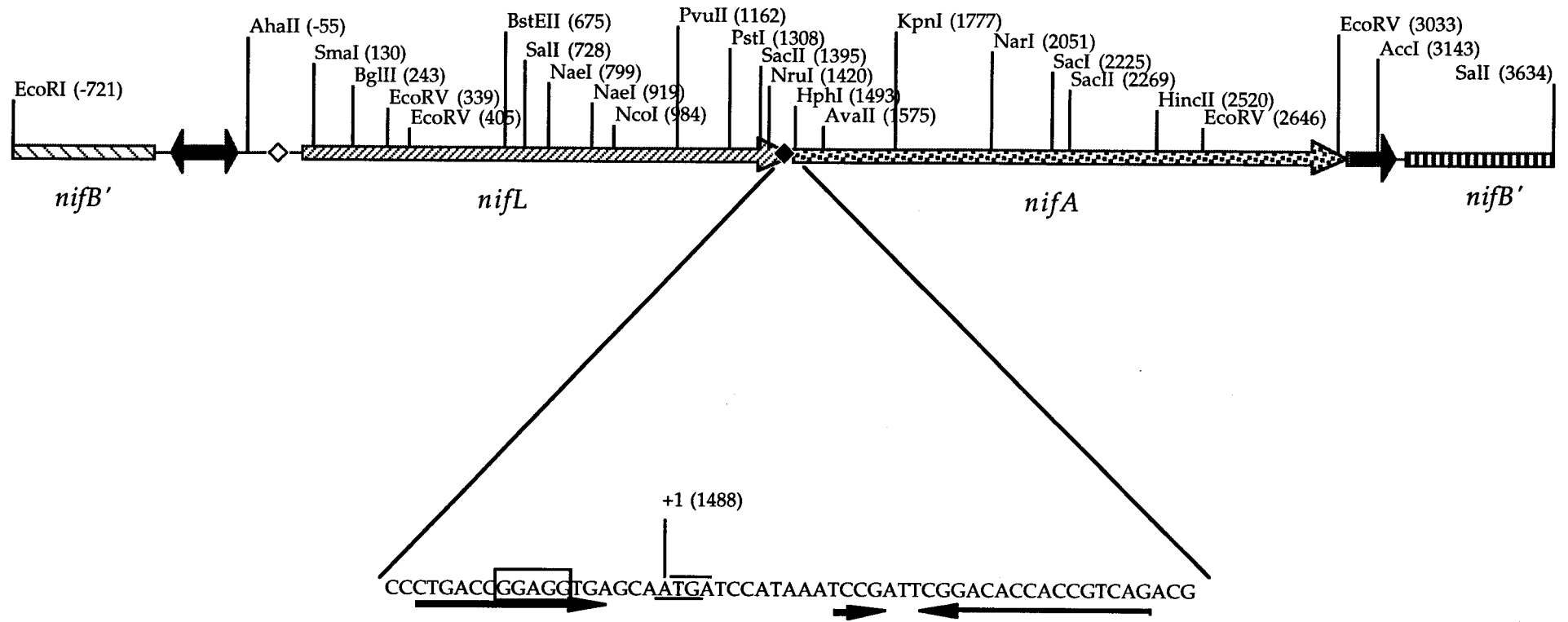


Figura 8. Mapa físico del operón *nifLA*. Se indican las dianas de restricción usadas en este trabajo y su posición respecto al inicio de la traducción de *nifL*. Las regiones sombreadas en negro corresponden a los promotores de *nifF*, *nifL* y *nifB*. Los rombos indican las secuencias Shine-Dalgarno de *nifL* (blanco) y *nifA* (negro). En la parte inferior aparece ampliada la región final de *nifL* a inicial de *nifA*. Se indica el codón de terminación de *nifL* y el de iniciación de *nifA* y la posición del primer nucleótido de *nifA* respecto al inicio de *nifL*. La Shine-Dalgarno de *nifA* aparece recuadrada. Las flechas indican una región de simetría con potencialidad para formar una estructura secundaria.

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 Δ (lacZYA-argF)U169 <i>recA1</i> <i>endA1 hsdR17 (r_k⁻ m_k⁻) supE44 thi-1 gyrA relA1</i>	Hanahan (1983)
ET8000	<i>ntr⁺ rbs lacZ::IS1 gyrA hutC_{Ka}</i>	Buck et al (1985)
JBRR3	<i>suA^{ts}(Rho^{ts}) Δlac Δgal trp strAton tsx</i>	Dalrymple y Arber (1986)
NCM631	<i>hsdS gal</i> (λ DE3: <i>lacI</i> , <i>lacUV5</i> : <i>-gen1</i> [ARN polimerasa <i>de T7</i>]) Δ lac ligada a Tn10	E. Santero
S17-1 (λ -pir)	<i>recA thi pro hsdR⁻M⁺ RP4:2-Tc:Mu:Km</i> Tn7 (Tp ^r Sm ^r) (λ pir)	Simon et al. (1983)

K. pneumoniae

SE1003	$\Delta lac2001$ Gal ^r <i>hsdR1</i> Tn7 <i>recA56 srl300::Tn10</i>	Este trabajo
SE1004	$\Delta lac2001$ Gal ^r <i>hsdR1</i> Tn7 Rif ^r <i>nifLA::pIZ287</i>	Este trabajo
SE1005	$\Delta lac2001$ Gal ^r <i>hsdR1</i> Tn7 Rif ^r <i>nifLA::pIZ288</i>	Este trabajo
UNF932	<i>hsdR1</i> Δlac <i>recA56 srl300::Tn10</i>	Buck (1986)
VJSK014	$\Delta lac2001$ Gal ^r <i>hsdR1</i> Tn7	Cali et al (1989)
VJSK014 Rif	$\Delta lac2001$ Gal ^r <i>hsdR1</i> Tn7 Rif ^r	Este trabajo

2. Plásmidos.

Las características más relevantes de los plásmidos utilizados en este trabajo aparecen reflejadas en la Tabla 2. En la Figura 8 se representa esquemáticamente el operón *nifLA* con las dianas de restricción utilizadas en las clonaciones.

Tabla 2. Plásmidos utilizados en este trabajo.

PLASMIDO	CARACTERISTICAS	ORIGEN / REFERENCIA
pGP704cat(+)	Fragmento <i>Bam</i> HI de pAW302 con el gen <i>cat</i> clonado en la diana <i>Sca</i> I de pGP704 (Miller y Mekalanos, 1988) con la orientación contraria a <i>bla</i> . Cm ^r . Replicación dependiente de π .	Este trabajo.
pIC551	Vector sonda de terminadores basado en pBR322. Contiene el promotor λp_R seguido de un MCS con las dianas <i>Nco</i> I, <i>Bgl</i> II, <i>Xho</i> I y <i>Sma</i> I que permiten la fusión transcripcional con un híbrido <i>galK-lacZ</i> . Ap ^r .	Macián et al, 1994.
pIC554	Terminador dependiente de Rho $\lambda tR1$ clonado en la diana <i>Xho</i> I de pIC551. Ap ^r .	Macián et al, 1994.
pIZ204	Fragmento <i>Eco</i> RI- <i>Sal</i> I de 4.35 kb con el extremo 5' de <i>nifF</i> , el operón <i>nifLA</i> y el extremo 5' de <i>nifB</i> clonado en pT7-5 digerido con <i>Eco</i> RI y <i>Sal</i> I. Ap ^r .	Este trabajo.
pIZ209	Fusión traduccional <i>nifLA-lacZ</i> en alto número de copias. Fragmento <i>Sma</i> I- <i>Bst</i> BI de 3.5 kb de pMC1403 (Casadaban et al, 1990) con <i>lacZ</i> y el extremo 5' de <i>lacY</i> clonado en pIZ204 digerido con <i>Nar</i> I y <i>Sal</i> I. Ap ^r .	Este trabajo.
pIZ210	Fusión transcripcional <i>nifLA-lacZ</i> en alto número de copias. Fragmento <i>Sma</i> I- <i>Bst</i> BI de 3.5 kb de pJEL126 con <i>lacZ</i> y el extremo 5' de <i>lacY</i> clonado en pIZ204 digerido con <i>Nar</i> I y <i>Sal</i> I. Ap ^r .	Este trabajo.

- pIZ227 Represor *lacIq* en *plysE* (Studier y Moffatt, 1986). Este trabajo. Fragmento *BamHI-EagI* de 1.4 kb de pMM40 que contiene al gen *lacIq* clonado en *plysE* digerido con *BamHI-EagI*. Cm^r.
- pIZ237 Vector de fusiones traduccionales *lac* de bajo número de copias. MCS con dianas *EcoRI*, *BamHI* y *SmaI*. Ap^r. Replicación runaway a 42°C. Molina-López et al, 1994.
- pIZ238 Fusión transcripcional *nifLA-lac* en bajo número de copias. Fragmento *EcoRI-NarI* de 2.8 kb con el extremo 5' de *nifF*, *nifL* y 0.55 kb del extremo 5' de *nifA* clonado en pJEL126 digerido con *EcoRI* y *BamHI*. Ap^r. Govantes y Santero, 1996.
- pIZ239 Fusión transcripcional *nifLA-lac* en bajo número de copias. Fragmento *EcoRI-NarI* de 2.8 kb con el extremo 5' de *nifF*, *nifL* y 0.55 kb del extremo 5' de *nifA* clonado en pJEL126 digerido con *EcoRI* y *BamHI*. *nifL* lleva un desfase producido rellenando con la polimerasa de Klenow la diana *BstEII* (+675). Ap^r. Govantes y Santero, 1996.
- pIZ240 Fusión transcripcional *nifLA-lac* en bajo número de copias. Fragmento *EcoRI-NarI* de 2.8 kb con el extremo 5' de *nifF*, *nifL* y 0.55 kb del extremo 5' de *nifA* clonado en pJEL126 digerido con *EcoRI* y *BamHI*. *nifL* lleva un desfase producido rellenando con la polimerasa de Klenow la diana *NcoI* (+984). Ap^r. Govantes y Santero, 1996.
- pIZ241 Fusión traduccional *nifLA-lac* en bajo número de copias. Fragmento *EcoRI-NarI* de 2.8 kb con el extremo 5' de *nifF*, *nifL* y 0.55 kb del extremo 5' de *nifA* clonado en pIZ237 digerido con *EcoRI* y *BamHI*. Ap^r. Govantes y Santero, 1996.
- pIZ242 Fusión traduccional *nifLA-lac* en bajo número de copias. Fragmento *EcoRI-NarI* de 2.8 kb con el extremo 5' de *nifF*, *nifL* y 0.55 kb del extremo 5' de *nifA* clonado en pIZ237 digerido con *EcoRI* y *BamHI*. *nifL* lleva un desfase producido rellenando con la polimerasa de Klenow la diana *BstEII* (+675). Ap^r. Govantes y Santero, 1996.
- pIZ243 Fusión traduccional *nifLA-lac* en bajo número de copias. Fragmento *EcoRI-NarI* de 2.8 kb con el extremo 5' de *nifF*, *nifL* y 0.55 kb del extremo 5' de *nifA* clonado en pIZ237 digerido con *EcoRI* y *BamHI*. *nifL* lleva un desfase producido rellenando con la polimerasa de Klenow la diana *NcoI* (+984). Ap^r. Govantes y Santero, 1996.
- pIZ244 Fusión transcripcional *nifLA-lac* en bajo número de copias. Fragmento *EcoRI-NarI* de 2.8 kb con el extremo 5' de *nifF*, *nifL* y 0.55 kb del extremo 5' de *nifA* clonado en pJEL126 digerido con *EcoRI* y *BamHI*. *nifL* lleva el fragmento *NdeI-SmaI* de 20 pb del MCS de pT7-7 clonado en la diana *NruI* distal (+1419). Ap^r. Govantes y Santero, 1996.

pIZ245	Fusión traduccional <i>nifLA-lac</i> en bajo número de copias. Fragmento <i>EcoRI-NarI</i> de 2.8 kb con el extremo 5' de <i>nifF</i> , <i>nifL</i> y 0.55 kb del extremo 5' de <i>nifA</i> clonado en pIZ237 digerido con <i>EcoRI</i> y <i>BamHI</i> . <i>nifL</i> lleva el fragmento <i>NdeI-SmaI</i> de 20 pb del MCS de pT7-7 (Tabor, 1994) clonado en la diana <i>NruI</i> distal (+1420). Ap ^r .	Govantes y Santero, 1996.
pIZ248	Fusión traduccional <i>nifLA-lacZ</i> en alto número de copias. Idéntico a pIZ209, pero <i>nifL</i> lleva un desfase producido eliminando con la polimerasa de T4 los extremos cohesivos de la diana <i>SacII</i> (+1395). Ap ^r .	Este trabajo.
pIZ263	Fragmento <i>EcoRI-BamHI</i> de 200 pb de pJES384 (Santero et al, 1992) con el promotor de <i>nifH</i> clonado en pIZ237 digerido con <i>EcoRI</i> y <i>BamHI</i> . Ap ^r .	Este trabajo.
pIZ287	Fragmento <i>EcoRI-HindIII</i> de 3.9 kb con el extremo 5' de <i>nifF</i> y el operón <i>nifLA</i> hasta la diana <i>AccI</i> clonado entre las diana <i>EcoRI</i> y <i>EcoRV</i> del MCS de pGP704 cat(+). Cm ^r . Replicación dependiente de π .	Este trabajo.
pIZ288	Fragmento <i>EcoRI-HindIII</i> de 3.1 kb con el extremo 5' de <i>nifF</i> y el operón <i>nifLA</i> hasta la diana <i>AccI</i> con una delección <i>SmaI-NaeI</i> de 789 nucleótidos en <i>nifL</i> clonado entre las dianas <i>EcoRI</i> <i>EcoRV</i> del MCS de pGP704 cat(+). Cm ^r . Replicación dependiente de π .	Este trabajo.
pIZ310	Fragmento <i>NcoI-PvuII</i> de 178 pb de <i>nifL</i> clonado en pIC551 digerido con <i>NcoI</i> y <i>BglII</i> . Ap ^r .	Govantes y Santero, 1996.
pIZ311	Fragmento <i>SmaI-SalI</i> de 697 pb de <i>nifL</i> clonado entre las dianas <i>BglII</i> <i>XhoI</i> de pI551. Ap ^r .	Govantes y Santero, 1996.
pIZ319	Fusión traduccional <i>nifLA-lac</i> en bajo número de copias. Fragmento <i>EcoRI-NarI</i> de 2.8 kb con el extremo 5' de <i>nifF</i> , <i>nifL</i> y 0.55 kb del extremo 5' de <i>nifA</i> clonado en pIZ237 digerido con <i>EcoRI</i> y <i>BamHI</i> . <i>nifL</i> lleva un desfase producido eliminando con la polimerasa de T4 los extremos cohesivos de la diana <i>SacII</i> (+1395). Ap ^r .	Govantes y Santero, 1996.
pIZ328	Operón <i>nifLA</i> superexpresado en pT7-7. Idéntico a pJES282, pero <i>nifL</i> lleva un desfase producido rellenando con la polimerasa de Klenow la diana <i>BstEII</i> (+675). Ap ^r .	Este trabajo.
pIZ329	Operón <i>nifLA</i> superexpresado en pT7-7. Idéntico a pJES282, pero <i>nifL</i> lleva un desfase producido rellenando con la polimerasa de Klenow la diana <i>NcoI</i> (+984). Ap ^r .	Este trabajo.
pIZ330	Operón <i>nifLA</i> superexpresado en pT7-7. Idéntico a pJES282, pero <i>nifL</i> lleva un desfase producido eliminando con la polimerasa de T4 los extremos cohesivos de la diana <i>SacII</i> (+1395). Ap ^r .	Este trabajo.

pIZ331	Fusión transcripcional <i>nifLA-lac</i> en bajo número de copias. Fragmento <i>EcoRI-NarI</i> de 2.8 kb con el extremo 5' de <i>nifF</i> , <i>nifL</i> y 0.55 kb del extremo 5' de <i>nifA</i> clonado en pJEL126 digerido con <i>EcoRI</i> y <i>BamHI</i> . <i>nifL</i> lleva un desfase producido eliminando con la polimerasa de T4 los extremos cohesivos de la diana <i>SacII</i> (+1395). Ap ^r .	Govantes y Santero, 1996.
pIZ337	Fragmento <i>BglII-NcoI</i> de 745 pb de <i>nifL</i> clonado en pIC551 digerido con <i>BglII</i> y <i>SmaI</i> . Ap ^r .	Govantes y Santero, 1996.
pIZ338	Fragmento <i>PstI-NruI</i> de 116 pb de <i>nifL</i> clonado en pIC551 digerido con <i>BglII</i> y <i>SmaI</i> . Ap ^r .	Govantes y Santero, 1996.
pIZ339	Fragmento <i>HphI-KpnI</i> de 284 pb de <i>nifA</i> clonado en pIC551 digerido con <i>NcoI</i> y <i>SmaI</i> . Ap ^r .	Govantes y Santero, 1996.
pIZ340	Fragmento <i>KpnI-SacII</i> de 492 pb de <i>nifA</i> clonado en pIC551 digerido con <i>NcoI</i> y <i>SmaI</i> . Ap ^r .	Govantes y Santero, 1996.
pIZ342	Fragmento <i>KpnI-NarI</i> de 271 pb de <i>nifA</i> clonado en pIC551 digerido con <i>NcoI</i> y <i>SmaI</i> . Ap ^r .	Govantes y Santero, 1996.
pIZ346	Fusión transcripcional <i>nifLA-lacZ</i> en alto número de copias. Idéntico a pIZ210, pero <i>nifL</i> lleva un desfase producido eliminando con la polimerasa de T4 los extremos cohesivos de la diana <i>SacII</i> (+1395). Ap ^r .	Este trabajo.
pIZ347	Fragmento <i>SacI-EcoRV</i> de 424 pb de <i>nifA</i> clonado en pIC551 digerido con <i>NcoI</i> y <i>XhoI</i> . Ap ^r .	Govantes y Santero, 1996.
pIZ349	Fragmento <i>HincII-EcoRV</i> de 512 pb de <i>nifA</i> clonado en pIC551 digerido con <i>NcoI</i> y <i>XhoI</i> . Ap ^r .	Govantes y Santero, 1996.
pIZ351	Fragmento <i>HindIII</i> de 450 pb de pTE102 (Elliot y Geiduchek, 1984) con el terminador temprano de T7 clonado en pIC551 digerido con <i>SmaI</i> . Ap ^r .	Govantes y Santero, 1996.
pIZ355	Fragmento <i>SmaI-BglII</i> de 145 pb de <i>nifL</i> clonado en pIC551 digerido con <i>NcoI</i> y <i>BglII</i> . Ap ^r .	Govantes y Santero, 1996.
pIZ371	Fusión traduccional <i>nifLA-lacZ</i> en alto número de copias. Idéntico a pIZ209, pero lleva una mutación que elimina el codón de terminación de <i>nifL</i> . Ap ^r .	Este trabajo.
pIZ372	Fusión traduccional <i>nifLA-lacZ</i> en alto número de copias. Análogo a pIZ209, pero con la fusión construida sobre la diana <i>AvaII</i> en la posición +87 de <i>nifA</i> y sobre la diana <i>BamHI</i> del MCS. Ap ^r .	Este trabajo.
pIZ373	Fusión traduccional <i>nifLA-lacZ</i> en alto número de copias. Idéntico a pIZ372, pero <i>nifL</i> lleva un desfase producido eliminando con la polimerasa de T4 los extremos cohesivos de la diana <i>SacII</i> (+1395). Ap ^r .	Este trabajo.

pIZ501	Vector de fusiones traduccionales <i>lacZ</i> bajo el promotor λp_R . Fragmento <i>Sma</i> I- <i>Sac</i> I de 2.9 kb de pMC1403 (Casadaban et al, 1990) clonado en pIC551 digerido con <i>Sma</i> I y <i>Sac</i> I. Ap ^r .	Este trabajo.
pIZ521	Fusión traduccional <i>nifA-lacZ</i> bajo el promotor λp_R . Fragmento <i>Sac</i> II- <i>Ava</i> II de 175 pb clonado en pIZ501 digerido con <i>Xho</i> I y <i>Bam</i> HI. Ap ^r .	Este trabajo.
pIZ529	Fusión traduccional <i>nifA-lacZ</i> bajo el promotor λp_R . Idéntico a pIZ521, pero con la mutación <i>nifLA-2</i> introducida por mutagénesis dirigida. Ap ^r .	Este trabajo.
pIZ538	Fusión traduccional <i>nifA-lacZ</i> bajo el promotor λp_R . Idéntico a pIZ521, pero con la mutación <i>nifLA-1</i> introducida por mutagénesis dirigida. Ap ^r .	Este trabajo.
pIZ539	Fusión traduccional <i>nifA-lacZ</i> bajo el promotor λp_R . Idéntico a pIZ521, pero con las mutaciones <i>nifLA-1</i> y <i>nifLA-2</i> introducidas por mutagénesis dirigida. Ap ^r .	Este trabajo.
pIZ546	Fusión transcripcional <i>nifLA-lacZ</i> en alto número de copias. Análogo a pIZ210, pero con la fusión construida sobre la diana <i>Ava</i> II en la posición +87 de <i>nifA</i> y sobre la diana <i>Bam</i> HI del MCS. Ap ^r .	Este trabajo.
pIZ547	Fusión transcripcional <i>nifLA-lacZ</i> en alto número de copias. Idéntico a pIZ546, pero <i>nifL</i> lleva un desfase producido eliminando con la polimerasa de T4 los extremos cohesivos de la diana <i>Sac</i> II (+1395). Ap ^r .	Este trabajo.
pIZ550	Fusión transcripcional <i>nifLA-lacZ</i> en alto número de copias. Idéntico a pIZ546, pero lleva una mutación que elimina el codón de terminación de <i>nifL</i> . Ap ^r .	Este trabajo.
pJEL126	Vector de fusiones transcripcionales <i>lac</i> de bajo número de copias. MCS con dianas <i>Eco</i> RI, <i>Bam</i> HI y <i>Sma</i> I. Ap ^r . Replicación runaway a 42°C.	Valentin-Hansen et al, 1986.
pJES282	Plásmido superproductor de <i>NifL</i> y <i>NifA</i> bajo el promotor y el sitio de unión de ribosomas del gen $\phi 10$ de T7. Fragmento de 3.1 kb desde el codón de iniciación de <i>nifL</i> hasta la diana <i>Acc</i> I por detrás del final de <i>nifA</i> , clonado en pT7-7digerido con <i>Nde</i> I y <i>Sal</i> I. Ap ^r .	Lee et al, 1993.
pJES292	Plásmido superproductor de <i>NifL</i> y <i>NifA</i> a partir del promotor del gen $\phi 10$ de T7. Fragmento <i>Aha</i> II- <i>Acc</i> I de 3.1 kb que incluye el sitio de unión de ribosomas de <i>nifL</i> y las fases de letcura de <i>nifL</i> y <i>nifA</i> clonado en pT7-5 digerido con <i>Eco</i> RI y <i>Sal</i> I. Ap ^r .	E. Santero, sin publicar.
pJES321	Plásmido superproductor de <i>NifL</i> y <i>NifA</i> bajo el promotor y el sitio de unión de ribosomas del gen $\phi 10$ de T7. Fragmento de 3 kb desde el codón de iniciación de <i>nifL</i> , que lleva una delección <i>Eco</i> RV de 66 pb, hasta la diana <i>Acc</i> I por detrás del final de <i>nifA</i> , clonado en pT7-7digerido con <i>Nde</i> I y <i>Sal</i> I. Ap ^r .	Narberhaus et al, 1995

pJES322	Plásmido superproductor de NifL y NifA bajo el promotor y el sitio de unión de ribosomas del gen $\phi 10$ de T7. Fragmento de 2.3 kb desde el codón de iniciación de <i>nifL</i> , que lleva una delección <i>SmaI-NaeI</i> de 789 pb, hasta la diana <i>AccI</i> por detrás del final de <i>nifA</i> , clonado en pT7-7 digerido con <i>NdeI</i> y <i>Sall</i> . Ap ^r .	Narberhaus et al, 1995
pJES323	Plásmido superproductor de NifL y NifA bajo el promotor y el sitio de unión de ribosomas del gen $\phi 10$ de T7. Fragmento de 2.5 kb desde el codón de iniciación de <i>nifL</i> , que lleva una delección <i>SmaI-Sall</i> de 592 pb, hasta la diana <i>AccI</i> por detrás del final de <i>nifA</i> , clonado en pT7-7 digerido con <i>NdeI</i> y <i>Sall</i> . Ap ^r .	Narberhaus et al, 1995
pJES324	Plásmido superproductor de NifL y NifA bajo el promotor y el sitio de unión de ribosomas del gen $\phi 10$ de T7. Fragmento de 3 kb desde el codón de iniciación de <i>nifL</i> , que lleva una delección <i>NaeI</i> de 120 pb, hasta la diana <i>AccI</i> por detrás del final de <i>nifA</i> , clonado en pT7-7 digerido con <i>NdeI</i> y <i>Sall</i> . Ap ^r .	Narberhaus et al, 1995
pJES329	Operón <i>nifLA</i> superexpresado desde el promotor y el sitio de unión de ribosoms del gen $\phi 10$ de T7. Fragmento de 3.6 kb desde el codón de iniciación de <i>nifL</i> hasta la diana <i>Sall</i> pde <i>nifB</i> , clonado en pT7-7 digerido con <i>NdeI</i> y <i>Sall</i> . <i>nifL</i> lleva el fragmento <i>NdeI-SmaI</i> de 20 pb del MCS de pT7-7 (Tabor, 1994) clonado en la diana <i>NruI</i> distal (+1420). Ap ^r .	E. Santero, sin publicar.
pT7-5	Vector de expresión a partir del promotor del gen $\phi 10$ de T7. Ap ^r .	Tabor, 1994.
pT7-7	Vector de expresión a partir del promotor y el sitio de unión de ribosomas del gen $\phi 10$ de T7. Ap ^r .	Tabor, 1994.

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 medio mínimo se usó el medio K (MacNeil et al, 1978), al que se añadió cuando fue necesario como fuentes de nitrógeno cloruro de amonio (2 g/l), arginina (2 g/l), glutamina (0.25 g/l) o serina (50 mg/l). 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.

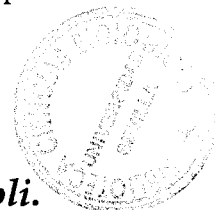
En la Tabla 3 se detallan las concentraciones a las que se usaron los antibióticos y otros agentes químicos añadidos a los medios de cultivo (a menos que se indique lo contrario).

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
Estreptomina	50 mg/l
IPTG	238 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 -70°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 µl de LB frío. Se incubó en hielo 5'. Se añadieron 75 µl de 2XTSS 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 2XTSS 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 µg de ADN plasmídico):

Un cultivo saturado de la estirpe receptora (normalmente DH5α) 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 incubarlo 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. Triptona, 5 g. extracto de levadura, 0.5 g. NaCl, 5 ml. KCl 250 mM. Ajustar pH a 7.0 con NaOH y autoclavar. Añadir posteriormente 5 ml. MgCl₂ 2M.

Medio SOC: 20 g. Triptona, 5 g. extracto de levadura, 0.5 g. NaCl, 5 ml. KCl 250 mM. Ajustar pH a 7.0 con NaOH y autoclavar. Añadir posteriormente 5 ml. 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 µl 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. Transferencia de plásmidos y 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 µl en filtros Millipore colocados sobre cajas de LB y se incubaron durante 30' a temperatura ambiente (para la transferencia de marcadores cromosómicos) o a 37°C toda la noche. 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 20". El sedimento se resuspendió en 100 μ l de GTE (glucosa 50mM, EDTA 10mM, Tris HCl 25mM pH8) y se incubó 5' a temperatura ambiente. Se añadieron 200 μ l de solución 2 (NaOH 0.2N, 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 5.8ml. 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 µl de agua y se transfirió a un tubo Eppendorf. A esta suspensión se le añadieron 45 µl 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 µl de agua, se añadieron 192 µl de NaCl 2.5 M y 600 µl 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 µl 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. Preparación de ADN total de *K. pneumoniae*.

Las extracciones de ADN cromosómico se llevaron a cabo de acuerdo con el protocolo descrito por Silberstein y Cohen (1987), con pequeñas modificaciones.

Se recogieron por centrifugación las células de 4.5 ml de cultivo. El sedimento se congeló a -20°C y, tras su descongelación, se resuspendió en 0.4 ml de tampón de lisis (Tris HCl 50 mM, pH 8; EDTA 10 mM; NaCl 100 mM; SDS 0.2%). seguidamente se añadieron 4 µl de una solución de ARNasa a 10 g/l y se incubó a 37°C durante 30'. Al término de la incubación se añadieron 20 µl de proteinasa K (20 g/l) y se incubó 2 horas a 65°C. Seguidamente, la suspensión se extrajo 3 veces con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), 1 vez con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se precipitó con etanol 96%. El precipitado se obtuvo por centrifugación 15' a 13000 rpm en microcentrífuga de sobremesa, se lavó con etanol al 70% (v/v) y se resuspendió en TE.

12. 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, para preparar fragmentos de ADN

para la hibridación Southern, 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°.

13. 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.

14. 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 tres métodos posibles, 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 comprendidos entre 0.5 kb y 1 kb. Se aislaron de geles de agarosa y se purificaron mediante extracción con fenol del fragmento de gel con agitación en vórtex durante 1' y posterior congelación a -80°C durante al menos 30'. Tras una centrifugación durante 10' en microcentrífuga se recuperó la fase acuosa, se extrajo con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (24:24:1), se precipitó con 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 1 kb. Se aislaron de geles de agarosa y se purificaron mediante el kit GeneClean (Bio 101), siguiendo las instrucciones del fabricante.

15. 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 kinasa 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 .

16. Preparación de ARN.

La preparación de ARN total de *E. coli* se realizó mediante el método descrito por Grisolia et al (1982), con algunas modificaciones. Este método implica la preparación de esferoplastos mediante tratamiento con lisozima, su posterior lisis en presencia de hidrocloreuro de guanidina y la extracción y precipitación final del ARN con solventes orgánicos. Células de *E. coli* ET8000 con los plásmidos apropiados se cultivaron en 50 ml de medio K con arginina (2g/l) y ampicilina (30 mg/l) durante 16 h. Los cultivos se pararon subitamente volcándolos sobre 50 ml de solución Killer (azida de sodio 10 mM; cloranfenicol 200 mg/ml en medio K) congelada y triturada finamente. Las mezclas se centrifugaron a 5000 rpm 10' a 4°C en un rotor Beckman JA14. Los sedimentos se resuspendieron en 750 ml de Tris 50 mM pH8; sacarosa 25%; EDTA 1 mM a 0°C y se transfirieron a tubos de polipropileno de 10 ml, se añadieron 150 µl de lisozima a 10 mg/ml y se incubaron 10' a 0°C. Se añadieron 300 µl EDTA 0.25 M pH 7.0 y se incubaron 10' a 0°C. Seguidamente se centrifugaron a 5000 rpm 10' a 4°C en un rotor Beckman JA20 con adaptadores corex, se congelaron los sedimentos de esferoplastos en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C. Sin descongelar los sedimentos se pipetearon en la pared de cada tubo 1.25 µl ditiotreitól 1 M y se añadieron inmediatamente después 1.25 ml de Solución A (hidrocloreuro de guanidina 8 M; acetato de sodio 50 mM pH 5; ditiotreitól 1 mM). Tras homogeneizar durante 2' con vórtex se añadieron 2.5 ml de cloroformo-isoamílico (24:1). y se homogeneizó de nuevo durante 1'. Seguidamente se centrifugó a 5000 rpm 10' a 0°C en un rotor Beckman JA20 con adaptadores corex y se transfirió la fase acuosa a otro tubo de 10 ml, se añadieron 625 µl de etanol al 96% y, tras incubación 30' a -20°C, se sedimentó el precipitado mediante centrifugación a 5000 rpm 10' a 0°C en rotor Beckman JA20 con adaptadores corex. Al sedimento resultante se le añadieron 1.25 µl ditiotreitól 1 M y 1.25 ml de Solución B (hidrocloreuro de guanidina 8 M; EDTA 20 mM pH 7) y se resuspendió en esta mezcla. Seguidamente se añadieron 20 µl de acetato de sodio 3 M pH 5 y 625 µl de etanol al 96% y tras incubación 30' a -20°C se sedimentó el precipitado mediante centrifugación en las condiciones anteriores. Los pasos de resuspensión en Solución B con ditiotreitól y posterior precipitación se repitieron tres veces. Tras la última precipitación se resuspendió el sedimento en 2 ml de EDTA 20 mM pH 7, se añadió 1 volumen de cloroformo-butanol (4:1), se mezcló con vórtex durante 2', y tras centrifugar 5' en centrífuga de sobremesa a 5000 rpm se recuperó la fase acuosa. A la fase orgánica se le añadió 1 ml de EDTA 20 mM pH7,

se centrifugó en las mismas condiciones y se recuperó la fase acuosa, que se añadió a la anteriormente recuperada. A esta suspensión se le añadieron 3 volúmenes de acetato de sodio 4 M pH 6 y se incubó al menos 12 horas a -20°C . Posteriormente se centrifugó 30' a 5000 rpm a 4°C en microcentrífuga de sobremesa y el precipitado se resuspendió en 400 μl de agua. En este punto se determinó la concentración y pureza de las preparaciones de ARN a partir de su A_{260} y A_{280} . Seguidamente se añadieron 0.1 V de acetato sódico 4 M pH 6 y 2.5 V de etanol al 96% se almacenaron las preparaciones en forma de suspensión etanólica a -80°C .

17. Detección de secuencias de ADN por hibridación en filtro (Southern blot).

a. Electroforesis y transferencia a filtro de nylon. Tras la electroforesis convencional en gel de agarosa, los geles fueron tratados según Sambrook et al, (1989), con las soluciones de despurinización, desnaturalización y neutralización. La transferencia del ADN desde geles convencionales a filtros de nylon Hybond (Amersham) se realizó usando un sistema de vacío (TransVac TE80, Hoeffler) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez transferidos los filtros se secaron y se fijaron en un "cross-linker" por irradiación con luz ultravioleta.

b. Marcaje de sondas de ADN con digoxigenina-dUTP. Se empleó el método no radiactivo de la digoxigenina-dUTP (deoxiuridín trinucleótido fosfato) de Boehringer Mannheim. Las sondas fueron normalmente fragmentos de restricción aislados de geles de agarosa y se marcaron mediante el método de cebado aleatorio o "random priming" siguiendo las intrucciones del fabricante.

c. Hibridación y detección de la señal. Los filtros de nailon se trataron según las instrucciones del fabricante (Boehringer Mannheim). Se prehibridaron un mínimo de 1 hora a 42°C , empleando formamida al 50% en la solución de prehibridación e hibridación y usando el tampón de bloqueo suministrado en el lote. La hibridación se llevó a cabo durante 14 horas a 42°C . Seguidamente se hicieron dos lavados de 5' cada uno con $2\times\text{SSC}$, 0.1% SDS a temperatura ambiente y otros dos de 15' cada uno con $0,1\times\text{SSC}$, 0.1% SDS a 68°C .

La detección se basa en el reconocimiento de la digoxigenina por un anticuerpo. Este anticuerpo está conjugado con la fosfatasa alcalina. Tras incubar

el filtro con el anticuerpo y lavar el anticuerpo sobrante, la reacción de la fosfatasa se pone de manifiesto con CSPD® (Boehringer), que es un sustrato luminiscente de la fosfatasa alcalina. El filtro se utiliza posteriormente para impresionar una película de rayos X durante el tiempo necesario (5' a 12 h) a temperatura ambiente.

18. Detección de secuencias de ARN por hibridación en filtro (Northern blot).

a. Electroforesis de ARN en gel de agarosa con formaldehído. La separación por tamaño de moléculas de ARN se realizó básicamente como está descrito en Sambrook et al. 5 µg de ARN total se precipitaron con etanol y se resuspendieron en una mezcla que contenía 3 µl de agua, 1.25 µl de tampón de electroforesis concentrado 10 veces, 2.25 µl formaldehído 12.3 M, 6.25 µl formamida y 0.5 µl bromuro de etidio a 0.5 g/l. Las muestras se calentaron 15' a 65°C, se les añadieron 2 µl de tampón de carga y se cargaron en un gel de agarosa al 1% en tampón MOPS (MOPS 40 mM. pH7.0; acetato de sodio 10 mM; EDTA 1 mM) con formaldehído 0.66 M. La electroforesis se corrió a 70 V hasta que el frente de azul de bromofenol había corrido 2/3 del gel.

b. Tratamiento del gel y transferencia del ARN a filtro de nylon. El gel de ARN se trató tres veces sucesivas durante 5' con agua a 65°C para eliminar el formaldehído, se equilibró en 10xSSC en dos cambios de 20' cada uno. La transferencia a filtro de nylon se realizó de forma análoga a la descrita para el Southern blot (ver más arriba), usando como solución de transferencia NaOH 50 mM/NaCl 1.5 M. Tras secar el filtro, se fijó el ARN mediante irradiación con luz ultravioleta.

c. Hibridación y detección de la señal. La prehibridación e hibridación se realizó de acuerdo con lo descrito por Boehringer-Manheim. Se usó la solución de prehibridación/hibridación con alta concentración de SDS (SDS 7%; formamida 50%; 5X SSC; reactivo de bloqueo 2%; fosfato de sodio 50 mM. pH 7.0; N-laurilsarcosina 0.1%) Se prehibridó durante al menos 1 hora a 50°C y se hibridó en las mismas condiciones durante 14 horas en presencia de la sonda deseada marcada con digoxigenina-dUTP como se ha descrito para el Southern blot. Los

lavados y el protocolo de detección se realizaron igualmente de forma análoga a la descrita para el Southern blot.

19. 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 ditiotreititol 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 (Hoeffler) y se detectó la marca radiactiva tras su exposición a una película de rayos X.

20. 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.

21. 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.

22. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida-SDS.

Las electroforesis de proteínas se realizaron en gel de poliacrilamida-SDS, básicamente según el método de descrito por Laemmli (1970). Las células de 1 ml de cultivo se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en 25 μ l H₂O por unidad de D.O.₆₀₀ del cultivo. Se añadió el mismo volumen de tampón de carga 2X (Tris-HCl 160 mM, pH 8; glicerol 20%; SDS 2%; azul de bromofenol 0.1%; β -mercaptoetanol 10%) y esta mezcla se hirvió 5', y se centrifugó 1' para sedimentar los restos celulares. Las electroforesis de los extractos así preparados se realizaron en geles discontinuos consistentes en un gel superior de empaquetamiento Tris-HCl 125 mM, pH 6.8; SDS 0.1%; acrilamida:bisacrilamida (36.5:1) 4.5%, persulfato amónico 0.01%; TEMED 0.001%) y un gel inferior de separación (Tris-HCl 375 mM, pH 8.8; SDS 0.75%; acrilamida:bisacrilamida (36.5:1) a la concentración deseada; persulfato amónico 0.03%; TEMED 0.0025%). Las electroforesis se corrieron a 25 mA en el gel de empaquetamiento y a 40 mA en el de separación. Los geles se tiñeron en una solución de azul brillante de Coomassie R-250 0.2%, metanol 40% y ácido acético 20% durante 30" en un horno microondas a máxima potencia. Los geles teñidos se dejaron enfriar y se destiñeron secuencialmente con una solución de metanol 50% y ácido acético 10% y una solución de metanol 30% y ácido acético 7.5% hasta que el fondo perdió el color azul. Finalmente, se deshidrataron con una solución de glicerol 1% y ácido acético 10% durante 1 hora y se secaron en un secador de geles DrygelSr SE1160 (Hoeffer).

RESULTADOS

1. Efecto del desequilibrio de la dosis génica entre *nifL* y *nifA* sobre la expresión del promotor de *nifH*.

El mecanismo mediante el cual la proteína NifL de *K. pneumoniae* inactiva a NifA aún no ha sido establecido. NifA se sintetiza en forma activa, pero en condiciones no demasiado severas de limitación de nitrógeno o aerobiosis NifL inhibe eficientemente la actividad de NifA. NifL y NifA se producen en cantidades aproximadamente estequiométricas y en general se asume que ambas proteínas se agregan para producir un complejo inactivo, basándose en datos de coimmunoprecipitación (Henderson et al 1989). Estos datos, sin embargo, no son muy concluyentes, dado que ambas proteínas tienden a agregarse y precipitar en ausencia de anticuerpos. De existir este tipo de inactivación, se requeriría un estricto control en la síntesis de NifA para garantizar una correcta regulación de los genes *nif*. Teóricamente, una cantidad excesiva del elemento regulador (NifA) titularía al sensor (NifL), lo que redundaría en la activación de los promotores *nif* en cualquier condición en que se produjera la síntesis de NifL y NifA. El resultado sería la síntesis de los productos Nif en las condiciones de activación del sistema *ntr*, puenteando así el sistema específico de regulación, que requiere para la activación unos niveles más bajos de nitrógeno y anaerobiosis. Sin embargo, una acción catalítica de NifL

sobre NifA podría permitir una correcta regulación sin necesidad de un control estricto de los niveles absolutos de las proteínas reguladoras.

Con objeto de probar si un exceso moderado en la síntesis de NifA en relación con la de NifL altera la expresión de los promotores activados por NifA se ha construido una estirpe de *K. pneumoniae* que lleva en el cromosoma una duplicación del operón *nifLA*, con una delección en una de las copias de *nifL* y se ha medido la activación de una fusión *nifH-lac* en condiciones en las cuales NifL debe inactivar a NifA, impidiendo la expresión del resto de promotores *nif*.

1.1. Construcción de duplicaciones del operón *nifLA* en el cromosoma de *K.pneumoniae*.

La integración de una copia extra del operón *nifLA* en el cromosoma de *K. pneumoniae* se realizó básicamente como está descrito en Miller y Mekalanos (1988). Como vector se usó el plásmido pGP704cat(+) (Figura 9). Este plásmido es un derivado de pGP704 al que se le ha insertado un fragmento del gen *cat* de pAW302 en la diana única *ScaI* del gen *bla*. El plásmido resultante es, por tanto, Ap^s Cm^r. Para el mantenimiento de este plásmido se requiere que la bacteria proporcione en *trans* la proteína π , producto del gen *pir*, necesaria para su replicación, lo que en la práctica convierte al plásmido en suicida en la mayor parte de las estirpes bacterianas. Además, la presencia del origen de transferencia de RP4 facilita su movilización conjugativa, por lo cual es un vector idóneo para forzar la integración de material exógeno por recombinación o transposición en gran número de bacterias. Los plásmidos pIZ287 y pIZ288 son derivados de pGP704cat(+) que contienen respectivamente el operón *nifLA* completo y con una delección en fase *SmaI-NaeI* en *nifL* (Figura 9). Esta delección elimina 263 aminoácidos de NifL, haciéndola inactiva, sin afectar a la expresión de *nifA*. (Arnott et al, 1989; Narberhaus et al, 1995).

Los plásmidos se transfirieron conjugativamente desde *E. coli* S17-1(λ *pir*) a *K. pneumoniae* VJSK014Rif, y se forzó su integración añadiendo cloranfenicol al medio de selección. La correcta integración de los plásmidos en las estirpes construidas se comprobó por Southern blot (Figura 10). Durante la realización de este experimento se observó que frecuentemente se producía la integración de más de una copia del plásmido, particularmente cuando se usaban

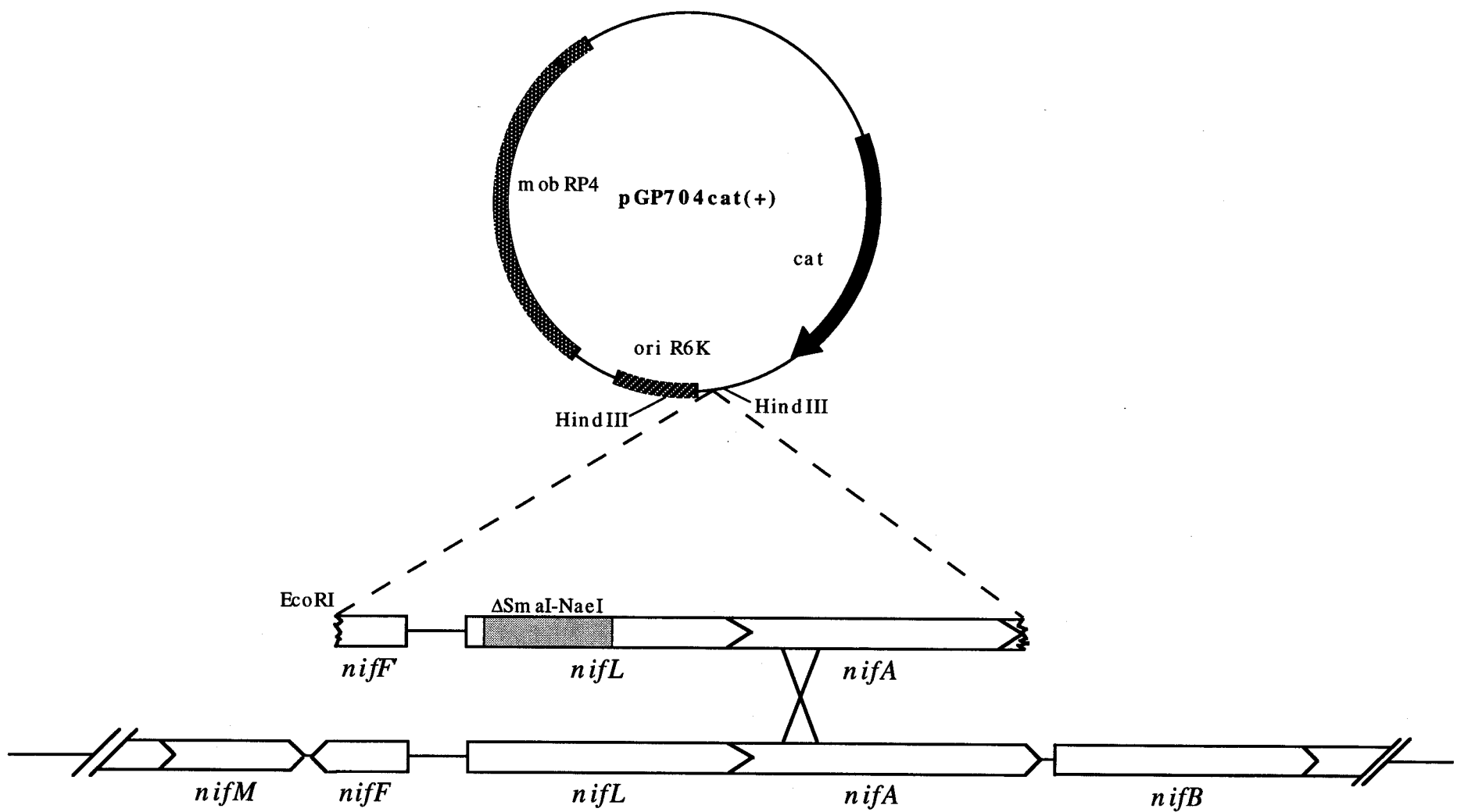


Figura 9. Esquema de la construcción de las duplicaciones del operón *nifLA* en el cromosoma de *K. pneumoniae*. En la parte superior aparece el vector suicida pGP704cat(+), utilizado para introducir la copia extra del operón *nifLA*. En la parte inferior se muestra el operón *nifLA* silvestre (presente en pIZ287) y la extensión de la deleción *SmaI-NaeI* (presente en pIZ288), así como una representación del hecho de recombinación que produciría la integración de estos plásmidos en el cromosoma de *K. pneumoniae*.

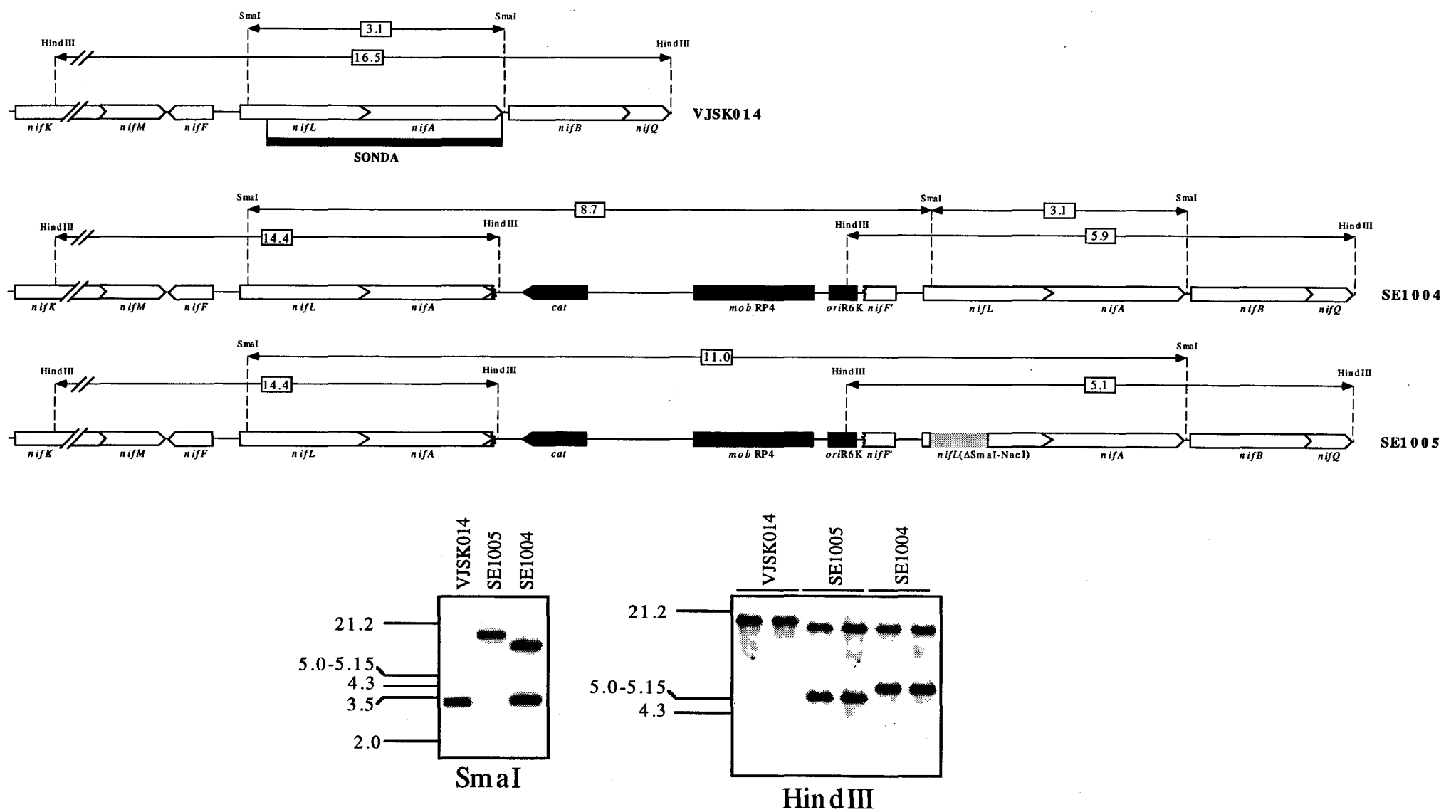


Figura 10. Esquema de las duplicaciones cromosómicas del operón *nifLA* y Southern blot del ADN total de dichas estirpes, digerido con *Sma*I o *Hind*III e hibridado con un fragmento *Sal*I (indicado como una barra negra) que cubre gran parte del operón. Se muestran los sitios de corte de *Sma*I y *Hind*III y los tamaños esperados de los fragmentos generados en cada estirpe.

concentraciones altas de cloranfenicol (hasta 20 mg/l). Las digestiones del ADN cromosómico utilizadas en el Southern blot permiten distinguir si ha habido una o múltiples integraciones.

1.2 Cinética de expresión del promotor *nifH* en presencia de las duplicaciones del operón *nifLA*.

Las estirpes SE1004 y SE1005, portadoras de las duplicaciones cromosómicas, con dosis génicas *nifL:nifA* 2:2 y 1:2 respectivamente, y la parental VJSK014Rif se transformaron con pIZ263, plásmido de bajo número de copias con una fusión traduccional *nifH-lac*. Para medir la actividad de la fusión se realizaron cultivos de los transformantes en medio K con cloruro amónico (2 g/l) y ampicilina (50 mg/l). A D.O.₆₀₀=0.2-0.3 se recogieron las células, se lavaron y se resuspendieron en medio K con ampicilina (50 mg/l) y serina (50 mg/l) como única fuente de nitrógeno añadida. Estas condiciones de limitación de nitrógeno son suficientes para inducir la fijación de nitrógeno en anaerobiosis en una estirpe silvestre de *K. pneumoniae*. De cada suspensión se hicieron dos cultivos: uno de ellos se mantuvo en aerobiosis y al otro se le forzó la anaerobiosis burbujeando nitrógeno. Los cultivos se realizaron en ausencia de cloranfenicol, dado que la adición de este antibiótico incluso en pequeñas cantidades (5 mg/l), lejos de garantizar la estructura de las duplicaciones cromosómicas, promovía un aumento en el número de copias de las mismas (datos no presentados). A cada cultivo se le midió periódicamente la actividad β -galactosidasa desde tiempo 0 hasta su estabilización. Las muestras de los cultivos anaeróbicos se tomaron con una jeringa Hamilton previa introducción del mismo volumen de nitrógeno en el cultivo. La integridad de las duplicaciones durante el periodo de ensayo se comprobó rutinariamente mediante Southern blot al término de éste, confirmando en todos los casos que las duplicaciones seguían presentes y que el número de copias no había aumentado.

Los resultados de la inducción del promotor *nifH* en las estirpes portadoras de duplicaciones cromosómicas del operón *nifLA* indican que la inducción fisiológica en anaerobiosis no se altera significativamente por el desequilibrio de la dosis génica entre *nifL* y *nifA* (Figura 11, A). En aerobiosis, la estirpe silvestre VJSK014 y la portadora de la duplicación con dosis génica equilibrada (SE1004) reprimen eficazmente al promotor *nifH* (Figura 11, B). Sin embargo, se observa

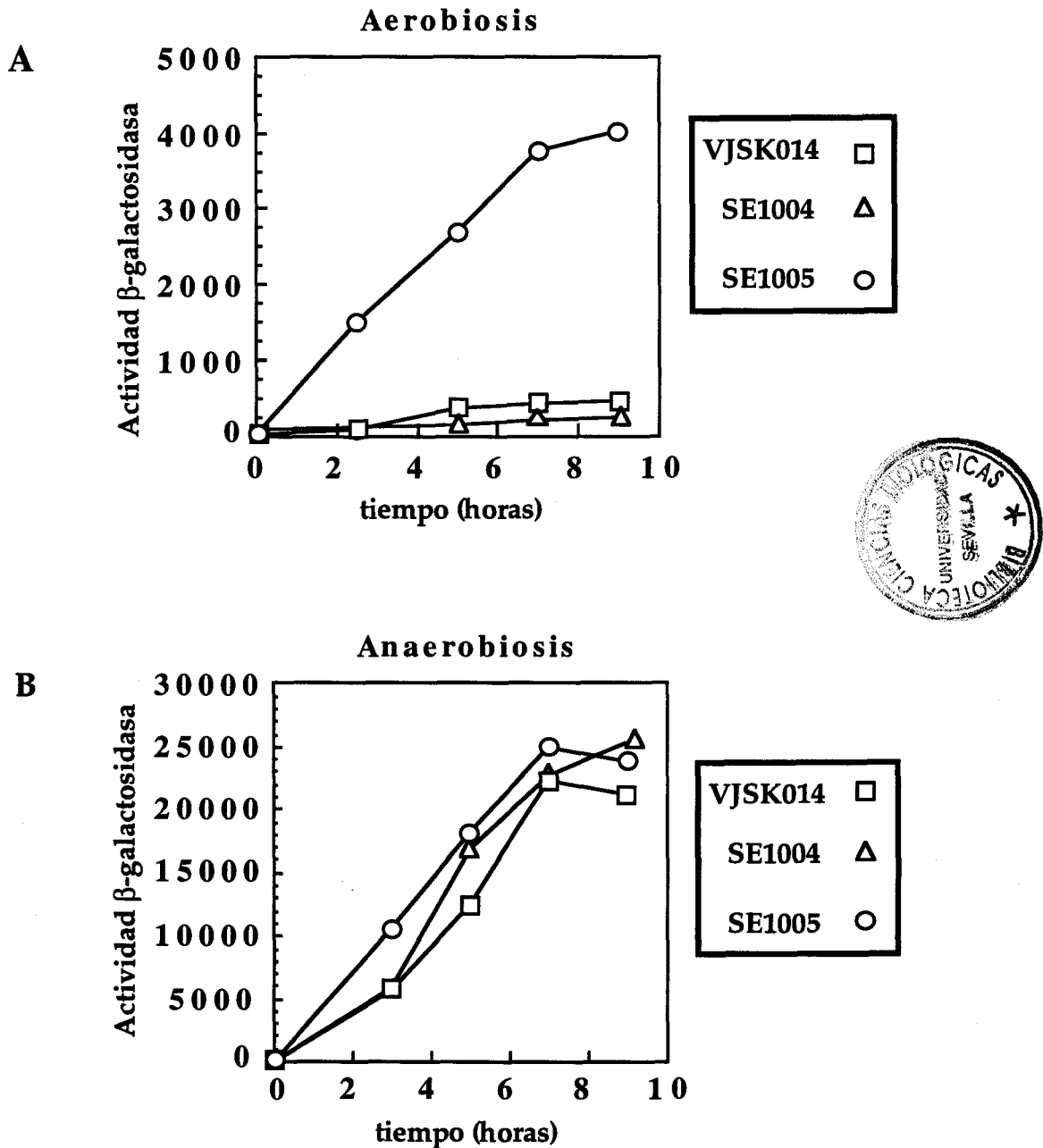


Figura 11. Cinética de inducción de una fusión *nifH-lac* en las estirpes de *K. pneumoniae* portadoras de duplicaciones cromosómicas del operón *nifLA*. VJSK014 es la estirpe silvestre, SE1004 lleva una duplicación del operón silvestre y SE1004 lleva una duplicación con una delección en fase en una de las copias de *nifL*. A. Inducción en aerobiosis. B. Inducción en anaerobiosis.

una desrepresión parcial de la expresión del promotor *nifH* en aerobiosis en la estirpe que lleva dos copias de *nifA* y una de *nifL* (SE1005). La actividad de la fusión *nifH-lac* en estas condiciones es aproximadamente de un 20% respecto a la correspondiente en anaerobiosis. Un exceso de dos veces en la cantidad de NifA impide su inactivación completa por NifL, lo que indica que NifL se sintetiza justo en cantidad suficiente para inhibir a NifA. El equilibrio en la síntesis de estas dos proteínas antagónicas se convierte por tanto en un elemento esencial para garantizar una correcta regulación de los promotores *nif*.

2. Efecto de la terminación prematura de la traducción de *nifL* sobre la expresión de *nifA*.

Dado que un exceso de NifA puede llevar a la expresión del resto de los genes *nif* en condiciones en las cuales no se puede llevar a cabo la fijación de nitrógeno, parece esencial para el funcionamiento del sistema que *K. pneumoniae* posea algún mecanismo que garantice la síntesis coordinada de los productos NifL y NifA. Existen dos fenómenos, polaridad y acoplamiento traduccional, que pueden cumplir con esta misión, ya que ambos operan supeditando la expresión de un gen distal a la expresión previa de un gen proximal. Aunque fenotípicamente son similares, ya que la presencia de cualquiera de los dos fenómenos redundaría en la falta de expresión del gen distal cuando la traducción completa del gen proximal no se lleva a cabo, los mecanismos a través de los que operan son radicalmente distintos. La polaridad se caracteriza por la terminación prematura de los transcritos no traducidos en regiones concretas del ARNm. Estas regiones son terminadores críticos dependientes de Rho, que se activan al no ser traducidos. Rho reconoce estas regiones e interacciona con la ARN polimerasa, deteniendo la transcripción. El acoplamiento traduccional, sin embargo, se basa en la incapacidad de iniciar la traducción de algunos genes a no ser que se complete la traducción del gen inmediatamente anterior. El acoplamiento traduccional aparece frecuentemente en pares de genes cuyos codones de iniciación y terminación están solapados, como es el caso de *nifL* y *nifA*, y se le ha asignado un papel en la síntesis estequiométrica de varios pares de proteínas que forman complejos. Para dilucidar si existe alguno de estos fenómenos en el operón *nifLA* decidimos abordar el estudio del efecto de una traducción incompleta de *nifL* sobre la expresión de *nifA*. Con este objetivo se construyeron una serie de mutaciones

que provocan la terminación prematura de la traducción en la fase de lectura de *nifL* y se midió su efecto sobre la actividad de fusiones *nifLA-lac* transcripcionales o traduccionales. Esta aproximación nos permite distinguir si existe un efecto sobre la transcripción de *nifA*, que sería atribuible a la existencia de polaridad en el operón y se detectaría tanto en la fusión transcripcional como en la traduccional, o si existe un efecto sobre la traducción de *nifA*, atribuible a acoplamiento traduccional y que se detectaría exclusivamente en la fusión traduccional.

2.1. Construcción de fusiones *nifLA-lac* en bajo número de copias.

Se han generado *in vitro* cuatro mutaciones de cambio de fase en *nifL* que provocan la terminación prematura de la traducción en distintos puntos del gen. Una inserción de 5 pb producida rellenando con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa la diana única *BstEII* y religando provoca la aparición de un codón UAA en fase en la posición 679 respecto al inicio de *nifL*. Una inserción de 4 pb generada análogamente en la diana única *NcoI* provoca la aparición de un codón UGA en fase en la posición 1021 respecto al inicio de *nifL*. Una delección de 2 pb producida al eliminar con la ADN polimerasa de T4 los extremos cohesivos de la diana única *SacII* provoca la aparición de un codón UGA en fase en la posición 1405 respecto al inicio de *nifL*. Finalmente, una inserción de 20 pb en el sitio *NruI* más distal con un codón UAG en fase provoca la terminación de la traducción en la posición 1426 respecto al inicio de *nifL*. Las distancias entre los codones de terminación de cada uno de estos mutantes y la Shine-Dalgarno de *nifA* son de 801, 458, 67 y 68 nucleótidos respectivamente. Se han construido fusiones *lac* transcripcionales y traduccionales a la altura de la diana única *NarI* de *nifA* sobre el operón silvestre y las versiones mutantes (Figura 12). Los vectores utilizados en la construcción han sido los plásmidos pJEL126 (fusiones transcripcionales) y pIZ237 (fusiones traduccionales) (Figura 13). Estos plásmidos están presentes en la célula en una copia por cromosoma, lo que asegura una situación similar a la fisiológica.

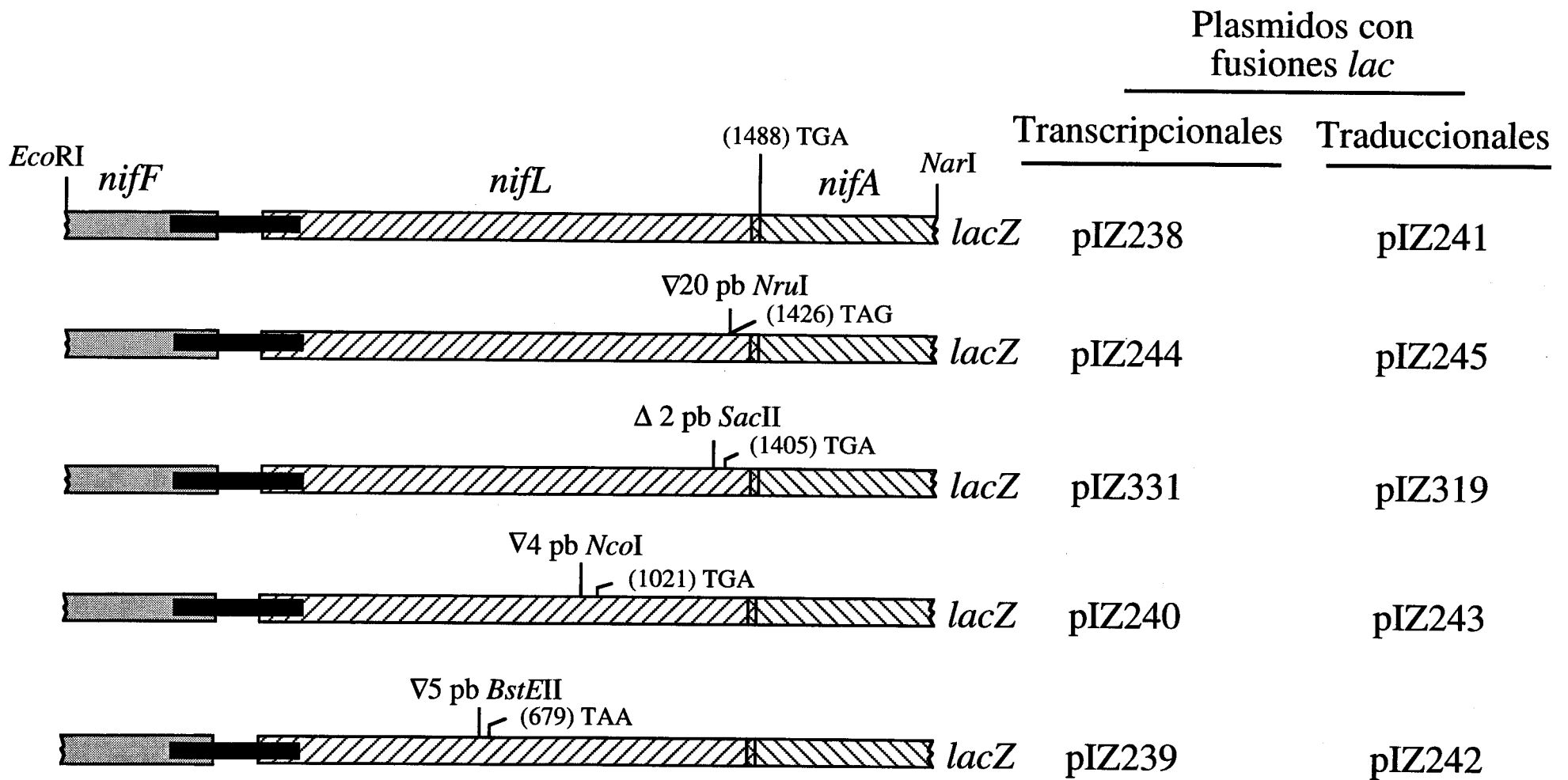


Figura 12. Esquema de las fusiones *nifA-lac*. Se indican los desfases producidos en *nifL* y las posiciones de los codones de terminación para cada uno de ellos. A la derecha aparecen los nombres de los derivados de pIZ237 y pJEL126 que llevan cada una de las construcciones.

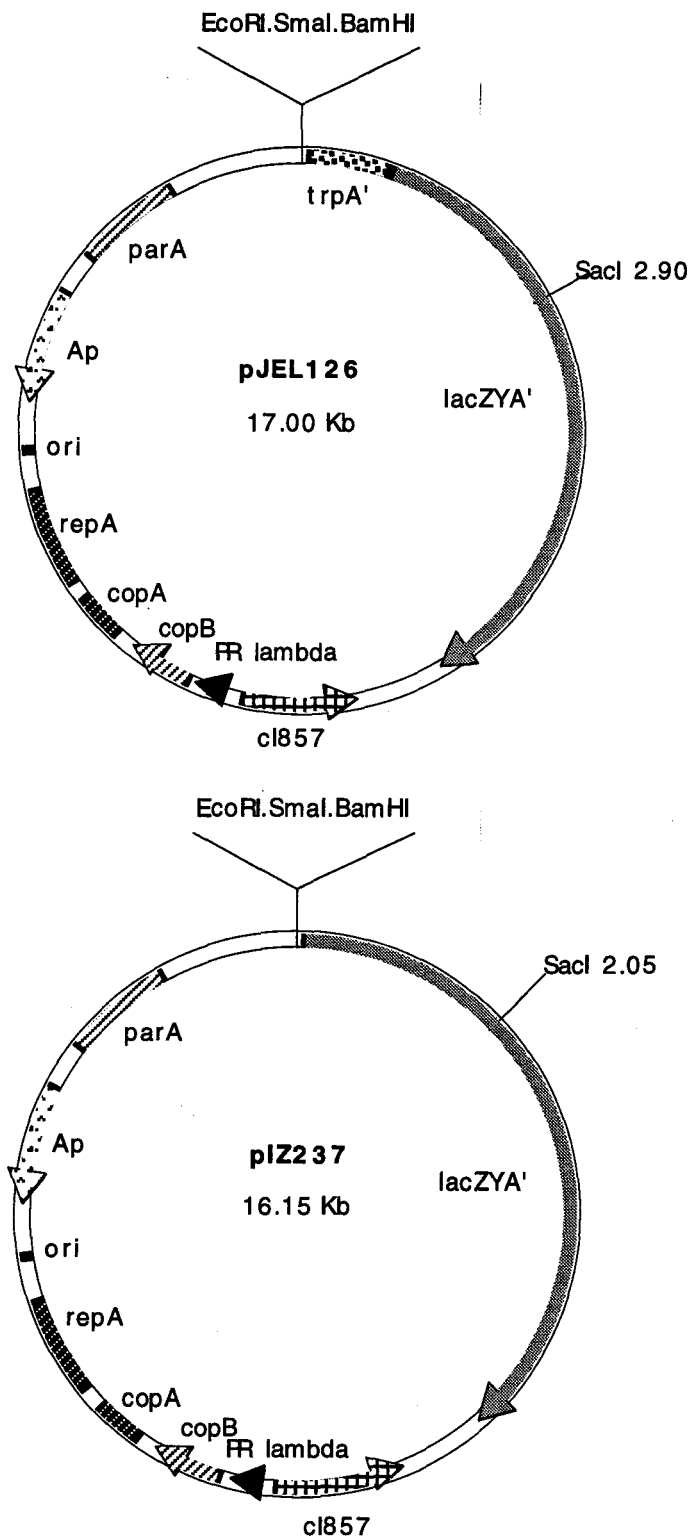


Figura 13. Esquema de pJEL126, vector de fusiones *lac* transcripcionales de bajo número de copias y pIZ237, vector de fusiones *lac* traduccionales de bajo número de copias.

2.2 Ensayo de la actividad de las fusiones *nifLA-lac*.

El efecto de la terminación prematura de la traducción de *nifL* sobre la expresión de *nifA* se determinó a partir de la actividad β -galactosidasa de las fusiones *nifLA-lac* en *K. pneumoniae* y *E. coli*. Las medidas de actividad β -galactosidasa se realizaron tras incubación de las estirpes portadoras de las fusiones génicas durante 16 -20 h. a 30°C y en aerobiosis en medio K con 2 g/l de arginina y 30 mg/l de ampicilina (para *E.coli*) o 0.25 g/l de glutamina y 50 mg/l de ampicilina (para *K. pneumoniae*). La D.O.₆₀₀ de los cultivos era de 0.4-0.6 en el momento del ensayo. Los controles no inducidos se realizaron en el mismo medio en presencia de 2 g/l de cloruro amónico.

Los resultados obtenidos son similares en las dos especies bacterianas (Figura 14). Todos los desfases provocan una reducción en la expresión de las fusiones transcripcionales, lo que indica que existe polaridad transcripcional en este operón. Aunque este efecto es más fuerte en el caso de las dos mutaciones más cercanas al inicio de *nifL* (pIZ239 y pIZ240), las dos más lejanas (pIZ244 y pIZ331) aún presentan una reducción de 3-4 veces en la expresión de las fusiones transcripcionales. Este dato es sorprendente, dado que en estos mutantes la traducción de *nifL* termina muy cerca del codón de terminación original, dejando tan sólo un pequeño segmento (67 ó 68 nucleótidos) de ARNm de *nifL* sin traducir hasta las señales de iniciación de la traducción de *nifA*. La longitud mínima de ARNm libre de ribosomas necesaria para que se produzca terminación de la transcripción dependiente de Rho, es de 85-90 nucleótidos (Hart y Roberts, 1994).

El efecto de la terminación prematura en *nifL* sobre las fusiones traduccionales es más drástico. Los desfases más distales presentan una actividad inferior al 5% respecto al control silvestre, mientras que los proximales presentan niveles prácticamente basales. Estos datos son coherentes con la hipótesis de que las mutaciones de terminación prematura en *nifL* tengan un efecto adicional impidiendo la traducción de *nifA*. El bloqueo en la traducción de *nifA* podría explicar la reducción observada en las fusiones transcripcionales en presencia de las dos mutaciones de terminación prematura más tardías, ya que se podría producir la terminación de la transcripción dentro de la fase de lectura de *nifA*. Alternativamente, la falta de traducción de *nifA* podría reducir la estabilidad del ARNm, como se ha observado en algunos operones de proteínas ribosómicas (Cole y Nomura, 1986) o en *lacZ* (McCormick et al, 1994).

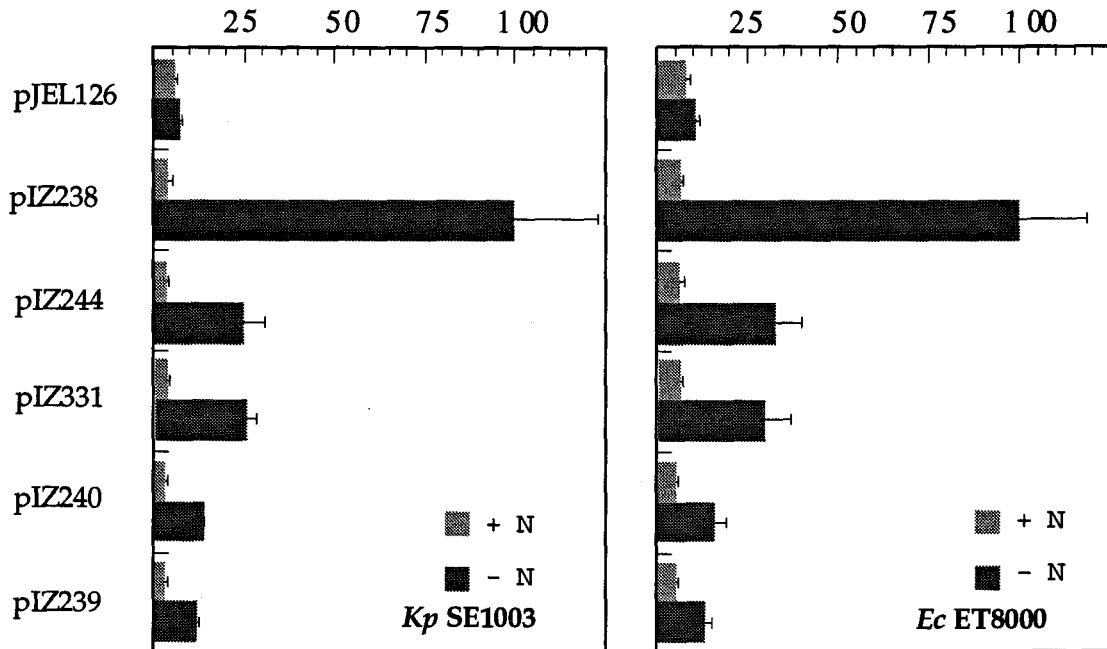
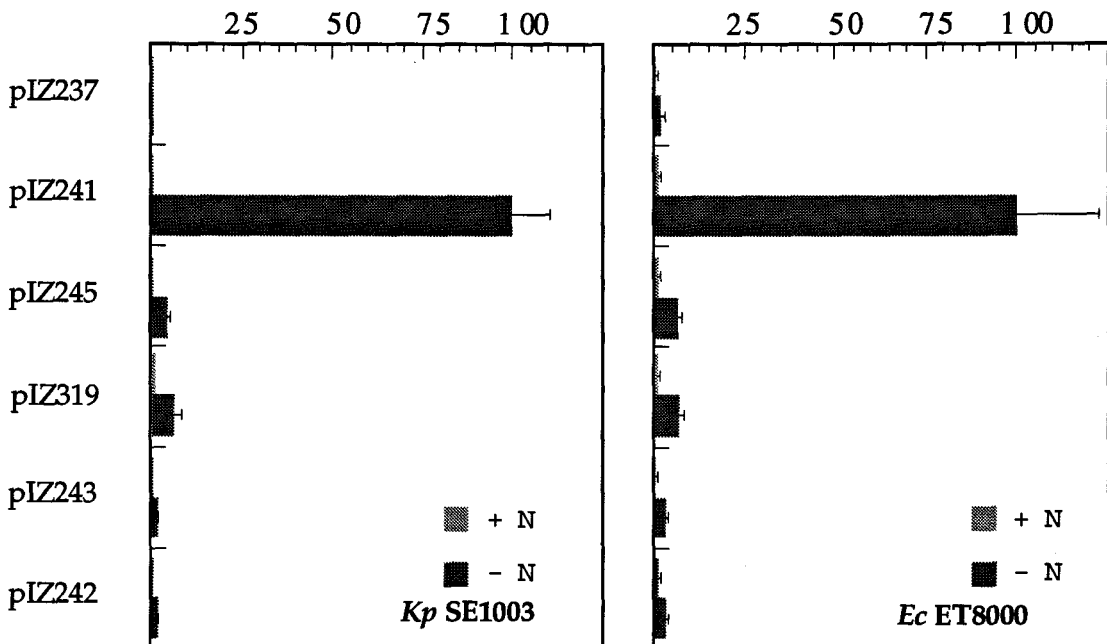
Actividad β -galactosidasa (Fusiones transcripcionales)Actividad β -galactosidasa (Fusiones traduccionales)

Figura 14. Efecto de la terminación prematura de la traducción de *nifL* sobre la actividad de las fusiones *nifLA-lac*. En abscisa se indica el nombre del plásmido y en ordenada la actividad β -galactosidasa expresada como porcentaje de la actividad de las fusiones silvestres (pIZ238 y pIZ241). Los dos paneles de la izquierda corresponden a los ensayos realizados en *K. pneumoniae* SE1003 y los de la derecha, a *E. coli* ET8000.

2.3. Análisis por Northern blot del ARNm de *nifLA*.

Con objeto de confirmar que la reducción de la expresión de las fusiones transcripcionales *nifA-lac* en presencia de las mutaciones de terminación prematura en *nifL* se debe a la falta de ARNm del operón *nifLA*, como sería de esperar en el caso de que se produjera la terminación prematura de la transcripción, se extrajo el ARN total de *E. coli* ET8000 con los plásmidos portadores de las fusiones transcripcionales *nifA-lac* cultivada en las condiciones descritas para la inducción del promotor *nifL* (Sección 2.2), se fraccionó en gel de agarosa-formaldehído y se realizó un Northern blot usando como sonda el fragmento *SmaI-SalI* de 0.6 kb interno a *nifL*, marcado con dUTP-Digoxigenina.

El resultado del Northern blot (Figura 15) muestra que sólo se observa una banda del tamaño de la especie de ARNm producida por la fusión (aproximadamente 8 kb) en el carril correspondiente al operón silvestre (pIZ238). Los mutantes que terminan la traducción más lejos del inicio de *nifL* (pIZ244 y pIZ331) presentan una marca de poca intensidad en la zona del gel correspondiente al tamaño del ARNm completo, mientras que los otros dos (pIZ239 y pIZ240) no presentan señal a esa altura. La caída en la expresión de las fusiones *nifA-lac* en presencia de las mutaciones de terminación prematura en *nifL* es, por tanto, debida a una drástica reducción en la concentración de ARNm en la célula. Esta reducción se puede deber a una terminación prematura de la transcripción condicionada a la falta de traducción de determinados segmentos del ARNm, como es característico en los terminadores intragénicos dependientes de Rho, o bien a una disminución en la estabilidad del ARNm. En los carriles correspondientes las dos mutaciones más proximales se observan otras bandas difusas de bajo peso molecular. Estas bandas podrían corresponder a especies de ARNm truncado por la terminación prematura de la transcripción, o bien a productos de degradación del ARNm de tamaño completo. No se puede descartar la presencia de bandas adicionales en las zonas de inhibición de la hibridación debida a los ARNr.

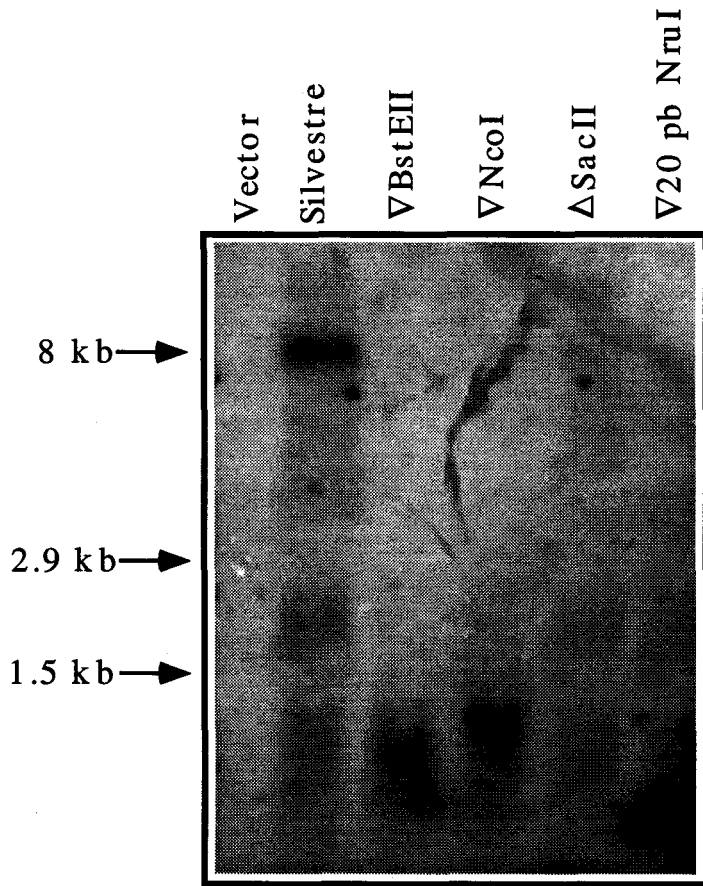


Figura 15. Northern blot del ARN total de *E. coli* ET8000 con los plásmidos portadores de las fusiones transcripcionales *nifA-lac* con *nifL* silvestre y con las distintas mutaciones de terminación prematura. Como sonda se utilizó el fragmento *SmaI-SalI* de 0.6 kb interno a *nifL* marcado con Digoxigenina-dUTP.

3. Análisis de las señales implicadas en la polaridad en el operón *nifLA*.

En la sección 2 hemos demostrado que la terminación prematura de la traducción de *nifL* afecta la expresión de *nifA* a nivel transcripcional. Asimismo hemos mostrado que este efecto se debe a una reducción en la cantidad de ARNm de tamaño completo correspondiente al operón *nifLA*. La polaridad transcripcional está asociada a la presencia de determinadas regiones en el ARNm que son reconocidas por Rho (sitios rut, de Rho ut^{il}ization). Los sitios rut son terminadores críticos de la transcripción, ya que Rho no los puede utilizar a no ser que estos segmentos del mensajero no estén siendo traducidos. En la presente sección abordamos la búsqueda inicial de secuencias que respondan a los requerimientos de secuencia descritos para los sitios rut y la posterior identificación de las secuencias en el operón *nifLA* con actividad terminadora de la transcripción que pudieran ser responsables de la polaridad transcripcional en este operón.

3.1. Búsqueda por ordenador de posibles terminadores dependientes de Rho en el ARNm de *nifLA*.

Las secuencias diana de la proteína terminadora de la transcripción Rho (sitios rut) han sido descritas como regiones con poca estructura secundaria, bajo contenido en guaninas, alto contenido en citosinas dispuestas con un espaciamiento regular y con estructuras secundarias inmediatamente por detrás que definen los extremos 3' de los transcritos (Richardson, 1991). Sin embargo, ninguno de estos requerimientos parece estar presente en todos los terminadores dependientes de Rho. En 1991, Alifano et al describieron un método de análisis por ordenador que permite la identificación de sitios rut. El método se basa en la comparación del contenido en guaninas y citosinas en una ventana de 78 nucleótidos que se desliza a lo largo de la secuencia del ARNm. Los sitios rut aparecen como regiones en las que el contenido en guaninas es significativamente inferior al de citosinas, denominadas "burbujas" C>G. La amplitud de la "burbuja" parece correlacionar con la eficiencia de la terminación en varios terminadores naturales (Alifano et al, 1991). Sin embargo, otros autores han mostrado que la alteración en el número de citosinas de los terminadores *λtrp1* y *trp1'* no correlaciona con la eficiencia de la terminación y han propuesto que no

sólo es importante el número de citosinas, sino también su distribución (Hart y Roberts, 1991; Zalazan y Platt, 1992).

Se ha aplicado este tipo de análisis al operón *nifLA* y ha revelado ocho regiones con un contenido en citosinas significativamente mayor que el de guaninas ("burbujas C>G") (numeradas I-VIII, Figura 16), distribuidos a lo largo de las dos fases de lectura del operón. Por su pequeño tamaño, las "burbujas" III y VIII no cumplen con los requerimientos descritos, pero las otras seis podrían en principio actuar como terminadores de la transcripción dependientes de Rho.

3.2. Clonación de fragmentos del operón *nifLA* en un vector sonda de terminadores.

pIC551 es un plásmido desarrollado por Macián et al (1994) para la detección de secuencias capaces de terminar la transcripción (Figura 17). Se trata de un vector de fusiones transcripcionales *lac* con un promotor (λp_R) que proporciona una expresión constitutiva del gen *lacZ* en ausencia del represor de λ . Un sitio múltiple de clonación entre el promotor y el gen informador permite la introducción de fragmentos de ADN en la región correspondiente al ARN líder no traducido. La presencia de actividad terminadora de la transcripción en los fragmentos clonados produce una reducción de la actividad β -galactosidasa en comparación con el vector.

Con objeto de detectar la presencia de terminadores de la transcripción en el operón *nifLA* y de esclarecer el valor diagnóstico del algoritmo descrito para la búsqueda de terminadores dependientes de Rho, se han clonado diez fragmentos de este operón en pIC551 (Figura 18, A). Los fragmentos probados cubren la práctica totalidad del operón y, cuando ha sido posible, se ha mantenido la integridad de las "burbujas C>G" en los fragmentos clonados. Como plásmidos control del sistema se han utilizado pIC554 (Macián et al 1994), que contiene el terminador dependiente de Rho $\lambda tR1$ y pIZ351, que contiene el terminador temprano de T7, cuya actividad es independiente de Rho.

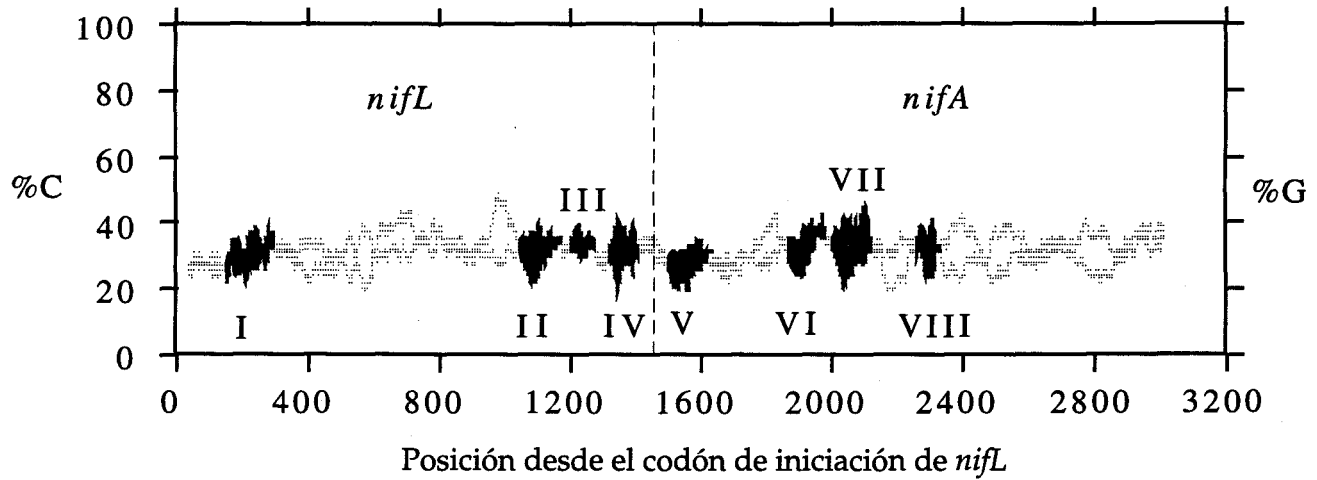


Figura 16. Representación de los porcentajes de C y G en una ventana de 78 nucleótidos que se desplaza a lo largo del ARNm de *nifLA* con un intervalo de 1 nucleótido. En abscisa se representa la posición central de cada ventana respecto al inicio de *nifL* y en ordenada el porcentaje de C y G para cada posición de la misma. Las áreas sombreadas y numeradas I-VIII corresponden a las regiones con un contenido en C significativamente mayor que el de G.

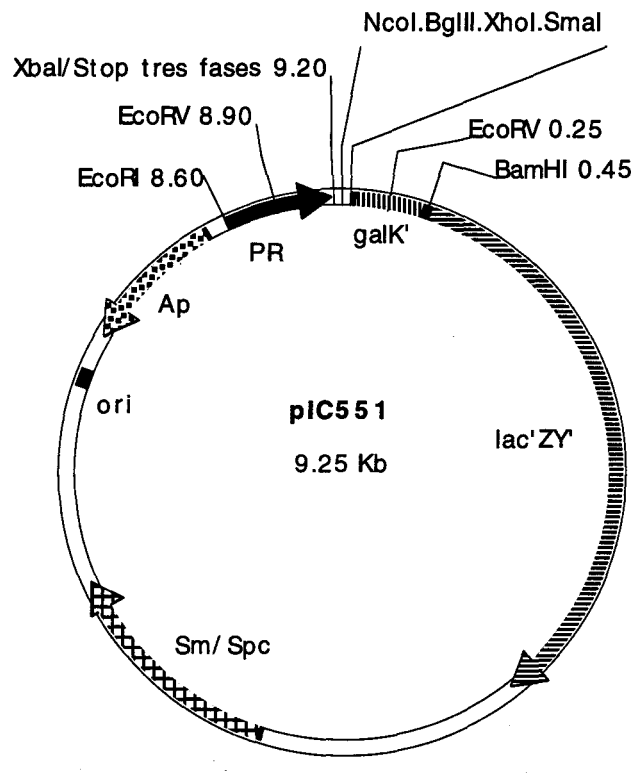
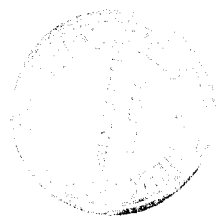


Figura 17. Esquema del vector sonda de terminadores pIC551.



3.3. Análisis de la actividad terminadora de la transcripción de los fragmentos de *nifLA*.

Se ha determinado la actividad β -galactosidasa producida por los plásmidos derivados de pIC551 que contienen diversos fragmentos del operón *nifLA* en *K. pneumoniae* y un mutante de *E. coli* Rho^{ts} (Figura 18). Las estirpes se cultivaron a 30°C en LB con ampicilina (100 mg/l) hasta saturación. Seguidamente se diluyeron 200 veces en el mismo medio (en el caso del mutante Rho^{ts} se diluyó por duplicado) y se incubaron en las mismas condiciones. Al cabo de 2 h. una copia de cada cultivo del mutante Rho^{ts} se transfirió a 42 °C. Las actividades β -galactosidasa se midieron en cultivos en fase exponencial media (D.O.₆₀₀=0.4-0.6) crecidos a 30°C o tras incubación durante 2 h. a 42°C.

En *K. pneumoniae* los plásmidos que contienen las "burbujas" II y VI (pIZ310 y 342) muestran una fuerte reducción (mayor del 80%) de la expresión de la fusión respecto al control (Figura 18, B), lo que indica que estos fragmentos tienen actividad terminadora. Un fragmento que contiene las "burbujas" VI y VII presenta una reducción de la actividad mayor que el que contiene sólo la "burbuja" VI, lo que sugiere que la "burbuja" VII también tiene actividad terminadora de la transcripción, aunque ésta no se ha podido ensayar directamente por no existir dianas de restricción que permitieran clonar la "burbuja" VII de forma aislada. Los restantes fragmentos presentan una actividad terminadora débil o no presentan actividad terminadora.

La expresión derivada del plásmido pIZ337 es más alta que la obtenida en el vector pIC551. Sin embargo, el fragmento *BglII-NcoI* de *nifL* presente en pIZ337 clonado en el vector sonda de promotores pIC552 no produce una expresión significativa (datos no presentados). Por tanto, la mayor actividad observada no se debe a la presencia de una región promotora en este fragmento, sino posiblemente a una mayor estabilidad del ARNm.

La reducción de los niveles de β -galactosidasa observada en *K.pneumoniae* se detecta también en un mutante Rho^{ts} de *E. coli* incubado a temperatura permisiva, aunque en general las diferencias son algo menores (Figura 18, B). Esto puede deberse a que la proteína Rho mutante presente una menor actividad terminadora incluso a temperatura permisiva. El hecho de que no se observara reducción de la actividad en ninguna de las construcciones (excepción hecha del control con un terminador independiente de Rho pIZ351), cuando el mutante

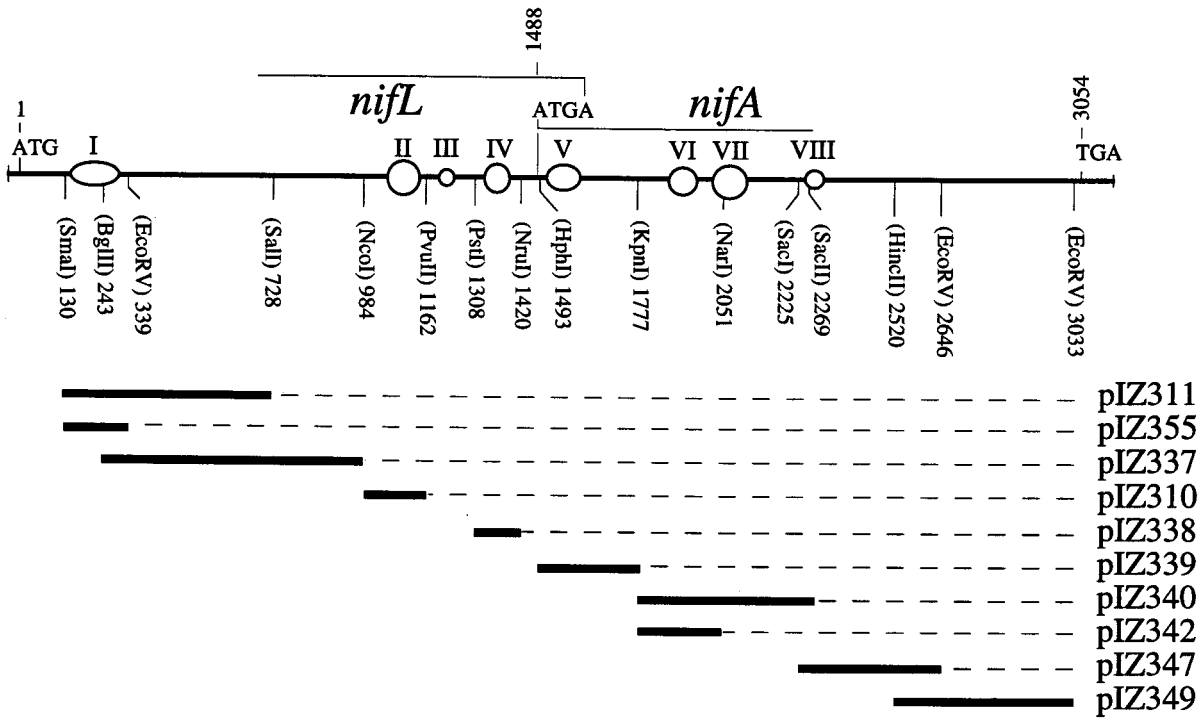


Figura 18. A. Fragmentos de *nifLA* clonados en el vector sonda de terminadores pIC551. En la parte superior se indican las dianas de restricción usadas para las clonaciones y las posiciones de las "burbujas C>G" en el operón.

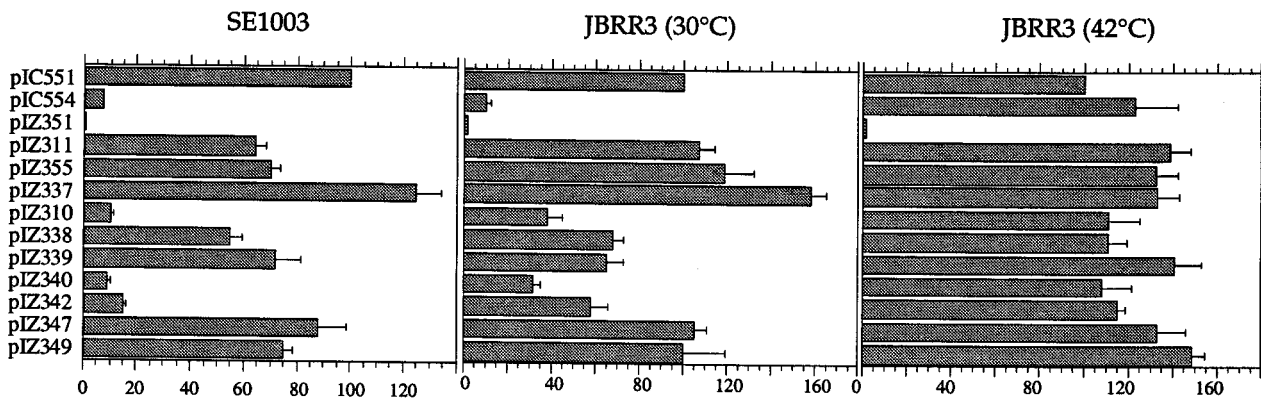


Figura 18. B. Identificación de regiones del operón *nifLA* con actividad terminadora de la transcripción. Ensayo de la actividad β -galactosidasa de los fragmentos del operón *nifLA* clonados en pIC551 en *K. pneumoniae* SE1003 y *E. coli* JBRR3 (Rho^{ts}). En abscisa se indica el nombre del plásmido y en ordenada la actividad medida en unidades Miller y expresada como porcentaje de la actividad del vector (pIC551). pIC554 lleva clonado el terminador de Rho $\lambda tr1$. pIZ351 lleva el terminador temprano de T7, independiente de Rho.

Rho^{ts} se incubó a temperatura restrictiva durante 2 horas indica que la reducción observada se debe a terminación dependiente de Rho (Figura 18, B).

3.4. Correlación entre el tamaño de las "burbujas" C>G y la eficiencia de la terminación.

Se ha establecido una correlación directa entre la eficiencia de terminación de los terminadores dependientes de Rho y el tamaño de las "burbujas" C>G (Alifano et al, 1991). En el operón *nifLA* se localizan seis regiones que cumplen con los requisitos para ser terminadores dependientes de Rho. De ellas sólo dos (las "burbujas" II y VI) presentan una capacidad de terminación eficiente en *K. pneumoniae*, mientras tres de las otras cuatro ("burbujas" I, IV y V) presentan una actividad terminadora débil (25-50%). La actividad de la "burbuja" VII no se ha podido determinar directamente. Con objeto de determinar si existe una relación entre el tamaño de las "burbujas" y su capacidad de terminación se ha calculado su longitud y su amplitud media (media de los cocientes entre los contenidos en citosinas y guaninas para cada posición de la "burbuja"). Estos parámetros definen el tamaño de la "burbuja" y, por tanto, deben correlacionar con su actividad terminadora. Asimismo, se ha determinado el perfil del cociente entre guaninas y citosinas de cada "bubuja" (Figura 19).

La comparación de los parámetros calculados nos muestra que las máximas longitudes corresponden a las "burbujas" I y V, que presentan una baja actividad terminadora. La máxima amplitud media corresponde a la "burbuja" IV, que también es inactiva. No se ha conseguido encontrar ningún parámetro en las "burbujas" II y VI que correlacione con la alta actividad terminadora que presentan. El algoritmo utilizado permite localizar potenciales regiones con actividad terminadora dependiente de Rho, dado que los dos terminadores del operón *nifLA* presentan una "burbuja" C>G. Sin embargo, los parámetros asociados al tamaño de las "burbujas" no permiten predecir la magnitud de la actividad terminadora de una determinada región. Las "burbujas" con actividad presentan un perfil abrupto, con un pico en la región central. Los perfiles de las "burbujas" I y V son menos abruptos y el de la "burbuja" IV presenta dos picos separados por un valle central. Aunque no hemos realizado un análisis sistemático de los terminadores dependientes de Rho conocidos, hemos determinado los perfiles de las "burbujas" de *hisG*, *F1* y *λtR1* y presentan

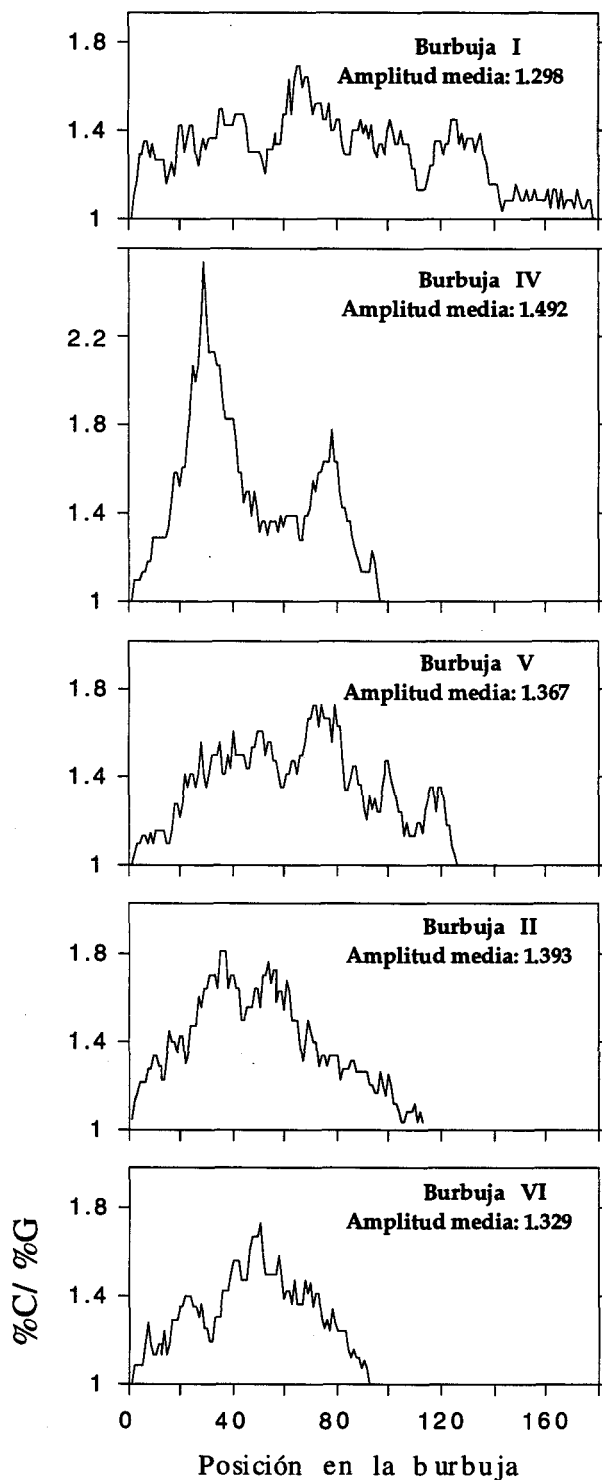


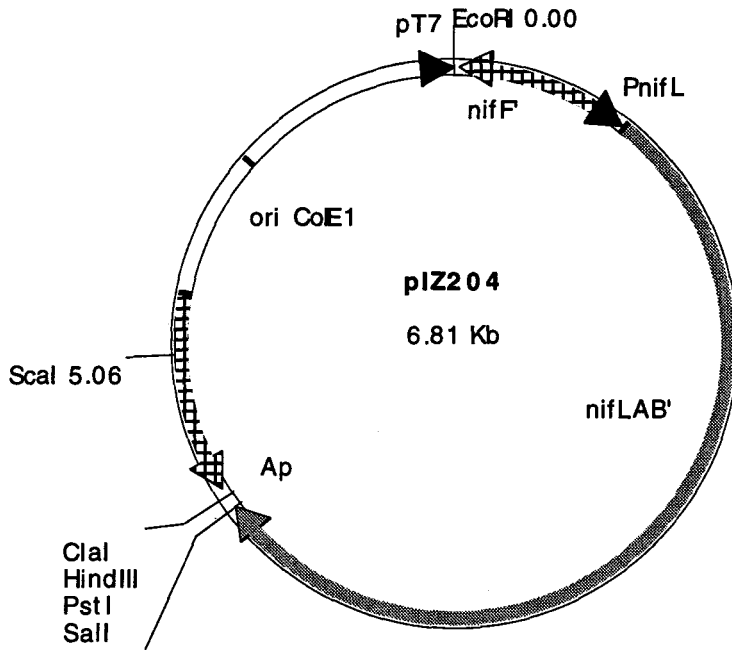
Figura 19. Perfil del cociente de los contenidos en citosinas y guaninas en las "burbujas" C>G de *nifLA*. Los perfiles indican el cociente %C/%G en un entorno de 78 nucleótidos de cada posición de la "burbuja". Los tres paneles superiores corresponden a las tres "burbujas" inactivas y los dos inferiores a las que presentan actividad terminadora. La amplitud media es la media de los cocientes entre el contenido en citosinas y el contenido en guaninas en el mismo intervalo utilizado para el cálculo de los perfiles.

características similares a los de las "burbujas" II y VI del operón *nifLA* (no mostrados).

3.5. Construcción de fusiones *nifLA-lacZ* en alto número de copias.

La reducción en los niveles de actividad de las fusiones transcripcionales observada en presencia de las mutaciones más lejanas en la fase de lectura de *nifL* podría deberse a la terminación prematura de la transcripción en la fase de lectura de *nifA*, siempre y cuando no exista traducción de *nifL*. Las fusiones ensayadas (Sección 2.2) están construidas a la altura de la diana *NarI* de *nifA* y contienen la "burbuja" VI, que presenta actividad terminadora, y parte de la "burbuja" VII. Por tanto, sería posible que la terminación de la transcripción sucediera en esta región. Con objeto de comprobar la funcionalidad del terminador dependiente de Rho de *nifA* se han construido fusiones transcripcionales *nifLA-lacZ* en dos posiciones distintas de la fase de lectura de *nifA* y se ha determinado el efecto de la terminación prematura producida por la delección de 2 pb en la diana *SacII* de *nifL* sobre la actividad de dichas fusiones. Usando como base el plásmido pIZ204 (Figura 20, A) se han construido fusiones *nifLA-lacZ* transcripcionales y traduccionales a la altura de las dianas *NarI* y *AvaII* (+573 y +87 respecto al inicio de *nifA*). Mientras que las fusiones en *NarI* presentan una estructura análoga a las ya ensayadas en bajo número de copias, las fusiones en *AvaII* carecen de la secuencia de *nifA* con actividad terminadora de la traducción asociada a la "burbuja" VI. Sobre estas fusiones, se ha transferido la delección de 2 pb en la diana *SacII* de *nifL* descrita anteriormente. Asimismo, se ha transferido sobre las fusiones en *NarI* una mutación generada por mutagénesis dirigida con oligonucleótidos que altera el codón de terminación de *nifL*, de UGA a UGC. Este mutante produce una proteína *nifL* de mayor longitud, que termina en la posición +79 dentro de la fase de lectura de *nifA*, 8 nucleótidos por delante de la diana *AvaII* (Figura 20, B).

A.



B.

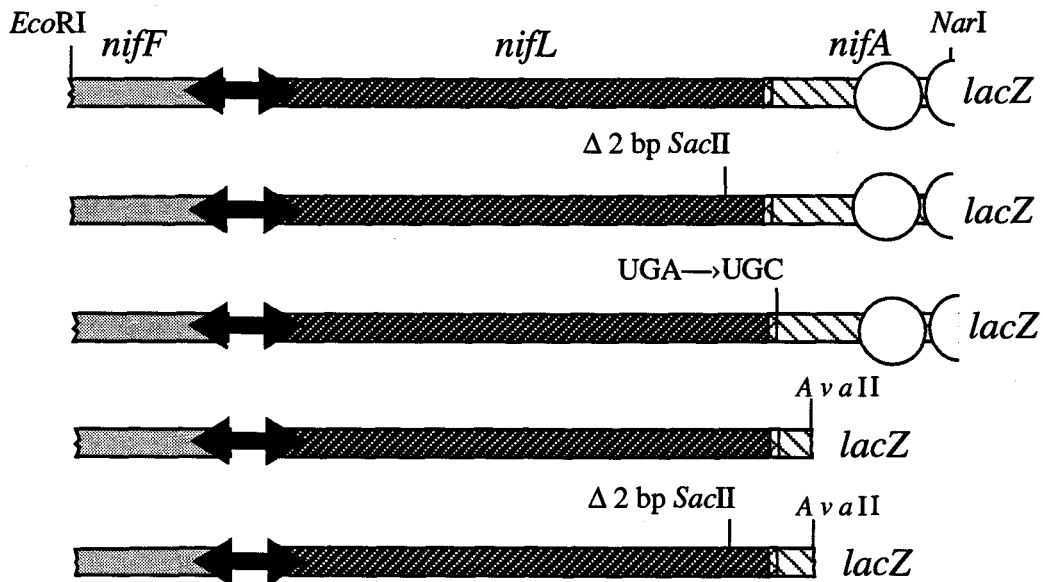


Figura 20. Fusiones *nifLA-lacZ* en alto número de copias. A. Esquema de pIZ204, plásmido base de la construcción de las fusiones. B. Esquema de las fusiones en el que se indica la posición del sitio de empalme y las mutaciones que llevan en *nifL*. Los círculos blancos representan las "burbujas" C>G VI y VII.

3.6. Actividad de las fusiones *nifLA-lacZ* en alto número de copias.

Se ha determinado el efecto de las dos mutaciones introducidas en *nifL* sobre la actividad β -galactosidasa de las fusiones *nifLA-lacZ* en alto número de copias en *E.coli* ET8000. Las medidas de actividad β -galactosidasa se realizaron tras la incubación de las estirpes portadoras de las fusiones génicas durante 16-20 h. a 30°C y en aerobiosis en medio K con 2 g/l de arginina y 100 mg/l de ampicilina, hasta una D.O.₆₀₀ aproximada de los 0.4.

El efecto del desfase en la diana *SacII* de *nifL* sobre las fusiones transcripcionales y traduccionales en la diana *NarI* es cuantitativamente muy similar al observado en las fusiones en bajo número de copias (Tabla 4). Se observa una reducción de unas 3 veces en la expresión de la fusión transcripcional en presencia de esta mutación. La alteración del codón de terminación de *nifL* provoca un descenso de 2 veces en la expresión de la fusión transcripcional, lo que indica que el efecto observado sobre la transcripción no se debe a la falta de traducción del segmento final de *nifL* y sugiere que podría deberse mayoritariamente a secuencias situadas por detrás de la terminación de la traducción de *nifL* en este mutante (posición +79 respecto al inicio de la traducción de *nifA*). Sin embargo, las fusiones transcripcionales en la diana *AvaII* se comportan de forma prácticamente idéntica a las fusiones en *NarI*, a pesar de que sólo contiene la secuencia de *nifA* hasta la posición +87 y de que la "burbuja" VI no está presente. Este dato indica que el terminador dependiente de Rho presente en *nifA* no juega un papel relevante en la caída de la expresión de las fusiones transcripcionales.

Aunque no conocemos la naturaleza exacta del origen de la reducción en las fusiones transcripcionales, la terminación de la traducción de *nifL* por delante o por detrás de su codón de terminación natural en los dos mutantes ensayados provoca sólo una reducción moderada en los niveles de transcripción, que contrasta con el acusado descenso observado en las fusiones traduccionales. El desfase en *SacII* provoca una reducción de 25-30 veces en la expresión de las fusiones traduccionales y la alteración del codón de terminación, de 17 veces. Estos resultados sugieren que *nifA* está acoplado traduccionalmente a *nifL*. En esta situación, la falta de traducción de *nifA* posiblemente produce una desestabilización del ARNm, que sería la responsable del efecto observado sobre las fusiones transcripcionales.

Tabla 4. Actividad de las fusiones *nifLA-lacZ* en alto número de copias. ^a Los valores son medias y desviaciones standard de al menos tres cultivos independientes. ^b Las actividades de las construcciones con mutaciones en *nifL* están expresadas como porcentaje de la actividad de la construcción silvestre con la misma estructura. ^c Deleción de 2 pb en la diana *SacII* de *nifL*. ^d Mutación en el codón de terminación de *nifL*.

Plásmido	Tipo de fusión	Posición	Mutación en <i>nifL</i>	Actividad β -galactosidasa (Miller) ^a	Actividad relativa (%) ^b
pIZ210	Transcripcional	<i>NarI</i>	Ninguna	16236 \pm 591	100
pIZ346	Transcripcional	<i>NarI</i>	Δ <i>SacII</i> ^c	4751 \pm 102	29
pIZ550	Transcripcional	<i>NarI</i>	UGA \rightarrow UGC ^d	8293 \pm 189	51
pIZ546	Transcripcional	<i>AvaII</i>	Ninguna	19256 \pm 857	100
pIZ547	Transcripcional	<i>AvaII</i>	Δ <i>SacII</i>	6378 \pm 191	33
pIZ209	Traduccional	<i>NarI</i>	Ninguna	7154 \pm 230	100
pIZ248	Traduccional	<i>NarI</i>	Δ <i>SacII</i>	300 \pm 50	4
pIZ371	Traduccional	<i>NarI</i>	UGA \rightarrow UGC	424 \pm 11	6
pIZ372	Traduccional	<i>AvaII</i>	Ninguna	8825 \pm 348	100
pIZ373	Traduccional	<i>AvaII</i>	Δ <i>SacII</i>	295 \pm 31	3

4. Análisis del acoplamiento traduccional en *nifLA*.

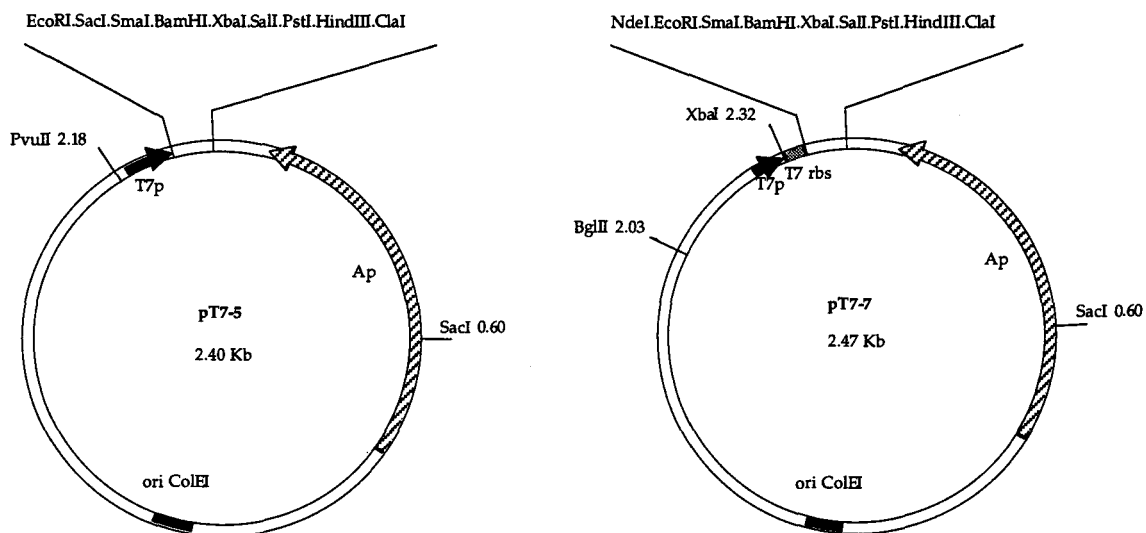
Varios datos apuntan a la existencia de acoplamiento traduccional en este operón: (1) Las mutaciones de terminación prematura en *nifL* tienen un efecto mucho mayor sobre las fusiones traduccionales que sobre las transcripcionales. (2) Las mutaciones de terminación prematura más distales terminan la traducción de *nifL* menos de 70 nucleótidos por delante de la terminación natural de *nifL*. Este fragmento es de tamaño inferior al descrito para permitir la entrada de Rho (Hart y Robert, 1994). Además, en esta secuencia no se observa el desequilibrio entre la proporción de citosinas y de guaninas que caracteriza a los terminadores dependientes de Rho (Alifano et al 1991). (3) El operón *nifLA* presenta algunas de las características de otros operones acoplados traduccionalmente, como son la falta de región intercistrónica y la presencia de una secuencia Shine-Dalgarno correspondiente al gen distal dentro de la fase de lectura del gen proximal (Oppenheim y Yanofsky, 1980; Yates y Nomura, 1981; Das y Yanofsky, 1984; Blomberg et al, 1992).

4.1. Superproducción de los productos del operón *nifLA* con la ARN polimerasa de T7.

Para demostrar de otra forma distinta que la traducción de *nifA* está acoplada a la de *nifL* hemos superproducido ambas proteínas a partir del promotor del gen $\phi 10$ del bacteriófago T7, presente en los plásmidos pT7-5 pT7-7 (Tabor, 1990) (Figura 21, A). El uso de la ARN polimerasa de T7 para analizar el acoplamiento traduccional presenta dos ventajas. En primer lugar, los altos niveles de expresión alcanzados permiten el análisis directo de los productos génicos en geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie. En segundo lugar, al no ser sensible a terminación dependiente de Rho, la ARN polimerasa de T7 permite observar el efecto de la terminación prematura del gen proximal sobre la traducción del gen distal en ausencia de efectos polares.

pJES292 (E. Santero, sin publicar) lleva el operón *nifLA* completo clonado en pT7-5 (Tabor et al, 1990) Este plásmido transcribe del operón *nifLA* con la ARN polimerasa de T7, pero traduce *nifL* a partir de sus propias señales. pJES282 (Lee et al, 1993) lleva el codón de iniciación de *nifL* fundido con el codón de

A.



B.

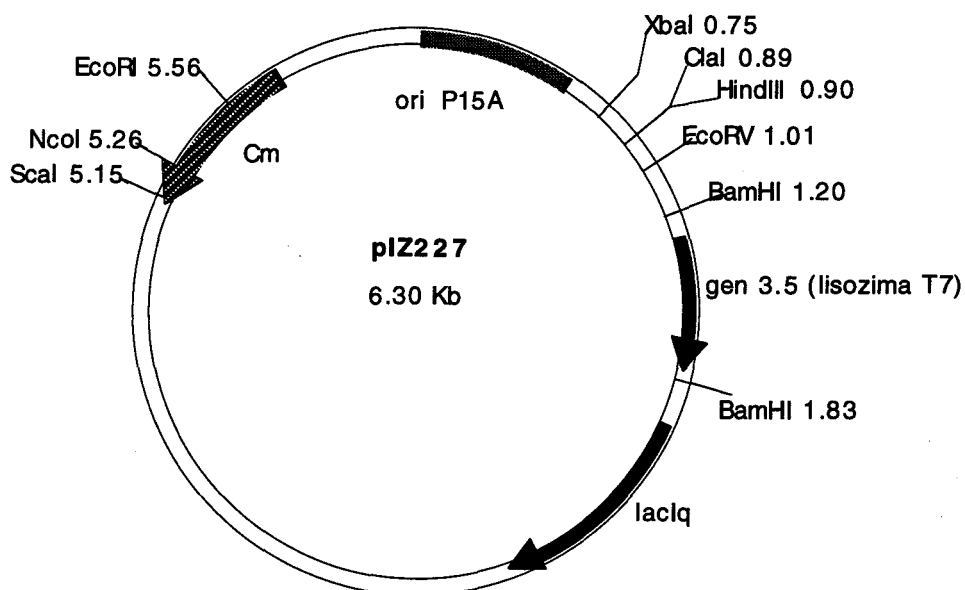


Figura 21. Plásmidos utilizados en el sistema de expresión dependiente de la ARN polimerasa de T7. **A.** Esquema de los vectores de expresión pT7-5 y pT7-7. **B.** Esquema del plásmido pIZ227, diseñado para mejorar la represión de la ARN polimerasa de T7.

iniciación que solapa con la diana *NdeI* de pT7-7 y por tanto traduce *nifL* a partir de la eficiente Shine-Dalgarno del gen $\phi 10$ de T7. Los plásmidos pIZ328, 329 y 330 son idénticos a pJES 282, excepto que llevan, respectivamente, los desfases generados en las dianas *BstEII*, *NcoI* y *SacII* descritos anteriormente. pJES329 (E. Santero, sin publicar) lleva la inserción de 20 pb en la diana *NruI* y además incluye un fragmento de 0.5 kb del extremo 5' de *nifB*, por detrás de *nifA*.

La estirpe NCM631 lleva integrado en su cromosoma un fago λ defectivo con el gen de la ARN polimerasa de T7 bajo el control del promotor *lacUV5* (λ DE3, Studier y Moffatt, 1986). Para superproducir NifL y NifA se transformó NCM631 con pIZ227 y con los plásmidos portadores del operón *nifLA* bajo el control del promotor $\phi 10$. pIZ227 es un derivado de plysE (Studier y Moffatt, 1986) que lleva clonado el alelo *lacI^q* del represor *lac* (Figura 21, B), La lisozima de T7 codificada por pIZ227 inhibe la actividad de la ARN polimerasa de T7, y *lacI^q* mejora la represión del promotor *lac*. pIZ227 reduce los niveles basales de expresión dependiente de la ARN polimerasa de T7 sin aumentar significativamente el tiempo de inducción. Los transformantes se inocularon en LB con 100 mg/l de ampicilina y 7.5 mg/l de cloranfenicol y se incubaron hasta saturación a 37°C con agitación. Los cultivos se diluyeron 100 veces en LB sin antibióticos y se incubaron en las mismas condiciones hasta D.O.₆₀₀=0.5-0.7. En ese momento se añadió IPTG a 1 mM (concentración final) y se incubaron durante 5 horas en las mismas condiciones. Al término de este periodo se recogieron muestras de cada cultivo, se lisaron y se cargaron en gel de SDS-poliacrilamida al 12%. Tras la carrera el gel se tiñó con azul brillante de Coomassie R-250.

La transcripción del operón *nifLA* con la ARN polimerasa de T7 permite una producción de los dos productos génicos de este operón en cantidades suficientes como para permitir su visualización en un gel de poliácridamida-SDS teñido con azul de Coomassie (Figura 22). Cuando además de transcribir el operón con la ARN polimerasa de T7 se traduce *nifL* a partir del sitio de unión de ribosomas del gen $\phi 10$ de T7, que tiene una alta eficiencia, se consigue un aumento espectacular de la producción de NifL, que lleva parejo un incremento similar en la producción de NifA. Los mutantes que llevan desfases en la fase de lectura de *nifL* superproducen los péptidos correspondientes a la proteína NifL truncada, pero producen cantidades mucho menores de NifA, llegando a ser indetectable en gel en los dos mutantes con la terminación prematura más temprana. El hecho de que un incremento en la eficiencia de la traducción de *nifL* estimule la síntesis de NifA demuestra que los genes *nifL* y *nifA* están

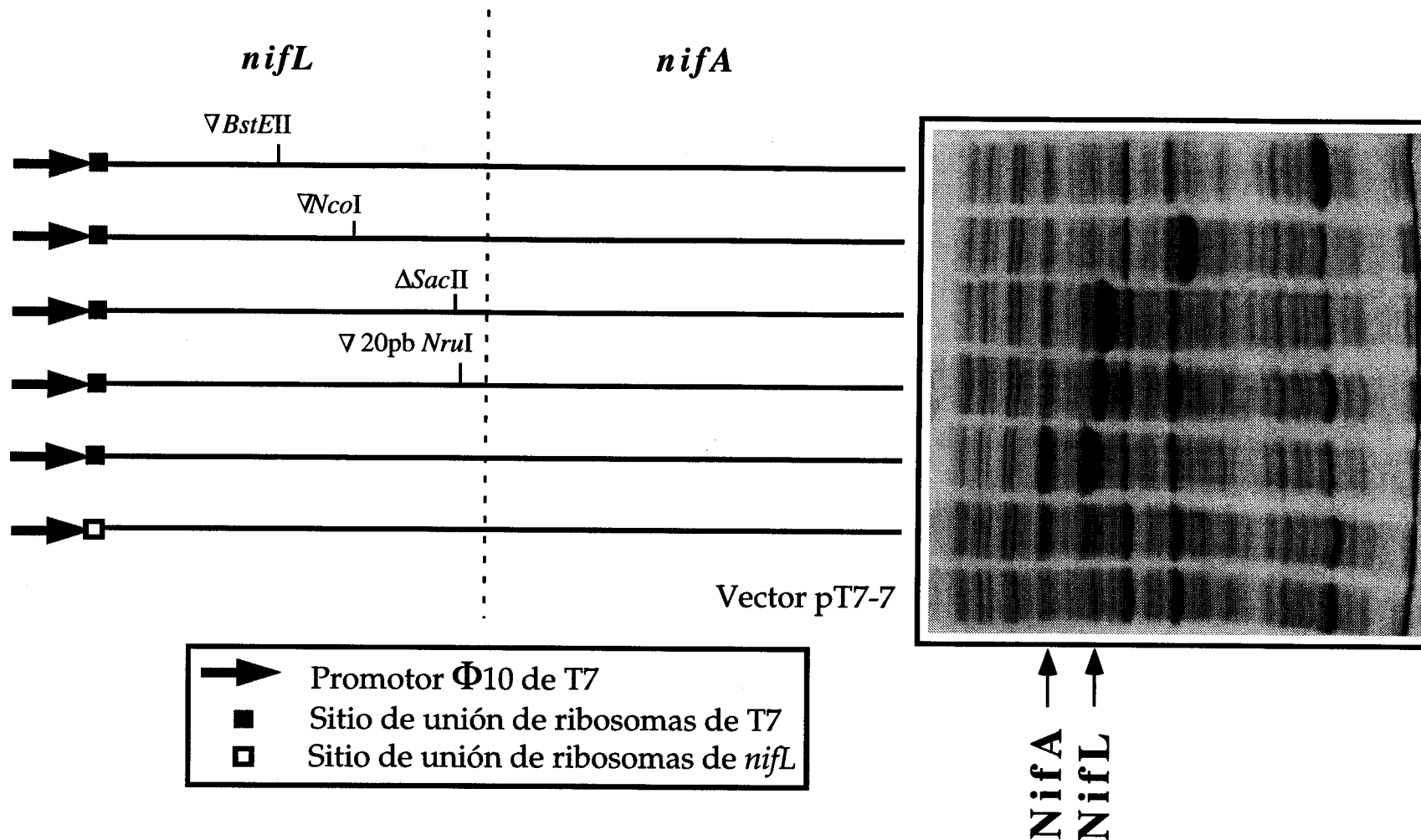


Figura 22. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS teñido con azul de Coomassie de los productos del operón *nifLA* silvestre y con mutaciones de terminación prematura en *nifL* superproducidos a partir del promotor $\phi 10$ de T7. Se indican las mutaciones presentes en *nifL*.

acoplados traduccionalmente. Aunque la producción de ambas proteínas, estimada visualmente a partir de los geles, no parece estequiométrica, la cantidad sintetizada de NifA no es mucho menor que la de NifL. Esto indica que la iniciación de la traducción desde la Shine-Dalgarno de *nifA* no limita sustancialmente su expresión ni siquiera cuando la tasa de traducción de *nifL* es muy alta. La falta de estimulación de la síntesis de NifA en los mutantes indica que, incluso en ausencia de polaridad, la traducción de *nifA* es estrictamente dependiente de la traducción completa de *nifL*.

No se ha descartado la posibilidad de que NifL regule positivamente la traducción de *nifA*, de manera que en ausencia de una proteína NifL funcional la traducción de *nifA* no pueda llevarse a cabo de una forma eficiente. Aunque el fenotipo Nif⁺ de los mutantes *nifL* de pérdida de función sugiere que éste no es el caso, hemos abordado el estudio de esta posibilidad determinando del efecto de una serie de deleciones en fase en *nifL* sobre la expresión de *nifA* en las mismas condiciones de superproducción utilizadas para el estudio del efecto de los mutantes de terminación prematura.

pJES321, pJES322, pJES323 y pJES324 son cuatro plásmidos derivados de pJES282 con deleciones en fase dentro de *nifL*. La transcripción del operón *nifLA* se lleva a cabo a partir del promotor $\phi 10$ de T7 y *nifL* se traduce a partir de la Shine-Dalgarno de este mismo gen. pJES321 lleva una deleción *EcoRV* que elimina 22 aminoácidos de NifL. pJES324 lleva una deleción *NaeI* que elimina 40 aminoácidos de NifL. pJES323 lleva una deleción *SmaI-SalI* que elimina 198 aminoácidos de NifL. pJES322 lleva una deleción *SmaI-NaeI* que elimina 263 aminoácidos de NifL (Figura 23). Esta deleción es la misma utilizada para hacer la duplicación cromosómica del operón *nifLA* (ver Sección 1.1). Se ha inducido la síntesis de la ARN polimerasa de T7 de la forma descrita anteriormente y se han analizado los productos de la superexpresión en gel de SDS-poliacrilamida al 12%.

Los resultados de la superexpresión de NifL con deleciones internas en fase indican que en todos los casos la síntesis de NifA es estimulada de forma semejante a la que se observa cuando se superexpresa NifL silvestre (Figura 23). Este dato contrasta con la falta de estimulación de la síntesis de NifA observada cuando NifL lleva mutaciones que provocan la terminación prematura de la traducción (Figura 22) y sugiere fuertemente que es la traducción completa de *nifL* y no la producción de una proteína NifL funcional la que estimula la traducción eficiente de *nifA*.

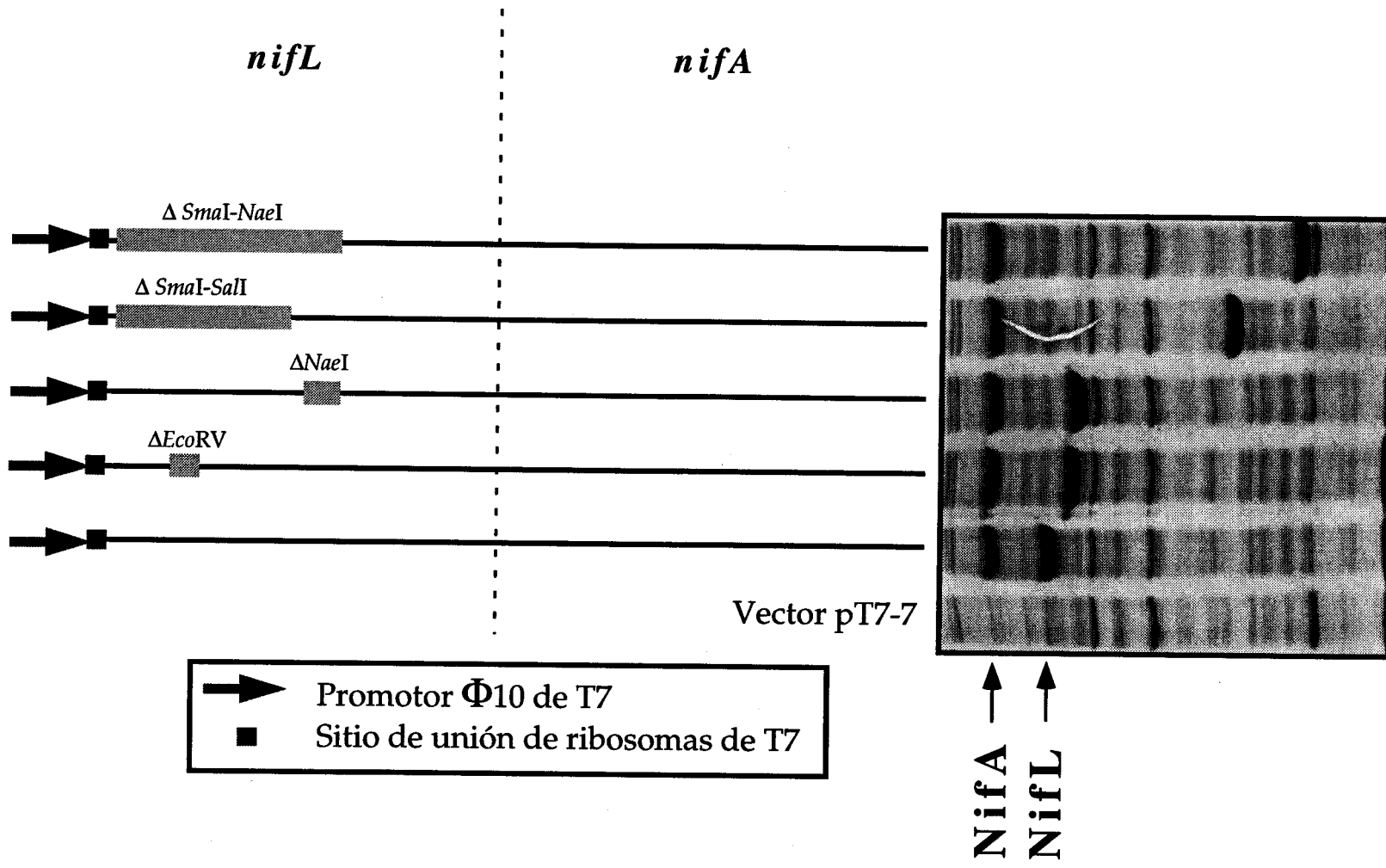


Figura 23. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS teñido con azul de Coomassie de los productos del operón *nifLA* silvestre y con deleciones en fase en *nifL* superproducidos a partir del promotor $\phi 10$ de T7. Las regiones sombreadas indican la extensión de las distintas deleciones.

4.2. Análisis de las señales implicadas en el acoplamiento traduccional del operón *nifLA*.

Para que exista acoplamiento traduccional entre dos genes de un operón es estrictamente necesario que se cumplan dos condiciones. En primer lugar, la traducción independiente del gen distal tiene que estar inhibida o las señales de iniciación de la traducción tienen que ser intrínsecamente ineficientes. En otros sistemas se ha demostrado la presencia de estructuras de orden superior tipo horquilla que ocluyen la Shine-Dalgarno del gen distal, inhibiendo la traducción. También se ha descrito la presencia de codones de iniciación poco eficientes, como UUG o GUG como responsables de una baja tasa de traducción independiente. En segundo lugar, la traducción del gen distal tiene que ser estimulada por la traducción completa del gen proximal. En esta sección hemos investigado en detalle la existencia de algunas características que permitan explicar la dependencia de la traducción de *nifA* de la traducción previa de *nifL*.

4.2.1. Análisis estructural de la región de iniciación de la traducción de *nifA*.

La inspección de la secuencia en la región 5' de *nifA* revela la presencia de una secuencia de Shine-Dalgarno (GGAGG) perfectamente complementaria al extremo 3' del ARNr 16S (CCUCC) y espaciada correctamente respecto al codón de iniciación AUG, lo que constituye potencialmente un sitio de unión de ribosomas ajustado al consenso. A su vez, el extremo 5' de *nifA* presenta una alta homología con el potenciador procariótico de la traducción denominado downstream box (Sprengart et al, 1990). Además, como se ha demostrado anteriormente, la traducción de *nifA* se lleva a cabo a una tasa muy alta cuando *nifL* se traduce desde una Shine-Dalgarno muy eficiente. No parece, por tanto, que las señales de iniciación de la traducción de *nifA* sean intrínsecamente deficientes.

Hemos hecho un análisis por ordenador de las posibles estructuras secundarias en la región de iniciación de la traducción de *nifA*. El programa Mfold del paquete GCG de la Universidad de Wisconsin predice

una estructura secundaria con un ΔG_0 de -12.5 en la cual cuatro de los cinco nucleótidos que forman parte de la Shine-Dalgarno de *nifA* se encuentran en forma apareada (Figura 24). Si esta estructura secundaria predicha tuviera un efecto real sobre la traducción independiente de *nifA*, permitiría explicar el acoplamiento traduccional fácilmente, pues la traducción completa de *nifL* provocaría su disrupción, pero no se vería afectada por la traducción de *nifL* en ninguno de los mutantes de terminación prematura. En las secciones que siguen probaremos funcionalmente si esta estructura actúa de hecho inhibiendo la traducción de *nifA* in vivo.

4.2.2. Mutagénesis dirigida de la región de iniciación de la traducción de *nifA*.

Con objeto de probar la posible implicación de la estructura secundaria predicha por el ordenador en la inhibición de la traducción de *nifA* se han introducido mediante mutagénesis dirigida con oligonucleótidos sustituciones que desestabilizan el apareamiento en la horquilla. En concreto, se han hecho dos grupos de mutaciones. Uno de ellos (mutante *nifLA1*) lleva tres sustituciones G a C ó C a G en las posiciones -5, -13 y -15 respecto al inicio de la traducción de *nifA*. El otro (mutante *nifLA2*) lleva otras tres sustituciones G a C ó C a G en las posiciones que aparean con las alteradas en el mutante *nifLA1*, concretamente +24, +31 y +33 con respecto al inicio de la traducción de *nifA*. Los dos grupos de mutaciones generados en el mismo clon restauran la integridad de la horquilla (Figura 24).

4.2.3. Análisis de la traducción independiente de *nifA* en los mutantes construidos.

Se han clonado los fragmentos *SacII-AvaII* de 180 pb que llevan la unión *nifLA* silvestre y con las mutaciones *nifLA1*, *nifLA2* y *nifLA1-2* en el vector de fusiones traduccionales pIZ501 (Figura 25, A). El resultado es

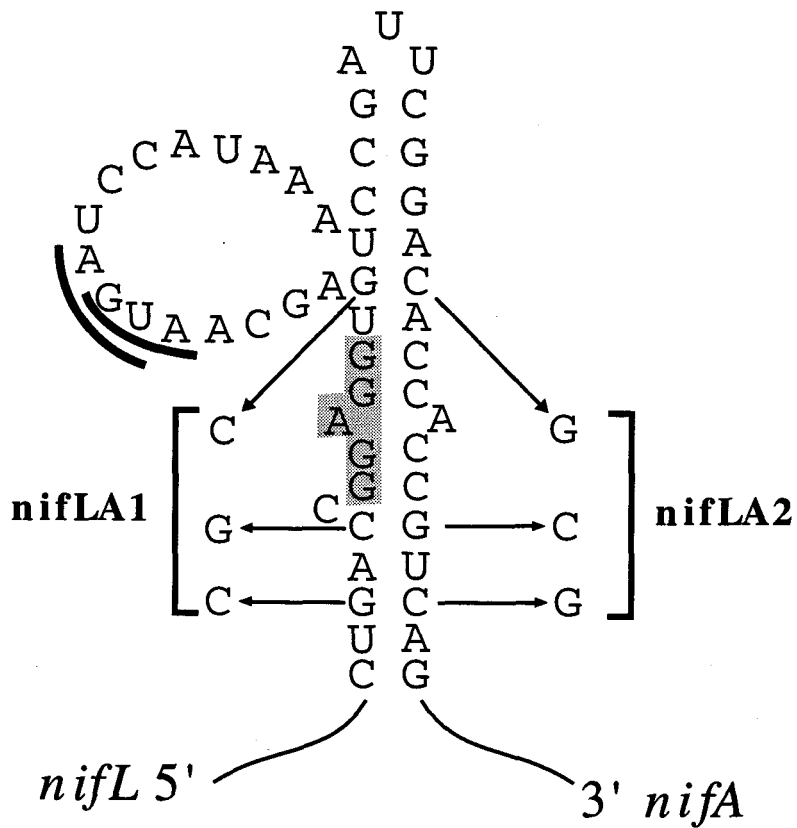
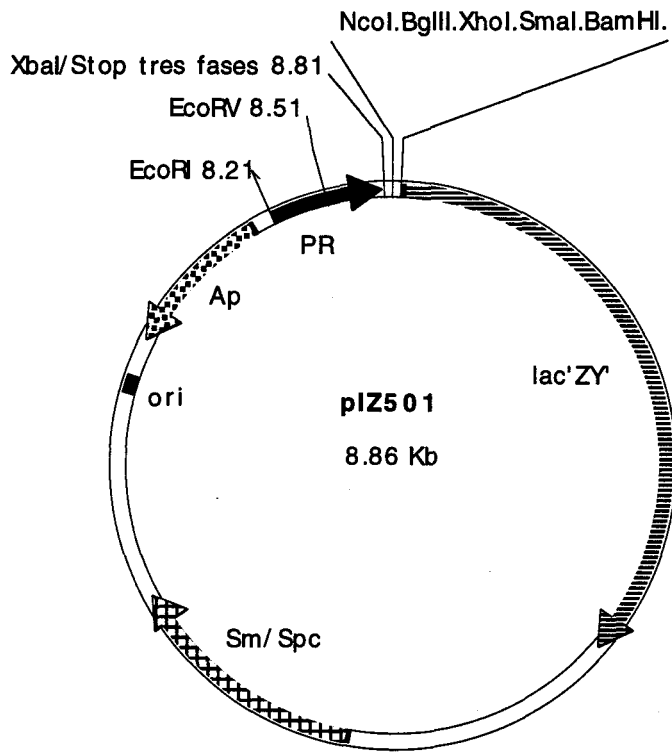


Figura 24. Estructura secundaria predicha por ordenador de la TIR de *nifA*. Se indican las sustituciones realizadas en la secuencia para desestabilizar dicha estructura en los mutantes *nifLA1* y *nifLA2*. La región sombreada corresponde a la Shine-Dalgarno de *nifA* y las dos líneas gruesas solapadas a los codones de iniciación de *nifA* y terminación de *nifL*.

A.



B.

Plásmido	Mutaciones ^a	Estructura ^b	β -galactosidasas ^c
----------	-------------------------	-------------------------	--------------------------------------

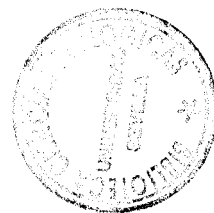
pIZ521	Ninguna		49 (1)
pIZ529	<i>nifLA2</i>		393 (8.0)
pIZ538	<i>nifLA1</i>		86 (1.8)
pIZ539	<i>nifLA1+nifLA2</i>		22 (0.4)

Figura 25. Análisis de la influencia de la estructura secundaria predicha para la TIR *denifA* sobre la traducción independiente de este gen. **A.** Esquema del vector de fusiones traduccionales pIZ501. **B.** Actividades β -galactosidasa de las fusiones *lac* generadas en pIZ501 con el fragmento *SacII-AvaII* que incluye las señales de iniciación de la traducción de *nifA*. ^aMutación desestabilizadora de la estructura secundaria presente en cada uno de los plásmidos. ^bDibujo donde se indica la presencia o ausencia de estructura secundaria en cada uno de los plásmidos y la posición de las mutaciones. ^cActividad β -galactosidasa producida por cada una de las fusiones expresada en unidades Miller o relativa a la fusión silvestre (entre paréntesis).

una colección de fusiones traduccionales *nifA-lac* con 92 pb del extremo 3' de *nifL* sin traducir y bajo el control del promotor λP_R . Como se ha comprobado, la falta de traducción de este segmento del extremo 3' de *nifL* tiene un fuerte efecto sobre la traducción de *nifA* (Secciones 2.2, 3.5 y 4.1).

Las construcciones descritas se transformaron en *E. coli* ET8000 y se determinó la actividad β -galactosidasa producida por los distintos cultivos en fase exponencial media ($D.O.600=0.5-0.6$) crecidos en medio LB con ampicilina (100 mg/l) a 30°C (Figura 25, B). Como es esperable, la expresión de *nifA* desde las señales silvestres es muy baja. El mutante *nifLA2* (pIZ529), que tiene alterada la rama derecha de la estructura secundaria, presenta una estimulación de la expresión de *nifA* de 8 veces con respecto al control silvestre (pIZ521). El mutante *nifLA1* (pIZ540), que tiene alterada la rama izquierda, también presenta una mayor expresión que el silvestre, aunque el aumento es sólo de dos veces. El mutante doble *nifLA1+nifLA2* (pIZ539), que restaura la estructura secundaria de la región, presenta una expresión prácticamente basal, inferior a la mitad del control silvestre.

La fuerte estimulación observada en el mutante *nifLA2* sugiere que la estructura secundaria efectivamente tiene un papel relevante en la inhibición de la traducción de *nifA*. La estimulación más moderada en el mutante *nifLA1* es sorprendente, dado que la desestabilización producida es similar a la producida por el mutante *nifLA2*. Sin embargo, se puede explicar si asumimos que las tres sustituciones introducidas tienen un efecto adicional negativo sobre la eficiencia de iniciación de la traducción de *nifA*, debido a su proximidad a la Shine-Dalgarno (ver Discusión). La baja actividad del doble mutante *nifLA1+nifLA2*, menor incluso que la del clon silvestre, indica que efectivamente existe una interacción entre las secuencias mutagenizadas que inhibe la traducción independiente de *nifA* y apoya la hipótesis de una menor eficiencia en la iniciación de la traducción cuando están presentes las mutaciones de *nifLA1*.



DISCUSION

La expresión de los genes *nif* de *K. pneumoniae* está regulada muy estrictamente por un sistema de "doble llave" que garantiza que su inducción sólo se lleve a cabo en condiciones severas de limitación de nitrógeno y anaerobiosis (Merrick, 1992). La fijación de nitrógeno es un proceso energéticamente muy costoso y que requiere la síntesis de un gran número de polipéptidos, algunos de ellos en cantidades muy grandes. La nitrogenasa es, además una enzima muy sensible a la presencia de oxígeno, dado que éste la inactiva de forma irreversible. Por estas razones, es de capital importancia que la célula sea capaz de reprimir la expresión de los genes de fijación de nitrógeno en condiciones en las que sus productos serían inútiles, como sucede en aerobiosis, o innecesarios, por ejemplo en presencia de otra fuente de nitrógeno cuya asimilación requiera un gasto menor.

El sistema de regulación específico de los genes *nif* se compone de dos proteínas, NifL y NifA. Estas dos proteínas son los productos del operón bicistrónico *nifLA*. NifA es un activador de la transcripción y NifL modula la actividad de NifA en respuesta a las condiciones ambientales. NifL impide la activación por parte de NifA en aerobiosis y cuando la limitación de nitrógeno no es muy severa. Se desconocen los mecanismos por los cuales NifL detecta las concentraciones de nitrógeno y oxígeno e inactiva a NifA. NifA se sintetiza en forma activa, de manera que en ausencia de NifL se produce la expresión de los genes *nif* en las mismas condiciones de inducción del operón *nifLA*, es decir,

requiere una limitación moderada de nitrógeno y es independiente de la presencia de oxígeno. Teniendo en cuenta estas características, un aumento en la producción de NifA que rebasara la capacidad inhibidora de NifL provocaría la desregulación del sistema, ya que no habría suficiente cantidad de proteína NifL como para inactivar a todas las moléculas de NifA. Puesto que la represión de los genes *nif* se lleva a cabo de forma eficaz, la bacteria debe disponer de una forma de garantizar que nunca se de este caso.

1. El desequilibrio de la dosis génica *nifL:nifA* provoca la desregulación de los genes *nif*.

NifL y NifA se sintetizan en cantidades aproximadamente estequiométricas y datos de inmunoprecipitación sugieren que interaccionan de forma no catalítica para formar un complejo (Henderson et al, 1989), aunque los resultados son muy discutibles. En realidad no sabemos cuánto NifL es necesario para inactivar a NifA en presencia de oxígeno o nitrógeno combinado. Hemos investigado la posibilidad de que la interacción entre NifL y NifA requiera una síntesis estequiométrica para conseguir una correcta regulación de los genes *nif*. Para ello hemos construido estirpes de *K. pneumoniae* con dosis génicas *nifL:nifA* de 2:2 y 1:2 y hemos determinado la capacidad de estas estirpes de activar el promotor *nifH* en aerobiosis y en anaerobiosis. La estirpe con dos copias de *nifL* y una de *nifA* presenta una desrepresión parcial del promotor *nifH* en aerobiosis correspondiente a un 20% de la expresión en anaerobiosis. Teniendo en cuenta el número de productos Nif y sus niveles de expresión (aproximadamente el 10% de la proteína total en condiciones de fijación de nitrógeno), la desrepresión observada significa una síntesis sustancial de un gran número de proteínas en condiciones en las que no pueden ser utilizadas. La incapacidad de NifL de inactivar a NifA cuando ésta se produce en cantidad doble a la habitual indica que NifL se sintetiza justo en cantidad suficiente para la inactivación de NifA, de manera que la producción de un exceso de NifL en relación a NifA no es la forma por la que la bacteria garantiza que siempre habrá suficiente NifL.

En el caso de que la inactivación de NifA se llevara a cabo por un mecanismo catalítico resulta improbable que un exceso moderado de NifA tuviera el efecto de desrepresión observado. Por tanto, nuestros datos favorecen

el modelo de inactivación de NifA a través de una interacción estequiométrica con NifL para formar un complejo inactivo.

2. La terminación prematura de la traducción de *nifL* es polar sobre *nifA*.

El modelo de regulación propuesto es muy sensible a un exceso en la concentración de NifA, de manera que debe ser crucial para la célula mantener los niveles de NifA controlados para que no se sintetice en una cantidad que no pueda ser inactivada por NifL. *nifL* y *nifA* forman un operón, y la cotranscripción de ambos genes permite ejercer el control de la síntesis de los dos productos génicos de forma simultánea. Sin embargo, dado que la expresión del operón *nifLA* sucede en condiciones de limitación de nitrógeno, no es difícil imaginar que la reducción de las concentraciones intracelulares de aminoácidos pudiera provocar un bloqueo temporal de la traducción en la fase de lectura de *nifL*. Si la traducción de *nifA* fuera menos sensible que la de *nifL* a la limitación en aminoácidos, esta situación produciría un desequilibrio en la síntesis de ambas proteínas que llevaría a la desrepresión de los promotores *nif*. El bloqueo de los ribosomas por limitación en aminoácidos se debe a la falta de un ARNt cargado y sucede preferentemente en regiones en las que aparecen varios residuos del mismo aminoácido. En NifL hay una región que presenta un agrupamiento de ocho aminoácidos con seis residuos de glutamina. Dado que la síntesis de NifL y NifA se induce precisamente cuando la concentración intracelular de glutamina es prácticamente indetectable, parece plausible que los ribosomas que traducen *nifL* puedan quedarse temporalmente bloqueados en esta región, al igual que sucede en los péptidos líder de los operones regulados por atenuación.

Hemos mimetizado el bloqueo de la traducción de *nifL* por limitación de aminoácidos introduciendo mutaciones que provocan la terminación prematura de la traducción a distintas alturas de la fase de lectura de *nifL*. Todas las mutaciones probadas provecan una reducción en los niveles de β -galactosidasa producidos por una fusión transcripcional *nifLA-lac*. La reducción de la actividad es mayor en los mutantes que terminan la traducción de *nifL* más prematuramente. Hemos comprobado mediante Northern blot que la reducción observada se debe a una disminución en los niveles de ARNm de tamaño

completo en los mutantes. Estos resultados indican que existe polaridad transcripcional en el operón *nifLA*.

La polaridad es un fenómeno que consiste en la terminación prematura de la transcripción en regiones del ARNm que no están siendo traducidas. Estas regiones son terminadores crípticos dependientes del factor de terminación Rho que se activan cuando no son traducidos. Los terminadores dependientes de Rho se caracterizan por tener un alto contenido en citosina y un bajo contenido en guanina ("burbuja" C>G) (Alifano et al, 1991). Hemos identificado seis regiones en el ARNm de *nifLA* que se ajustan a este consenso. Sin embargo, sólo dos de ellas presentan actividad terminadora dependiente de Rho cuando se clonan aisladamente en un vector sonda de terminadores. De estas dos regiones, una de ellas (la "burbuja" II) se encuentra por detrás de los codones de terminación de los dos mutantes de *nifL* más proximales y podría explicar la reducción en la expresión de la fusión *nifLA-lac* observada en estos mutantes, aunque no la observada en los dos mutantes distales. La otra región, la "burbuja" VI, se localiza en el segmento del extremo 5' de *nifA* presente en las fusiones *nifLA-lac*.

La capacidad de terminar la traducción en distintos terminadores dependientes de Rho se ha correlacionado con el tamaño de la "burbuja" C>G (Alifano et al, 1991; Rivellini et al, 1991). Sin embargo, en nuestro sistema no hemos conseguido establecer ningún tipo de relación evidente entre los parámetros que definen el tamaño de las "burbujas" (amplitud y longitud) y su actividad terminadora. Los datos sugieren que la localización de regiones ricas en citosinas y pobres en guaninas pueden ser útil como guía en la búsqueda de terminadores dependientes de Rho puesto que los terminadores identificados tienen esta característica, pero no sirve como diagnóstico de su presencia puesto que otras secuencias con "burbujas" no tienen actividad terminadora. Otros autores han propuesto que no sólo el contenido en citosinas determina la capacidad de terminación, sino también su distribución (Hart y Roberts, 1991; Zalazan y Platt, 1992). El análisis del perfil del cociente citosinas/guaninas a lo largo de las "burbujas" del operón *nifLA* ha revelado que las "burbujas" con actividad terminadora se caracterizan por un perfil abrupto con un pico en la región central y otros terminadores dependientes de Rho presentan también un perfil similar. Dado que distintas distribuciones de citosinas y guaninas producirán distintos perfiles, nuestros datos favorecen la hipótesis de que la distribución de las citosinas y las guaninas a lo largo de las "burbujas" condiciona su actividad terminadora.

Los dos mutantes de terminación prematura más distales aún presentan una reducción de 3-4 veces en la actividad de las fusiones *nifA-lac* transcripcionales. Este dato es muy sorprendente, dado que Rho sólo actúa sobre ARNm libre de ribosomas y el segmento de *nifL* sin traducir que queda hasta las señales de iniciación de la traducción de *nifA* tiene una longitud de sólo 67 ó 68 nucleótidos en estos mutantes. Rho se une a un total de 78 nucleótidos y la longitud mínima de ARNm necesaria para que se produzca terminación dependiente de Rho es de 85-90 nucleótidos. La región expuesta del extremo 3' de *nifL* es demasiado corta para permitir la entrada de Rho y, además, no presenta las características propias (alto contenido en citosinas, bajo contenido en guaninas) de los terminadores dependientes de Rho.

Una explicación posible de estos resultados es que la traducción de *nifA* dependa de la previa traducción completa de *nifL*. El efecto polar de las mutaciones distales sería entonces indirecto, ya que impedirían la traducción de *nifA* y esta falta de traducción permitiría la terminación de la transcripción en la fase de lectura de *nifA*. Esta hipótesis es coherente con el hecho de que las mutaciones de terminación prematura en *nifL* provoquen una reducción en la expresión de una fusión traduccional *nifA-lac* mayor que en la fusión transcripcional, dado que en la fusión traduccional se observaría la suma de los efectos sobre la transcripción y la traducción. Además, el operón *nifLA* presenta características compartidas con algunos pares de genes acoplados traduccionalmente, como son el solapamiento de los codones de iniciación y terminación y la síntesis estequiométrica de sus productos (McCarthy, 1990).

En el caso de que se produjera la terminación dependiente de Rho dentro de la fase de lectura de *nifA* parece razonable pensar que ésta pudiera ocurrir en la región de la "burbuja" VI, que está presente en el segmento de *nifA* por delante del empalme de la fusión. Sin embargo, una de las mutaciones distales en *nifL* provoca una reducción de 3 veces en la expresión de una fusión transcripcional *nifLA-lac* independientemente de que ésta haya sido generada por delante (posición +87 de *nifA*) o por detrás de la "burbuja" VI (posición +573). Por tanto, la reducción observada no se debe a la terminación prematura de la transcripción en la "burbuja" VI y, de existir terminación prematura, ésta debe producirse en las secuencias comprendidas entre el final de la traducción de *nifL* en el mutante y la posición +87 de *nifA*. Un mutante en el codón de terminación de *nifL* que termina la traducción de *nifL* dentro de la fase de lectura de *nifA* (posición +79) y, por tanto, traduce la práctica totalidad de la región propuesta, también provoca una reducción de 2 veces en la expresión de una fusión transcripcional *nifLA-lac*.

Ambos mutantes afectan en mucho mayor medida (17-30 veces) a una fusión traduccional *nifLA-lac*.

Nuestros datos descartan que la terminación de la transcripción en la fase de lectura de *nifA* tenga un papel relevante en el control de la expresión de *nifA* cuando la traducción de *nifL* termina prematuramente. Sin embargo, la fuerte reducción observada en las fusiones traduccionales cuando la traducción de *nifL* termina por delante o por detrás de su sitio de terminación natural sugiere que la traducción de *nifA* se activa por la terminación de la traducción de *nifL* en las cercanías de su codón de iniciación (ver más adelante). La falta de traducción de *nifA* en los mutantes podría provocar una desestabilización del ARNm, que explicaría la reducción moderada observada en las fusiones transcripcionales. La reducción de la estabilidad de los ARNm cuando no son traducidos se ha observado en otros sistemas, algunos de ellos acoplados traduccionalmente (Cole y Nomura, 1986; Blomberg et al, 1992). La falta de acoplamiento entre la traducción de *nifL* y *nifA* puede entenderse como un modo de inactivación funcional no nucleolítica del ARNm. La inactivación funcional de los ARNm se asocia frecuentemente a un aumento en su tasa de degradación que redundaría en una reducción de su vida media (Petersen, 1992).

En el contexto de la regulación *nif*, los datos descritos en esta sección sugieren que la falta de traducción de *nifL* no permite que se sintetice un exceso de *nifA* que produjera una desregulación del sistema. La terminación prematura de la transcripción de *nifL* en el terminador intragénico asociado a la "burbuja" II garantizaría el control de la síntesis de NifA siempre que la traducción de *nifL* quedara bloqueada por delante de este terminador. La región de *nifL* que codifica el segmento rico en glutaminas se localiza entre las posiciones +804 y +828 de la fase de lectura de *nifL* y la "burbuja" II está centrada aproximadamente en la posición 1100. Por tanto, el bloqueo de los ribosomas en esta región provocaría la terminación de la transcripción en la "burbuja" II. La polaridad por sí sola no explica sin embargo el efecto de la terminación de la traducción de *nifL* en posiciones más distales. Para explicar la reducción observada en la expresión de *nifA* cuando la traducción de *nifL* termina prematuramente por detrás del terminador dependiente de Rho, proponemos un modelo basado en acoplamiento traduccional, aunque la inestabilidad del ARNm derivada de la falta de traducción de *nifA* también pueda contribuir moderadamente.

3. La traducción de *nifA* está acoplada a la de *nifL*.

El acoplamiento traduccional se ha descrito en numerosos operones bacterianos como un mecanismo de control a nivel de traducción que supedita la traducción de un gen a la traducción previa del gen inmediatamente anterior. Aunque no es una regla general para todos los pares de genes acoplados traduccionalmente, un buen número de ellos presentan características comunes, compartidas con el operón *nifLA*. Es frecuente el solapamiento de las señales de terminación e iniciación de la traducción y este hecho se ha asociado a la síntesis estequiométrica de los productos génicos cuando éstos interactúan para formar un complejo. En estos casos suele aparecer una estructura secundaria que ocluye a la Shine-Dalgarno del gen distal, impidiendo su traducción de forma independiente. La traducción del gen proximal estimula la del gen distal porque el paso de los ribosomas interrumpe la estructura secundaria, permitiendo la entrada de otros ribosomas en solución a la Shine-Dalgarno del gen distal o reiniciando ellos mismos la traducción.

Hemos estudiado el efecto de un aumento en la tasa de traducción de *nifL* sobre la expresión de *nifA* en condiciones de alta expresión con la ARN polimerasa de T7. Cuando se mejora la traducción de *nifL* utilizando un sitio de unión de ribosomas de T7 muy eficiente se produce un gran aumento en la producción de NifL. Este aumento se ve acompañado de un aumento similar en la producción de NifA. La cantidad sintetizada de ambas proteínas no es muy diferente, aunque siempre parece haber una producción algo mayor de NifL que de NifA. La estimulación observada en la expresión de *nifA* cuando la traducción de *nifL* se lleva a cabo muy eficientemente debe interpretarse en términos de acoplamiento traduccional en el operón.

Una explicación alternativa sería que la alta tasa de traducción de *nifL* llevara consigo un incremento en la concentración local de ribosomas en las cercanías de la región de iniciación de *nifA*, lo que mejoraría su tasa de traducción. Sin embargo, cuando se introducen mutaciones de terminación prematura de la traducción en la fase de lectura de *nifL* el efecto de estimulación de la síntesis de NifA desaparece, a pesar de que las dos mutaciones más distales provocan la terminación de la traducción tan sólo a 67 y 68 nucleótidos por delante de la Shine-Dalgarno de *nifA*. Al menos en estos mutantes distales, la concentración local de ribosomas sería muy similar a la del silvestre.

estructura en ninguno de los mutantes de terminación prematura probados, lo que explicaría plenamente el hecho de que en ninguno de ellos sea posible traducir *nifA* eficazmente.

Hemos probado la funcionalidad de la estructura secundaria predicha por el ordenador introduciendo mutaciones que desestabilizan la horquilla por mutagénesis dirigida con oligonucleótidos y determinando su efecto sobre la capacidad de traducción independiente de *nifA*. El diseño de las mutaciones es tal que la presencia simultánea de dos grupos de mutaciones desestabilizadoras, uno en cada rama de la horquilla, restaura la integridad de la estructura. Mientras que la TIR silvestre presenta una baja expresión independiente, las mutaciones desestabilizadoras generadas en ambas ramas de la horquilla provocan un aumento de dicha expresión. Sin embargo, el aumento producido por las mutaciones en la rama izquierda es mucho menor que el producido por las generadas en la rama derecha. La Shine-Dalgarno de *nifA* presenta otros tres nucleótidos adyacentes complementarios al extremo 3' del ARNr16S. La presencia de complementariedad adicional en la vecindad de la Shine-Dalgarno estabiliza la interacción con el ribosoma y se ha asociado a una mayor eficiencia de la traducción (McCarthy y Gualerzi, 1990). La secuencia de la Shine-Dalgarno de *nifA* extendida con estos tres nucleótidos sería 5'GGAGGUGA3'. Una de las mutaciones introducidas en la rama izquierda de la estructura secundaria es precisamente una sustitución G→C en la última de las guaninas de esta Shine-Dalgarno extendida. Por tanto, parece posible que esta mutación disminuya la eficiencia del sitio de unión de ribosomas, teniendo un efecto contrario al aumento de la expresión debido a la mayor accesibilidad de la Shine-Dalgarno. La reconstitución de la estructura secundaria por los dos grupos de mutaciones produce una expresión basal, inferior a la mitad de la producida por la construcción con la TIR silvestre. El hecho de que la presencia de los dos grupos de mutaciones, que separadamente tienen un efecto positivo, elimine dicho efecto indica claramente que la interacción entre las dos ramas de la estructura secundaria es responsable de la inhibición de la traducción independiente de *nifA*. Además, los niveles observados, significativamente inferiores a los del control silvestre apoyan la hipótesis de que las mutaciones de la rama izquierda disminuyen la eficiencia del sitio de unión de ribosomas de *nifA*. Según esta hipótesis, este mutante no sólo presentaría una estructura secundaria similar a la silvestre, sino que además tendría un sitio de unión de ribosomas menos eficiente.

Se han propuesto dos modelos para la estimulación de la traducción del gen distal en el acoplamiento traduccional, que se ajustan a las características de los distintos pares de genes en los que se ha observado este fenómeno. El primero, denominado de reiniciación, propone que el ribosoma que traduce el gen proximal termina la traducción y, sin que se produzca la disociación de la subunidad 30S del ARNm, esta misma subunidad reconoce la Shine-Dalgarno del gen distal e inicia la traducción. Este modelo es el propuesto para otros pares de genes con las señales de terminación e iniciación de la traducción solapadas. La eficiencia del acoplamiento depende de la capacidad de la Shine-Dalgarno del gen distal de capturar al ribosoma que ha terminado la traducción del gen proximal, lo cual viene dado por la eficiencia de la Shine-Dalgarno y por la distancia entre las señales de terminación e iniciación de la traducción (Gold, 1988). En presencia de una Shine-Dalgarno eficiente y de señales de terminación e iniciación solapadas, la eficiencia de la reiniciación es aproximadamente 1, produciéndose la síntesis estequiométrica de los dos productos génicos. El modelo alternativo, denominado de unión facilitada, propone que la traducción del gen proximal provoca la desestabilización de una estructura que ocluye al sitio de unión de ribosomas del gen distal, permitiendo así el acceso de otros ribosomas desde solución. Este modelo es el más probable en los casos en los que las señales de iniciación y terminación están más alejadas y, desde luego, parece el único posible en los pares de genes en los que la tasa de traducción del gen distal es mayor que la del proximal (McCarthy y Gualerzi, 1991).

Hay varios datos que permiten proponer un modelo de reiniciación para el acoplamiento traduccional del operón *nifLA*. En primer lugar, la estructura de la TIR de *nifA*, con las señales de terminación de la traducción de *nifL* e iniciación de la traducción de *nifA* perfectamente solapadas, se asemeja a la de otros genes para los que se ha propuesto la reiniciación como mecanismo de acoplamiento. En segundo lugar, la síntesis de los dos productos NifL y NifA es aproximadamente estequiométrica en condiciones fisiológicas. Adicionalmente, un aumento en la eficiencia de traducción de *nifL* se refleja simultáneamente en un aumento de la eficiencia de traducción de *nifA*, de manera que incluso cuando la tasa de traducción de *nifL* es tan alta que se convierte en la proteína mayoritaria en un extracto celular, la síntesis de NifA se produce a una tasa no muy inferior. Mientras que en la reiniciación la tasa de traducción del gen distal viene determinada en función de la tasa de traducción del gen proximal, en un sistema acoplado con unión facilitada esa relación no tiene porqué existir (Rex et al, 1994). En tercer lugar, la localización de la Shine-Dalgarno de *nifA*, en la rama izquierda de la estructura que inhibe la traducción es un argumento en contra de

una acción a distancia por parte de los ribosomas que traducen *nifL*, ya que cuando el ribosoma disrumpe la estructura secundaria ya se encuentra sobre la Shine-Dalgarno de *nifA*. Cabe suponer que la cercanía del ribosoma que traduce *nifL* supone un impedimento estérico para la entrada de otros ribosomas en solución. Finalmente, el hecho de que un mutante en el codón de terminación de *nifL*, que traduce a lo largo de la TIR de *nifA*, pero termina fuera de ella también reduzca fuertemente la traducción de *nifA* sugiere que la desestabilización transitoria de la estructura secundaria no es suficiente para permitir la traducción de *nifA*. Este argumento se ha utilizado para proponer un modelo de reiniciación en otros sistemas acoplados (Berckhout et al, 1987; Blomberg et al, 1992). Sin embargo, no se debe descartar que el efecto observado en este mutante se deba a que los ribosomas que traducen por encima de las señales de iniciación de *nifA* interfieran con el proceso de iniciación de su traducción.

CONCLUSIONES

1. La regulación de la fijación de nitrógeno requiere un estricto control de la proporción en la que se sintetizan las proteínas reguladoras antagónicas NifL y NifA para poderse llevar a cabo de forma eficiente.
2. La terminación prematura de la transcripción de *nifL* es polar sobre *nifA* y produce un descenso en la cantidad de ARNm del operón *nifLA* de tamaño completo.
3. Existen dos terminadores de la transcripción dependientes de Rho en el operón *nifLA*, uno en la fase de lectura de *nifL* y otro en la fase de lectura de *nifA*. El terminador dependiente de Rho de *nifL* puede ser responsable de los efectos polares en este operón.
4. La terminación de la transcripción dependiente de Rho sucede en regiones ricas en citosinas y pobres en guaninas. Sin embargo, no existe una correlación entre la diferencia de contenido en guaninas y citosinas y la eficiencia de la terminación.

5. La traducción de *nifA* no requiere la síntesis de una proteína NifL activa.

6. La traducción de *nifA* está acoplada a la de *nifL*. El acoplamiento traduccional en este operón es muy eficaz y es probable que garantice la síntesis estequiométrica de los dos productos génicos.

7. La traducción independiente de *nifA* está inhibida por una estructura secundaria estable en el ARNm. Los ribosomas que traducen *nifL* desestabilizan esta estructura y facilitan la traducción de *nifA* por un mecanismo de reiniciación.



BIBLIOGRAFIA

- Adhin M. R. y van Duin J.** (1989). Translational regulation of the lysis gene in RNA bacteriophage *φ* requires a UUG initiation codon. *Mol. Gen Genet.* 218, 137-142.
- Adler, S. P., Purich, D. y Stadtman, E. R.** (1975). Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase. Properties of the PII regulatory protein and the uridyltransferase-uridylylremoving enzyme. *J. Biol. Chem.* 250, 6264-6272.
- Alifano, P., Rivellini, F., Limauro, D., Bruni, C. C. y Carlomagno, M. S.** (1991). A consensus motif common to all Rho-dependent prokaryotic transcription terminators. *Cell* 64, 553-563.
- Arnold, W., Rump, A., Klipp, W., Priefer, U. B. y Puhler, A.** (1988). Nucleotide sequence of a 24,206 base-pair DNA fragment containing the entire nitrogen fixation gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Mol. Biol.* 203, 715-738.
- Asano, K., Kato, A., Moriwaki, H., Hama, C., Shiba, K. y Mizobuchi, K.** (1991). Positive and negative regulations of plasmid ColIb-P9 *repZ* gene expression at the translational level. *J. Biol. Chem.* 266, 3774-3781
- Athanasopoulos, V., Praszker, J. y Pittard, A. J.** (1995). The replication of an IncL/M plasmid is subject to antisense control. *J. Bacteriol.* 177, 4730-4741.

- Atkinson, M. R., Kamberov, E. S., Weiss, R. L. y Ninfa, A. J.** (1994). Reversible uridylylation 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.
- Austin, S., Henderson, N. y Dixon, R.** (1987). Requirements for transcriptional activation in vitro of the nitrogen-regulated *glnA* and *nifLA* promoters from *Klebsiella pneumoniae*: dependence on activator concentration. *Mol. Microbiol.* 1, 92-100.
- Austin, S., Henderson, N. y Dixon, R.** (1990). Characterisation of the *Klebsiella pneumoniae* nitrogen-fixation regulatory protein NIFL and NIFA in vitro. *Eur. J. Biochem.* 187, 353-360.
- Berger, D. K., Narberhaus, F. y Kustu, S.** (1994). The isolated 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.
- Berger, D. K., Narberhaus, F., Lee, H.-S y Kustu, S.** (1995). In vitro studies of the nitrogen fixation regulatory protein NIFA. *J. Bacteriol.* 191-199.
- Berkhout, B., Schmidt, B. F., van Strien, A., van Boom, J., van Westrenen, J. y van Duin, J.** (1987). Lysis Gene of Bacteriophage MS2 is Activated by translation Termination at the Overlapping Coat Gene. *J. Mol. Biol.* 195, 517-524
- Bishop, P. E. y Premakumar, R.** (1992). Alternative nitrogen fixation systems. En: *Biological nitrogen fixation*. p. 736-762. G. Stacey, R. Burris y H. Evans (eds.) Chapman & Hall. Nueva York.
- Blomberg, P., Nordström, K. y Wagner, E. G. H.** (1992). Replication control of plasmid R1: RepA synthesis is regulated by CopA RNA through inhibition of leader peptide translation. *EMBO J.* 11, 2675-2683.
- Brennan, C. A. y Platt, T.** (1991). Mutations in an RNP1 consensus sequence of rho protein reduce RNA binding affinity but facilitate helicase turnover. *J. Biol. Chem.* 256, 17296-17305.
- Brigle, K. E., Weiss, M. C., Newton, W. E. y Dean, D. R.** (1987). Products of the iron-molibdenum cofactor-specific biosynthetic genes, *nifE* and *nifN*, are structurally homologous to the products of the nitrogenase molibdenum-iron protein genes, *nifD* and *nifK*.

Buchanan-Wollaston, V., Cannon, M. C., Beynon, J. L. y Cannon, F. C. (1981). Role of the *nifA* gene product in the regulation of *nif* expression in *Klebsiella pneumoniae*. *Nature* 294, 776-778.

Buck, M. (1986). Deletion analysis of the *Klebsiella pneumoniae* nitrogenase promoter: importance of spacing between conserved sequences around positions -12 and -24 for activation by the *nifA* and *ntrC* (*glnG*) products. *J. Bacteriol.* 166, 545-551.

Buck, M., Khan, H. y Dixon, R. (1985). Site-directed mutagenesis of the *Klebsiella pneumoniae nifL* and *nifH* promoters and *in vivo* analysis of promoter activities. *Nucleic Acids Res.* 13, 7621-7638.

Buikema, W. J., Klingensmith, J. A., Gibbons, S. L. y Ausubel, F. M. (1987). Conservation of structure and location of *Rhizobium meliloti* and *Klebsiella pneumoniae nifB* genes. *J. Bacteriol.* 169, 1120-1126.

Cali, B., Micca, J. L. y Stewart, V. (1989). Genetic regulation of nitrate assimilation in *Klebsiella pneumoniae* M5a1. *J. Bacteriol.* 171, 2666-2672.

Cannon, W. y Buck, M. (1992). Central domain of the positive control protein NifA and its role in transcriptional activation. *J. Mol. Biol.* 225, 271-286.

Casadaban, M. J., Chou, J. y Cohen, S. N. (1980). In vitro gene fusions that join an enzymatically active β -galactosidase segment to amino-terminal fragments of exogenous proteins: *Escherichia coli* plasmid vectors for the detection and cloning of translation initiation signals. *J. Bacteriol.* 143, 971-980.

Ceruzzi, M., Bektesh, S. L. y Richardson, J. P. (1985). Interaction of Rho factor with bacteriophage λ *cro* gene transcripts. *J. Biol. Chem.* 260, 9412-9418.

Chung, C., Niemela, S. L. y Miller, R. H. (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli* cells: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 6, 2172-2175.

Cole, J. R. y Nomura, M. (1986). Changes in the half-life of ribosomal protein messenger RNA caused by translation repression. *J. Mol. Biol.* 188, 383-392.

Collado-Vides, J. B., Magasanik, B. y Gralla, J. D. (1991). Control site location and transcriptional regulation in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 55, 371-394.

- Dallmann, H. G. y Dunn, S. D.** (1994). Translation through an *uncDC* mRNA secondary structure governs the level of *uncC* expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175, 1242-1250
- Dalrymple, B. y Arber, W.** (1986). The characterization of terminators of RNA transcription on IS30 and an analysis of their role in IS element-mediated polarity. *Gene* 44, 1-10.
- Das, A. y Yanofsky, C.** (1984). A ribosome binding site sequence is necessary for efficient expression of the distal gene of a translationally-coupled gene pair. *Nucleic Acids Res.* 12, 4757-4768.
- Dean, D. R., Bolin, J. T. y Zheng, L.** (1993). Nitrogenase metalloclusters: structure, organization and synthesis. *J. Bacteriol.* 175, 6737-6744.
- Dean, D. R. y Jacobson, M. R.** (1992). Biochemical genetics of nitrogenase. En: *Biological nitrogen fixation*. p. 763-834. G. Stacey, R. Burris y H. Evans (eds.) Chapman & Hall. Nueva York.
- de Smit, M. H. y van Duin, J.** (1990). Secondary structure of the ribosome binding site determines translational efficiency: A quantitative analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 7668-7672.
- de Smit, M. H. y van Duin, J.** (1994). Control of translational efficiency by mRNA secondary structure in *Escherichia coli*. A quantitative analysis of literature data. *J. Mol. Biol.* 244, 144-150.
- Dixon, R., Eady, R. R., Espin, G., Hill, S., Iaccarino, M., Kahn, D. y Merrick, M.** (1980). Analysis of regulation of *Klebsiella pneumoniae* nitrogen fixation (*nif*) gene cluster with gene fusions. *Nature* 286, 128-132.
- Dixon, R. A., Henderson, N. C. y Austin, S.** (1988). DNA supercoiling and aerobic regulation of transcription from the *Klebsiella pneumoniae nifLA* promoter. *Nucleic Acids Res.* 16, 9933-9946.
- Dolan, J. W., Marshall y Richardson, J. P.** (1990). Transcription termination factor rho has three distinct structural domains. *J. Biol. Chem.* 265, 5747-5754.
- Dombroski, A. J. y Platt, T.** (1988). Structure of Rho factor: an RNA-binding domain and a separate region with strong similarity to proven ATP-binding domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2538-2542.

- 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, 29-37.
- Drummond, M. H. y Wooton, J. C.** (1987). Sequence of *nifL* from *Klebsiella pneumoniae*: mode of action and relationship to two families of regulatory proteins. *Mol. Microbiol.* 1, 37-44.
- Engleman, E. y Francis, S.** (1978). Cascade control of *E. coli* glutamine synthetase. II. 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* and *ntrC* genes of *Klebsiella pneumoniae* and studies of their role in regulation of the nitrogen fixation (*nif*) gene cluster. *Mol. Gen. Genet.* 186, 518-524.
- Finger, L. R. y Richardson, J. P.** (1982). Stabilization of the hexameric form of *Escherichia coli* protein rho under ATP hydrolysis conditions. *J. Mol. Biol.* 156, 203-219.
- Friedman, D. I.** (1988). Integration Host Factor: a protein for all reasons. *Cell* 55, 545-554.
- Gerstel, B. y McCarthy, J. E. G.** (1989). Independent and coupled translation initiation of *atp* genes in *Escherichia coli*. Experiments using chromosomal and plasmid-borne *lacZ* fusions. *Mol. Microbiol.* 3, 851-859
- Gold, L.** (1988). Posttranscriptional regulatory mechanisms in *Escherichia coli*. *Ann. Rev. Biochem.* 57, 199-233.
- Gold, L. y Stormo, G.** (1987). Translational initiation. En: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Molecular and cellular biology. p. 1302-1307. F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter y H. E. Umbrager, eds. Am. Soc. Microbiol. Washington D. C.
- Govantes, F. y Santero, E.** (1996). Transcription termination within the regulatory *nifLA* operon of *Klebsiella pneumoniae*. *Mol. Gen. Genet.* 250, 447-454.
- Gralla, J. D.** (1991). Transcriptional control-lessons from an *E. coli* promoter data base. *Cell* 66, 415-418.

- Grisolia, V., Carlomagno, M. S. y Bruni, C. B.** (1982). Cloning and expression of the distal portion of the histidine operon of *Escherichia coli* K12. *J. Bacteriol.* 151, 692-700.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580.
- Hart, C. M. y Roberts, J. W.** (1991). Rho-dependent Transcription Termination. Characterization of the requirement for cytidine in the nascent transcript. *J. Biol. Chem.* 266, 24140-24148.
- Hart, C. M. y Roberts, J. W.** (1994). Deletion analysis of the lambda tR1 termination region. Effect of sequences near the transcript release sites, and the minimum length of Rho-dependent transcripts. *J. Mol. Biol.* 237, 255-265.
- Hausinger, R. P. y Howard, J. B.** (1983). Thiol reactivity of the nitrogenase Fe-protein from *Azotobacter vinelandii*. *J. Biol. Chem.* 258, 13486-13492.
- Hellmuth, K., Rex, G., Surin, B., Zinck, R. y McCarthy, J. E. G.** (1991). Translational coupling varying in efficiency between different pairs of genes in the central region of the ATP operon of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 5, 813-824.
- Henderson, N., Austin, S. A. y Dixon, R.** (1989). Role of metal ions in negative regulation of nitrogen fixation by the *nifL* gene product from *Klebsiella pneumoniae*. *Mol. Gen. Genet.* 216, 484-491.
- Hill, S.** (1992). Physiology of nitrogen fixation in free-living heterotrophs. En: *Biological nitrogen fixation*. p. 87-134. G. Stacey, R. Burris y H. Evans (eds.) Chapman & Hall. Nueva York.
- Hill, S., Austin, S., Eydmann, T., Jones, T. y Dixon, R.** (1996). *Azotobacter vinelandii* NIFL is a flavoprotein that modulates transcriptional activation of nitrogen-fixation genes via a redox-sensitive switch. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 2143-2148.
- Hill, S. y Kavanagh, E. P.** (1980). Roles of *nifF* and *nifJ* gene product in electron transport to nitrogenase in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 141, 470-475.
- Hill, S., Kennedy, C. y Kavanagh, E.** (1981). Nitrogen fixation gene (*nifL*) involved in oxygen regulation of nitrogenase synthesis in *K. pneumoniae*. *Nature* 290, 424-426.

- Holtel, A., y Merrick, M. J. (1989). The *Klebsiella pneumoniae* PII protein (*glnB* gene product) is not absolutely required for nitrogen regulation and is not involved in NifL-mediated *nif* gene regulation. *Mol. Gen. Genet.* 217, 474-480.
- Homer, M. J., Paustian, T. D., Shah, V. K. y Roberts, G. P. (1993). The *nifY* product of *Klebsiella pneumoniae* is associated with apodinitrogenase and dissociates upon activation with the iron-molibdenum factor. *J. Bacteriol.* 175, 4907-4910.
- Hoover, T. R., Santero, E., Porter, S. y Kustu, S. (1990). Integration host factor stimulates interaction of RNA polimerase with NifA, the transcriptional activator for nitrogen fixation operons. *Cell* 63, 1-22.
- Howard, J. B., Davis, R., Moldenhauer, B., Cash, V. L. y Dean, D. (1989). Fe:S cluster ligands are the only cysteines required for nitrogenase Fe protein activities. *J. Biol. Chem.* 264,11270-11274.
- Howard, K. S., McLean, P. A., Hansen, F. B., Lemley, P. V., Koblan, K. S. y Orme-Johnson, W. H. (1986). *Klebsiella pneumoniae nifM* gene product is required for stabilization and activation of nitrogenase iron protein in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 261, 772-778.
- Hui, A. y de Boer, H. A. (1987). Specialized ribosome system: preferential translation of a single mRNA species by a subpopulation of mutated ribosomes in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 4762-4766
- Inoue, H., Nojima, H. y Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-28.
- Ish-Horowicz, D. y Burke, J. F. (1981). Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.* 9, 2989.
- Jacobson, M. R., Cash, V. L., Weiss, M. C., Laird, N. F., Newton, W. E. y Dean, D, R. (1989). Biochemical and genetic analysis of the *nifUSVWZM* cluster from *Azotobacter vinelandii*. *Mol. Gen. Genet.* 219, 49-57.
- 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.
- Kastelein, R. A., Berkhout, B. y van Duin, J. (1983). Opening the closed ribosome-binding site of the lysis cistron of bacteriophage MS2. *Nature* 305, 741-743.

Kunkel, T. A. (1985). Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 488-492.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 6.

Lee, H.-S., Berger, D. K. y Kustu, S. (1993a). Activity of purified NIFA, a transcriptional activator of nitrogen fixation genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 2266-2270.

Lee, H.-S., Narberhaus, F. y Kustu, S. (1993b). In vitro activity of NifL, a signal transduction protein for biological nitrogen fixation. *J. Bacteriol.* 175, 7683-7688.

Leong, D., Pfeifer, F., Boyer, H. y Betlach, M. (1988). Characterization of a second gene involved in bacterio-opsin gene expression in a halophilic archaeobacterium. *J. Bacteriol.* 170, 4903-4909.

Kim, J. y Rees, D. C. (1992). Structural models for the metal centers in the nitrogenase molybdenum-iron protein. *Science* 257, 1677-1682.

Kustu, S., North, A. K., Weiss D. S. (1991). Prokaryotic 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.

Lesage, P., Chiaruttini, C., Graffe, M., Dondon, J., Milet, M. y Springer, M. (1992). Messenger RNA secondary structure and translational coupling in the *Escherichia coli* operon encoding translational initiation factor IF3 and the ribosomal proteins L35 and L20. *J. Mol. Biol.* 228, 366-386.

Macián, F., Pérez-Roger, I. y Armengod, M. E. (1994). An improved vector system for constructing transcriptional *lacZ* fusions: analysis of the regulation of the *dnaA*, *dnaN*, *recF* and *gyrF* genes of *Escherichia coli*. *Gene* 145,17-24.

MacNeil, D. y Brill, W. J. (1980). Mutation in *nif* genes that cause *Klebsiella pneumoniae* to be derepressed for nitrogenase synthesis in the presence of ammonium. *J. Bacteriol.* 144, 744-751.

- MacNeil, T., MacNeil, D., Roberts, G. P., Supiano, M. A. y Brill, W. J.** (1978). Fine-structure mapping and complementation analysis of *nif* (nitrogen fixation) genes in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 136, 252-266.
- Maloy, S. R.** (1990). *Experimental techniques in bacterial genetics*. Jones and Bartlett Publishers, Boston.
- McCarthy, J. E. G. y Gualerzi, C.** (1990). Translational control of prokaryotic gene expression. *Trends Genet.* 6, 78-85.
- McCormick, J. R., Zengel, J. M. y Lindahl, L.** (1994). Correlation of translation efficiency with the decay of *lacZ* mRNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 239, 608-622.
- McSwiggen, J. A., Bear, D. G. y von Hippel, P. H.** (1988). Interactions of *Escherichia coli* transcription terminator factor rho with RNA. I. Binding stoichiometries and free energies. *J. Mol. Biol.* 199, 609-622.
- Merrick, M. J.** (1992). Regulation of nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic bacteria. En: *Biological nitrogen fixation*. p. 835-876. G. Stacey, R. Burris y H. Evans (eds.) Chapman & Hall. Nueva York.
- Merrick, M. J.** (1993). In a class of its own-the RNA polymerase sigma factor σ^{54} (σ^N). *Mol. Microbiol.* 10, 903-909.
- Merrick, M. J. y Edwards, R. A.** (1995). Nitrogen control in bacteria. *Microbiol. Rev.* 59, 604-622.
- Merrick, M., Hill, S., Hennecke, H., Hahn, M., Dixon, R. y Kennedy, C.** (1982). 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. Laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, Nueva York.
- Miller, V. L. y Mekalanos, J. J.** (1988). A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J. Bacteriol.* 170, 2575-2583.
- Minchin, S. D., Austin, S. A. y Dixon, R. A.** (1989). Transcriptional activation of the *Klebsiella pneumoiniae nifLA* promoter by NTRC is face-of-the-helix

dependent and the activator stabilizes the interaction of sigma 54-RNA polymerase with the promoter. *EMBO J.* 8, 3491-3499.

Molina-López, J.A., Govantes, F. y Santero, E. (1994). Geometry of the process of activation at the σ^{54} -dependent *nifH* promoter of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* 269, 25419-25425.

Morett, E. y Buck, M. (1988). NifA-dependent in vivo protection demonstrates that the upstream activator sequence of *nif* promoters is a protein binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 9401-9405.

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 of *nif* promoters and can be separated from the positive control function of NifA. *Nucleic Acids Res.* 16, 11469-11487.

Morett, E., Kreutzer, R., Cannon, W. y Buck, M. (1990). The influence of the *Klebsiella pneumoniae* regulatory gene *nifL* upon the transcriptional activator *nifA*. *Mol. Microbiol.* 4, 1253-1258.

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.

Morgan, W. D., Bear, D. G., Litchman, B. L. y von Hippel, P. H. (1985). RNA sequence and secondary structure requirements for rho-dependent transcription termination. *Nucleic Acids Res.* 13, 37-39.

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

Narberhaus, F., Lee, H.-S., Schmitz, R. A., He, L. y Kustu, S. (1995). The C-terminal domain of NifL is sufficient to inhibit NifA activity. *J. Bacteriol.* 177, 5078-5087.

Ninfa, A. J. y Benett, R. L. (1991). Identification of the site of autophosphorylation of the bacterial protein kinase/phosphatase NR_{II}. *J. Biol. Chem.* 266, 6888-6893.

Ninfa, A. J. y Magasanik, B. (1986). Covalent modification of the *glnG* product, NR_I, by the *glnL* product, NR_{II} regulates the transcription of the *glnALG* operon in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 5909-5913.

Ninfa, A. J., Reitzer, L. J. 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.

North, A. K., Klose, K. E., Stedman, K. M. y Kustu, S. (1993). Prokaryotic enhancer-binding proteins reflect eukaryote-like modularity: the puzzle of nitrogen regulatory protein C. J. Bacteriol. 175, 4267-4273.

Oppenheim, D. S. y Yanofsky, C. (1980). Translational coupling during expression of the tryptophan operon of *Escherichia coli*. Genetics 95, 785-795.

Parkinson, J. y Kofoid, E. C. (1992). Communication modules in bacterial signaling proteins. Ann. Rev. Genet. 26, 71-112.

Pati, S., DiSilvestre, D. y Brusilow, W. S. A. (1992). Regulation of the *Escherichia coli unchH* gene by mRNA secondary structure and translational coupling. Mol. Microbiol. 6, 3559-3566

Paul, W. y Merrick, M. (1989). The roles of the *nifW*, *nifZ* and *nifM* genes of *Klebsiella pneumoniae* in nitrogenase biosynthesis. Eur. J. Biochem. 170, 259-265.

Paustian, T. D., Shah, V. K. y Roberts, G. P. (1989). Purification and characterization of the *nifN* and *nifE* gene products from *Azotobacter vinelandii* mutant UW45. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6082-6086.

Pérez-Martín, J., Timmis, K. N., de Lorenzo, V. (1994). Transcriptional coregulation by bent DNA: functional substitutions of the IHF site at the σ^{54} -dependent promoter *Pu* of the upper TOL operon by intrinsically curved DNA sequences. J. Biol. Chem. 269, 22657-22662.

Petersen, C. (1989). Long-range translational coupling in the *rplJL-rpoBC* operon of *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 206, 323-332.

Petersen, C. (1991). Control of functional mRNA stability in bacteria: multiple mechanisms of nucleolytic and non-nucleolytic inactivation. Mol. Microbiol. 6, 277-282.

- Platt, T.** (1994). Rho and RNA: models for recognition and response. *Mol. Microbiol.* 11, 983-990.
- Platt, T. y Richardson, J. P.** (1992) *Escherichia coli* Rho factor: protein and enzyme of transcription termination. En: *Transcriptional regulation*, vol. 1. McKnight, S. L. y Yamamoto, K. R. (ed.), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Porter, S. C., North, A. K., Wedel, A. B. y Kustu, S.** (1993). Oligomerization of NtrC at the *glnA* enhancer is required for transcriptional activation. *Genes and Dev.* 7, 2258-2273.
- Praszkier, J., Wilson, I. W. y Pittard, A. J.** (1992). Mutations affecting translational coupling between the *rep* genes of an IncB miniplasmid. *J. Bacteriol.* 174, 2376-2383
- Rex, G., Surin, B., Besse, G., Schneppe, B. y McCarthy, J. E. G.** (1994). The mechanism of translational coupling in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 269, 18118-18127
- Richardson, J. P.** (1982). Activation of rho protein ATPase requires simultaneous interaction at two kinds of nucleic acid binding sites. *J. Biol. Chem.* 257, 5760-5766.
- Richardson, J. P.** (1990) Rho-dependent transcription termination. *Biochim. Biophys. Acta* 1048, 127-138.
- Richardson, J. P.** (1991). Preventing the synthesis of unused transcripts by Rho factor. *Cell* 64, 1047-1049.
- Richardson, J. P.** (1996). Structural organization of transcription termination factor Rho. *J. Biol. Chem.* 271,1251-1254.
- Ringquist, S., Shinedling, S., Barrick, D., Green, L., Binkley, J., Stormo, G. D., y Gold, L.** (1992). Translation initiation in *Escherichia coli* : sequences within the ribosome-binding site. *Mol. Microbiol.* 6, 1219-1229
- Rivellini, F., Alifano, P., Piscitelli, C., Bruni, C. B. y Carlomagno, M. S.** (1991). A cytosine-over-guanine rich sequence in RNA activates rho-dependent transcription termination. *Mol. Microbiol.* 5, 3049-3054.
- Roberts, G. P. y Brill, W. J.** (1980). Gene-product relationships of the *nif* regulon of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 144, 210-216.

- Roberts, G. P., MacNeil, T., MacNeil, D. y Brill, W. J. (1980).** Regulation and characterization of protein products coded by the *nif* (nitrogen fixation) genes of *Klebsiella pneumoniae*. J. Bacteriol. 136, 267-279.
- Robinson, A. C., Chun, T. W., Li, J.-G. y Burguess, B. K. (1989).** Iron-molibdenum cofactor biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* requires the iron protein of the nitrogenase. J. Biol. Chem. 262, 14327-14332.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, Nueva York.
- Santero, E., Hoover, T. R., North, 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.
- Schmidt, B. F., Berkhout, B., Overbeek, G. P., van Strien, A. y van Duin, J. (1987).** Determination of the RNA secondary structure that regulates lysis gene expression in bacteriophage MS2. J. Mol. Biol. 195, 505-516
- Schmitz, R. A., He, L. y Kustu, S. (1996).** Iron is required to relieve inhibitory effects of NifL on transcriptional activation by NifA. J. Bacteriol. En prensa.
- Seifried, S. E., Easton, J. B. y von Hippel, P. H. (1992).** ATPase activity of transcription-termination factor rho: Functional dimer model. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10454-10458
- Shah, V. K. y Brill, W. J. (1977).** Isolation of an iron-molibdenum cofactor from nitrogenase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 3249-3253.
- Shah, V. K., Imperial, J., Ugalde, R. A., Ludden, P. W. y Brill, W. J. (1986).** In vitro synthesis of the iron-molibdenum cofactor of the nitrogenase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 1636-1640.
- Shah, V. K., Stacey, G. y Brill, W. J. (1983).** Electron transport to nitrogenase: purification and characterization of pyruvate:flavodoxin oxidoreductase, the *nifJ* gene product. J. Biol. Chem. 258, 12064-12068.
- Silberstein, Z. y Cohen, A. (1987).** Synthesis of linear multimers of OriC and pBR322 derivatives in *Escherichia coli* K12: role of recombination and replication functions. J. Bacteriol. 169, 3131-3137.

Simon, R., Priefer, U. y Pühler, A. (1983). A broad host-range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Bio/Technology* 1, 784-791.

Stock, J. B., Ninfa, A. J. y Stock, A. M. (1989). Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol. Rev.* 53, 450-490.

Sprengart, M. L., Fatscher, H. P. y Fuchs, E. (1990). The initiation of translation in *E. coli*: apparent base-pairing between the 16S rRNA and downstream sequence of the mRNA. *Nucleic Acids Res.* 18, 1719-1723.

Sprengart, M. L., Fuchs, E. y Porter, A. (1996). The downstream box: an efficient and independent translation initiation signal in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 15, 665-674.

Steinmetz, E. J. y Platt, T. (1994). Evidence supporting a tethered tracking model for helicase activity of *Escherichia coli* Rho factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 1401-1405.

Stephen, D., Jones, C. 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.

Studier, F. W. y Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189, 113-130.

Sullivan, S. L. y Gottesman, M. E. (1992). Requirement for *E. coli* NusG protein in factor-dependent transcription termination. *Cell* 68, 989-994.

Tabor, S. (1994). Gene expression using the T7 RNA polymerase/promoter system. En: *Current protocols in molecular biology*. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D., Seidman, J. G., Smith, J. A. y Struhl, K. (eds). John Wiley, NuevaYork.

Theisen, M. y Neuhard, J. (1990). Translational coupling in the *pyrF* operon of *Salmonella typhimurium*. *Mol. Gen Genet.* 222, 345-352.

Ugalde, R. A., Imperial, J., Shah, V. K. y Brill, W. J. (1985). Biosynthesis of the iron-molibdenum cofactor and the molibdenum cofactor in *Klebsiella pneumoniae*: effect of sulfur source. *J. Bacteriol.* 164, 1081-1087.

Valentin-Hansen, P., Albrechtsen B. y Løve Larsen, J. E. (1986). DNA-protein recognition: demonstration of three genetically separated operator elements that are required for repression of the *Escherichia coli* *deoR* repressor. *EMBO J.* 5, 2015-2021.

Vellanoweth, R. L. y Rabinowitz, J. C. (1992). The influence of ribosome-binding-site elements on translational efficiency in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* in vivo. *Mol. Microbiol.* 6, 1105 - 1114

Wang, Y. y von Hippel, P. H. (1993). *Escherichia coli* transcription termination factor rho. II. Binding of oligonucleotide cofactors. *J. Biol. Chem.* 268, 13947-13955.

Wedel, A., Weiss, D. S., Popham, D., Dröge, P. y Kustu, S. (1990). A bacterial enhancer functions to tether a transcriptional activator near a promoter. *Science* 248, 486-490.

Weiss, D. S., Batut, J., Klose, K. E., 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.

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.

Yager, T. D. y von Hippel, P. H. (1987). Transcript elongation and termination in *Escherichia coli*. En: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. p. 1241-1275
Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik, B., Schaechter, M. y Umberger, H. E., eds.
Am. Soc. Microbiol. Washington, D.

Yates, J. L., Dean, D., Strycharz, W. A. y Nomura, M. (1981). *E. coli* ribosomal protein L10 inhibits translation of L10 and L7/L12 mRNAs by acting at a single site. *Nature* 294, 190-192

Yates, J. L. y Nomura, M. (1981). Feedback Regulation of Ribosomal Protein Synthesis in *E. coli*: Localization of the mRNA Target Sites for Repressor Action of Ribosomal Protein L1. *Cell* 24, 243 - 249

Zalatan, F. y Platt, T. (1992). Effects of decreased cytosine content on Rho interaction with the Rho-dependent terminator *trp t'* in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 267, 19082-19088.

Zheng, L., White, R. H., Cash, V. L., Jack, R. F. y Dean, D. R. (1993). Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 2754-2758.

de ...
... de

Fernando Górriz Romero
Regulación de la síntesis
coordinada de N-fl y N-fA en
Klebsiella pneumoniae
Anto cum laude

25 Junio

96

Milla

Trinfelth

María Dylew G

~~Amoroso~~

Caacemi

F.M. Parantz



UNIVERSIDAD DE SEVILLA



600672119