

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE GRANADA**

T. Prov. 24/21
T 10/64

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha *20/12/2001*
ENTRADA NUM. *4856*

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
N.º Documento *51338499*
N.º Copia *1637/01x*

TESIS DOCTORAL

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL EXTREMO
AMINO TERMINAL DE LA PROTEÍNA REGULADORA
XylS**

**RAQUEL RUIZ ARROYO
2002**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL EXTREMO
AMINO TERMINAL DE LA PROTEÍNA
REGULADORA XylS.**

Memoria que presenta la Licenciada en
Bioquímica Raquel Ruiz Arroyo
para aspirar al Título de Doctor.



Fdo: Raquel Ruiz Arroyo

VºBº
El director



Fdo: Juan Luis Ramos Martín
Doctor en Biología
Investigador Científico del C.S.I.C.

Universidad de Granada
2002



Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el
Grupo de Degradación de Tóxicos Orgánicos del
Departamento de Bioquímica y Biología
Molecular y Celular de Plantas de la Estación
Experimental del Zaidín (C.S.I.C.), GRANADA

A tres grandes personas que siempre confiaron en mi:

Pepa, Pili y Nono.

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE TABLAS	ii
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	39
MATERIALES Y MÉTODOS	41
CAPÍTULO 1	75
CAPÍTULO 2	109
CAPÍTULO 3	131
RESUMEN Y PERSPECTIVAS	159
CONCLUSIONES	163
BIBLIOGRAFÍA	165

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla M.1.	Estirpes bacterianas utilizadas en este trabajo.	41
Tabla M.2.	Plásmidos utilizados en este trabajo.	44
Tabla M.3.	Oligonucleótidos usados para realizar ensayos de extensión reversa.	60
Tabla M.4.	Oligonucleótidos utilizados como cebadores en las reacciones de PCR.	62
Tabla M.5.	Cebadores utilizados para la generación de mutantes dirigidos por PCR.	65
Tabla 1.1.	Razón de inducción mediada por XylS _{p_{ww0}} silvestre y varios mutantes de este regulador con distintos efectores.	82
Tabla 1.2.	Actividad mediada por los reguladores XylS en presencia de distintas concentraciones de 3MBz.	89
Tabla 1.3.	K's y V _{máx} de las proteínas XylS mutantes para el 3MBz.	91
Tabla 1.4.	Efecto de las mutaciones en las posiciones 137 y 153 de XylS en la activación de la transcripción desde el promotor P _m .	93
Tabla 2.1.	Expresión de P _m en presencia de derivados de α -NTD con sustituciones a alanina.	113
Tabla 2.2.	Efecto de la delección de α -CTD en la expresión desde el promotor P _m mediada por los reguladores XylS y XylS1.	115
Tabla 2.3.	Residuos de α -CTD que afectan a la transcripción desde P _m .	119
Tabla 2.4.	Efecto de la sustitución a alanina en las posiciones 289 y 291 de α -CTD en la transcripción desde P _m mediada por reguladores XylS mutantes.	121

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1.	Rutas metabólicas codificadas por el plásmido TOL pWW0.	6
Figura I.2.	Esquema del plásmido TOL pWW0 de <i>P.putida</i> .	7
Figura I.3.	Modelo de regulación de las rutas degradativas del plásmido TOL pWW0.	12
Figura I.4.	Motivos de unión de XylS en el promotor Pm.	16
Figura I.5.	Estructura tridimensional de la proteína MarA junto con su secuencia diana en el ADN del promotor <i>mar</i> .	19
Figura I.6.	Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de XylS y MarA.	20
Figura I.7.	Representación de la proteína XylS.	20
Figura I.8.	Estructura de los promotores del gen <i>xylS</i> .	24
Figura I.9.	Estructura tridimensional del dominio N-terminal de la proteína AraC.	30
Figura I.10	Modelo de la inducción de AraC por L-arabinosa en el promotor <i>araBAD</i> .	31
Figura I.11.	Representación esquemática de la región promotora <i>rhaSR</i> .	32
Figura I.12.	Representación esquemática de las regiones promotoras <i>rhaBAD</i> y <i>rhaT</i> .	33
Figura I.13.	Modelo para la activación de la transcripción desde el promotor <i>melAB</i> .	35
Figura I.14.	Modelo de la represión del promotor <i>melR</i> dependiente de MelR.	35
Figura M.1.	Plásmido pCMX2.	45
Figura M.2.	Plásmido pGEX-4T-1.	46
Figura M.3.	Plásmido pLOW2.	47
Figura M.4.	Plásmido pMAL-pV.	48
Figura M.5.	Plásmido pQE30.	49
Figura M.6.	Esquema del método de mutagénesis dirigida por PCR solapante.	64
Figura 1.1.	Mapa físico de pWW53 y organización de los operones catabólicos y los genes reguladores.	76
Figura 1.2.	Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las proteínas XylS _{pww0} y XylS1 _{pww53} .	77
Figura 1.3.	Perfil de efector de las proteínas XylS y XylS1.	78
Figura 1.4.	Construcción de mutantes de <i>xylS</i> .	80
Figura 1.5.	Construcción de los mutantes dobles de XylS.	83
Figura 1.6.	Inmunodetección de las proteínas XylS silvestre y mutantes.	86
Figura 1.7.	Niveles de inducción mediados por XylS y algunos derivados mutantes en respuesta a benzoatos sustituidos.	88
Figura 1.8.	Determinación de la K's para el 3MBz de la proteína XylS.	90
Figura 1.9.	Inmunodetección de las proteínas XylS silvestre y mutantes.	95

Figura 1.10-A.	Efecto de las mutaciones en <i>rpoS</i> y <i>rpoH</i> en la transcripción desde Pm mediada por los reguladores XylS, XylSD137E y XylSH153N.	98
Figura 1.10-B.	Efecto de las mutaciones en <i>rpoS</i> y <i>rpoH</i> en la transcripción desde Pm mediada por los reguladores XylSD137E-H153N y XylS1.	99
Figura 1.11.	Transcripción in vivo desde Pm mediada por XylS, XylSD137E y XylS1 en un fondo σ^{70} silvestre y σ^{70} termosensible.	101
Figura 1.12.	Transcripción in vivo desde Pm mediada por XylS, XylSD137E y XylS1 en un fondo σ^{70} termosensible deficiente en σ^{38} .	103
Figura 2.1.	Modelo del papel de la subunidad α de la ARN polimerasa (ARNP) en el reconocimiento de un promotor y en la activación de la transcripción desde el mismo.	109
Figura 2.2.	Estructura del dominio N-terminal de la subunidad α de la ARNP de <i>E. coli</i> (α -NTD).	110
Figura 2.3.	Efecto de las sustituciones a alanina en α -CTD en la activación de Pm mediada por XylS.	117
Figura 2.4.	Efecto de las sustituciones a alanina en α -CTD en la activación de Pm mediada por XylS1.	118
Figura 2.5.	Secuencia del promotor Pm.	125
Figura 2.6.	Estructura del dominio C-terminal de la subunidad α de la ARNP (α -CTD).	127
Figura 2.7.	Modelo espacial de la estructura de α -CTD.	128
Figura 3.1.	Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las proteínas XylS y AraC.	134
Figura 3.2.	Esquema del sitio de clonación múltiple del plásmido pQE30.	135
Figura 3.3.	Secuencia de ADN de la fusión del extremo N-terminal de XylS a una cola de hexa-histidina.	136
Figura 3.4.	Expresión de la fusión de NXylS a una cola de 6xHis.	137
Figura 3.5.	Fusión GST-NXylS.	139
Figura 3.6.	Secuencia de ADN de la fusión génica <i>gst::xylSN</i> .	140
Figura 3.7.	Expresión de la fusión de NXylS a la proteína GST.	141
Figura 3.8.	Fusión MBP-NXylS.	143
Figura 3.9.	Secuencia de ADN de la fusión génica <i>malE::xylSN</i> .	144
Figura 3.10.	Expresión de la proteína de fusión MBP-NXylS.	146
Figura 3.11.	Expresión de las proteínas MBP y MBP-NXylS a diferentes tiempos y en presencia de distintas concentraciones de IPTG.	147
Figura 3.12.	Expresión de MBP-NXylS a diferentes temperaturas.	148
Figura 3.13.	Detección de la proteína de fusión MBP-NXylS.	149
Figura 3.14.	Purificación de la proteína de fusión MBP-NXylS.	151
Figura 3.15.	Detección de la proteína de fusión MBP-NXylS.	151
Figura 3.16.	Ensayo de Cross-linking con glutaraldehído.	152

Introducción

Las proteínas que participan en la regulación de la expresión génica responden a señales específicas de diversa naturaleza (ambientales, celulares, etc.) estimulando o inhibiendo la transcripción, traducción o algún otro proceso relacionado con ella, de modo que la tasa de síntesis del producto génico se modifica de forma apropiada. Uno de los pasos fundamentales en el mecanismo de acción de los reguladores es la interacción de éstos con sus secuencias de ADN específicas, por ello, este aspecto se ha estudiado ampliamente. Sin embargo, las interacciones de los reguladores con sus efectores y los cambios conformacionales resultantes que desembocarían en la activación del regulador han recibido menos atención. Esto es debido entre otras razones, en el caso de señales químicas, a la ausencia de señales alternativas o a la escasez de análogos químicos que permitan explorar la estructura y función del dominio de reconocimiento de señal de los reguladores.

Nuestro grupo de investigación ha enfocado parte de sus esfuerzos en el estudio de la regulación de las rutas catabólicas del plásmido TOL pWW0 de *Pseudomonas putida* para el metabolismo de tolueno y benzoato. La ventaja que presenta este sistema para el estudio de las interacciones efector-regulador es que existe una gran cantidad de análogos químicos que permiten explorar la estructura del bolsillo de unión del efector que presenta el regulador.

A lo largo de esta introducción se van a describir algunas propiedades de las bacterias del género *Pseudomonas*, así como la organización bioquímica y genética de las funciones catabólicas que porta el plásmido TOL pWW0. En particular se describirán las características más interesantes de los elementos que participan en la regulación de la ruta *meta*, para posteriormente centrarnos en un estudio más detallado de la proteína XylS y de la familia de proteínas reguladoras AraC/XylS a la cual pertenece.

1. EL GÉNERO *Pseudomonas*.

El género *Pseudomonas* fue descrito por primera vez por Migula en 1894. Este grupo de microorganismos es muy heterogéneo y se caracteriza por ser bacterias gram negativas, de forma bacilar, con uno o varios flagelos polares.

Estos microorganismos son ubicuos y se pueden aislar de hábitats muy variados como son suelos, sedimentos de ríos y lagos, aguas dulces y saladas, alimentos y plantas sanas y enfermas.

Las bacterias del género *Pseudomonas* son en general aerobias, aunque en condiciones anaeróbicas, muchas cepas son capaces de utilizar nitrato como aceptor de electrones (Auling *et al.*, 1978; Ballard *et al.*, 1968; Davis, 1967; Sands *et al.*, 1967; Stainer *et al.*, 1966). En la desnitrificación el producto final puede ser NO_2 ó N_2 y el proceso se reprime en presencia de oxígeno. Esteve-Núñez y colaboradores (2000) describieron una cepa de *Pseudomonas* capaz de utilizar el explosivo 2,4,6-trinitrotolueno como aceptor alternativo de electrones.

En 1986 Palleroni propuso cinco grupos taxonómicos dentro del género *Pseudomonas*, basándose en análisis de hibridación ADN-ADN. La secuenciación posterior de los ARNr 16S reflejó la diversidad entre grupos, de modo que actualmente sólo se considera como verdaderas *Pseudomonas* el denominado grupo ARN-I, que incluye, entre otras a las siguientes especies: *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. stutzeri* y *P. syringae*.

La propiedad fisiológica más notable es la enorme capacidad de las bacterias de este género para utilizar una amplia gama de compuestos orgánicos como fuente de carbono, como son hidrocarburos lineales y aromáticos, carbohidratos, ácidos, alifáticos, aminas, amidas, aminoácidos, alcoholes y compuestos aromáticos.

Otra característica de este género es su capacidad de interaccionar con otros organismos ya que aproximadamente dos tercios de las especies que lo componen tienen relaciones parásito/huésped con plantas y animales, destacando entre estas últimas la especie *P. aeruginosa* por ser

un parásito oportunista del hombre en situaciones extremas como quemaduras graves o individuos con fibrosis cística (Palleroni, 1986). Además de cepas patógenas oportunistas de animales, hay cepas patógenas oportunistas de plantas, como *P. syringae* y cepas que estimulan el crecimiento de plantas actuando como fungicidas, por ejemplo *P. fluorescens* (Lugtenberg, 1999).

2. EL PLÁSMIDO TOL pWW0 de *Pseudomonas putida*.

En 1963 se describió por primera vez la capacidad de la cepa *Pseudomonas putida* mt-2 para crecer en 3-metilbenzoato como única fuente de carbono (Nozaki *et al.*, 1963). Posteriormente se demostró que esa capacidad residía en el plásmido autotransmisible de 117 kb denominado pWW0 (Nakazawa y Yokota, 1973; Williams y Murray, 1974). Desde entonces, este plásmido se ha estudiado en detalle, de modo que actualmente es uno de los plásmidos catabólicos mejor caracterizados. El plásmido TOL pWW0 de *Pseudomonas putida* se considera el plásmido arquetipo de degradación de tolueno. Se han aislado además otros plásmidos TOL que difieren de pWW0 en una serie de características como son transmisibilidad, estructura molecular, patrones de restricción o presencia de deleciones (Duggleby *et al.*, 1977; Friello *et al.*, 1976; Keil *et al.*, 1985; Kunz y Chapman, 1981; Whited *et al.*, 1986; Williams y Worsey, 1976; Worsey y Williams, 1977). Entre éstos se encuentra el plásmido TOL pWW53 que se ha caracterizado en algún detalle, pero la información que se dispone de éste es menor que en el caso de pWW0 (Assinder *et al.*, 1993; Assinder y Williams, 1990; Gallegos *et al.*, 1997; Keil *et al.*, 1985; 1987; 1992; Osborne *et al.*, 1988).

2.1. Organización bioquímica de las rutas catabólicas de pWW0.

La Figura I.1 muestra las reacciones implicadas en la degradación de tolueno e hidrocarburos aromáticos relacionados hasta intermediarios del ciclo de Krebs por los enzimas codificados por el plásmido TOL pWW0. El grupo metilo del carbono 1 del anillo aromático es oxidado secuencialmente vía alcohol bencílico y benzaldehído hasta el correspondiente ácido carboxílico aromático (benzoato o los respectivos compuestos sustituidos). Este conjunto de reacciones constituye la denominada ruta "upper". Los ácidos carboxílicos aromáticos son posteriormente metabolizados a través de la ruta *meta*, en la cual, el benzoato o los alquilbenzoatos son oxidados y descarboxilados para producir catecol o alquilatecoles, los cuales sufren una fisión *meta* para rendir el semialdehído del ácido 2-hidroxi-2,4-pentadienoico o el correspondiente derivado alquílico. Dependiendo de que el benzoato tenga algún sustituyente o no y de la posición de éste, el semialdehído sigue una de las dos vías alternativas indicadas en la Figura 1, que convergen posteriormente en un intermediario común, el 4-hidroxi-2-oxopentanoato, que entra en el metabolismo central a nivel de piruvato y acetaldehído. El semialdehído producido a partir del 3-metilbenzoato es metabolizado por un enzima hidrolítico que rinde 2-hidroxi-2,4-pentadienoato, mientras que el semialdehído derivado del benzoato y 4-metilbenzoato es metabolizado a través de la rama del oxalcrotonato, que implica al menos tres reacciones enzimáticas (Assinder y Williams, 1990; Harayama y Reikik, 1990; Harayama y Timmis, 1989; Harayama *et al.*, 1986; Harayama *et al.*, 1987; Nakai *et al.*, 1983; Polissi y Harayama, 1993; Shaw y Harayama, 1990; Suzuki *et al.*, 1991).

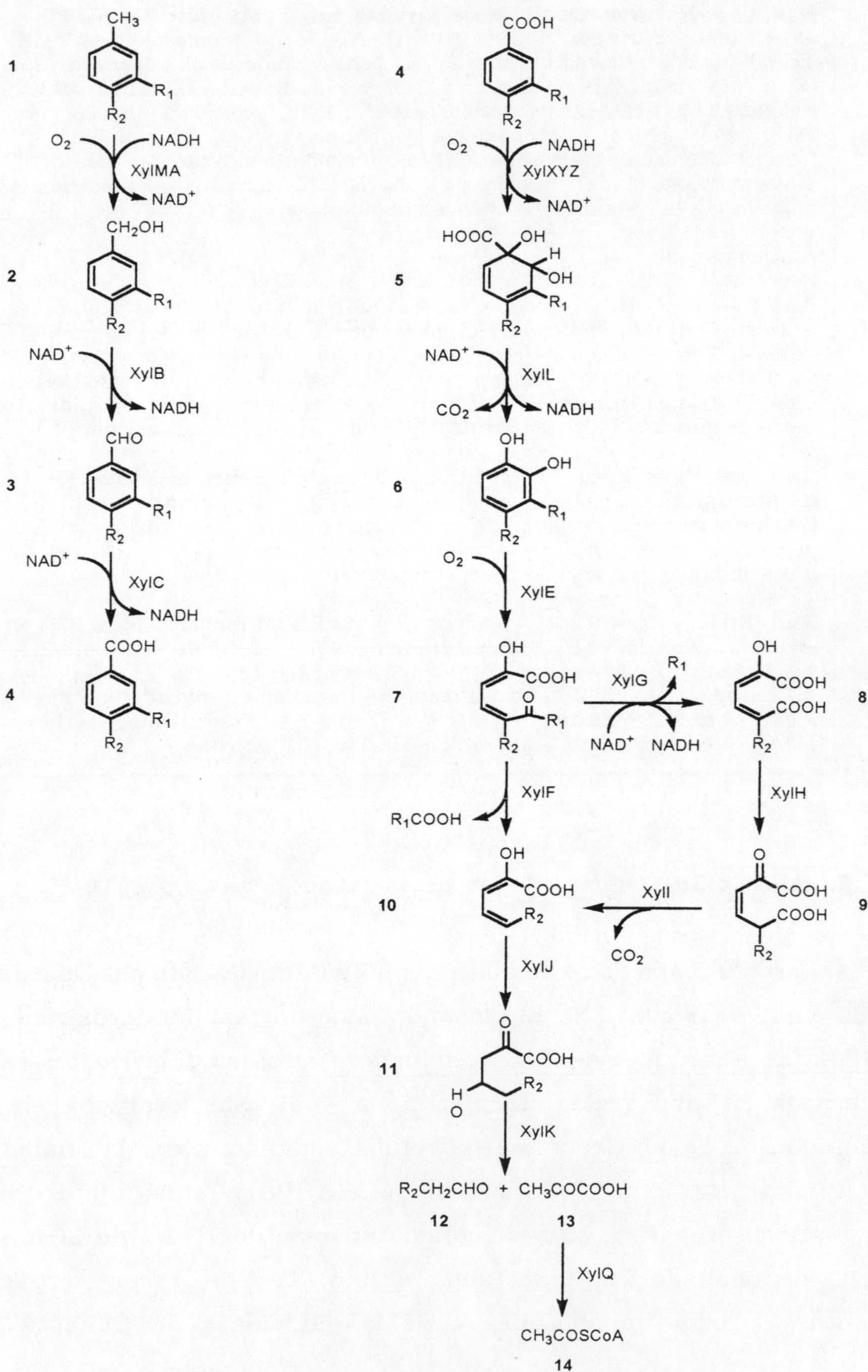


Figura I.1. Rutas metabólicas codificadas por el plásmido TOL pWW0.

Los enzimas de la ruta "upper" son: XylMA, tolueno monooxigenasa; XylB, alcohol bencílico deshidrogenasa; XylC, benzaldehído deshidrogenasa y los de la ruta *meta*: XylXYZ, toluato 1,2-dioxigenasa; XylL, 1,2-dihidroxi-3,5-ciclohexadien-1-carboxilato deshidrogenasa; XylE, catecol 2,3-dioxigenasa; XylF, semialdehído 2-hidroximucónico hidrolasa; XylG, semialdehído 2-hidroximucónico deshidrogenasa; XylH, 4-oxalcrotonato tautomerasa; XylI, 4-oxalcrotonato descarboxilasa; XylJ, 2-hidroxi-2,4-pentadienoato hidratasa; XylK, 4-hidroxi-2-oxovalerato hidrolasa.

Los compuestos son:

Para $R_1=H$ y $R_2=H$, (1) tolueno, (2) alcohol bencílico, (3) benzaldehído, (4) benzoato, (5) 1,2-dihidroxi-3,5-ciclohexadien-1-carboxilato, (6) catecol, (7) semialdehído del ácido 2-hidroximucónico, (8) 2-hidroxi-2,4-hexadien-1,6-dioato (forma enol del 4-oxalcrotonato), (9) 2-oxo-3-hexen-1,6-dioato (forma ceto del 4-oxalcrotonato), (10) 2-hidroxi-2,4-pentadienoato, (11) 4-hidroxi-2-oxo-pentanoato, (12) acetaldehído, (13) piruvato, (14) acetilcoenzima A.

Para $R_1=CH_3$ y $R_2=H$, (1) *m*-xileno, (2) alcohol 3-metilbencílico, (3) 3-metilbenzaldehído, (4) 3-metilbenzoato, (5) 1,2-dihidroxi-3-metil-3,5-ciclohexadien-1-carboxilato, (6) 3-metilcatecol, (7) 2-hidroxi-6-oxo-2,4-heptadienoato, (10) 2-hidroxi-2,4-pentadienoato, (11) 4-hidroxi-2-oxopentanoato, (12) acetaldehído, (13) piruvato.

Para $R_1=H$ y $R_2=CH_3$, (1) *p*-xileno, (2) alcohol 4-metilbencílico, (3) 4-metilbenzaldehído, (4) 4-metilbenzoato, (5) 1,2-dihidroxi-4-metil-3,5-ciclohexadien-1-carboxilato, (6) 4-metilcatecol, (7) 2-hidroxi-5-metil-6-oxo-2,4-hexadienoato, (8) 2-hidroxi-5-metil-2,4-hexadien-1,6-dioato, (9) 5-metil-2-oxo-3-hexen-1,6-dioato, (10) *cis*-2-hidroxi-2,4-hexadienoato, (11) 4-hidroxi-2-oxohexanoato, (12) propionaldehído, (13) piruvato.

2.2. Organización genética de las rutas catabólicas de pWW0.

El primer mapa físico detallado de pWW0 fue descrito por Downing y Broda en 1979 (Figura I.2). El plásmido tiene un tamaño aproximado de 117 kb, las rutas degradativas de tolueno y otros alquilbenzoatos están codificadas en una región de 40 kb, la cual está localizada en un transposón de 56 kb denominado Tn4651 perteneciente a la familia de Tn3 (Chakrabarty *et al.*, 1978; Meulien *et al.*, 1981; Tsuda e Iino, 1987). Este transposón está a su vez incluido en otro de 70 kb de la misma familia denominado Tn4653 (Tsuda e Iino, 1987). La caracterización genética de estos transposones y de las funciones de transposición

codificadas por éstos la realizaron en detalle Tsuda *et al.* (1989). Además se ha localizado la zona del origen de replicación y la región implicada en las funciones de transferencia (Franklin *et al.*, 1981). Los genes que codifican el pili conjugativo en pWW0 se expresan de forma constitutiva, lo cual podría explicar la alta frecuencia de transferencia que presenta este plásmido desde bacterias donadoras a receptoras. Esta frecuencia oscila entre 10^{-1} y 1 transconjugante por célula receptora en conjugaciones intragenéricas (Ramos-González *et al.*, 1991).

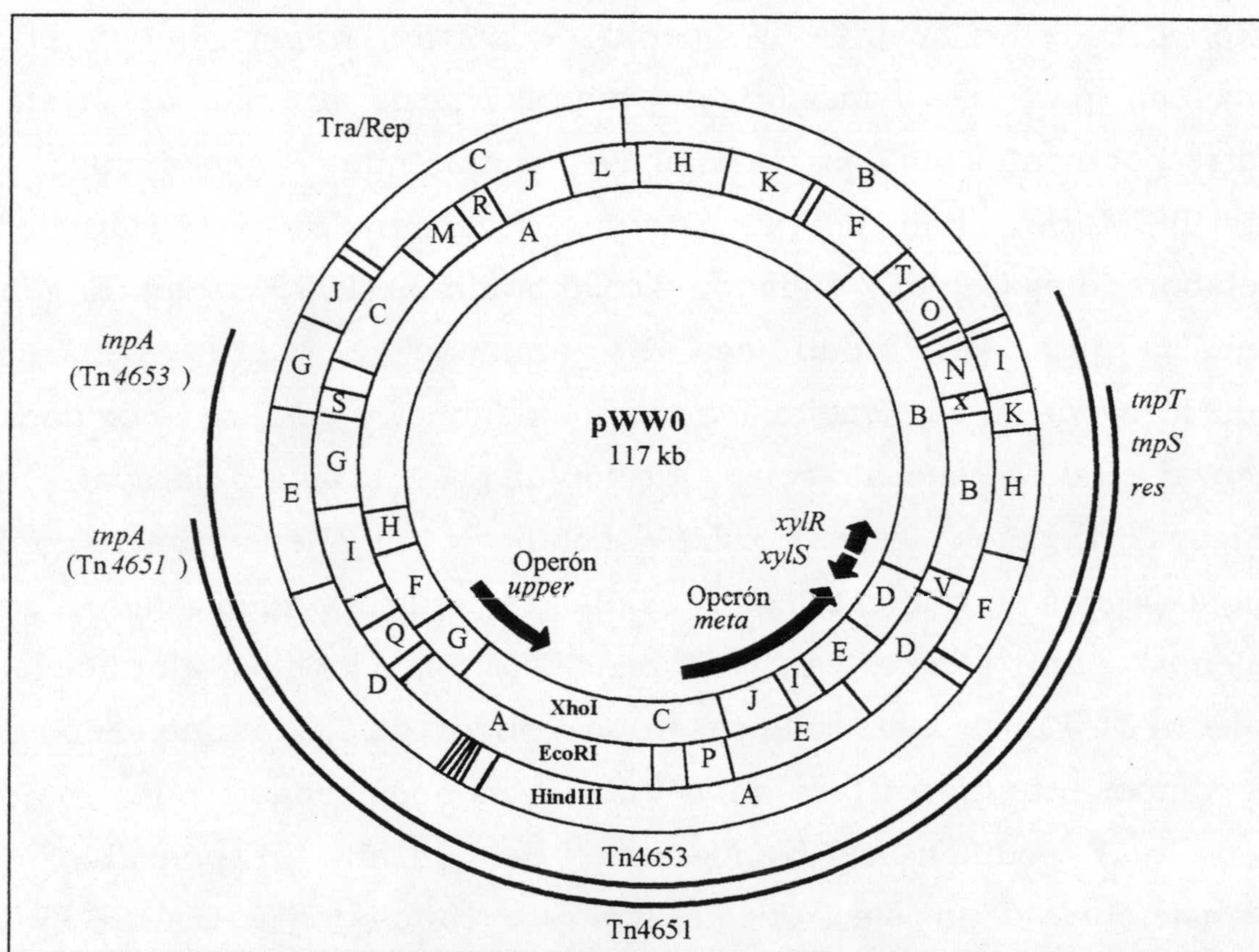


Figura I.2. Esquema del plásmido TOL pWW0 de *P. putida*. Se representan los mapas de restricción del plásmido pWW0 para los enzimas *XhoI*, *EcoRI* y *HindIII*. Los fragmentos se nombran por orden alfabético en orden decreciente de acuerdo con su tamaño. Las flechas indican las regiones que contienen los operones "upper" y "meta", así como los genes reguladores *xylR* y *xylS*, y su sentido indica el sentido de la transcripción. Se muestra la localización de los transposones Tn4651 y Tn4653, así como los genes que codifican las transposasas (*tnpA*) específicas de cada transposón, y resolvasas (*tnpS* y *tnpT*) y el sitio *res* de Tn4651, común para ambos transposones. También se indica la posición de las regiones de transferencia (Tra) y replicación (Rep).

El plásmido TOL pWW0 pertenece al grupo de incompatibilidad P9 y es autotransmisible, aunque su espectro de hospedador está restringido a bacterias del género *Pseudomonas* y a algunas Enterobacteriáceas (Nakazawa, 1978; Ramos-González *et al.*, 1991). La replicación de pWW0 parece ser termosensible, ya que en *P. aeruginosa* el plásmido no se mantuvo a 42°C (Nakazawa, 1978).

El orden y la función de los genes catabólicos en los operones “upper” y *meta* se determinó mediante mutagénesis con transposones, clonación y secuenciación del ADN, así como mediante estudios de expresión de los mismos. El operón de la ruta “upper”, que codifica los enzimas para la oxidación de hidrocarburos aromáticos hasta sus correspondientes ácidos carboxílicos, comprende 7 genes cuyo orden, *xylUWCMABN*, fue definitivamente determinado por Harayama y colaboradores (1989) y Williams y colaboradores (1995, 1996). El gen *xylC* codifica una subunidad de 487 aminoácidos de la benzaldehído deshidrogenasa, este enzima es un homodímero y cataliza la oxidación de benzaldehído a benzoato con reducción de NAD⁺ (Shaw y Harayama, 1990) (Figura 1). Los genes *xylMA* codifican el heterodímero tolueno monooxigenasa, que cataliza la oxidación del grupo metilo del tolueno (o xilenos) para generar alcohol bencílico (o alcoholes alquilbencílicos) (Figura 1). El gen *xylM* codifica un polipéptido de 348 aminoácidos que es el componente hidroxilasa de la tolueno monooxigenasa, mientras que el gen *xylA* codifica el componente del enzima responsable de la transferencia de los electrones al sustrato (Harayama *et al.*, 1986). El gen *xylB* codifica una subunidad de 366 aminoácidos de la alcohol bencílico deshidrogenasa; este enzima es un homodímero que cataliza la oxidación del alcohol bencílico a benzaldehído con la reducción concomitante de NAD⁺ a NADH (Shaw y Harayama, 1990) (Figura 1). Los genes *xylU*, *xylW* y *xylN* codifican proteínas cuyas funciones no son imprescindibles para el crecimiento en tolueno o xilenos. Recientemente se ha puesto de manifiesto que *xylN* codifica una proteína de membrana externa,

probablemente una porina implicada en el transporte de m-xileno y derivados a través de la membrana externa (Kasai *et al.*, 2001).

El operón de la ruta *meta* codifica los enzimas necesarios para la degradación de benzoatos hasta intermediarios del ciclo de Krebs. El orden de los genes, *xyLXYZLTEGFJQKIH*, fue establecido definitivamente por Harayama y Reikik en 1990. Los 13 genes se extienden a lo largo de 11 kb y constituyen uno de los operones más largos en procariotas (Harayama *et al.*, 1984; Marqués *et al.*, 1993). Los genes *xylX*, *xylY* y *xylZ* codifican las tres subunidades de 454, 162 y 336 aminoácidos respectivamente de la toluato 1,2-dioxigenasa, que cataliza la conversión de benzoato a 1,2-dihidroxi-3,5-ciclohexadien-1-carboxilato (Harayama *et al.*, 1986; Subramanian *et al.*, 1981). El gen *xylL* codifica la 1,2-dihidroxi-3,5-ciclohexadien-1-carboxilato deshidrogenasa, de 273 aminoácidos, que cataliza la conversión de 1,2-dihidroxi-3,5-ciclohexadien-1-carboxilato a catecol (Neidle *et al.*, 1992). El gen *xylT* codifica una proteína de 112 aminoácidos necesaria para mantener catalíticamente activa a la catecol 2,3 dioxigenasa y parece ser una ferredoxina similar a la de los cloroplastos (Polissi y Harayama, 1993). El gen *xylE* codifica un polipéptido de 307 aminoácidos que constituye la catecol 2,3 dioxigenasa; la forma activa de este enzima consta de 4 subunidades idénticas y cataliza la conversión de catecol al semialdehído del ácido 2-hidroximucónico, requiriendo hierro no hemínico para su actividad (Nakai *et al.*, 1993a; 1993b). El gen *xylG* codifica la semialdehído 2-hidroximucónico deshidrogenasa, proteína de 487 aminoácidos que cataliza la conversión del semialdehído 2-hidroximucónico a 2-hidroxi-2,4-hexadien-1,6-dioato (Horn *et al.*, 1991). El gen *xylF* codifica una subunidad de 282 aminoácidos de la semialdehído 2-hidroximucónico hidrolasa; este enzima es un homodímero que cataliza la conversión de 2-hidroxi-3-metil-3,5-ciclohexadien-1-carboxilato a 2-hidroxi-2,4-pentadienoato (Duggleby y Williams, 1986; Horn *et al.*, 1991). El gen *xylJ* codifica el polipéptido de 222 aminoácidos 2-hidroxi-2,4-pentadienoato

hidratasa, que cataliza la conversión del 2-hidroxi-2,4-pentadienoato a 4-hidroxi-2-oxo pentanoato (Harayama *et al.*, 1989; Horn *et al.*, 1991). El gen *xylQ* codifica una proteína de 312 aminoácidos que parece ser una acetaldehído deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ y coenzima A (Harayama y Rekik, 1993). El gen *xylK* codifica la 4-hidroxi-2-oxovalerato hidrolasa, enzima de 345 aminoácidos que cataliza la conversión de 4-hidroxi-2-oxo-pentanoato en acetaldehído y piruvato (Harayama y Rekik, 1993). El gen *xylI* codifica el enzima de 264 aminoácidos 4-oxalcrotonato descarboxilasa, que cataliza la conversión de 2-oxo-3-hexen-1,6-dioato en 2-hidroxi-2,4-pentadienoato (Harayama y Rekik, 1993). Por último, el gen *xylH* codifica la 4-oxalcrotonato tautomerasa, este enzima de 264 aminoácidos cataliza la conversión del 2-hidroxi-2,4-hexadien-1,6-dioato en 2-oxo-3-hexen-1,6-dioato (Harayama y Rekik, 1993).

En el extremo 3' del operón *meta* se localizan dos genes reguladores, *xylS* y *xylR*, que se transcriben desde promotores divergentes (Inouye *et al.*, 1987a; Marqués *et al.*, 1994; Ramos *et al.*, 1987) (Figura 2). XylS es una proteína de 321 aminoácidos que pertenece a la familia de reguladores transcripcionales AraC/XylS (Gallegos *et al.*, 1993; 1997; Ramos *et al.*, 1990a; Tobes y Ramos, 2002). XylR es una proteína de 566 aminoácidos que pertenece a la familia de reguladores NtrC/NifA (Morett y Segovia, 1993; North *et al.*, 1993; O'Neill *et al.*, 1998; Pérez-Martín y de Lorenzo, 1997a; Shingler *et al.*, 1993; Shingler y Pavel 1995; Shingler 1996).

3. CONTROL TRANSCRIPCIONAL DE LAS RUTAS CATABÓLICAS DEL PLÁSMIDO TOL pWW0.

3.1. Esquema global de regulación.

El control de los operones catabólicos refleja su organización bioquímica, así, existen dos bucles o circuitos de regulación. Un circuito funciona cuando las células se cultivan en toluatos como fuente de carbono (bucle *meta*) y el otro circuito, más complejo, funciona cuando las células utilizan xilenos como fuente de carbono (bucle "upper" o circuito en cascada) y asegura que tanto la ruta "upper" como la *meta* se expresen de forma coordinada. La figura I.3 muestra el modelo para el control de la expresión de los operones catabólicos del plásmido TOL pWW0.

El circuito *meta* funciona del siguiente modo: cuando las células se cultivan en ausencia de efector (por ejemplo en glucosa o glicerol), el gen *xylS* se expresa a bajo nivel desde un promotor débil de expresión constitutiva dependiente de σ^{70} denominado Ps2, generándose la proteína XylS a baja concentración y de forma inactiva (Gallegos *et al.*, 1996b). Cuando se añade un efector de XylS al medio de cultivo (benzoato o derivados sustituidos del mismo), la proteína XylS inactiva interacciona con el efector y adquiere una conformación activa capaz de estimular la transcripción desde el promotor del operón de la ruta *meta* (Pm). El mantenimiento de altos niveles transcripcionales desde Pm a lo largo de las distintas fases de crecimiento requiere la presencia del factor σ^{32} durante la fase exponencial temprana y la presencia de σ^{38} durante la fase exponencial tardía y fase estacionaria. (Marqués *et al.*, 1995, 1999).

El circuito "upper" o en cascada funciona de la siguiente manera: cuando las células se cultivan en presencia de xilenos, el regulador clave en el control de las rutas catabólicas es la proteína XylR, la cual se transcribe desde dos promotores en tándem dependientes de σ^{70} , proceso

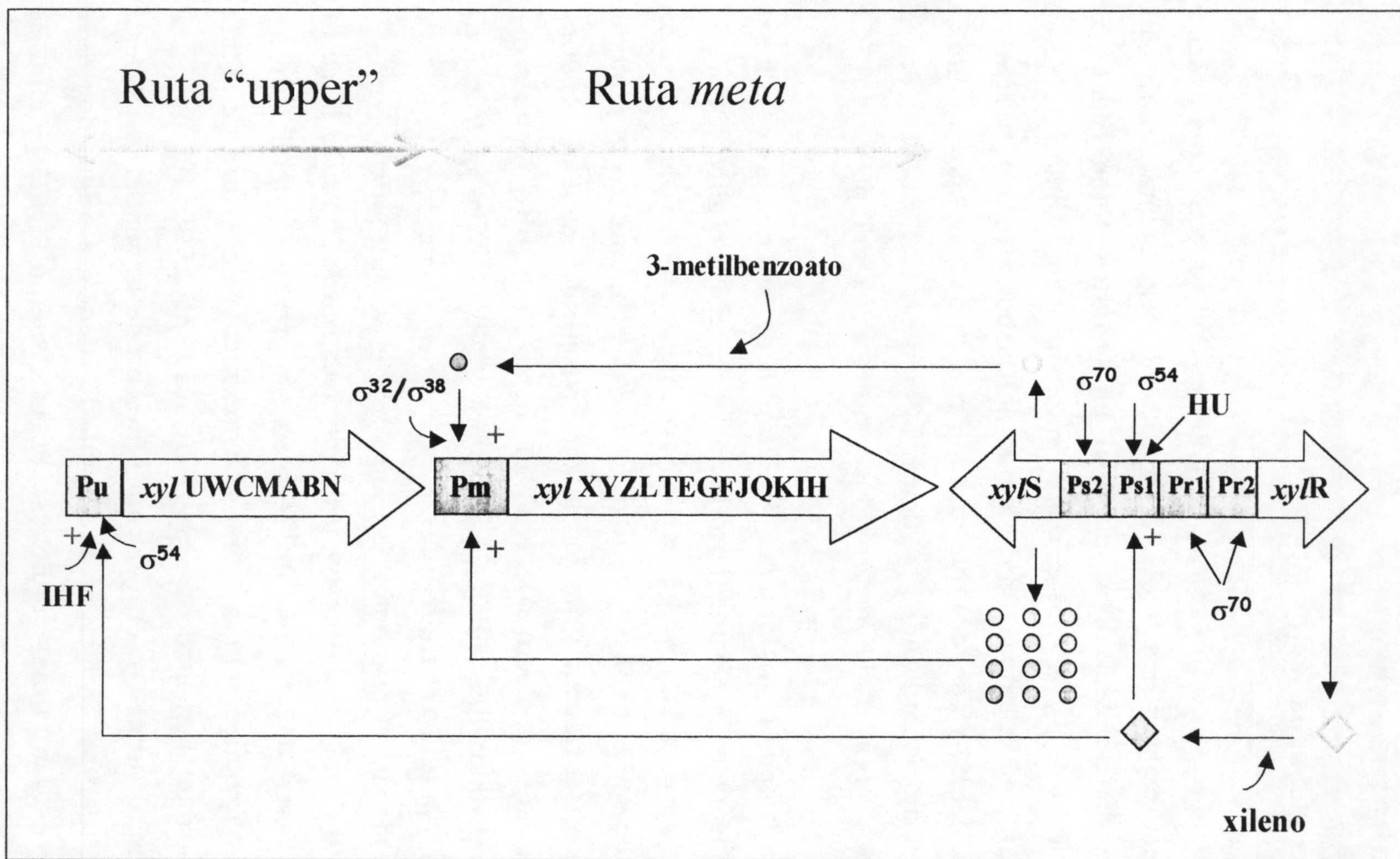


Figura I.3. Modelo de regulación de las rutas degradativas del plásmido TOL pWW0. La activación (+) ejercida por cada proteína sobre los promotores correspondientes se indica mediante flechas. El rombo vacío representa al regulador XylR en su forma inactiva y el rombo sólido representa el regulador XylR activo. El círculo vacío representa a la proteína XylS inactiva mientras que el círculo sólido representa a dicho regulador en su forma activa.

en el que XylR controla su propia síntesis. En la proteína XylR se pueden distinguir 4 dominios funcionales; el dominio carboxilo terminal, denominado dominio D, contiene un motivo α -hélice-giro- α -hélice de unión a ADN; el dominio central C está implicado en interacciones con el factor σ^{54} de la ARN polimerasa y en la hidrólisis de ATP para la formación del complejo abierto de transcripción; el dominio B sirve de nexo entre los dominios C y A. El dominio amino-terminal, denominado dominio A, es el dominio de recepción de señal y está implicado en la interacción con moléculas inductoras (Delgado y Ramos, 1994; Abril *et al.*, 1989, 1991), además, este dominio actúa como un represor intramolecular, inhibiendo la unión a ADN y la actividad ATPasa hasta el momento en que se une el efector (Fernández *et al.*, 1995; Pérez-Martín y de Lorenzo, 1995b, 1996b). Por otro lado, Garmendia y colaboradores (2000) han propuesto que el dominio C puede modificar a distancia la conformación del sitio de reconocimiento de efectores, por lo que puede influir en el perfil de efectores que reconoce la proteína. La proteína XylR se encuentra siempre unida al ADN, y su secuencia diana se encuentra a gran distancia (más de 100 pb) del promotor al que regula, estas secuencias se denominan UAS (secuencias corriente arriba para la activación) (Abril *et al.*, 1991; de Lorenzo *et al.*, 1991; Pérez-Martín y de Lorenzo, 1996a,c y d). La unión de un efector (tolueno o xilenos) al dominio A de XylR elimina la represión intramolecular que ejerce este dominio, posteriormente se produce la unión de ATP que induce un cambio conformacional en XylR que estimula las interacciones proteína-proteína entre las moléculas del activador unidas a las UAS; una vez que el multímero se ha formado, se estimula la actividad ATPasa de modo que la hidrólisis de ATP se acopla con la activación de la polimerasa y se produce la transcripción desde el promotor del operón de la ruta "upper", Pu (Fernández *et al.*, 1995; Pérez-Martín y de Lorenzo, 1996a). En este proceso participa la proteína IHF, que curva el ADN y de esta manera permite el contacto del regulador unido a distancia al ADN con la ARN polimerasa (Abril *et al.*, 1991; de

Lorenzo *et al.*, 1991). Paralelamente, la forma activa de la proteína XylR induce la expresión del gen *xylS* ya que estimula la transcripción desde el promotor Ps1 dependiente de σ^{54} . Este proceso está asistido por la proteína HU, la cual también induce curvatura en el ADN (Pérez-Martín y de Lorenzo, 1995; Bartels *et al.*, 2001). De este modo el gen *xylS* se expresa desde sus dos promotores, Ps2 (constitutivo e independiente de XylR) y Ps1 (dependiente de XylR). La sobreexpresión del gen *xylS* hace que la proteína XylS se hiperproduzca y alcance una alta concentración, en estas condiciones la proteína XylS es capaz de activar la transcripción desde Pm incluso en ausencia de efector (Mermod *et al.*, 1987; Ramos *et al.*, 1987; Spooner *et al.*, 1987).

La expresión de los operones del plásmido TOL está integrada en un control metabólico general en *P. putida*; tanto el promotor Pu del operón de la ruta "upper", como el promotor Ps1 del gen *xylS* están sujetos a un control por represión catabólica (Cases *et al.*, 1996; Duetz *et al.*, 1994; Holtel *et al.*, 1994; Marqués *et al.*, 1994).

3.2. Elementos reguladores de la ruta *meta*.

3.2.1. El promotor Pm.

La región promotora de la ruta *meta* se definió en el año 1984, cuando se determinó mediante mapeo con nucleasa S1 y transcripción reversa el punto de inicio de la transcripción del operón *meta*. En un principio se propusieron dos hipótesis acerca de cómo estaba organizada esta región promotora. En 1984, Mermod y colaboradores propusieron la existencia de dos promotores solapantes, a los que denominaron Pm1 y Pm2, que estaban regulados de forma positiva y coordinada. Ese mismo año, Inouye y colaboradores propusieron la existencia de un único punto de inicio de la transcripción y resaltaron la carencia de homología entre las regiones -10 y -35 de Pm con las secuencias consenso de esas

regiones que se habían propuesto para promotores reconocidos por factores de la familia de σ^{70} . Posteriormente, Marqués y colaboradores en 1993 confirmaron la existencia de un único punto de inicio de la transcripción en Pm mediante un análisis de extensión de cebadores y mapeo con la nucleasa S1, lo cual corroboraba los datos obtenidos por Inouye y colaboradores en 1984. De este modo se confirmó que el operón *meta* se transcribía desde un único promotor denominado Pm.

El estudio en detalle de la activación del promotor Pm comenzó al final de los años 80, al observarse que la inducción de la expresión desde Pm requería alrededor de 85 pb en 5' con respecto al punto de iniciación de la transcripción (Ramos *et al.*, 1987; Spooner *et al.*, 1986). Además, puesto que inserciones y deleciones en la región desde -25 a -30 anulaban la estimulación de la transcripción desde Pm, se dedujo que la ARN polimerasa contactaba en Pm en esa zona (Ramos *et al.*, 1987). Posteriormente, Kessler y colaboradores generaron deleciones y mutaciones puntuales en el promotor y analizaron la transcripción desde esos promotores mutantes mediada por XylS en presencia del inductor 3-metilbenzoato (Kessler *et al.*, 1992; 1993). Los resultados que obtuvieron sugerían que la zona de unión de XylS en el promotor Pm estaba organizada como dos motivos homólogos repetidos en tandem de secuencia 5'-TGCAAPuAAPuPyGGNTA-3', separados por 6 pb y la más cercana al punto de iniciación de la transcripción solapando con la región -35 de unión de la ARN polimerasa. De este modo se propuso como motivo de reconocimiento de XylS las repeticiones directas e imperfectas del motivo, de aproximadamente 36 pb, que incluían tres vueltas y media de hélice del ADN. Posteriormente, Gallegos y colaboradores (1996a) generaron una serie de mutantes en el promotor Pm y analizaron la activación de éstos mediada por la proteína XylS silvestre y algunos mutantes de la misma. De los resultados obtenidos se propuso que XylS reconocía dos motivos de secuencia 5'-T(C/A)CAN₄TGCA-3' que ocupaban las posiciones -67 a -78 y -46 a -57. Además, Kaldalu y colaboradores

realizaron ensayos *in vitro* de protección de Pm por una variante de XylS que porta el epítipo de una hemaglutinina en su extremo N-terminal. Utilizando esta variante de XylS unida a una matriz de sefarosa se observó que XylS se unía al promotor Pm a lo largo de una de las caras del ADN, cubriendo 4 vueltas de hélice (desde -28 a -72) y que realizaba contactos específicos de base con cuatro surcos mayores adyacentes (Kaldalu et al., 1996). Posteriormente, Miura y colaboradores (1998a) demostraron que XylS y la ARN polimerasa se unían en una región compartida del promotor Pm. Finalmente, el análisis mutacional detallado del promotor Pm en la región comprendida entre -41 y -78 permitió redefinir los sitios de unión del regulador XylS como dos motivos directos repetidos en tandem de secuencia 5'-TGCAN₆GGNTA-3', localizados entre las posiciones -70/-56 y -49/-35, de modo que el motivo proximal solapa parcialmente con la región -35 de unión de la ARN polimerasa. (González-Pérez et al., 1999). Dentro de estos motivos, el submotivo proximal TGCA (-49/-46) constituye la región crítica para la activación de la transcripción dependiente de XylS, seguido de la región GCGGATA (-63/-56) y el submotivo distal TGCA (-70/-67) (Figura I.4).

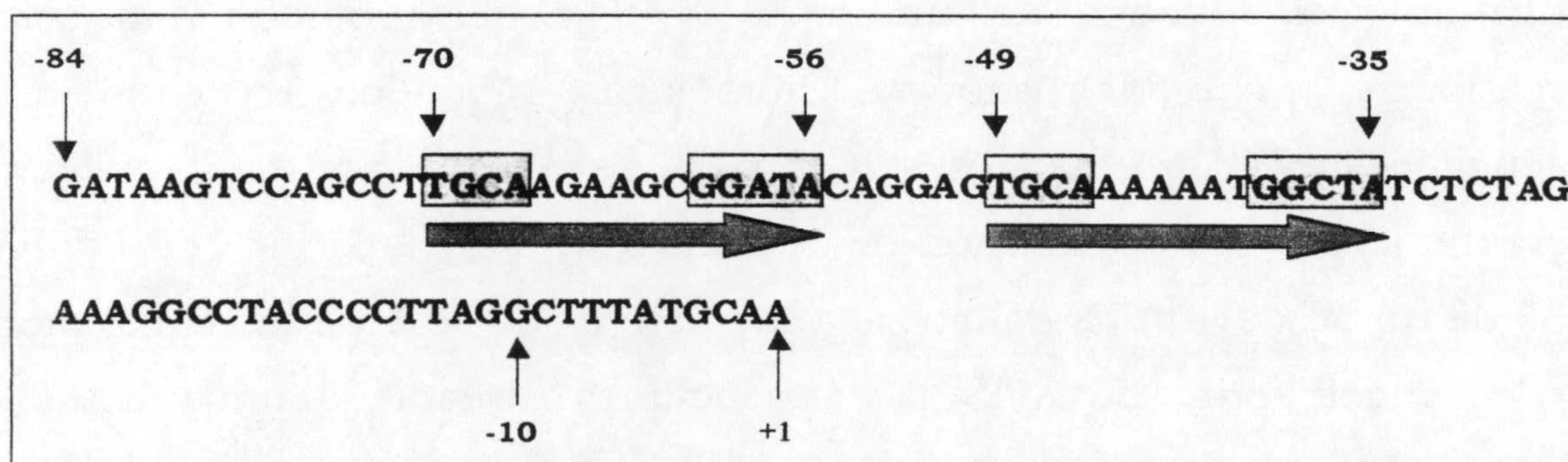


Figura I.4. Motivos de unión de XylS en el promotor Pm. Las flechas verdes muestran los motivos distal y proximal reconocidos por XylS. Las cajas amarillas representan la localización de las posiciones críticas dentro de cada motivo.

El hecho de que los sitios propuestos para la unión de XylS estén solapando con el sitio de unión de la ARN polimerasa sugirió que el regulador podría contactar con ésta (Collado-Vidés *et al.*, 1991; Rhodius *et*

al., 1997). Se ha comprobado que el promotor Pm presenta una curvatura de aproximadamente 41° localizada en una región de 6 adeninas que ocupan las posiciones -41 a -46. La existencia de esta curvatura, aunque no es imprescindible para la activación de Pm dependiente de XylS, si que es necesaria para que se alcancen los niveles máximos de expresión (González-Pérez *et al.*, 2002). La existencia de esta curvatura podría favorecer las interacciones entre XylS y la ARN polimerasa. Se ha observado además que en un fondo de *P. putida* carente de *xylS* se produce una ligera activación de Pm en respuesta a la adición de benzoato. Se ha propuesto que esta activación podría deberse a una regulación cruzada mediada por algún regulador de origen cromosómico, como por ejemplo BenR (Jeffrey *et al.*, 1992; Kessler *et al.*, 1994a). Recientemente se ha secuenciado el gen *benR* y el promotor del operón al que regula, *benABCD* (Cowles *et al.*, 2000) y se ha comprobado que los reguladores XylS y BenR presentan más de un 60% de identidad. Asimismo, en el promotor del gen *benA* se ha localizado un motivo de unión de XylS similar al que se ha propuesto en Pm; este motivo podría ser reconocido por XylS, lo que conduciría a la activación de la transcripción del operón en un fenómeno de regulación cruzada XylS/BenR. Cowles y colaboradores (2000) también han demostrado que BenR puede activar a Pm en presencia o ausencia de benzoato y que XylS activa al promotor *PbenA* en presencia de benzoato.

Inicialmente se consideró que Pm era un promotor dependiente de σ^{70} , a pesar de la escasa similitud que existe con la secuencia consenso típica de un promotor de esta clase, tal como ocurre con otros promotores dependientes de este factor sigma (Collado-Vidés *et al.*, 1991). Sin embargo, al analizar la actividad de Pm en fondos de *E. coli* carentes de σ^{38} se demostró que Pm dependía de este factor transcripcional durante la fase exponencial tardía y la fase estacionaria de crecimiento (Marqués *et al.*, 1995). Además, se ha comprobado que el factor σ^{38} interviene en la

expresión desde Pm durante la fase estacionaria en *P. putida* (Miura *et al.*, 1998b). Posteriormente se analizó la expresión desde Pm a lo largo de la curva de crecimiento en una cepa termosensible de *E. coli* que porta una pequeña delección en el gen *rpoD* que hace que el factor σ^{70} mutante sea inestable a 42°C. Los resultados mostraron que la transcripción desde Pm era independiente del factor σ^{70} . Cuando este ensayo se realizó en una cepa deficiente en RpoH, se pudo comprobar que el factor σ^{32} es el que se requiere para la transcripción desde Pm en la fase exponencial de crecimiento, y se demostró que el aumento en la concentración de σ^{32} necesario para la transcripción en la fase exponencial se obtenía mediante el disparo de la respuesta a choque térmico debido a la presencia del efector 3-metilbenzoato (Marqués *et al.*, 1999).

El promotor Pm puede activarse independientemente de la presencia de efectores mediante la hiperproducción de la proteína XylS (Inouye *et al.*, 1987a y b; Mermoud *et al.*, 1987; Ramos *et al.*, 1987). Para explicar este fenómeno se ha propuesto la existencia de una pequeña concentración del regulador XylS en forma activa sin necesidad de efectores, de modo que al aumentar los niveles de proteína en la célula dicha concentración bastaría para activar la transcripción desde Pm.

3.2.2. El regulador XylS.

La proteína XylS pertenece a la familia de reguladores transcripcionales AraC/XylS (Gallegos *et al.*, 1993; 1997; Ramos *et al.*, 1990a; Tobes y Ramos, 2002). En la mayoría de los miembros de esta familia la región conservada se localiza en el dominio C-terminal, donde se encuentran los motivos de unión a ADN. La purificación y co-cristalización de la proteína reguladora MarA junto con su sitio de unión al promotor *mar* del operón *marRAB* han puesto de manifiesto que esta proteína está constituida por siete α -hélices que forman dos motivos α -hélice-giro- α -

hélice (HTH) que permiten la unión de la proteína a dos surcos mayores adyacentes en el ADN (Rhee *et al.*, 1998) (Figura I.5). La estructura cristalina de Rob, otro miembro de la familia, junto con su diana en el promotor *micF* se ha resuelto recientemente y se ha podido comprobar que los dos motivos HTH de Rob se pueden superponer en la estructura de la proteína MarA (Kwon *et al.*, 2000), lo que sugiere que esta forma de reconocimiento del ADN podría ser común a todos los miembros de la familia de reguladores AraC/XylS.

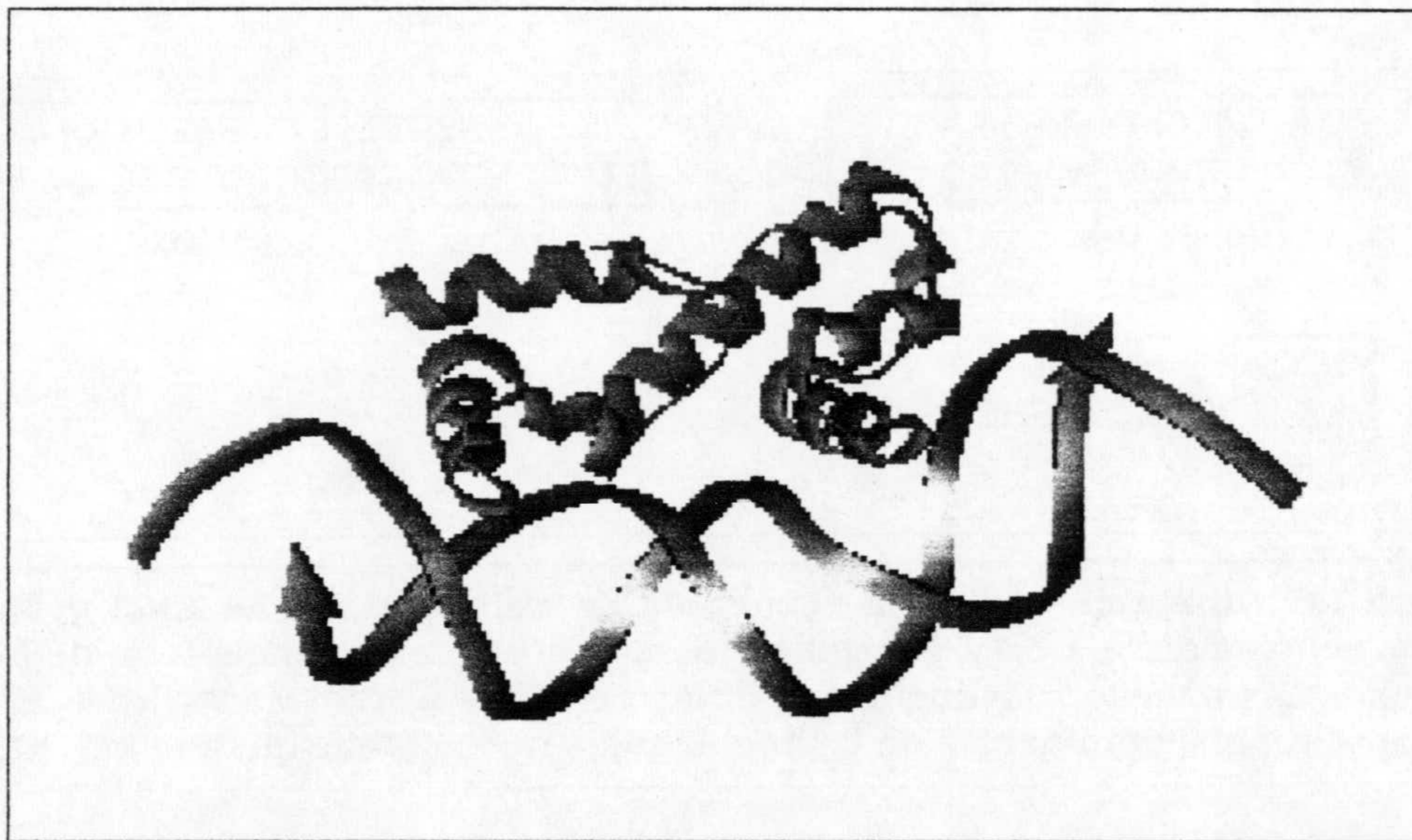


Figura I.5. Estructura tridimensional de la proteína MarA junto con su secuencia diana en el ADN del promotor *mar*. En rojo se representa la proteína MarA y en verde el ADN. Ver detalles en el texto.

La proteína MarA, constituida por 129 aminoácidos, es una de las proteínas de menor tamaño de la familia y se corresponde con el dominio C-terminal de la proteína XylS. El alineamiento de las secuencias de XylS y MarA y análisis predictivos de estructura secundaria han permitido sugerir a Manzanera y colaboradores (2000) que el dominio C-terminal de XylS contiene 7 α -hélices que formarían dos motivos HTH. El motivo HTH-1 estaría formado por α 2 (desde E231 hasta L236) y la hélice de reconocimiento α 3 (desde P241 hasta H252) mientras que el motivo HTH-2

estaría constituido por $\alpha 5$ (desde I282 hasta Y289) y la hélice de reconocimiento $\alpha 6$ (desde L294 hasta F305); los dos motivos HTH estarían conectados por la hélice $\alpha 4$ (desde P256 hasta D274) y flanqueados por las hélices $\alpha 1$ (desde N210 hasta E221) y $\alpha 7$ (desde S310 hasta R314) (Figuras I.6 e I.7).

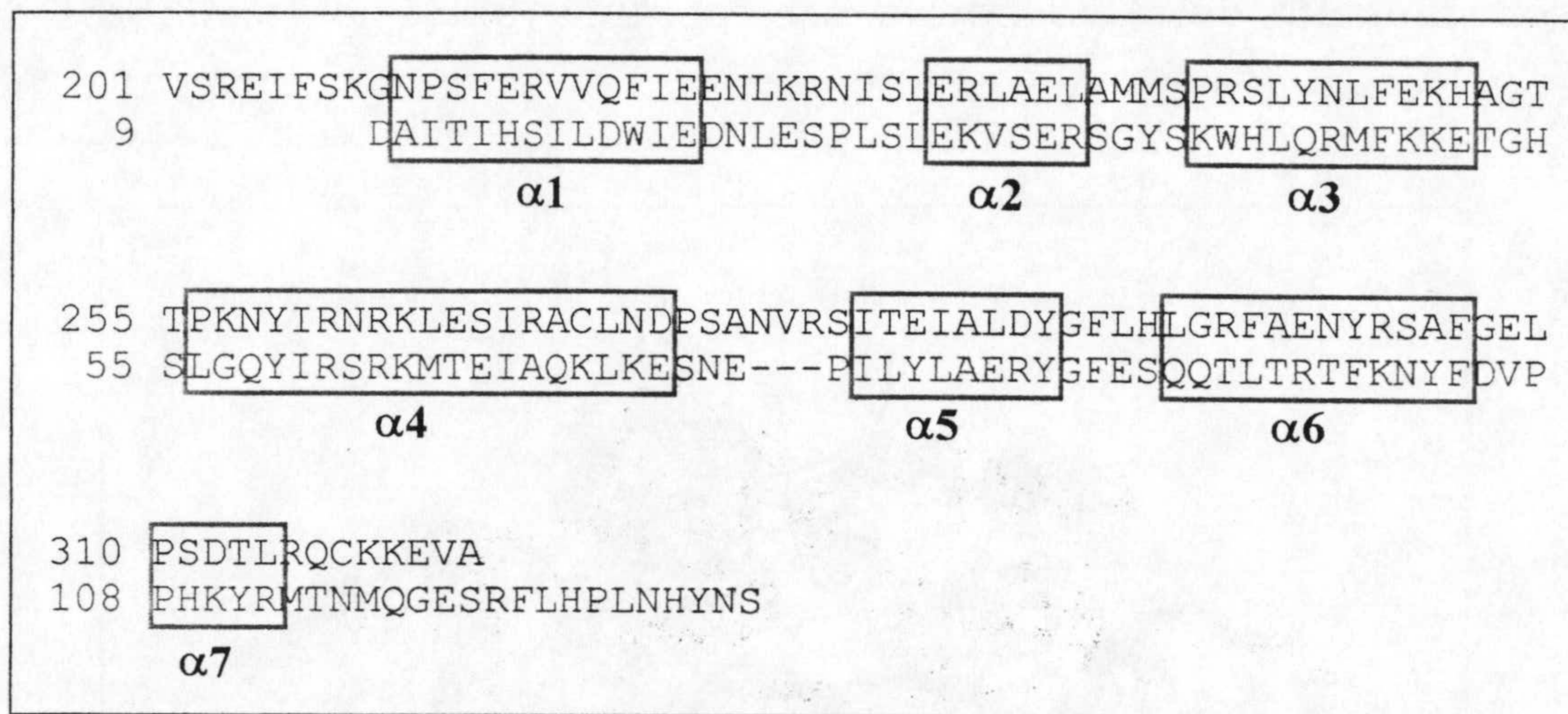


Figura I.6. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de XylS y MarA. La secuencia parcial de XylS se muestra en negro y la secuencia total de MarA en azul. Las α -hélices deducidas tras la cristalización de MarA (Rhee *et al.*, 1998) se representan dentro de los rectángulos rojos. (Manzanera *et al.*, 2000).

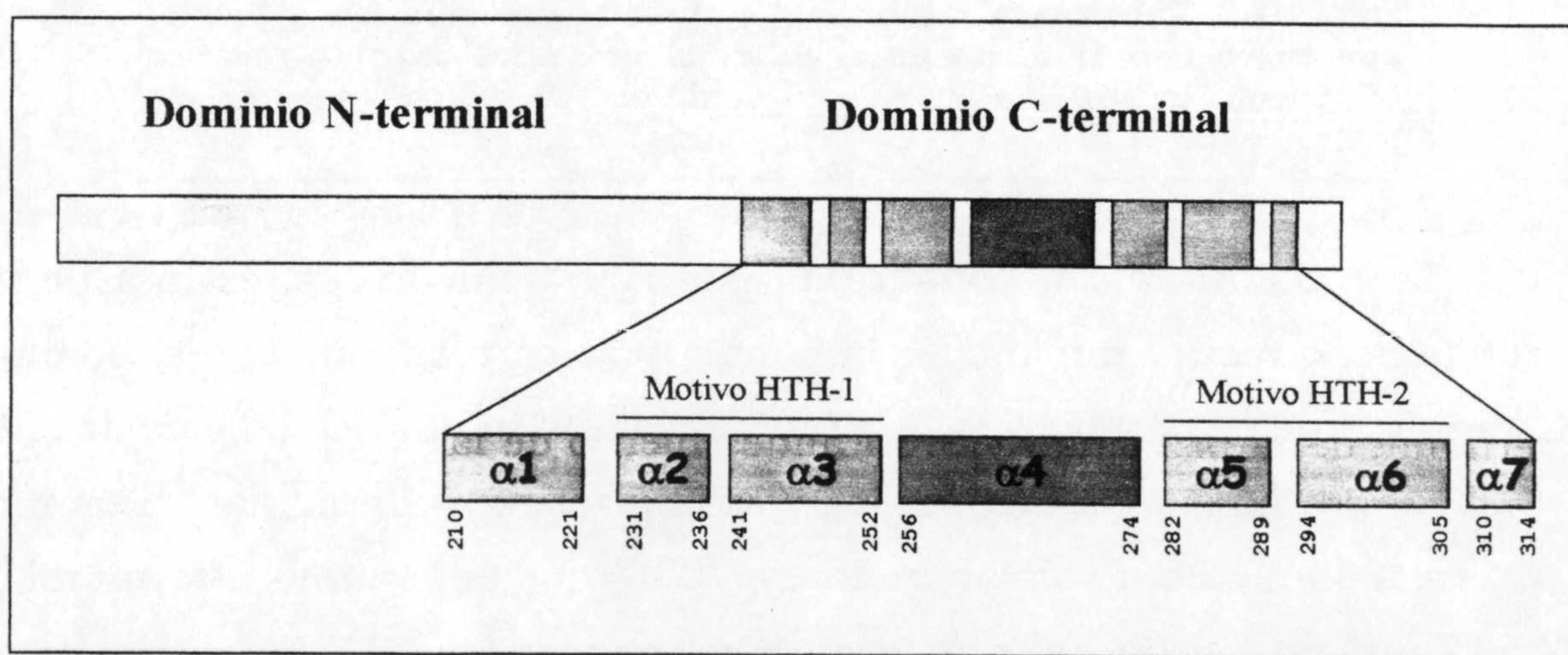


Figura I.7. Representación de la proteína XylS. Se representan las siete α -hélices que constituirían el dominio C-terminal del regulador XylS así como los dos motivos HTH que formarían (en azul) (Manzanera *et al.*, 2000).

En 1996, Gallegos y colaboradores realizaron un alineamiento de la región conservada de todos los miembros de la familia de reguladores AraC/XylS; basándose en este alineamiento propusieron un perfil que definía a los miembros de esta familia. Este alineamiento múltiple reveló la existencia de una serie de residuos altamente conservados, particularmente en las hélices $\alpha 5$ y $\alpha 6$, que constituyen el segundo motivo HTH. Tras la hélice $\alpha 6$ aparece un residuo de Pro en la posición 309 que está conservado en más del 90% de los miembros de la familia. Basándose en esta observación, Manzanera y colaboradores (2000) construyeron mutantes puntuales de XylS en los residuos más conservados y analizaron la capacidad que tenían para estimular la transcripción desde el promotor Pm fusionado al gen '*lacZ*. Dentro de las estructuras en α hélice, los residuos más conservados en la familia corresponden a la Phe297 y Ala286 de XylS, que están localizados en las hélices $\alpha 6$ y $\alpha 5$ respectivamente; la sustitución de estos residuos por otros no polares no dio lugar a un descenso significativo de la actividad, lo que sugería que estos residuos podrían estar implicados en el mantenimiento de las interacciones hidrofóbicas entre estas dos hélices o hélices adyacentes. En la hélice $\alpha 5$, los cambios en los residuos Ile282 e Ile285 fueron bastante permisivos, lo que sugería que la estructura de esta α -hélice no es crucial para la actividad de la proteína. El efecto más fuerte de las mutaciones se observó en residuos conservados que estaban localizados fuera del dominio de unión al ADN. Así, la Gly-290 que se encuentra en el giro entre las hélices $\alpha 5$ y $\alpha 6$ podría intervenir en el mantenimiento de la orientación correcta entre ambas hélices, lo que conduciría a la hélice $\alpha 6$ a establecer contactos adecuados con el ADN. Los resultados obtenidos con el mutante G290A sugerían que la orientación relativa de las hélices $\alpha 5$ y $\alpha 6$ es de vital importancia para la actividad de la proteína. La Pro-309 podría mantener la orientación de la hélice de reconocimiento $\alpha 6$ con respecto a la hélice $\alpha 7$, cualquier cambio en este residuo daba lugar a un regulador totalmente inactivo. Parece que la hélice $\alpha 7$ juega un papel importante en

la actividad de las proteínas de la familia que aún no se conoce. Esta hipótesis está sostenida por el hecho de que la mutación del residuo Leu-313 de XylS, que forma parte de la hélice $\alpha 7$ dio lugar a un regulador inactivo. En resumen, lo que sugieren los resultados de Manzanera y colaboradores (2000) es que la conservación de los residuos en las proteínas de la familia juega un papel importante en el mantenimiento de la estructura de la proteína más que el establecimiento de interacciones específicas con el ADN.

El dominio amino terminal de los miembros de la familia no está conservado y se ha implicado en el reconocimiento del efector y en la dimerización (Brunelle *et al.*, 1987; Eustance *et al.*, 1994; Kaldalu *et al.*, 1999; Lauble *et al.*, 1989; Ramos *et al.*, 1990b; Soisson *et al.*, 1997 y Strey *et al.*, 1999). La interacción de XylS con moléculas efectoras se ha estudiado determinando la expresión mediada por XylS desde el promotor Pm fusionado al gen '*lacZ* en presencia de más de 50 análogos de benzoato. Estos estudios revelaron que la presencia de un grupo carboxílico en el carbono 1 del anillo aromático es esencial para el establecimiento de interacciones productivas entre el efector y el regulador; también se pudo comprobar que muchos benzoatos sustituidos son efectores de XylS, aunque no todas las posiciones en el anillo son equivalentes; así, la posición 3 es la más permisiva, ya que sustituyentes tales como grupos metilo, etilo y átomos de F, Cl, Br y I permiten la activación de XylS. Sin embargo, las posiciones 2 y 4 son más restrictivas, ya que permiten como sustituyentes a grupos metilo y átomos de F y Cl, pero no a grupos etilo ni átomos de Br y I (Ramos *et al.*, 1986). Además, hasta la fecha no se han encontrado benzoatos disustituidos con sustituyentes en los carbonos 5 ó 6 que actúen como efectores de XylS, y puesto que sólo algunos derivados disustituidos en las posiciones 2 y 3 ó 3 y 4 permiten la activación de XylS, se sugirió que las interacciones del regulador con el efector son asimétricas. Se han aislado y caracterizado

una serie de reguladores mutantes que son capaces de reconocer como efectores benzoatos sustituidos que no son reconocidos por la proteína silvestre; estas mutaciones estuvieron localizadas en las posiciones 37-45, 88-92, 151-155 y 288 (Michán *et al.*, 1992a; Ramos *et al.*, 1990b). Estos resultados sugieren que en XylS el sitio de reconocimiento de los efectores podría estar constituido por dos o más segmentos no contiguos en la estructura primaria de la proteína.

El residuo Arg41 parece que es crítico para la interacción con los efectores, ya que cambios en esta posición dieron lugar a mutantes que presentaban cuatro fenotipos distintos, que fueron los siguientes: (a) mutantes con un comportamiento similar al del regulador silvestre (XylSR41S y XylSR41P), (b) mutantes con fenotipo constitutivo o semiconstitutivo, es decir, capaces de estimular la transcripción desde Pm en ausencia de efector (XylR41C), (c) mutantes con perfil de efector alterado (XylSR41G) y (d) mutantes incapaces de responder a benzoatos (XylSR41L) (Michán *et al.*, 1992a).

Aún no se conoce cómo la interacción de XylS con los benzoatos conduce a la activación del regulador y a la estimulación de la transcripción desde Pm. Se ha propuesto que tras la unión del efector se transmite una señal intramolecular desde el extremo amino de la proteína hasta el carboxilo, de modo que XylS se une al ADN e induce la expresión desde Pm (Kaldalu *et al.*, 1996; Michán *et al.*, 1992b; Ramos *et al.*, 1986, 1990b). Otra posibilidad es que la unión del efector favorezca la dimerización de XylS y el dímero sea la forma activa de la proteína (Kessler *et al.*, 1993). Independientemente del mecanismo, los motivos de unión al efector y de unión al ADN no son totalmente independientes, como se demostró por la dominancia intramolecular de mutaciones en el extremo carboxilo terminal sobre mutaciones en el extremo amino terminal y viceversa, en dobles mutantes de XylS construidos *in vitro* (Michán *et al.*, 1992b).

Se han aislado mutantes de XylS tales como XylSP37L, XylSR41C, XylSG44S o XylSH91Y, que parecen ser más estables que el regulador silvestre, capaces de activar la transcripción desde Pm en ausencia de efectores (Michán et al., 1992a); este comportamiento es el que muestra el regulador silvestre cuando se hiperproduce. Estos resultados apoyan la hipótesis de que in vivo existen dos formas de XylS en equilibrio dinámico, una activa y otra inactiva con respecto a la estimulación de la transcripción desde Pm, de modo que el paso de forma inactiva a forma activa estaría mediado por los efectores o por la hiperproducción o estabilización de la proteína.

3.2.3. Los promotores del gen *xylS*.

Aguas arriba del punto de iniciación de la transcripción del gen *xylS* se han definido dos regiones promotoras denominadas Ps1 y Ps2 (Gallegos et al., 1996a y c) (Figura I.8).

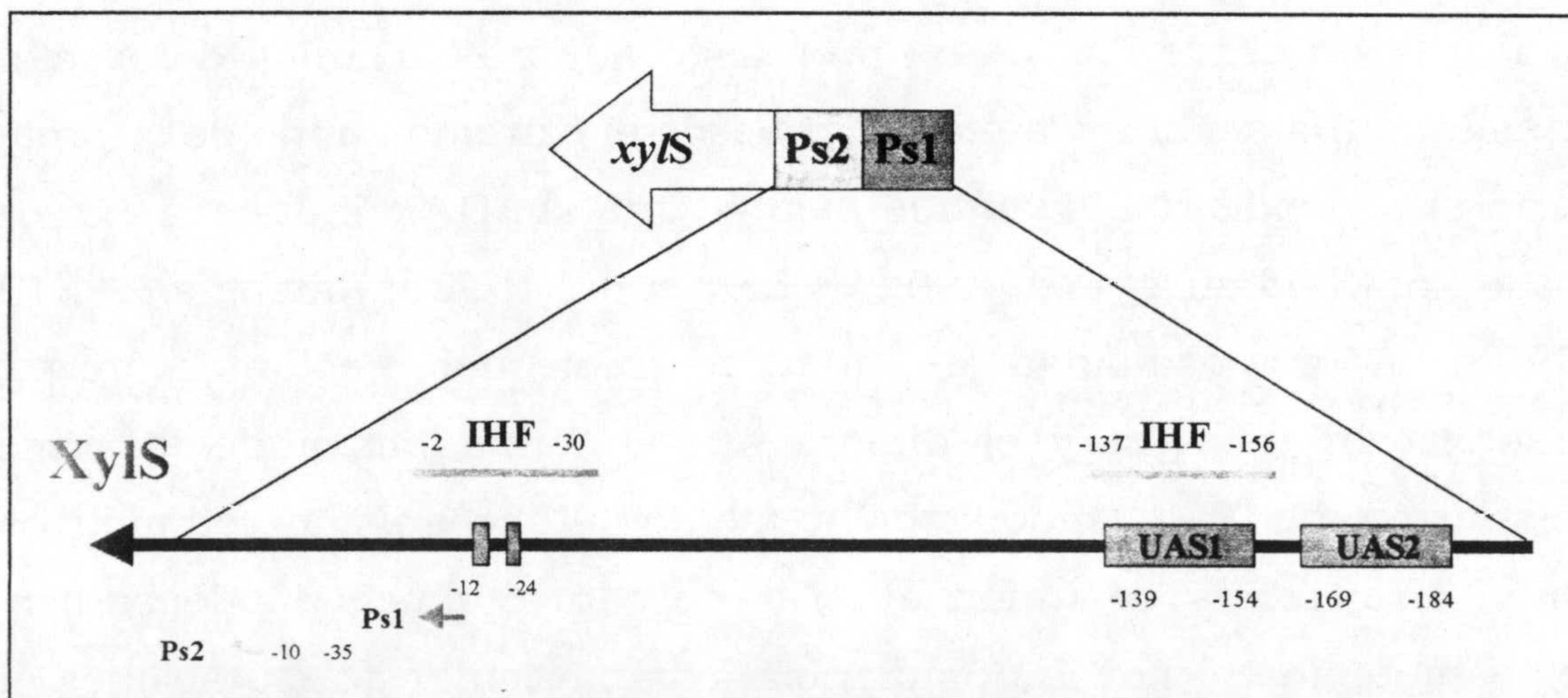
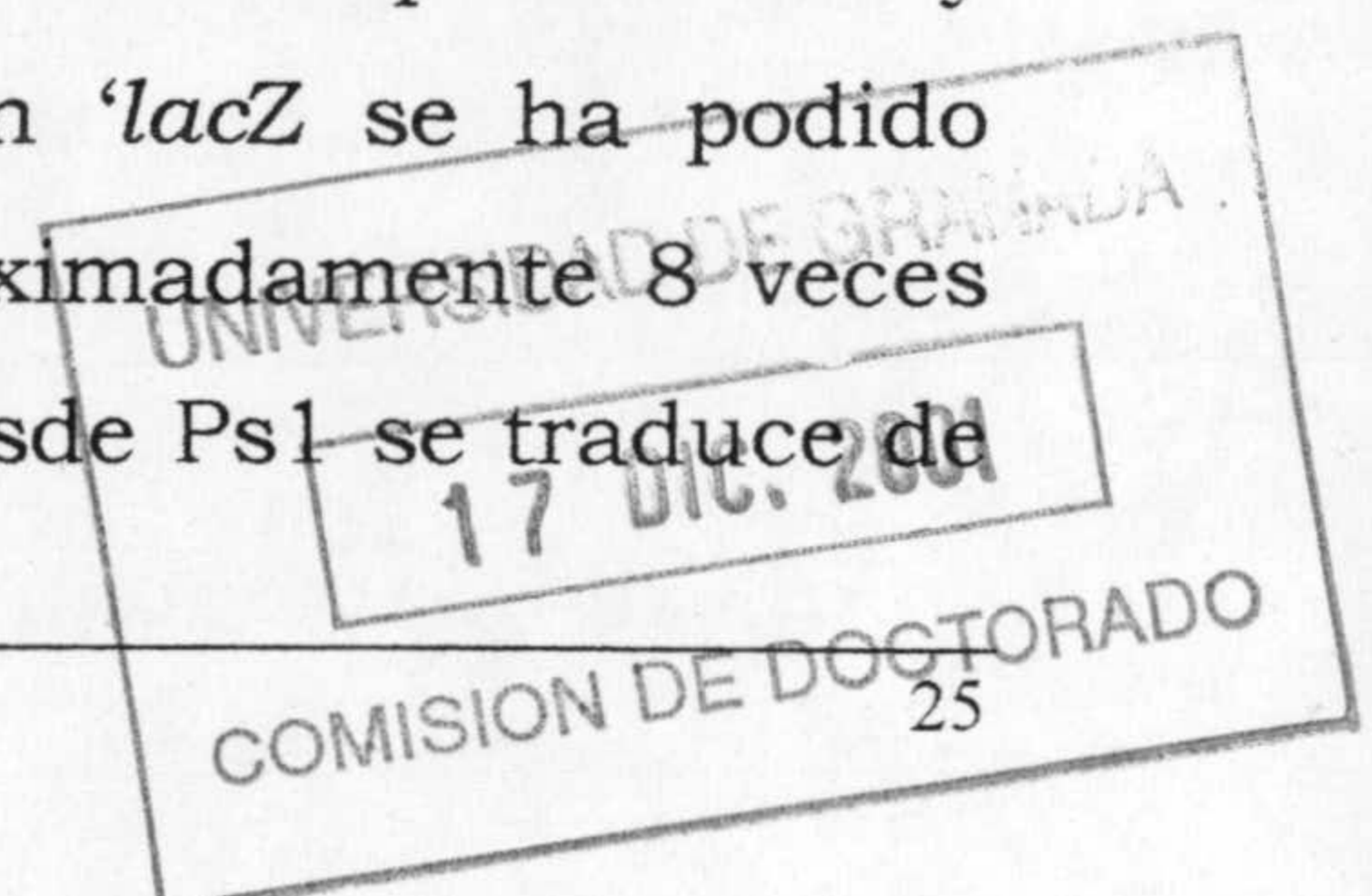


Figura I.8. Estructura de los promotores del gen *xylS*. Las cajas azules de mayor tamaño representan los sitios de unión de XylR en Ps1 (UAS). Las cajas más pequeñas representan las regiones -12 y -24 reconocidas por el factor σ^{54} y las líneas moradas representan los sitios de unión de la proteína IHF. También se muestran las regiones -35 y -10 del promotor Ps2 que es dependiente de σ^{70} .

El promotor Ps2 es un promotor débil de expresión constitutiva dependiente de σ^{70} . Los niveles de expresión desde este promotor no se afectan por la presencia o ausencia de efectores (Gallegos *et al.*, 1996b). El punto de iniciación de la transcripción para este promotor se localiza 9 pb aguas arriba del primer codon (ATG) propuesto para el gen *xylS*. Las secuencias -10 y -35 que muestra este promotor son similares a las secuencias consenso propuestas para el reconocimiento de promotores por el complejo ARN polimerasa/ σ^{70} . El ARN mensajero (ARNm) sintetizado desde Ps2 tiene una región líder de 9 nucleótidos que incluye una posible secuencia de unión al ribosoma (GTGA) propuesta para el ARNm de *xylS* (Spooner *et al.*, 1986). La expresión del gen *xylS* desde este promotor da lugar a una cantidad de proteína XylS que requiere la presencia de un efector para activar la transcripción desde Pm.

El promotor Ps1 es un promotor dependiente de la ARN polimerasa asociada al factor σ^{54} y de la proteína reguladora XylR, cuyas secuencias de unión a este promotor (UAS) se localizan aproximadamente entre las posiciones -139/-154 y -169/-184 (Holtel *et al.*, 1992, Pérez-Martín y de Lorenzo, 1996a, c y d). Ps1 contiene además dos sitios de unión para la proteína IHF localizados entre las posiciones -2/-30 y -137/-156, la cual reprime la expresión del promotor (Marqués *et al.*, 1998) (Figura I.8). El ARNm obtenido desde Ps1 contiene una posible secuencia de unión al ribosoma a 126 pb del extremo 5' que podría facilitar la unión al mismo y permitir una alta eficiencia de traducción. La expresión del gen *xylS* desde este promotor da lugar a una cantidad de proteína XylS que es capaz de activar la transcripción desde Pm independientemente de la presencia de efector.

Mediante la construcción de fusiones transcripcionales y traduccionales de los promotores Ps1 y Ps2 al gen '*lacZ*' se ha podido determinar que el promotor Ps1 se transcribe aproximadamente 8 veces más que el promotor Ps2 y que el ARNm obtenido desde Ps1 se traduce de



una forma mucho más eficaz que el obtenido desde Ps2 (González-Pérez, 2001). Esto explica porqué cuando el gen *xylS* se expresa desde este promotor la proteína XylS no necesita la presencia de efectores para estimular la transcripción desde Pm.

4. LA FAMILIA DE REGULADORES AraC/XylS.

En 1990 se definió por primera vez la familia de proteínas reguladoras AraC/XylS mediante el alineamiento de 8 proteínas implicadas en el metabolismo del carbono de *Escherichia coli* y *Pseudomonas* (Ramos *et al.*, 1990a). La familia se amplió en 1993 hasta 27 miembros usando las secuencias depositadas hasta 1992 en la base de datos SwissProt. El análisis de la función que desempeñaban estas proteínas reveló que éstas estaban implicadas en el control transcripcional de genes y operones implicados en el metabolismo del carbono, patogénesis o respuesta a agentes alquilantes en bacterias (Gallegos *et al.*, 1993). Posteriormente, utilizando el algoritmo de Lüthy (1994), se alinearon los 99 aminoácidos del extremo C-terminal de estas 27 proteínas que era el segmento mejor conservado. En base a este alineamiento Gallegos y colaboradores (1997) obtuvieron una secuencia consenso con la que rastrearon todas las bases de datos de secuencias de ADN y proteínas disponibles hasta ese momento y ampliaron la familia hasta cerca de 100 miembros. El alineamiento de la región homóloga de 99 aminoácidos de las proteínas permitió definir la secuencia consenso para la familia como:

A-----S---L---F---G-----R---A---L-----**(I/V)**--**(I/V)**---G**(F/Y)**-----F---F**(R/K)**---G--P

donde - representa cualquier aminoácido y que se corresponde con las posiciones 234 a 309 de XylS.

Los 17 residuos que se muestran aparecen conservados en más del 50% de las proteínas. Entre estos residuos conservados, la Gly290 y la

Pro309 (en rojo) aparecen en el 90% de las proteínas alineadas. Los residuos Arg264, Leu279 y Phe297 (en azul) se encuentran en el 80% de las proteínas y los residuos Ala234, Ser240 y Ala268 (en verde) se han conservado en el 70% de las proteínas de la familia. En la mayoría de los miembros de la familia, la región conservada se encuentra en el extremo C-terminal del regulador, sin embargo hay casos en los que aparece en el extremo N-terminal (CafR y Rob de *E. coli*) o en el dominio central (Ada de *E. coli* e Ybb de *Bacillus subtilis*). El dominio N-terminal y las regiones centrales no están conservadas, se ha sugerido que intervienen en el reconocimiento de señales químicas y que contienen sitios de unión para moléculas activadoras que confieren especificidad (Caswell *et al.*, 1992; Michán *et al.*, 1992b; Ramos *et al.*, 1990b; Soisson *et al.*, 1997). Actualmente, el número de proteínas que constituyen la familia ha aumentado hasta 277 (Tobes y Ramos, 2002). El alineamiento múltiple de estas proteínas está disponible en la dirección <http://www.arac-xyls.org> y confirma el consenso definido arriba.

Dentro de la familia se pueden diferenciar dos grupos de proteínas, en un grupo, el receptor de la señal se encontraría en la misma cadena polipeptídica que lleva a cabo la función reguladora (por ejemplo, AraC, XylS, RhaR y UreR); en otro grupo la transcripción de la proteína reguladora está controlada por otro regulador, que podría estimular o desreprimir la transcripción dando lugar a la sobreexpresión del miembro de la familia de AraC/XylS, el cual, a su vez, regularía la transcripción desde otro promotor; este es el caso de las proteínas MarA, Rob y TcpN.

Todas las proteínas de la familia son activadores de la transcripción excepto CelD, que actúa como represor (Parker y Hall, 1990) y AraC e YbtA que pueden funcionar como activadores o represores (Fetherston *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1992). Las proteínas pertenecientes a esta familia están implicadas en la regulación tres tipos de procesos:

(i) Respuesta a estrés. Encontramos proteínas que intervienen en la respuesta a agentes alquilantes (Ada), estrés oxidativo (SoxS), tolerancia a antibióticos, disolventes orgánicos y metales pesados (MarA o Rob) y transición desde la fase exponencial de crecimiento a la fase estacionaria (AppY).

(ii) Patogénesis. Algunos miembros de la familia intervienen en la producción de factores de virulencia en infecciones de plantas o mamíferos (UreR). Algunas de estas proteínas se han encontrado en microorganismos que colonizan el tracto gastrointestinal, respiratorio o urinario (VirF, RnS, CfaD, CafR). Estos factores responden a factores ambientales como temperatura, osmolaridad y concentración de Ca^{2+} .

(iii) Metabolismo del carbono. Algunos reguladores de esta familia controlan procesos de degradación de azúcares tales como arabinosa (AraC), celobiosa (CelD), melibiosa (MelR), rafinosa (RafR) o ramnosa (RhaS y RhaR); de ciertos aminoácidos como valina (MnsR), alcoholes (PocR), alquilbenzoatos (XylS) o herbicidas (TchR). Estos reguladores transcripcionales se caracterizan por estar constituidos por unos 300 aminoácidos y porque estimulan la transcripción en respuesta a la presencia de un efector.

En los siguientes apartados se van a describir más detalladamente algunos de los miembros de la familia mejor estudiados que están implicados en esta última función.

4.1. La proteína AraC.

AraC es una proteína de 292 aminoácidos que controla la expresión de los genes implicados en la utilización de L-arabinosa: *araBAD*, que codifican tres enzimas responsables del catabolismo de la L-arabinosa (Englesberg et al., 1962); *araE* y *araFGH* que codifican las proteínas responsables para el transporte de L-arabinosa de baja y alta afinidad

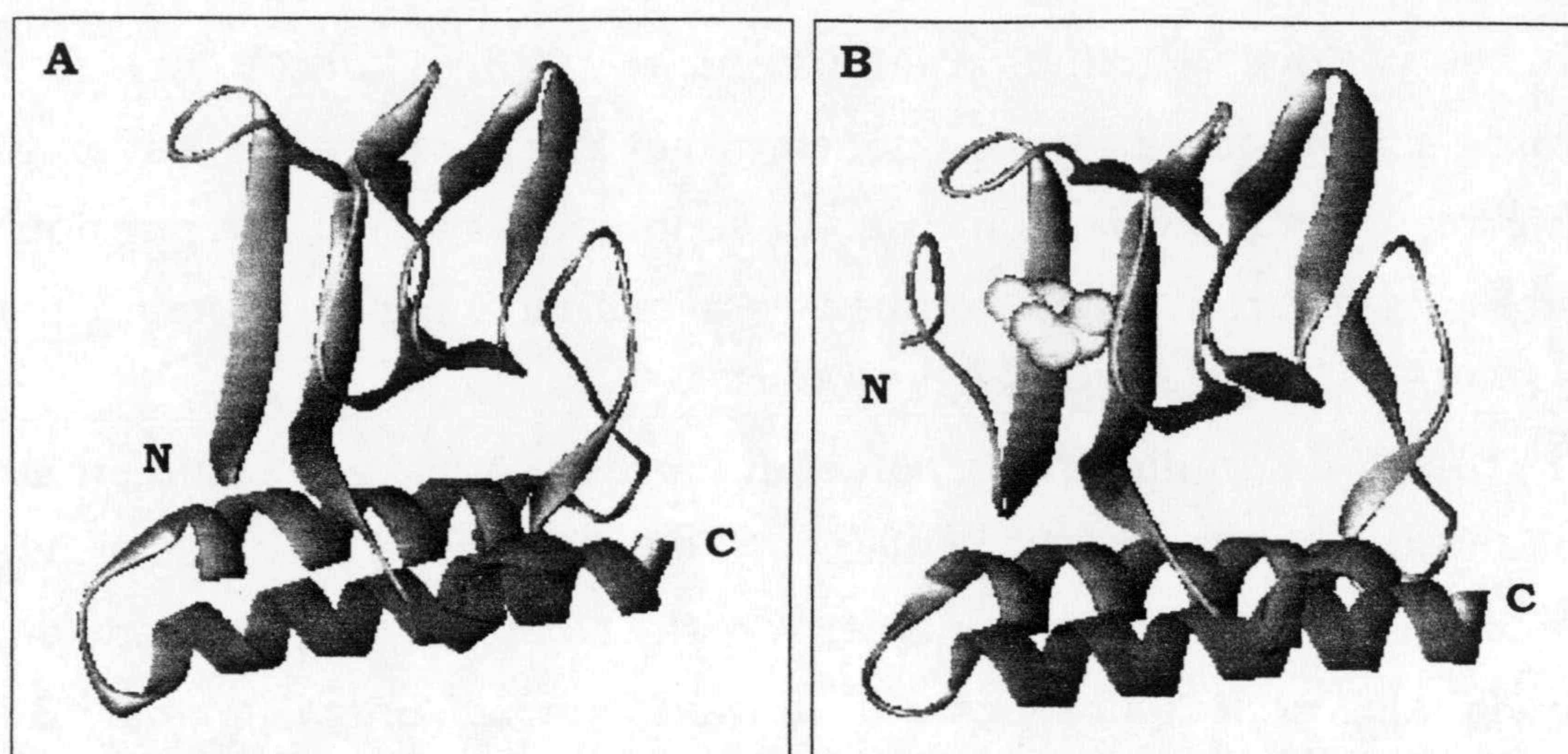


Figura I.9. Estructura tridimensional del dominio N-terminal de la proteína AraC. El panel A muestra la estructura en ausencia de arabinosa y el panel B representa la estructura en presencia de arabinosa donde se puede observar el brazo N-terminal (en verde). Ver más detalles en el texto.

En presencia de arabinosa los dos monómeros están asociados por un enrollamiento antiparalelo que se forma entre la α -hélice terminal de cada monómero. En ausencia de arabinosa, los dos monómeros estarían asociados mediante el barril β de cada uno.

La regulación de los promotores *araBAD* (P_{BAD}) y *araC* (P_C) por la proteína AraC se ha estudiado en detalle. En ausencia de arabinosa, AraC se une mediante uno de sus monómeros al sitio *araI*₁, mientras que el otro monómero ocupa un sitio localizado 210 pb aguas arriba denominado *araO*₂. Esto conlleva la formación de un bucle en el ADN que impide el acceso de la ARN polimerasa (ARNP) a su sitio de unión, de modo que no se transcriben los genes del operón *araBAD* ni el gen *araC* (Carra y Schleif, 1993; Harmer et al., 2001; Lobell y Schleif, 1990) (Figura I.8). La unión de arabinosa en el dominio N-terminal de la proteína AraC provoca un cambio conformacional en ésta que hace que el brazo N-terminal de AraC, que antes estaba asociado al dominio de unión al ADN, se asocie sobre la arabinosa, lo cual favorece la unión de los dos monómeros a dos sitios adyacentes, *araI*₁ y *araI*₂; esto, junto con la ayuda de la proteína

(Brown y Hogg, 1972; Stoner y Schleif, 1983); y *araC*, que codifica la proteína reguladora AraC que controla la expresión de estos genes y autorregula su propia síntesis (Casadaban, 1976). La expresión desde estos cuatro promotores también está regulada por la proteína receptora de cAPM o CRP (Hahn *et al.*, 1984).

AraC es un dímero en solución tanto en presencia como en ausencia de arabinosa (Bustos y Schleif., 1993; Menon y Lee, 1990; Wilcox y Meuris, 1976). Cada monómero está constituido por dos dominios funcionales conectados entre sí a través de un brazo flexible (Bustos y Schleif., 1993; Eustance y Schleif, 1996). El dominio N-terminal (residuos 1 a 170) es responsable de la dimerización y la unión a arabinosa, mientras que el dominio C-terminal (residuos 178 a 292) contiene la región de unión a ADN, en la que se han localizado dos dominios de unión a ADN de tipo HTH (Franklyn y Lee, 1988). El alineamiento de los promotores reconocidos por AraC ha permitido definir una secuencia consenso AGCN₇TCCATA que se conserva en todos los sitios de unión de AraC y se repite en tándem. El sitio de unión de AraC en P_{BAD} solapa en 4 pb con la región -35 del promotor y se ha sugerido que en este promotor el dominio C-terminal de la subunidad α de la ARN polimerasa interacciona con CRP y AraC. El dominio N-terminal de AraC se ha cristalizado en presencia y en ausencia de arabinosa (Soisson *et al.*, 1997) y se ha podido comprobar que la molécula de arabinosa se une a un bolsillo dentro de un barril β . Los residuos 7 a 18 de AraC constituyen un brazo N-terminal que se extiende a través de ese barril y encierra a la molécula de arabinosa dentro del mismo (Figura I.9).

La estructura de este dominio en ausencia de arabinosa es muy similar, aunque presenta algunas diferencias; la más notable es que en ausencia de arabinosa, el brazo N-terminal aparece desordenado y no cubre el bolsillo de unión del azúcar.

CRP provoca la desestabilización del bucle de ADN, por lo tanto, el sitio de unión de la ARN polimerasa queda desbloqueado, activándose la transcripción de los genes catabólicos (Lobell y Schleif, 1990, 1991; Saviola *et al.*, 1998) (Figura I.10).

Recientemente se ha comprobado que la unión de arabinosa no cambia la afinidad de los dominios de unión a ADN por su diana y que AraC regula su unión al ADN casi exclusivamente mediante el cambio de la posición relativa de los dominios de unión al ADN (Harmer *et al.*, 2001).

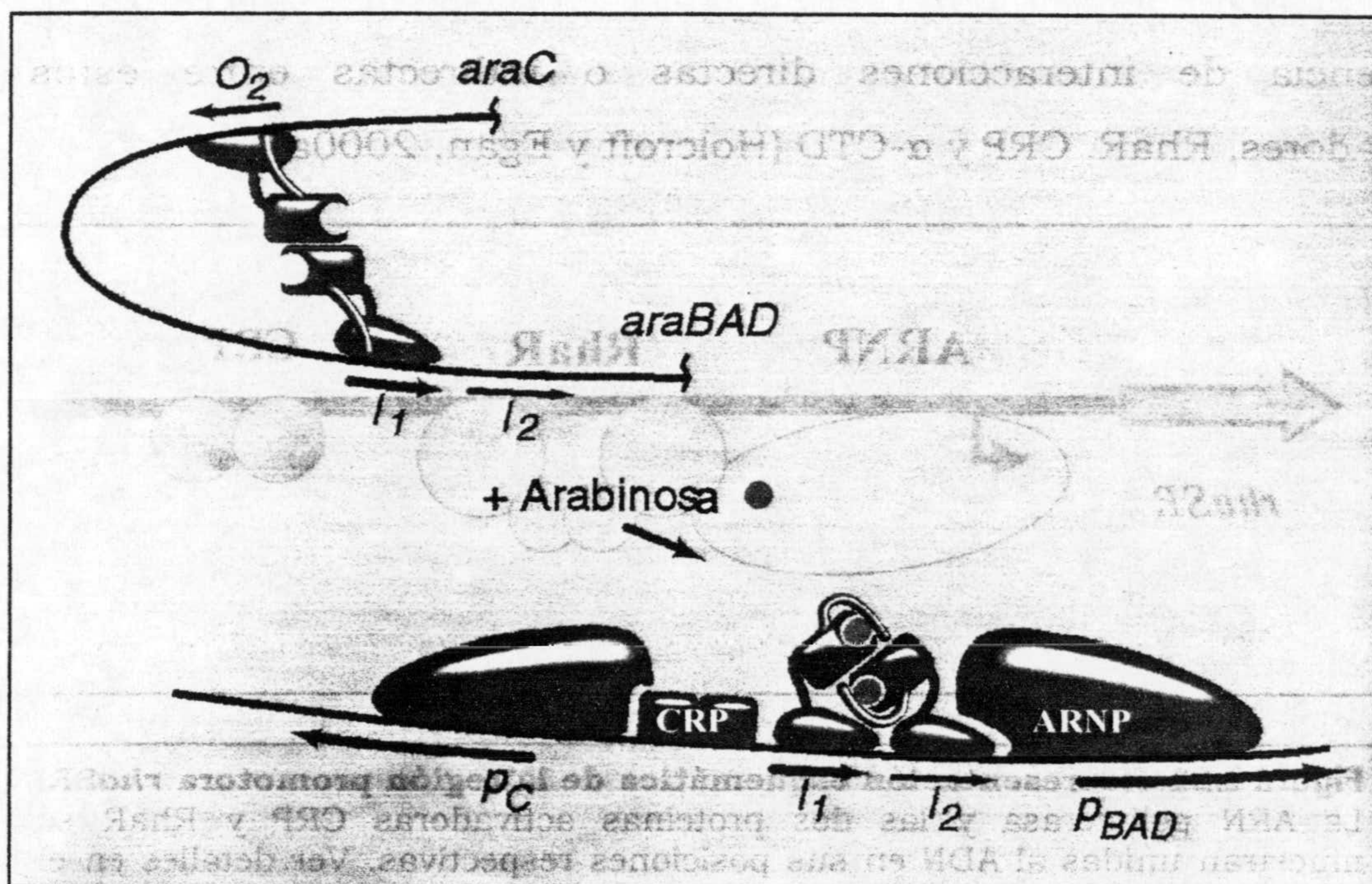


Figura I.10. Modelo de la inducción de AraC por L-arabinosa en el promotor *araBAD*. Las flechas moradas muestran los sitios relevantes. El círculo rosa representa a la L-arabinosa. Ver detalles en el texto.

4.2. La proteína RhaR.

Las proteínas reguladoras RhaR y RhaS están codificadas en el mismo operón *rhaSR* (Tobin y Schleif, 1987).

RhaR es una proteína de 312 aminoácidos que activa la transcripción desde el promotor P_{SR} del operón *rhaSR* en respuesta a la

presencia de L-ramnosa (Tobin y Schleif, 1990a). RhaR es una proteína dimérica, en la que cada monómero contiene dos motivos HTH y contacta con dos surcos mayores del ADN. El dímero de RhaR se une a una repetición invertida que ocupa las posiciones -32 a -82 respecto al punto de iniciación de la transcripción de *rhaSR*, quedando entre ambos sitios de unión 17 pb (Tobin y Schleif, 1990a y b). El sitio de unión de RhaR en P_{SR} solapa con la región -35 de unión de la ARN polimerasa. La expresión máxima del operón *rhaSR* requiere de la proteína CRP y de contactos entre el dominio C-terminal de la subunidad α de la ARN polimerasa (α -CTD) con el ADN del promotor P_{SR} (Figura I.11). Se ha sugerido además la existencia de interacciones directas o indirectas entre estos tres activadores, RhaR, CRP y α -CTD (Holcroft y Egan, 2000a).

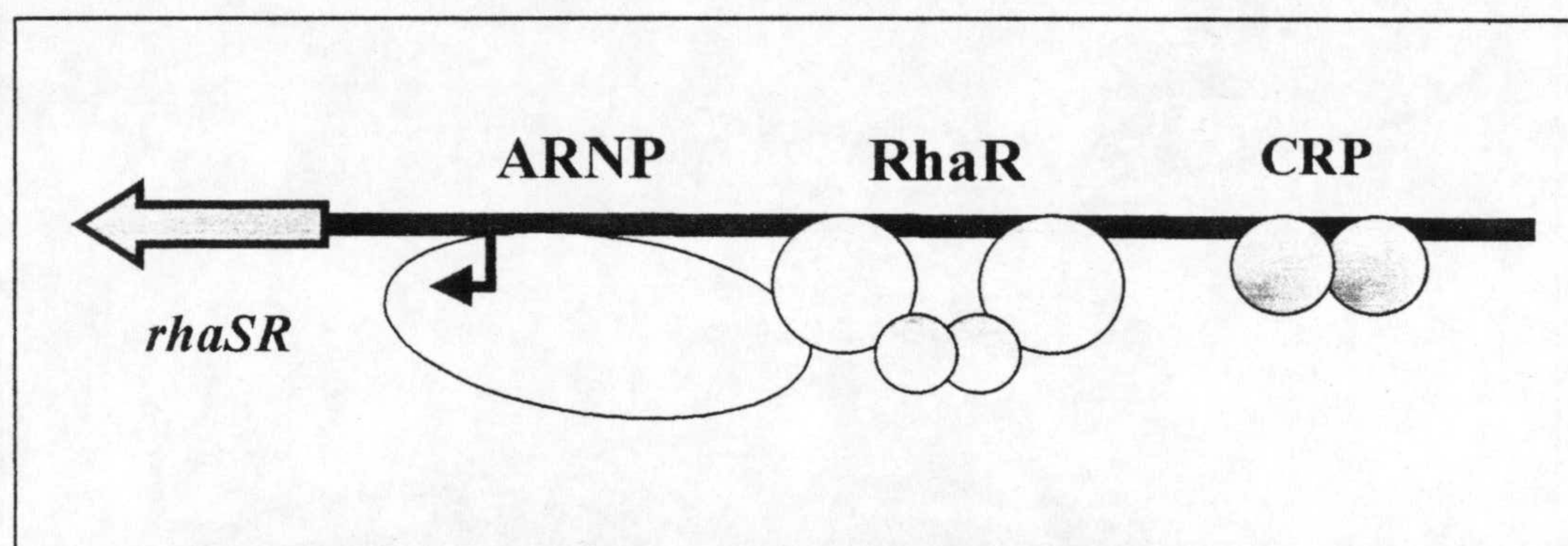


Figura I.11. Representación esquemática de la región promotora *rhaSR*. La ARN polimerasa y las dos proteínas activadoras CRP y RhaR se muestran unidas al ADN en sus posiciones respectivas. Ver detalles en el texto.

4.3. La proteína RhaS.

En respuesta a la presencia de ramnosa, RhaS activa la transcripción del operón *rhaBAD*, que codifica los enzimas necesarios para el catabolismo de la L-ramnosa, y del gen *rhaT* que codifica la proteína transportadora de L-ramnosa; la activación máxima de ambos promotores, P_{BAD} y P_T, requiere de la proteína CRP (Figura I.12) (Egan y Schleif, 1993, 1994; Tobin y Schleif, 1987; Via *et al.*, 1996). En RhaS, el dominio C-

terminal es el responsable de la unión a ADN y en él se han localizado dos motivos HTH (Bhende y Egan, 1999). El sitio de unión a ADN de RhaS (*rhaI*) en el promotor P_{BAD} está localizado en una región que se extiende desde la posición -32 a -81 respecto al punto de iniciación de la transcripción. Este sitio está constituido por dos secuencias repetidas e invertidas (*rhaI*₁ y *rhaI*₂) de 17 pb separadas por 16 pb (Egan y Schleif, 1994). Se ha propuesto que RhaS se une a *rhaI* como un dímero, en el que cada monómero contactaría con un semi-sitio (Bhende y Egan, 1999); además, parece que las funciones de dimerización y unión de L-ramnosa residen en el dominio N-terminal. El sitio de unión de RhaS en los dos promotores solapa con la región -35 de unión de la ARN polimerasa por 4 pb. Se ha sugerido que RhaS establece contactos con σ^{70} en ambos promotores (Bhende y Egan, 2000) y se ha comprobado que α -CTD contribuye a la activación máxima, probablemente mediante interacciones con el ADN y posiblemente con RhaS (Holcroft y Egan, 2000b).

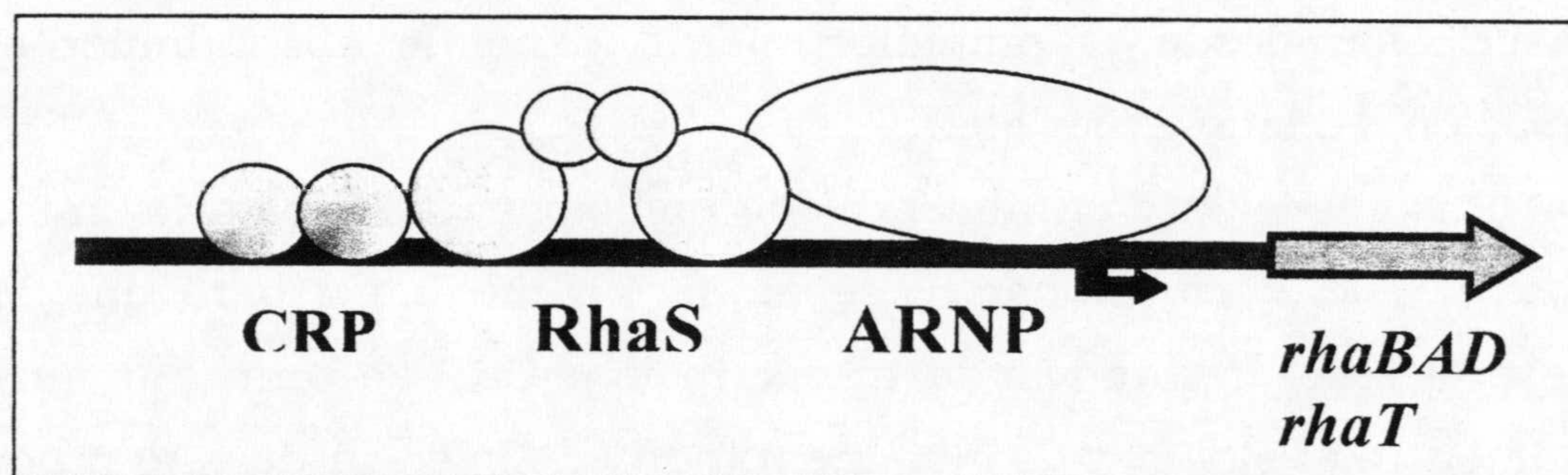


Figura I.12. Representación esquemática de las regiones promotoras *rhaBAD* y *rhaT*. La ARN polimerasa y las dos proteínas activadoras CRP y RhaS se muestran unidas al ADN en sus posiciones respectivas. Ver detalles en el texto.

4.4. La proteína MelR.

El regulador MelR está constituido por 302 aminoácidos y su función es activar la transcripción del operón *melAB*. El gen *melA* codifica una alfa-galactosidasa, mientras que el gen *melB* codifica el transportador

de melibiosa. Ambos genes se co-transcriben desde un promotor simple en respuesta a la presencia de melibiosa en el medio de cultivo (Webster *et al.*, 1987). La iniciación de la transcripción desde el promotor *melAB* depende totalmente de MelR, la cual es totalmente dependiente de melibiosa (Webster *et al.*, 1989). Se ha sugerido que MelR está constituida por dos dominios, un dominio C-terminal de aproximadamente 100 aminoácidos que interviene en la unión al ADN y un dominio N-terminal de unos 200 aminoácidos que parece ser un sensor de melibiosa (Michán *et al.*, 1995). Recientemente se ha comprobado que la proteína CRP interviene en la activación de la transcripción desde el promotor *melAB* y se ha propuesto que MelR se puede unir a cinco sitios diferentes en la región reguladora del operón *mel*; a estos sitios se les ha denominado sitio 1 (centrado en la posición -100.5), sitio 1' (centrado en la posición -120.5), sitio 2 (centrado en la posición -62.5), sitio 2' (centrado en la posición -42.5) y sitio R (centrado en la posición -238.5) (Belyaeva *et al.*, 2000). El modelo que se ha propuesto (Figura I.13) sugiere que la activación de la transcripción desde el promotor *melAB* depende absolutamente de la ocupación del sitio 2' por MelR.

En presencia y en ausencia de melibiosa, MelR estaría unida a los sitios 1', 1 y 2; sin embargo, se requeriría melibiosa para que MelR se uniese al sitio 2' y activar la transcripción; CRP se uniría al hueco que queda entre el sitio 1 y 2, incrementando la eficiencia de este proceso. Se ha supuesto que MelR unida al sitio 2' actuaría como un activador convencional que interacciona con la subunidad σ de la ARN polimerasa unida a la región -35 del promotor. Por lo tanto, parece ser que la melibiosa desencadena un cambio conformacional en MelR que se requiere para la activación.

MelR regula su propia síntesis mediante la formación de un lazo de represión en el ADN; este lazo se formaría por la unión de MelR a los sitios R y 2 en ausencia de melibiosa. En presencia de melibiosa, MelR sufriría

un cambio conformacional que la llevaría a ocupar los sitios 2 y 2' y por lo tanto activaría la transcripción desde el promotor *melAB* (Figura I.14) (Wade *et al.*, 2000).

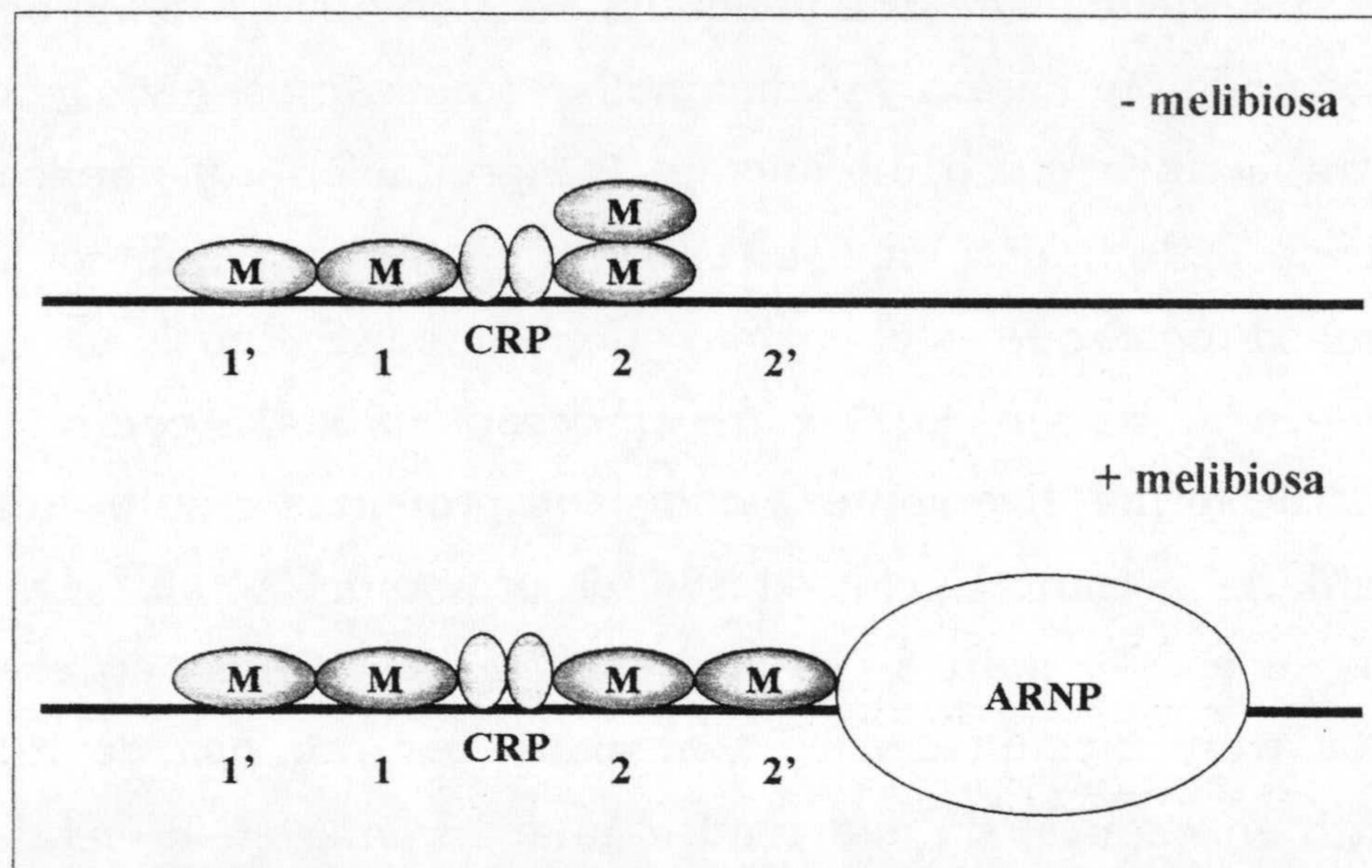


Figura I.13. Modelo para la activación de la transcripción desde el promotor *melAB*. Ver detalles en el texto.

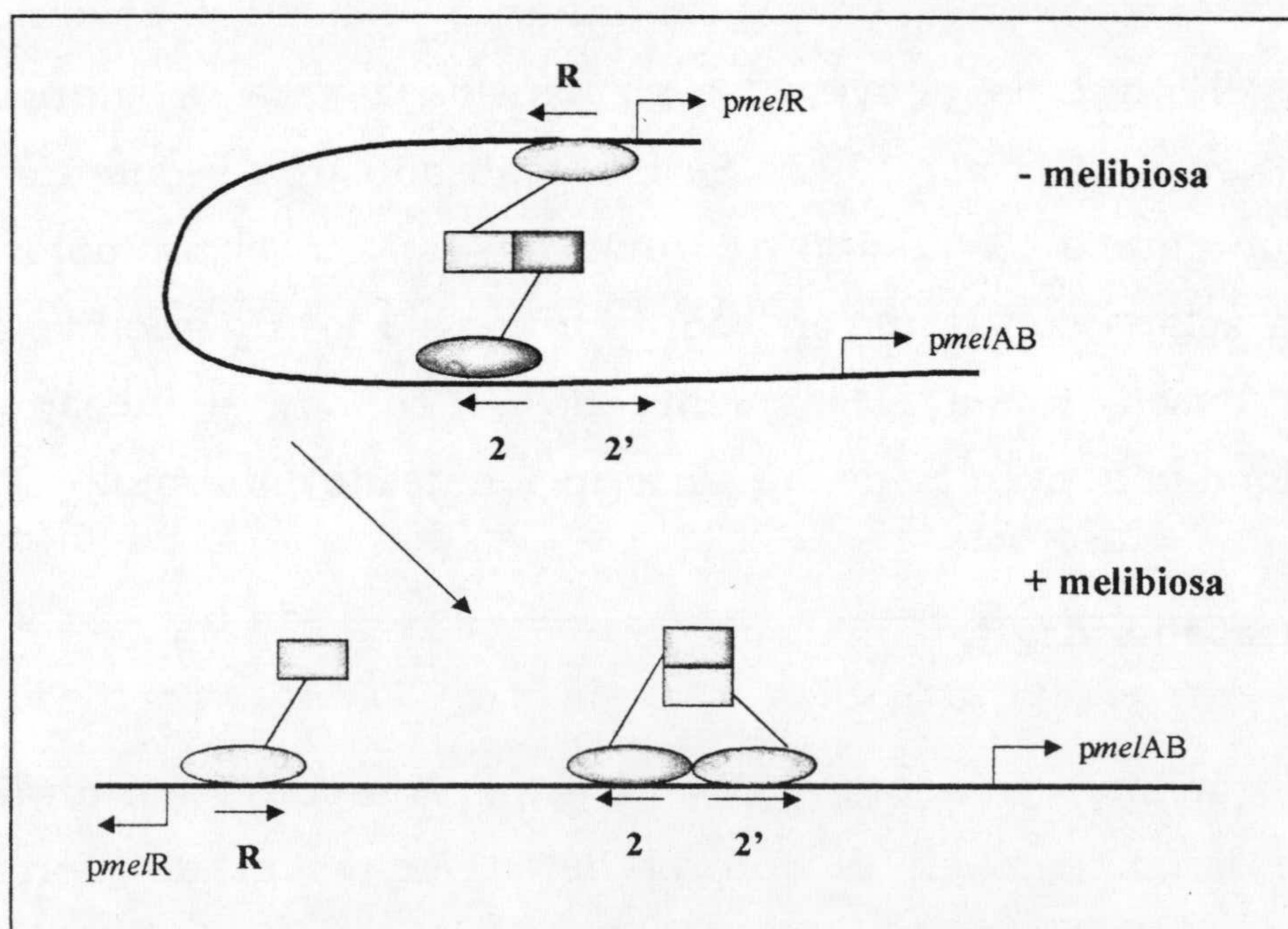


Figura I.14. Modelo de la represión del promotor *melR* dependiente de MelR. Ver detalles en el texto.

4.5. La proteína RafR.

Rosenow y colaboradores (1999) encontraron en el genoma de *Streptococcus pneumoniae* una región de 10.2 kb que contenía ocho genes implicados en la regulación y el metabolismo de rafinosa. Los genes *rafR* y *rafS* se transcriben como un operón; la agrupación *raf* implicada en el metabolismo de rafinosa incluye, entre otros, un gen que codifica la α -galactosidasa (*aga*), que es el enzima que rompe la rafinosa en galactosa y sacarosa; un activador (*rafR*) y un represor (*rafS*). El operón *rafSR* se transcribe de forma divergente a *aga* y las proteínas resultantes, RafR y RafS regulan la transcripción desde el promotor P_A del gen *aga*. La expresión de *aga* se induce por la presencia de rafinosa en el medio de cultivo. La transcripción desde P_A mediada por rafinosa da lugar a un incremento en el nivel de actividad α -galactosidasa en la célula de 500 veces. Se ha comprobado que los niveles de inducción de *aga* dependen de la concentración de rafinosa en el medio. Se ha propuesto que RafR es un activador del promotor P_A, ya que un mutante en este gen sólo incrementó 80 veces el nivel de actividad α -galactosidasa tras la inducción con rafinosa (Rosenow *et al.*, 1999). Se ha localizado una secuencia repetida directa que parece ser el sitio de unión de RafR en el promotor P_A; esta secuencia solapa con la región -35 de unión de la ARN polimerasa en 3 pares de bases. Hasta el momento no se conoce el mecanismo que desencadena la activación de la transcripción desde el promotor P_A.

4.6. La proteína ArgR.

La proteína reguladora ArgR está codificada por el gen *argR*, y juega un papel importante en el control de la expresión de ciertos genes implicados en la biosíntesis y catabolismo de arginina en *Pseudomonas aeruginosa*. Este gen es el último de los seis genes que constituyen el operón *aotJQMOPR*, el cual está implicado en el transporte de arginina y

ornitina (Park *et al.*, 1997). El gen *argR* está localizado aguas arriba del operón *aruCFGDB* y se transcribe en la misma dirección que éste.

La proteína de 328 aminoácidos ArgR es un dímero de 74 kDa formado por dos subunidades idénticas de 37 kDa cada una (Park *et al.*, 1997). Esta proteína actúa como activador y represor, ya que activa a los operones *aot* y *aru*, así como al gen *gdhB* y reprime los operones biosintéticos *car* y *argF* que codifican la carbamoilfosfato sintetasa y la ornitina carbamoil transferasa respectivamente (Park *et al.*, 1997). El operón *aot* codifica los componentes de un sistema de transporte de ornitina y arginina y se induce fuertemente por arginina, efecto que está mediado por la proteína ArgR. Este operón se transcribe desde dos promotores, P1 y P2, y se ha comprobado que ArgR se une y participa en el control de ambos (Nishijyo *et al.*, 1998). ArgR induce también la expresión del operón *aru* que codifica los enzimas de la ruta de la arginina succinil transferasa, que se considera la ruta principal para el catabolismo de arginina y ornitina bajo condiciones aeróbicas en *Pseudomonas aeruginosa* (Itoh, 1997). Por último, se ha comprobado recientemente que el gen *gdhB*, que codifica una glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD⁺, se expresa desde un promotor inducible por arginina, de modo que esta inducción requiere la presencia de la proteína ArgR (Lu y Abdelal, 2001).

El alineamiento de los sitios de unión de la proteína ArgR reveló que el sitio de unión de ArgR ocupa una región de aproximadamente 44 pb y que está constituido por dos secuencias repetidas directas (Park *et al.*, 1997). En el caso del operón *aru* y del gen *gdhB*, se han encontrado dos sitios de unión para ArgR, de modo que el sitio de unión proximal solapa con la región -35 de unión de la ARN polimerasa (Lu y Abdelal, 2001; Park *et al.*, 1997). En los operones *car* y *argF*, el único sitio de unión de ArgR solapa completamente con la región promotora de ambos, lo que indica que ArgR ejerce su control negativo en la expresión de estos operones mediante impedimentos estéricos (En el caso del operón *aot*, se ha

encontrado un solo sitio de unión de ArgR que solapa con la región -35 del promotor P2 y con la región -10 del promotor P1, por lo que se ha sugerido que ArgR actúa como represor del promotor P1 (Nishijyo *et al.*, 1998).

En resumen, los miembros de la familia de AraC/XylS que controlan la utilización de diversos compuestos como fuente de carbono, reconocen a los sustratos de la ruta como efectores. La unión de estos efectores conduce a una forma del regulador que es activa desde el punto de vista transcripcional.

Objetivos

En base a lo expuesto en la Introducción, al comienzo de esta Tesis Doctoral, quedaban pendientes de aclaración algunas cuestiones acerca de cómo se produce la interacción entre la proteína reguladora XylS con sus efectores y sobre el mecanismo de activación de la transcripción desde el promotor Pm. Por ello, al inicio de este trabajo se propuso abordar los siguientes objetivos:

1. Búsqueda de residuos críticos para la interacción de XylS con sus efectores y su incidencia en la maquinaria transcripcional que expresa el promotor Pm de la ruta *meta* del plásmido TOL pWW0.
2. Estudio del papel de la subunidad alfa de la ARN polimerasa en la activación del promotor Pm.
3. Purificación del dominio amino-terminal de XylS.

Materialles y Métodos

1. CEPAS BACTERIANAS

Las estirpes bacterianas utilizadas en este trabajo, junto con su genotipo o sus características fenotípicas más relevantes, se recogen en la Tabla M1.

Tabla M1. Estirpes bacterianas utilizadas en este trabajo.

Estirpe	Genotipo/fenotipo	Referencia o Fuente
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17</i> (<i>r_k⁻m_k⁺</i>) <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> (Nal ^R) <i>thi-1</i> <i>relA1</i>	Hanahan (1983)
JM109	<i>recA1</i> <i>supE44</i> <i>endA1</i> <i>hsdR17</i> (<i>r_k⁻m_k⁺</i>) <i>gyrA96</i> (Nal ^R) <i>relA1</i> <i>thi</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) F'[<i>traD36</i> <i>proAB</i> ⁺ <i>lac^k</i> <i>lac Z</i> Δ M15]	Yanisch-Perron <i>et al.</i> (1985)
MC4100	F- <i>araD139</i> Δ (<i>argF-lac</i>)U169 <i>rpsL150</i> (Str ^R) <i>relA1</i> <i>flbB5301</i> <i>deoC1</i> <i>ptsF25</i> <i>rbsR</i>	Lange y Hengge-Aronis (1991)
KY1429	MC4100 <i>rpoH6</i> (Am) <i>zhf-50::Tn10</i>	Zhou <i>et al.</i> (1988)
RH90	MC4100 <i>rpoS59::Tn10</i>	Lange y Hengge-Aronis (1991)
P90A5c	<i>thi</i> <i>lacZ4</i> <i>argG75</i>	Harris <i>et al.</i> (1978)
UQ285	P90A5c <i>rpoD285</i>	Harris <i>et al.</i> (1978)
EEZ286	UQ285 <i>rpoS59::Tn10</i>	Este trabajo

2. CONSERVACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS

La conservación de cepas a corto plazo se hizo en cultivos en estría sobre placas de medios selectivos a 4°C. La conservación a largo plazo se hizo por congelación a -20°C y -80°C de cultivos líquidos mezclados en proporción 1:1 con glicerol al 80% (v/v).

3. MEDIOS DE CULTIVO

La composición de los medios de cultivo utilizados en este trabajo se detalla a continuación. Todos los medios y soluciones se esterilizaron en autoclave por calor húmedo a 120°C y 1 atmósfera de presión, o por filtración a través de filtros estériles de acetato de celulosa de 0,22 μm de diámetro de poro.

3.1 Medios ricos

Como medio habitual de crecimiento se utilizó el medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989), cuya composición fue la siguiente: bacto-triptona, 10 g; extracto de levadura, 5 g; NaCl, 10 g y H₂O hasta 1 litro.

Para la preparación de medio sólido LB se añadió bacto-agar (Difco, ref. 0140-01) a una concentración final de 1,5% (p/v) y se esterilizó mediante autoclave.

3.2. Medios mínimos

Para el cultivo de células en medio mínimo se utilizó una modificación del medio M9 (Sambrook *et al.*, 1989), cuya composición fue la siguiente: solución 10xM9, 100 ml; solución A9 ("goodies"), 2,5 ml; MgSO₄ 1M, 1 ml; citrato férrico amónico 6 ‰ (p/v), 1 ml y H₂O hasta 1 litro. Las soluciones empleadas en este medio se prepararon y esterilizaron por separado en el autoclave.

La composición de la solución 10xM9 fue: Na₂HPO₄ x 7 H₂O, 70 g; KH₂PO₄, 30 g; NH₄Cl, 10 g; NaCl, 5 g y H₂O hasta 1 litro.

La solución A9 se compuso de: HBO₃, 300 mg; ZnCl₂, 50 mg; MnCl₂ x 4 H₂O, 30 mg; CoCl₂, 200 mg; CuCl₂ x 2 H₂O, 10 mg; NiCl₂ x 6 H₂O, 20 mg; NaMO₄ x 2 H₂O, 30 mg y H₂O hasta 1 litro.

Para el cultivo de cepas de *E. coli* se utilizó como fuente de carbono glucosa a una concentración final de 0,5% (p/v). La glucosa se preparó como solución madre al 20% (p/v), se esterilizó mediante autoclave y se almacenó a 4°C. Los cultivos en medio mínimo se suplementaron con tiamina a una concentración final de 0,05mM a partir de una solución madre 200 veces concentrada y esterilizada por filtración

Para el cultivo de cepas de *P. putida* se utilizó 3-metilbenzoato como única fuente de carbono, éste se preparó como solución madre a concentración 0,5M y pH 7,0, se esterilizó mediante autoclave, se almacenó a temperatura ambiente y se utilizó a una concentración final de 5mM.

Para la preparación de medio mínimo sólido se añadió bacto-agar a una concentración final del 2% (p/v). El bacto-agar se esterilizó previamente mediante autoclave en soluciones en H₂O a una concentración de 2,25% (p/v).

3.3. Antibióticos

Las soluciones de antibióticos se prepararon 1.000 veces concentradas en H₂O destilada, excepto el cloramfenicol que se preparó en etanol absoluto, y la rifampicina y la tetraciclina que se disolvieron en metanol. Las soluciones preparadas en H₂O se esterilizaron por filtración y se almacenaron a -20°C. Los antibióticos se utilizaron a las concentraciones finales indicadas en µg/ml: ácido nalidíxico (Nal), 10; ampicilina (Ap), 100; cloramfenicol (Cm), 30; estreptomina (Sm), 50; kanamicina (Km), 25 y tetraciclina (Tc), 20.

3.4. Condiciones de cultivo

Las cepas de *E. coli* se cultivaron a 30 ó 37°C. Los cultivos líquidos en matraz se incubaron con una agitación de 200 rpm en un incubador orbital Adolf Kühner ISF-4-V, y en líquido en un rotatubos modelo EYELA Biospin-MBS1.

4. PLÁSMIDOS

La Tabla M2 muestra los plásmidos utilizados en este trabajo junto con sus características más relevantes. Los plásmidos de nueva construcción se describirán detalladamente en los apartados correspondientes de la sección Resultados. A continuación se describen con más detalle las características de los plásmidos mencionados en dicha tabla.

Tabla M2. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Características	Referencia/Fuente
pCMX2	pSELECT-1, <i>xylS</i> _{XhoI} , ori f1, ColE1, Tc ^r	Manzanera <i>et al.</i> , 2000
pERD100	pMP220, Pm::' <i>lacZ</i> , IncP1, Tc ^r	Ramos <i>et al.</i> , 1990a
pGEX-4T-1	Ptac, <i>lacI</i> ^q , <i>gst</i> , Trombina, ColE1, Ap ^r	Pharmacia
pJLR107	pMD1405, Pm::' <i>lacZ</i> , ColE1, Ap ^r	Ramos <i>et al.</i> , 1986
pLOW2	pACYC177, p15A, Km ^r	Hansen <i>et al.</i> , 1997
pMAL-pV	pMAL-C2, 6xHis, diana NIa, Pta c, <i>malE</i> , <i>lacI</i> ^q , ColE1, Ap ^r	Pérez-Martín <i>et al.</i> , 1997 ^b
pPPV1	NIa, Cm ^r	Pérez-Martín <i>et al.</i> , 1997 ^b
pQE30	pDS56/RBSII, 6xHis, ColE1, Ap ^r	Qiagen
pREII α	<i>rpoA</i> , ColE1, Ap ^r	Blatter <i>et al.</i> , 1994
pSE192	pREII α , α - Δ 235, Ap ^r	Holcroft <i>et al.</i> , 2000 ^b

pCMX2: Plásmido de alto número de copias derivado de pCM2 en el que se ha introducido un sitio XhoI en el triplete codificante para la glicocola 266 de XylS y a cuyo alelo llamamos *xylS_{XhoI}*, siendo esta mutación silenciosa. Este plásmido contiene un fragmento de 1,7 kb *Bam*HI en el que se encuentra el alelo *xylS_{XhoI}* expresado desde sus dos promotores naturales Ps1 y Ps2. (Figura M1).

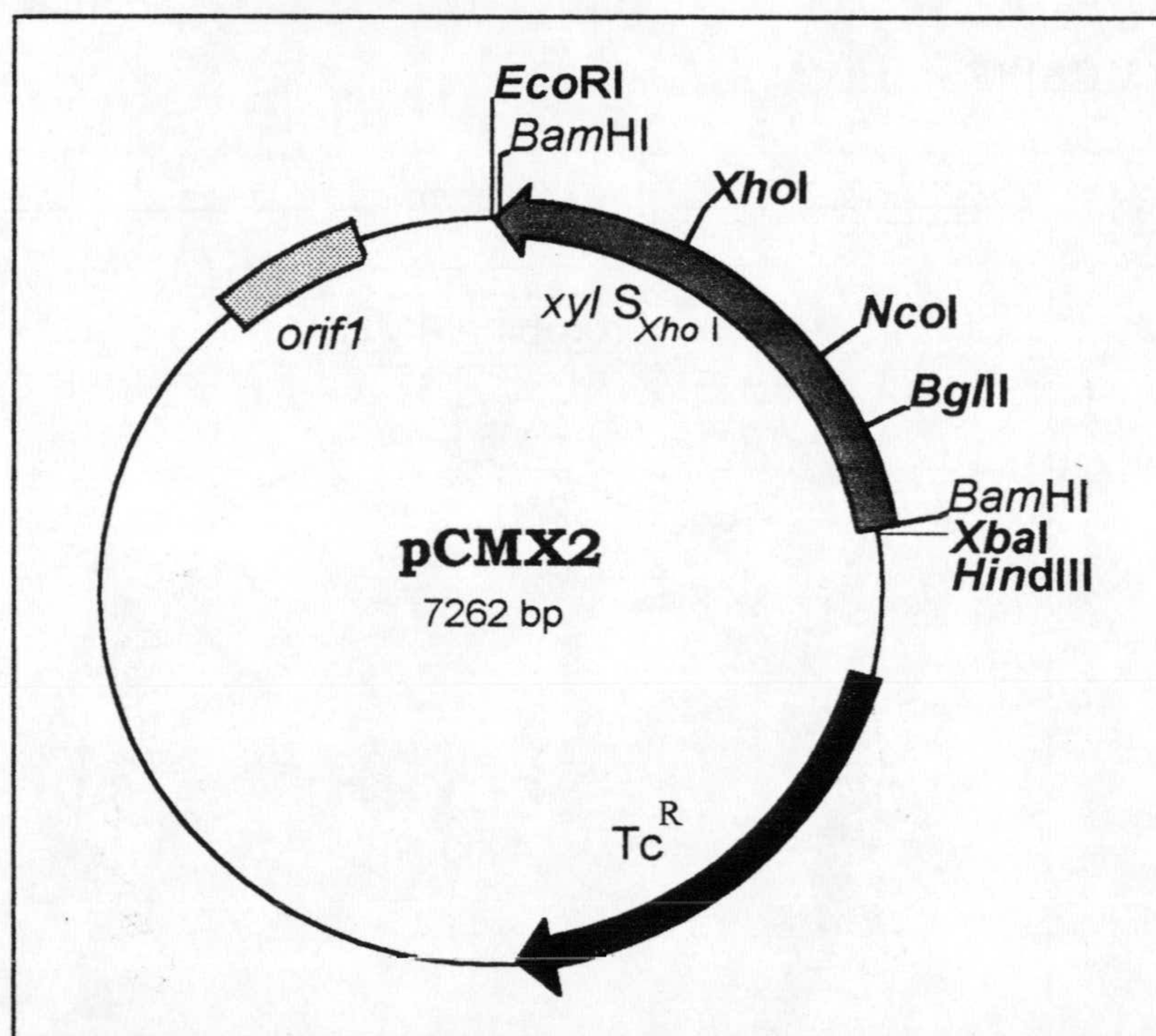


FIGURA M1. Plásmido pCMX2. Los sitios de restricción en negrita son únicos para los enzimas que se indican. Se muestra la localización del origen de replicación del fago f1, del gen de resistencia a tetraciclina y del gen *xylS*. Las flechas indican el sentido de transcripción de los genes.

pERD100: Plásmido de relativo bajo número de copias portador de una fusión Pm::*lacZ*, que se construyó clonando un fragmento *Pst*I de 401 pb que contiene el promotor de la ruta *meta* de plásmido TOL (Pm), proveniente de pJLR101, en el sitio *Pst*I de pMP220.

pGEX-4T-1: Vector diseñado para la expresión de genes o fragmentos de genes como proteínas de fusión a la glutatión-S-transferasa. Este vector contiene el origen de replicación de pBR322, el promotor Ptac, para la expresión inducible y de alto nivel, una copia del gen *lacI* que controla su expresión, el gen de resistencia a ampicilina, el gen de la glutatión transferasa (GST), una diana para la trombina que permite separar la proteína a estudiar de la GST y un sitio de clonación múltiple (MCS) (Figura M2).

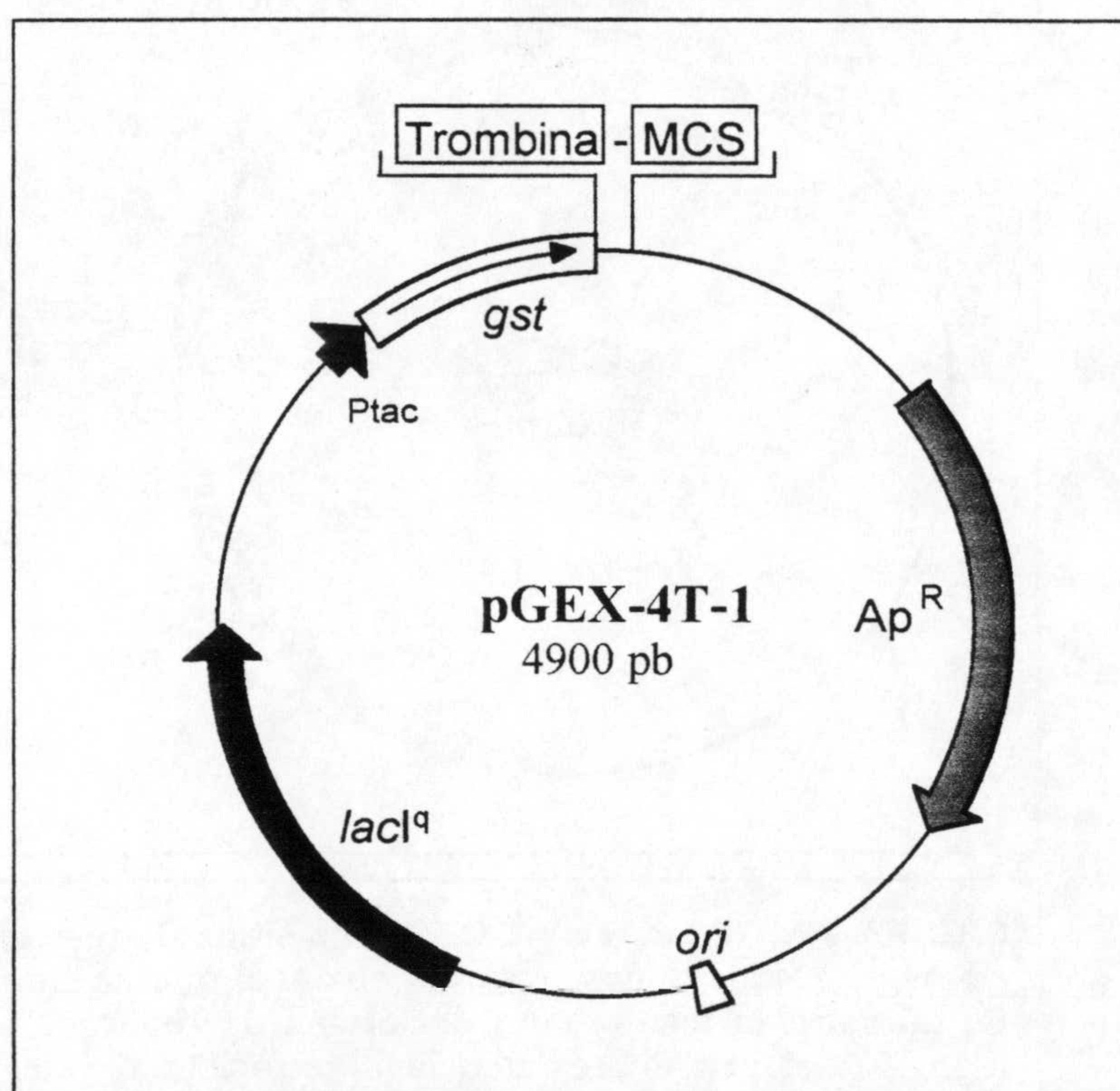


FIGURA M2. Plásmido pGEX-4T-1. Se indica la localización del gen de resistencia a ampicilina y del gen *lacI^q*, así como la del origen de replicación del plásmido. Se muestra además la posición de otros elementos relevantes que porta el plásmido. Las flechas indican el sentido de la replicación o de la transcripción de los genes.

pJLR107: Plásmido derivado de pMD1405 que contiene la fusión Pm::*lacZ*, que se obtuvo clonando el fragmento *EcoRI-HindIII* de pJLR100 que contiene la secuencia del promotor Pm.

pLOW2: Plásmido de bajo número de copias derivado de pACYC177 que se obtuvo clonando el fragmento *PvuII* que contiene el sitio de clonación múltiple (MCS) de pUC18-*NotI* (Figura M3).

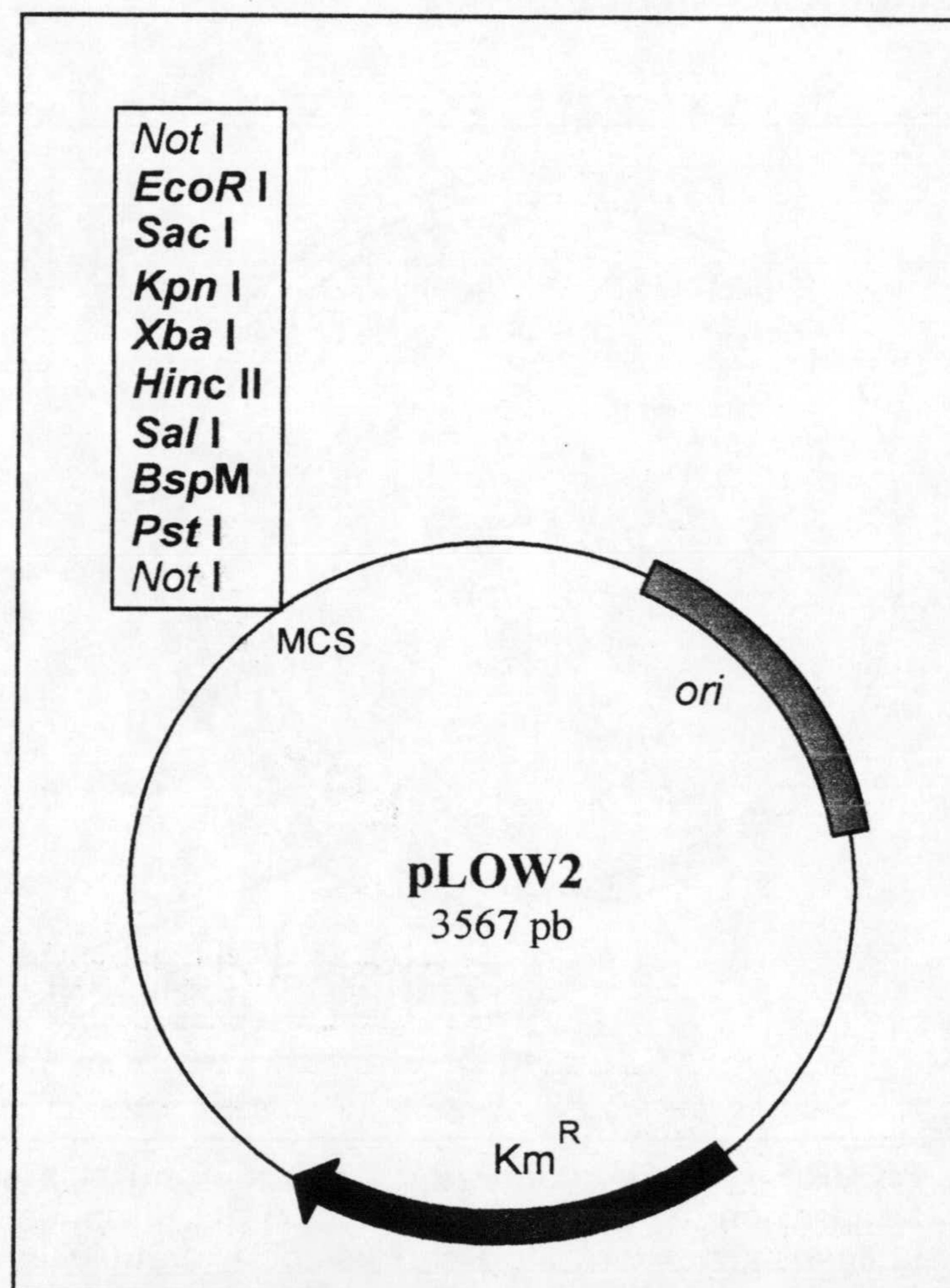


FIGURA M3. Plásmido pLOW2. Los sitios de restricción en negrita son únicos para los enzimas que se indican. Se muestra la localización del origen de replicación del plásmido así como la del gen de resistencia a kanamicina. La flecha indica el sentido de transcripción del gen.

pMALpV: Plásmido derivado de pMALC2, el cual es un vector comercial para la construcción de proteínas de fusión a la proteína de unión a maltosa (MBP). En este plásmido el sitio de corte para el factor Xa se sustituyó por el sitio de reconocimiento de la proteasa vírica NIa, tras el cual aparece una secuencia que codifica para seis histidinas y un sitio de clonación múltiple (MCS). El gen *malE* se expresa a partir del promotor inducible *P_{tac}*, que se mantiene reprimido por la proteína LacI hasta la adición del inductor IPTG (Figura M4).

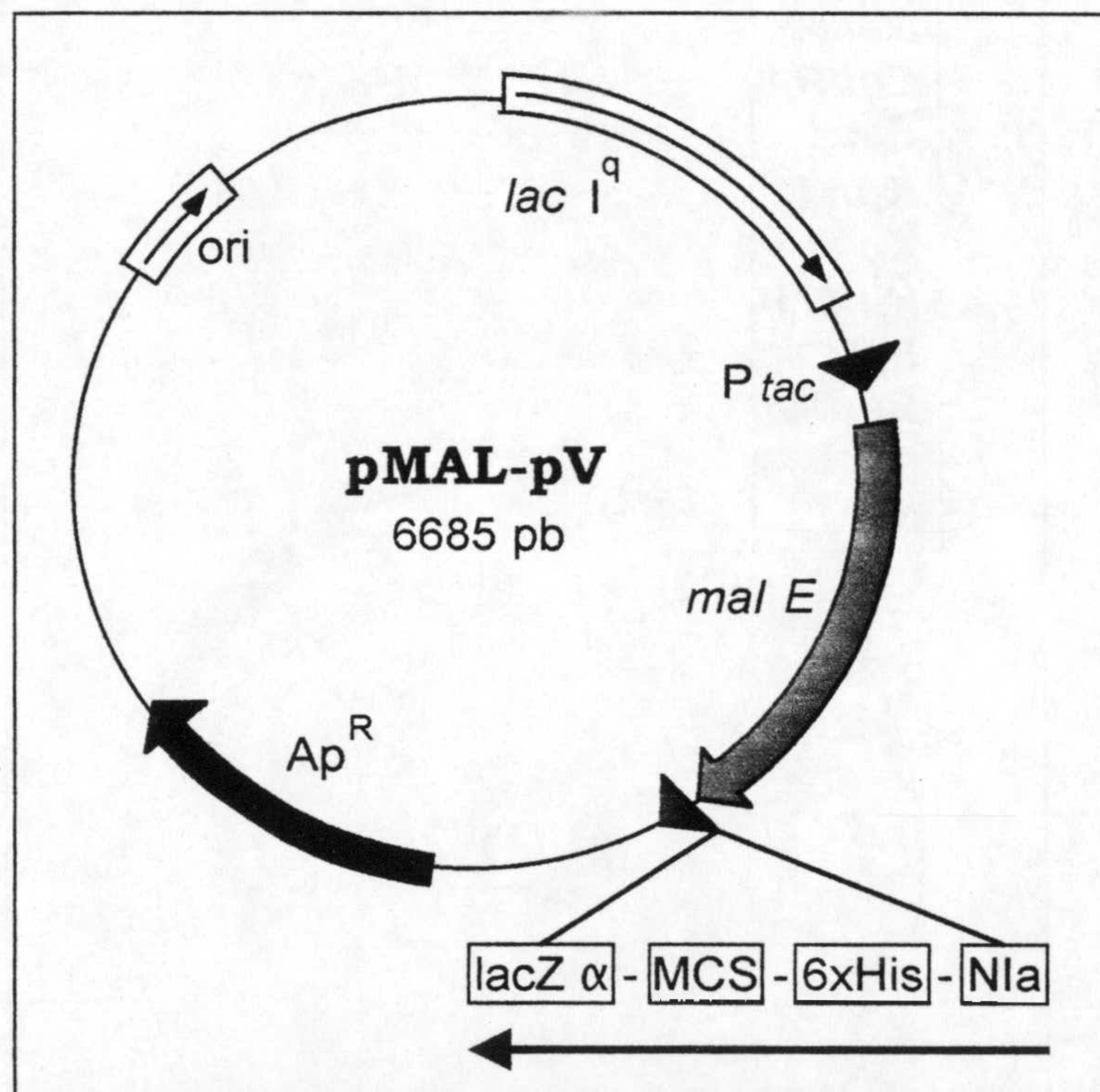


FIGURA M4. Plásmido pMAL-pV. Se muestra la localización del origen de replicación del plásmido y la de los genes *lacI*, *malE* y resistencia a ampicilina. Además se indica la posición de otros elementos relevantes que porta el plásmido. Las flechas indican el sentido de la replicación o de la transcripción de los genes indicados.

pPPV1: Plásmido que porta el gen que codifica la proteasa vírica NIa.

pQE30: Plásmido de bajo número de copias perteneciente a la familia de plásmidos pDS que permite fusionar una cola de 6xHis en el extremo amino terminal de la proteína de interés. Este plásmido contiene un elemento promotor/operador optimizado que consiste en el promotor del fago T5 y 2 secuencias operadoras *lac*, que incrementan la probabilidad de unión del represor *lac* y aseguran una represión eficiente del promotor T5. Además posee un sitio sintético de unión al ribosoma RBSII que permite una traducción eficiente y dos terminadores transcripcionales fuertes, *t₀* del fago lambda y T1 del operón *rrnB* de *E. coli*, que previenen el arrastre de la transcripción y aseguran la estabilidad de la expresión (Figura M5).

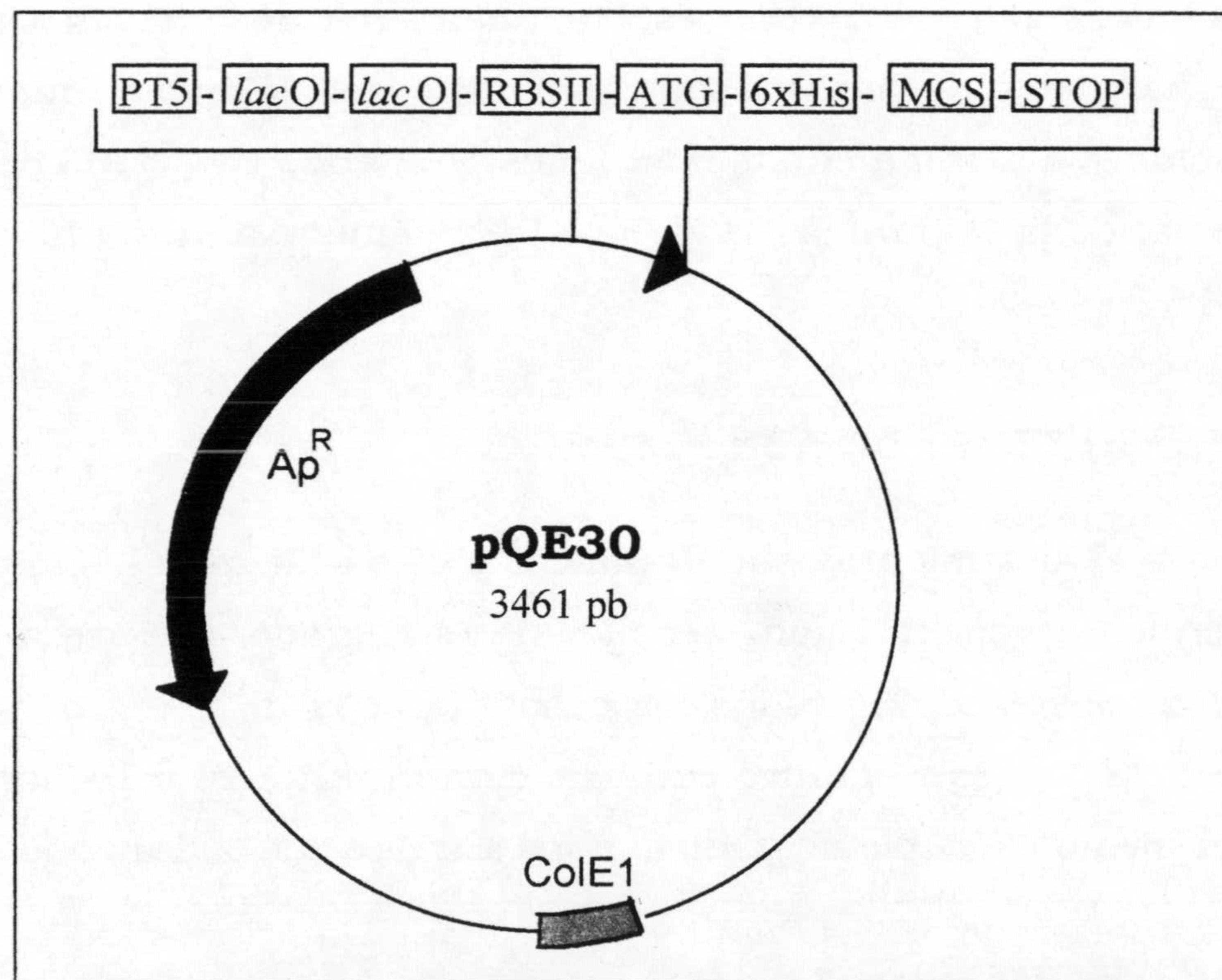


FIGURA M5. Plásmido pQE30. Se indica la localización del gen de resistencia a ampicilina y la del origen de replicación del plásmido. Además se muestra la posición de otros elementos relevantes que porta el plásmido. Las flechas indican el sentido de la transcripción de los genes.

pREII α : Plásmido multicopia que porta el gen silvestre *rpoA* que codifica la subunidad α de la ARN polimerasa. En este plásmido el gen *rpoA* está bajo el control del promotor en tándem *IppP-lacUV5*.

pSE192: Plásmido derivado de pREII α que codifica una deleción total del dominio C-terminal de la subunidad α de la ARN polimerasa de *E. coli* (α - Δ 235). Esta deleción no interfiere con el ensamblaje del holoenzima ARN polimerasa, y la enzima mutante es enzimáticamente activa.

Además de los plásmidos anteriormente mencionados se ha utilizado una librería de plásmidos que codifican sustituciones a alanina en cada posición dentro del dominio C-terminal de la subunidad α de la ARN polimerasa. Esta librería está parcialmente descrita en Gaal *et al.*, (1996). Asimismo, se ha utilizado una serie de plásmidos que codifican sustituciones a alanina en las posiciones 162, 163, 164 y 165 del extremo N-terminal de la subunidad α de la ARN polimerasa, descritos en Niu *et al.*, (1996).

5. AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO

Para el aislamiento de ADN plasmídico se utilizaron los métodos que se describen a continuación, dependiendo del grado de pureza requerido en su uso posterior. En todos los casos, la cepa de *E. coli* portadora del plásmido de interés se cultivó con agitación durante 10 – 14 horas a 30 ó 37°C en medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes.

5.1. Método “Qiapreps”

El sistema “Qiapreps spin plasmid kit” (Qiagen, ref. 27104) se utilizó para la preparación rápida de ADN plasmídico de alta pureza, partiendo de un volumen de cultivo de 3 ml y siguiendo las instrucciones de uso del

fabricante. Este ADN plasmídico se empleó para reacciones posteriores de secuenciación y/o clonación.

5.2. Método de la lisis alcalina

Para la comprobación de plásmidos de nueva construcción por análisis de restricción, éstos se aislaron por el método de la lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989) con algunas modificaciones.

Se partió de un volúmen de 1,5 ml de cultivo. Las células se recogieron por centrifugación a 12.000 rpm durante 2 minutos. Tras eliminar el sobrenadante, éstas se resuspendieron en 100 µl de GTE y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se añadieron 200 µl de solución de lisis, se agitó el tubo suavemente por inversión y se incubó durante 5 minutos en hielo. El lisado se neutralizó añadiendo 150 µl de tampón acetato sódico 3M pH 4,8 y, tras agitar el tubo por inversión, las proteínas, el ADN cromosómico y los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 12.000 rpm durante 15 minutos y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio. El sobrenadante se trató con un volumen de una mezcla de fenol, cloroformo y alcohol isoamílico en proporción 25:24:1 (v/v) para eliminar los restos de proteínas, y nuevamente con un volumen de una mezcla de cloroformo y alcohol isoamílico en proporción 24:1 (v/v) para eliminar restos de fenol. Posteriormente, a la fase acuosa se añadieron 2 volúmenes de etanol puro frío, se incubó durante 30 minutos a -20°C. Para precipitar el ADN se centrifugó a 12.000 rpm durante 15 minutos. Las sales del precipitado se lavaron con un volumen de etanol 70% (v/v) en H₂O y se centrifugó a 12.000 rpm durante 5 minutos. Tras descartar el sobrenadante, el sedimento de ADN se secó y se resuspendió en 40 µl de TE.

La composición de las soluciones empleadas en este procedimiento fue la siguiente:

GTE: glucosa, 50 mM; Tris-HCl (pH 8,0), 25 mM; EDTA-Na₂, 10mM.

La solución se esterilizó mediante autoclave y se conservó a 4°C.

Solución de lisis: SDS 1% (p/v) y NaOH 0,2N. Esta solución fue de preparación extemporánea a partir de soluciones madre de SDS al 10% (p/v) y 2N de NaOH.

Acetato sódico 3M pH 4,8: a 60 ml de una solución de acetato sódico 5M se le añadieron 11,5 ml de ácido acético glacial y H₂O hasta 100 ml. Cuando fue necesario, el pH se ajustó a 4,8 con ácido acético glacial. La solución se esterilizó mediante autoclave y se conservó a 4°C.

TE: Tris-HCl (pH 8,0), 10mM y EDTA-Na₂, 1mM. Esta solución se esterilizó mediante autoclave y se almacenó a 4°C.

6. TRANSFORMACIÓN DE *E. coli*

El método utilizado para la preparación de células competentes de *E. coli* y su posterior transformación mediante choque térmico fue descrito por Inoue *et al.* (1990). Con este método se obtuvieron frecuencias de transformación comprendidas entre 10⁷ – 10⁸ transformantes/ μ g de ADN.

7. TRANSDUCCIÓN CON EL FAGO P1.

Esta técnica se empleó en la construcción de la cepa *E. coli* EEZ216. Se utilizó el fago P1clr100Cm (Cm^r) (Goldberg *et al.*, 1974). El método utilizado para la inducción del lisógeno de P1 y para la transducción fue descrito por Silhavy *et al.* (1984).

8. MANIPULACIÓN DE ADN Y ARN

8.1. Determinación de la concentración de ADN y ARN

Para estimar la concentración de ADN o ARN de una solución se utilizó el método espectrofotométrico descrito por Sambrook *et al.* (1989).

Se determinó la absorbancia de la solución de ADN o ARN a 260 nm y 280 nm frente a un blanco de H₂O o TE, dependiendo del disolvente utilizado en la disolución del ácido nucleico. La concentración de ADN o ARN de la muestra se calculó respecto al valor estándar de $A_{260}=1$ para soluciones con 50 µg/ml de ADN de cadena doble ó 40 µg/ml de ARN. La relación A_{260}/A_{280} se utilizó para estimar el grado de pureza de la preparación, de forma que valores de esta relación por debajo de 1,8 se consideraron indicadores de contaminación por proteínas y/o fenol.

8.2. Restricción de ADN

Las digestiones de ADN con enzimas de restricción se realizaron en las condiciones óptimas para cada enzima fijadas por el fabricante. Las reacciones contenían habitualmente 0,1-5 µg de ADN, 0,1 volúmenes del tampón de restricción correspondiente suministrado por la casa comercial (10 veces concentrado), y 0,5-10 unidades del enzima de restricción, en volúmenes finales de 10-30 µl completados con H₂O bidestilada estéril. Las digestiones de plásmidos se llevaron a cabo incubando las mezclas de reacción durante 2 horas a la temperatura indicada por el fabricante.

8.3. Desfosforilación de ADN con fosfatasa alcalina

Con objeto de aumentar la eficiencia de clonación, rutinariamente se desfosforiló el ADN del vector linearizado con fosfatasa alcalina de gamba ártica. Para ello, el ADN ya cortado con enzimas de restricción se mezcló con la décima parte del tampón suministrado por el fabricante, y 0,1 a 0,5 unidades de fosfatasa alcalina de gamba ártica (USB. Amersham, ref. 70092), por cada pmol de extremos de ADN. Tras una hora de incubación a 37°C la fosfatasa se inactivó por calor, incubando la reacción a 65°C durante 15 minutos.

8.4. Electroforesis de ADN

La separación y visualización tanto de plásmidos completos, como de fragmentos de ADN originados por la digestión con enzimas de

restricción se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa. Por cada 5 μ l de muestra a analizar se añadió 1 μ l de tampón de carga, y esta mezcla se depositó en un pocillo del gel de agarosa al 0,8% (p/v) en tampón TAE, sumergido en una cubeta con el mismo tampón. Cuando el tamaño del fragmento de ADN era inferior a 0,5 kb, la concentración de agarosa en el gel fue de 1,5% (p/v). La separación se realizó por electroforesis horizontal sumergida a un voltaje de 5-10 V/cm.

Las moléculas de ADN se tiñeron por inmersión en una solución con bromuro de etidio (1 μ g/ml) durante 10 minutos. Tras lavar en agua para eliminar el exceso de bromuro de etidio, el ADN se visualizó mediante exposición del gel a la luz ultravioleta (254 nm). Las imágenes se recogieron con una video-cámara acoplada a una impresora térmica, empleando el equipo "gelprinter" de la casa comercial TDI (Madrid).

Como patrones de peso molecular se usaron los fragmentos de ADN del fago λ cortado con el enzima de restricción *Hind*III, así como los marcadores VIII y X de la casa Roche Molecular Biochemicals (Ref. 1336045 y 1498037 respectivamente).

La composición de los tampones y soluciones empleados en este procedimiento fue la siguiente:

Tampón TAE: Tris-base, 4,84 g; ácido acético glacial, 1,14 ml; EDTA- Na_2 0,5 M pH 8, 2 ml y H_2O hasta 1 litro. Este tampón se preparó a partir de una solución 50 veces concentrada y esterilizada en el autoclave.

Tampón de carga: glicerol, 30% (v/v), azul de bromofenol, 0,3% (p/v) y azul de xilencianol, 0,3% (p/v).

Los marcadores de peso molecular se prepararon de la siguiente forma: se cortaron 80 μ l de ADN del fago λ (250 μ g/ml) con 1,5 unidades del enzima *Hind*III por μ g de ADN. Una vez digerido el ADN, se calentó a 80°C para separar las regiones *cos* de λ , y a la reacción se añadieron finalmente 80 μ l de tampón de carga y se completó el volumen hasta 400 μ l con TE, de forma que la concentración final de ADN en la solución fue de 50 μ g/ml.

8.5. Recuperación de fragmentos de ADN de geles de agarosa

Una vez identificado el fragmento de ADN que se quería recuperar, se cortó el trozo de agarosa del gel que contenía el fragmento con ayuda de un bisturí y se extrajo del mismo utilizando los sistemas comerciales "QIAEX II Gel Extraction Kit" (QIAGEN, ref. 20021) y "Qiaquick Gel Extraction Kit" (QIAGEN, ref. 28706), siguiendo las instrucciones del fabricante.

8.6. Ligación de ADN

Para la ligación de moléculas de ADN se partió de fragmentos lineales obtenidos por digestión con enzimas de restricción en sitios compatibles para la ligación. El vector linearizado y el fragmento de ADN obtenido por digestión con uno o varios enzimas de restricción, y purificado como se ha descrito en el apartado anterior, se mezclaron en una proporción vector:inserto de 1:3 y se añadió 0,1 volumen de tampón de ligación (suministrado por el fabricante) y 1 unidad de ADN-ligasa del fago T4 en un volumen final de 15-20 μ l completados con H₂O. La mezcla de reacción se incubó a 12-16°C durante un mínimo de 16 horas.

8.7. Secuenciación de ADN

La secuenciación automática de ADN plasmídico y de fragmentos amplificados por PCR se llevó a cabo en el servicio de secuenciación automática del Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra del C.S.I.C. en Granada, utilizando un aparato Applied Biosystem (modelo 373 STRECHT), así como en el servicio de secuenciación automática del Grupo de Degradación de Tóxicos Orgánicos de la Estación Experimental del Zaidín del C.S.I.C. en Granada, utilizando el aparato ABI PRISM™ (modelo 310) de Perkin Elmer. El método de secuenciación fue el comercializado por Perkin Elmer, ABI PRISM™ Dye Terminator que utiliza en la reacción de extensión el enzima comercializado como "AmpliTaq DNA Polymerase" (ref. 402122), y que emplea dideoxinucleótidos marcados

diferencialmente con cromóforos fluorescentes. Los oligonucleótidos empleados como cebadores en la secuenciación se sintetizaron en el servicio de síntesis de oligonucleótidos del instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra. Se secuenciaron siempre ambas cadenas de ADN para eliminar las ambigüedades que surgían.

8.8. Marcaje de cebadores

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores se marcaron por fosforilación en su extremo 5' con [γ -³²P] ATP. Cada reacción contenía en un volumen final de 10 μ l, 1 μ l de tampón de polinucleótido quinasa 10 veces concentrado, 10 pmoles de oligonucleótido, 1 μ l de [γ -³²P] ATP (>3000 mCi/mmol) y 1 unidad de polinucleótido quinasa del fago T4. Las reacciones se incubaron a 37°C durante 1 hora y la quinasa se eliminó tratando con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). El exceso de nucleótido radiactivo se eliminó por filtración forzada a través de una columna rellena con gel Sephadex G-25.

Tampón de polinucleótido quinasa 10 veces concentrado: Tris-HCl 0,5M pH 7,6; MgCl₂, 0,1M; DTT, 50mM; espermidina 1mM; EDTA, 1mM.

8.9. Otras técnicas de manipulación de ácidos nucleicos

Las reacciones de relleno de extremos cohesivos en 5' (mediante tratamiento con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*) o de eliminación de extremos cohesivos en 3' (usando la ADN polimerasa del fago T4), se realizaron siguiendo los protocolos descritos por Sambrook *et al.* (1989).

8.10. Extracción de ARN

La extracción de ARN y su análisis posterior se llevó a cabo según el método descrito por Chomczynski y Sacchi (1987) y Sambrook *et al.* (1989), modificado por Marqués *et al.* (1993).

Para la preparación de ARN se recogieron fracciones alícuotas de volumen variable en función del estado de crecimiento del cultivo, en tubos previamente enfriados en nitrógeno líquido. Los sedimentos celulares obtenidos por centrifugación a 4°C se congelaron a -80°C hasta la extracción del ARN. Para la extracción se añadió 1,4 ml de solución de lisis y se mezcló y agitó vigorosamente con los sedimentos de cada muestra, tras lo cual se incubó a 60°C durante 10 minutos, sometiendo la mezcla a agitación periódica durante este tiempo. Pasado el tiempo de incubación, se añadió 0,28 ml de cloroformo, agitándose de nuevo para homogenizar la muestra. Se centrifugó a 10.000 rpm en frío durante 15 minutos, y la fase acuosa se pasó a un tubo limpio al que se le añadió 0,66 ml de isopropanol frío, que se mezcló e incubó a -20°C durante 30 minutos. Los ácidos nucleicos se recogieron por centrifugación a 12.000 rpm durante 15 minutos, y el sedimento se lavó con etanol al 70%. Una vez seco se resuspendió en 75 µl de H₂O_{DEPC}.

A los ácidos nucleicos extraídos se les eliminó el posible ADN presente mediante tratamiento con ADNasaI de páncreas bovino, para lo cual se preparó una mezcla de ADNasaI y se añadió 25 µl por muestra a los 75 µl de ácidos nucleicos previamente extraídos. Este tratamiento se realizó durante 1 hora a 37°C, tras lo cual se trató con proteinasa K de *Tritirachium album* para eliminar las proteínas presentes en las muestras. Para ello se preparó una mezcla de proteinasa K y se añadió 110 µl de esta mezcla a la mezcla anterior ya tratada con ADNasaI. Este tratamiento también se realizó durante 1 hora a 37°C, tras lo cual se realizó una extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y otra con cloroformo:alcohol isoamílico. El ARN presente en la fase acuosa de esta última extracción se precipitó añadiendo 0,1 volumen de acetato sódico

3M pH 4,8 y 2 volúmenes de etanol frío. Tras mantener la mezcla a -80°C durante 30 minutos se centrifugó a 12.000 rpm durante 15 minutos y el sedimento se lavó con etanol al 70%, se secó y se resuspendió en 20 μl de $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$. La concentración de ARN de la solución resultante se cuantificó espectrofotométricamente según se describe en el apartado 7.1 de esta sección.

La composición de los tampones y soluciones empleadas en este procedimiento fue la siguiente:

$\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$: Es el resultado de esterilizar en autoclave una solución 1:1.000 de DEPC en H_2O , tras incubarla al menos 60 minutos a temperatura ambiente.

Solución de lisis: Solución D, 20 ml; acetato sódico 2M pH 4, 2 ml; fenol saturado en $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$, 20 ml .

Solución D: Guanidium isotiocianato, 4M; citrato sódico, 25 mM; N-lauril sarcosina 0,5% (p/v), en $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ hasta 50 ml. Una vez disuelta la mezcla, se esterilizó por autoclave y se le añadió 0,36 ml de β -mercaptoetanol.

Mezcla de ADNasaI: Inhibidor de ARNasa, 20 U; DTT (ditiotreitól) 0,1M, 1 μl ; MgCl_2 1M, 1 μl ; ADNasaI (libre de ARNasa), 10 U; $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ hasta 25 μl .

Mezcla de Proteinasa K: Tris 0,2M pH 7/NaCl 0,1M, 100 μl ; SDS 10%, 4 μl ; EDTA 0,5M pH 8, 4 μl ; proteinasa K (libre de ARNasa), 2,4 U.

Todas las disoluciones empleadas en la preparación de las soluciones anteriores, salvo las que llevan Tris, se prepararon en una solución 1:1.000 de DEPC en H_2O , y tras 1 hora de incubación se inactivó el DEPC mediante esterilización en autoclave.

8.11. Electroforesis de ARN

La separación y visualización de ARN total se realizó por electroforesis en geles de agarosa, para comprobar si existía contaminación de ADN genómico en las muestras. El procedimiento fue el mismo descrito para ADN, con las variaciones siguientes: todo el material de electroforesis se enjuagó previamente en SDS 1% y se aclaró con una solución autoclavada 1:1.000 de DEPC en H₂O. El tampón TAE se preparó por dilución del 50 veces concentrado (anteriormente descrito) en solución autoclavada 1:1.000 de DEPC en H₂O. La concentración de la agarosa en el gel fue de 1,5% (p/v) y se acompañó de 0,1% (p/v) de SDS. Todo el material de vidrio para preparar estas soluciones se trató previamente con cloroformo para eliminar posibles contaminaciones de ARNasas.

9. EXTENSIÓN REVERSA A PARTIR DE CEBADOR

9.1. Reacción de extensión

Como cebadores complementarios a las cadenas de ARN se utilizaron los oligonucleótidos que se muestran en la Tabla M3; éstos hibridan con secuencias próximas al extremo 5' de los ARNm de los genes en estudio, generalmente dentro de la región codificante. Para la hibridación de los oligonucleótidos marcados con las cadenas de ARN se mezclaron 2 µl de tampón de hibridación, 10⁵ cpm del oligonucleótido marcado y 10-60 µg de ARN total en un volumen final de 10 µl. La mezcla se incubó a 85°C durante 5 minutos, se pasó a un baño a 65°C y se dejó enfriar hasta 45°C. La reacción de extensión se realizó añadiendo 40 µl de tampón de transcriptasa reversa que contenía 1mM de cada uno de los 4 desoxinucleótidos, 20 U de inhibidor de ARNasa, 3 µg de actinomicinaD y 7U de transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis de ave, y se incubó a 44°C durante 1 hora. La reacción se detuvo mediante la adición de 5 µl de acetato sódico 3M pH 4,8 y 150 µl de etanol.

La composición de las soluciones utilizadas en este procedimiento fue la siguiente:

Tampón de hibridación: NaCl 2M; piperacina-N,N'-bis(2-etanosulfonato) (PIPES) 50mM, pH 7.

Tampón de transcriptasa reversa: Tris-HCl 12,5mM pH 8,2; DTT 10 mM; MgCl₂ 6 mM.

Tabla M3. Oligonucleótidos usados para realizar ensayos de extensión reversa.

Nombre	Uso	Secuencia (5' → 3')
OSXylX	Analizar el promotor Pm	GATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTG

9.2. Separación de las cadenas extendidas de ADNc mediante electroforesis

Las reacciones de extensión se precipitaron por centrifugación a 12.000 rpm durante 15 minutos, se lavaron con etanol al 70% y se resuspendieron en 6 µl de TE y 3 µl de tampón de carga con formamida. La separación de las cadenas con distinta longitud se llevó a cabo mediante electroforesis en geles (40 x 20 cm) desnaturalizantes de poliacrilamida al 6% (p/v) en TBE, a potencia fija de 40 W y voltaje variable entre 1.500 y 2.000 V.

Una vez finalizada la separación, el gel se transfirió a un papel de filtro Whatman 3MM, se cubrió con plástico transparente y se secó al vacío en un secador Bio-Rad a 80°C durante 20 minutos. El gel se autorradiografió en una película Amersham Hyperfilm-MP durante al menos 24 horas a -80°C. La película se reveló utilizando métodos estándar.

Alternativamente el gel se cuantificó mediante un Molecular Imager modelo GS-525 (Bio-Rad).

La composición de las soluciones utilizadas fue la siguiente:

TBE: Tris-base, 4,84g; ácido acético glacial, 1,14 ml; EDTA-Na₂ 0,5M pH 8, 2 ml; H₂O hasta 1 litro.

Solución concentrada de acrilamida 40%: acrilamida, 38 g; N,N'-metilenbisacrilamida, 2 g y H₂O hasta 100 ml. Esta solución se filtró al vacío a través de una membrana de nylon. La solución filtrada se almacenó en oscuridad a 4°C.

Acrilamida desnaturalizante 6% (p/v): acrilamida 40% (p/v), 9 ml; urea, 25,2 g; TBE (5 veces concentrado), 12 ml y H₂O hasta 60 ml.

Para catalizar la polimerización de la acrilamida se añadió a la solución anterior, inmediatamente antes de verter el gel, 125 µl de persulfato amónico 10% (p/v) y 125 µl de TEMED.

El montaje de las placas de cristal de la unidad de electroforesis, una de las cuales había sido tratada con dimetil-dicloro-silano para evitar la adhesión del gel, se realizó conforme a las instrucciones del fabricante.

10. REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN EN CADENA CON ADN POLIMERASA TERMORRESISTENTE (PCR)

10.1. Reacciones generales

El tipo de reacciones de PCR que se describen a continuación se utilizaron para amplificar fragmentos de ADN para su posterior clonación. La reacción de amplificación contenía: 10 pg/µl de ADN plasmídico que se usó como molde, cebadores apropiados (Tabla M4) (0,5 µM cada uno), tampón de reacción (KCl, 50 mM; MgCl₂, 1,5 mM; Tris-HCl, 10 mM pH 9,0), dNTPs (100 µM cada uno) y ADN polimerasa *Taq* (Pharmacia Biotech, ref. 27-0799-02) 0,025U/µl. Las condiciones estándar de la reacción de amplificación fueron las siguientes: tras una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, se realizaron 25 ciclos en las siguientes condiciones: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a la temperatura específica

de hibridación, 1 minuto a 72°C y finalmente se realizó una extensión durante 10 minutos a 72°C. La temperatura de hibridación varió en función de los cebadores utilizados en cada reacción. Cuando la reacción estándar no resultó satisfactoria, se combinaron distintas modificaciones, como cambiar la concentración de MgCl₂ (incrementándola a 3 ó 4,5mM) y/o añadir ciertos compuestos a la mezcla de reacción (por ejemplo, glicerol al 10% [v/v] o DMSO al 5% [v/v]). Ocasionalmente, el producto obtenido tras la amplificación se purificó utilizando el sistema comercial "QIAquick PCR purification Kit" (QIAGEN, ref.28104) para eliminar los cebadores y los dNTPs no incorporados.

Tabla M4. Oligonucleótidos utilizados como cebadores en las reacciones de PCR.

Oligonucleótido	Secuencia (5' → 3')
NBam	GAACCG <u>GGATCC</u> ATGGATTTTGC
StopSal	GAATTG <u>GTCGACTCACTA</u> GAAAGACG

Los oligonucleótidos indicados son complementarios a su ADN diana excepto en la secuencia en negrita y subrayada que indica los cambios introducidos con respecto a la secuencia original. Estos oligonucleótidos se utilizaron para amplificar el extremo N-terminal de XylS desde pCMX2 y flanquearlo con las dianas *Bam*HI y *Sal*I.

10.2. Mutagénesis dirigida con oligonucleótidos

Para la obtención de mutantes puntuales de XylS se empleó el método de extensión de fragmentos solapantes (Higuchi, 1990; Ho *et al.*, 1989). Este método se basa en la utilización de 4 cebadores, dos de los cuales poseen parte de sus secuencias complementarias y contienen la mutación que se desea introducir (ver Tabla M5), y los otros dos son complementarios a cada uno de los extremos del fragmento que se quiere amplificar (Figura M6). En primer lugar se llevan a cabo dos reacciones de PCR paralelas, una usando los cebadores A y B (este último porta la mutación deseada), para amplificar la porción de secuencia comprendida

entre dichos oligonucleótidos introduciendo la mutación, y otra usando los cebadores C (que porta la mutación) y D, para amplificar la secuencia restante y mutar la misma posición. Los dos fragmentos de ADN generados poseen un extremo con una secuencia común, que además contiene la mutación deseada. Posteriormente, se mezclan estos dos fragmentos en una nueva reacción de amplificación con los cebadores A y D, de modo que se obtiene el fragmento de ADN completo con la mutación deseada.

En las mutagénesis con PCR realizadas en este estudio se utilizó el siguiente protocolo: en primer lugar se llevaron a cabo las dos reacciones de extensión independientes para obtener los fragmentos solapantes, para ello se prepararon mezclas de reacción con un volumen final de 50 μ l que contenían: Tampón de reacción de la ADN-polimerasa *Taq* (10x), 5 μ l; dNTPs (10 mM de cada uno de los cuatro), 2 μ l; ADN molde pCMX2 (10 μ M), 2,5 μ l; cebadores: oligonucleótido que contiene la mutación (10 μ M), 2 μ l y los oligos U20T, R20T, U224 ó R214 (10 μ M), 2 μ l; *Taq* ADN-polimerasa, 2,5 U; H₂O hasta 50 μ l. Se utilizó un programa de 25 ciclos, en el cual cada ciclo consta de un periodo de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 52°C y 1 minuto a 72°C. A continuación se cargaron 5 μ l de cada reacción en un gel de agarosa de bajo punto de fusión (1% [p/v]) y los fragmentos amplificados se separaron electroforéticamente. Las bandas de agarosa correspondientes a los fragmentos extendidos se recortaron y se depositaron en tubos de 0,5 ml.

Para obtener el fragmento completo de ADN mutado, se mezclaron 5 μ l de agarosa fundida con los fragmentos resultantes de cada una de las reacciones independientes y los pares de cebadores U20T/R20T o U224/R214 en 50 μ l de mezcla de reacción precalentada a 72°C, para evitar que la agarosa gelificara, y se extendieron con el programa descrito anteriormente.

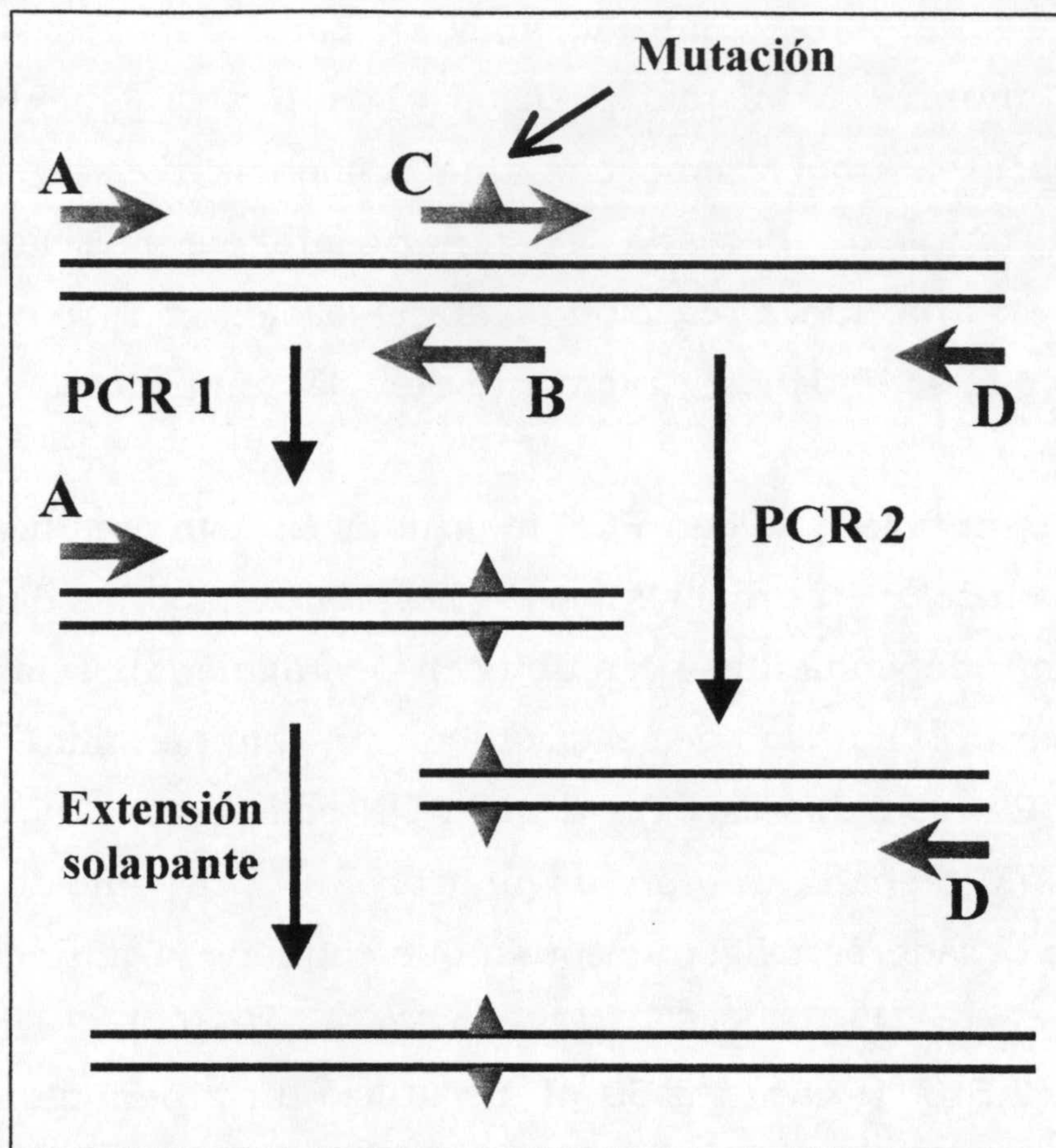


FIGURA M6. Esquema del método de mutagénesis dirigida por PCR solapante. Las flechas representan los oligonucleótidos utilizados en cada reacción y el triángulo indica la existencia de mutaciones tanto en los oligonucleótidos como en el ADN. La reacción denominada PCR1 se llevaría a cabo con los oligonucleótidos A y B mientras que la reacción denominada PCR2 se llevaría a cabo con los oligonucleótidos C y D. Ver detalles en el texto.

En la Tabla M5 se muestran los oligonucleótidos usados para generar mutantes mediante esta técnica. Se indican los oligonucleótidos mutantes que se han denominado genéricamente B y C en este subapartado y los oligonucleótidos externos que se han denominado genéricamente A y D.

Tabla M5. Cebadores utilizados para la generación de mutantes dirigidos por PCR.

Nombre	Secuencia (5' → 3')
U20T	GGCACTGGGATCGTTCAAGC
R20T	GGATTTTGGCTTATTGAACG
U224	GACTGCATAGGGCTCGGCGTGG
R214	CAGGAAACAGCTATGACCATG
C4R	GGATTTT <u>C</u> GCTTATTGAACG
C4RC	CGTTCAATAAGC <u>G</u> AAAATCC
C53G	CTTCGGAG <u>G</u> GCCTCGACCTG
C53GC	CAGGTCGAGGC <u>C</u> TCCGAAG
G90D	GTGGCGTG <u>A</u> CCATGGCCAGGAG
G90DC	GGCCATGGT <u>T</u> CACGCCACAGG
D137E	GCAGTG <u>G</u> CAACAATTGGCAC
D137EC	GCCAATTGTTG <u>C</u> CACTGCATGC
H153N	CGCCGCGCGA <u>A</u> ACAATCTCC
H153NC	GCTGGAGATTGT <u>T</u> TCGCGCGGC
D137X	GCAGT <u>HBD</u> AACAATTGGCAC
D137XC	GCCAATTGTT <u>HVD</u> ACTGCATGC
D137A	GCATGCAGTG <u>C</u> CAACAATTGG
D137AC	CCAATTGTTG <u>G</u> CACTGCATGC
H153X	CGCCGCGCGA <u>DBD</u> AATCTCC
H153XC	GCTGGAGATT <u>HVH</u> TCGCGCGGC
H153D	CGCCGCGCGA <u>G</u> ACAATCTCC
H153DC	GCTGGAGATTGT <u>C</u> TCGCGCGG

Los oligonucleótidos son complementarios a su ADN diana excepto en la secuencia en negrita y subrayada que indica los cambios introducidos con respecto a la secuencia original. Los códigos IUB para las bases degeneradas son **H**= A/C/T, **B**= C/G/T, **D**= A/G/T y **V**= A/C/G.

11. MEDIDA DE ACTIVIDAD β -GALACTOSIDASA

La medida de actividad β -galactosidasa se realizó en células permeabilizadas según el método descrito por Miller (1972). Este sistema se basa en una reacción colorimétrica en la que el *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG), sustrato incoloro de la β -galactosidasa, es hidrolizado por el enzima rindiendo galactosa y *o*-nitrofenol, un compuesto de color amarillo cuya concentración se determinó espectrofotométricamente. La composición de las soluciones utilizadas en este procedimiento aparece al final de este apartado.

Se partió de cultivos de las células correspondientes en medio LB suplementado con los antibióticos necesarios, que habían sido incubadas a 30°C en agitación durante 12-16 horas. Las células se diluyeron 100 veces en 3 ml del mismo medio y se incubaron a 30°C en agitación durante 1 hora más, momento en que las células se indujeron con el inductor adecuado cuando fue necesario. Tras un periodo de incubación determinado (generalmente 5 horas), se tomaron alícuotas del cultivo y se añadió el mismo volumen de una solución del detergente bromuro de alquil-trimetil-amonio (MATAB) con objeto de permeabilizar las células. Esta mezcla se incubó en hielo durante 30 minutos.

La determinación de la actividad β -galactosidasa se realizó a 30°C en tampón Z. A la mezcla con las células permeabilizadas se añadió 0,8 ml de tampón Z y 0,2 ml de solución de ONPG. Los tubos de reacción se incubaron a 30°C hasta la aparición de color (2 - 60 minutos). La reacción se detuvo añadiendo 2 ml de una solución de Na₂CO₃ 0,5M. La concentración de *o*-nitrofenol se estimó espectrofotométricamente determinado su absorbancia a 420 nm. Para cada muestra se realizó además una medida a 550 nm para corrección de la turbidez y se determinó también la densidad celular de los cultivos utilizados en los ensayos midiendo su turbidez a 660 nm.

La actividad β -galactosidasa expresada en unidades Miller se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Unidades } \beta\text{-galactosidasa} : \frac{A_{420} - 1,7 \times A_{550}}{t \times V \times A_{660}} \times 1000$$

donde t representa el tiempo de reacción en minutos, y V el volumen de células permeabilizadas utilizadas en la reacción en ml.

Las soluciones empleadas en este ensayo se conservaron a 4°C y su composición fue la siguiente:

Solución de MATAB: 20 mg de bromuro de alquil-trimetil-amonio en 10 ml de una solución 0,2 M de Tris-HCl pH 8.

Tampón Z pH 7: Na₂HPO₄ 60 mM; NaH₂PO₄, 40 mM; KCl, 10 mM; MgSO₄, 1 mM y β -mercaptoetanol, 50 mM. Esta solución es estable a 4°C.

Solución de ONPG: 40 mg de *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido se disolvieron en 10 ml de tampón fosfato 0,1 M pH 7. Esta solución es estable a 4°C en oscuridad.

Rutinariamente los ensayos de β -galactosidasa se realizaron por triplicado.

12. OBTENCIÓN DEL CONTENIDO PROTEICO TOTAL DE CULTIVOS BACTERIANOS

Para analizar la expresión del dominio N-terminal de la proteína XylS fusionado a una cola de hexa-histidina o a la proteína GST fue necesaria la obtención de la fracción proteica soluble e insoluble a partir de un cultivo de la cepa que estaba expresando la proteína recombinante. Para ello, la cepa correspondiente de *E. coli* se cultivó en medio líquido en agitación durante 12-16 horas a 30°C, tras este tiempo

se diluyó 100 veces en 50 ml del mismo medio y se cultivó en las mismas condiciones hasta alcanzar una turbidez a 600 nm de 0,6-0,7, momento en el cual se añadió IPTG hasta una concentración final de 1 mM. Transcurridas 3-4 horas tras la inducción del cultivo, las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en 3 ml de Tampón A, tras lo cual se rompieron con la prensa de French "French^R Pressure Cell Press" (ASM-AMINCO). Para eliminar los restos celulares, los lisados se centrifugaron a 5000 rpm, el sobrenadante resultante de esta centrifugación se sometió a otra centrifugación a 13000 rpm con el fin de separar la fracción proteica soluble de la insoluble (esta última se resuspendió en 250 µl de Tampón A). Ambas fracciones fueron analizadas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS como se describe en el apartado 14.2 de esta sección.

Las soluciones empleadas en este ensayo se conservaron a 4°C y su composición fue la siguiente:

Tampón A: Na₂HPO₄ 20 mM pH 7,2; NaCl 1 M; Tritón X-100 0,1% (v/v); glicerol 10% (v/v); β-mercaptoetanol 1 mM.

IPTG: Se preparó una solución 100 mM en H₂O y se esterilizó mediante filtración con filtros de 0,22 µm.

13. PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN MBP-NXylS

Para la purificación del extremo amino-terminal del regulador XylS se utilizó una construcción que incrementa la solubilidad de proteínas en la cual el péptido de interés se expresa fusionado a la proteína MBP (proteína de unión a la maltosa). La proteína de fusión MBP-NXylS se purificó a partir de células de *E.coli* DH5α que portaban el plásmido pMAL-Nxyl. Dicha cepa se cultivó en medio rico suplementado con glucosa y Ap. Para la inducción de la expresión de la proteína de fusión se realizó una dilución 1:100 del cultivo anterior y se cultivó a 30°C hasta alcanzar una turbidez a 600 nm de 0,6-0,7, momento en el cual se añadió IPTG

hasta una concentración final de 1 mM. Transcurridas 4 horas tras la inducción del cultivo, las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en tampón de columna suplementado con el inhibidor de proteasas "Complete™ Mini Protease Inhibitor Cocktail" (Roche Molecular Biochemicals, ref. 1836153). Para romper las células y obtener la fracción proteica soluble se utilizó la prensa de French "French^R Pressure Cell Press" (ASM-AMINCO) y dos rondas de centrifugación a 5.000 y 13.000 rpm. Tras eliminar el material particulado, el sobrenadante se diluyó 5 veces en tampón de columna y se analizó en geles de poliacrilamida desnaturizante como se describe en el apartado 14.2 de esta sección.

Para la purificación de la proteína de fusión MBP-NXylS se utilizó la columna XK16 de la casa comercial Amersam Pharmacia Biotech (ref. 18-8773-01); dicha columna se rellenoó con una resina de amilosa suministrada por la casa comercial New England Biolabs (ref. E8021L). La columna se lavó con tampón de columna siguiendo las instrucciones del fabricante y posteriormente se cargó la fracción proteica soluble. Para eliminar las proteínas que no se habían adherido a la columna, ésta se lavó con tampón de columna y por último se procedió a la elución de la proteína de fusión MBP-NXylS pasando por la columna una solución de maltosa en tampón de columna a la concentración final de 10mM. El flujo utilizado a lo largo de todo el ensayo fue de 0,25 ml por minuto. Las fracciones que presentaron un mayor grado de pureza y una alta concentración se limpiaron mediante diálisis. Para ello se utilizaron tubos de diálisis "Spectra Por^R Diálisis tubing MWCO 6000-8000" de 25 mm de anchura de la casa comercial SERVA (ref. 44170.01), preparados según las instrucciones del fabricante. La diálisis se realizó frente a tampón de columna durante al menos 24 horas.

La composición de los medios y de las soluciones empleadas en este ensayo fue la siguiente:

Medio rico: Bactotripton, 10 g; extracto de levadura, 5 g; NaCl, 5 g; glucosa, 2 g y H₂O hasta 1 litro. Este medio se esterilizó mediante autoclave.

IPTG: Se preparó una solución 100 mM en H₂O y se esterilizó mediante filtración con filtros de 0,22 µm.

Tampón de columna: Tris-HCl pH 7,4, 20mM; NaCl, 200mM; EDTA, 1mM.

14. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Para la determinación de la cantidad de proteínas en extractos libres de células se utilizó el método Bradford (1976). Los reactivos para la determinación de proteínas por este método fueron suministrados por la casa comercial Bio-Rad (Bio-Rad Dye reagent concentrate, ref. 500-0006). Se hicieron diluciones 10⁻¹, 10⁻² y 10⁻³ de la fracción soluble obtenida tras la lisis celular y se completaron las muestras hasta un volumen final de 800 µl con H₂O, posteriormente se añadieron 200 µl del colorante comercial y se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente. Se determinó la absorbancia de la muestra a 595 nm y la concentración de proteínas se estimó utilizando como patrón una solución de albúmina.

15. TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A MEMBRANAS DE NITROCELULOSA E INMUNODETECCIÓN ("WESTERN-BLOTTING")

15.1. Preparación de lisado celular total

Entre 1 y 10 ml de un cultivo de células en la fase de crecimiento deseada se recogieron por centrifugación a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sedimento celular se resuspendió en tampón de muestra (Laemmli, 1970) a razón de 50 µl por cada equivalente de DO₆₆₀-ml. El número de equivalentes de DO₆₆₀-ml se calculó multiplicando el

volumen (en ml) de cultivo centrifugado por su DO_{660} en el momento de la recogida. Para eliminar la viscosidad de la muestra debida a los ácidos nucleicos, se añadieron 2,5 U de la endonucleasa comercial "Benzonasa" (Merck, ref. 1.01653), por cada equivalente de DO_{660} -ml. Tras 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, las muestras se solubilizaron calentándolas durante 5 minutos a 95°C , y después se enfriaron en hielo. Las células sin romper y los restos celulares de mayor tamaño se eliminaron por centrifugación a 14.000 rpm durante 3 minutos. Para el análisis electroforético de la muestra se utilizaron 15 μl de este sobrenadante (0,3 equivalentes de DO_{660} -ml). Como patrones de peso molecular se utilizaron, indistintamente los marcadores comerciales "SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range" (Bio-Rad Laboratories, ref. 161-0317) o "Calibration Proteins for SDS-Gel Electrophoresis" (Roche Molecular Biochemicals, ref. 1317474). Éstos se diluyeron en tampón de muestra según las recomendaciones del fabricante, y se solubilizaron de manera idéntica a las demás muestras.

15.2. Separación de proteínas por electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (EGPA-SDS)

Para la separación electroforética de proteínas se utilizó el equipo de electroforesis vertical "Mini-PROTEAN II" (Bio-Rad Laboratories, ref. 165-2940) siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. Las electroforesis se realizaron utilizando geles discontinuos de poliacrilamida de 0,75 mm de espesor, de acuerdo con el método descrito por Laemmli (1970). Cada gel constaba de un segmento superior concentrador (con 4% [p/v] de poliacrilamida) y un segmento inferior separador (con una concentración de poliacrilamida entre el 8 y el 12% [p/v] dependiendo del tamaño de las proteínas a separar). Tanto los geles como el tampón de electroforesis contenían 0,1% (p/v) de SDS. Las proteínas separadas se visualizaron mediante tinción con el colorante Azul Coomasie.

15.3. Transferencia a nitrocelulosa e inmunodetección

Para la transferencia de las proteínas separadas electroforéticamente, se utilizó una membrana de nitrocelulosa "Immobilon-NC" (Millipore, ref. HAHY304F0) de 0,45 μm de diámetro de poro. Tras la electroforesis, el gel separador y la membrana se equilibraron brevemente en tampón de transferencia (Tris, 20 mM; glicina, 150 mM; etanol 20% [v/v]). La transferencia se realizó utilizando el equipo "Mini Trans-Blot" (Bio-Rad Laboratories, ref. 170-3930) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Tras la transferencia, la membrana se sumergió en rojo Ponceau (Ponceau S, 0,2% [p/v]; ácido tricloroacético, 3% [p/v]) y se agitó suavemente durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después, se lavó 3 ó 4 veces con H_2O_d hasta que las bandas de proteína se visualizaron claramente y finalmente, se secó entre dos hojas de papel "Whatman 3MM" (Whatman International Ltd., ref. 3030917). Así, a la vez que se comprobó la eficiencia de la transferencia, se marcó a lápiz la posición de las bandas correspondientes a los patrones de peso molecular. En este punto, la membrana se guardó para su uso posterior o se utilizó inmediatamente para la detección inmunológica. Para ello, la membrana se incubó en agitación durante 5 minutos en tampón PBS (NaCl, 137 mM; KCl, 2,7 mM; Na_2HPO_4 , 10 mM pH 7,4) suplementado con 5% (p/v) de leche desnatada. La membrana se incubó con el primer anticuerpo (diluido en PBS-leche) con agitación, durante 1 hora a temperatura ambiente o, alternativamente, durante toda la noche a 4°C. Después se realizaron 3 lavados con PBS-leche de 5 minutos cada uno y se añadió el segundo anticuerpo, conjugado a peroxidasa (diluido en PBS-leche). Tras incubarse en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS y se procedió al revelado utilizando un sustrato cromogénico. Para ello, la membrana se incubó, en oscuridad, en una solución recién preparada de PBS, con 0,6 mg/ml de 3,3'-diaminobencidina y 0,03% (v/v) de H_2O_2 . Cuando las

bandas de producto precipitado se visualizaron nítidamente, la reacción se paró lavando varias veces con H₂O_d.

Como anticuerpos primarios se utilizaron los siguientes:

- Anti-His Antibody (Amersham Pharmacia Biotech, ref. 27-4710). Es un anticuerpo monoclonal de ratón que reacciona con polipéptidos que contienen una cola de hexahistidina. Este anticuerpo se utilizó a una dilución 1:3.000.
- Anti MBP (New England Biolabs, ref. E8030S). Es un anticuerpo policlonal de conejo generado contra la proteína de unión a maltosa. Para su uso se diluyó 10.000 veces.
- Anti- XylS (Gramsch Laboratories). Este anticuerpo policlonal de conejo está dirigido contra el extremo amino terminal de la proteína XylS. Este anticuerpo se utilizó a una dilución 1:500.

Como anticuerpos secundarios, se utilizaron anticuerpos de conejo (diluídos 1:1.000) dirigidos contra inmunoglobulinas de ratón (Dakopatts, ref. P161) y anticuerpos de cabra (diluídos 1:500) dirigidos contra inmunoglobulinas de conejo (Cappel, ref. 55682). En ambos casos estaban conjugados a peroxidasa de rábano.

16. ENSAYOS DE UNIÓN CRUZADA DE PROTEÍNAS

Estos ensayos se llevaron a cabo siguiendo el método descrito por Lu y Abdelal (2001) utilizando las proteínas MBP y MBP-NXylS purificadas. Ambas proteínas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con 3-metilbenzoato a una concentración final de 1 μM, 10 μM y 100 μM. Como control, una fracción de cada proteína se mantuvo en ausencia de 3-metilbenzoato. Posteriormente, cada fracción de proteína se dividió en dos alícuotas, una se mantuvo como control y la otra se trató durante dos horas a temperatura ambiente con glutaraldehído a una

concentración final del 0,005% (v/v). Finalmente, cada muestra se mezcló con un volumen equivalente de tampón de muestra (Laemmli, 1970), se calentó durante 5 minutos a 95°C y se sometió a análisis electroforético.

17. PROGRAMAS INFORMÁTICOS UTILIZADOS

Para el tratamiento y análisis de secuencias de nucleótidos y aminoácidos (determinación de las fases de lectura abierta, de los sitios de restricción, uso de codones, composición de aminoácidos, etc) se emplearon los programas informáticos DNA Strider v 1.1 (Marck, 1988) y SeqEd v. 1.0.3 (Applied Biosystems, Inc., 1992).

Para el diseño y análisis de oligonucleótidos (para secuenciación y PCR) se utilizaron los programas informáticos OLIGO v. 4.05 (W. Rychlik, National Biosciences, Inc., 1992) y Amplify v. 2.52 β (B. Engels, Universidad de Wisconsin, 1996). Para la estimación de la temperatura de hibridación de los oligonucleótidos se usó el programa "T_m determination" (Breslauer *et al.*, (1986)) que se encuentra disponible en Internet (<http://alces.med.umn.edu/rawtm.html>) que, además de la composición de bases, también tiene en cuenta su secuencia.

Resultados

Capítulo 1

BÚSQUEDA DE RESIDUOS CRÍTICOS EN LA INTERACCIÓN DE XylS CON SUS EFECTORES

Como se ha descrito anteriormente, los genes que codifican la ruta *meta* del plásmido TOL pWW0 (Figura 1.2) están agrupados en un operón cuya expresión se regula positivamente a nivel transcripcional por la proteína XylS, la cual se activa mediante efectores de tipo benzoato (Ramos *et al.*, 1997).

Otro plásmido TOL bien estudiado es pWW53 (Figura 1.1), este plásmido se encontró en la cepa *Pseudomonas putida* MT53 (Keil *et al.*, 1985), presenta un tamaño de 107 kb, no es autotransmisible y codifica los enzimas necesarios para el catabolismo de toluenos y xilenos. El operón que codifica los enzimas de la ruta "upper" (*xylUWCMABN*) está localizado entre dos operones *meta* (*xylXYZLTEGFJQKIH*) homólogos entre sí y funcionales, aunque se pueden diferenciar entre sí ya que poseen patrones de restricción distintos (Osborne *et al.*, 1988). Assinder y colaboradores (1993) clonaron y secuenciaron tres regiones del plásmido TOL pWW53 que hibridaron con el gen *xylS*_{pww0}. La comparación de las secuencias de ADN reveló que *xylS1*_{pww53} presentaba un 99% de identidad con *xylS*_{pww0} y se localizaba de forma contigua a *xylR*_{pww53}, esta organización era idéntica a la que muestran *xylS/xylR* en pWW0. La secuencia codificante de *xylS3*_{pww53} fue un 87% idéntica a la de *xylS*_{pww0}, aunque la secuencia no codificante aguas arriba del primer ATG era muy distinta. Además, el extremo C-terminal de XylS_{pww53} se extiende 10 aminoácidos con respecto a XylS_{pww0} debido a un cambio en la fase de lectura del alelo *xylS3*_{pww53}. *xylS2*_{pww53} es anómalo y se ha sugerido que codifica un pseudogen truncado por una secuencia de inserción (Assinder *et al.*, 1993).

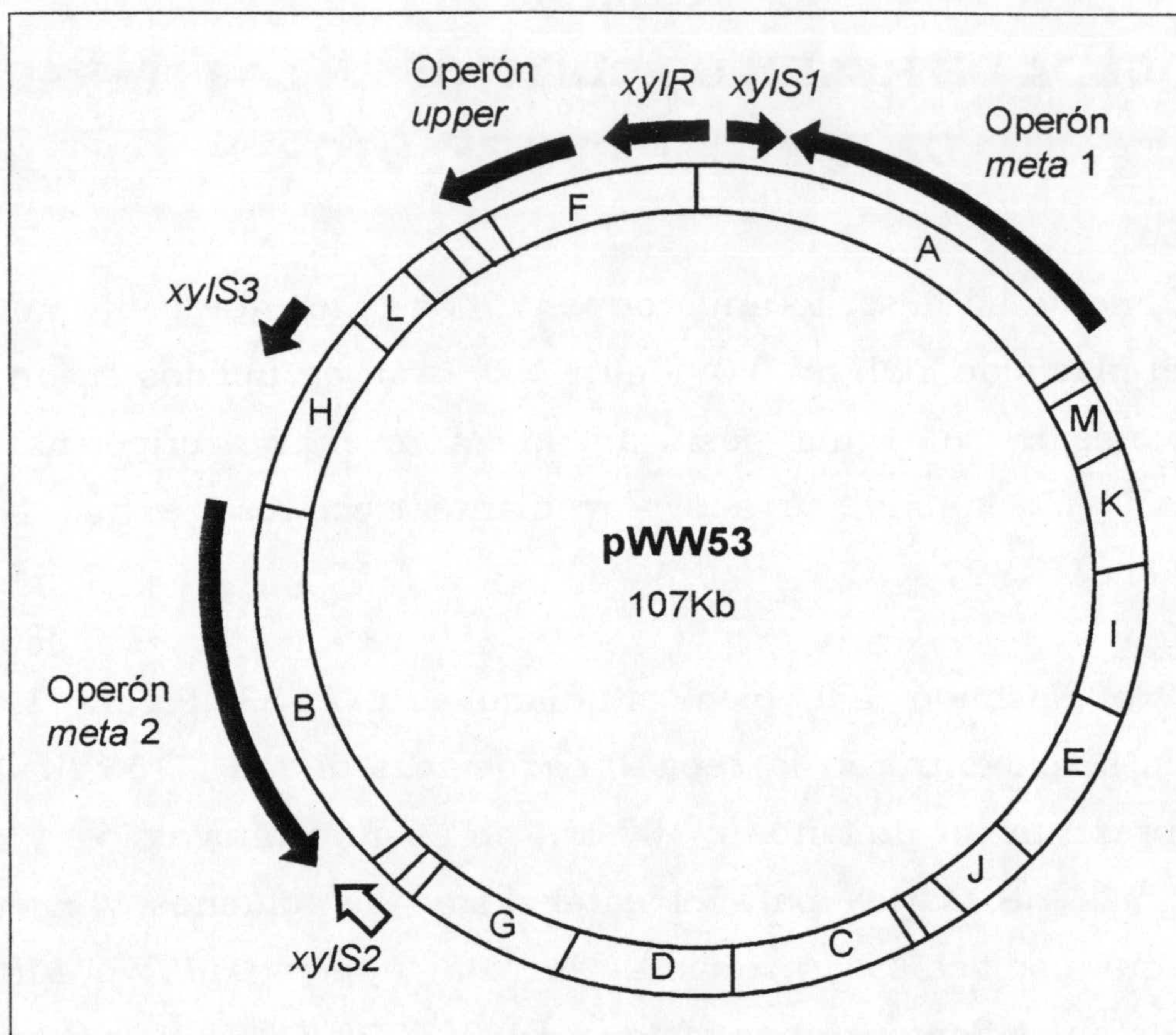


Figura 1.1. Mapa físico de pWW53 y organización de los operones catabólicos y los genes reguladores. Se representa el mapa de restricción del plásmido TOL pWW53 para el enzima *Hind*III. Los fragmentos se nombran por orden alfabético en orden decreciente de acuerdo con su tamaño. Las flechas sólidas indican las regiones que contienen el operón *upper*, los operones *meta1* y *meta2* y los genes reguladores *xylR*, *xylS1* y *xylS3*, así como la dirección de transcripción. La flecha abierta representa el pseudogen *xylS2* (Assinder y Williams, 1990).

Las dos isoformas de XylS, XylS1_{pww53} y XylS3_{pww53} fueron capaces de estimular la transcripción desde el promotor Pm (Gallegos *et al.*, 1997b).

XylS_{pww0} y XylS1_{pww53} sólo se diferencian en 5 aminoácidos (Cys4, Cys53, Gly90, Asp137 e His153 en XylS frente a Arg4, Gly53, Asp90, Glu137 y Asn153 en XylS1) (Figura 1.2).

XylS	MDFCLLNEKSQIFVHAEPYAVSDYVNQYVGTSHIRLPKGGRPAGRLHHRIFGCLDLCRISY
XylS1	MDFRLLNEKSQIFVHAEPYAVSDYVNQYVGTSHIRLPKGGRPAGRLHHRIFGGDLDCRISY
XylS	GGSVRVISPGLETCYHLQIILKGHCLWRGHGQEHYFAPGELLLLNPDDQADLTYSCEKF
XylS1	GGSVRVISPGLETCYHLQIILKGHCLWRDHGQEHYFAPGELLLLNPDDQADLTYSCEKF
XylS	IVKLPSVVLDRACSDNNWHKPREGIRFAARHNLQQLDGFINLLGLVCDEAEHTKSMPRVQE
XylS1	IVKLPSVVLDRACSENNWHKPREGIRFAARHNLQQLDGFINLLGLVCDEAEHTKSMPRVQE
XylS	HYAGIIASKLLEMLGNSVSREIFSKGNPSFERVVQFIEENLKRNISLERLAELAMMSPRSL
XylS1	HYAGIIASKLLEMLGNSVSREIFSKGNPSFERVVQFIEENLKRNISLERLAELAMMSPRSL
XylS	YNLFEKHAGTTPKNYIRNRKLESIRACLNDPSANVRSITEIALDYGFLHLGRFAENYRSF
XylS1	YNLFEKHAGTTPKNYIRNRKLESIRACLNDPSANVRSITEIALDYGFLHLGRFAENYRSF
XylS	GELPSDTLRQCKKEVA
XylS1	GELPSDTLRQCKKEVA

Figura 1.2. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las proteínas XylS_{p_{ww}} y XylS1_{p_{ww53}}. En rojo se muestran los aminoácidos diferentes entre ambas proteínas.

A pesar de estas pequeñas diferencias, XylS1 muestra un perfil de efector mucho más estrecho que XylS (Figura 1.3), de hecho, mientras que XylS1 reconoce como efectores el 3-metilbenzoato (3MBz) y el 3-clorobenzoato (3ClBz), XylS reconoce además de éstos a otros alquil- y clorobenzoatos con sustituyentes en las posiciones 2 y 4 (Ramos *et al.*, 1990b). Además, los niveles de transcripción desde P_m mediados por XylS son de 6 a 10 veces más altos que aquellos que están mediados por XylS1 (Gallegos *et al.*, 1997) (Figura 1.3).

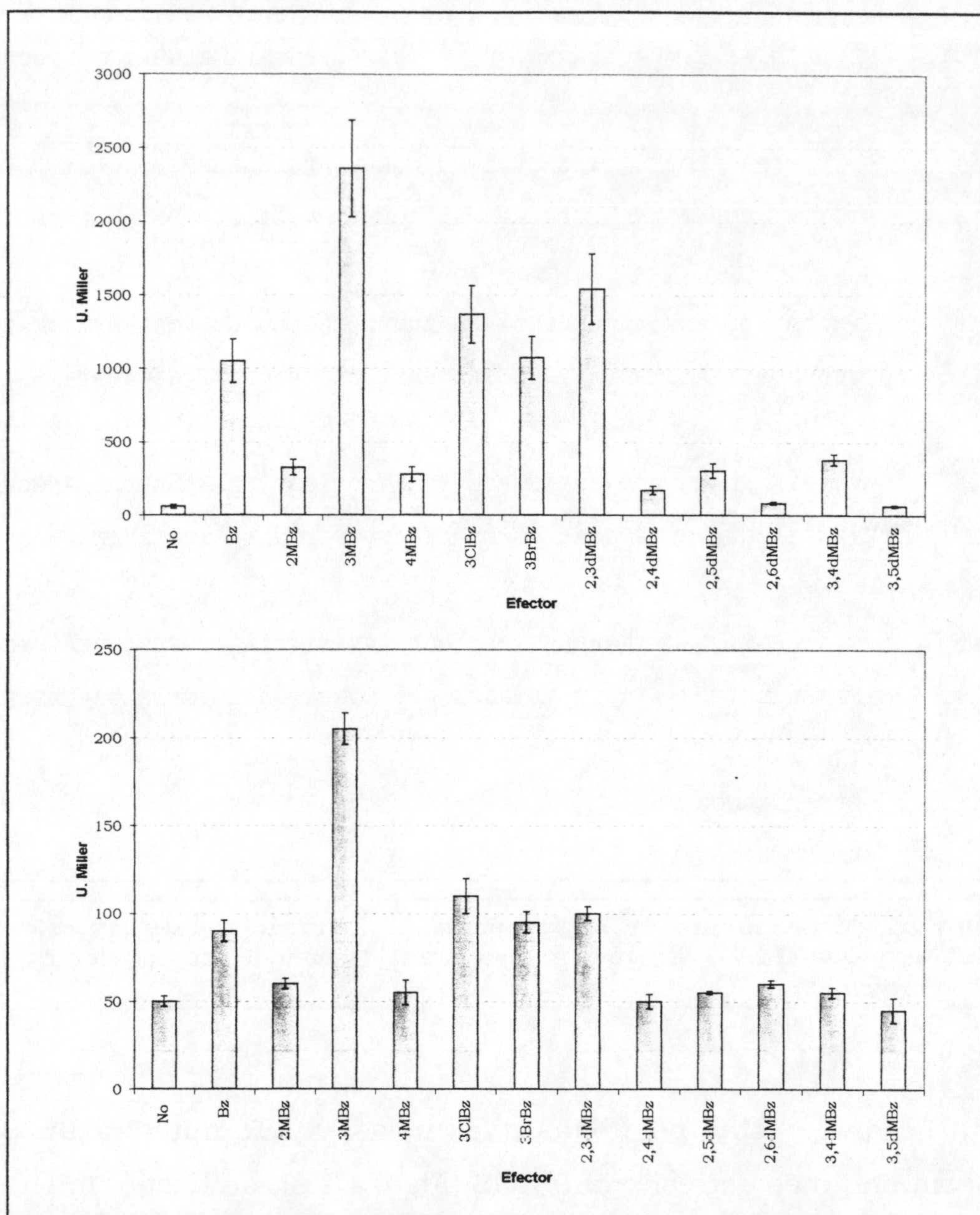


Figura 1.3. Perfil de efector de las proteínas XylS y XylS1. Se muestra el perfil de efector de XylS (panel A) y el de XylS1 (panel B). Las medidas de actividad β -galactosidasa se realizaron en *E. coli* MC4100 [pERD100 (Pm::'lacZ), pLAR1 (XylS) o pLAR32 (XylS1)].

Esta diferencia en el perfil de efector es consistente con los cambios que existen en el extremo N-terminal de estos dos reguladores, en particular porque previamente se habían aislado mutantes de XylS que presentaban una especificidad de efector alterada (por ejemplo, el mutante

XylS Arg45→Thr presentaba una mayor afinidad por los efectores) o un peor reconocimiento del efector (por ejemplo el mutante XylS Arg41→Leu). Estos resultados sugerían que el extremo N-terminal de XylS estaba implicado en el reconocimiento del efector y en la activación del regulador (Michán *et al.*, 1992a; Ramos *et al.*, 1990b).

Para determinar cual o cuales de los residuos que eran distintos en XylS_{1pww53} versus aquellos en XylS_{pww0} eran los responsables de estas diferencias, se decidió introducir una serie de mutaciones en XylS en las posiciones 4, 53, 90, 137 y 153, de modo que estos residuos de XylS se sustituyeron por los que ocupan estas mismas posiciones en XylS₁ y se analizó el efecto que ejercía cada uno de los cambios, de manera individual o en sus combinaciones, sobre la actividad transcripcional de los mutantes.

1.1. Construcción de mutantes de XylS.

Para la obtención de mutantes puntuales de XylS se empleó el método de mutagénesis dirigida por PCR solapante descrito en el apartado 10.2 de la sección Materiales y Métodos utilizando como ADN molde el plásmido pCMX2 que contiene un fragmento de 1,7 kb *Bam*HI en el que se encuentra el alelo *xylS*_{XhoI} expresado desde sus dos promotores naturales Ps1 y Ps2 (Figura 1.4). Este alelo presenta un sitio *Xho*I que se introdujo mediante mutagénesis dirigida de forma que se produjo una mutación silenciosa (Manzanera *et al.*, 2000). La construcción del mutante Cys4→Arg se llevó a cabo utilizando los oligonucleótidos externos U224 y R214 y con el par de oligonucleótidos mutagénicos C4R/C4RC. El fragmento de ADN mutado que se obtuvo tras la amplificación se digirió con las enzimas *Hind*III y *Bgl*II para obtener un fragmento mutado *Hind*III-*Bgl*II de 321 pb que se intercambió por el fragmento *Hind*III-*Bgl*II silvestre que portaba el plásmido pCMX2. Para la construcción de los mutantes Cys53→Gly, Gly90→Asp, Asp137→Glu e His153→Asn se utilizaron los

oligonucleótidos externos U20T y R20T y los pares de oligonucleótidos mutagénicos C53G/C53GC, G90D/G90DC, D137E/D137EC y H153N/N153NC para los cuatro mutantes respectivamente. El fragmento de ADN mutado que se obtuvo tras la amplificación se digirió con las enzimas *Bgl*II y *Xho*I para obtener un fragmento mutado *Bgl*II-*Xho*I de 761 pb que se intercambió por el fragmento *Bgl*II-*Xho*I silvestre que portaba el plásmido pCMX2. De este modo se obtuvieron los plásmidos pCMX2::*xyl*S* (el asterisco indica que uno o más aminoácidos de la proteína silvestre se ha/han cambiado).

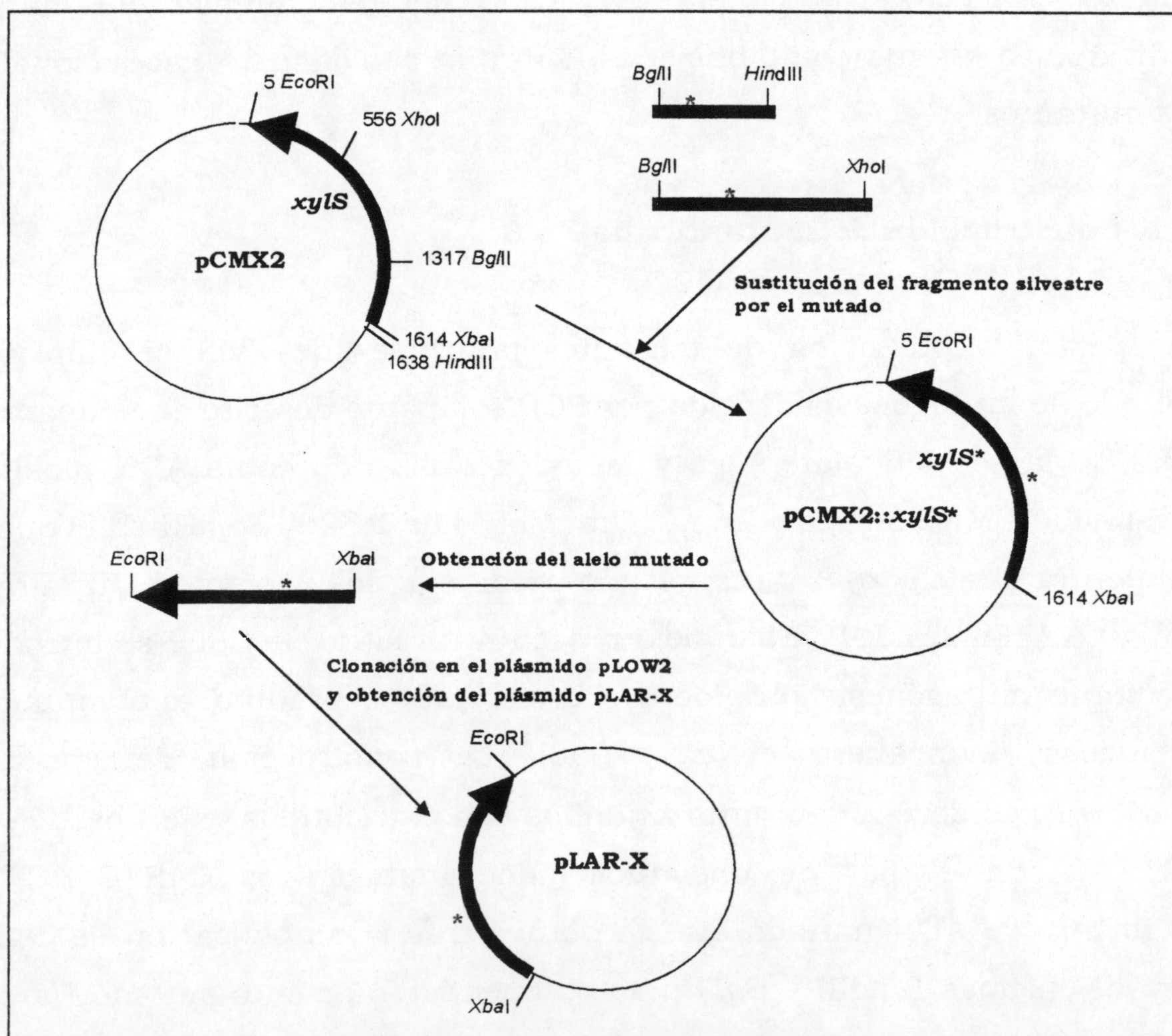


Figura 1.4. Construcción de mutantes de *xyl*S. El asterisco rojo indica una mutación en el fragmento obtenido tras la PCR solapante o en un alelo de *xyl*S. Se indica la posición de algunas dianas de restricción. La flecha indica el sentido de transcripción del gen *xyl*S. La X simboliza un número entre 1 y 6. Ver detalles en el texto.

Los plásmidos pCMX2::*xylS** que portan los alelos mutantes de *xylS** fueron digeridos con *EcoRI* y *XbaI* y los fragmentos *EcoRI* y *XbaI* de 1609 pb que contenían los alelos mutantes completos de *xylS** se subclonaron entre los sitios *EcoRI* y *XbaI* de pLOW2 para generar los plásmidos pLAR1 a pLAR6 que codifican las proteínas que se indican en la Tabla 1.1. El paso de subclonaje en pLOW2 fue necesario puesto que se había observado la aparición de mutaciones espontáneas en el gen *xylS* cuando éste estaba clonado en un vector de alto número de copias y se habían obtenido altos niveles basales de expresión desde Pm cuando el regulador se encontraba a alta concentración.

Todos los alelos mutantes construidos en este trabajo se secuenciaron para confirmar que portaban la mutación deseada y que no se habían introducido mutaciones adicionales.

1.2. Respuesta de los reguladores XylS mutantes a benzoatos sustituidos en la posición 3 del anillo aromático.

En una primera serie de ensayos se utilizó como efector el 3-metilbenzoato (3MBz) puesto que es el mejor efector tanto para XylS como para XylS1.

Para llevar a cabo los ensayos, la cepa *E. coli* MC4100 se transformó con pERD100 (Pm::*lacZ*) y con el plásmido pLAR1 (*xylS*), pLAR2 (*xylSC4R*), pLAR3 (*xylSC53G*), pLAR4 (*xylSG90D*), pLAR5 (*xylSD137E*), pLAR6 (*xylSH153N*), o pLAR32 (*xylS1*). Esta cepa se cultivó a 30°C durante 12 a 16 horas en LB con los antibióticos adecuados, tras lo cual se diluyó 100 veces en el mismo medio y tras 1 hora de incubación a 30°C se dividió en dos fracciones alícuotas, la primera se mantuvo como control y a la segunda se le añadió el inductor 3MBz en concentración 1mM. La actividad β -galactosidasa se determinó tras 4,5 horas de incubación a 30°C. Los resultados se muestran en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1. Razón de inducción mediada por XylS_{p_{WWO}} silvestre y varios mutantes de este regulador con distintos efectores.

REGULADOR		3MBz	3C1Bz	3BrBz
XylS _{p_{WWO}}		39	23	18
Mutantes Simples	C4R	32	14	10
	C53G	37	25	20
	G90D	36	17	12
	D137E	20	10	8
	H153N	20	10	8
Mutantes Dobles	4+53	17	9	7
	4+90	14	6	5
	4+137	11	4	3
	4+153	9	4	3
	53+90	36	17	12
	53+137	22	10	8
	53+153	19	10	6
	90+137	21	8	6
	90+153	26	12	8
137+153	5	2	2	
Mutantes Triples	4+53+90	15	7	5
	4+53+137	6	3	2
	4+53+153	17	8	6
	4+90+137	6	3	2
	4+90+153	8	4	3
	4+137+153	3	2	2
	53+90+137	9	3	2
	53+90+153	14	6	5
	53+137+153	5	2	2
90+137+153	3	2	2	
Mutantes Cuádruples	4+53+90+137	10	5	3
	4+53+90+153	13	6	5
	4+53+137+153	5	1	1
	4+90+137+153	5	1	1
	53+90+137+153	5	2	3
XylS1 _{p_{WW53}}		4	2	2

E. coli MC4100 con los plásmidos pERD100 (Pm::lacZ) y pLAR-X (que codifican los mutantes de XylS mostrados en la tabla) se cultivaron en medio LB con Tc y Km. La actividad β -galactosidasa se determinó como se indica en el texto. En cada caso se realizaron de 3 a 5 determinaciones independientes y las desviaciones estándar en todos los casos fueron inferiores al 10% de la media. La razón de inducción es el nivel de enzima en células cultivadas en presencia del inductor respecto al nivel determinado en células cultivadas sin efector. Los niveles basales de actividad estuvieron comprendidos entre 30 y 50 unidades Miller en todos los casos.

Como se puede observar, el nivel de transcripción mediado por el regulador XylS silvestre aumentó unas 40 veces respecto al nivel basal, mientras que la proteína XylS1 mediaba una inducción de sólo 4 veces. Respecto a los mutantes simples, los cambios C4→R, C53→G y G90→D tuvieron un pequeño efecto mientras que los mutantes puntuales D137→E y H153→N presentaron un efecto moderado, puesto que la actividad descendió hasta casi el 50% respecto a la actividad mostrada por la proteína XylS silvestre (Tabla 1.1).

Puesto que el nivel de inducción mediado por XylS1 con 3MBz fue significativamente menor que el mediado por los mutantes simples, se generaron todas las posibles mutaciones dobles. Los mutantes simples construidos anteriormente se utilizaron para construir los mutantes dobles siguiendo la técnica descrita en el apartado 1.1 de esta sección (Figura 1.5).

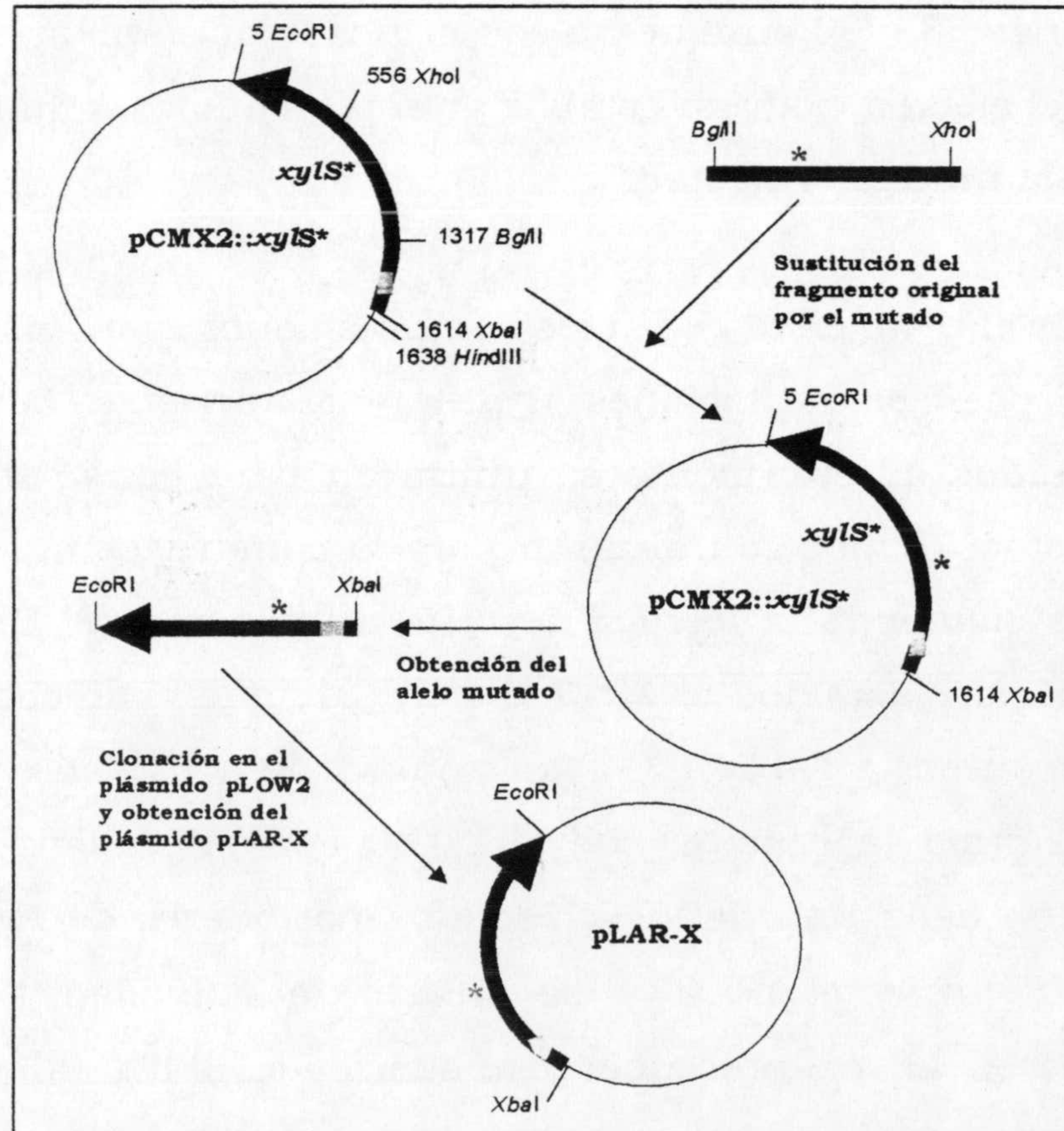


Figura 1.5. Construcción de los mutantes dobles de XylS. El asterisco rojo indica una mutación en el fragmento obtenido tras la PCR solapante o en un alelo de *xylS*. Se indica la posición de algunas dianas de restricción. La flecha indica el sentido de transcripción del gen *xylS*. El cuadrado amarillo representa una mutación ya existente en el gen *xylS*. La X simboliza un número del 7 al 16. De este modo se obtuvieron los plásmidos pLAR7 a pLAR16 que codifican las proteínas que se indican en la Tabla 1.1. Ver detalles en el texto.

La cepa *E. coli* MC4100 portadora del plásmido pERD100 (Pm::*lacZ*) se transformó con cada uno de los plásmidos portadores de los alelos mutantes de *xylS* (serie pLAR-X) y se ensayó la actividad β -galactosidasa en cultivos en LB en presencia y ausencia de 3MBz tal y como se ha descrito anteriormente. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1.1.

Como se puede observar, el nivel de inducción del doble mutante XylSD137E-H153N fue similar al de XylS1 (Tabla 1.1). La combinación de la mutación D137E o H153N con C4R dio lugar a unos niveles de actividad más bajos que los mediados por cualquiera de los mutantes simples. Sin embargo, cuando la mutación D137E o H153N se combinó con una mutación en la posición 53 ó 90, la actividad fue similar a la que se observó con la mutación D137E o H153N sola (Tabla 1.1).

El nivel de inducción mediado por los mutantes dobles C4R-C53G y C4R-G90D fue más bajo que el mediado por los mutantes simples. Parece por tanto que las posiciones 53 y 90 aunque no son críticas por si mismas para el reconocimiento del efector, podrían estabilizar el regulador o influir de un modo indirecto en la unión del efector.

Esto llevó a analizar el resto de las posibles combinaciones, para ello se generaron todas las posibles mutaciones triples y cuádruples. Los mutantes dobles construidos anteriormente se utilizaron para construir los mutantes triples, y éstos últimos se utilizaron para la construcción de los mutantes cuádruples siguiendo la técnica descrita anteriormente. De este modo se obtuvieron los plásmidos pLAR17 a pLAR31, que codifican las proteínas que se indican en la Tabla 1.1. Para analizar la actividad de estos mutantes se transformó la cepa *E. coli* MC4100 con el plásmido pERD100 (Pm::*lacZ*) y con cada uno de los plásmidos portadores de los alelos mutantes de *xylS* (serie pLAR-X) y se ensayó la actividad β -galactosidasa en cultivos en LB en presencia y ausencia de 3MBz tal y

como se ha descrito anteriormente. Los resultados obtenidos se reflejan en la Tabla 1.1.

Como se puede observar, la combinación del mutante doble XylSD137E-H153N con el resto de las mutaciones dio lugar a una serie de reguladores que se comportaron como el mutante doble y mostraron un nivel de inducción similar al de XylS1.

La combinación de cualquiera de los otros mutantes dobles C4R-C53G, C4R-G90D y C53G-G90D con D137E o H153N provocó un descenso significativo de la actividad, lo que sugería que la combinación de mutaciones tenía un efecto sinérgico.

La combinación de cuatro mutaciones en XylS también provocó un descenso significativo en la actividad, aunque el nivel de actividad fue algo más alto que el de XylS1, con la excepción de aquellos mutantes que contenían la combinación D137E-H153N, que mostraron un nivel de actividad similar al de XylS1.

Estos resultados sugieren que los residuos D137 e H153 en XylS son claves en el reconocimiento del efector y en la activación del regulador.

Para determinar si el efecto de las mutaciones era específico para el 3MBz, se analizó el nivel de inducción con otros dos análogos de benzoato sustituidos que son efectores de XylS: 3-clorobenzoato (3ClBz) y 3-bromobenzoato (3BrBz).

Los ensayos se realizaron tal y como se ha descrito anteriormente. Los resultados se presentan en la Tabla 1.1. En general, los efectores 3ClBz, 3BrBz y 2,3dMBz inducen menos actividad β -galactosidasa que el 3MBz con cualquier mutante, y la reducción en el nivel de inducción mediado por cada mutante con estos efectores siguió un patrón similar al descenso observado cuando se utilizó como efector el 3MBz.

1.3. Estabilidad *in vivo* de los mutantes.

Para determinar si el descenso en la activación era debido a una peor estabilidad de las proteínas mutantes, se llevó a cabo un ensayo de Western blot de proteína total de *E. coli* MC4100 que portaba algunos alelos mutantes de XylS utilizando un anticuerpo policlonal dirigido contra la proteína XylS (Figura 1.6). Como se puede observar, en todos los casos la cantidad de proteína XylS mutante fue similar, por lo que las diferencias en los niveles de expresión desde Pm mediados por cada regulador mutante no podrían deberse en principio a una alteración en la estabilidad de las proteínas mutantes.

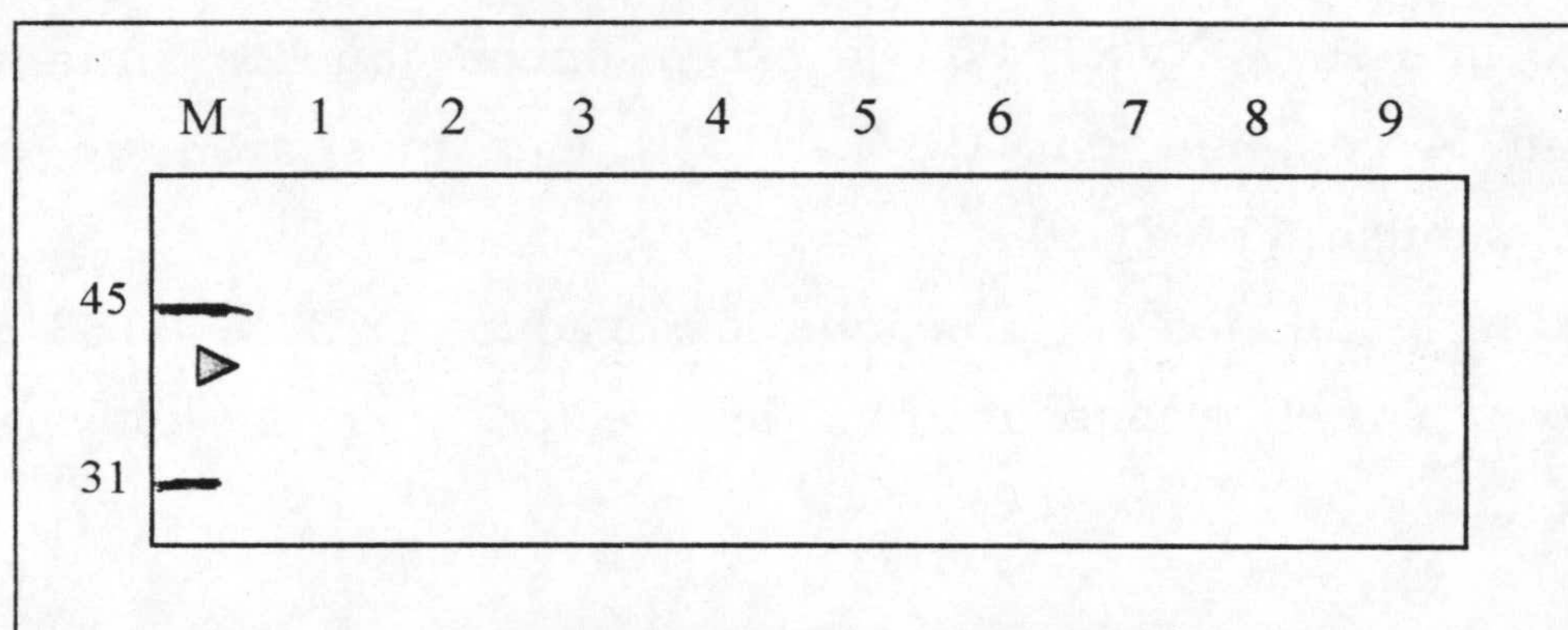


Figura 1.6. Inmunodetección de las proteínas XylS silvestre y mutantes. Se partió de un lisado celular total de un cultivo de *E. coli* MC4100 que porta el plásmido pLAR1 (XylS) (calle 1), pLAR32 (XylS1) (calle2), pLAR5 (XylSD137E) (calle 3), pLAR6 (XylSH153N) (calle 4), pLAR9 (XylSC4R-D137E) (calle 5), pLAR16 (XylSD137E-H153N) (calle6), pLAR21 (XylSC4R-G90D-H153N) (calle 7), pLAR25 (XylSC53G-D137E-H153N) (calle 8) o pLAR30 (XylSC4R-G90D-D137E-H153N) (calle 9). Las proteínas se separaron por electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida al 12% en presencia de SDS y posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Para la detección inmunológica de las proteínas se utilizó el anticuerpo policlonal Anti-XylS. El tamaño (kDa) de las bandas del marcador de peso molecular (M) se indica a la izquierda. La flecha violeta marca la banda que por su tamaño correspondería a la proteína XylS silvestre o sus derivados mutantes.

1.4. Perfil de efector de los reguladores mutantes.

En vista de los resultados anteriores, se decidió caracterizar en mayor detalle los mutantes simples XylSD137E y XylSH153N y el mutante doble XylSD137E-H153N. En primer lugar se determinó el perfil de efector de los reguladores mutantes con todos los posibles metilbenzoatos monosustituídos y disustituídos. Para ello, la cepa *E. coli* MC4100 se transformó con el plásmido pERD100 (Pm::'lacZ) y el plásmido pLAR1 (XylS), pLAR5 (XylSD137E), pLAR6 (XylSH153N), pLAR16 (XylSD137E-H153N) o pLAR32 (XylS1). Esta cepa se cultivó a 30°C durante 12 a 16 horas en LB con los antibióticos adecuados, tras lo cual se diluyó 100 veces en el mismo medio y tras 1 hora de incubación a 30°C se dividió en dos fracciones alícuotas, la primera se mantuvo como control y a la segunda se le añadió como inductor uno de los siguientes benzoatos en concentración 1mM: Benzoato (Bz), 2-metilbenzoato (2MBz), 3-metilbenzoato (3MBz), 4-metilbenzoato (4MBz), 2,3-dimetilbenzoato (2,3DMBz), 2,4-dimetilbenzoato (2,4DMBz), 2,5-dimetilbenzoato (2,5DMBz), 2,6-dimetilbenzoato (2,6DMBz), 3,4-dimetilbenzoato (3,4DMBz) y 3,5-dimetilbenzoato (3,5DMBz). La actividad β -galactosidasa se determinó tras 4,5 horas de incubación a 30°C. Los resultados se representan en la Figura 1.7.

En el caso de la proteína XylS silvestre, la capacidad de inducción de los benzoatos ensayados siguió este orden: 3MBz > 2,3DMBz > Bz > 3,4DMBz > 2MBz = 2,5DMBz = 4MBz > 2,4DMBz > 2,6DMBz = 3,5DMBz. Los dos últimos dimetilbenzoatos no se consideran efectores para XylS. Respecto al perfil de efector que mostraron los mutante simples XylSD137E y XylSH153N y el mutante doble XylSD137E-H153N, se puede observar que los mutantes simples reconocieron la mayoría de los efectores, pero al igual que ocurría con los benzoatos sustituidos en la

UNIVERSIDAD DE GRANADA

17 DIC. 2001

COMISION DE DOCTORADO

posición 3, todos los mutantes mostraron unos niveles de inducción más bajos que los mediados por el regulador silvestre.

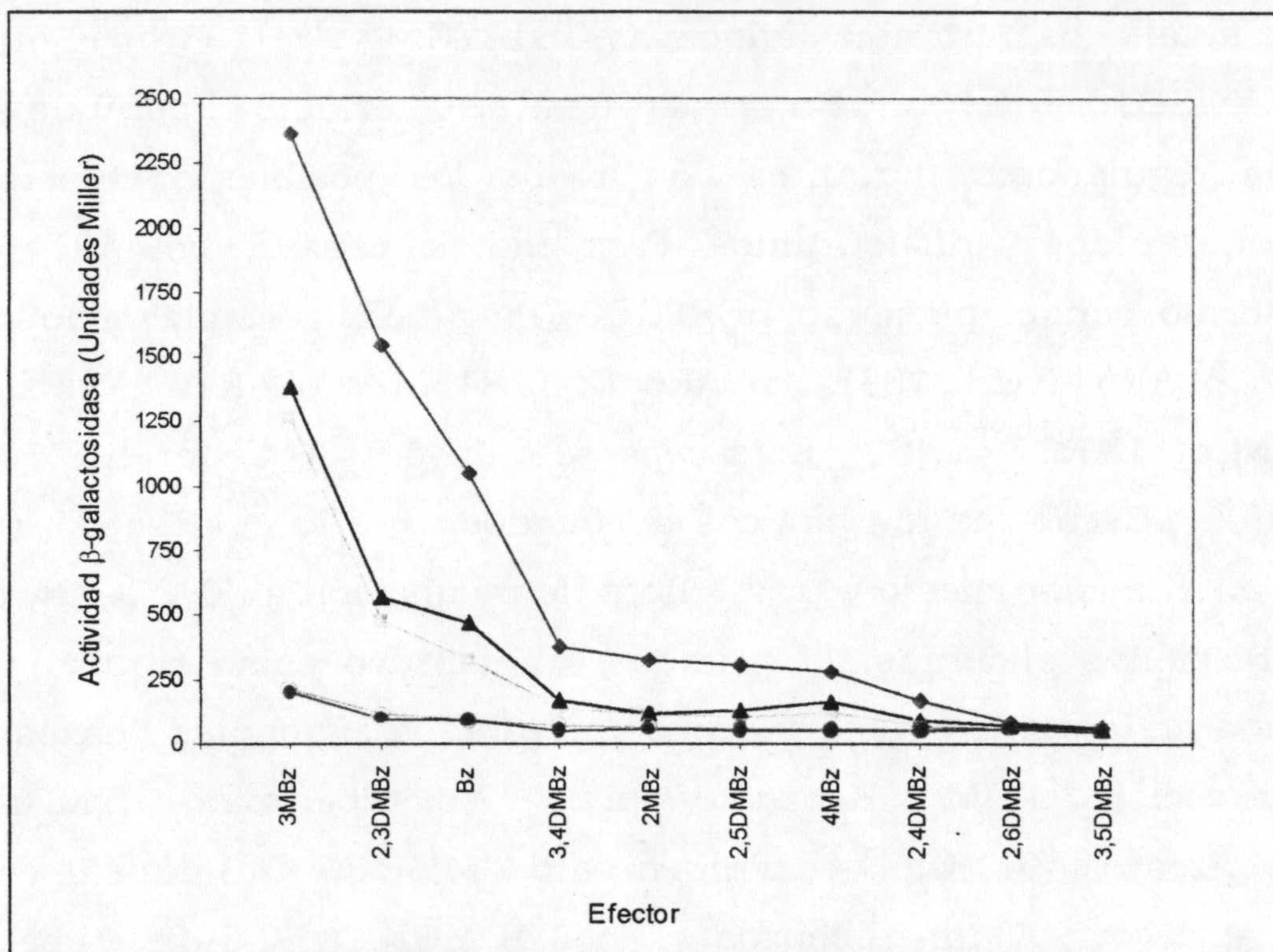


Figura 1.7. Niveles de inducción mediados por XylS y algunos derivados mutantes en respuesta a benzoatos sustituidos. Se muestran los niveles de actividad β -galactosidasa (Unidades Miller) mediados por los reguladores XylS silvestre (♦), XylSD137E (▲), H153N (◻), XylSD137E-H153N (○) o XylS1 (●) en respuesta a diferentes benzoatos mono- y disustituidos. Los resultados son la media de seis determinaciones independientes y las desviaciones estándar en todos los casos fueron inferiores al 15% de la media.

En contraste, el mutante doble XylSD137E-H153N parecía no responder a 3,4dMBz, 2MBz ó 4MBz y mostró un perfil de efector similar, si no idéntico, al que presentó el regulador XylS1.

Con objeto de determinar porqué estos mutantes presentaban un perfil de efector más reducido que XylS_{pww0} se decidió realizar una serie de ensayos para estimar la constante de afinidad aparente (K's) para el 3MBz tanto en los mutantes como en XylS silvestre. Para ello se determinó

la estimulación de la transcripción desde Pm en *E. coli* MC4100 que portaba el plásmido pERD100 (Pm::lacZ) y el plásmido pLAR1 (XylS), pLAR5 (XylSD137E), pLAR6 (XylSH153N), pLAR16 (XylSD137E-H153N) o pLAR32 (XylS1). Para ello esta cepa se cultivó a 30°C durante 12 a 16 horas en LB con los antibióticos adecuados, tras lo cual se diluyó 100 veces en el mismo medio y tras 1 hora de incubación a 30°C se dividió en varias fracciones alícuotas, una se mantuvo como control y a las demás se le añadió como inductor 3MBz en concentración 10µM, 50µM, 100µM, 250µM, 500µM, 1mM y 2mM, y tras 4,5 horas de incubación a 30°C se determinó la actividad β-galactosidasa. Los resultados obtenidos se representan en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2. Actividad mediada por los reguladores XylS en presencia de distintas concentraciones de 3MBz.

[3MBz] (µM)	Regulador				
	XylS	XylSD137E	XylSH153N	XylSD137E-H153N	XylS1
0	60	50	50	60	60
10	200	75	80	75	70
50	595	155	175	85	80
100	935	235	260	100	105
250	1520	470	540	140	145
500	1895	655	740	180	175
1000	2280	985	985	220	210
2000	2415	1115	1160	245	240

Se muestra la actividad β-galactosidasa mediada por los reguladores XylS, XylSD137E, XylSH153N, XylSD137E-H153N y XylS1 en presencia de diversas concentraciones del inductor 3MBz. La actividad β-galactosidasa se determinó como se indica en el texto. Los valores son la media de 6 determinaciones independientes y las desviaciones estándar en todos los casos fueron inferiores al 15% de la media.

La determinación de la constante de afinidad aparente se realizó en todos los casos como el ejemplo siguiente, en el que se han utilizado los datos obtenidos con el regulador XylS silvestre. Al representar los valores obtenidos (Figura 1.8), se puede comprobar que los puntos forman una curva hiperbólica. La velocidad máxima y la K_s (concentración de 3MBz a la que se obtiene una velocidad semimáxima) se determinó tras la representación de la inversa de la concentración de sustrato (en este caso 3MBz) frente a la inversa de la velocidad (actividad β -galactosidasa obtenida con cada concentración de 3MBz) (Figura 1.8).

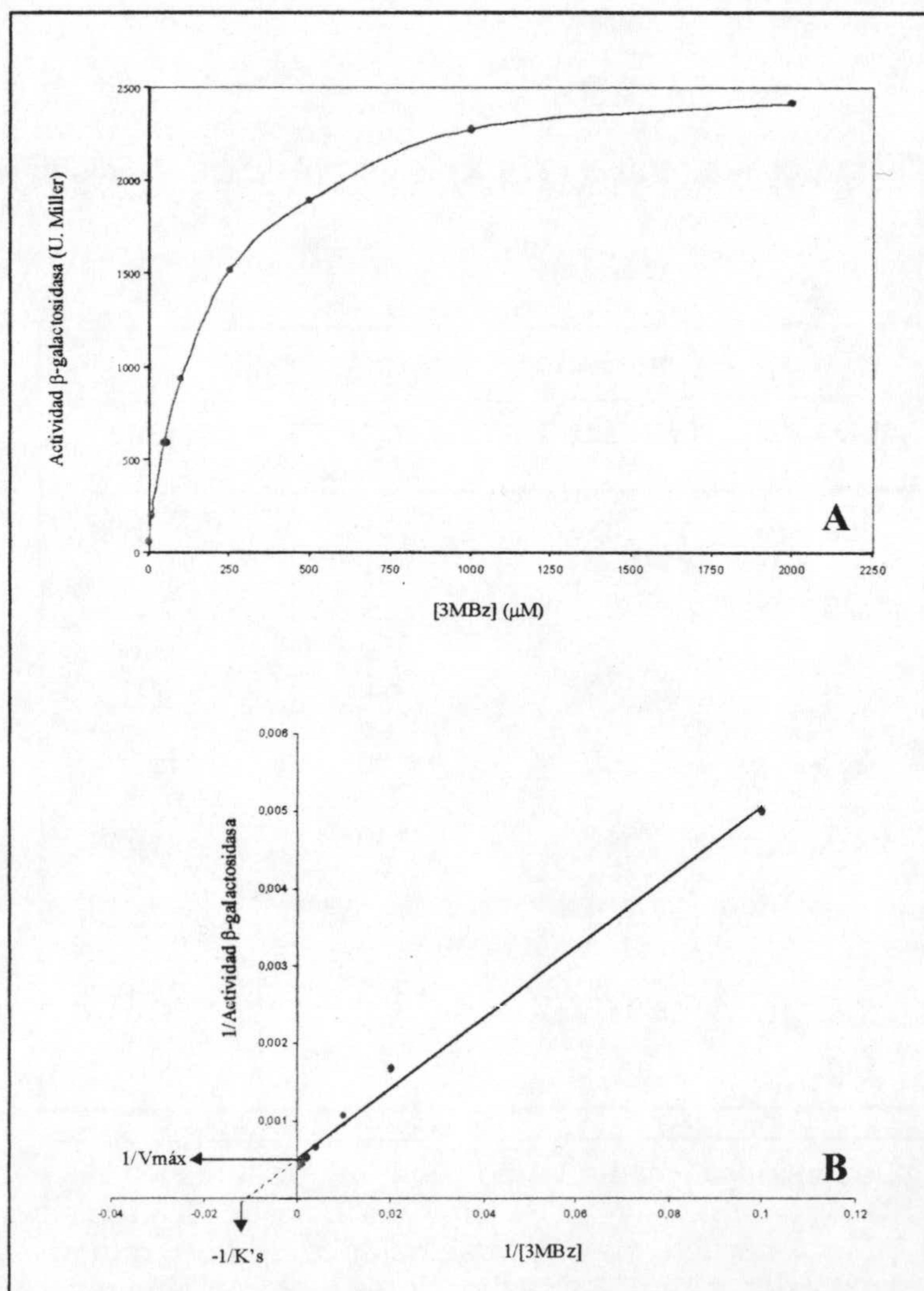


Figura 1.8. Determinación de la K_s para el 3MBz de la proteína XylS.

Panel A. Efecto de la concentración de 3MBz en la transcripción desde Pm mediada por la proteína XylS silvestre.

Panel B. Representación de Lineweaver-Burk. Los puntos rojos corresponden a los valores obtenidos en el ensayo y la línea azul es la recta de regresión correspondiente a los mismos. Se indica además cómo a partir del punto de corte de la recta con los ejes de abscisas y ordenadas se estima la K_s y la $V_{m\acute{a}x}$.

La Tabla 1.3 muestra los resultados obtenidos con cada mutante. Como se puede observar, la $V_{m\acute{a}x}$ fue significativamente menor (entre 1250 unidades Miller para XylSD137E y 200 unidades Miller para XylS1) mientras que la K_s fue de 2 a 3 veces más alta (por ejemplo, 350 μ M para XylS1 y 490 μ M para XylSD137E) que la que se había determinado para XylS. Esto sugería que las mutaciones en el regulador XylS interferían en el reconocimiento del efector y por lo tanto disminuían la activación de la transcripción desde Pm.

Tabla 1.3. K_s y $V_{m\acute{a}x}$ de las proteínas XylS mutantes para el 3MBz.

Regulador	K_s	$V_{m\acute{a}x}$
XylS	165 \pm 5	2500 \pm 250
XylSD137E	490 \pm 50	1250 \pm 70
XylSH153N	450 \pm 10	1200 \pm 125
XylSD137E-H153N	365 \pm 20	210 \pm 10
XylS1	355 \pm 15	205 \pm 15

Se muestra la K_s y $V_{m\acute{a}x}$ para los reguladores XylS, XylSD137E, XylSH153N, XylSD137E-H153N y XylS1. Los datos mostrados son la media de 6 determinaciones independientes. Ver condiciones en el texto.

1.5. Caracterización de una colección de mutantes de XylS en las posiciones 137 y 153.

Para confirmar el papel crucial de los residuos 137 y 153 de XylS en el reconocimiento del efector y en la activación del regulador, se decidió introducir tantas mutaciones como fuese posible en estas dos posiciones de la proteína XylS. Los mutantes se obtuvieron mediante mutagénesis dirigida por PCR solapante del mismo modo que se ha descrito en el

apartado 1.1, utilizando como oligos externos U20T y R20T y como oligos mutagénicos los pares D137X/D137XC y H153X/H153XC para mutar las posiciones 137 y 153 respectivamente. Los oligos mutagénicos eran degenerados, aunque ninguno portaba el triplete que codificaba el aminoácido silvestre para esa posición con el fin de evitar la selección de ese codón por afinidad (ver Tabla M5 en la sección Materiales y Métodos).

De 20 posibles mutantes para cada posición que se secuenciaron, se encontraron cinco nuevos mutantes en la posición 137 (el ácido aspártico se sustituyó por alanina, arginina, leucina, prolina y serina) y otros cinco mutantes más en la posición 153 (la histidina se sustituyó por glicina, alanina, serina, prolina y ácido aspártico). Los mutantes D137→A y H153→D se construyeron con los pares de oligos mutagénicos D137A/D137AC y H153D/H153DC respectivamente, ya que los oligos degenerados no portaban los tripletes que codificaban para estos aminoácidos. De este modo se obtuvieron 10 nuevos plásmidos de la serie pLAR, denominados pLAR33 a pLAR42, los cuales codificaban las proteínas mutantes que se indican en la Tabla 1.4.

Para determinar la expresión desde P_m mediada por cada regulador mutante en respuesta a una serie de benzoatos sustituidos, la cepa *E. coli* MC4100 se transformó con el plásmido pERD100 (P_m::'lacZ) y el plásmido pLAR1 (XylS), pLAR5 (XylSD137E), pLAR33 (XylSD137P), pLAR34 (D137S), pLAR35 (XylSD137R), pLAR36 (XylSD137L), pLAR37 (D137A), pLAR6 (H153N), pLAR38 (H153P), pLAR39 (H153S), pLAR40 (H153A), pLAR41 (H153G) o pLAR42 (H153D). Esta cepa se cultivó a 30°C durante 12 a 16 horas en LB con los antibióticos adecuados, tras lo cual se diluyó 100 veces en el mismo medio y tras 1 hora de incubación a 30°C se dividió en dos fracciones alícuotas, la primera se mantuvo como control y a la segunda se le añadió como inductor uno de los siguientes benzoatos para alcanzar una concentración 1mM: Benzoato (Bz), 3-metilbenzoato (3MBz),

3-clorobezoato (3-ClBz), 3-bromobenzoato (3BrBz) y 2,3-dimetilbenzoato (2,3DMBz). La actividad β -galactosidasa se determinó tras 4,5 horas de incubación a 30°C. Los resultados obtenidos se representan en la Tabla 1.4.

Tabla 1.4. Efecto de las mutaciones en las posiciones 137 y 153 de XylS en la activación de la transcripción desde el promotor Pm.

Regulador	Efector					
	No	Bz	3MBz	3ClBz	3BrBz	2,3dMBz
XylS	60	1050	2350	1400	1100	1550E
D137E	50	300	1250	500	400	500
D137P	50	50	50	50	50	70
D137S	70	300	900	400	350	450
D137R	50	70	100	70	50	80
D137L	60	150	400	200	200	250
D137A	60	500	1420	750	500	850
H153N	50	450	1400	500	400	550
H153P	70	1750	2800	1700	1350	1950
H153S	50	800	1650	850	600	1150
H153A	80	1550	2600	1450	1100	2050
H153G	60	100	150	100	100	150
H153D	60	70	100	80	80	90

Se muestra la actividad β -galactosidasa mediada por los reguladores XylS silvestre y los mutantes del mismo en las posiciones 137 y 153 en presencia y ausencia de los inductores Bz, 3MBz, 3ClBz, 3BrBz y 2,3DMBz. La actividad β -galactosidasa se determinó como se indica en el texto. Los valores son la media de 5 determinaciones independientes y las desviaciones estándar en todos los casos fueron inferiores al 15% de la media.

Como se puede comprobar, la sustitución del ácido aspártico que ocupa la posición 137 por arginina o prolina dio lugar a unos reguladores que fueron incapaces de estimular la transcripción desde Pm con cualquiera de los efectores ensayados. El cambio a ácido glutámico o serina redujo la capacidad de activación hasta casi el 50% de la que se observó con el regulador silvestre, mientras que el cambio por un aminoácido apolar como es la leucina dio lugar a un mutante con muy baja actividad. En el caso de la posición 153, la sustitución de histidina por prolina o alanina no tuvo consecuencias en la inducción mediada por estos reguladores mutantes, mientras que el cambio de este residuo por asparagina o serina dio lugar a que la actividad de este regulador descendiera aproximadamente un 50% respecto a la mostrada por el regulador silvestre. Por último, cuando se sustituyó la histidina 153 por glicina o ácido aspártico se obtuvieron unos reguladores que no mostraron actividad alguna. Por lo tanto, estos resultados sugieren que los residuos 137 y 153 de XylS influyen en la capacidad de este regulador para activar la transcripción desde el promotor Pm.

Para comprobar que las proteínas mutantes que mostraron menos actividad que el regulador silvestre eran estables, se realizó un ensayo de western-blot de proteína total de *E. coli* MC4100 que portaba el alelo silvestre o los alelos mutantes de XylS utilizando un anticuerpo policlonal dirigido contra la proteína XylS (Figura I.9).

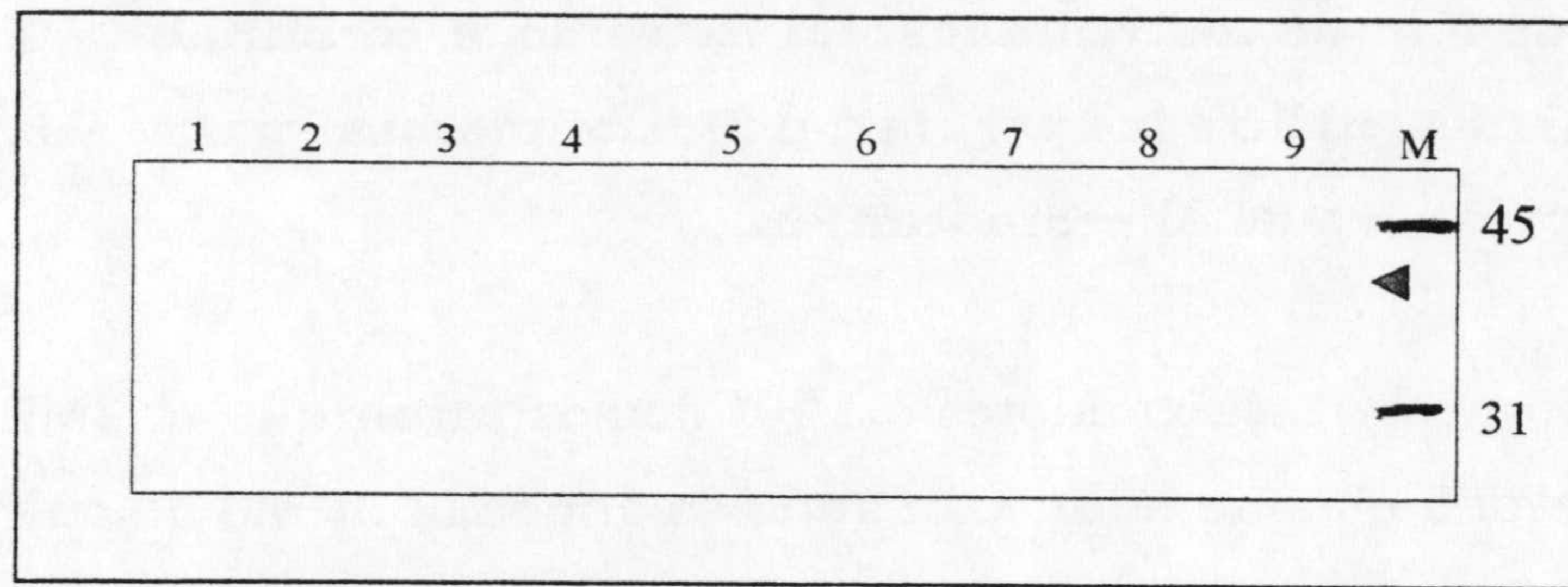


Figura 1.9. Inmunodetección de las proteínas XylS silvestre y mutantes. Se partió de un lisado celular total de un cultivo de *E. coli* MC4100 que porta el plásmido pLAR1 (XylS) (calle 1), pLAR33 (XylD137P) (calle 2), pLAR34(XylSD137S) (calle 3), pLAR35 (XylSD137R) (calle 4), pLAR36 (XylSD137L) (calle 5), pLAR37 (XylSD137A) (calle 6), pLAR39 (XylSH153S) (calle 7), pLAR41 (XylSH153G) (calle 8) o pLAR42 (XylSH153D) (calle 9). Las proteínas se separaron por electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida al 12% en presencia de SDS y posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Para la detección inmunológica de las proteínas se utilizó el anticuerpo policlonal Anti-XylS. El tamaño (kDa) de las bandas del marcador de peso molecular (M) se indica a la derecha. La flecha verde marca la banda que por su tamaño correspondería a la proteína XylS silvestre o sus derivados mutantes.

Como se puede observar, en todos los casos la cantidad de proteína XylS mutante fue similar a la silvestre, lo que indica que las mutaciones introducidas en el regulador no afectan, en principio, a la estabilidad del mismo.

1.6. Influencia de los residuos del extremo N-terminal de XylS en el factor sigma utilizado por la ARN polimerasa para estimular la transcripción desde el promotor Pm.

Marqués y colaboradores (1999) demostraron que el 3MBz dispara la respuesta a choque térmico cuando se añade al medio de cultivo, y que la ARN polimerasa utiliza el factor σ^{32} para mediar la expresión desde el promotor Pm dependiente de los reguladores XylS y XylS1 durante la fase exponencial temprana de crecimiento. Una vez que el cultivo alcanza la fase exponencial tardía y durante la fase estacionaria, la ARN polimerasa utiliza el factor σ^{38} para mediar la transcripción desde Pm en el caso de XylS y σ^{70} en el caso de XylS1 (Gallegos *et al.*, 1997b, Marqués *et al.*, 1995, 1999). Con objeto de determinar si la transcripción desde Pm mediada por los mutantes de XylS seguía el mismo patrón que el regulador silvestre, se siguió la actividad del promotor Pm en un fondo mutante *rpoH*, carente por tanto del factor σ^{32} y en un fondo mutante *rpoS* carente del factor σ^{38} . Para llevar a cabo los ensayos se utilizaron tres cepas de *E. coli*: la cepa *E. coli* MC4100, que porta los factores σ^{32} y σ^{38} silvestres; la cepa *E. coli* KY1429, derivada de *E. coli* MC4100, es un mutante deficiente en *rpoH*, incapaz de crecer a 42°C (Tobe *et al.*, 1984, Zhou *et al.*, 1988) y la cepa *E. coli* RH90 que es un derivado de *E. coli* MC4100 mutado en el gen *rpoS* que codifica la proteína σ^{38} (Lange y Hengge-Aronis, 1991).

Las cepas *E. coli* MC4100, KY1429 y RH90 se transformaron con el plásmido pJLR107 (Pm::'*lacZ*) y con el plásmido pLAR1 (XylS), pLAR5 (XylSD137E), pLAR6 (XylSH153N), pLAR16 (XylSD137E-H153N) o pLAR32 (XylS1). Las cepas se cultivaron a 30°C durante 12 a 16 horas en LB con los antibióticos adecuados, tras lo cual se diluyeron a una DO_{660nm} inicial de 0,05 en el mismo medio y tras 1 hora de incubación a 30°C se dividieron en dos fracciones alícuotas, una de ellas se mantuvo como control sin inducir y a la segunda se le añadió como inductor 3MBz en

concentración 1mM, manteniéndose ambas con agitación a 30°C. La actividad β -galactosidasa, producto de la expresión desde Pm se siguió a lo largo de la curva de crecimiento. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 1.9. Como se puede comprobar, los resultados obtenidos con XylSH153N y el mutante doble XylSD137E-H153N fueron similares a los que se obtuvieron con los reguladores XylSD137E y XylS1 respectivamente.

En el fondo deficiente en σ^{32} se observó que durante la fase exponencial temprana la inducción de Pm fue muy baja con XylS o XylS1 y ni la mutación D137E ni la H153N eliminaron la dependencia de RpoH. Este resultado era de esperar puesto que la transcripción desde Pm tras la adición de 3MBz al medio de cultivo era dependiente de RpoH tanto con XylS como con XylS1. En los fondos sin RpoS y con RpoS, el perfil de actividad β -galactosidasa expresada desde Pm y mediada por XylS1 con 3MBz fue casi idéntico, lo que confirmaba que la expresión desde Pm mediada por XylS1 era independiente de RpoS. Sin embargo, con el regulador XylS, la estimulación de la transcripción desde Pm es dependiente del factor RpoS, ya que el nivel de actividad β -galactosidasa descendía casi un 50% en la fase exponencial tardía. En el caso de los tres mutantes, XylSD137E, XylSH153N y XylSD137E-H153N, se observó que la actividad β -galactosidasa se mantenía al 100%, indicando que con estos mutantes la expresión desde Pm no dependía del factor RpoS (Figura 1.10-A y B).

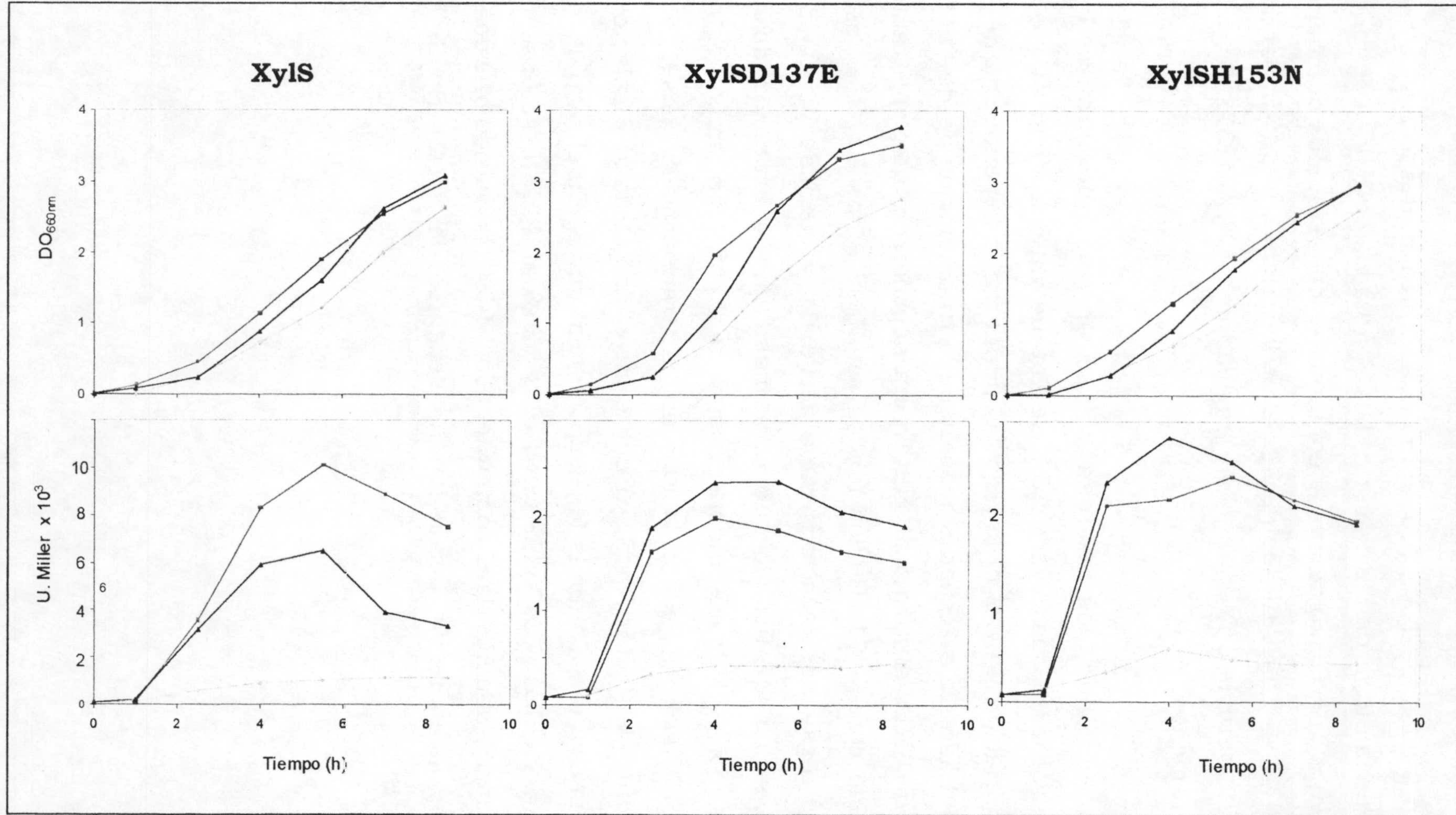


Figura 1.10-A. Efecto de las mutaciones en *rpoS* y *rpoH* en la transcripción desde P_m mediada por los reguladores XylS, XylSD137E y XylSH153N. Se representa la curva de crecimiento (paneles superiores) y la actividad β-galactosidasa (paneles inferiores) en función del tiempo en cultivos de MC4100 (silvestre) (■), RH90 (*rpoS*) (▲) y KY1429 (*rpoH*) (○). Los resultados mostrados son la media de 3 determinaciones independientes con una desviación típica inferior al 10% de la media. Ver detalles en el texto.

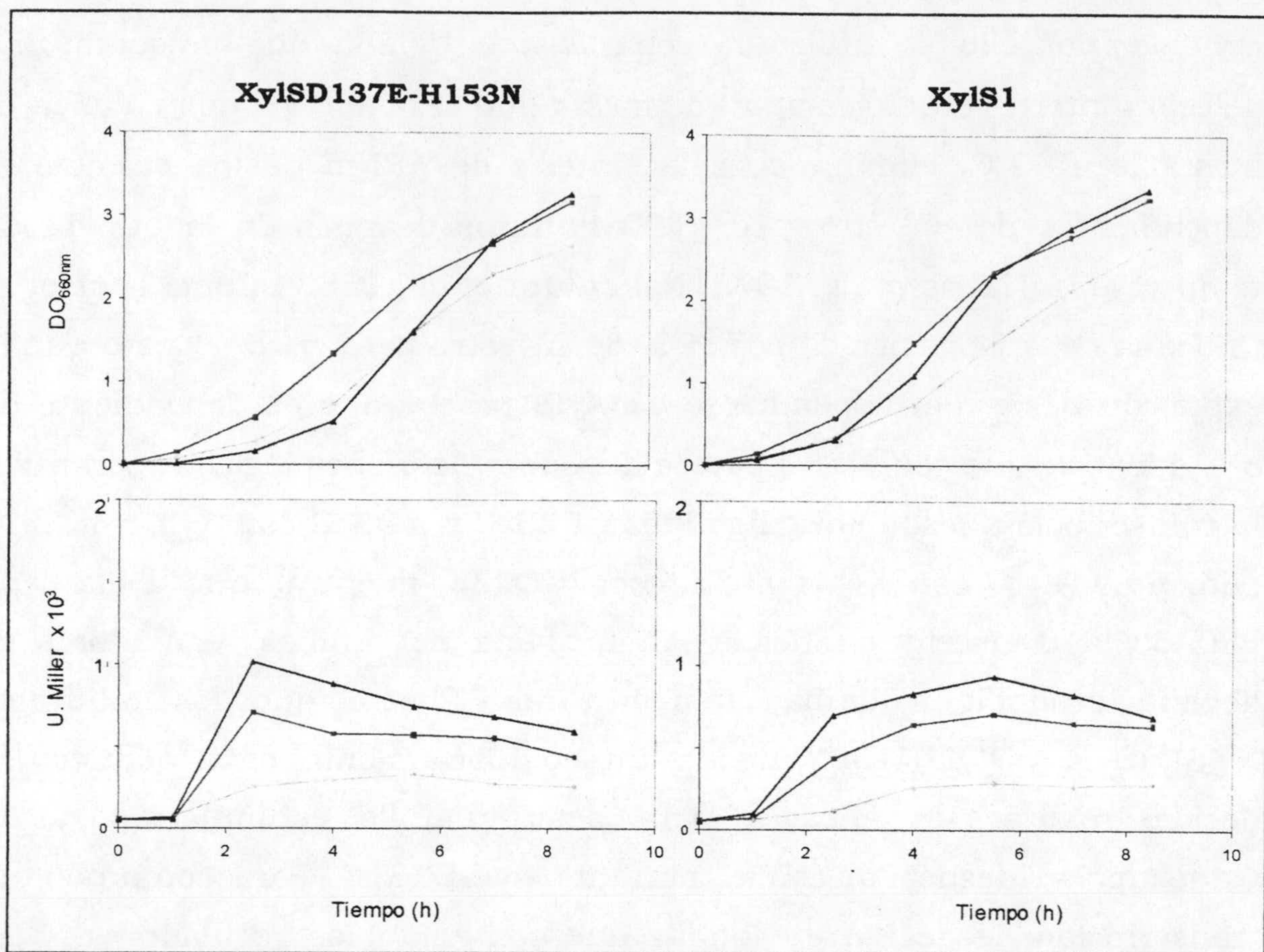


Figura 1.10-B. Efecto de las mutaciones en *rpoS* y *rpoH* en la transcripción desde Pm mediada por los reguladores XylSD137E-H153N y XylS1. Se representa la curva de crecimiento (paneles superiores) y la actividad β -galactosidasa (paneles inferiores) en función del tiempo en cultivos de MC4100 (silvestre) (■), RH90 (*rpoS*) (▲) y KY1429 (*rpoH*) (●). Los resultados mostrados son la media de 3 determinaciones independientes con una desviación típica inferior al 10% de la media. Ver detalles en el texto.

1.7. Evidencias in vivo de la transcripción desde Pm mediada por la ARN polimerasa con σ^{70} por reguladores XylS mutantes.

Para comprobar que el nivel de actividad β -galactosidasa reflejaba la actividad transcripcional desde Pm, se determinó el nivel de expresión desde Pm en diferentes fondos utilizando cepas σ^{70} termosensibles, eficientes y deficientes en la síntesis del factor σ^{38} . Puesto que el factor σ^{70} está implicado de forma directa o indirecta en la transcripción de la mayoría de los genes bacterianos, un mutante nulo en este gen es

inviabile, por ello se utilizó la cepa *E. coli* UQ285 que presenta una deleción interna en el gen *rpoD* de forma que el factor σ^{70} que codifica es inestable a 42°C, eliminándose la síntesis de ARNm de los promotores dependientes de σ^{70} entre 10 y 20 minutos después de la subida de temperatura (Harris *et al.*, 1978; Nakamura *et al.*, 1983). Como control se utilizó la cepa isogénica *E. coli* P90A5c silvestre para *rpoD*. Puesto que la expresión desde Pm dependiente de XylS parece que es dependiente de σ^{38} , mientras que con XylS1 parece depender de σ^{70} , es lógico esperar que la transcripción desde Pm tenga lugar a 30°C y a 42°C con XylS y a 30°C pero no a 42°C con XylS1 en la cepa UQ285, mientras que en la cepa P90A5c la transcripción desde Pm mediada por ambos reguladores se debería producir a ambas temperaturas. Puesto que los mutantes XylSD137E y XylSH153N tienen un comportamiento casi idéntico, se decidió realizar los ensayos para determinar la estimulación de la transcripción desde Pm con el mutante XylSD137E. Para comprobar la transcripción desde Pm en fondos que contenían los reguladores XylS, XylS1 ó XylSD137E, se transformaron las cepas *E. coli* P90A5c y UQ285 con los plásmidos pJLR107 (Pm::*lacZ*), pLAR1 (XylS), pLAR32 (XylS1) y pLAR5 (XylSD137E). Las cepas se cultivaron durante 12-16 horas a 30°C en medio rico suplementado con los antibióticos necesarios, tras lo cual se diluyeron 100 veces en el mismo medio y tras 1 hora de incubación a 30°C se dividió en dos fracciones alícuotas, la primera se mantuvo como control y la segunda se indujo con 1mM de 3MBz, tras 4h de crecimiento en agitación a 30°C los cultivos se dividieron en dos fracciones, una de las cuales quedó a 30°, mientras que la otra se incubó a la temperatura restrictiva de 42°C. A los 45 minutos se tomaron muestras de 2 ml de cada cultivo para análisis de ARN. El nivel de transcripción generado desde Pm se determinó utilizando 20µg de ARN total de las distintas muestras. Los mARNs correspondientes se extendieron a partir del cebador marcado OSXylX, complementario al gen *xyIX* como se describió en el apartado 9 de la sección Materiales y Métodos.

La figura 1.11 muestra los resultados obtenidos para las muestras inducidas con 3MBz. Se observa que con la cepa P90A5c (panel A) la transcripción desde Pm mediada por los tres reguladores (XylS, XylS1 y XylSD137E) tuvo lugar, como se esperaba, tanto a 30 como a 42°C, puesto que los factores sigma requeridos en cada caso estaban presentes. En el caso de la cepa UQ285 (panel B), la transcripción desde Pm se produjo a 30°C con los tres reguladores, sin embargo, a 42°C, sólo se observó transcripción en el fondo que contenía el regulador XylS silvestre; de este modo, el regulador XylSD137E se comportó como XylS1, lo que indicaba que el mutante XylSD137E facilitaba la transcripción desde Pm con σ^{70} en lugar de σ^{38} en la fase estacionaria de crecimiento.

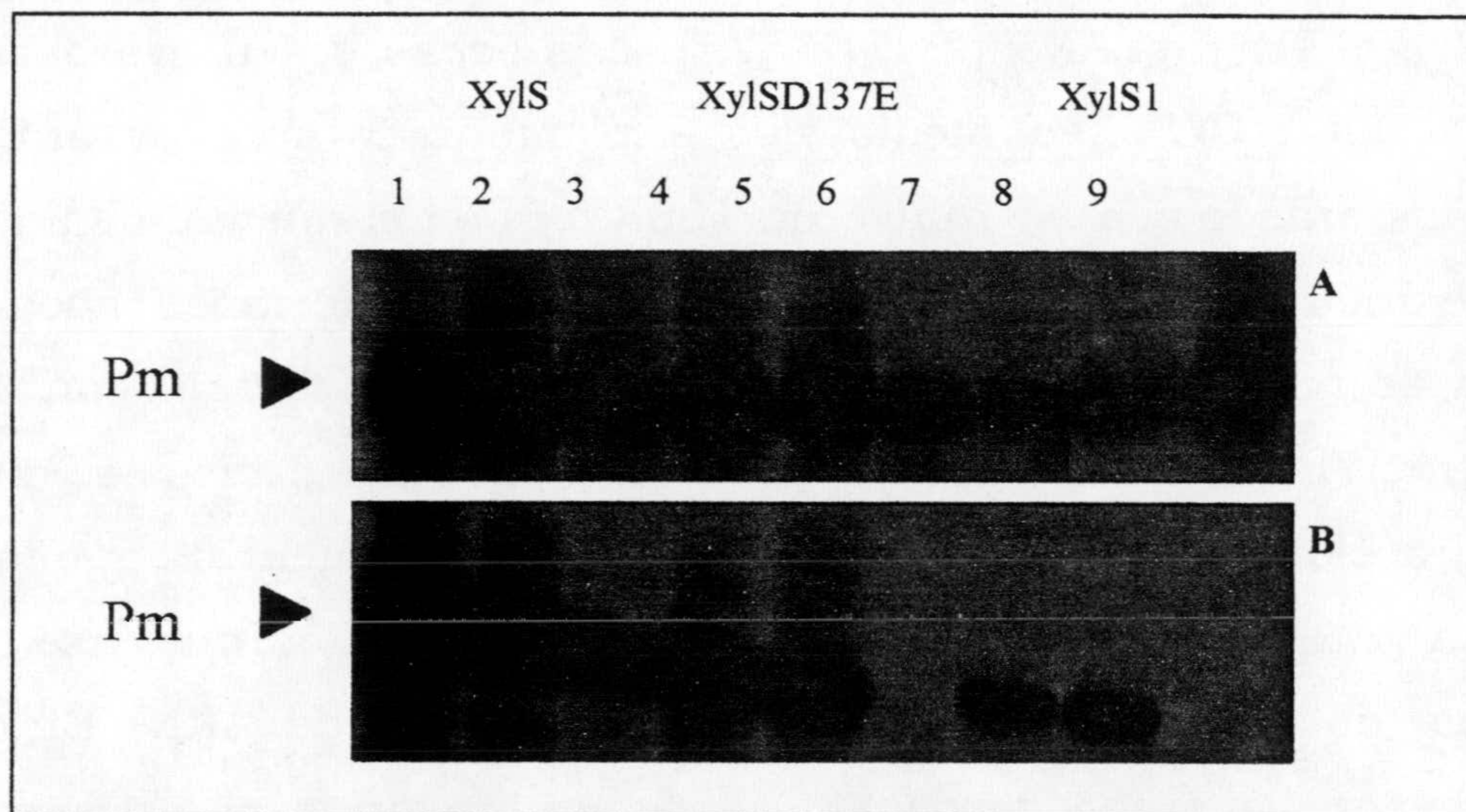


Figura 1.10. Transcripción in vivo desde Pm mediada por XylS, XylSD137E y XylS1 en un fondo σ^{70} silvestre y σ^{70} termosensible. E. coli P90A5c (σ^{70} silvestre) (A) y UQ285 (σ^{70} termosensible) (B) portando los plásmidos pJLR107 (Pm::'lacZ) y pLAR1 (XylS) (líneas 1 a 3) o pLAR5 (XylSD137E) (líneas 4 a 6) o pLAR32 (XylS1) (líneas 7 a 9) se cultivaron hasta alcanzar la fase exponencial tardía en presencia de 3MBz a 30°C. Cuando la turbidez fue de aproximadamente 1,2, se tomó una muestra de 2 ml para extracción de ARN (líneas 1, 4 y 7), en este punto, cada cultivo se dividió en dos alícuotas, una se mantuvo como control a 30°C (líneas 2, 5 y 8) y la otra se incubó a 45°C (líneas 3, 6 y 9) y tras 45 minutos se extrajo el ARN correspondiente a 2 ml de muestra. La extensión reversa a partir del cebador y la separación del ADNc se realizó como se describe en el apartado 9 de la sección Materiales y Métodos. El gel resultante se expuso a una película autorradiográfica durante 24 horas.

Para confirmar el cambio del factor sigma que utiliza la ARN polimerasa para transcribir Pm en función del regulador utilizado, se construyó la cepa *E. coli* EEZ286 mediante transducción con el fago P1 del gen *rpoS59::Tn10* (que porta la cepa *E. coli* RH90) a la cepa *E. coli* UQ285; este proceso está descrito en el apartado 7 de la sección Materiales y Métodos. Por tanto, la cepa *E. coli* EEZ286, además de la mutación en el gen *rpoD* (que hace que el factor σ^{70} sea termosensible), porta un alelo *rpoS* inactivo que hace que la cepa sea deficiente en el factor σ^{38} . Para determinar la estimulación de la transcripción desde Pm mediada por los reguladores XylS, XylS1 y XylSD137E en este fondo, se transformó la cepa *E. coli* EEZ286 con los plásmidos pJLR107 (Pm::*lacZ*), pLAR1 (XylS), pLAR32 (XylS1) y pLAR5 (XylSD137E). Las cepas se cultivaron durante 12-16 horas a 30°C en medio rico suplementado con los antibióticos necesarios, tras lo cual se diluyeron 100 veces en el mismo medio y tras 1 hora de incubación a 30°C se dividió en dos fracciones alícuotas, la primera se mantuvo como control y la segunda se indujo con 1mM de 3MBz, tras 7h de crecimiento en agitación a 30°C los cultivos se dividieron en dos fracciones, una de las cuales quedó a 30°C, mientras que la otra se incubó a la temperatura restrictiva de 42°C. A los 45 minutos se tomaron muestras de 2 ml de cada cultivo para análisis de ARN. El nivel de transcripción generado desde Pm se determinó utilizando 15µg de ARN total de las distintas muestras. Estos ARNs se extendieron a partir del cebador marcado OSXylX y el ADNc obtenido se separó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante como se describe en el apartado 9 de la sección Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 1.11, en la que se puede observar que a 30°C, la transcripción desde Pm tuvo lugar cuando estuvieron presentes los reguladores XylS1 y el mutante XylSD137E, pero no cuando el regulador fue XylS, ya que en este caso se requería el factor σ^{38} y éste no estaba presente.

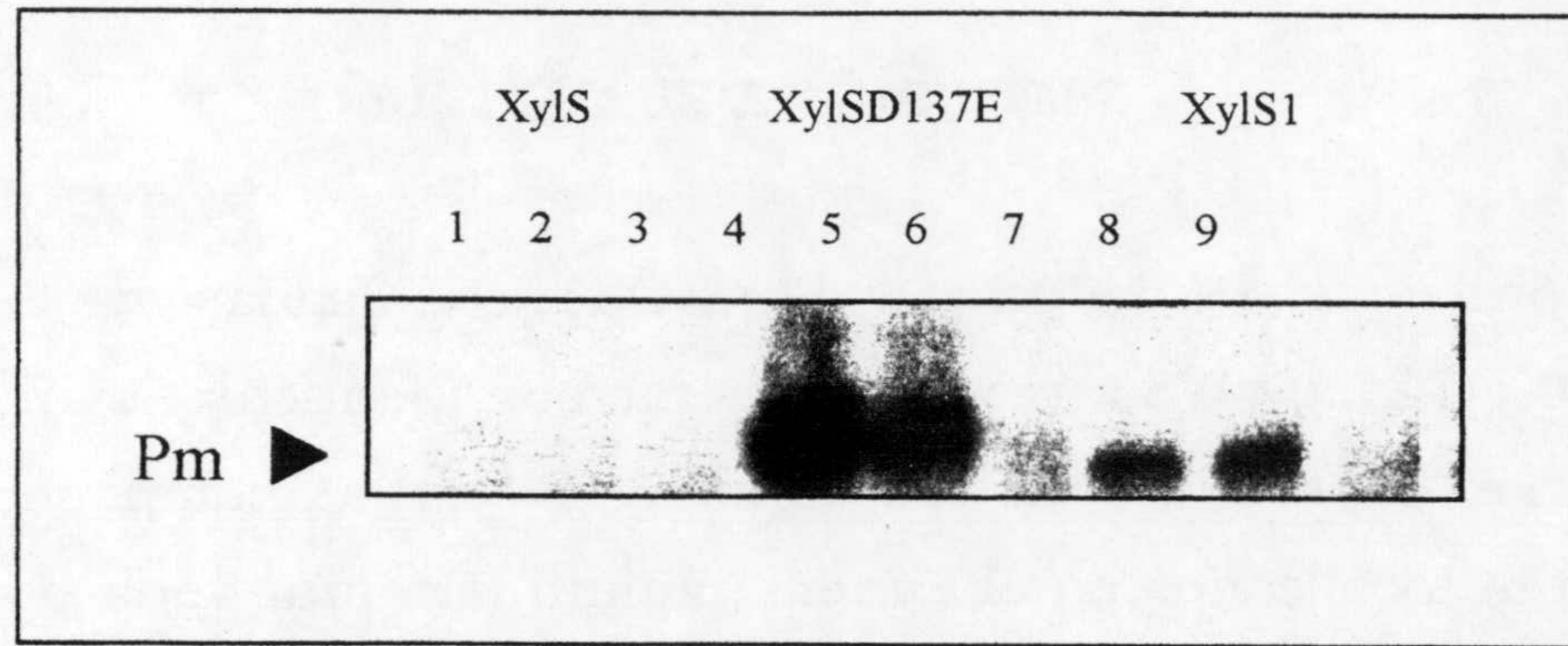


Figura 1.11. Transcripción in vivo desde Pm mediada por XylS, XylSD137E y XylS1 en un fondo σ^{70} termosensible deficiente en σ^{38} . E. coli EEZ286 [σ^{70} termosensible, σ^{38} (-)], portando los plásmidos pJLR107 (Pm::'lacZ) y pLAR1 (XylS) (líneas 1 a 3) o pLAR5 (XylSD137E) (líneas 4 a 6) o pLAR32 (XylS1)(líneas 7 a 9) se cultivó hasta alcanzar la fase exponencial tardía en presencia de 3MBz a 30°C. Cuando la turbidez fue de aproximadamente 1,2, se tomó una muestra de 2 ml para extracción de ARN (líneas 1, 4 y 7), en este punto, cada cultivo se dividió en dos alícuotas, una se mantuvo como control a 30°C (líneas 2, 5 y 8) y la otra se incubó a 45°C (líneas 3, 6 y 9) y tras 45 minutos se extrajo el ARN correspondiente a 2 ml de muestra. El gel resultante se expuso a una película autorradiográfica durante 24 horas.

A 42°C no se produjo transcripción desde Pm en ningún caso, puesto no estaba presente el factor σ^{70} , requerido para la transcripción mediada por XylSD137E y XylS1, ni el factor σ^{38} , requerido para la transcripción dependiente de XylS silvestre.

DISCUSIÓN DEL CAPÍTULO.

Las proteínas reguladoras XylS y XylS1, codificadas por el plásmido TOL pWW0 y TOL pWW53, respectivamente son idénticas en un 98,44% y se diferencian en sólo 5 residuos de los 321 que las componen, estos 5 residuos están localizados en el extremo amino terminal de la proteína. La disponibilidad de estos dos alelos del regulador es de gran interés, puesto que estas “pequeñas” diferencias se reflejan claramente en la capacidad del regulador para inducir la transcripción desde Pm con diferentes efectores y en las interacciones de éste con la maquinaria transcripcional. Respecto a las propiedades cinéticas, Gallegos y colaboradores (1997b) describieron que el nivel de inducción desde Pm del regulador XylS era de 6 a 10 veces más alto que el de XylS1. El estudio realizado en este trabajo ha confirmado esta observación (ver Tabla 1.1), y también ha demostrado que XylS muestra una mayor afinidad por los efectores que XylS1, lo que podría explicar porqué el perfil de efector de XylS es más amplio que el del regulador XylS1.

La introducción en XylS de todas las combinaciones posibles de los cinco aminoácidos diferentes entre XylS y XylS1 reveló que las mutaciones simples que tenían un efecto más acusado en la V_{máx}, K's y el perfil de efector fueron las que afectaban a los residuos 137 y 153. Esto se confirmó posteriormente cuando se encontró que el perfil de efector, V_{máx} y K's para los efectores en el mutante doble XylSD137E-H153N era similar al que mostraba el regulador XylS1. Estos resultados indicaban que estos dos residuos podrían estar implicados en las interacciones con el efector.

La importancia de los residuos 137 y 153 en las interacciones con el efector se confirmó mediante la introducción de mutaciones al azar en estas dos posiciones que dieron lugar a una serie de mutantes puntuales, como por ejemplo, XylSD137R, XylSD137P, XylSH153G y XylSH153D, que

habían perdido la capacidad de reconocer efectores. Recientemente se ha cristalizado el regulador MarR con 2-hidroxibenzoato (salicilato), que es un efector reconocido por este regulador (Aleksun *et al.*, 2001). En este regulador, el salicilato está unido a dos sitios denominados SalA y SalB. En ambos sitios el grupo carboxilo del salicilato se une por puentes de hidrógeno a la cadena lateral cargada positivamente de residuos de arginina. El grupo hidroxilo del salicilato está unido por puentes de hidrógeno al grupo hidroxilo de la cadena lateral de un residuo de Thr en el sitio SalA y al esqueleto carbonado de una Ala en el sitio SalB. Esto indica que los sustituyentes del anillo aromático pueden establecer interacciones con diferentes residuos. En base a estos resultados se podría especular que en XylS, la His153 podría estar implicada en interacciones con algunos sustituyentes del anillo aromático del benzoato, puesto que la sustitución de este residuo por un aminoácido sin carga o cargado negativamente provocó la pérdida de la capacidad para reconocer derivados del benzoato, lo que podría deberse a una pérdida de las interacciones con el grupo carboxilo. El cambio H153→N dio lugar a un regulador menos eficiente, pero el grupo amida que forma parte de la cadena lateral de la Asn podría permitir algunas interacciones con derivados del benzoato.

Dado el carácter negativo del ácido aspártico que ocupa la posición 137, éste no podría estar implicado en interacciones con el grupo carboxilo del benzoato. Por lo tanto, el residuo Asp137 podría estar implicado en otras interacciones con sustituyentes o en la transmisión de la señal intramolecular que conduce a la activación del regulador. De hecho, cuando se alteró la carga de este residuo se afectó la capacidad del regulador para reconocer benzoatos.

Previamente Michán y colaboradores (1992a) pusieron de manifiesto que el residuo Cys41 podría formar parte del bolsillo de unión del efector en XylS. El fenotipo de los mutantes XylSD137R y XylSH153G que habían

perdido la capacidad para reconocer benzoatos fue similar al que mostró el mutante Cys41→Leu (Michán *et al.*, 1992a). Sin embargo, ciertas mutaciones en la posición 41 dieron lugar a otros cambios fenotípicos. Por ejemplo, la sustitución de la Cys41 por Arg generó un mutante que presentaba un fenotipo semi-constitutivo, es decir, capaz de mediar altos niveles de transcripción desde Pm en ausencia de efectores. El mutante XylSC41G mostró una especificidad de efector alterada, puesto que no respondía a 4MBz pero mantenía la capacidad de reconocer 3MBz (Michán *et al.*, 1992a). El hecho de que distintas mutaciones en las posiciones 41, 137 y 153 den lugar a diferentes fenotipos es consistente con los distintos papeles de los residuos 41, 137 y 153 en las interacciones con los efectores o en la transmisión de señal para conseguir la forma activa de este regulador transcripcional. Sin embargo, aún se desconoce de manera fehaciente si alguno de estos residuos interacciona con los efectores. Estas interacciones se conocerán en detalle cuando se resuelva la estructura cristalina de este regulador en presencia y ausencia del efector, lo cual es bastante complicado puesto que hay muchas dificultades para purificar la proteína XylS debido a la insolubilidad intrínseca de la misma, una característica que es compartida por muchos miembros de la familia de reguladores AraC/XylS (Egan y Schleif, 1994; Fawcett y Wolf, 1994; Michán *et al.*, 1992b).

Dos miembros de la familia de AraC/XylS, SoxS y MarA, de aproximadamente 110 aminoácidos, equivalen al dominio C-terminal de los miembros de la familia. Esta coincidencia sugiere que el extremo C-terminal de los miembros de la familia AraC/XylS está implicado en unión al ADN y probablemente en interacciones con la maquinaria transcripcional. Michán y colaboradores (1992b) demostraron que, aunque los extremos N- y C-terminal de XylS tienen funciones específicas, no son independientes y existe comunicación entre ambos extremos. Esta relación entre los dos extremos está sostenida por los resultados

obtenidos en este trabajo que indican que ciertas mutaciones en el extremo N-terminal de XylS influyen en el factor σ que elige la ARN polimerasa para estimular la transcripción desde Pm. De hecho, el promotor Pm es único en el sentido de que la transcripción desde Pm con XylS requiere de la ARN polimerasa con σ^{32} o σ^{38} , mientras que cuando XylS1 es el activador, la ARN polimerasa utiliza los factores σ^{32} o σ^{70} . El 3-metilbenzoato induce la respuesta a choque térmico (Marqués *et al.*, 1999), y tras la transcripción inicial con σ^{32} , este factor es sustituido por σ^{38} en el caso de XylS y σ^{70} en el caso de XylS1. También es interesante el hecho de que pequeños cambios en XylS influyan en el factor sigma que elige la ARN polimerasa para la transcripción desde Pm. Mutaciones puntuales simples en las posiciones 137 y 153 de XylS son suficientes para hacer que la ARN polimerasa funcione con el factor σ^{70} en lugar del factor σ^{38} . Puesto que σ^{38} y σ^{70} pertenecen a la misma clase de factores sigma (Ishihama, 2000) y puesto que el punto de iniciación de la transcripción desde Pm es siempre el mismo independientemente del factor sigma implicado, parece que la ARN polimerasa con diferentes factores sigma reconoce las mismas cajas -10 y -35 en Pm, aunque esto se debe hacer con diferencias sutiles. Estas observaciones están de acuerdo con el mapeo de las interacciones de σ^{38} y σ^{70} en promotores reconocidos por estos dos factores sigma (Arthur y Burgess, 1998; Ohnuma *et al.*, 2000; Owens *et al.*, 1998) y con resultados recientes (no publicados) de la licenciada Patricia Domínguez Cuevas en nuestro grupo de investigación, que ha puesto de manifiesto que las bases -13/-16 y -16/-18 de Pm son importantes para la interacción con σ^{38} y σ^{32} respectivamente.

En resumen, XylS y XylS1 son dos reguladores casi idénticos que se diferencian en sólo 5 aminoácidos. Los aminoácidos que ocupan las posiciones 137 y 153 influyen de un modo significativo en el perfil de efector que muestra la proteína, principalmente por alteración de la

afinidad por los efectores. Estos dos residuos de XylS determinan el que XylS medie la transcripción desde Pm con una ARN polimerasa que utilice el factor σ^{38} ó σ^{70} .

Capítulo 2

ESTUDIO DEL PAPEL DE LA SUBUNIDAD ALFA DE LA ARN POLIMERASA EN LA ACTIVACIÓN DEL PROMOTOR P_m.

La holoenzima de la ARN polimerasa de *E. coli* es una enzima de varias subunidades constituida por un núcleo catalítico de composición $\alpha_2\beta\beta'$ y una de las siete subunidades σ implicadas en el reconocimiento específico de promotores (Gross *et al.*, 1998; Ishihama, 1997, 2000) (Fig. 2.1.a).

La subunidad alfa (α) de la ARN polimerasa de *E. coli* lleva a cabo tres funciones conocidas: (1) inicia el ensamblaje de la ARN polimerasa, que se produce de forma secuencial siguiendo el orden $\alpha \rightarrow \alpha_2 \rightarrow \alpha_2\beta \rightarrow \alpha_2\beta\beta'$ (revisado en Ishihama, 1981 y Zillig *et al.*, 1976), por tanto, la dimerización de α es el primer paso en el ensamblaje de las subunidades, (2) es la responsable del reconocimiento, en algunos promotores, de una región rica en A/T situada entre las posiciones -40 y -60 que contribuye a la activación transcripcional, denominada "elemento UP" (Ross *et al.*, 1993, 1998) (Fig. 2.1.b) y (3) es la diana de muchas proteínas activadoras

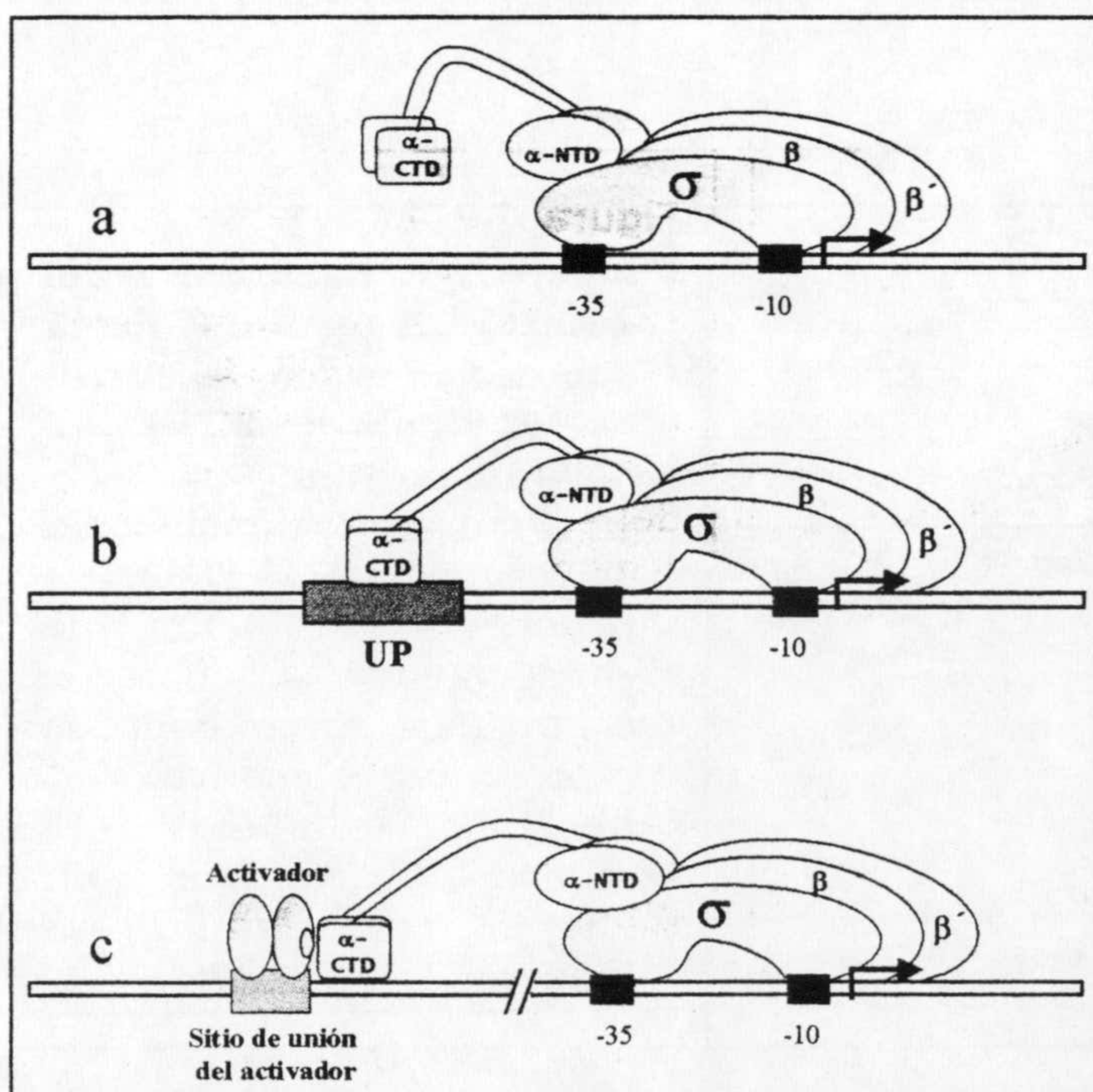


Figura 2.1. Modelo del papel de la subunidad α de la ARN polimerasa (ARNP) en el reconocimiento de un promotor y en la activación de la transcripción desde el mismo. El dominio carboxilo terminal de la subunidad α (α -CTD) ocupa diferentes posiciones en diferentes promotores. **(a).** Promotor simple. **(b)** Promotor que contiene un elemento UP (α establece interacciones específicas proteína-ADN con el elemento UP). **(c)** Promotor que contiene un sitio de unión para un activador que funciona a través de α (α establece interacciones específicas proteína-proteína con el activador) (Ross *et al.*, 1993).

de la transcripción (Busby y Ebright, 1994; Ebright y Busby, 1995; Rhodius y Busby, 1998) (Fig. 2.1.c).

La subunidad α de la ARN polimerasa está constituida por 329 aminoácidos. Los estudios de proteólisis limitada indican que α está constituida por dos dominios plegados de forma independiente (Blatter *et al.*, 1994; Busby y Ebright, 1994; Ebright y Busby, 1995; Negishi *et al.*, 1995). El dominio N-terminal de la subunidad α (α -NTD) está constituido por los residuos 8 a 235 y contiene regiones de secuencia conservada (denominadas motivos $\alpha 1$ y $\alpha 2$) entre las subunidades α homologas de las ARN polimerasas de procariotas, arqueobacterias, cloroplastos y eucariotas (Gebhardt *et al.*, 1993) (Figura 2.2). En este dominio se encuentra el determinante principal para la dimerización de α , los determinantes para la interacción de α con las subunidades β y β' de la ARN polimerasa y un determinante para la interacción con activadores (Hayward *et al.*, 1991; Igarashi *et al.*, 1990, 1991a; Igarashi e Ishihama, 1991; Kimura *et al.*, 1994; Niu *et al.* 1996; Zhang y Darst, 1998). α -NTD es esencial para el ensamblaje de la ARNP *in vivo* e *in vitro* así como para la transcripción basal (Blatter *et al.*, 1994; Hayward *et al.* 1991; Igarashi e Ishihama, 1991).

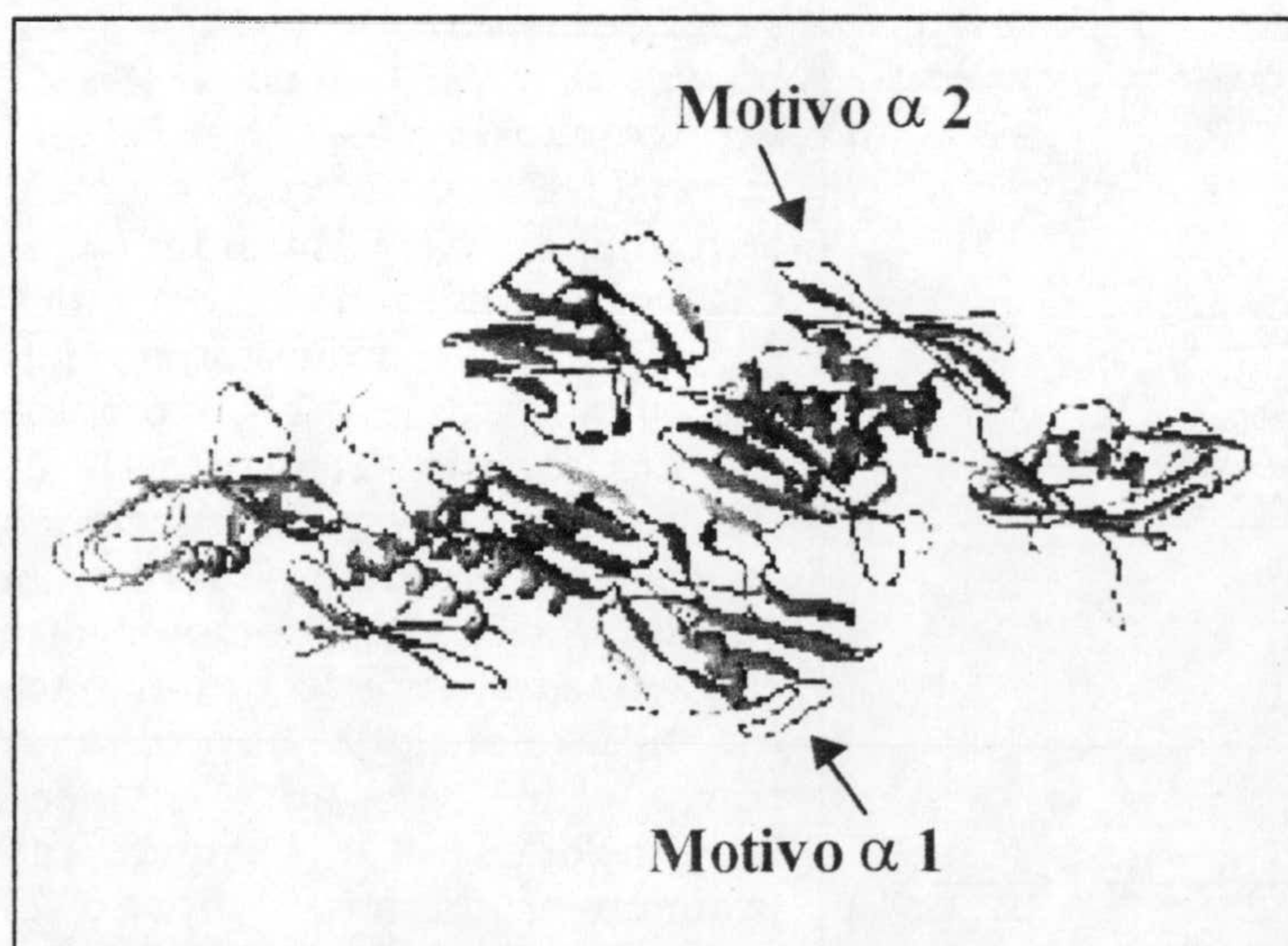


Figura 2.2. Estructura del dominio N-terminal de la subunidad α de la ARNP de *E. coli* (α -NTD). El diagrama muestra la estructura tridimensional del dímero α -NTD. Las regiones altamente conservadas aparecen coloreadas. En morado se representa el motivo $\alpha 1$ (residuos 23-152). El motivo $\alpha 2$ (residuos 169-234) se representa en rosa (Zhang y Darst, 1998).

El dominio C-terminal de la subunidad α (α -CTD) comprende los residuos 249 a 329. Este dominio contiene un determinante secundario para la dimerización de α (Blatter *et al.*, 1994), determinantes que intervienen en las interacciones con secuencias específicas de ADN (elementos UP) (Gaal *et al.*, 1996; Rao *et al.*, 1994; Ross *et al.*, 1993; Yasuno *et al.*, 2000) y determinantes para la interacción con proteínas activadoras (Chen *et al.*, 1994; Igarashi e Ishihama, 1991; Ishihama, 1992; Russo y Silhavy, 1992; Tang *et al.*, 1994). Por lo tanto, α -CTD está implicada en el reconocimiento de promotores y en la activación de la transcripción. En este dominio también se ha localizado una región muy conservada entre las ARN polimerasas de procariotas y cloroplastos que corresponde a los aminoácidos 257 a 314 (Gebhardt *et al.*, 1993).

El fragmento que enlaza los dos dominios está constituido por al menos 13 residuos aminoacídicos (desde D236 hasta E248 en la proteína de *E. coli*), es flexible y carece de estructura definida. Estas características que presenta facilitan el movimiento independiente de α -CTD, lo que permite que α -CTD pueda ocupar distintas posiciones u orientaciones respecto a α -NTD y al resto de la ARN polimerasa en distintos complejos de transcripción. (Blatter *et al.*, 1994; Jeon *et al.*, 1997)

Muchas proteínas activadoras de la transcripción, aunque no todas, realizan su función a través de α -CTD. Así, se ha demostrado que la eliminación o sustitución de α -CTD reduce la activación de la transcripción por Ada, AraC, CysB, IHF, FNR, MelR y OmpR entre otras (Igarashi *et al.*, 1991b; Landini *et al.*, 1997, 1998; Lee *et al.*, 2000; Thomas y Glass, 1991; van Ulsen *et al.*, 1997). De entre estas proteínas, la mejor caracterizada hasta el momento es la proteína receptora de AMPc o CRP (revisado en Busby y Ebright, 1999).

Al comienzo de este trabajo de tesis doctoral no se habían realizado estudios acerca de posibles interacciones del regulador XylS con la maquinaria transcripcional. Por ello nos fijamos como objetivo analizar si la subunidad α de la ARN polimerasa es necesaria para la activación total del promotor Pm mediada por XylS y XylS1 y, en caso afirmativo, si se requieren contactos proteína-proteína con dichos reguladores para llevar a cabo la activación de la transcripción.

2.1. Estudio del papel de α -NTD en la activación del promotor Pm mediada por los reguladores XylS y XylS1.

Niu y colaboradores demostraron en 1996 que los residuos 162 a 165 del dominio N-terminal de la subunidad α de la ARN polimerasa (α -NTD) son necesarios para la activación de la transcripción en promotores dependientes de la proteína receptora de AMP cíclico (CRP) de clase II, en los cuales el sitio de unión de CRP solapa con el hexámero -35 del promotor (Ebright, 1993).

Para comprobar si α -NTD interviene en la activación de la transcripción mediada por las proteínas XylS y XylS1, se utilizó la cepa *E. coli* MC4100 que porta una copia cromosómica del gen *rpoA* silvestre, el cual codifica la subunidad α de la ARN polimerasa. Esta cepa se transformó con el plásmido pERD100 que porta la fusión Pm::lacZ, el plásmido pLAR1 (que porta el gen *xylS* silvestre) o pLAR32 (que porta el gen *xylS1*) así como con el plásmido pREII- α que sobreexpresa la subunidad α silvestre o plásmidos derivados de éste que sobreexpresan derivados de α con sustituciones a alanina en las posiciones 162 a 165. La cepa *E. coli* MC4100 (pERD100, pLAR1 ó pLAR32, pREII- α o derivados) se cultivó a 30°C durante 12 a 16 horas en LB con los antibióticos adecuados, tras lo cual se diluyó 100 veces en el mismo medio y tras 1 hora de incubación a 30°C se dividió en dos fracciones alícuotas, la primera se mantuvo como control y a la segunda se le añadió el inductor

3-metilbenzoato para alcanzar una concentración 1mM. La actividad β -galactosidasa se determinó tras 4,5 horas de incubación a 30°C. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.1. Como puede observarse, la expresión de los derivados de α -NTD no tuvo efecto significativo en la activación del promotor Pm mediada por XylS o XylS1.

Tabla 2.1. Expresión de Pm en presencia de derivados de α -NTD con sustituciones a alanina.

Derivado de α -NTD	Actividad β -galactosidasa (U. Miller)			
	XylS		XylS1	
	- 3MBz	+ 3MBz	- 3MBz	+ 3MBz
WT	70	1520	65	175
E162→A	70	1625	65	175
E163→A	70	1790	65	180
D164→A	70	1900	65	170
E165→A	75	1745	65	185
162A-165A	75	1760	75	160

E. coli MC4100 se transformó con los plásmidos pERD100 (Pm::lacZ), pLAR1(xylS) ó pLAR32, (xylS1) y pREII- α (α -CTD) o derivados. La actividad β -galactosidasa se determinó como se indica en el texto. Los valores son la media de 3 a 5 determinaciones independientes y las desviaciones estándar en todos los casos fueron inferiores al 10% de la media.

2.2. Estudio del papel de α -CTD en la activación del promotor Pm mediada por los reguladores XylS y XylS1.

Muchas proteínas activadoras de la transcripción tienen como diana el dominio carboxilo terminal de la subunidad α de la ARN polimerasa. Entre estas proteínas hay algunas que pertenecen a la familia de reguladores transcripcionales AraC/XylS, como son MarA, SoxS, Rob, AlkA y RhaS (Giffard y Booth, 1988; Holcroft y Egan, 2000; Jair *et al.*,

1995, 1996a y b, Landini *et al.*, 1997). Sin embargo, hasta el momento no se conoce si la activación del promotor Pm por XylS o XylS1 requiere de α -CTD. Por ello, nos propusimos determinar si α -CTD es necesaria para la activación del promotor Pm.

2.2.1 Efecto de la expresión de un derivado deleciónado de α -CTD en la actividad del promotor Pm.

La deleción del tercio C-terminal de la subunidad α (desde el residuo 235 hasta el 329) no interfiere con el ensamblaje de la ARN polimerasa (Hayward *et al.*, 1991; Igarashi *et al.*, 1990; 1991a). Además, se ha comprobado que ARN polimerasas mutantes que contienen subunidades α carentes de extremo C-terminal son enzimáticamente activas y capaces de iniciar la transcripción desde varios promotores simples que no requieren proteínas activadoras. Sin embargo, estas holoenzimas mutantes son incapaces de activar la transcripción de algunos promotores dependientes de activador (Igarashi e Ishihama, 1991).

Con objeto de determinar si α -CTD se requiere para la activación máxima del promotor Pm mediada por XylS y XylS1, se comprobó el efecto que ejercía la expresión de un derivado de α deleciónado en el extremo C-terminal. Para ello, se analizó la expresión del promotor Pm midiendo actividad β -galactosidasa en la cepa *E. coli* con pERD100 (Pm::*lacZ*), pLAR1 (*xylS*) o pLAR32 (*xylS1*) y con un plásmido que sobreexpresa la subunidad α silvestre (pREII- α) o un derivado de α carente del dominio C-terminal, α - Δ 235 (plásmido pSE192). La cepa *E. coli* MC4100 (pERD100, pLAR1 ó pLAR32, pREII- α o pSE192) se cultivó a 30°C durante 12 a 16 horas en LB con los antibióticos adecuados, tras lo cual se diluyó 100 veces en el mismo medio y tras 1 hora de incubación a 30°C se dividió en dos fracciones alícuotas, una de las alícuotas se mantuvo como control y a la otra se le añadió el inductor 3-metilbenzoato para alcanzar una concentración 1mM. La actividad β -galactosidasa se determinó tras 4,5

horas de incubación a 30°C. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.2. Como puede observarse, la sobreexpresión de α - Δ 235 hace que el nivel de expresión desde Pm mediado por XylS o XylS1 descienda un 50% respecto al nivel silvestre. Estos resultados sugieren que la delección de α -CTD afecta a la activación de la transcripción desde el promotor Pm mediada por XylS.

Tabla 2.2. Efecto de la delección de α -CTD en la expresión desde el promotor Pm mediada por los reguladores XylS y XylS1.

	Actividad β -galactosidasa (U. Miller)			
	XylS		XylS1	
	- 3MBz	+ 3MBz	- 3MBz	+ 3MBz
α -CTD	65	1000	70	150
α - Δ 235	25	615	25	70

La cepa *E. coli* MC4100 se transformó con los plásmidos pERD100, pLAR1 (*xylS*) ó pLAR32 (*xylS1*) y pREII- α (α -CTD) o pSE192 (α - Δ 235). La actividad β -galactosidasa se determinó como se indica en el texto. Los valores son la media de 3 a 5 determinaciones independientes y las desviaciones estándar en todos los casos fueron inferiores al 10% de la media.

2.2.2. Efecto de la expresión de derivados de α -CTD con sustituciones a alanina en la actividad del promotor Pm.

Los resultados obtenidos anteriormente sugerían que α -CTD intervenía en la activación del promotor Pm mediada por XylS o XylS1. Para determinar si la activación por α -CTD dependía de interacciones con el ADN del promotor Pm y/o de interacciones con el regulador, analizamos la expresión desde Pm con XylS y XylS1 en combinación con una librería de mutantes puntuales en α -CTD. Los ensayos se realizaron en la cepa *E. coli* MC4100 que porta el gen *rpoA* mutante en un plásmido multicopia y

el gen *rpoA* silvestre en el cromosoma. En estas condiciones, la subunidad α codificada por el plásmido se sobreproduce aproximadamente 2,5 veces respecto a la subunidad α codificada en el cromosoma. En base a estos niveles de sobreproducción, y asumiendo que la subunidad α de codificación plasmídica y la subunidad α codificada en el cromosoma tienen la misma eficiencia de ensamblaje en la ARN polimerasa, es de esperar que aproximadamente el 90% del conjunto de ARN polimerasa tenga al menos una subunidad α de codificación plasmídica, y que aproximadamente el 50% del conjunto de ARN polimerasa tenga las dos subunidades α codificadas por el plásmido. Por lo tanto, es de esperar que el fenotipo de la subunidad α de codificación plasmídica sea dominante o parcialmente dominante (Tang *et al.*, 1994). Basándonos en esta hipótesis se pretendía encontrar un efecto dominante negativo en la activación de la transcripción desde Pm. El ensayo se realizó del siguiente modo: la cepa *E. coli* MC4100 se transformó con pERD100 (Pm::*lacZ*), pLAR1 (*xylS*) o pLAR32 (*xylS1*) y con un plásmido que sobreexpresa la subunidad α silvestre (pREII- α) o un derivado de α que porta una sustitución simple a alanina en cada posición dentro del dominio C-terminal. Las cepas correspondientes se cultivaron a 30°C durante 12 a 16 horas en LB con los antibióticos adecuados, tras lo cual se diluyó 100 veces en el mismo medio y tras 1 hora de incubación a 30°C se dividió en dos fracciones alícuotas, una se mantuvo como control y la otra se suplementó con 1mM del inductor 3-metilbenzoato. La actividad β -galactosidasa se determinó como se ha descrito anteriormente. Los resultados se muestran en las Figuras 2.3 y 2.4 donde se representa en un diagrama de barras el porcentaje de actividad β -galactosidasa obtenida con cada mutante de la subunidad α respecto a la silvestre. Los niveles de expresión en ausencia de inductor se mantuvieron entre 30 y 70 unidades Miller. Como puede observarse, las sustituciones a alanina en la mayoría de los residuos de α -CTD no tuvieron un efecto significativo en nivel de expresión mediado por XylS o XylS1. Sin embargo, 11 mutaciones puntuales en α -CTD afectaban

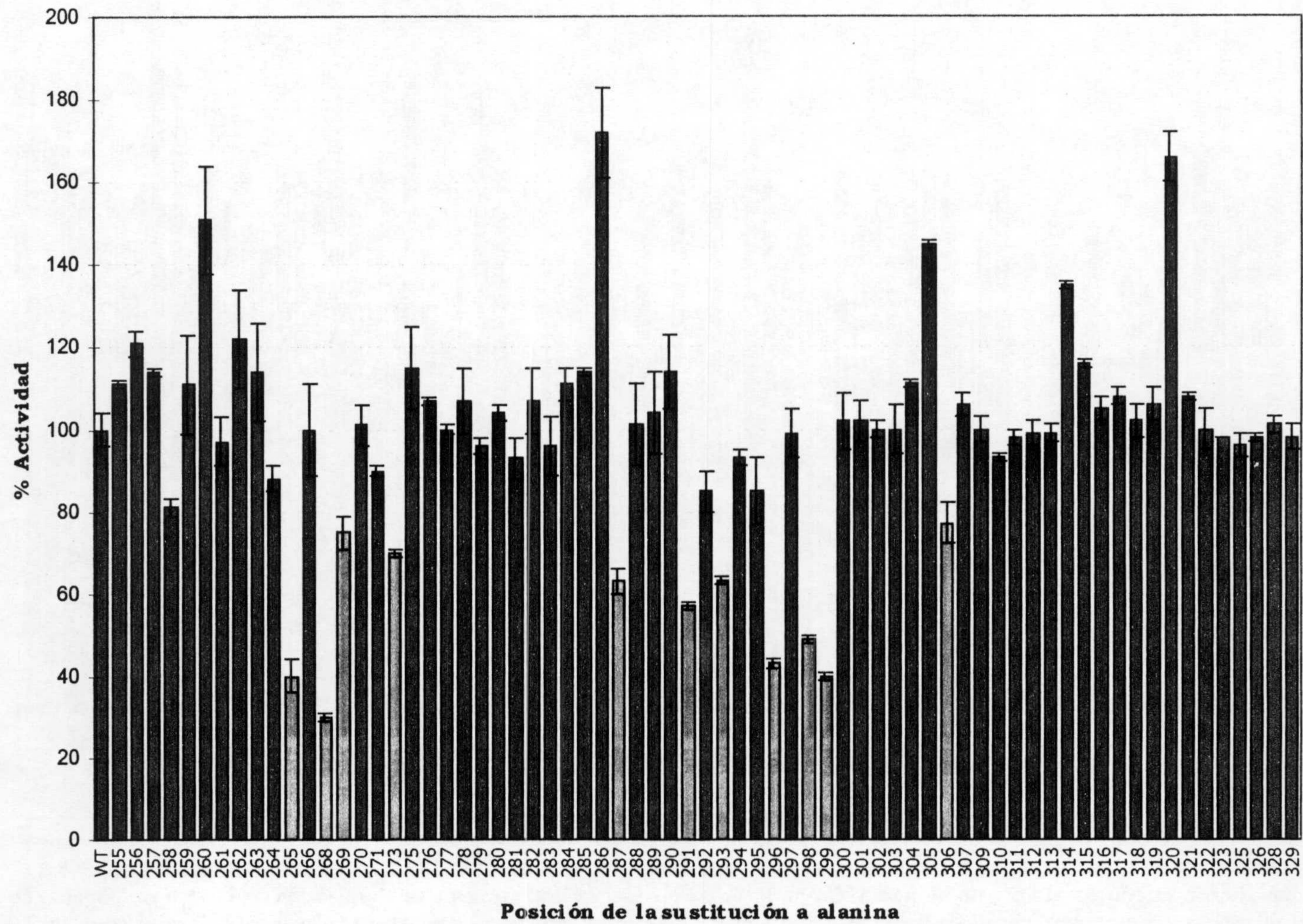


Figura 2.3. Efecto de las sustituciones a alanina en α -CTD en la activación de Pm mediada por XylS. Los valores mostrados son la media de al menos 4 determinaciones independientes. Las desviaciones típicas en todos los casos fueron inferiores al 15% de la media. En amarillo se muestran las mutaciones simples en α -CTD que afectan significativamente y con carácter negativo al nivel de expresión mediado por XylS. En azul se muestran las posiciones que no ejercen un efecto negativo significativo en dicho nivel.

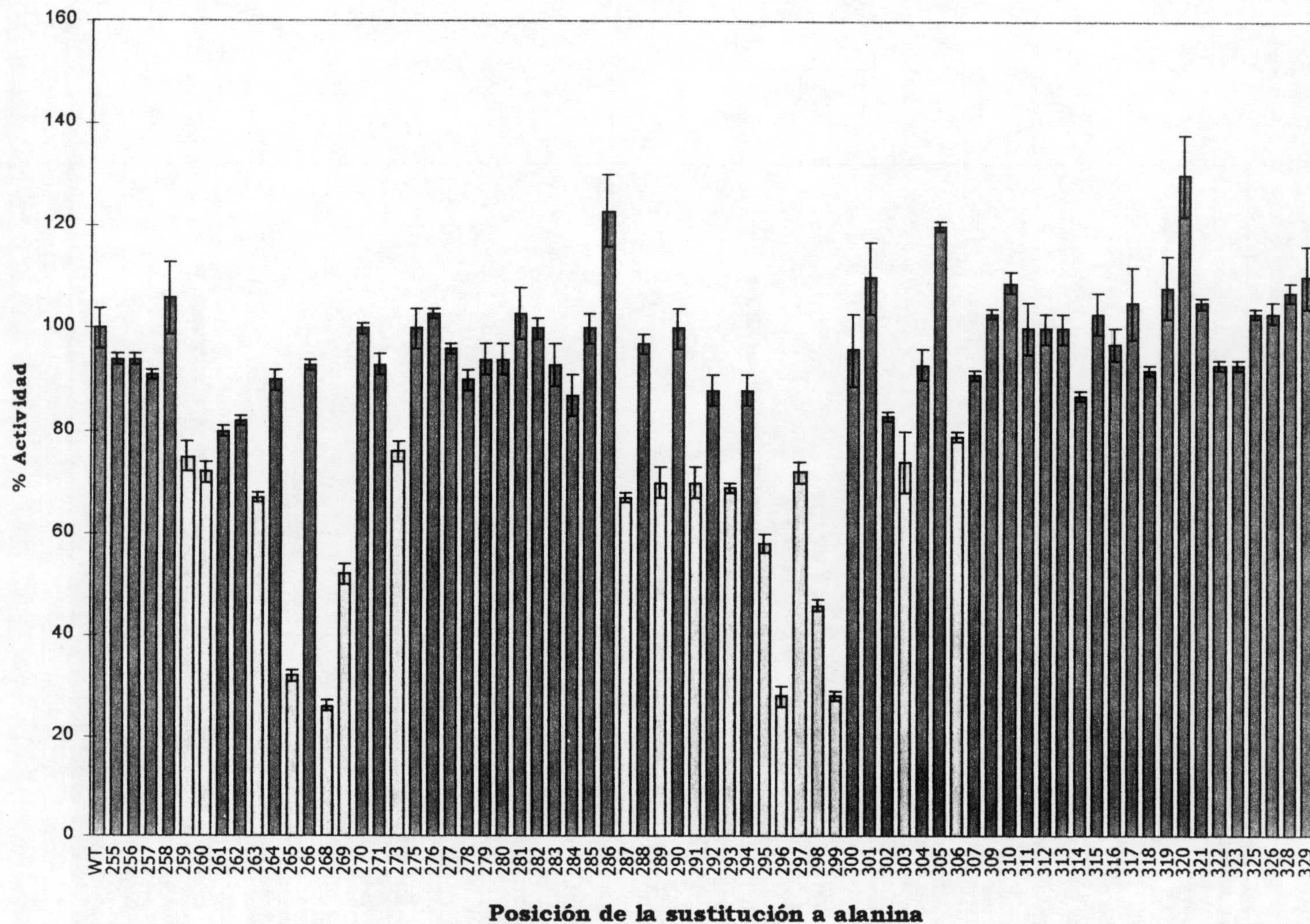


Figura 2.4. Efecto de las sustituciones a alanina en α -CTD en la activación de Pm mediada por XylS1. Los valores mostrados son la media de al menos 4 determinaciones independientes. Las desviaciones típicas en todos los casos fueron inferiores al 15% de la media. En amarillo se muestran las mutaciones simples en α -CTD que afectan significativamente y con carácter negativo al nivel de expresión mediado por XylS1. En azul se muestran las posiciones que no ejercen un efecto negativo significativo en dicho nivel.

al nivel de expresión mediado por ambos reguladores (Figuras 2.3 y 2.4 y Tabla 2.3), y 7 mutaciones adicionales tuvieron un efecto modesto en la estimulación de la transcripción con XylS1 como regulador, pero no afectaron a la transcripción mediada por XylS (Figura 2.4 y Tabla 2.3).

Tabla 2.3. Residuos de α -CTD que afectan a la transcripción desde Pm.

	REGULADOR	
	XylS y XylS1	XylS1
Residuo de α -CTD	265	259
	268	260
	269	263
	273	289
	287	295
	291	297
	293	303
	296	
	298	
	299	
	306	

Residuos de α -CTD que afectan a la transcripción desde el promotor Pm mediada por los reguladores XylS y XylS1 (columna izquierda) o sólo por el regulador XylS1 (columna derecha). Ver detalles en el texto.

2.2.3. ¿Qué residuos de XylS determinan los contactos con α -CTD?

Los residuos 289 y 291 de α -CTD forman parte del “determinante 289” de α -CTD, donde se dan las interacciones con diversos reguladores positivos tales como CRP, FNR, MetR y OmpR, (Busby y Ebright, 1999; Fritch *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000; Savery *et al.*, 1998; Slauch *et al.*, 1991).

Los resultados presentados en las Figuras 2.3 y 2.4 revelaban que la transcripción desde Pm dependiente de XylS no se veía afectada de forma significativa cuando se sobreexpresaba un mutante de α -CTD que portaba una sustitución a alanina en la posición 289; sin embargo, la sobreexpresión de α -CTD con alanina en la posición 291 da lugar a un descenso en la actividad del 52%. Por otro lado, se observó que el nivel de transcripción mediado por XylS1 descendió hasta el 60% en un fondo en el que se estaba sobreexpresando un derivado de α -CTD con alanina en la posición 289, pero no así en un fondo en el que se sobreexpresaba α -CTD con alanina en la posición 291. Esto sugería posibles interacciones preferentes de XylS y XylS1 con los residuos que ocupan las posiciones 291 y 289 en α -CTD respectivamente.

Para identificar que residuo/s en XylS1 hacen que este regulador establezca contactos preferentes con α -CTD en un residuo distinto al de XylS, hemos analizado el efecto que ejerce un conjunto de mutaciones en XylS en la expresión desde Pm en fondos que sobreexpresan las dos variantes de α -CTD (con sustituciones a alanina en las posiciones 289 y 291).

Los mutantes de XylS que se han utilizado son aquellos en los que el residuo correspondiente de XylS se ha sustituido por el que aparece en XylS1. Estos mutantes son XylSC4R (mutante de XylS en el que la Cys 4 se ha sustituido por Arg), XylSC53G, XylSG90D, XylSD137E y XylSH153N (la generación de estos mutantes se describió en detalle en el apartado 1.1 del Capítulo 1). Además de estos mutantes sencillos, se ha utilizado el doble mutante XylSD137E-H153N, que como se ha visto en el capítulo anterior, se comportaba de forma idéntica a XylS1.

Para llevar a cabo los ensayos, se transformó la cepa *E. coli* MC4100 con pERD100 (Pm::*lacZ*), pLAR1 (*xylS*), pLAR2 (*xylSC4R*), pLAR3 (*xylSC53G*), pLAR4 (*xylSG90D*), pLAR5 (*xylSD137E*), pLAR6 (*xylSH153N*),

pLAR16 (*xylSD137E,H153N*) o pLAR32 (*xylS1*), así como con el plásmido que sobreexpresa la subunidad α silvestre (pREII- α) o el derivado de α que porta una sustitución simple a alanina en las posiciones 289 y 291. Esta cepa se cultivó a 30°C durante 12 a 16 horas en LB con los antibióticos adecuados, tras lo cual se diluyó 100 veces en el mismo medio y tras 1 hora de incubación a 30°C se dividió en dos fracciones alícuotas; una se mantuvo como control y a la segunda se le añadió 1mM del inductor 3-metilbenzoato en concentración 1mM. Los resultados se muestran en la Tabla 2.4. Los niveles de expresión en ausencia de inductor se mantuvieron entre 50 y 70 unidades Miller.

Tabla 2.4. Efecto de la sustitución a alanina en las posiciones 289 y 291 de α -CTD en la transcripción desde Pm mediada por reguladores XylS mutantes.

Regulador	Actividad β -galactosidasa (%)		
	Sustitución en α -CTD		
	Silvestre	289A	291A
XylS	100	90	48
XylS C4R	100	91	52
XylS C53G	100	82	52
XylS G90D	100	82	48
XylS D137E	100	54	72
XylS H153N	100	61	70
XylS D137E-H153N	100	60	87
XylS1	100	59	90

La cepa *E. coli* MC4100 se transformó con los plásmidos pERD100, pLAR1 (*xylS*) o derivados y pREII- α (α -CTD) o derivados. La actividad β -galactosidasa se determinó como se indica en el texto. El 100% de actividad correspondió a 1400 Unidades Miller para XylS, 800 Unidades Miller para XylSC4R, 1100 Unidades Miller para XylSC53G, 1060 Unidades Miller para XylSG90D, 625 Unidades Miller para XylSD137E y XylSH153N y 210 Unidades Miller para XylSD137E-H153N y XylS1. Los valores son la media de 3 a 5 determinaciones independientes y las desviaciones estándar en todos los casos fueron inferiores al 15% de la media.

Analizando estos resultados, se puede ver que las mutaciones que afectan a las posiciones 4, 53 y 90 de XylS no tienen un efecto significativo en el nivel de expresión desde Pm en comparación con el mediado por el regulador XylS silvestre, mientras que las mutaciones puntuales en las posiciones 137 y 153 hacen que el nivel de expresión descienda de forma significativa. Los resultados también muestran que el doble mutante XylSD137E,H153N tiene un patrón de expresión casi idéntico al de XylS1. En resumen, estos resultados sugieren que los residuos 137 y 153 de XylS alteran las interacciones preferentes con el residuo 291 de α -CTD por el residuo 289.

DISCUSIÓN DEL CAPÍTULO.

XylS es una proteína de 321 aminoácidos (Inouye *et al.*, 1986; Mermod *et al.*, 1987; Spooner *et al.*, 1987) que pertenece a la familia de reguladores transcripcionales AraC/XylS (Gallegos *et al.*, 1997). Esta familia está constituida por más de 280 proteínas (Tobes y Ramos, 2002) que participan en la regulación de la transcripción en respuesta a la presencia de distintas fuentes de carbono y nitrógeno, patogénesis y respuesta a agentes alquilantes en bacterias. Prácticamente todos los miembros de esta familia son capaces de activar la transcripción, esto hace pensar que el mecanismo de activación utilizado por estas proteínas se ha conservado, aunque distintos subconjuntos de miembros de esta familia puedan utilizar mecanismos diferentes. Varios miembros de la familia AraC/XylS requieren el dominio C-terminal de la subunidad α de la ARN polimerasa (α -CTD) y el dominio C-terminal de la subunidad σ para mediar activación máxima (Bhende y Egan., 2000; Holcroft y Egan., 2000; ^{a, b}Jair *et al.*, 1995; 1996a y b; Landini *et al.*, 1997, 1998; Landini y Busby, 1999; Lonetto *et al.*, 1998; Ruiz *et al.*, 2001). Sin embargo, se piensa que aún quedan por identificar una o varias dianas de activación adicionales. Por ejemplo, se ha visto que SoxS es capaz de activar *in vitro* la transcripción desde un promotor de clase II utilizando una ARN polimerasa reconstituida que carece de α -CTD y de los residuos C-terminales de σ^{70} (Jair y Wolf, resultados no publicados). Una de esas dianas podría ser el dominio N-terminal de la subunidad α de la ARN polimerasa (α -NTD), ya que se ha demostrado que los residuos 162 a 165 de α -NTD son necesarios para la activación de la transcripción de promotores de clase II dependientes de CRP, que son aquellos en los que el sitio de unión de CRP solapa con el hexámero -35 del promotor (Niu *et al.*, 1996). Para determinar si α -NTD interviene en la activación de la transcripción desde el promotor Pm mediada por XylS y XylS1, se ensayó la actividad del promotor Pm en unas condiciones en las que se

sobreexpresaba la subunidad α silvestre o unos derivados de ésta que portaban sustituciones a alanina en las posiciones 162 a 165. De los resultados obtenidos se puede concluir que el determinante 162 a 165 de α -NTD no es necesario para la activación del promotor Pm mediada por los reguladores XylS y XylS1. Esto está en consonancia con los resultados obtenidos con otros miembros de la familia como son RhaS, RhaR, MarA y SoxS (Egan *et al.*, 2000). Además, mediante mutagénesis por PCR de α -NTD y tras el análisis de 18000 transformantes, no se ha logrado aislar mutaciones en α -NTD que influyan en la activación mediada por el regulador SoxS (Egan *et al.*, 2000), por lo que es posible que ninguna porción de α -NTD intervenga en la activación mediada por estos reguladores. Estos activadores representan un conjunto diverso de la familia de proteínas AraC/XylS, los cuales, con excepción de pares particularmente relacionados (MarA/SoxS y RhaS/RhaR), comparten una identidad de secuencia aminoacídica del 24 al 28% solamente. Parece por lo tanto, que esta conclusión se puede aplicar a muchos otros miembros de la familia AraC/XylS.

Mediante un análisis mutacional detallado del promotor Pm se ha podido determinar que el sitio de unión de XylS en Pm está constituido por dos motivos de 15 pares de bases (5'-TGCAAGAAGCGGATA-3' y 5'-TGCAAAAATGGCTA-3') separados uno del otro por 6 nucleótidos. El motivo distal de unión de XylS se extiende desde -70 a -56 y el motivo proximal se extiende desde -49 a -35 (Gallegos *et al.*, 1996a; González-Pérez *et al.*, 1999; Kessler *et al.*, 1993). La organización de estos motivos es tal que el sitio de unión proximal de XylS solapa por dos pares de bases con la región -35 de unión de la ARN polimerasa (González-Pérez *et al.*, 2002) (Figura 2.5). A este tipo de promotores en los que las secuencias de reconocimiento de los reguladores solapan parcialmente con la región -35 de unión de la subunidad sigma de la ARN polimerasa se les denomina promotores de tipo II (Collado-Vides *et al.*, 1991; Rhodius *et al.*, 1997). En

la familia de reguladores transcripcionales AraC/XylS encontramos ejemplos de este tipo de promotores, como son *fumC*, *inaA* y *nfo* que son promotores reconocidos por los reguladores MarA, SoxS y Rob respectivamente (Martin *et al.*, 1999) o el promotor *rha* reconocido por RhaS (Bhende y Egan, 2000).

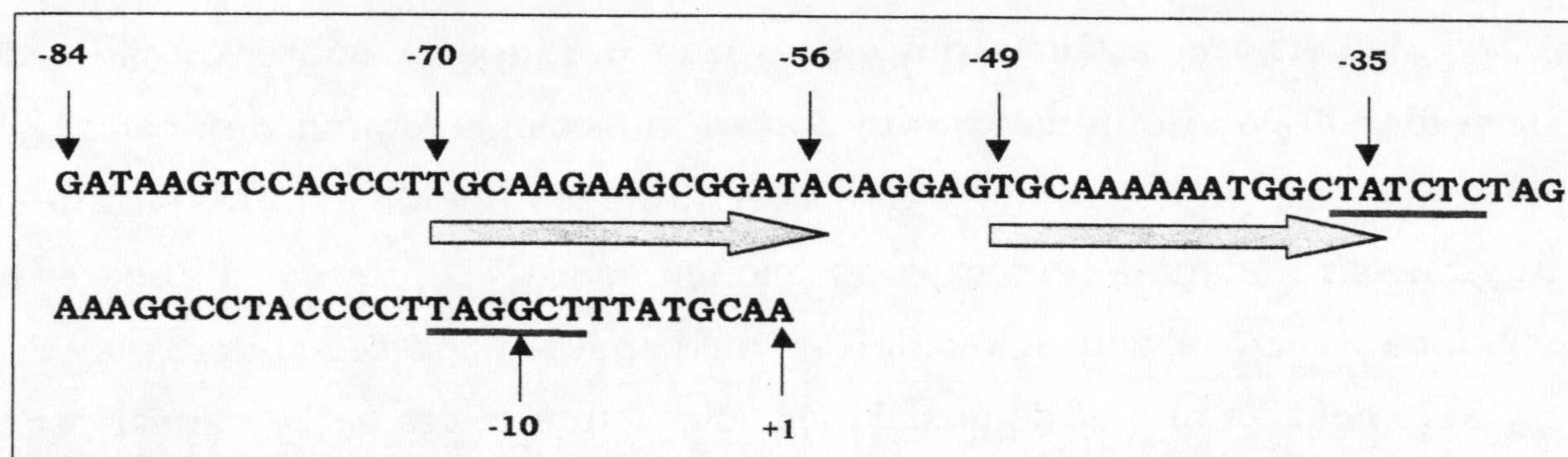


Figura 2.5. Secuencia del promotor Pm. Se muestra la región comprendida entre las posiciones -84 a +1. Las flechas violeta indican los sitios de unión distal y proximal de XylS. Las bases subrayadas en rojo representan las posibles secuencias reconocidas por la ARN polimerasa. Las flechas negras indican distintas posiciones a lo largo de la secuencia del promotor.

En la mayoría de los promotores, cuando existe un solapamiento entre los sitios de unión del regulador y la región -35, es frecuente que el regulador interaccione con las subunidades α y/o σ de la ARN polimerasa (Busby y Ebright, 1997; Jin *et al.*, 1995). Por lo tanto, esta organización sugiere que la proteína XylS podría contactar con la maquinaria de la ARN polimerasa.

Este trabajo se ha centrado en el estudio de las posibles interacciones de los reguladores XylS y XylS1 con la subunidad α de la ARN polimerasa, y más concretamente con el dominio C-terminal de la misma (α -CTD). Los análisis realizados han puesto de manifiesto que la transcripción desde Pm dependiente de XylS desciende cuando se sobreexpresa un derivado de la subunidad α que carece del dominio C-terminal. Estos resultados indican que el truncamiento de α -CTD afecta a

la activación de Pm dependiente de XylS. Este efecto es similar al que se ha descrito *in vitro* para la activación de la transcripción desde el promotor P_{cooF} mediada por el regulador CooA en *Rhodospirillum rubrum*. Este activador, perteneciente a la familia de CRP, actúa como un sensor de CO que se une a secuencias específicas de ADN en respuesta a la presencia de CO (He *et al.*, 1999).

Mediante el análisis del efecto que produce la sobreexpresión de derivados de la subunidad α que portan mutaciones simples en cada una de las posiciones del dominio C-terminal, hemos podido comprobar que la sustitución a alanina en varias posiciones de α -CTD provoca un descenso significativo en la activación de Pm mediada por los reguladores XylS y XylS1, mientras que otras posiciones sólo tienen efecto en la transcripción desde Pm dependiente de XylS1. El dominio C-terminal de la subunidad α (residuos 233 a 329) está formado por cuatro α -hélices y dos grandes lazos (Figura 2.6). La hélice 1 está formada por los aminoácidos 264 a 273, la hélice 2 abarca los residuos 278 a 283, los residuos 286 a 292 forman la hélice 3 mientras que la hélice 4 está constituida por los residuos 297 a 309.

La mayoría de los residuos en la hélice 1, la mitad N-terminal de la hélice 4 y la región en lazo entre las hélices 3 y 4, están implicados en interacciones con el ADN (Jeon *et al.*, 1995). Además, mediante técnicas genéticas y bioquímicas se ha demostrado que un subconjunto de residuos, concretamente los que ocupan las posiciones 265, 268, 269, 296, 298 y 299, localizados en estas regiones son importantes para las interacciones de α -CTD con elementos UP de diferentes promotores (Artsimovitch *et al.*, 1996; Fritsch *et al.*, 2000; Gaal *et al.*, 1996; Igarashi e Ishihama, 1991; Murakami *et al.*, 1996; Prost *et al.*, 1999; Ross *et al.*, 1998; Savery *et al.*, 1995; van Ulsen *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1997).

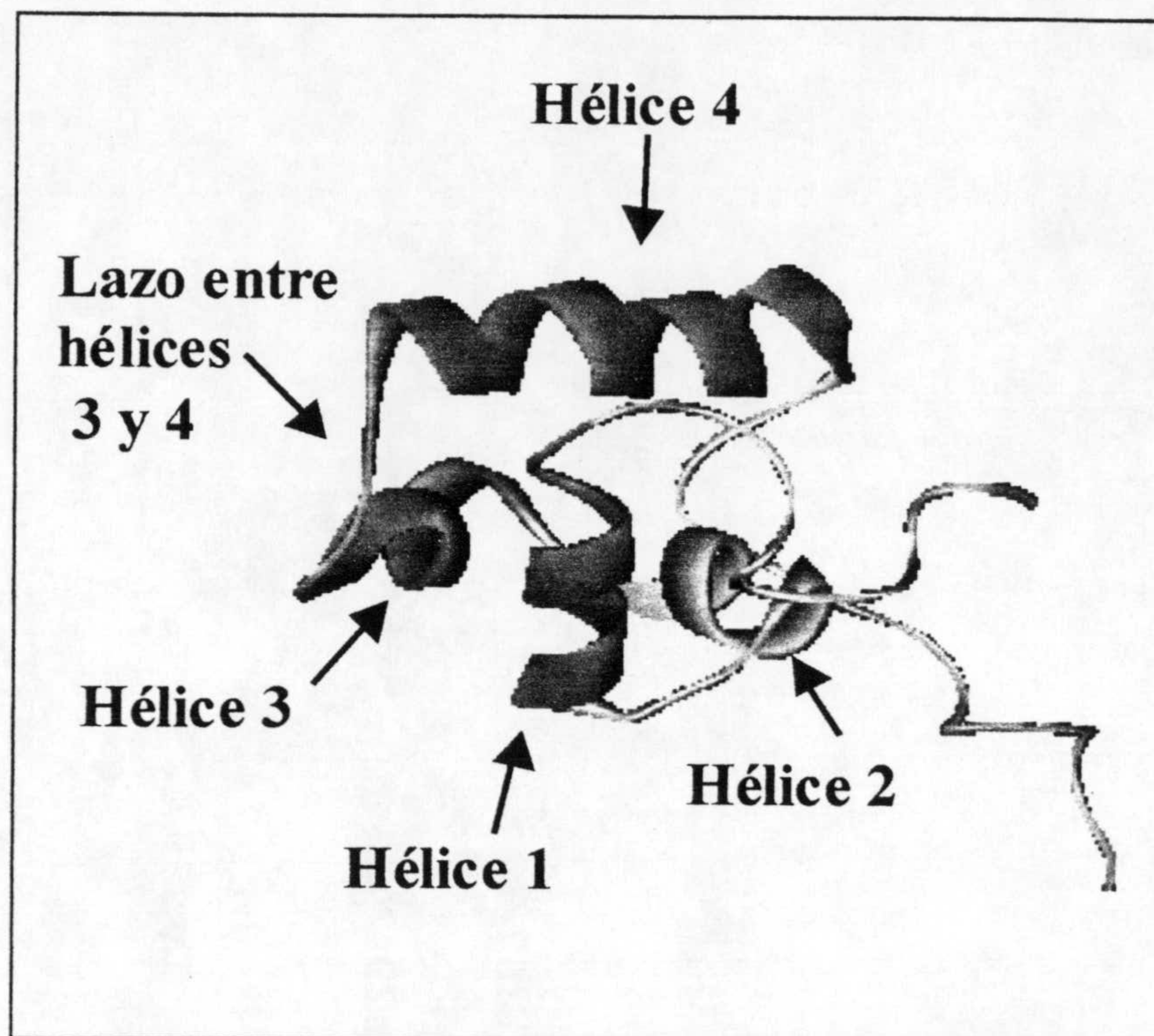


Figura 2.6. Estructura del dominio C-terminal de la subunidad α de la ARNP (α -CTD). El modelo está basado en las coordenadas atómicas de Jeon *et al.* (1995).

De las 11 mutaciones que afectaban de forma significativa el nivel de expresión desde Pm mediado tanto por XylS como por XylS1, 9 de ellas estaban localizadas en la hélice 1 (265, 268, 269 y 273), en la hélice 4 (298, 299 y 306) y en el lazo entre las hélices 3 y 4 (293, 296), lo que sugiere que podrían estar interaccionando con el ADN del promotor Pm (Figura 2.7). Estas observaciones están en consonancia con la identificación de los residuos 262, 265 y 297 como los que intervienen principalmente en la transcripción desde el promotor *mtr* dependiente de TyrR (Yang *et al.*, 1997), y en la estabilización del complejo ternario de la proteína Mor y la ARN polimerasa en el promotor Pm del fago Mu (Artsimovitch *et al.*, 1996).

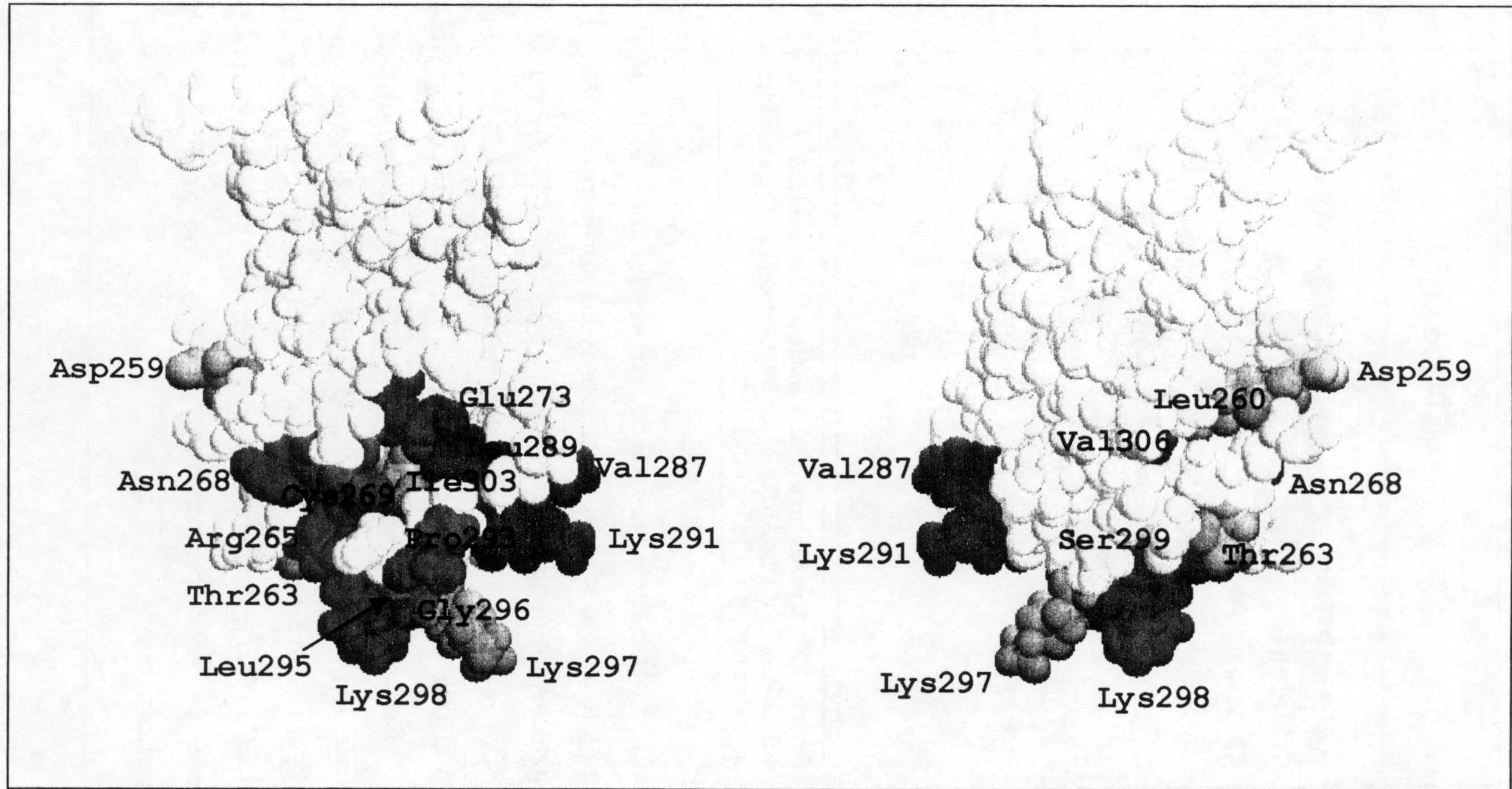


Figura 2.7. Modelo espacial de la estructura de α -CTD. El modelo espacial está basado en las coordenadas atómicas de Jeon *et al.* (1995). Los residuos coloreados son aquellos que se han identificado como importantes para la activación del promotor Pm. En rojo se representan los residuos que pueden ser importantes para las interacciones con el ADN. Los residuos que aparecen en verde pueden estar implicados en interacciones con los reguladores XylS. Los residuos que pueden estar implicados en interacciones con el ADN cuando el activador es XylS1 aparecen en naranja. Los dos modelos están relacionados entre sí por una rotación de 180° alrededor del eje vertical.

En Pm, aguas arriba de la región -35, se localizan dos segmentos ricos en A/T, entre -40 y -46 y entre -54 y -58 que, aunque no presentan alta homología con los elementos UP, podrían constituir la región de reconocimiento de la subunidad α . Además, se ha determinado que el promotor Pm presenta una curvatura de 40° producida por una región de As localizada entre las posiciones -41 y -46 (González-Pérez, 2001) y se ha comprobado que α -CTD reconoce la estructura del esqueleto azúcar-fosfato del surco menor del ADN y que se une preferentemente a secuencias que contienen regiones ricas en As y que muestran una curvatura intrínseca (Yasuno *et al.*, 2000). Recientemente se ha determinado que los residuos 265 y 298 de α -CTD están insertados directamente en el surco menor del ADN (Ross *et al.*, 2001). Nuestros resultados están de acuerdo con esta observación, ya que la sobreproducción de subunidades α que portan sustituciones a alanina en las posiciones 265 y 298 producen un marcado efecto en la transcripción desde Pm (Figuras 2.3 y 2.4).

De las siete mutaciones que afectaban al nivel de transcripción mediado por XylS1 pero no por XylS (Figura 2.4), seis de ellas (259, 260, 263, 295, 297 y 303) están localizadas en o cerca de las regiones que están implicadas en las interacciones de α -CTD con los elementos UP (Figura 2.7), y por lo tanto podrían reflejar una sutil diferencia en la interacción de α -CTD con los dos activadores. Es posible que el activador más débil (XylS1) disminuya las interacciones proteína-proteína con α -CTD y por lo tanto, el papel de las interacciones de α -CTD con el ADN sea más observable. Tomando en consideración todos estos resultados podemos decir que α -CTD es necesaria para conseguir la máxima activación de la transcripción desde el promotor Pm, y que al menos parte de ese papel implica interacciones con el ADN del promotor Pm.

La sustitución a alanina en las posiciones 287 y 291 provoca un descenso en la actividad del promotor Pm. Esto puede ser el resultado de

una disminución en las interacciones de α -CTD con los reguladores XylS y XylS1 en el promotor Pm. Una posición importante sólo para la transcripción desde Pm mediada por XylS1 es la 289, que está localizada de forma adyacente a los residuos 287 y 291. Estos tres aminoácidos (287, 289 y 291) están localizados en la hélice 3 y forman una agrupación (Figura 2.7) que podría representar un sitio de interacción entre α -CTD, XylS y XylS1. Debemos hacer notar que los residuos 287 y 289 se han identificado como parte del “determinante 289” de α -CTD, el cual es necesario para el establecimiento de interacciones cooperativas entre α -CTD y CRP (Savery *et al.*, 1995), esto sostiene la conclusión de que estos residuos pueden definir un sitio de contacto con los reguladores XylS y XylS1. Además, se sabe que los residuos 289 y 290 de α -CTD interaccionan con la proteína Ogr del fago P2 (Ayers *et al.*, 1994), y que estos mismos residuos podrían estar implicados en interacciones de MetR con α -CTD, ya que la transcripción dependiente de MetR desde los promotores *metH* y *metE* se ve disminuida con mutantes de α -CTD que presentan sustituciones a alanina en dichos residuos (Fritsch *et al.*, 2000). Por lo tanto, nuestros resultados indican que el conjunto de residuos 287 a 291 que se localizan en la superficie de α -CTD podrían definir un sitio de interacción con los activadores XylS y XylS1. Así, XylS establecería contactos preferentemente con el residuo 291 de α -CTD, mientras que XylS1 lo haría con el residuo 289 (ver Tabla 2.3). La utilización de una batería de mutantes en XylS ha permitido establecer que los residuos 137 y 153 de XylS influyen en las interacciones con α -CTD, puesto que tanto los mutantes simples en estas posiciones como el mutante doble cambian las interacciones de manera preferencial hacia el residuo 289.

Capítulo 3

PURIFICACIÓN DEL EXTREMO AMINO-TERMINAL DE XylS

La proteína XylS pertenece a la familia de reguladores transcripcionales AraC/XylS. Muchos miembros de esta familia presentan serios problemas de solubilidad, por ejemplo, las proteínas RhaS, XylS y SoxS son extremadamente insolubles. La insolubilidad de la familia AraC/XylS no es única, de hecho, muchas proteínas forman cuerpos de inclusión insolubles cuando se sintetizan a altos niveles. Este problema parece ser especialmente acusado en proteínas reguladoras y otras proteínas de unión a ADN. Se ha sugerido que en este último caso, ello es debido a que el dominio de unión a ADN está total o parcialmente desordenado cuando la proteína no se encuentra unida a ADN (Spolar y Record, 1994). Parece ser que el plegamiento incompleto de la región de unión a ADN incrementa la superficie expuesta al disolvente de aminoácidos hidrofóbicos en algunas proteínas, lo que genera la tendencia general de estas proteínas a agregarse cuando se sobreproducen.

Sin embargo, otras proteínas de la familia como AraC, MelR o RhaR son lo suficientemente solubles cuando se sobreproducen como para permitir llevar a cabo análisis bioquímicos de una forma directa (Caswell *et al.*, 1992a y b; Schleif y Favreau, 1982; Tobin y Schleif, 1990b). Esto ha permitido confirmar los resultados que se habían obtenido anteriormente mediante análisis genéticos, como por ejemplo, la localización de los sitios de unión de estas proteínas en sus promotores correspondientes así como el análisis de las interacciones que se producen entre la proteína y su promotor (Bourgerie *et al.*, 1997; Michán *et al.*, 1995; Tobin y Schleif, 1990a y b; Williams *et al.*, 1994) o el análisis de las interacciones que se establecen entre la proteína y su efector (Soisson *et al.*, 1997).

La extremada insolubilidad que presentan algunos miembros de la familia de AraC/XylS es un impedimento serio para la caracterización *in vitro* de las interacciones proteína-proteína, proteína-ADN o proteína-efector utilizando métodos ordinarios. No obstante, se han podido realizar algunos estudios *in vitro* como ensayos de retardo en gel o protección frente a ADNasa con algunas proteínas de la familia que son insolubles; por ejemplo, con el regulador RhaS se llevó a cabo una renaturalización en presencia de ADN que permitió definir su sitio de unión en el promotor *rhaBAD* (Egan y Schleif, 1994). Otro método que se ha utilizado para purificar proteínas insolubles es la expresión de estas proteínas como proteínas de fusión; se han utilizado sistemas de fusión a la glutatión transferasa (GST) y sistemas de fusión a la proteína de unión a maltosa (MBP). Por ejemplo, la fusión MBP-SoxS permitió identificar los sitios de control de los genes inducibles por el ión superóxido en *Escherichia coli* (Fawcett y Wolf, 1994), mientras que la fusión a la glutatión-S-transferasa permitió purificar la proteína MelR (Bourgerie et al., 1997). Sin embargo, otras proteínas de la familia se han purificado sin necesidad de fusionarlas a otros péptidos, tal es el caso de los reguladores MarA y Rob (Jair et al., 1995; Kwon et al., 2000; Rhee et al., 1998).

En el caso del regulador XylS, se han encontrado numerosas dificultades a la hora de purificar la proteína completa (de Lorenzo et al., 1993). Kaldalu y colaboradores (1996) utilizaron una estrategia compleja que consistió en fusionar el epítipo hemaglutinina (HA) del virus influenza al extremo N-terminal de XylS, lo que permitió purificar la proteína mediante el anticuerpo monoclonal 12CA5 acoplado a una matriz de sefarosa-ProteínaA. La proteína inmovilizada en este soporte se utilizó para realizar ensayos de improntas *in vitro* (Kaldalu et al., 1996, 2000).

A la vista de las dificultades que presenta la purificación de la proteína completa, se decidió purificar por separado los dos dominios del regulador. En este capítulo se describen las estrategias utilizadas para intentar purificar y caracterizar el extremo N-terminal de XylS. Paralelamente, en nuestro grupo de investigación se está llevando a cabo la purificación y caracterización del extremo C-terminal de XylS, reponsable de la unión a ADN, por parte de la Dra. María del Mar González Pérez.

3.1. Definición del dominio N-terminal de XylS.

Para definir el dominio amino-terminal de la proteína XylS y determinar el punto en el cual se iba a truncar la proteína, se alineó la secuencia de aminoácidos de las proteínas AraC y XylS (Figura 3.1). Como se ha descrito en la Introducción, la proteína AraC es un dímero constituido por dos monómeros; cada monómero presenta dos dominios, un dominio C-terminal implicado en la unión a ADN y activación de la transcripción, que está constituido por los aminoácidos 178 a 292, conectado a través de un brazo flexible definido entre los residuos 171 a 177 con el dominio N-terminal responsable de la dimerización, reconocimiento y unión del efector (residuos 1 a 170).

La figura 3.1 muestra el alineamiento en función del cual se definió el dominio N-terminal de XylS como la porción de proteína comprendida entre los aminoácidos Met 1 a Phe 213.

XylS	1	MDFCLLNEKSQIFVHAEPYAVSDYVNQYVGTHSIRLPKGGRPAGRLHHRI
AraC	1	MAEAQNDFLLPGYSFNA----HLV
		<u>Brazo N-terminal</u>
XylS	51	FGCLDLCRISYGGSVRVISPGLETQYHLQIILKGHCLWRGHGQEHYFAPG
AraC	21	AGLTPIEANGYLDFIDRPLGMKG-YILNLTIRGQGVVKNQGREFVCRPG
XylS	101	ELLLLNPDDQADLTYSCEKFIKLPVSVLDRACSD-NNWHKPREGIRF
AraC	70	DILLFPPGEIHHYGRHPEAREWYHQVVYFRPRAYWHEWLNWPSIFANTGF
XylS	150	AARHNLQQLDGFINLLGLVCDEAEHTKSMPRVQEHYAGIIASKLLEMLGS
AraC	120	FRPDEAHQ-PHFSDLFGQIINAGQ---GEGRYSELLAINLLEQLLLRME
XylS	200	NVSREIFSKGNPSFERVVQFIEENLK-RNISLERLAELAMMSPRSLYNLF
AraC	166	AINESLHPPMDNRVREACQYISDHLADSNFDIASVAQHVCCLSPSRLSHLF
		<u>HTH-1</u>
XylS	249	EKHAGTTPKNYIRNRKLESIRACLNDPSANVRSITEIALDYGFLHLGRFA
AraC	216	RQQLGISVLSWREDQRISQAKLLL---STTRMPIATVGRNVGFDDQLYFS
		<u>HTH-2</u>
XylS	299	ENYRSAFGELPSDTLRQCKKEVA
AraC	263	<u>RVFKKCTGASPSEFRAGCEEKVNDVAVKLS</u>

Figura 3.1. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las proteínas XylS y AraC. El rectángulo indica la región de proteína elegida como dominio N-terminal de XylS. En rojo se representan los aminoácidos que constituyen el dominio C-terminal de AraC, en azul los que forman el dominio N-terminal y en verde, el segmento que une ambos dominios. Se indica también los residuos que forman los dos motivos hélice-giro-hélice (HTH) de unión a ADN así como los que constituyen el brazo N-terminal del regulador.

3.2. Purificación del extremo amino-terminal de XylS fusionado a una cola de hexa-histidina.

Como primera aproximación para purificar el extremo amino-terminal de XylS se intentó sobreexpresar éste tras conectarle una cola de hexa-histidina que permitiese la purificación en un solo paso de la proteína mediante cromatografía de afinidad utilizando una columna

cargada con el ión Ni^{2+} . Para ello se utilizó el vector pQE30 (ver detalles en la sección Materiales y Métodos) (Figura 3.2).

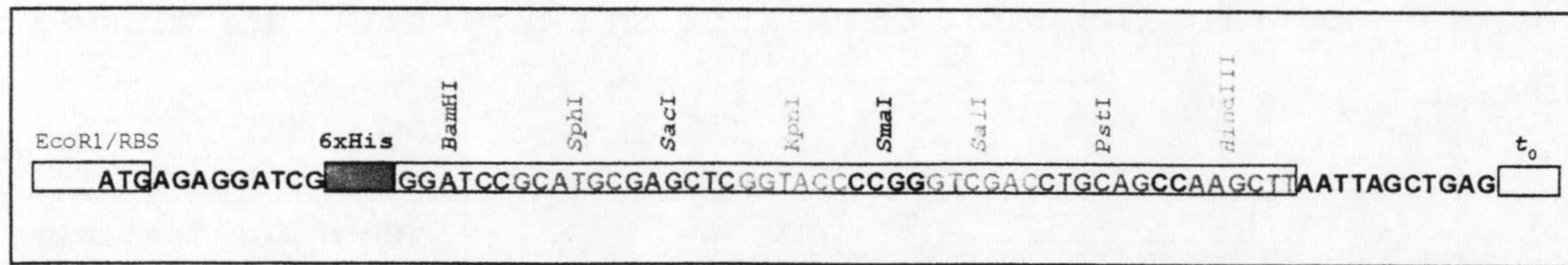


Figura 3.2. Esquema del sitio de clonación múltiple del plásmido pQE30. Las dianas para los enzimas de restricción se muestran en diferentes colores. Se muestra también el codon de inicio (ATG). El rectángulo rojo representa los codones que codifican las 6 His. Ver más detalles en el texto.

El fragmento de ADN correspondiente al extremo amino-terminal de XylS se obtuvo por amplificación por PCR utilizando como molde el vector pCMX2 (Manzanera *et al.*, 2000) (ver detalles en la sección Materiales y Métodos), que porta la secuencia codificante del gen *xylS*. El fragmento que se obtuvo tenía un tamaño de 668 pb y contenía la secuencia que correspondía a la porción de la proteína XylS comprendida entre los aminoácidos Met1 a Phe213. Los dos oligonucleótidos que se utilizaron en la reacción portaban los sitios de restricción de las enzimas *Bam*HI y *Sal*II (Tabla M.4). El oligo que contenía la diana para *Sal*II contenía además dos codones de parada de la traducción. El fragmento amplificado se digirió con sendas enzimas de restricción y se clonó en los sitios *Bam*HI-*Sal*II de pQE30, obteniéndose un plásmido que se denominó pQNXyl.

Tras transformar la ligación del fragmento *Bam*HI-*Sal*II de *xylS* con pQE30 y comprobar mediante análisis de restricción y secuenciación que el plásmido resultante presentaba el tamaño correcto y que el inserto no contenía ninguna mutación, se seleccionó uno de los clones obtenidos.

La Figura 3.3 muestra la secuencia de ADN resultante de la fusión, en ella se puede observar que el primer aminoácido de XylS queda en fase con los tripletes que codifican las seis histidinas, por lo que es de suponer

que la proteína recombinante obtenida se expresará desde el promotor T5 en la pauta de lectura correcta. De la secuencia obtenida se puede deducir que la proteína recombinante debería mostrar un tamaño aproximado de 25 kDa.

BamHI Met1

ATGAGAGGATCG **CATCACCATCACCATCAC**GGATCCATGGATTTTTGCTT

ATTGAACGAGAAAAGTCAGATCTTCGTCCACGCCGAGCCCTATGCAGTCT

CCGATTATGTTAACCAGTATGTCGGTACGCACTCTATTCGCCTGCCAAG

GGCGGGCGCCCGGCAGGCAGGCTGCACCACAGAATCTTCGGATGCCTCGA

CCTGTGTGCGAATCAGCTACGGCGGTAGCGTGAGGGTAATCTCGCCTGGAT

TAGAGACCTGTTATCATCTGCAAATAATACTCAAAGGCCATTGCCTGTGG

CGTGGCCATGGCCAGGAGCACTATTTTGCGCCGGGCGAACTATTGCTGCT

CAATCCGGATGACCAAGCCGACCTGACCTATTCAGAAGATTGCGAGAAAT

TTATCGTTAAATTGCCCTCAGTGGTCTTGATCGGGCATGCAGTGACAAC

AATTGGCACAAGCCGAGGGAGGGTATCCGTTTCGCCGCGGACACAATCT

CCAGCAACTCGATGGCTTTATCAATCTACTCGGGTTAGTTTGTGACGAAG

CGGAACATACAAAGTCGATGCCTCGGGTCCAAGAGCACTATGCGGGGATC

ATCGCTTCCAAGCTGCTCGAAATGCTGGGCAGCAATGTCAGCCGTGAAAT

Stop Stop

TTTCAGCAAAGGTAACCCGTCT **TTCTAGTGAGTCGAC**

Phe213 SalI

Figura 3.3. Secuencia de ADN de la fusión del extremo N-terminal de XylS a una cola de hexa-histidina. En negro se muestra parte de la secuencia del vector pQE30. La caja amarilla muestra los seis codones que codifican para His. En rojo se muestra la secuencia de ADN del fragmento del gen *xylS* que codifica la porción de proteína comprendida entre los aminoácidos Met1 a Phe213. En azul se muestran las dianas utilizadas en la clonación. En morado se muestran los dos codones de parada de la traducción.

Para comprobar si el dominio N-terminal de XylS fusionado a la cola de hexa-histidina era soluble, la cepa *E. coli* JM109 que portaba los plásmidos pQE30 y pQNXyl se cultivó según las condiciones descritas en el apartado 12 de la sección Materiales y Métodos, y se prepararon extractos celulares en los que se analizó la presencia de la proteína recombinante tanto en la fracción soluble como en la insoluble. La figura 3.4 es una electroforesis en gel de poliacrilamida que muestra el contenido proteico de la fracción soluble e insoluble de los cultivos de *E. coli* JM109 (pQE30) y *E. coli* JM109 (pQNXyl) en presencia y en ausencia del inductor IPTG.

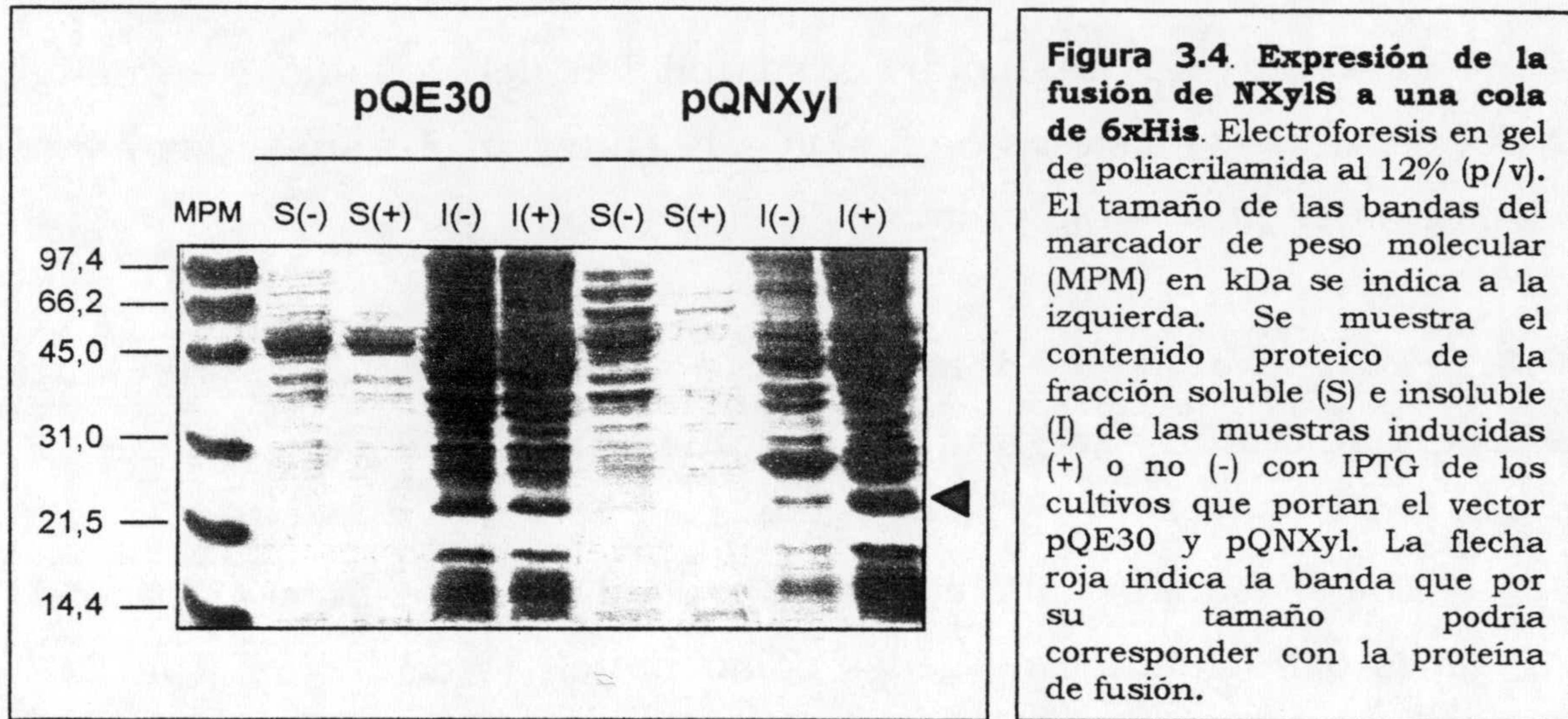


Figura 3.4. Expresión de la fusión de NXylS a una cola de 6xHis. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% (p/v). El tamaño de las bandas del marcador de peso molecular (MPM) en kDa se indica a la izquierda. Se muestra el contenido proteico de la fracción soluble (S) e insoluble (I) de las muestras inducidas (+) o no (-) con IPTG de los cultivos que portan el vector pQE30 y pQNXyl. La flecha roja indica la banda que por su tamaño podría corresponder con la proteína de fusión.

Como se puede observar, en la fracción proteica correspondientes a la cepa *E. coli* JM109 (pQNXyl) aparece una banda de inducción de aproximadamente 25 kDa que podría corresponder a la proteína recombinante constituida por el dominio N-terminal de XylS fusionado a una cola de hexa-histidina. Parece que esta banda sólo está presente en la fracción insoluble, lo que sugiere que la sobreproducción de esta proteína conlleva la formación de cuerpos de inclusión insolubles, por lo que este sistema de purificación quedó descartado.

3.3. Purificación del dominio amino-terminal de XylS fusionado a otros péptidos.

Una estrategia ampliamente utilizada para aumentar la solubilidad de proteínas que tienen tendencia a agregar consiste en fusionarlas a otra proteína altamente soluble. Entre las proteínas que han sido utilizadas como agentes solubilizantes se incluyen la tiorredoxina (TRX) (La Vallie *et al.*, 1993), la glutation-S-transferasa (GST) (Nygren *et al.*, 1994), la proteína de unión a maltosa (MBP) (Pryor & Leiting, 1997) y la proteína A (Samuelsson *et al.*, 1994).

Para intentar aumentar la solubilidad del dominio N-terminal de XylS, se utilizó el sistema de fusión a la glutathion-S-transferasa así como el sistema de fusión a la proteína de unión a maltosa.

3.3.1. Purificación del dominio amino-terminal de XylS mediante el sistema de fusión a la glutathion-S-transferasa (GST).

Este sistema permite inducir a altos niveles la expresión intracelular de genes o fragmentos de genes como proteínas de fusión a la GST de *Schistosoma japonicum*. A partir de un lisado bacteriano, se podría purificar en un solo paso la proteína de interés mediante cromatografía de afinidad utilizando una glutathion sefarosa. La separación de la proteína de interés de la GST se puede conseguir utilizando una proteasa específica, como el Factor Xa o la Trombina.

La construcción de la proteína de fusión entre la Glutathion-S-Transferasa (GST) y el dominio N-terminal de XylS se llevó a cabo utilizando el plásmido pGEX-4T-1 (ver detalles en la sección Materiales y Métodos). Este plásmido posee el promotor Ptac a partir del cual se expresa el gen que codifica la GST. Tras el gen *gst* existe una secuencia que codifica una diana para la trombina y un sitio de clonación múltiple seguido de una secuencia de ADN que contiene varios codones de parada de la traducción (Figura 3.5).

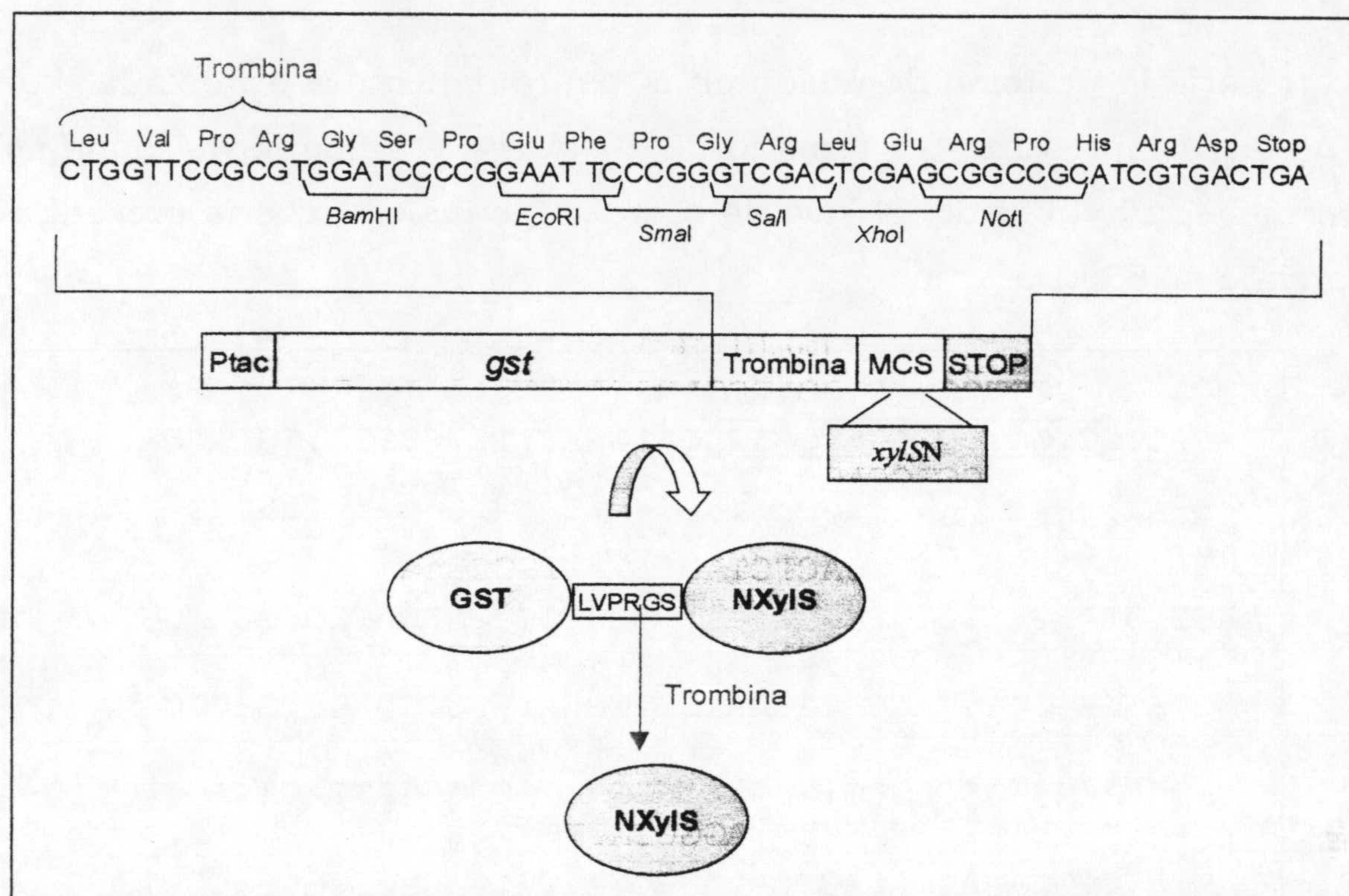


Figura 3.5. Fusión GST-NXylS. La parte superior representa un esquema del plásmido pGEX-4T-1, donde se detalla la secuencia de ADN comprendida entre la diana para la trombina y el codón STOP. En la parte inferior se muestra un esquema de la proteína de fusión y la obtención del fragmento NXylS.

El fragmento de ADN correspondiente al extremo amino terminal de XylS se obtuvo a partir del plásmido pQNXyl. En primer lugar se digirió dicho plásmido con las enzimas *Bam*HI y *Sal*I y los dos fragmentos resultantes se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa. Posteriormente se extrajo de la agarosa la banda de 657 pb que contenía el fragmento del gen *xylS* que codifica la porción de proteína comprendida entre los aminoácidos Met1 a Phe 213 más dos codones de parada de la traducción. Este fragmento se clonó en los sitios *Bam*HI-*Sal*I del plásmido pGEX-4T-1 y así se obtuvo el plásmido pGEX-NXyl. La secuencia de ADN de la fusión génica resultante se muestra en la Figura 3.6. Como se puede observar, el primer aminoácido de XylS queda en fase con la glutatión transferasa, por lo que se puede suponer que a partir del promotor Ptac se

expresaría la proteína de fusión en la pauta de lectura apropiada. Puesto que la GST presenta un tamaño de 29 kDa y el tamaño del dominio N-terminal de XylS es de 24 kDa, la proteína de fusión debería presentar un tamaño de 53 kDa.



Figura 3.6. Secuencia de ADN de la fusión génica *gst::xylSN*. En azul se representa parte de la secuencia del vector pGEX-4T-1. La caja amarilla representa el sitio de corte de la Trombina. En rojo aparece la secuencia del fragmento del gen *xylS* que codifica la porción de proteína comprendida entre los aminoácidos Met1 a Phe213. En verde se muestran las dianas utilizadas en la clonación. En morado se muestran los dos codones de parada de la traducción que portaba el fragmento del gen *xylS* clonado. Las bases subrayadas muestran el último aminoácido de la GST así como los codones de parada que porta el vector.

Para comprobar si la proteína de fusión era soluble, la cepa *E. coli* DH5 α portando los plásmidos pGEX-4T-1 y pGEX-NXyl se cultivó según las condiciones descritas en el apartado 12 de la sección Materiales y Métodos y se obtuvieron extractos celulares en los que se analizó la presencia de la proteína de fusión GST-NXylS tanto en la fracción soluble como en la insoluble (Figura 3.7). Como se puede observar, en las fracciones proteicas correspondientes a la cepa *E. coli* DH5 α (pGEX-4T-1) aparece una banda de inducción de aproximadamente 25 kDa que probablemente corresponde a la GST codificada por el vector pGEX-4T-1. En el caso de la cepa *E. coli* DH5 α (pGEX-NXylS) aparece una banda de inducción de 55 kDa que por su tamaño podría corresponder a la proteína de fusión GST-NXylS, pero que es mucho más evidente en la fracción insoluble que en la fracción soluble, lo que indica que la sobreproducción de la proteína de fusión la llevaba a formar preferentemente cuerpos de inclusión insolubles.

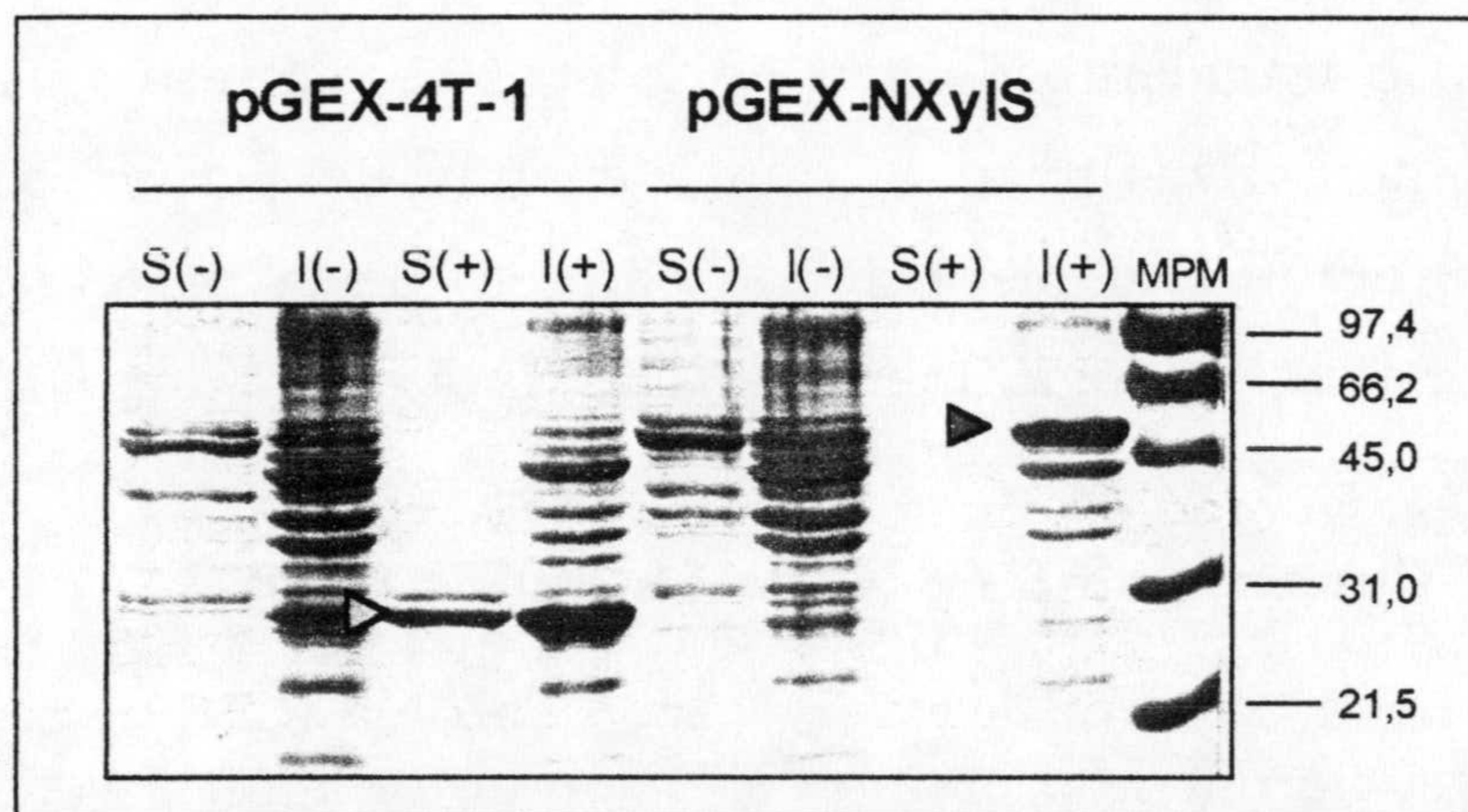


Figura 3.7. Expresión de la fusión de NXylS a la proteína GST. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% (p/v). El tamaño de las bandas del marcador de peso molecular (MPM) en kDa se indica a la derecha. Se muestra el contenido proteico de la fracción soluble (S) e insoluble (I) de las muestras inducidas (+) o no (-) con IPTG de los cultivos que portan el vector pGEX-4T-1 y pGEX-NXylS. Las flechas amarilla y roja indican las bandas que por su tamaño podrían corresponder con las proteínas GST y GST-NXylS respectivamente.

En 1995, Ghosh y colaboradores describieron que un descenso en la temperatura de crecimiento de las células favorecía la obtención de un mayor nivel de proteína soluble, por esta razón se realizó un ensayo idéntico al anterior, aunque la temperatura de cultivo en este caso fue de 25°C. Los resultados obtenidos fueron idénticos a los anteriores, de modo que la solubilidad de la proteína de fusión no mejoró con las nuevas condiciones, por lo que este sistema fue descartado para estudios posteriores.

3.3.2. Purificación del dominio amino-terminal de XylS mediante el sistema de fusión a la Proteína de Unión a la Maltosa (MBP).

En este sistema se produce un proceso de maduración artificial de proteínas que incrementa la solubilidad *in vivo* de proteínas recombinantes sobreproducidas en *E. coli*. Este sistema está basado en el procesamiento proteolítico de poliproteínas virales (Pérez-Martín *et al.*, 1997b). El gen o fragmento de gen de interés se expresa fusionado a la proteína de unión a maltosa, la cual, además de actuar como agente solubilizante promueve el plegamiento correcto de la proteína de interés en una conformación biológicamente activa (Kapust y Waugh, 1999).

3.3.2.1. Construcción de la fusión *malE::xylSN*.

La construcción de la proteína de fusión entre la MBP y el dominio N-terminal de XylS se llevó a cabo utilizando el plásmido pMAL-pV (ver detalles en la sección Materiales y Métodos). En este plásmido, el gen *malE* se expresa desde el promotor Ptac, tras este gen aparece el sitio de reconocimiento de la proteasa vírica Nla seguido de seis codones que codifican His y un sitio de clonación múltiple (Figura 3.8). Tras la producción, la proteína de fusión se podría cortar *in vivo* por la proteasa Nla que está codificada en *trans*. La proteína de interés permanecería

soluble y unida a una cola de hexa-histidina; esto permitiría su purificación en un solo paso mediante cromatografía de afinidad utilizando una columna cargada con el ión Ni^{2+} .

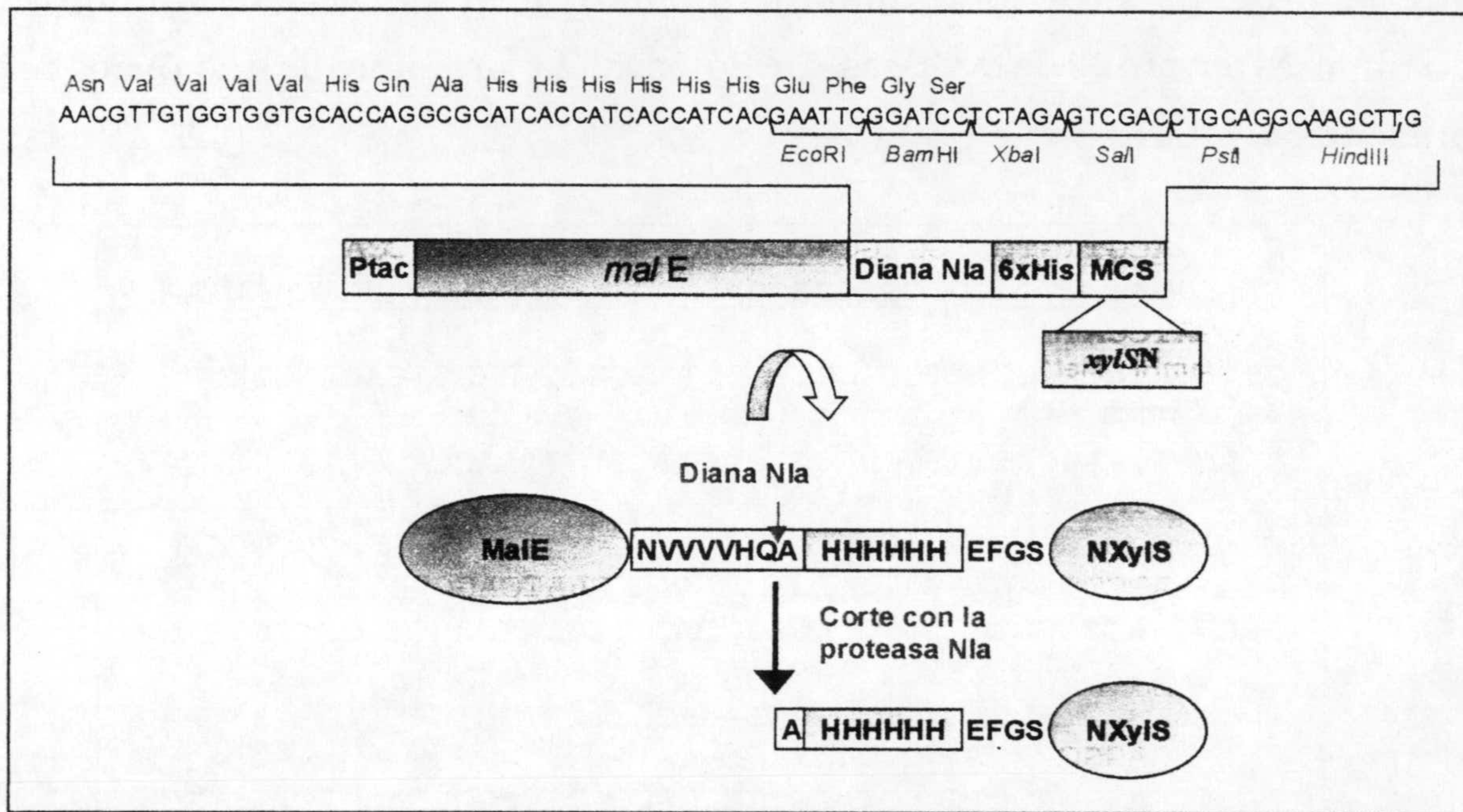


Figura 3.8. Fusión MBP-NXylS. La parte superior representa un esquema del plásmido pMAL-pV, donde se detalla la secuencia de ADN comprendida entre la diana de la proteasa Nla y el sitio de clonación múltiple. La parte inferior muestra un esquema de la proteína de fusión y la obtención del fragmento NXylS.

El fragmento de ADN correspondiente al extremo amino terminal de XylS se obtuvo a partir del plásmido pQNXyl. En primer lugar se digirió dicho plásmido con las enzimas *Bam*HI y *Sal*I y los dos fragmentos resultantes se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa, posteriormente se extrajo de la agarosa la banda de 657 pb que contenía el fragmento del gen *xylS* que codifica la porción de proteína comprendida entre los aminoácidos Met1 a Phe 213 más dos codones de parada de la traducción. Este fragmento se clonó en los sitios *Bam*HI-*Sal*I del plásmido pMAL-pV y así se obtuvo el plásmido pMAL-NXyl. Mediante análisis de restricción y secuenciación se comprobó que el inserto que contenía el plásmido resultante presentaba el tamaño y la secuencia correcta. La secuencia de ADN de la fusión génica se muestra en la Figura 3.9; como

se puede observar, el primer aminoácido de XylS queda en fase con la MBP, por lo que se puede suponer que a partir del promotor Ptac se expresaría la proteína de fusión en la pauta de lectura apropiada. Puesto que la proteína MBP presenta un tamaño de 41 kDa y el tamaño del dominio N-terminal de XylS es de 24 kDa, la proteína de fusión debería presentar un tamaño de 65 kDa.

```

GAAGGAACGTTGTGGTGGTGCACCAGGCGCATCACCATCACCATCACGAA
TTCGGATCCATGGATTTTTGCTTATTGAACGAGAAAAGTCAGATCTTCGT
BamHI Met1
CCACGCCGAGCCCTATGCAGTCTCCGATTATGTTAACCAGTATGTCGGTA
CGCACTCTATTTCGCCTGCCCAAGGGCGGGCGCCCGGCAGGCAGGCTGCAC
CACAGAATCTTCGGATGCCTCGACCTGTGTGCAATCAGCTACGGCGGTAG
CGTGAGGGTAATCTCGCCTGGATTAGAGACCTGTTATCATCTGCAAATAA
TACTCAAAGGCCATTGCCTGTGGCGTGGCCATGGCCAGGAGCACTATTTT
GCGCCGGGCGAACTATTGCTGCTCAATCCGGATGACCAAGCCGACCTGAC
CTATTCAGAAGATTGCGAGAAATTTATCGTTAAATTGCCCTCAGTGGTCC
TTGATCGGGCATGCAGTGACAACAATTGGCACAAGCCGAGGGAGGGTATC
CGTTTCGCCGCGCGACACAATCTCCAGCAACTCGATGGCTTTATCAATCT
ACTCGGGTTAGTTTGTGACGAAGCGGAACATACAAAGTCGATGCCTCGGG
TCCAAGAGCACTATGCGGGGATCATCGCTTCCAAGCTGCTCGAAATGCTG
GGCAGCAATGTCAGCCGTGAAATTTTCAGCAAAGGTAACCCGTCTTTCTAG
Phe213 Stop
TGAGTCGACCTGCAGGCAAGCTTG
Stop SalI
    
```

Figura 3.9. Secuencia de ADN de la fusión génica *male::xylSN*. En azul se representa parte de la secuencia del vector pMAL-pV. La caja amarilla representa el sitio de corte de la proteasa Nla. La caja verde representa la cola de hexa-his. En rojo aparece la secuencia del fragmento del gen *xylS* que codifica la porción de proteína comprendida entre los aminoácidos Met1 a Phe213. En verde se muestran las dianas utilizadas en la clonación. En morado se muestran los dos codones de parada de la traducción.

3.3.2.2. Expresión de la proteína de fusión MBP-NXylS.

La expresión de la proteína de fusión se realizó según las condiciones descritas por Pérez-Martín y colaboradores (1997b). La cepa *E. coli* DH5 α portando el plásmido pMAL-pV (MBP) ó pMAL-NXyl (MBP-NXylS) se cultivó en medio líquido con agitación durante 12-16 horas a 30°C, tras este tiempo se diluyó 100 veces en 50 ml del mismo medio y se cultivó en las mismas condiciones hasta alcanzar una turbidez a 600 nm de 0,6-0,7, momento en el cual se añadió IPTG hasta una concentración final de 10 μ M. Transcurridas 10-12 horas tras la inducción del cultivo, las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en 3 ml de Tampón A, tras lo cual se rompieron con la prensa de French y se separaron las fracciones soluble e insoluble tal y como se describió en el apartado 12 de la sección Materiales y Métodos. Ambas fracciones fueron analizadas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (PAGE-SDS) (Figura 3.10).

En estos geles se puede observar la aparición de una banda de inducción que podría corresponder a la proteína MBP (panel A, flecha amarilla). Dicha banda es algo más evidente en la fracción soluble que en la insoluble. En el panel B aparece una banda de inducción que por su tamaño podría corresponder a la proteína de fusión MBP-XylS (flecha roja), aunque la banda es más evidente en la fracción insoluble, una buena parte de la proteína permanece soluble, por lo que este sistema parece ser el más adecuado para llevar a cabo la purificación.

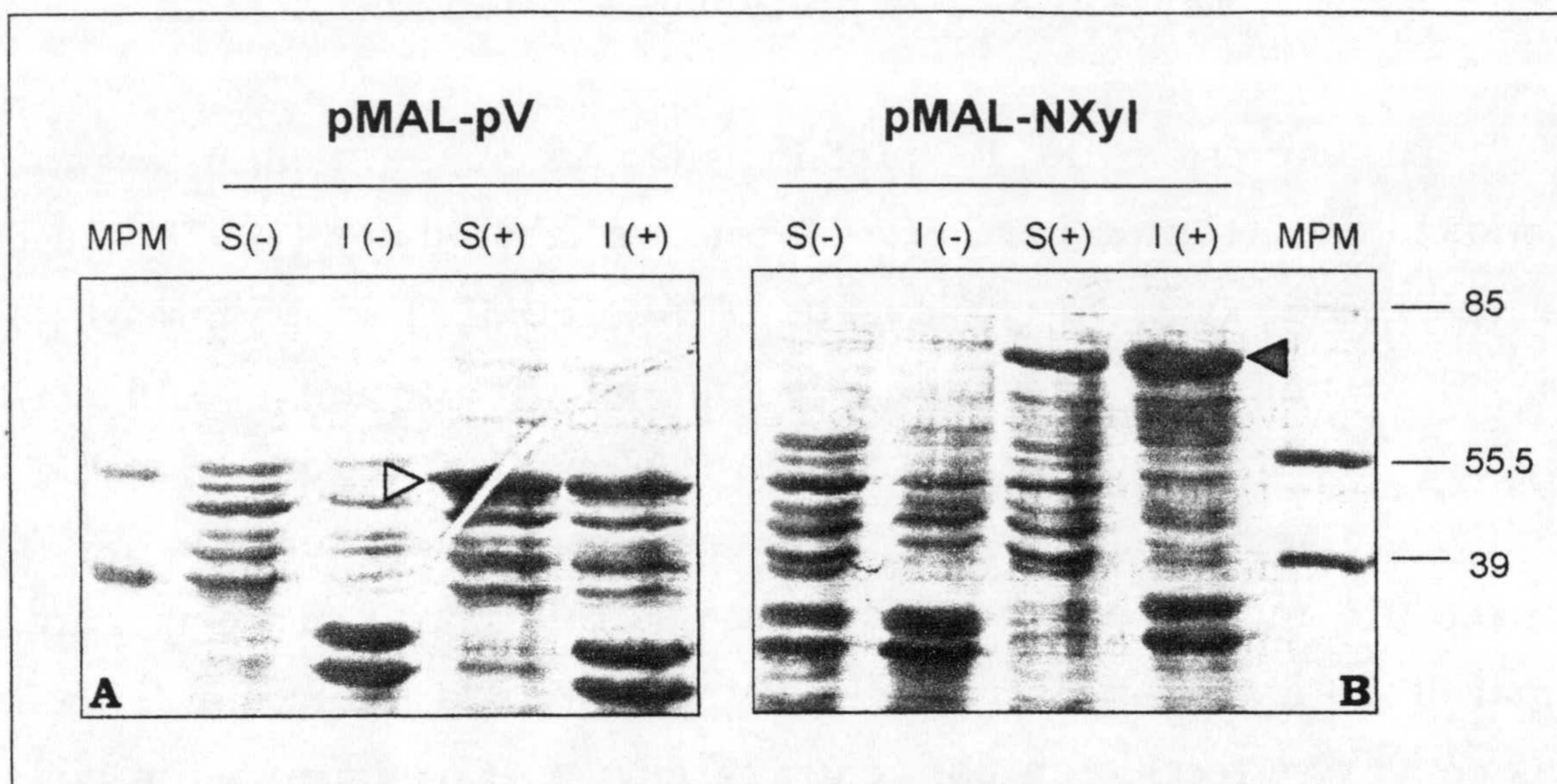


Figura 4.10. Expresión de la proteína de fusión MBP-NXylS. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% (p/v). **A.** Muestras obtenidas con los cultivos que portaban el plásmido pMAL-pV. **B.** Muestras obtenidas con los cultivos que portaban el plásmido pMAL-NXyl. El tamaño de las bandas del marcador de peso molecular (MPM) se indica a la derecha. Se muestra la fracción soluble (S) y la insoluble (I) de los cultivos inducidos (+) y sin inducir (-). Las flechas amarilla y roja indican las bandas que por su tamaño podrían corresponder a las proteínas MBP y MBP-NXylS respectivamente.

3.3.2.3. Optimización de las condiciones de expresión de la proteína de fusión MBP-NXylS.

Con el fin de encontrar las condiciones en las que los niveles de expresión de la proteína fueran óptimos y hacerla mayoritaria respecto al contenido total de proteína se determinó la expresión de la proteína a distintos tiempos utilizando distintas concentraciones del inductor IPTG. La cepa *E. coli* DH5 α portando el plásmido pMAL-pV (MBP) ó pMAL-NXyl (MBP-NXylS) se cultivó en medio líquido en agitación durante 12-16 horas a 30°C, tras este tiempo se diluyó 100 veces en 50 ml el mismo medio y se cultivó en las mismas condiciones hasta alcanzar una turbidez a 600 nm de 0,6-0,7, momento en el cual se dividió el cultivo en cuatro fracciones alícuotas, una de ellas se mantuvo como control al que no se le añadió inductor y las tres restantes se indujeron con IPTG a la concentración

final de 10 μ M, 0,1 mM, 0,4 mM y 1 mM respectivamente. Estos cultivos se incubaron en agitación a 30°C y se tomaron muestras de 1ml de cada cultivo a las 2, 4, 6 y 12 horas tras la inducción. Las células se recogieron por centrifugación y se trataron como se describió en el apartado 15.1 de la sección Materiales y Métodos. Las muestras se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% (p/v) y los resultados se muestran en la Figura 3.10.

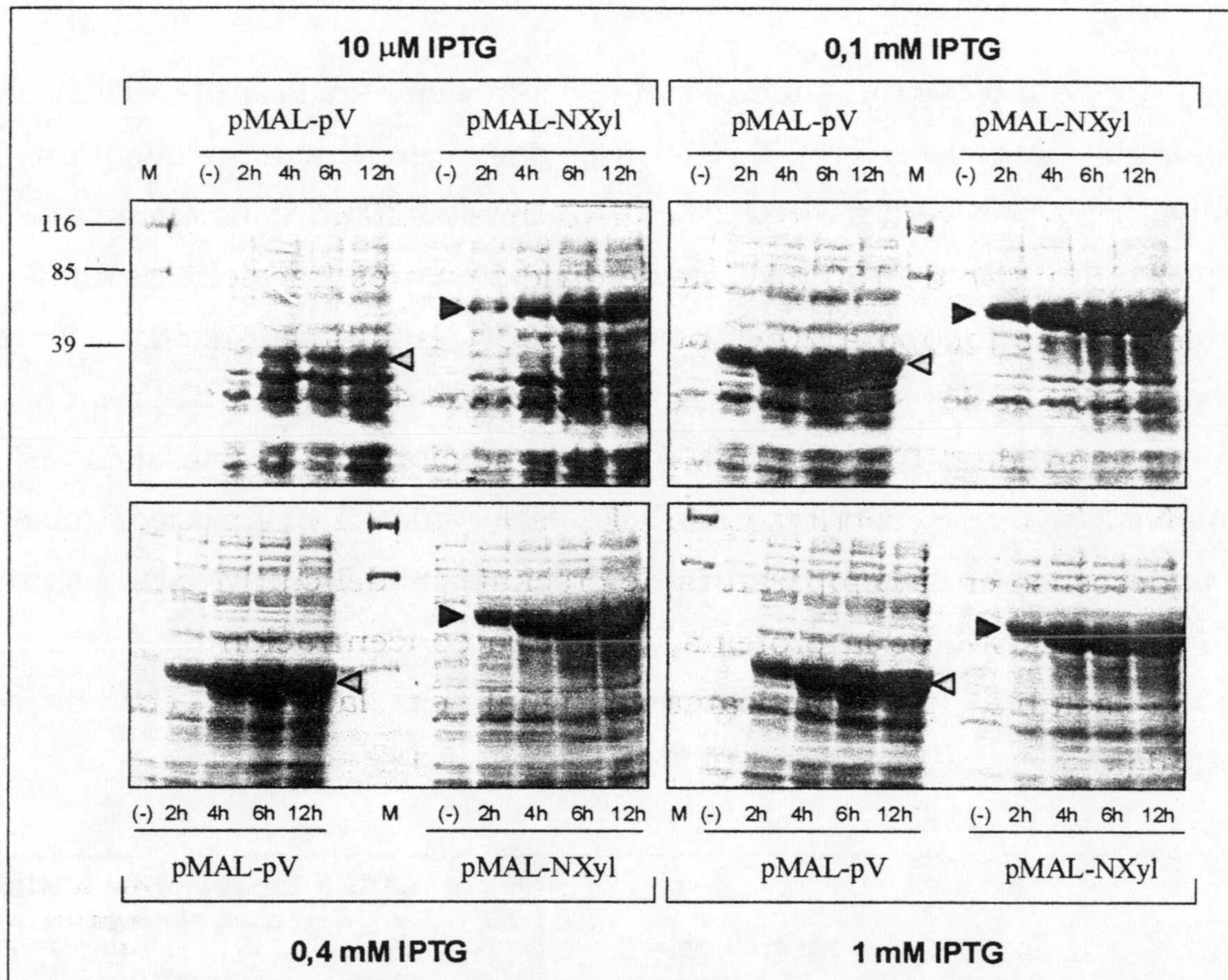


Figura 3.10. Expresión de las proteínas MBP y MBP-NXylS a diferentes tiempos y en presencia de distintas concentraciones de IPTG. El tamaño de las bandas del marcador de peso molecular (M) se indica a la izquierda. Se muestra el contenido proteico total de los cultivos que portaban el plásmido pMAL-pV y pMAL.NXyl a las 2h, 4h, 6h y 12h tras la inducción con IPTG a la concentración final de 10 μ M, 0,4mM y 1mM. También se muestra el contenido proteico total del cultivo control sin inducir (-). Las flechas amarilla y roja indican las bandas que por su tamaño podrían corresponder a las proteínas MBP y MBP-NXylS respectivamente.

UNIVERSIDAD DE GRANADA

17 DIC. 2007

COMISION DE DOCTORADO

Como se puede observar, la concentración óptima de IPTG para inducir la expresión de la proteína de fusión debe ser mayor de 10 μ M, ya que con esta concentración la proteína de inducción no es mayoritaria respecto al contenido proteico total de la célula. A la vista de estos resultados se decidió utilizar una concentración de IPTG de 1 mM para inducir los cultivos y se estableció incubar durante 4 horas, ya que así la proteína era mayoritaria y permitía obtener la misma sin periodos extensos de incubación.

En un intento de aumentar la concentración de la proteína de fusión en forma soluble, se llevó a cabo un ensayo en el que se disminuyó la temperatura de crecimiento del cultivo hasta 20°C. Partiendo de un volumen de cultivo de 150 ml, éste se dividió en tres fracciones alícuotas, una de ellas se incubó a 20°C, otra a 25°C y la última a 30°C. En este ensayo la inducción se llevó a cabo durante 4 horas utilizando una concentración de IPTG de 1mM. Las condiciones de análisis de las proteínas fueron las descritas arriba. En la Figura 3.11 se puede observar que el descenso en la temperatura de crecimiento del cultivo no es crítico en la solubilización de la proteína, ya que la concentración de ésta en la fracción soluble fue prácticamente igual en las tres condiciones ensayadas.

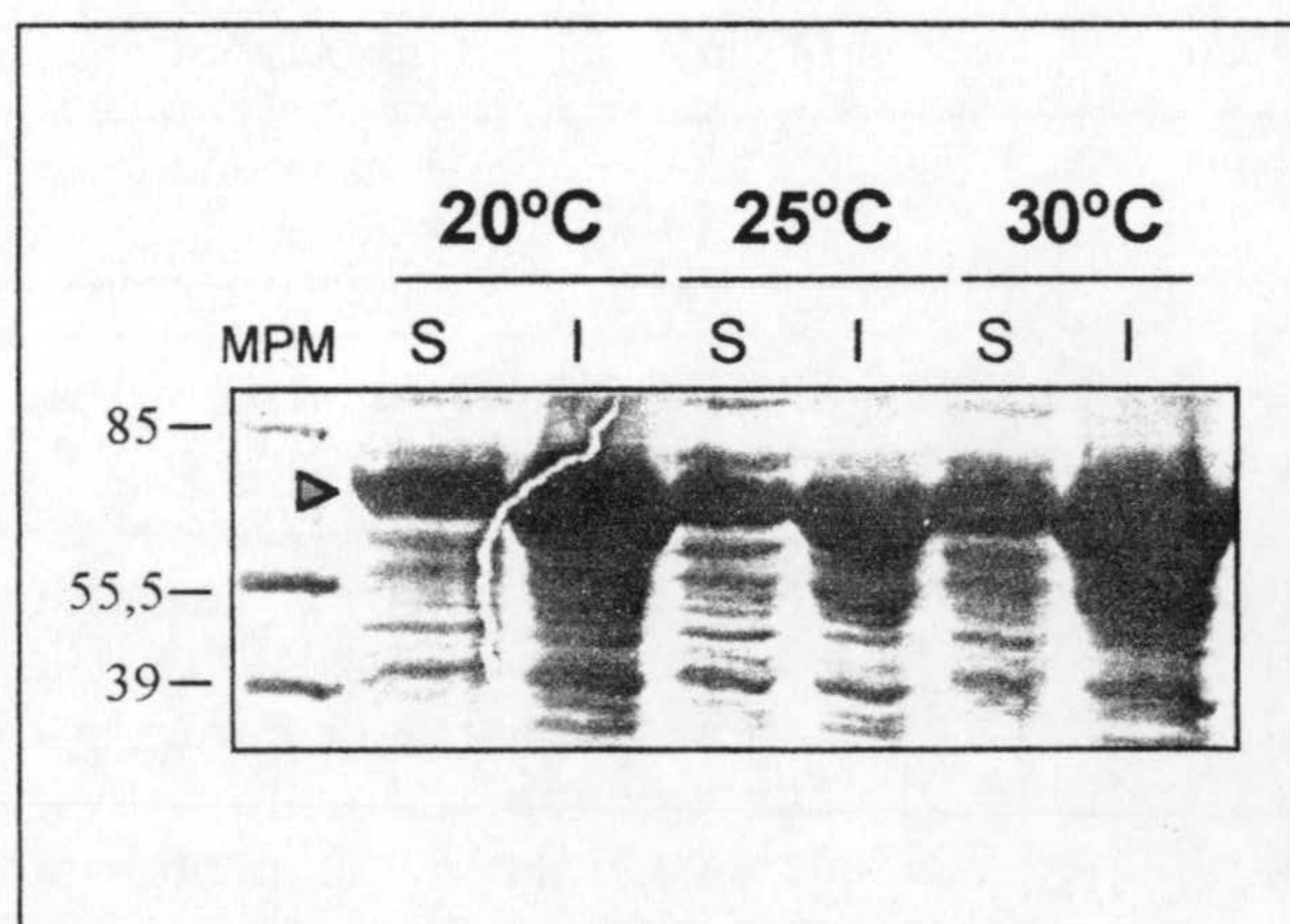


Figura 3.11. Expresión de MBP-NXylS a diferentes temperaturas. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% (p/v). Se muestra la fracción soluble (S) e insoluble (I) de cultivos inducidos a la temperatura de crecimiento indicada. El tamaño (kDa) de las bandas del marcador de peso molecular (MPM) se indica a la izquierda. La flecha roja indica la banda que podría corresponder a la proteína de fusión.

Para comprobar que la banda de inducción que aparecía en el gel correspondía con la proteína de fusión, se realizó un ensayo de western-blot de las fracciones obtenidas en el ensayo anterior correspondientes a la temperatura de 30°C utilizando un anticuerpo policlonal dirigido frente a la MBP (Figura 3.12).

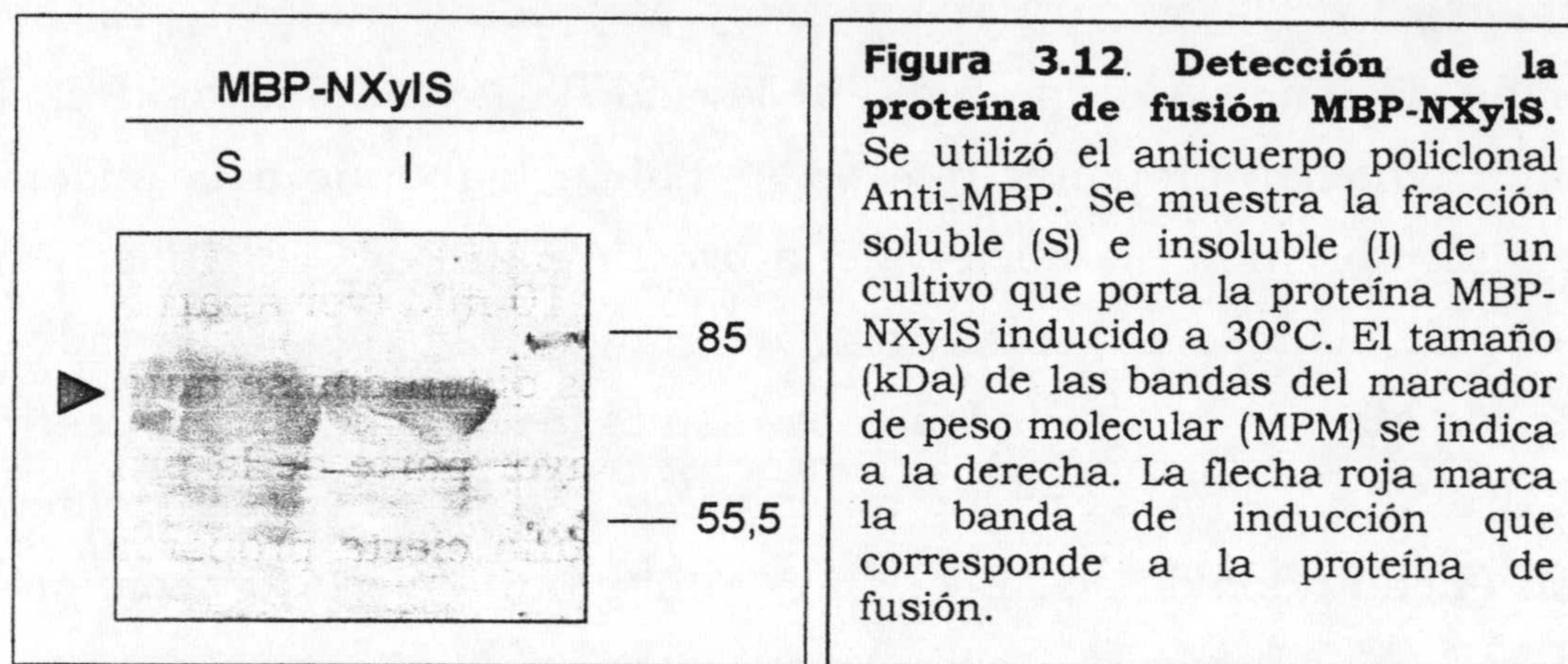


Figura 3.12. Detección de la proteína de fusión MBP-NXylS. Se utilizó el anticuerpo policlonal Anti-MBP. Se muestra la fracción soluble (S) e insoluble (I) de un cultivo que porta la proteína MBP-NXylS inducido a 30°C. El tamaño (kDa) de las bandas del marcador de peso molecular (MPM) se indica a la derecha. La flecha roja marca la banda de inducción que corresponde a la proteína de fusión.

Puesto que el sistema desarrollado por Pérez-Martín y colaboradores (1997) permitía el corte *in vivo* de la proteína de fusión mediante un procesamiento proteolítico de la misma, se construyó una cepa de *E. coli* DH5 α que portaba la proteína de fusión MBP-NXylS y la proteasa vírica NIa, que estaba codificada en el plásmido compatible pPPV1 (ver detalles en la sección Materiales y Métodos). En los ensayos realizados según las condiciones descritas por Pérez-Martín y colaboradores (1997), la proteína de fusión no fue procesada, por lo que no fue posible separar los dos elementos que formaban la proteína quimérica. Puesto que existen proteínas que son solubles cuando está fusionadas a la MBP y recuperan la insolubilidad cuando se separan de ésta, y teniendo en cuenta el carácter fuertemente insoluble que presentó el dominio N-terminal de XylS cuando se sobreexpresó sin fusionarse a otra proteína, se decidió purificar la proteína de fusión completa.

3.3.2.4. Purificación de la proteína de fusión MBP-NXylS.

Para llevar a cabo la purificación de la proteína de fusión se partió de 1 litro de cultivo de la cepa *E. coli* DH5 α portando el plásmido pMAL-NXyl (MBP-NXylS); la fracción soluble se obtuvo como se indica en el apartado 13 de la sección Materiales y Métodos y tras cargarla en una columna de amilosa se procedió al lavado de la columna con el fin de eliminar aquellas proteínas que no se habían adherido a la misma. Por último se procedió a la elución de la proteína MBP-NXylS utilizando una solución de maltosa a la concentración final de 10 mM (ver apartado 13 de la sección Materiales y Métodos). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.13. Como se puede observar, la mayor parte de la proteína de fusión quedó retenida en la columna aunque una cierta proporción de la misma eluyó cuando se aplicó la muestra en la columna y cuando se procedió a su lavado. Tras aplicar en la columna una solución de maltosa en concentración 10 mM, se produjo la elución de una proteína que por su tamaño podría ser la proteína de fusión.

Puesto que la proteína de fusión contenía una secuencia de seis histidinas, se realizó un ensayo de western-blot utilizando un anticuerpo monoclonal dirigido frente a las seis histidinas. La proteína obtenida en la elución fue reconocida por el anticuerpo, de este modo se comprobó que la proteína que había eluido al aplicar en la columna la maltosa era la proteína de fusión MBP-NXylS (Figura 3.14).

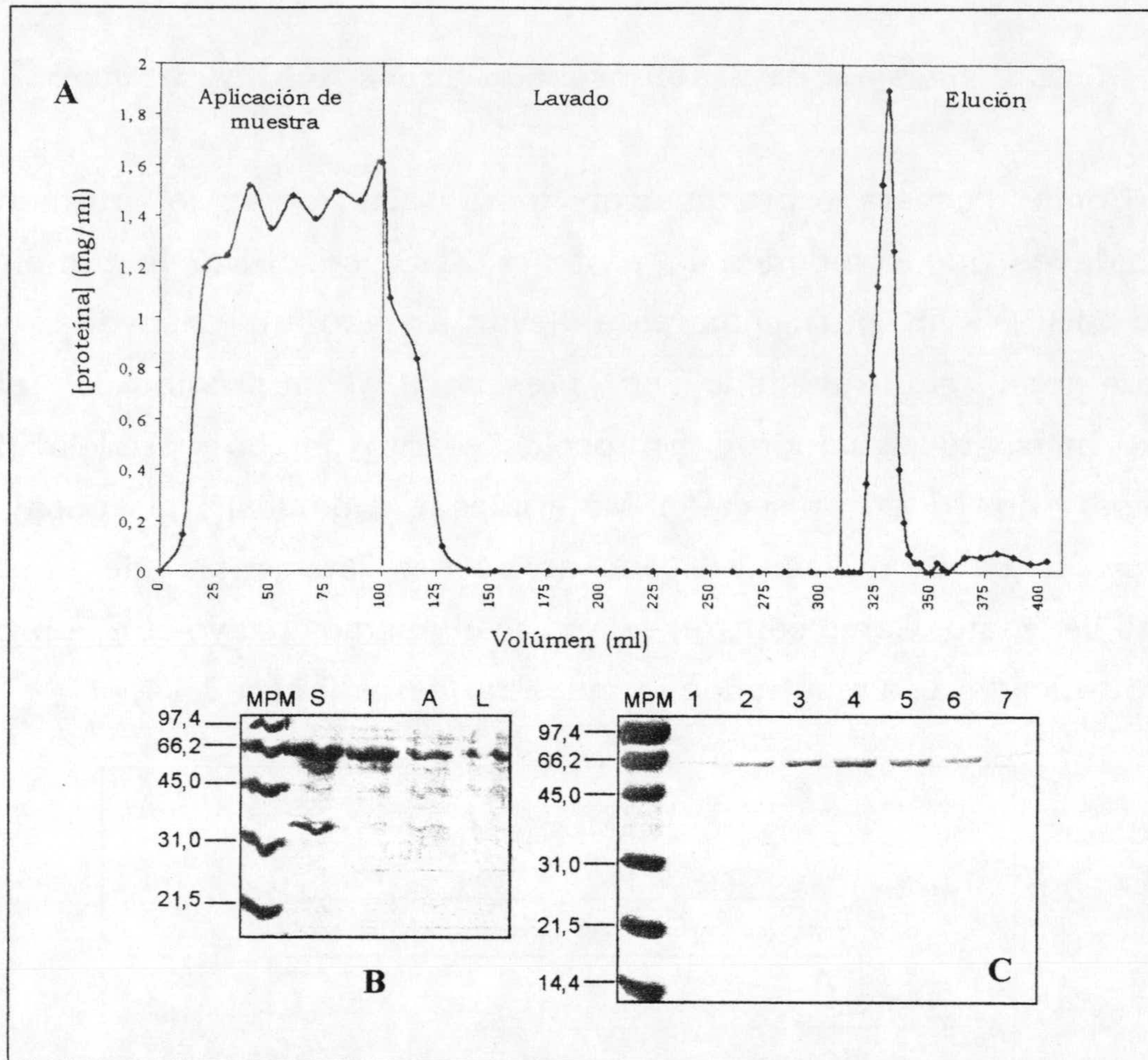


Figura 3.13. Purificación de la proteína de fusión MBP-NXylS. El panel A muestra el cromatograma correspondiente al proceso de purificación. El panel B es una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% (p/v). Se muestra la fracción soluble (S) e insoluble (I). La calle A corresponde al contenido proteico de una de las fracciones recogidas mientras se aplicaba la muestra y la calle L muestra el contenido proteico de una de las fracciones recogidas durante el lavado de la columna. El tamaño (kDa) de las bandas del marcador de peso molecular (MPM) se indica a la izquierda de los paneles B y C. El panel C es una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% (p/v) que muestra distintas fracciones (calles 1 a 7) recogidas durante el proceso de elución de la proteína de fusión de la columna de amilosa.

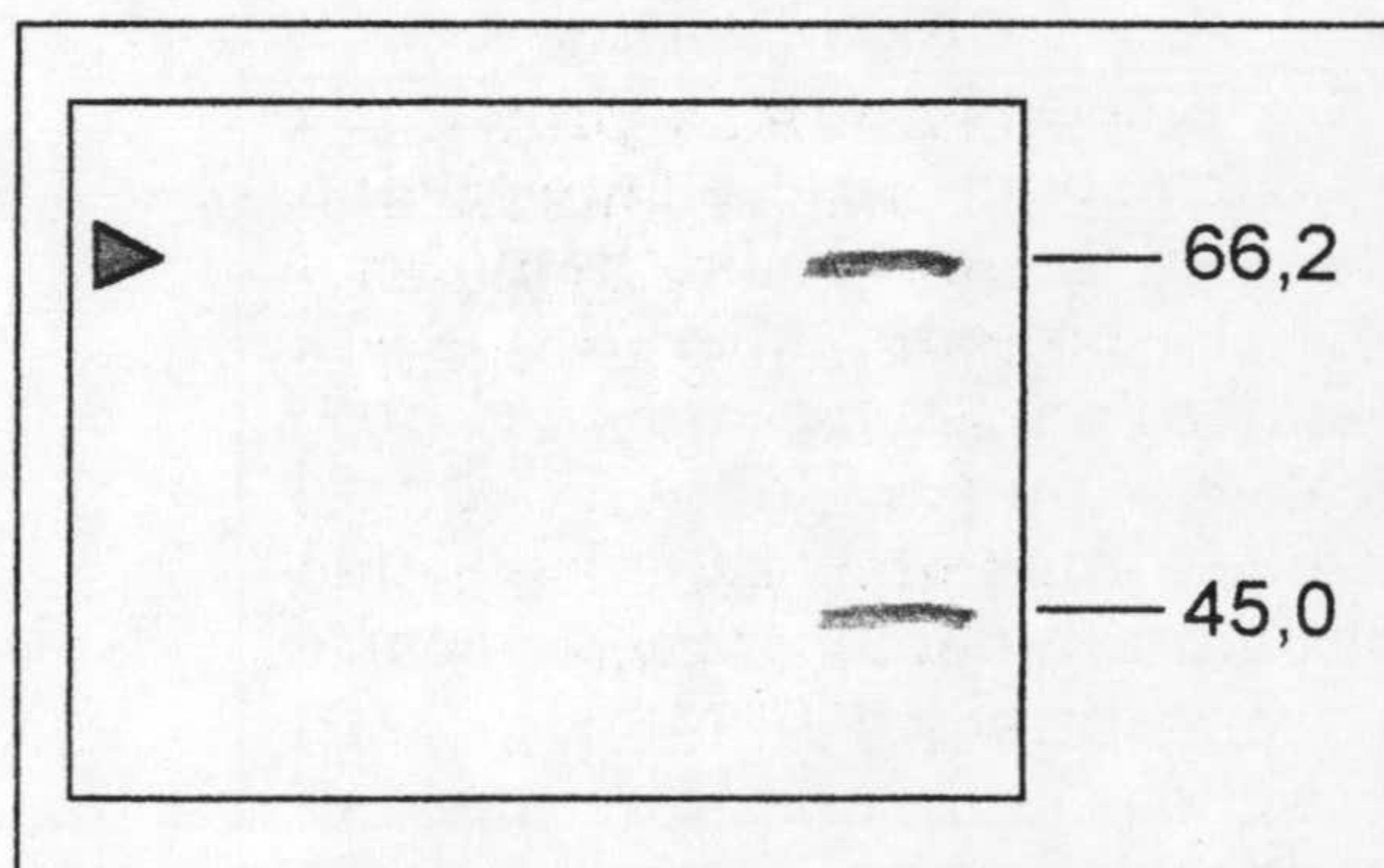


Figura 3.14. Detección de la proteína de fusión MBP-NXylS. Se utilizaron dos fracciones de la proteína purificada. El tamaño (kDa) de las bandas del marcador de peso molecular (MPM) se indica a la derecha. La flecha verde indica la banda correspondiente a la proteína de fusión.

3.3.2.5. Ensayos de unión cruzada (cross-linking) *in vitro*.

Como primera aproximación para determinar el número de subunidades que componen la proteína XylS, se utilizó la proteína de fusión MBP-NXylS purificada para llevar a cabo un ensayo de unión cruzada con glutaraldehído en presencia y ausencia del efector 3-metil benzoato siguiendo el protocolo descrito por Lu y Abdelal (2001) (ver apartado 16 de la sección Materiales y Métodos). Los ensayos se llevaron a cabo utilizando concentraciones crecientes del inductor 3-metil benzoato. Como control, se realizó el mismo ensayo con la proteína MBP purificada. Los resultados se muestran en la figura 3.14.

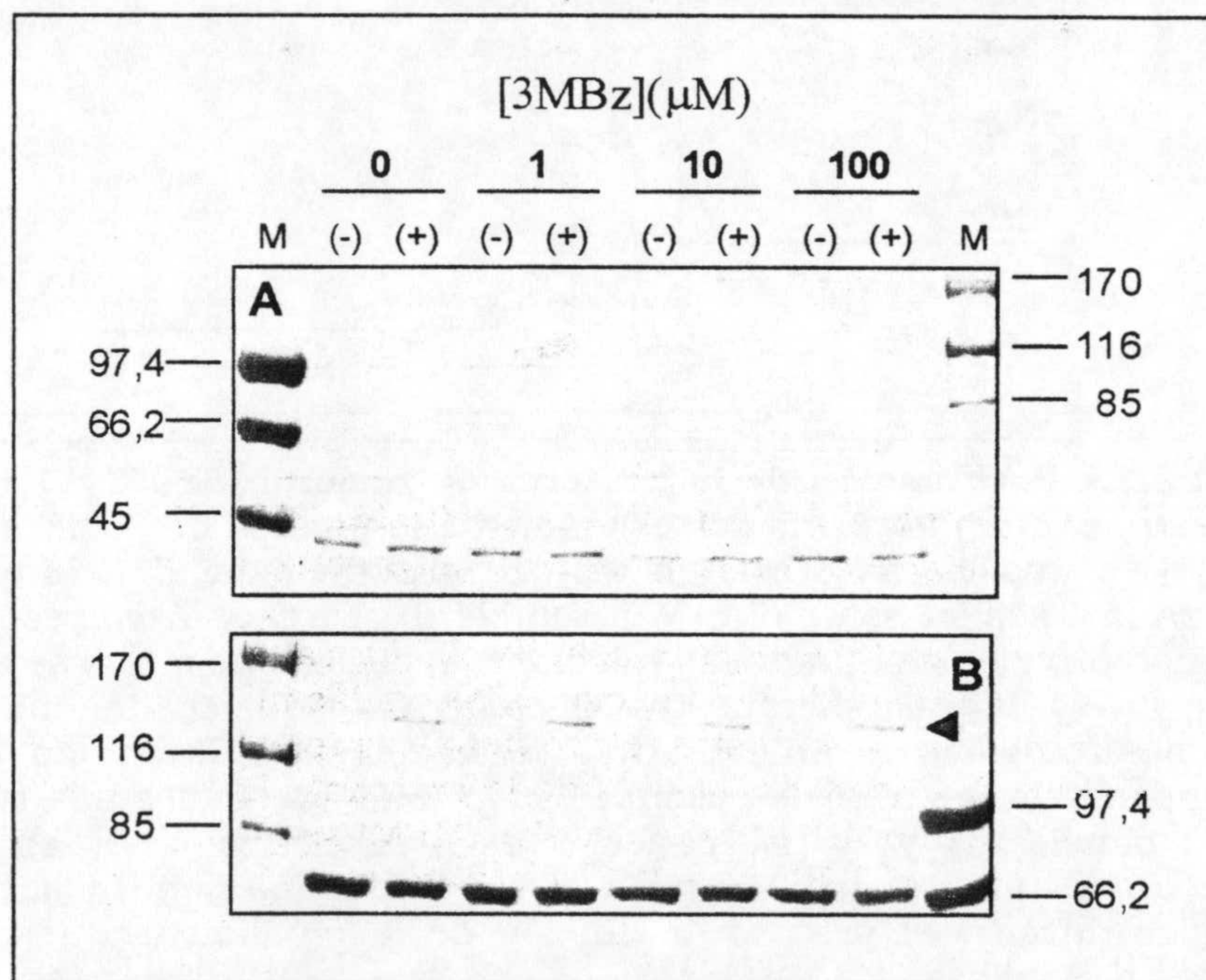


Figura 3.14. Ensayo de Cross-linking con glutaraldehído. Panel A. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% (p/v) correspondiente a la proteína MBP. Panel B. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% (p/v) correspondiente a la proteína MBP-NXylS. El tamaño (kDa) de las bandas del marcador de peso molecular (M) se indica a ambos lados del gel correspondiente. Se indica las muestras que han sido tratadas (+) o no (-) con glutaraldehído. En la parte superior se muestra la concentración (μM) de 3MBz utilizada. La flecha roja indica la banda que por su tamaño podría corresponder a la forma dimérica de la proteína de fusión MBP-NXylS.

Como se puede observar, en el caso de la proteína MBP (Figura 3.14, panel A), independientemente de la presencia o no del efector 3-metilbenzoato y de glutaraldehído aparece una sola banda que corresponde a la proteína MBP, lo cual es lógico puesto que la proteína MBP se ha cristalizado en presencia y ausencia de su ligando y se ha comprobado que es un monómero (Sharff *et al.*, 1992; Spurlino *et al.*, 1991). Sin embargo, en el caso de la proteína de fusión MBP-NXylS (Figura 3.14, panel B) se puede observar la presencia de dos bandas en las muestras tratadas con glutaraldehído. La banda inferior corresponde a la proteína de fusión MBP-NXylS, mientras que la banda superior podría corresponder, por su tamaño, a la forma dimérica de dicha proteína. Dicha banda aparece tanto en presencia como en ausencia de 3-metilbenzoato, lo que sugiere que la proteína podría ser un dímero tanto en presencia como en ausencia de efector, tal y como ocurre con la proteína AraC (Bustos y Schleif., 1993; Menon y Lee, 1990; Wilcox y Meuris, 1976). Este resultado que se ha obtenido es preliminar, por lo que deberá ser corroborado utilizando otros sistemas.

DISCUSIÓN DEL CAPÍTULO.

Como se ha comentado al inicio de este capítulo, se han encontrado dificultades para obtener una cantidad suficiente de la proteína XylS pura, soluble y activa desde el punto de vista funcional. Esto no ha permitido la realización de análisis bioquímicos *in vitro* para caracterizar las interacciones proteína-proteína, proteína-ADN o proteína-efector, por lo que los estudios de estructura y función de esta proteína se han realizado bien mediante análisis comparativos con otros miembros de la familia a la que pertenece o bien mediante análisis genéticos de mutantes de la proteína y del promotor al que regula.

Hasta ahora, se han realizado ensayos *in vitro* de metilación y de protección con radical hidroxilo utilizando la proteína XylS fusionada en su extremo N-terminal al epítipo hemaglutinina (HA) del virus influenza, lo que permitió su inmunopurificación utilizando el anticuerpo monoclonal 12CA5 acoplado a una matriz de sefarosa-ProteínaA (Kaldalu *et al.*, 1996). Puesto que la proteína purificada tenía tendencia a agregar en solución, estos estudios se realizaron con la proteína inmovilizada y demostraron que XylS se une a una sola cara del ADN del promotor Pm en una región que ocupa cuatro vueltas de hélice.

A la vista de los problemas que presentaba la purificación de la totalidad de la proteína, se decidió purificar el extremo N-terminal de la proteína utilizando métodos más sencillos que el utilizado anteriormente y que permitiesen obtener la proteína pura y en forma soluble. En primer lugar se utilizó un sistema en el que se fusionó una cola de hexahistidina al dominio N-terminal de XylS, sin embargo, la proteína recombinante que se obtuvo presentó un alto grado de insolubilidad que la hizo precipitar en forma de cuerpos de inclusión, por lo que este sistema de purificación tuvo que ser descartado.

La siguiente estrategia que se planteó estaba basada en la construcción de proteínas de fusión. Ésta es una técnica que ha permitido solventar en numerosos casos el problema de los cuerpos de inclusión, que supone uno de los grandes obstáculos en la producción de proteínas recombinantes biológicamente activas en sistemas heterólogos (Schein, 1989). Puesto que muchos polipéptidos que presentan tendencia a la agregación se transforman en péptidos solubles cuando se fusionan a una proteína adecuada, y puesto que el dominio N-terminal de XylS no fusionado a otra proteína el altamente insoluble, se decidió fusionarlo a dos proteínas ampliamente utilizadas como agentes solubilizantes, la glutatión-S-transferasa (GST) (Nygren *et al.*, 1994) y la proteína de unión a maltosa (MBP) (Pryor y Leiting, 1997). Ambos sistemas se han utilizado en la purificación de proteínas pertenecientes a la familia de AraC/XylS, por ejemplo, el regulador MelR se purificó mediante el sistema GST (Bourgerie *et al.*, 1997), mientras que el sistema MBP permitió la purificación del regulador SoxS (Fawcett y Wolf, 1994). La fusión del dominio N-terminal de XylS a la proteína GST no resultó ser efectiva puesto que prácticamente toda la proteína de fusión que se había obtenido tras la sobreexpresión apareció en la fracción insoluble.

Kapust y Waugh (1999) compararon la capacidad que presentaban tres proteínas solubles (la proteína de unión a maltosa, la glutatión-S-transferasa y la tiorredoxina) para inhibir la agregación de seis proteínas que normalmente se acumulan en una forma insoluble en *E. coli*. Los resultados mostraron que la MBP era un agente solubilizante mucho más efectivo que la GST o la TRX y que podría actuar en algunos casos como una chaperona promoviendo el plegamiento correcto de la proteína a la que está fusionada. La fusión del dominio N-terminal de XylS a la MBP hizo que la proteína de fusión MBP-NXylS permaneciese en alta proporción en la fracción soluble, lo que permitió su purificación mediante cromatografía de afinidad a amilosa. El comportamiento que presentó el

dominio N-terminal de XylS fue idéntico al mostrado por la proteasa TEV, la expresión de esta proteína fusionada a una cola de hexahistidina dio lugar a una proteína insoluble e inactiva, sin embargo cuando se expresó como una proteína de fusión a la MBP, ésta se mantuvo soluble y funcional.

El inconveniente que presentó la proteína de fusión MBP-NXylS es que aunque el sistema de fusión utilizado estaba diseñado para permitir el procesamiento proteolítico *in vivo* de la proteína de fusión, los ensayos de corte realizados en este trabajo no fueron efectivos. Las causas por las que no se pudo conseguir la separación de ambas proteínas pueden ser varias, en primer lugar, la proteína de fusión podría adoptar una conformación tridimensional que haga que la proteasa Nla no pueda acceder a su sitio de corte, por lo que no podría actuar. Otro motivo podría ser la ausencia de algún cofactor vírico que sea necesario para la regulación de la proteólisis (Vos *et al.*, 1988). También podría ocurrir que el corte se hubiese llevado a cabo en pequeña proporción y que el dominio N-terminal de XylS, una vez separado de la MBP, se hubiese degradado por la acción de proteasas celulares. Puesto que se ha demostrado que la fusión a la MBP no altera la actividad biológica de ciertas proteínas, como el regulador SoxS o la proteasa TEV, y que mediante estudios mutacionales se ha comprobado *in vivo* que la proteína XylS tolera modificaciones en su extremo N- y C-terminal sin que se produzcan cambios aparentes en su actividad (Kessler *et al.*, 1994), se utilizó la proteína de fusión para la realización de ensayos *in vitro*.

Los ensayos de unión cruzada realizados *in vitro* sugieren que XylS podría ser un dímero tanto en presencia como en ausencia de 3-metilbenzoato y que el dominio de dimerización podría estar localizado en el extremo N-terminal de la proteína. Esta situación también aparece en la familia de reguladores AraC-XylS, ya que algunos de sus miembros son dímeros en los que el dominio responsable de la dimerización se localiza

en el extremo N-terminal de la proteína; como ejemplo se podrían citar las proteínas AraC y UreR (Bustos y Schleif., 1993; Poore *et al.*, 2001). Puesto que estos ensayos son preliminares, habrá que realizar otros ensayos que permitan confirmar los resultados obtenidos hasta este momento.

Por último, hay que destacar que la Dra. María del Mar González Pérez ha logrado purificar el dominio C-terminal de XylS fusionado a la proteína MBP y ha realizado ensayos *in vitro* de retardo en gel utilizando ADN del promotor Pm y la proteína de fusión MalEXylSc. Los resultados obtenidos indican que la proteína de fusión reconoce los motivos de unión de XylS en Pm.

Resumen y Perspectivas

Este trabajo de Tesis Doctoral se ha centrado en el estudio del dominio amino-terminal de la proteína XylS, que es el regulador de la transcripción de la ruta *meta* del plásmido TOL pWW0. Previamente se habían aislado mutantes en el extremo N-terminal de XylS que presentaban anomalías en el reconocimiento de los efectores, lo que sugería que esta región del regulador estaba implicada en el reconocimiento del efector y en la activación del regulador (Michán *et al.*, 1992a; Ramos *et al.*, 1990b). El primer objetivo de este trabajo consistió en la búsqueda de residuos críticos en la interacción del regulador con sus efectores, esta búsqueda se basó en las diferencias que mostraban las proteínas XylS, codificada por el plásmido TOL pWW0 y XylS1, codificada por el plásmido TOL pWW53, tanto en el perfil de efector como en nivel de activación de la transcripción desde el promotor Pm. Puesto que estas dos proteínas sólo se diferencian en 5 aminoácidos, todos ellos localizados en el extremo N-terminal, se generó una batería de mutantes de XylS en estos residuos y se encontró que los mutantes simples en las posiciones 137 y 153 presentaban un perfil de efectores distinto respecto al mostrado por el regulador silvestre. En el mutante doble XylSD137E-H153N, el perfil de efector, $V_{\text{máx}}$ y K 's para benzoatos fue similar al de XylS1, lo que sugiere que estos dos residuos son cruciales para el reconocimiento del efector y la activación del regulador que conduce a la estimulación de la transcripción desde el promotor Pm. Sin embargo queda por determinar si alguno de estos residuos interacciona directamente con los efectores. El conocimiento detallado de estas interacciones aguarda la resolución de la estructura cristalina de este regulador tanto en presencia como en ausencia del efector.

En este estudio también se ha puesto de manifiesto que mutaciones puntuales en las posiciones 137 y 153 de XylS conducen a la ARN polimerasa a mediar la transcripción desde Pm con σ^{70} en lugar de hacerlo con el factor σ^{38} , hecho que se ha demostrado mediante análisis de extensión reversa a partir de cebador en un fondo σ^{70} termosensible,

eficiente y deficiente en la síntesis del factor σ^{38} . Este descubrimiento representa el primer ejemplo de cómo un regulador transcripcional influencia en el factor sigma que elige la ARN polimerasa para expresar un promotor determinado. Queda aún por determinar el mecanismo mediante el cual estos cambios tan sutiles en XylS influyan hasta tal punto en la transcripción desde Pm mediada por este regulador.

Estudios previos al inicio de este trabajo sugerían la existencia de contactos entre XylS y la ARN polimerasa (Kaldalu *et al.*, 1996). La organización de los sitios de unión de XylS en el promotor Pm es tal que el sitio de unión proximal del regulador solapa en 2 pares de bases con la región -35 de unión de la ARN polimerasa. En la mayoría de los promotores, cuando existe un solapamiento entre los sitios de unión del regulador y la región -35, es frecuente que el regulador interaccione con las subunidades α y/o σ de la ARN polimerasa (Busby y Ebright, 1997; Jin *et al.*, 1995). El segundo objetivo de este trabajo consistió en estudiar las posibles interacciones de los reguladores XylS y XylS1 con la subunidad α de la ARN polimerasa, y más concretamente con el dominio C-terminal de la misma (α -CTD). Los resultados obtenidos han puesto de manifiesto que α -CTD es necesaria para conseguir la máxima activación de la transcripción desde el promotor Pm, y que ello implica interacciones de α -CTD con el ADN del promotor Pm. Además, el conjunto de residuos 287 a 291 localizados en la superficie de α -CTD, podrían definir un sitio de interacción con los activadores XylS y XylS1, de modo que XylS establecería contactos preferentemente con el residuo 291 de α -CTD, mientras que XylS1 lo haría con el residuo 289. El uso de una serie de mutantes en XylS ha permitido establecer que los residuos 137 y 153 de XylS influyen en las interacciones del regulador con α -CTD. Sin embargo, aún se desconocen los residuos de XylS que contactan con α -CTD y en qué zona del promotor Pm contacta esta subunidad de la ARN polimerasa.

El último objetivo de este trabajo consistió en la purificación del dominio N-terminal de XylS. La decisión de purificar este dominio por separado se debe a las dificultades que se han encontrado a la hora de purificar la proteína completa. Los resultados obtenidos en esta última parte del trabajo han reflejado que el sistema de fusión a la proteína de unión a maltosa (MBP) permite obtener en forma soluble el dominio N-terminal de XylS. Se han realizado ensayos *in vitro* utilizando la proteína de fusión MBP-NXylS que sugieren que ésta es un dímero tanto en presencia como en ausencia de efector. Queda pendiente el obtener en forma soluble el dominio N-terminal sin estar fusionado a otra proteína, la realización de ensayos *in vitro* de unión de efectores al regulador y la resolución de la estructura cristalina de este dominio en presencia y ausencia de efectores. Por otro lado, se podría intentar la purificación de la proteína completa utilizando el sistema de fusión a la MBP. Las ventajas de este sistema permitieron a la Dra. María del Mar González Pérez purificar el dominio C-terminal de XylS, con el que se han realizado ensayos *in vitro* que indican que este dominio reconoce los motivos de unión de XylS en Pm.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten establecer las siguientes conclusiones:

1. Los residuos Asp137 e His153 del regulador XylS son críticos para el reconocimiento del efector y la activación del regulador para estimular la transcripción desde Pm. Estos residuos influyen en el perfil de efectores que reconoce el regulador, probablemente porque alteran la afinidad del regulador por el efector.

2. Los residuos Asp137 e His153 del regulador XylS influyen en el factor sigma que elige la ARN polimerasa para llevar a cabo la transcripción desde el promotor Pm.

3. El dominio carboxilo terminal de la subunidad α de la ARN polimerasa (α -CTD) es necesario para obtener la activación máxima de la transcripción desde el promotor Pm mediada por los reguladores XylS y XylS1.

4. Los residuos Glu265, Pro268, Ile269, Pro273, Thr293, Leu296, Lys298, Lys299 y Asp306 de α -CTD influyen en la transcripción desde Pm mediada por los reguladores XylS y XylS1 de modo que podrían estar implicados en las interacciones de α -CTD con el ADN del promotor Pm.

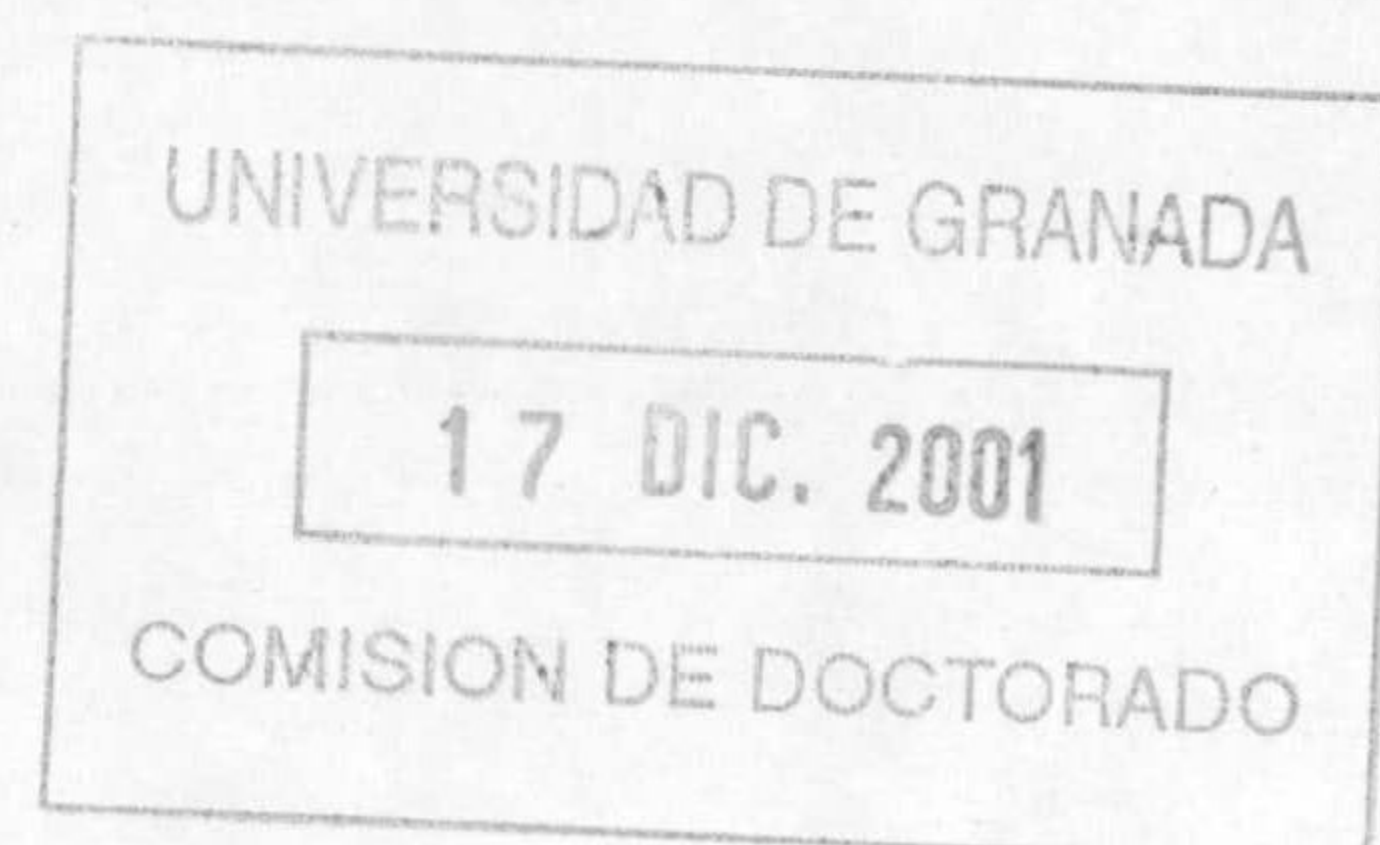
5. El conjunto de residuos 287 a 291 localizados en la superficie de α -CTD podrían definir un sitio de interacción con los reguladores XylS y XylS1, de modo que XylS establecería contactos preferentemente con el residuo 291 de α -CTD, mientras que XylS1 lo haría con el residuo 289.

6. El uso de una batería de mutantes en XylS ha permitido establecer que los residuos 137 y 153 de XylS influyen en las interacciones del regulador con el dominio carboxilo terminal de la subunidad α de la ARN polimerasa.

7. La fusión del extremo N-terminal de XylS a la proteína de unión a maltosa (MBP) da lugar a una proteína quimérica que permanece soluble en alta concentración cuando se hiperproduce, lo que hace aconsejable este sistema para solubilizar el extremo amino-terminal de XylS.

8. La proteína quimérica MBP-NXylS purificada mediante cromatografía de afinidad es un dímero tanto en presencia como en ausencia de efector.

Bibliografía



- Abril, M. A., Michán, C., Timmis, K. N. and Ramos, J. L.** 1989. Regulator and enzyme specificities of the TOL plasmid-encoded upper pathway for degradation of aromatic hydrocarbons and expansion of the substrate range of the pathway. *J. Bacteriol.* **171**, 6782-6790
- Abril, M.A., Buck, M. y Ramos, J.L.** 1991. Activation of the *Pseudomonas* TOL plasmid upper pathway operon. Identification of binding sites for the positive regulator XylR and for integration host factor protein. *J. Biol.Chem.* **266**, 15832-8.
- Alekshun, M.N., Levy, S.B., Mealy, T.R., Seaton, B.A. y Head, J.F.** 2001. The crystal structure of MarR, a regulator of multiple antibiotic resistance, at 2.3 Å resolution. *Nature Struct. Biol.* **8**, 710-714.
- Arthur, T.M. y Burgess, R.R.** 1998. Localization of a sigma70 binding site on the N terminus of the *Escherichia coli* RNA polymerase beta' subunit. *J. Biol. Chem.* **273**, 31381-31387.
- Artsimovitch, I., Murakami, K., Ishihama, A. y Howe, M.M.** 1996. Transcription activation by the bacteriophage Mu Mor protein requires the C-terminal regions of both α and σ^{70} subunits of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* **271**, 32343-32348.
- Assinder, S.J. y Williams, P.A.** 1990. The TOL plasmids: determinants of the catabolism of toluene and the xylenes. *Adv. Microb. Phys.* **31**, 1-69.
- Assinder, S.J., de Marco, P., Osborne, D.J., Poh, C.L., Shaw, L.E., Winson, M.K. y Williams, P.A.** 1993. A comparison of the multiple alleles of *xylS* carried by TOL plasmid pWW53 and pDK1 and its implications for their evolutionary relationship. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 557-568.
- Ayers, D.J., Sunshine, M.G., Six, E.W. y Christie, G.E.** 1994. Mutations affecting two adjacent amino acid residues in the alpha subunit of RNA polymerase block transcriptional activation by the bacteriophage P2 Ogr protein. *J. Bacteriol.* **176**, 7430-7438.
- Bartels, F., Fernández, S., Holtel, A., Timmis, K.N. y de Lorenzo, V.** 2001. The essential HupB and HupN proteins of *Pseudomonas putida* provide redundant and nonspecific DNA-bending functions. *J. Biol. Chem.* **276**, 16641-8.

- Belyaeva, T.A., Wade, J.T., Webster, C.L., Howard, V.J., Thomas, M.S., Hyde, E.I. Busby, S.J.W.** 2000. Transcription activation at the *Escherichia coli* melAB promoter: the role of MelR and the cyclic AMP receptor protein. *Mol. Microbiol.* **36**, 211-222.
- Bhende, P. y Egan, S.M.** 1999. Amino acid-DNA contacts by RhaS: an AraC family transcription activator. *J. Bacteriol.* **181**, 5185-5192.
- Bhende, P.M. and Egan, S.M.** 2000. Genetic evidence that transcription activation by RhaS involves specific amino acid contacts with sigma 70. *J. Bacteriol.* **182**, 4959-4969.
- Blatter, E.E., Ross, W., Tang, H., Gourse, R.L. y Ebright, R.H.** 1994. Domain organization of RNA polymerase α subunit: C-terminal 85 amino acids constitute a domain capable of dimerization and DNA binding. *Cell.* **78**, 889-896.
- Bourgerie, S.J., Michán, C., Thomas, M.S, Busby, S.J.W. y Hyde, E.** 1997. DNA binding and DNA bending by the MelR transcription activator protein from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids. Res.* **25**, 1685-1693.
- Bradford, M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Breslauer, K.J., Frank, R., Blocker, H. y Marky, L.A.** 1986. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 3746-3750.
- Brown, C.E. y Hogg, R.W.** 1972. A second transport system of L-arabinose in *Escherichia coli* controlled by the *araC* gene. *J. Bacteriol.* **111**, 606-613.
- Brunelle, A. y Schleif, R.F.** 1987. Missing contact probing of DNA-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **84**, 6673-6.
- Busby, S. y Ebright, R.H.** 1994. Promoter structure, promoter recognition, and transcription activation in prokaryotes. *Cell.* **79**, 743-746.
- Busby, S., y Ebrigh, R.** 1997. Transcription activation at Class II CAP-dependent promoters. *Mol. Microbiol.* **23**, 853-859.

- Busby, S. y Ebright, R.H.** 1999. Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J. Mol. Biol.* **293**, 199-213.
- Bustos, S.A y Schleif, R.** 1993. Functional domains of the AraC protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 5638-42.
- Carra, J.H. y Schleif, R.F.** 1993. Formation of AraC-DNA sandwiches. *Nucleic Acids. Res.* **21**, 435-8.
- Casadaban, M.J.** 1976. Regulation of the regulatory gene for the arabinose pathway, *araC*. *J. Mol. Biol.* **104**, 557-566.
- Cases, I., de Lorenzo, V. y Pérez-Martin, J.** 1996. Involvement of sigma 54 in exponential silencing of the *Pseudomonas putida* TOL plasmid Pu promoter. *Mol. Microbiol.* **19**, 7-17.
- Caswell, R., Willians, J., Lyddiatt, A. y Busby, S.** 1992a. Overexpression, purification and characterization of the *Escherichia coli* MelR transcription activator protein. *Biochem. J.* **287**, 493-499.
- Caswell, R., Webster, C. y Busby, S.** 1992b. Studies on the binding of the *Escherichia coli* MelR transcription activator protein to operator sequences at the *melAB* promoter. *Biochem. J.* **287**, 501-508.
- Chakrabarty, A.M., Friello, D.A. y Bopp, L.H.** 1978. Transposition of plasmid DNA segments specifying hydrocarbon degradation and their expression in various microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **75**, 3109-3112.
- Chen, Y., Ebright, Y. y Ebright, R.** 1994. Identification of the target of a transcription activator protein by protein-protein photocrosslinking. *Science.* **265**, 90-92.
- Chomczynski, P. y Sacchi, N.** 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* **162**, 156-159.
- Collado-Vides, J., Magasanik, B. y Gralla, J.D.** 1991. Control-site location and transcriptional regulation in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **55**, 371-394.

- Cowles, C.E., Nichols, N.N. y Harwood, C.S.** 2000. BenR, a XylS homologue, regulates three different pathways of aromatic acid degradation in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **182**, 6339-46.
- Delgado, A. y Ramos, J.L.** 1994. Genetic evidence for activation of the positive transcriptional regulator Xyl1R, a member of the NtrC family of regulators, by effector binding. *J. Biol. Chem.* **269**, 8059-8062.
- Downing, R.G. y Broda, P.A.** 1979. A cleavage map of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida* mt-2. *Mol. Gen. Genet.* **68**, 189-191.
- Duetz, W.A., Marqués S, de Jong C., Ramos, J.L. y van Andel, J.G.** 1994. Inducibility of the TOL catabolic pathway in *Pseudomonas putida* (pWW0) growing on succinate in continuous culture: evidence of carbon catabolite repression control. *J. Bacteriol.* **176**, 2354-61.
- Duggleby, C.J., Bayley, S.A., Worsey, M.J., Williams, P.A. y Broday, P.** 1977. Molecular sizes and relationships of TOL plasmids in *Pseudomonas*. *J. Bacteriol.* **130**, 1274-1280.
- Duggleby, C.J. y Williams, P.A.** 1986. Purification and some properties of the 2-hydroxy-6-oxohepta-2,4-dienoate hydrolase encoded by the TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida* mt-2. *J. Gen. Microbiol.* **132**, 717-726.
- Ebright, R.H.** 1993. Transcription activation at class I CAP-dependent promoters. *Mol. Microbiol.* **8**, 797-802.
- Ebright, R.H. y Busby, S.** 1995. The *Escherichia coli* RNA polymerase α subunit: structure and function. *Current Opinion in Genetics & Development.* **5**, 197-203.
- Egan, S.M. y Schleif, R.F.** 1993. A regulatory cascade in the induction of *rhaBAD*. *J. Mol. Biol.* **234**, 87-98.
- Egan, S. y Schleif, R.** 1994. DNA-dependent renaturation of an insoluble DNA binding protein. Identification of the RhaS binding site at *rhaBAD*. *J. Mol. Biol.* **243**, 821-829.

- Egan, S.M., Pease, A.J., Lang, J., Li, X., Rao, V., Gillette, W.K., Ruiz, R., Ramos, J.L. and Wolf, R.E. Jr.** 2000. Transcription activation by a variety of AraC/XylS family activators does not depend on the class II-specific activation determinant in the N-terminal domain of the RNA polymerase alpha subunit. *J. Bacteriol.* **182**, 7075-7077.
- Englesberg, E., Anderson, R.L., Weinberg, R., Lee, N., Hoffee, P., Huttenhauer, G. y Boyer, H.** 1962. L-Arabinose-sensitive, L-ribulose 5-phosphate 4-epimerase-deficient mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **84**, 137-146.
- Eustance, R.J, Bustos, S.A. y Schleif, R.** 1994. Locating and lengthening the interdomain linker in AraC protein. *J. Mol. Biol.* **242**, 330-338.
- Eustance, R.J. y schleif, R.F.** 1996. The linker region of Arac protein. *J. Bacteriol.* **178**, 7025-7030.
- Fawcett, W.P. y Wolf, R.E.** 1994. Purification of a MalE-SoxS fusion protein and identification of the control sites of *Escherichia coli* superoxide-inducible genes. *Mol. Microbiol.* **14**, 669-679.
- Fernández, S., de Lorenzo, V. y Pérez-Martín, J.** 1995. Activation of the transcriptional regulator XylR of *Pseudomonas putida* by release of repression between functional domains. *Mol. Microbiol.* **16**, 205-13.
- Fetherston, J.D., Bearden, S.W. y Perry, R.D.** 1996. YbtA, an AraC-type regulator of the *Yersinia pestis* pesticin/yersiniabactin receptor. *Mol Microbiol.* **22**, 315-25.
- Franklin, F.C.H., Bagdasarian, M., Bagdasarian, M.M. y Timmis, K.N.** 1981. Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida* and cloning of genes for the entire regulated aromatic ring *meta* cleavage pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**, 7458-7462.
- Franklyn, C.S. y Lee, N.** 1988. AraC proteins with altered DNA sequence specificity which activate a mutant promoter in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **263**, 4400-4407.
- Friello, D.A., Mylroie, J.R., Gibson, D.T., Rogers, J.E. y Chakrabarty, A.M.** 1976. XYL, a nonconjugative xylene-degradative plasmid in *Pseudomonas Pxy*. *J. Bacteriol.* **127**, 1217-1224.

- Fritsch, P.S., Urbanowski, M.L. and Stauffer, G.V.** 2000. Role of the RNA polymerase α subunits in MetR-dependent activation of *metE* and *metH*: important residues in the C-terminal domain and orientation requirements within RNA polymerase. *J. Bacteriol.* **182**, 5539-5550.
- Gaal, T., Ross, W., Blatter, E.E., Tang, H., Jia, X., Krishnan, V.V., Assa-Munt, N., Ebright, R.H. y Gourse, R.L.** 1996. DNA-binding determinants of the α subunit of RNA polymerase: novel DNA-binding domain architecture. *Genes Dev.* **10**, 16-26.
- Gallegos, M.T., Michán, C. y Ramos, J.L.** 1993. The XylS/AraC family of regulators. *Nucleic Acids Res.* **21**, 807-810.
- Gallegos, M.T., Marqués, S. y Ramos, J.L.** 1996a. The TACAN₄TGCA motif upstream from the -35 region in the σ^{70} - σ^S -dependent Pm promoter of the TOL plasmid is the minimum DNA segment required for transcription stimulation by XylS regulators. *J. Bacteriol.* **178**, 6427-6434.
- Gallegos, M.T., Marqués, S. y Ramos, J.L.** 1996b. Expression of the TOL plasmid *xylS* gene in *Pseudomonas putida* occurs from a σ^{70} -dependent promoter from σ^{70} and σ^{54} dependent tandem promoters according to the compound used for growth. *J. Bacteriol.* **178**, 2356-2361.
- Gallegos, M.T.** 1996c. Caracterización del regulador transcripcional XylS del plásmido TOL de *Pseudomonas putida*. Universidad de Granada. Tesis Doctoral.
- Gallegos, M.T., Schleif, R., Bairoch, A., Hofmann, K. y Ramos, J.L.** 1997a. AraC/XylS family of transcriptional regulators. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 393-410.
- Gallegos, M.T., Williams, P.A. y Ramos, J.L.** 1997b. Transcriptional control of the multiple catabolic pathways encoded on the TOL plasmid pWW53 of *Pseudomonas putida* MT53. *J. Bacteriol.* **179**, 5024-5029.
- Garmendia, J., y De Lorenzo, V.** 2000 The role of the interdomain B linker in the activation of the XylR protein of *Pseudomonas putida*. *Mol. Microbiol.* **38**, 401-10.
- Gebhardt, K., Lindqvist, B. y Petersen, S.** 1993. Sequence conservation among proteins related to the alpha subunit of *Escherichia coli* DNA-dependent RNA polymerase (RpoA). *Protein. Seq. Data. Anal.* **5**, 277-284.

- Giffard, P.M. and Booth, I.R.** 1988. The rpoA341 allele of *Escherichia coli* specifically impairs the transcription of a group of positively-regulated operons. *Mol. Gen. Genet.* **214**, 148-152.
- Goldberg, R.B., Bender, R.A. y Streicher, S.L.** 1974. Direct selection for P1-sensitive mutants of enteric bacteria. *J. Bacteriol.* **118**, 810-814.
- González-Pérez, M.M., Ramos, J.L., Gallegos, M.T. y Marqués, S.** 1999. Critical nucleotides in the upstream region of the XylS-dependent TOL *meta*-cleavage pathway operon promoter as deduced from analysis of mutants. *J. Biol. Chem.* **274**, 2286-2290.
- González-Pérez, M.M.** 2001. Caracterización molecular de los elementos reguladores de la expresión de la ruta de degradación de alquilbenzoatos codificada por el plásmido TOL pWW0 de *Pseudomonas putida*: La proteína reguladora XylS y el promotor Pm. Universidad de Granada. Tesis doctoral.
- Ghosh, S., Basu, S., Strum, J.C., Basu, S. y Bell, R.M.** 1995. Identification of conditions that facilitate the expression of GST fusions as soluble, full-length proteins. *Anal Biochem.* **225**, 376-8.
- Gross, C.A., Chan, C., Dombroski, A., Gruber, T., Sharp, M., Tupy, J. y Young, B.** 1998. The functional and regulatory roles of σ factors in transcription. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **63**, 141-155.
- Gussin, G., Olson, C., Igarashi, K. e Ishihama, A.** 1992. Activation defects caused by mutations in the *Escherichia coli* rpoA are promoter specific. *J. Bacteriol.* **174**, 5156-5160.
- Hahn, S., Dunn, T. y Schleif, R.** 1984. Upstream repression and CRP stimulation of the *Escherichia coli* L-arabinose operon. *J. Mol. Biol.* **180**, 61-72.
- Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Hansen, L.H., Sorensen, S.J. y Jensen, L.B.** 1997. Chromosomal insertion of the entire *Escherichia coli* lactose operon, into two strains of *Pseudomonas*, using a modified mini-Tn5 delivery system. *Gene* **186**, 167-173.

Harayama, S. 1995. GenBank. N° acceso: D63341.

Harayama, S., Lehrbach, P.R. y Timmis, K.N. 1984. Transposon mutagenesis analysis of *meta* cleavage pathways operon genes of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida* mt-2. J. Bacteriol. **160**, 251-255.

Harayama, S., Leppik, R.A., Rekik, M., Mermod, N., Lehrbach, P.R., Reineke, W. y Timmis, K.N. 1986. Gene order of the TOL catabolic plasmid upper pathway operon and oxidation of both toluene and benzyl alcohol by the *xylA* product. J. Bacteriol. **167**, 455-461.

Harayama, S., Mermod, N., Rekik, M., Lehrbach, P.R., Reineke, W. y Timmis, K.N. 1987. Roles of the divergent branches of the *meta*-cleavage pathway in the degradation of benzoate and substitutes benzoates. J. Bacteriol. **169**, 558-564.

Harayama, S. y Rekik, M. 1990. The *meta* cleavage operon of TOL degradative plasmid pWW0 comprises 13 genes. Mol. Gen. Genet. **221**, 113-120.

Harayama, S. y Rekik, M. 1993. Comparison of the nucleotide sequences of the *meta*-cleavage pathway genes of TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida* with other *meta*-cleavage genes suggests that both single and multiple nucleotide substitutions contribute to enzyme evolution. Mol. Gen. Genet. **239**, 81-89.

Harayama, S., Rekik, M., Wubbolts, M., Rose, K., Leppik, R.A. y Timmis, K.N. 1989. Characterization of five genes in the upper-pathway operon of TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida* and identification of the gene products. J. Bacteriol. **171**, 5048-55.

Harayama, S. y Timmis, K.N. 1989. Catabolism of aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas*. In Genetics of Bacterial Diversity, ed. D. Hopwood, D. y Chater, K. 151-154. New York: Academic.

Harmer, T., Wu, M y Schleif, R. 2001. The role of rigidity in DNA looping-unlooping by AraC. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. **98**, 427-31.

Harris, J.D., Heilig, J.S., Martínez, I.I., Calendar, R. E Isaksson, L.A. 1978. Temperature-sensitive *Escherichia coli* mutant producing a temperature-sensitive σ subunit of DNA-dependent RNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75**, 6177-6181.

- Hayward, R.S., Igarashi, K. e Ishihama, A.** 1991. Functional specialitation within the α -subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **221**, 23-29.
- He, Y., Gaal, T., Karls, R., Donohue, T.J., Gourse, R.L. and Roberts, G.P.** 1999. Transcription activation by CooA, the CO-sensing factor from *Rhodospirillum rubrum*. *J. Biol. Chem.* **274**, 10840-10845.
- Higuchi, R.** 1990. PCR protocols: a guide to methods and applications. Eds: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. y White, T.J. pp 177-183. Academic Press. San Diego, California, USA.
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K. y Pease, L.R.** 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**, 51-59.
- Holcroft, C.C. y Egan, S.M.** 2000a. Interdependence of activation at *rhaSR* by cyclic AMP receptor protein, the RNA polymerase alpha subunit C-terminal domain, and RhaR. *J. Bacteriol.* **182**, 6774-6782.
- Holcroft, C.C. y Egan, S.M.** 2000b. Roles of cyclic AMP receptor protein and the carboxyl-terminal domain of the α subunit in transcription activation of the *Escherichia coli* *rhaBAD* operon. *J. Bacteriol.* **182**, 3529-3535.
- Holtel, A., Timmis, K.N. y Ramos, J.L.** 1992. Upstream binding sequences of the XylR activator protein and integration host factor in the *xylS* gene promoter region of the *Pseudomonas* TOL plasmid. *Nucleic Acids. Res.* **20**, 1755-1762.
- Holtel, A., Marqués, S., Mohler, I., Jakubzik, U., y Timmis, K.N.** 1994. Carbon source-dependent inhibition of *xyl* operon expression of the *Pseudomonas putida* TOL plasmid. *J Bacteriol* **176**, 1773-6.
- Holtel, A., Goldenberg, D., Gilade, H., Oppenheim, A. y Timmis, K.N.** 1995. Involvement of IHF protein in expression of the Ps promoter of the *Pseudomonas putida* TOL plasmid. *J. Bacteriol.* **177**, 3312-3315.
- Horn, J.M., Harayama, S. y Timmis, K.N.** 1991. DNA determination of the TOL plasmid (pWW0) *xylGFJ* genes of *Pseudomonas putida*: implications for the evolution of aromatic catabolism. *Mol. Microbiol.* **5**, 2459-2474.

Igarashi, K., Fujita, N. e Ishihama, A. 1990. Sequence analysis of two temperature-sensitive mutations in the alpha subunit gene (*rpoA*) of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* **18**, 5945-5948.

Igarashi, K e Ishihama, A. 1991. Bipartite functional map of the *E. coli* RNA polymerase α subunit: involvement of the C-terminal region in transcription activation by cAMP-CRP. *Cell.* **65**, 1015-1022.

Igarashi, K., Fujita, N. e Ishihama, A. 1991a. Identification of a subunit assembly domain in the alpha subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **218**, 1-6.

Igarashi, K., Hanamura, A., Makino, K., Aiba, H., Aiba, H., Mizuno, t., Nakata, A. e Ishihama, A. 1991b. Functional map of the α subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase: Two modes of transcription activation by positive factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 8958-8962.

Inoue, H., Nojima, H. y Okayama, H. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28.

Inouye, S., Nakazawa, A. y Nakazawa, T. 1983. Molecular cloning of the regulatory gene *xylR* and operator-promoter regions of the *xylABC* and *xylDEGF* operons of the TOL plasmid. *J. Bacteriol.* **155**, 1192-1199.

Inouye, S., Nakazawa, A. y Nakazawa, T. 1984. Nucleotide sequence of the promoter region of the *xylDEGF* operon on TOL plasmid of *Pseudomonas putida*. *Gene.* **29**, 323-330.

Inouye, S., A. Nakazawa, y Nakazawa, T.. 1986. Nucleotide sequence of the regulatory gene *xylS* on the *Pseudomonas putida* TOL plasmid and identification of the protein product. *Gene.* **44**, 235-242.

Inouye, S., Nakazawa, A. y Nakazawa, T. 1987a. Expression of the regulatory gene *xylS* on the TOL plasmid is positively controlled by the *xylR* gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 5182-5186.

Inouye, S., A. Nakazawa, A. y Nakazawa, T.. 1987b. Overproduction of the *xylS* gene product and activation of the *xylDLEGF* operon on the TOL plasmid. *J. Bacteriol.* **169**, 3587-3592.

- Ishihama, A.** 1981. Subunit assembly of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Advan. Biophys.* **14**, 1-35.
- Ishihama, A.** 1992. Role of the RNA polymerase alpha subunit in transcription activation. *Mol. Microbiol.* **6**, 3283-3288.
- Ishihama, A.** 1997. Promoter selectivity control of RNA polymerase. In *nucleic Acids and Molecular Biology: Mechanisms of Transcription* (Eckstein, F. & Lilley, D.M.J., eds), vol **11**, 53-70, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Ishihama, A.** 2000. Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Ann. Rev. Microbiol.* **54**, 499-518.
- Itoh, Y.** 1997. Cloning and characterization of the *aru* genes encoding enzymes of the catabolic arginine succinyltransferase pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **179**, 7280-7290.
- Jair, K-W., Martin, R.G., Rosner, J.L., Fujita, N., Ishihama, A. y Wolf, R.E. Jr.** 1995. Purification and regulatory properties of MarA protein, a transcriptional activator of *Escherichia coli* multiple antibiotic and superoxide resistance promoters. *J. Bacteriol.* **177**, 7100-7104.
- Jair, K-W., Fawcett, W.P., Fujita, N., Ishihama, A. y Wolf, R.E. Jr.** 1996a. Ambidextrous transcriptional activation by SoxS: requirement for the C-terminal domain of the RNA polymerase alpha subunit in a subset of *Escherichia coli* superoxide-inducible genes. *Mol. Microbiol.* **19**, 307-317.
- Jair, K-W., Yu, X., Kkarstad, K., Thony, B., Fujita, N., Ishihama, A. y Wolf, R.E. Jr.** 1996b. Transcriptional activation of promoters of the superoxide and multiple antibiotic resistance regulons by Rob, a binding protein of the *Escherichia coli* origin of chromosomal replication. *J. Bacteriol.* **178**, 2507-2513.
- Jeffrey, W.H., Cuskey, S.M., Chapman, P.J., Resnick, S. y Olsen, R.H.** 1992. Characterization of *Pseudomonas putida* mutants unable to catabolize benzoate: cloning and characterization of *Pseudomonas* genes involved in benzoate catabolism and isolation of a chromosomal DNA fragment able to substitute for *xylS* in activation of the TOL lower-pathway promoter. *J. Bacteriol.* **174**, 4986-4996.

- Jeon, Y.H., Negishi, T., Shirakawa, M., Yamazaki, T., Fujita, N., Ishihama, A. y Kyogoku, Y.** 1995. Solution structure of the activator contact domain of the RNA polymerase α subunit. *Science*. **270**, 1495-1497.
- Jeon, Y.H., Yamazaki, T., Otomo, T., Ishihama, A. y Kyogoku, Y.** 1997. Flexible linker in the RNA polymerase alpha subunit facilitates the independent motion of the C-terminal activator contact domain. *J. Mol. Biol.* **267**, 953-962.
- Jin, R., Sharif, K. and Krakow, J.** 1995. Evidence for contact between the cyclic AMP receptor protein and the σ^{70} subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* **270**, 19213-19216.
- Kaldalu, N., Mandel, T. y Ustav, M.** 1996. TOL plasmid transcription factor XylS binds specifically to the Pm operator sequence. *Mol Microbiol.* **20**, 569-79
- Kaldalu, N., Toots, U., de Lorenzo, V. y Ustav, M.** 1999. Functional domains of the TOL plasmid transcription factor XylS. *J Bacteriol.* **182**, 1118-26.
- Kaldalu, N., Lepik, D., Kristjuhan, A. y Ustav, M.** 2000. Monitoring and purification of proteins using bovine papillomavirus E2 epitope tags. *Biotechniques.* **28**, 456-60, 462.
- Kapust, R.B. y Waugh, D.S.** 1999. *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Science.* **8**, 1668-1674.
- Kasai, Y., Inoue, J. y Harayama, S.** 2001. The TOL plasmid pWW0 *xylN* gene product from *Pseudomonas putida* is involved in m-xylene uptake. *J. Bacteriol.* **183**, 6662-6.
- Keil, S., Pickup, R.W. y Williams, P.A.** 1985. Evolutionary conservation of genes coding for *meta* pathway enzymes within TOL plasmids pWW0 and pWW53. *J. Bacteriol.* **164**, 887-895.
- Keil, H., Keil, S. y Williams, P.A.** 1987. Molecular analysis of regulatory and structural genes of the TOL plasmid pWW53-4. *J. Gen. Microbiol.* **133**, 1149-1158.
- Keil, S. y Keil, H.** 1992. Construction of a cassette enabling regulated gene expression in the presence of aromatic hydrocarbons. *Plasmid* **27**, 191-199.

- Kessler, B., de Lorenzo, V. y Timmis, K.** 1992. A general system to integrate *lacZ* fusion into the chromosomes of gram-negative eubacteria: regulation of the Pm promoter of the TOL plasmid studied with all controlling elements in monocopy. *Mol. Gen. Genet.* **233**, 293-301.
- Kessler, B., de Lorenzo, V. y Timmis, K.** 1993. Identification of a *cis*-acting sequence within the Pm promoter of the TOL plasmid which confers XylS-mediated responsiveness to substituted benzoates. *J. Mol. Biol.* **230**, 699-703.
- Kessler, B., Marqués, S., Köhler, T., Ramos, J.L., Timmis, K. y de Lorenzo, V.** 1994a. Cross talk between catabolic pathways in *Pseudomonas putida*: XylS-Dependent and independent activation of the TOL *meta* operon requires the same *cis*-acting sequences within the Pm promoter. *J. Bacteriol.* **176**, 5578-5582.
- Kessler, B., Herrero, M., Timmis, K.N. y de Lorenzo, V.** 1994b. Genetic evidence that the XylS regulator of the *Pseudomonas* TOL *meta* operon controls the Pm promoter through weak DNA-protein interactions. *J. Bacteriol.* **176**, 3171-3176.
- Kimura, M., Fujita, N. e Ishihama, A.** 1994. Functional map of the alpha subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **242**, 107-115.
- Kunz, D.A. y Chapman, P.J.** 1981. Isolation and characterization of spontaneously occurring TOL plasmid mutants of *Pseudomonas putida* HS1. *J. Bacteriol.* **146**, 952-964.
- Kwon, H.J., Bennik, M.H.J., Demple, B. y Ellenberger, T.** 2000. Crystal structure of the *Escherichia coli* Rob transcription factor in complex with DNA. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 424-430.
- Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* **227**, 680-685.
- Landini, P. y Busby, S.J.** 1999. The *Escherichia coli* Ada protein can interact with two distinct determinants in the σ^{70} subunit of RNA polymerase according to promoter architecture: identification of the target of Ada activation at the *alkA* promoter. *J. Bacteriol.* **181**, 1524-1529.

- Landini, P., Gaal, T., Ross, W. y Volkert, M.R.** 1997. The RNA polymerase α subunit carboxyl-terminal domain is required for both basal and activated transcription from the *alkA* promoter. *J. Biol. Chem.* **272**, 15914-15919.
- Landini, P., Bown, J.A., Volkert, M.R. y Busby, J.W.** 1998. Ada protein-RNA polymerase σ subunit interaction and α subunit-promoter DNA interactions are necessary at different steps in transcription activation at the *Escherichia coli* *ada* and *aidB* promoters. *J. Biol. Chem.* **273**, 13307-13312.
- Lange, R. y Hengge-Aronis, R.** 1991. Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **5**, 49-59.
- Lauble, H., Georgalis, Y. y Heinemann, U.** 1989. Studies on the domain structure of the *Salmonella typhimurium* AraC protein. *Eur. J. Biochem.* **185**, 319-25.
- La Vallie, E.R., DiBlasio, E.A., Kovacic, S., Grant, K.L., Schendel, P.F. y McCoy, J.M.** 1993. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Biotechnology.* **11**, 187-193.
- Lee, D.H., Huo, L. y Schleif, R.** 1992. Repression of the *araBAD* promoter from *araO1*. *J. Mol. Biol.* **224**, 335-41.
- Lee, D.J., Wing, H.J., Savery, N.J. y Busby, S.J.** 2000. Analysis of interactions between Activating Region 1 of *Escherichia coli* FNR protein and the C-terminal domain of the RNA polymerase alpha subunit: use of alanine scanning and suppression genetics. *Mol. Microbiol.* **37**, 1032-1040.
- Lobell, R.B. y R.F. Schleif.** 1990. DNA looping and unlooping by AraC protein. *Science.* **250**: 528-532.
- Lobell, R.B. y Schleif, R.F.** 1991 AraC-DNA looping: orientation and distance-dependent loop breaking by the cyclic AMP receptor protein. *J. Mol. Biol.* **218**, 45-54.
- Lonetto, M.A., Rhodius, V., Lamberg, K., Kiley, P., Busby, S. and Gross, C.** 1998. Identification of a contact site for different transcription activators in region 4 of the *Escherichia coli* RNA polymerase σ^{70} subunit. *J. Mol. Biol.* **284**, 1353-1365.

- de Lorenzo, V., Herrero, M., Metzke, M. y Timmis, K.N.** 1991. An upstream XylR- and IHF-induced nucleoprotein complex regulates the sigma 54-dependent Pu promoter of TOL plasmid. *EMBO J.* **10**, 1159-67.
- de Lorenzo, V., Eltis, L., Kessler, B. y Timmis, K.N.** 1993. Analysis of *Pseudomonas* gene products using lacIq/P_{trp}-lac plasmids and transposons that confer conditional phenotypes. *Gene.* **123**, 17-24.
- Lu, C-D. y Abdelal, A.T.** 2001. The *gdhB* gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes an arginine-inducible NAD⁺-dependent glutamate dehydrogenase which is subject to allosteric regulation. *J. Bacteriol.* **183**, 490-499.
- Lüthy, R., Xenarios, I. y Bucher, P.** 1994. Improving the sensitivity of the sequence profile method. *Protein Sci.* **3**, 139-146.
- Manzanera, M., Marqués, S y Ramos, J.L.** 2000. Mutational analysis of the highly conserved C-terminal residues of the XylS protein, a member of the AraC family of transcriptional regulators. *FEBS Lett.* **476**, 312-317.
- Marck, C.** 1988. "DNA Strider": a "C" program for the fast analysis of DNA and protein sequences on the Apple Macintosh family of computers. *Nucleic Acids Res.* **16**, 1829-1836.
- Marqués, S., Ramos, J.L. y Timmis, K.N.** 1993. Analysis of the mRNA structure of the *Pseudomonas putida* TOL *meta* fission pathway operon around the transcription initiation point, the *xylTE* and the *xylFJ* regions. *Biochim Biophys Acta.* **1216**, 227-236.
- Marqués, S., Holtel, A., Timmis, K.N. y Ramos, J.L.** 1994. Transcriptional induction kinetics from the promoters of the catabolic pathways of TOL plasmid pWWO of *Pseudomonas putida* for metabolism of aromatics. *J. Bacteriol.* **176**, 2517-2524.
- Marqués, S., Gallegos, M.T. y Ramos, J.L.** 1995. Role of σ^s in transcription from the positively controlled P_m promoter of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida*. *Mol. Microbiol.* **18**, 851-857.

Marqués, S., Gallegos, M.T., Manzanera, M., Holtel, A., Timmis, K.N y Ramos, J.L. 1998. Activation and repression of transcription at the double tandem divergent promoters for the *xylR* and *xylS* genes of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **180**, 2889-2894.

Marqués, S., Manzanera, M., González-Pérez, M.M., Gallegos, M.T., y Ramos, J.L. 1999. The XylS-dependent Pm promoter is transcribed *in vivo* by RNA-polymerase with σ^{32} or σ^{38} according to the growth phase. *Mol. Microbiol.* **31**, 1105-1113.

Martin, R.G., Gillete, W., Sangkhee, R. y Rosner, J.. 1999. Structural requirements for marbox function in transcriptional activation of *mar/sox/rob* regulon promoters in *Escherichia coli*: sequence, orientation and spatial relationship to the core promoter. *Mol. Microbiol.* **34**, 431-441.

Menon, K.P. y Lee, N.L. 1990. Activation of *ara* operons by a truncated AraC protein does not require inducer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, 3708-3712.

Meulien, P., Downing, R.G. y Broda, P. 1981. Escisión of the 40 kb segment of the TOL plasmid from *Pseudomonas putida* mt-2 involves direct repeats. *Mol. Gen. Genet.* **184**, 97-101.

Mermod, N., Lehrbach, P.R., Reineke, W. y Timmis, K.N.. 1984. Transcription of the TOL plasmid toluate catabolic pathway operon of *Pseudomonas putida* is determined by a pair of co-ordinately and positively regulated overlapping promoters. *EMBO. J.* **3**, 2461-2466.

Mermod, N., Ramos, J.L., Bairoch, A. y Timmis, K.N. 1987. *xylS* gene positive regulator of TOL plasmid pWW0: identification, sequence analysis, and overproduction leading to constitutive expresion of *meta*-cleavage pathway. *Mol. Gen. Genet.* **207**, 349-354.

Michán, C., Zhou, L., Gallegos, M.T., Timmis, K.N. y Ramos, J.L. 1992a. Identification of critical amino-terminal regions of XylS. *J. Biol. Chem.* **267**, 22897-22901.

Michán, C., Kessler, B., de Lorenzo, V., Timmis, K.N. y Ramos, J.L. 1992b. XylS domain interactions can be deduced form intrallelic dominance in double mutants of *Pseudomonas putida*. *Mol. Gen. Genet.* **235**, 406-412.

- Michán, C., Busby, S. y Hyde, E.** 1995. The *Escherichia coli* MelR transcription activator: production of a stable fragment containing the DNA-binding domain. *Nucleic Acids Res.* **23**, 1518-1523.
- Miller, J.** 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Miura, K., Inouye, S. y Nakazawa, A.** 1998a. Protein binding in vivo to OP2 promoter of the *Pseudomonas putida* TOL plasmid. *Biochem Mol Biol Int.* **46**, 993-941.
- Miura, K., Inouye, S y Nakazawa, A.** 1998b. The *rpoS* gene regulates OP2, an operon for the lower pathway of xylene catabolism on the TOL plasmid, and the stress response in *Pseudomonas putida* mt-2. *Mol Gen Genet.* **259**, 72-8.
- Morett, E. y Segovia, L.** 1993. The sigma 54 bacterial enhancer-binding protein family: mechanism of action and phylogenetic relationship of their functional domains. *J. Bacteriol.* **175**, 6067-6074.
- Murakami, K., Fujita, N. and Ishihama, A.** 1996. Transcription factor recognition surface on the RNA polymerase alpha subunit is involved in contact with the DNA enhancer element. *EMBO J.* **15**, 4358-4367.
- Nakai, C., Hori, K., Kagiya, H., Nakazawa, T. y Nozaki, M.** 1983a. Purification, subunit structure, and partial amino acid sequence of metapyrocatechase. *J. Biol. Chem.* **258**, 2916-2922.
- Nakai, C., Kagiya, H., Nozaki, M., Nakazawa, T., Inouye, S., Ebina, Y. y Nakazawa, A.** 1983b. Complete nucleotide sequence of the metapyrocatechase gene on the TOL plasmid of *Pseudomas putida* mt-2. *J. Biol. Chem.* **258**, 2923-2928.
- Nakamura, Y., Osawa, T. y Yura, T.** 1983. Intragenic localization of amber and temperature sensitive *rpoD* mutations affecting RNA polymerase sigma factor of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **189**, 193-198.
- Nakazawa, T. y Yokota, T.** 1973. Benzoate metabolism in *Pseudomonas putida* (*arvilla*) mt-2: demonstration of two benzoate pathways. *J. Bacteriol.* **115**, 262-267.
- Nakazawa, T.** 1978. TOL plasmid in *Pseudomonas aeruginosa* PAO: thermosensitivity of self-maintenance and inhibition of hst cell growth. *J. Bacteriol.* **133**, 527-535.

- Neidle, E., Hartnett, C., Ornston, L.N., Bairoch, A., Rekik, M. y Harayama, S.** 1992. Cis-dioldehydrogenases encoded by the TOL pWW0 plasmid *xyiL* gene and the *Acinetobacter calcoaceticus* chromosomal *benD* gene are members of the sort-chain alcohol dehydrogenase superfamily. *Eur. J. Biochem.* **204**, 113-120.
- Nishijyo, T., Park, S-M., Lu, C-D., Itoh, Y. y Abdelal, A.** 1998. Molecular characterization and regulation of an operon encoding a system for transport of an arginine and ornithine and the ArgR regulatory protein in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **180**, 5559-5566.
- Niu, W., Kim, Y., Tau, G., Heyduk, T. y Ebright, R.H.** 1996. Transcription activation at class II CAP-dependent promoters: two interactions between CAP and RNA polymerase. *Cell* **87**, 1123-1134.
- North, A.K., Klose, K.E., Stedman, K.M. y Kustu, S.** 1993. Prokariotic enhancer-binding proteins reflect eukaryote-like modularity: the puzzle of nitrogen regulatory protein C. *J. Bacteriol.* **175**, 4267-4273.
- Nygren, P-A., Stahl, S., Uhlen, M.** 1994. Engineering proteins to facilitate bioprocessing. *Trends Biotechnol.* **12**, 184-188.
- Ohnuma, M., Fujita, N., Ishihama, A., Tanaka, K. y Takahashi, H.** 2000. A carboxy-terminal 16-amino-acid region of σ^{38} of *Escherichia coli* is important for transcription under high-salt conditions and sigma activities in vivo. *J. Bacteriol.* **182**, 4628-4631.
- O'Neill, E., Ng, L.C., Sze, C.C. y Shingler, V.** 1998. Aromatic ligand binding and intramolecular signalling of the phenol-responsive sigma54-dependent regulator DmpR. *Mol Microbiol.* **28**, 131-141.
- Osborne, D.J., Pickup, R.W. y Williams, P.A.** 1988. The presence of two complete homologous *meta* pathway on TOL plasmid pWW53. *J. General Microbiol.* **134**, 2965-2975.
- Owens, J.T., Miyake, R., Murakami, K., Chmura, A.J., Fujita, N., Ishihama, A. y Meares, C.F.** 1998. Mapping the sigma70 subunit contact sites on *Escherichia coli* RNA polymerase with a sigma70-conjugated chemical protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 6021-6026.

Park, S-M., Lu, C-D. y Abdelal, A.T. 1997. Purification and characterization of an arginine regulatory protein, ArgR, from *Pseudomonas aeruginosa* and its interactions with the control regions for the *car*, *argF*, and *aru* operons. *J. Bacteriol.* **179**, 5309-17.

Parker, L.L. y Hall, B.G. 1990. Characterization and nucleotide sequence of the cryptic *cel* operon of *Escherichia coli* K12. *Genetics.* **11**, 769-775.

Pérez-Martín, J. y de Lorenzo, V. 1995a. The σ^{54} dependent promoter Ps of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida* requires HU for transcriptional activation *in vivo* by XylR. *J. Bacteriol.* **177**, 3758-3763.

Pérez-Martín, J. y de Lorenzo, V. 1995b. The amino-terminal domain of the prokaryotic enhancer-binding protein XylR is a specific intramolecular repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 9392-6.

Pérez-Martín, J. y de Lorenzo, V. 1996a. ATP binding to the sigma 54-dependent activator XylR triggers a protein multimerization cycle catalyzed by UAS DNA. *Cell* **86**, 331-339.

Pérez-Martín, J. y de Lorenzo, V. 1996b. Identification of the repressor subdomain within the signal reception module of the prokaryotic enhancer-binding protein XylR of *Pseudomonas putida*. *J. Biol. Chem.* **271**, 7899-902.

Pérez-Martín, J. y de Lorenzo, V. 1996c. Physical and functional analysis of the prokaryotic enhancer of the sigma 54-promoters of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida*. *J. Mol. Biol.* **258**, 562-74.

Pérez-Martín, J. y de Lorenzo, V. 1996d. *In vitro* activities of an N-terminal truncated form of XylR, a sigma 54-dependent transcriptional activator of *Pseudomonas putida*. *J. Mol. Biol.* **258**, 575-87.

Pérez-Martín, J. y de Lorenzo, V. 1997a. Clues and consequences of DNA bending in transcription. *Annu. Rev. Microbiol.* **51**, 593-628.

Pérez-Martín, J., Cases, I. y de Lorenzo, V. 1997b. Design of a solubilization pathway for recombinant polypeptides *in vivo* through processing of a bi-protein with a viral protease. *Protein Engineering.* **10**, 725-730.

Polissi, A. y Harayama, S. 1993. In vivo reactivation of catechol 2,3-dioxygenase mediated by a chloroplast-type ferredoxine: a bacterial strategy to expand the substrate specificity of aromatic degradative pathways. *EMBO J.* **12**, 3339-3347.

Poore, C.A., Coker, C., Dattelbaum, J.D. y Mobley, L.T. 2001. Identification of the domains of UreR, an AraC-like transcriptional regulator of the urease gene cluster in *Proteus mirabilis*. *J. Bacteriol.* **183**, 4526-4535.

Prost, J.F., Nègre, D., Oudot, C., Murakami, K., Ishihama, A., Cozzone, A.J. and Cortay, J.C. 1999. Cra-dependent transcriptional activation of the *icd* gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**, 893-898.

Pryor, K.D. y Leiting, B. 1997. High-level expression of soluble protein in *Escherichia coli* using a His₆-tag and maltose-binding-protein double-affinity fusion system. *Protein Exp. Purif.* **10**, 309-319.

Ramos, J.L., Stolz, A., Reineke, W y Timmis, K.N. 1986. Altered effector specificities in regulators of gene expression : TOL plasmid *xylS* mutants and their use to engineer expansion of the range of aromatics degraded by bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**, 8467-8471.

Ramos, J.L., Mermod, N. y Timmis, K.N. 1987. Regulatory circuits controlling transcription of TOL plasmid operon encoding meta-cleavage pathway for degradation of alkylbenzoates by *Pseudomonas*. *Mol. Microbiol.* **1**, 293-300.

Ramos, J.L., Rojo, F., Zhou, L. y Timmis, K. 1990a. A family of positive regulators related to the *Pseudomonas putida* plasmid *XylS* and the *Escherichia coli* *AraC* activators. *Nucl. Acids. Res.* **18**, 2149-2152.

Ramos, J.L., Michán, C., Rojo, F., Dwyer, D. Y Timmis, K.N. 1990b. Signal-regulator interactions. Genetic analysis of the effector binding site of *xylS*, the benzoate-activated positive regulator of *Pseudomonas* TOL plasmid *meta*-cleavage pathway operon. *J. Mol. Biol.* **211**, 373-382.

Ramos, J.L., Marqués, S. y Timmis, K.N. 1997. Transcriptional control of the *Pseudomonas* TOL plasmid catabolic operons is achieved through an interplay of host factors and plasmid encoded regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* **51**, 341-73.

- Ramos-González, M.I., Duque, E. y Ramos, J.L.** 1991. Conjugational transfer of recombinant DNA in cultures and in soils: host range of *Pseudomonas putida* TOL plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 3020-3027.
- Rao, L., Ross, W., Appleman, J.A., Gaal, T., leirimo, S., Schlax, P., Record, M.T. y Gourse, R.L.** 1994. Factor independent activation of *rnmB* P1: an "extended" promoter with an upstream element that dramatically increases promoter strength. *J. Mol. Biol.* **235**, 1421-1435.
- Rhee, S., Martin, R.G., Rosner, J.L. y Davies, D.R.** 1998. A novel DNA-binding motif in MarA: the first structure for an AraC family transcriptional activator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 10413-10418.
- Rhodijs, V.A., West, D.M., Webster, C.L., Busby, S.J.W. y Savery, N.J.** 1997. Transcription activation at Class II CRP-dependent promoters: the role of different activating regions. *Nucleic Acids Res.* **25**, 326-332.
- Rosenow, C., Maniar, M. y Trias, J.** 1999. Regulation of the α -galactosidase activity in *Streptococcus pneumoniae*: Characterization of the raffinose utilization system. *Genome Research.* **9**, 1189-1197.
- Ross, W., Gosink, K.K., Salomon, J., Igarashi, K., Zou, C., Ishihama, A., Severinov, K. Y Gourse, R.L.** 1993. A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the α subunit of RNA polymerase. *Science.* **262**, 1407-1413.
- Ross, W., Aiyar, S., Salomon, J. y Gourse, R.L.** 1998. *Escherichia coli* promoters with UP elements of different strengths: modular structure of bacterial promoters. *J. Bacteriol.* **180**, 5375-5383.
- Ross W, Ernst A, Gourse RL.** 2001. Fine structure of *E. coli* RNA polymerase-promoter interactions: alpha subunit binding to the UP element minor groove. *Genes Dev.* **15**, 491-506.
- Ruiz, R., Ramos, J.L. and Egan, S.M.** 2001. Interactions of the XylS regulators with the C-terminal domain of the RNA polymerase alpha subunit influence the expression level from the cognate Pm promoter. *FEBS Lett.* **491**, 207-211.

- Russo, F. y Silhavy, T.** 1992. Alpha: the Cinderella subunit of RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* **267**, 14515-14518.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Samuelsson, E., Moks, T., Nilsson, B. y Uhlen, M.** 1994. Enhanced in vitro refolding of insulin-like growth factor I using a solubilizing fusion partner. *Biochemistry.* **33**, 4207-4211.
- Savery, N.J., Rhodius, V.A., Wing, H.J. and Busby S.J.W.** 1995. Transcription activation at *Escherichia coli* promoters dependent on the cyclic AMP receptor protein: effects of binding sequences for the RNA polymerase alpha-subunit. *Biochem. J.* **309**, 77-83.
- Savery, N.J., Lloyd, G.S., Kainz, M., Gaal, T., Ross, W., Ebright, R.H., Gourse, R.L. y Busby, S.J.W.** 1998. Transcription activation at Class II CRP-dependent promoters: identification of determinants in the C-terminal domain of the RNA polymerase alpha subunit. *EMBO J.* **17**, 3439-3447.
- Saviola, B., Seabold, R. y Schleif, R.F.** 1998. Arm-domain interactions in AraC. *J. Mol. Biol.* **278**, 539-548.
- Schein, C.H.** 1989. Production of soluble recombinant proteins in bacteria. *BioTechnology.* **7**, 1141-1148.
- Schleif, R.F. y Favreau, M.A.** 1982. Hyperproduction of AraC protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry.* **21**, 778-82.
- Sharff, A.J., Rodseth, L.E., Spurlino, J.C. y Quioco, F.A.** 1992. Crystallographic evidence of a large ligand-induced hinge-twist motion between the two domains of the maltodextrin binding protein involved in active transport and chemotaxis. *Biochemistry.* **31**, 10657-10663.
- Shaw, J.P. y Harayama, S.** 1990. Purification and characterization of TOL plasmid-encoded benzyl alcohol dehydrogenase and benzaldehyde dehydrogenase of *Pseudomonas putida*. *Eur. J. Biochem.* **191**, 705-714.

- Shingler, V., Bartilson, M. y Moore, T.** 1993. Cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the positive regulator (*dmpR*) of the phenol catabolic pathway encoded by pVI150 and identification of DmpR as a member of the NtrC family of transcriptional activators. *J. Bacteriol.* **175**, 1596-1604.
- Shingler, V. y Pavel, H.** 1995. Direct regulation of the ATPase activity of the transcriptional activator DmpR by aromatic compounds. *Mol. Microbiol.* **17**, 505-513.
- Shingler, V.** 1996. Signal sensing by sigma 54-dependent regulators: derepression as a control mechanism. *Mol. Microbiol.* **19**, 409-16.
- Silhavy, T.J., Berman, M.L. y Enquist, L.W.** 1984. Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbor Laboratory. 109-112.
- Slauch, J.M., Russo, F.D. y Silhavy, T.J.** 1991. Suppressor mutations in *rpoA* suggest that OmpR controls transcription by direct interactions with the α subunit of RNA polymerase. *J. Bacteriol.* **173**, 7501-7510.
- Soisson, S.M., Macdougall-Shackleton, Schleif, R. y Wolberger, C.** 1997. Structural basis for ligand-regulated oligomerization of AraC. *Science.* **276**, 421-425.
- Spolar, R.S. y Record, M.T. Jr.** 1994. Coupling of local folding to site-specific binding of proteins to DNA. *Science.* **263**, 777-784.
- Spooner, R.A., Lindsay, K. y Franklin, F.C.H.** 1986. Genetic, functional and sequence analysis of the *xylR* and *xylS* regulatory genes of the TOL plasmid pWW0. *J. Gen. Microbiol.* **132**, 1347-1358.
- Spooner, R.A., Bagdasarian, M. y Franklin, C.F.** 1987. Activation of the *xylDEGF* promoter of the TOL toluene-xylene degradation pathway by overproduction of the *xylS* regulatory gene product. *J. Bacteriol.* **169**, 3581-3586.
- Spurlino, J.C., Lu, G-Y y Quioco, F.A.** 1991. The 2.3-A resolution structure of the maltose- or maltodextrin- binding protein, a primary receptor of bacterial active transport and chemotaxis. *J. Biol. Chem.* **266**, 5202-5219.
- Stoner, C.M. y Schleif, R.** 1983. The *araE* low affinity L-arabinose transport promoter. *J. Mol. Biol.* **170**, 1049-1053.

- Strey, J., Witchen, D. y Meinhardt, F.** 1999. Regulation of β -galactosidase expression in *Bacillus megaterium* DMS319 by a XylS/AraC-type transcriptional activator. *J. Bacteriol.* **181**, 3288-3292.
- Subramanian, V., Liu, T.N., Yeh, W.K., Narro, M. y Gibson, D.T.** 1981. Purification and properties of NADH-ferredoxin TOL reductase. A component of toluene dioxygenase from *Pseudomonas putida*. *J. Biol. Chem.* **256**, 2723-2730.
- Suzuki, M., Hayakawa, T., Shaw, J.P., Rekik, M. y Harayama, S.** 1991. Primary structure of xylene monooxygenase: similarities to and differences from the alkane hydroxylation system. *J. Bacteriol.* **173**, 1690-1695.
- Tang, H., Severinov, K., Goldfarb, A. Fenyo, D., Chait, B. y Ebright, R.** 1994. Location, structure and function of the target of a transcriptional activator protein. *Genes Dev.* **8**, 3058-3067.
- Thomas, M.S. y Glass, R.E.** 1991. *Escherichia coli* *rpoA* mutation which impairs transcription of positively regulated systems. *Mol. Microbiol.* **5**, 2719-2725.
- Tobe, T., Ito, K. y Yura, T.** 1984. Isolation and physycal mapping of temperature-sensitive mutants defective in heat-shock induction of proteins in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **195**, 10-16.
- Tobes, R y Ramos, J.L.** 2002. AraC/XylS database: A family of positive transcriptional regulators in bacteria. *Nucleic Acids Res.* En prensa.
- Tobin, J.F. y Schleif, R.F.** 1987. Positive regulation of the *Escherichia coli* L-rhamnose operon is mediated by the products of tandemly repeated regulatory genes. *J. Mol. Biol.* **196**, 789-799.
- Tobin, J.F. y Schleif, R.F.** 1990a. Transcription from the *rha* operon P_{SR} promoter. *J. Mol. Biol.* **211**, 1-4.
- Tobin, J.F. y Schleif, R.F.** 1990b. Purification and properties of RhaR, the positive regulator of the L-rhamnose operons of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **211**, 75-89.
- Tsuda, M. e Iino, T.** 1987. Genetic analysis of a transposon carrying toluene degrading genes on a TOL plasmid pWW0. *Mol. Gen. Genet.* **210**, 270-276.

- Tsuda, M., Minegishi, K.J. e Iino, T.** 1989. Toluene transposons Tn4651 and Tn4653 are class II transposons. *J. Bacteriol.* **171**, 1386-1393.
- van Ulsen, P., Hillebrand, M., Kaizz, M., Collard, R., Zulianello, L., van de Putte, P., Gourse, R. and Goosen, N.** 1997. Function of the C-terminal domain of the alpha subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase in basal expression and integration host factor-mediated activation of the early promoter of bacteriophage Mu. *J. Bacteriol.* **179**, 530-537.
- Via, P., Badia, J., Baldoma, L., Obradors, N. y Aguila, J.** 1996. Transcriptional regulation of the *Escherichia coli rhaT* gene. *Microbiology.* **142**, 1833-40.
- Vos, P., Verver, J., Jaegle, M., Wellink, J., van Kammen, A. y Goldbach, R.** 1988. Two viral proteins involved in the proteolytic processing of the cowpea mosaic virus polyproteins. *Nucleic Acids Res.* **16**, 1967-85.
- Wade, J.T., Belyaeva, T.A., Hyde, E.I. y Busby, S.J.W.** 2000. Repression of the *Escherichia coli melR* promoter by MelR: evidence that efficient repression requires the formation of a repression loop. *Mol. Microbiol.* **36**, 223-229.
- Webster, C., Kempell, K., Booth, I. y Busby, S.** 1987. Organisation of the regulatory region of the *Escherichia coli* melibiose operon. *Gene* **59**, 253-263.
- Webster, C., Gardner, L. y Busby, S.** 1989. The *E. coli melR* gene encodes a DNA binding protein with affinity for specific sequences located in the melibiose-operon regulatory region. *Gene.* **83**, 207-213.
- Whited, G.M., McCombie, R., Kwart, L.D. y Gibson, D.T.** 1986. Identification of cis-diols as intermediates in the oxidation of aromatic acids by a strain of *Pseudomonas putida* that contains a TOL plasmid. *J. Bacteriol.* **166**, 1028-1039.
- Wilcox, G. y Meuris, P.** 1976. Stabilization and size of AraC protein. *Mol. Gen. Genet.* **145**, 97-100.
- Williams, P.A. y Murray, K.** 1974. Metabolism of benzoates and methylbenzoates by *Pseudomonas putida (arvilla)* mt-2: evidence for the existence of a TOL plasmid. *J. Bacteriol.* **120**, 416-423.

Williams, P.A. y Worsey, M.J. 1976. Ubiquity of plasmids in coding for toluene and xylene metabolism in soil bacteria: evidence for the existence of new TOL plasmids. *J. Bacteriol.* **125**, 818-828.

Williams, J., Michan, C., Webster, C. y Busby, S. 1994. Interactions between the *Escherichia coli* MelR transcription activator protein and operator sequences at the *melAB* promoter. *Biochem. J.* **300**, 757-763

Williams, P.A., Pitt, C., Vrecl, M. y Shaw, L.E. 1995. GenBank. N° acceso: U20269.

Williams, P.A., Shaw, L.M., Pitt, C.W. y Vrecl, M. 1996. *xyIUW*, two genes at the start of the upper pathway operon of TOL plasmid pWW0, appear to play no essential part in determining its catabolic phenotype. *Microbiology.* **143**, 101-107.

Worsey, M.J. y Williams, P.A. 1977. Characterization of a spontaneously occurring mutant of the TOL20 plasmid in *Pseudomonas putida* MT20: possible regulatory implications. *J. Bacteriol.* **130**, 1149-1158.

Yang J., Murakami, K., Camakaris, H., Fujita N., Ishihama, A. y Pittard, A.J. 1997. Amino acid residues in the alpha-subunit C-terminal domain of *Escherichia coli* RNA polymerase involved in activation of transcription from the *mtr* promoter. *J. Bacteriol.* **179**, 6187-6191.

Yanisch-Perron, C., J. Vieira y J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-109.

Yasuno, K., Yamazaki, T., Tanaka, Y., Kodama, T.S., Matsugami, A., Katahira, M., Ishihama, A. y Kyogoku, Y. 2000. Interaction of the C-terminal domain of the *E. coli* RNA polimerase α subunit with the UP element: recognizing the backbone structure in the minor groove surface. *J. Mol. Biol.* **306**, 213-225.

Zhang, G y Darst, S.A. 1998. Structure of the *Escherichia coli* RNA polymerase α subunit amino-terminal domain. *Science.* **281**, 262-266.

Zhou, Y.-N., Kusakawa, N., Erickson, J.W., Gross, C. y Yura, T. 1988. Isolation and characterization of *Escherichia coli* mutants that lack the heat shock sigma factor σ^{32} . *J. Bacteriol.* **170**, 3640-3649.

Zhou, L., Timmis, K.N. y Ramos, J.L. 1990. Mutations leading to constitutive expression from the TOL plasmid *meta*-cleavage pathway operon are located at the C-terminal end of the positive regulator protein XylS. *J. Bacteriol.* **172**, 3707-3710.

Zillig, W., Palm, P. y Heil, A. 1976. Funcion and reassembly of subunits of DNA-dependent RNA polymerase. In polymerase. Edited by Losick, R., Chamberlin, M. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 101-1025.