



UNIVERSIDAD DE LEÓN
FACULTAD DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA, GENÉTICA Y MICROBIOLOGÍA

MECANISMOS MOLECULARES DE CONTROL TRANSCRIPCIONAL
EN *Brevibacterium lactofermentum*

Memoria presentada en la Universidad de León por
JOSÉ ANTONIO OGUIZA TOMÉ,
Licenciado en Ciencias Biológicas,
para optar al grado de Doctor en Biología,

León, Diciembre de 1995

JUAN FRANCISCO MARTÍN MARTÍN, Catedrático de Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad de León y,

LUIS MARIANO MATEOS DELGADO, Profesor Titular de Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad de León

CERTIFICAN: Que el licenciado **José Antonio Oguiza Tomé** ha realizado en el Departamento de Ecología, Genética y Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad de León, bajo nuestra dirección, el trabajo "MECANISMOS MOLECULARES DE CONTROL TRANSCRIPCIONAL EN *Brevibacterium lactofermentum*", que presenta para optar al grado de Doctor en Biología.

Y para que así conste, se extiende el presente certificado en León a 15 de diciembre de 1995.

Juan Francisco Martín Martín
Catedrático de Microbiología

Luis Mariano Mateos Delgado
Profesor Titular de Microbiología

AGRADECIMIENTOS

Deseo hacer constar mi agradecimiento a las numerosas personas e instituciones que han contribuido a la realización de esta Tesis Doctoral.

Al Profesor Dr. Juan Francisco Martín por aceptarme en su laboratorio para realizar este trabajo de investigación, así como por su dirección y apoyo a lo largo de estos cinco últimos años. Al Dr. Luis Mariano Mateos, por la codirección de este trabajo y su constante interés.

Al Ministerio de Educación y Ciencia por la concesión de una Beca del P.F.P.I. para la realización de esta Tesis Doctoral.

En el Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire del C.N.R.S. en Strasbourg, al Dr. Jean Gangloff, que permitió mi estancia en el Laboratoire de Biochimie, y a Gilbert Eriani y Franck Martin, por su contribución en los estudios de la ArgRS.

En el Department of Medicine del Boston University Medical Center Hospital, al Dr. Jack Murphy, por su generosidad y entusiasmo, que junto con Xu Tao, fueron indispensables en los estudios del DtxR, así como a los restantes miembros de su laboratorio, que hicieron más llevadera mi estancia.

A todos los miembros del Area de Microbiología, pasados y presentes, su ayuda y amistad. En particular, a Marcos Malumbres por ser mi *maestro* y, Ana T. Marcos por descubrirme el mundo de los factores sigma. A Agustín Pisabarro por su ayuda en la clonación y secuenciación del *argS*.

A Vili el trabajo gráfico y el tratamiento de imágenes.

Y finalmente, a mi familia y a Cris por su paciencia y apoyo.

INDICE GENERAL

Abreviaturas	9
Abreviaturas para aminoácidos	10
1. INTRODUCCION	11
1. Características generales de las corinebacterias.....	11
2. Regulación de la expresión génica: control de la transcripción.....	13
3. Secuencias específicas localizadas en el DNA implicadas en el control transcripcional en corinebacterias.....	14
3.1. Secuencias promotoras.....	14
3.2. Secuencias de unión de activadores.....	14
3.3. Secuencias operadoras.....	14
3.4. Secuencias terminadoras y atenuadoras.....	15
4. Transcripción en procariotas.....	15
4.1. Composición de la RNA polimerasa.....	16
4.2. Iniciación de la transcripción.....	17
4.3. Elongación de la transcripción.....	19
4.4. Terminación de la transcripción.....	20
5. Factores sigma.....	21
5.1. Actividades bioquímicas de los factores sigma.....	21
5.2. Clasificación y estructura de los factores sigma.....	22
5.2.1. Familia Sigma-70.....	22
5.2.2. Estructura y función de las regiones de los factores Sigma-70.....	24
5.2.3. Familia Sigma-54 (Sigma-N).....	23
5.2.4. Estructura y función de las regiones de los factores Sigma-54 (Sigma-N).....	27
6. Regulación por hierro.....	29
6.1. Regulación modulada por hierro en organismos procariotas.....	29
6.2. Expresión del gen de la toxina de la difteria en <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	31
6.3. Características de la proteína DtxR de <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	32
6.3.1. La unión DtxR-operador <i>tox</i> es dependiente de iones metálicos divalentes.....	32

6.3.2. Dominios funcionales de la proteína DtxR.....	33
6.3.3. Secuencia consenso de unión de la proteína DtxR.....	35
6.3.4. Genes regulados por hierro en <i>C. diphtheriae</i>	36
6.4. Proteínas homólogas DtxR en otros microorganismos.....	36
7. Regulación de la terminación de la transcripción: aminoacil-tRNA sintetasas.....	37
7.1. Propiedades generales de las aminoacil-tRNA sintetasas.....	38
7.2. Características estructurales de las aminoacil-tRNA sintetasas: clasificación.....	39
7.3. Implicación de las aminoacil-tRNA sintetasas en otras funciones celulares ...	40
7.4. Regulación de la expresión de genes de aminoacil-tRNA sintetasas.....	41
8. Objetivos del presente trabajo.....	41
2. MATERIALES Y METODOS.....	43
1. Materiales.....	43
1.1. Microorganismos utilizados.....	43
1.2. Medios y condiciones de cultivo.....	43
1.3. Soluciones de uso general.....	45
1.4. Plásmidos utilizados.....	46
1.5. Reactivos químicos y bioquímicos.....	46
1.6. Análisis informático.....	47
2. Métodos relativos al estudio de ácidos nucleicos.....	47
2.1. Preparación del DNA.....	47
2.1.1. Preparación de DNA total de corinebacterias.....	47
2.1.2. Minipreparación de DNA plasmídico de <i>Escherichia coli</i>	48
2.1.3. Lisis alcalina.....	48
2.1.4. Preparación de DNA monocatenario (ssDNA).....	49
2.2. Digestión y modificaciones enzimáticas del DNA.....	50
2.2.1. Hidrólisis por endonucleasas de restricción.....	50
2.2.2. Modificaciones enzimáticas de los extremos del DNA.....	50
2.2.3. Ligación de fragmentos de DNA.....	51
2.3. Separación y purificación de fragmentos de DNA.....	51
2.3.1. Electroforesis en geles de agarosa.....	51
2.3.2. Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa.....	51
2.3.2.1. Electroelución sobre papel DEAE NA45.....	51
2.3.2.2. Método del butanol-CTAB.....	52
2.3.3. Geles para secuenciación de DNA.....	52
2.4. Técnicas de transformación de DNA en bacterias.....	53
2.4.1. Transformación de <i>Escherichia coli</i>	53
2.4.1.1. Preparación de células competentes con cloruro de calcio ...	53
2.4.1.2. Preparación de células competentes con cloruro de rubidio ..	54
2.4.1.3. Preparación de células competentes con solución TSS.....	54
2.4.2. Transformación de <i>Brevibacterium lactofermentum</i>	54
2.4.3. Transferencia por conjugación de plásmidos desde <i>E. coli</i> a corinebacterias.....	55
2.5. Análisis de fragmentos de DNA mediante hibridación.....	56
2.5.1. Transferencia del DNA en geles de agarosa.....	56
2.5.2. Transferencia <i>in situ</i> del DNA de colonias.....	57
2.5.3. Marcaje radioactivo de fragmentos de DNA.....	57

2.5.4. Hibridación.....	58
2.6. Técnicas de secuenciación del DNA.....	59
2.6.1. Generación de deleciones unidireccionales.....	59
2.6.2. Reacciones de secuencia.....	60
2.7. Métodos de estudio del RNA.....	60
2.7.1. Preparación de RNA total de <i>Brevibacterium lactofermentum</i>	61
2.7.2. Separación electroforética del RNA.....	61
2.7.3. Hibridación de <i>Northern</i>	62
3. Métodos relativos al estudio de proteínas.....	62
3.1. Determinación de la concentración de proteínas.....	62
3.2. Medida de actividades enzimáticas.....	63
3.2.1. Reacción de aminoacilación.....	63
3.2.2. Actividad α -galactosidasa.....	63
3.3. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes.....	64
3.4. Preparación de proteínas.....	65
3.4.1. Preparación de extractos crudos de <i>E. coli</i>	65
3.4.2. Preparación de extractos crudos de <i>B. lactofermentum</i>	66
3.4.3. Extracción rápida de proteínas mediante la lisis de bacterias con SDS.....	66
3.5. Expresión de la proteína arginil-tRNA sintetasa.....	66
3.6. Purificación de la proteína recombinante DtxR.....	67
3.7. Inmunodetección de la proteína DtxR.....	67
3.8. Análisis de la interacción DtxR-región <i>toxPO</i>	68
3.8.1. Retraso en geles.....	68
3.8.2. Protección de la digestión por DNasa I.....	68
3 RESULTADOS Y ANALISIS: Factores sigma en corinebacterias.....	71
1. Clonación de genes <i>rpoD</i> de <i>Brevibacterium lactofermentum</i>	71
2. Identificación del gen <i>sigA</i> de <i>B. lactofermentum</i>	77
3. Identificación de la región ORF1- <i>sigB</i> - <i>dtxR</i> - <i>galE</i> de <i>B. lactofermentum</i>	77
4. Dominios funcionales de los factores sigma <i>SigA</i> y <i>SigB</i> de <i>B. lactofermentum</i> ...	84
5. Organización en el cromosoma de los genes <i>sigA</i> y <i>sigB</i> de <i>B. lactofermentum</i> ...	85
6. Análisis transcripcional del gen <i>sigA</i> y de la región génica ORF1- <i>sigB</i> - <i>dtxR</i> - <i>galE</i> de <i>B. lactofermentum</i>	88
6.1. Análisis transcripcional de los genes <i>sigA</i> y <i>sigB</i>	88
6.2. Análisis transcripcional de los genes <i>dtxR</i> y <i>galE</i>	90
4. RESULTADOS Y ANALISIS: Regulación por hierro en <i>Brevibacterium lactofermentum</i>.....	93
1. Identificación del gen <i>dtxR</i> de <i>B. lactofermentum</i>	93
2. Inmunodetección de la proteína DtxR de <i>B. lactofermentum</i>	94
3. La proteína DtxR de <i>B. lactofermentum</i> es un elemento regulador activado por hierro.....	96
4. Interacción entre la proteína DtxR de <i>B. lactofermentum</i> y el promotor/operador <i>tox</i> de <i>C. diphtheriae</i> (<i>toxPO</i>).....	99
4.1. Reconocimiento del promotor/operador <i>tox</i> por la proteína DtxR de <i>B. lactofermentum</i> activada.....	99

4.2. Protección de la digestión por DNasa I de la secuencia palindrómica del promotor/operador <i>tox</i> por la proteína DtxR de <i>B. lactofermentum</i> activada..	99
---	----

5. RESULTADOS Y ANALISIS. Caracterización del operón <i>argS-lysA</i> de <i>Brevibacterium lactofermentum</i>: Mecanismo de antiterminación	103
1. Clonación del operón <i>argS-lysA</i> de <i>B. lactofermentum</i>	103
2. Identificación del gen <i>argS</i> de <i>B. lactofermentum</i>	106
3. Comparación de la arginil-tRNA sintetasa con otras aminoacil-tRNA sintetasa ..	109
4. Expresión del operón <i>argS-lysA</i> en <i>B. lactofermentum</i> y <i>E. coli</i>	110
5. Ensayos de disrupción génica del gen <i>argS</i> en el cromosoma de <i>B. lactofermentum</i>	112
6. Análisis transcripcional del operón <i>argS-lysA</i> y regulación por lisina y arginina de la vía biosintética de lisina.....	113
7. Mecanismo de regulación mediante antiterminación de la transcripción	114
6. DISCUSIÓN.....	119
1. Factores sigma en <i>Brevibacterium lactofermentum</i>	120
2. Regulación mediante el represor DtxR de <i>B. lactofermentum</i> en presencia de metales	120
3. Regulación mediante antiterminación en el operón <i>argS-lysA</i> de <i>B. lactofermentum</i>	121
4. Perspectivas futuras	122
7. CONCLUSIONES.....	123
8. BIBLIOGRAFIA.....	125

ABREVIATURAS

A	Adenina o Adenosina	mit	mitocondrial
aa	Aminoácido	Nal	Ácido nalidíxico
aaRS	Aminoacil-tRNA sintetasa	NBRF	National Biochemical Research Foundation
Aec	S-(2-aminoetil)-L-cisteína	NBT	Azul de nitrotetrazolio
AMP	Adenosina-5'-monofosfato	ONPG	2-nitrofenil- -D-galactopiranosido
Ap	Ampicilina	ORF	Marco de lectura abierto (<i>Open Reading Frame</i>)
ATCC	American Type Culture Collection	ori	Origen de replicación
ATP	Adenosina-5'-trifosfato	p	Plásmido
BCIP	5-bromo-1-cloro-3-indol-fosfato	PAGE	Gel de electroforesis de poli(acrilamida)
bp	Pares de bases	PEG	Polietilenglicol
BSA	Albúmina de suero bovino	PPi	Pirofosfato inorgánico
C	Citosina	ppGpp	Guanosina-5'-difosfato-3'-difosfato
CIA	Cloroforfo:alcohol isoamílico (24:1)	PIR	Protein Identification Resource
cpm	Cuentas por minuto	psi	Pulgadas por libra cuadrada (<i>pounds per square inch</i>) (1 atm = 1.47 psi)
CGSC	<i>E. coli</i> General Stock Center	p/v	Relación peso:volumen
Cm	Cloranfenicol	PVDF	Fluoruro de polivinilo
CTAB	bromuro de cetiltrimetilamonio	PVP	Polivinilpirrolidona
CTP	Citidina-trifosfato	r	Resistencia
DAP	Ácido diaminopimélico	RBS	Sitio de unión a ribosomas
ddNTP	Cualquiera de los cuatro dideoxynucleótidos trifosfato (ddATP, ddCTP, ddGTP y ddTTP)	RNasa	Ribonucleasa
	Delección	rpm	Revoluciones por minuto
DEPC	Dietilpirocarbonato	rRNA	RNA ribosomal
DMSO	Dimetilsulfóxido	Rif	Rifampicina
DNasa	Desoxirribonucleasa	s	Sensibilidad
dNTP	Cualquiera de los cuatro desoxynucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP)	SDS	Sodio dodecilsulfato
		ssDNA	DNA de cadena sencilla
DO	Densidad óptica	T	Timina o timidina
DTT	Ditiotreitol	TCA	Ácido tricloroacético
EDTA	Ácido etileno-diaminotetraacético	TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
EMBL	European Molecular Biology Laboratory	Tn	Trasposón
EtBr	Bromuro de etidio	TTP	Timidina trifosfato
ExoIII	Exonucleasa III	Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
g	Gravedad	tRNA	RNA de transferencia
G	Guanina o guanosina	TSS	Solución de transformación y almacenaje
GTP	Guanosina-trifosfato	u	Unidades de enzima
HTH	Hélice-Giro-Hélice (<i>Helix-Turn-Helix</i>)	U	Uracilo o uridina
Hyg	Higromicina	UDP	Uridina difosfato
IgG	Inmunoglobulina G	UTP	Uridina trifosfato
IPTG	1-isopropil- -D-1-tiogalactopiranosido	UV	Ultravioleta
kb	Kilobases (1000 bp)	v/v	Relación volumen:volumen
kDa	Kilodalton	X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- -D-galactopiranosido
Km	Kanamicina	[]	Indica que la cepa contiene el plásmido señalado
MCS	Sitio de clonación múltiple (<i>Multiple Cloning Site</i>)	()	Indica estado lisogénico
MeLys	Metil-lisina		
MOPS	Ácido morfolinopropanosulfónico		
Mr	Masa molecular relativa		
mRNA	RNA mensajero		

ABREVIATURAS PARA AMINOACIDOS

Ala	Alanina	A	
Arg	Arginina	R	
Asn	Asparagina	N	
Asp	Acido aspártico	D	
Cys	Cisteina		C
Gln	Glutamina	Q	
Glu	Acido glutámico	E	
Gly	Glicina	G	
His	Histidina	H	
Ile	Isoleucina	I	
Leu	Leucina	L	
Lys	Lisina	K	
Met	Metionina	M	
Phe	Fenilalanina	F	
Pro	Prolina	P	
Ser	Serina	S	
Thr	Treonina	T	
Trp	Triptófano	W	
Tyr	Tirosina	Y	
Val	Valina	V	

1. INTRODUCCION

1. Características generales de las corinebacterias

El género *Corynebacterium* fue creado por Lehmann y Neumann en 1896, para clasificar taxonómicamente a los bacilos de la difteria, incluyendo posteriormente unas pocas especies similares parásitas de animales. El género fue definido en base a características morfológicas, *corynebacteria* proviene del griego (*corunē*): bastón nudoso y, (*bacterion*): bastoncillo. En general, las corinebacterias son bacilos Gram-positivos, pleomorfos, no ramificados, no esporulantes y anaerobios obligados o facultativos. El pleomorfismo en su ciclo de vida se observa en formas bacilares de longitud diversa y frecuentes engrosamientos en los extremos (Figura 1.1), estando marcadamente influido por las condiciones de cultivo (Cure y Keddie, 1973).

En la última edición del manual de Bergey (Sneath *et al.*, 1986) se incluye a las corinebacterias en la *sección 15*, que engloba una diversa colección de 22 géneros. El carácter heterogéneo de los organismos incluidos en esta sección se observa en el contenido en G+C que varía entre 30 y 78%, de lo que se deduce la inclusión de las corinebacterias en esta sección se basó más en criterios eminentemente prácticos (Jones y Collins, 1986), que en fuertes relaciones filogenéticas entre las corinebacterias y los géneros restantes de la sección 15. En base a la composición molecular de su pared celular, las corinebacterias parecen estar más próximas filogenéticamente a *Mycobacterium* y *Nocardia* (Barksdale, 1970). A partir de estudios de rRNAs 16S de un gran número de microorganismos, se ha agrupado a las corinebacterias en la subdivisión de eubacterias Gram-positivas de alto contenido en G+C, en estrecha relación filogenética con *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Nocardia* e incluso *Streptomyces* (Woese, 1987).

Las corinebacterias, en general, se caracterizan por presentar una pared celular estructurada como un entramado de peptidoglicano con ácido *meso*-diaminopimélico (*meso*-DAP), polímeros de arabinogalactanos y cadenas de ácidos micólicos de 21-36 carbonos (Barksdale, 1970), predominando largas cadenas de ácidos grasos saturados y no saturados. La presencia de estos ácidos micólicos también es característica de los géneros *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus* (Schleifer y Stackebrandt, 1983).

Las corinebacterias están ampliamente distribuidas en la naturaleza, encontrándose en habitats diversos: suelo, agua, productos lácteos (normalmente queso), plantas y, en la mucosa y piel de hombres y animales. Incluye especies no patógenas y, patógenas de plantas y animales. Entre los patógenos animales, el mejor caracterizado es *C. diphtheriae* habitante normal del tracto respiratorio; la mayoría de sus cepas no son patógenas, pero adquieren la capacidad de producir la toxina de la difteria cuando son infectadas por un fago específico que les confiere toxigenicidad sobre la célula hospedadora. En función de los requerimientos de oxígeno para el crecimiento, se pueden dividir en dos grupos: bacterias aerobias o anaerobias facultativas y, bacterias anaerobias o aerotolerantes (Jones y Collins, 1986). Dentro del primer grupo se incluyen los géneros *Brevibacterium* y *Corynebacterium* ampliamente utilizados en la producción de aminoácidos.

Entre los usos industriales más frecuentes de las corinebacterias se pueden destacar la producción de queso, bioconversión de precursores de ácido L-ascórbico, conversión de esteroides y oxidación de terpenoides. Algunas corinebacterias producen antibióticos (corinecinas), sustancias relacionadas con bacteriocinas y compuestos antitumorales. Otras aplicaciones industriales incluyen la degradación de hidrocarburos, producción de agentes emulsificantes y nucleótidos (Martín, 1989).

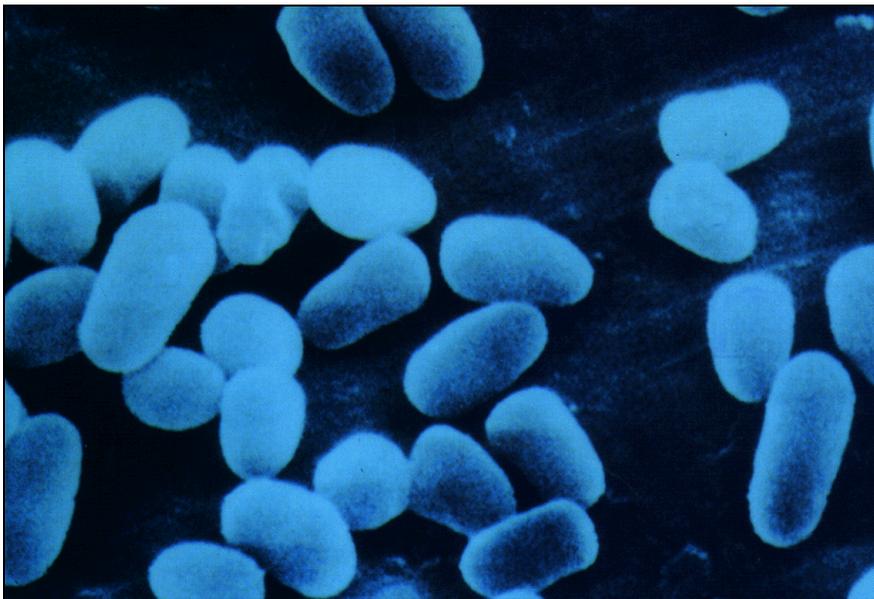


Figura 1.1. Micrografía obtenida mediante microscopía electrónica de barrido de una preparación de células de *Brevibacterium flavum*. Tomada de Vertés *et al.*, 1994.

Entre las bacterias corineformes de interés industrial existe un grupo que presenta la capacidad de excretar ácido glutámico en grandes cantidades, por lo que se ha denominado *bacterias del ácido glutámico*. Este grupo incluye especies de los géneros *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Arthrobacter* y *Microbacterium* (Abe *et al.*, 1967). Las *corinebacterias del ácido glutámico* presentan un rango de contenido en G+C en el DNA total muy estrecho (53-56%) y una alta similaridad morfofisiológica. En concreto, las especies *Brevibacterium lactofermentum* y *Corynebacterium glutamicum*, han atraído la atención de la industria y de los estudios básicos y aplicados, debido a su capacidad de producción de aminoácidos.

2. Regulación de la expresión génica: control de la transcripción

Todos los organismos controlan la expresión de la información genética contenida en su DNA. El DNA en cada célula de cada organismo contiene un gran número de genes, y a su vez los productos génicos pueden llevar a cabo un enorme número de funciones biológicas y bioquímicas. La utilización de este potencial debe estar coordinada y ser energéticamente eficiente para que cada organismo pueda sobrevivir a la presión selectiva de su habitat y reproducirse en número suficiente para evitar su extinción. La regulación génica tiene fundamentalmente dos objetivos primarios: *primero*, permitir la adaptación biológica favorable en respuesta a cambios en el medio ambiente, y *segundo*, coordinar efectivamente un programa irreversible de desarrollo que conduzca a la reproducción (Pribnow, 1979).

Tanto en organismos procariotas como eucariotas, la regulación de la expresión génica tiene lugar principalmente a nivel de la transcripción, proceso en el que la RNA polimerasa de una manera precisa transcribe unidades seleccionadas de información genética almacenadas en el DNA a RNA. Al ser este el primer proceso en la expresión génica, se trata del objetivo lógico para una regulación eficiente. La mayoría de los transcritos de RNA son mensajes genéticos que son traducidos por los ribosomas para producir proteínas; otros transcritos (rRNAs y tRNAs, principalmente) no son traducidos, pero son incorporados directamente dentro de la maquinaria celular. El control de la transcripción se ejerce a dos niveles:

a. *Mediante secuencias específicas de pares de bases localizadas en el DNA.* Secuencias de control particulares en el DNA indican a la RNA polimerasa el lugar y la frecuencia de inicio o pausa de la síntesis de RNA.

b. *Mediante productos génicos que interactúan con el DNA y con la RNA polimerasa.* Secuencias de control específicas en el DNA son reconocidas por estos productos génicos afectando la interacción entre la RNA polimerasa y las señales de inicio y terminación y, por tanto, regulan la transcripción. También determinadas proteínas reguladoras pueden alterar la RNA polimerasa directamente, modificando su respuesta ante las diferentes señales en el DNA.

Los avances en la biología molecular de corinebacterias, han permitido acumular una cantidad considerable de información genética referente a estos microorganismos. De todo ello ha sido posible obtener una visión preliminar de la expresión génica en corinebacterias, a partir de la información disponible sobre secuencias específicas de control de la transcripción localizadas en el DNA (promotores, terminadores y secuencias reguladoras). Una vez alcanzada esta situación era necesario el inicio de un estudio más avanzado de la expresión génica en corinebacterias, concretamente el análisis de diferentes mecanismos moleculares que mediante productos génicos interactúan con el DNA y con la RNA polimerasa controlando la transcripción.

3. Secuencias específicas localizadas en el DNA implicadas en el control transcripcional en corinebacterias

3.1. Secuencias promotoras

En los términos más simples, un promotor es aquella secuencia particular de DNA de doble cadena que es reconocida directamente por la RNA polimerasa como una señal de inicio para la transcripción (Epstein y Beckwith, 1968). Múltiples secuencias de inicio de la transcripción han sido caracterizadas en genes de corinebacterias, pudiéndose identificar fácilmente algunas de las características consenso para promotores procariontes (Hawley y McClure, 1983): secuencias de nucleótidos análogas a las regiones -35 y -10 de promotores de *E. coli* están usualmente presentes, pero no siempre. La mayoría de los promotores propuestos de corinebacterias tienen que ser considerados como hipotéticos, ya que únicamente en algunos casos se han realizado análisis del inicio de la transcripción mediante las técnicas de *primer extension* o *mapeo SI* (Martín, 1989).

A partir del análisis de los promotores de corinebacterias, se pueden considerar al menos dos clases de promotores (Martín, 1989):

a. Promotores de Tipo I (promotores CEP, Corinebacterias-E. coli Promotores), aquellos que son utilizados de manera eficiente en *E. coli* y corinebacterias y, presentan las regiones -35 y -10 consenso reconocidas por los factores sigma principales de *E. coli* y *B. subtilis*.

b. Promotores de Tipo II (promotores CSP, Corinebacterias eSpécíficos Promotores), que son reconocidos en corinebacterias pero no en *E. coli* y, no presentan las secuencias consenso -35 y -10.

3.2. Secuencias de unión de activadores

La activación de un promotor significa un incremento en la fuerza del promotor. Las secuencias específicas de unión de un activador en el promotor se encuentran adyacentes al DNA reconocido por la RNA polimerasa (Gilbert, 1976), de tal manera que los activadores colaboran con la RNA polimerasa y permiten un aumento de la actividad génica. Hasta la actualidad, no se han identificado secuencias específicas de unión de activadores en corinebacterias.

3.3. Secuencias operadoras

El operador es la secuencia de unión para una proteína represora específica. Cuando la proteína represora está unida al operador, impide a la RNA polimerasa el inicio de la síntesis de RNA al bloquear el reconocimiento del promotor por la RNA polimerasa (Nakanishi *et al.*, 1973). En muchos casos, la unión está mediada por una pequeña molécula efectora.

En *B. lactofermentum* y *C. glutamicum* se han observado típicas estructuras de horquilla formadas a partir de secuencias invertidas repetidas en la región promotora del gen *trp* (Guerrero *et al.*, 1994) y los genes *hom* (Mateos *et al.*, 1994) que corresponderían a operadores. El promotor del gen *trp*

de *B. lactofermentum* contiene una secuencia palindrómica de 14 bp que es reconocida por el represor *trp* (Guerrero *et al.*, 1994). En *C. diphtheriae* el gen *tox*, que codifica para la toxina de la difteria y está localizado en el corinebacteriófago, presenta una región operadora que se superpone sobre la región -10 del promotor (Kaczorek *et al.*, 1985). Esta región operadora *tox* de 27 bp está formada por una secuencia palindrómica de 9 bp, a la que se une en presencia de hierro el represor DtxR o proteína reguladora de la toxina de la difteria, bloqueando la transcripción.

3.4. Secuencias terminadoras y atenuadoras

El terminador es una secuencia de DNA que induce a la RNA polimerasa a detener la síntesis de RNA y a separarse del DNA (Chamberlin, 1974). En *E. coli* se han descrito dos tipos de terminadores, los de *Tipo I* o Rho independientes, que no requieren *in vitro* de un factor de terminación, y frecuentemente están compuestos de secuencias palindrómicas ricas en G-C seguidas de residuos de T y, los de *Tipo II* o Rho dependientes, que precisan de la proteína Rho tanto *in vitro* como *in vivo*. Además del factor Rho se han identificado otras proteínas que intervienen en terminación y antiterminación como NusA, NusB y NusE (Yager y von Hippel, 1987).

En un gran número de genes de corinebacterias se han identificado secuencias palindrómicas que pueden corresponder a terminadores de la transcripción: en el operón *trp* (Guerrero *et al.*, 1992), en el cluster *hom-trpB* (Mateos *et al.*, 1987), en el gen *lysA* (Yeh *et al.*, 1988) y en el gen *thrC* (Malumbres *et al.*, 1988). Los terminadores estudiados corresponden tanto a Rho dependientes como a Rho independientes.

Un atenuador es una estructura alternativa terminadora/antiterminadora que generalmente precede al primer gen estructural de un operón y, como consecuencia la expresión de este operón únicamente ocurre si el terminador se vuelve inactivo al formarse la estructura antiterminadora. La presencia de estas estructuras es frecuente en operones biosintéticos de aminoácidos de bacterias Gram-negativas, donde el RNA líder tiene en su extremo 3' un terminador transcripcional de *Tipo I* o *II*. La característica común a todos los atenuadores es que la transición de la estructura terminadora a la antiterminadora está controlada por algún acontecimiento externo.

La expresión del operón del triptófano está regulada por atenuación en corinebacterias (Guerrero *et al.*, 1992), al igual que ocurre en *E. coli* (Yanofsky *et al.*, 1987). En respuesta a la presencia o ausencia de triptófano, se observa la formación de dos estructuras secundarias alternativas en el mRNA, en la región correspondiente al atenuador del operón del triptófano. En presencia de triptófano ocurre la terminación y en su ausencia la antiterminación.

4. Transcripción en procariontas

La transcripción es el proceso central en el crecimiento y desarrollo celular en el cuál los genes, contenidos en el DNA de doble cadena del cromosoma, son selectivamente localizados, reconocidos y transcritos por la RNA polimerasa dependiente de DNA para producir moléculas de RNA. La

transcripción y su regulación han sido ampliamente estudiadas en muchas bacterias Gram-negativas, especialmente *E. coli*, pero prácticamente olvidada en bacterias Gram-positivas. La mayor excepción entre las bacterias Gram-positivas, la representa *B. subtilis*. Las enzimas que catalizan la transcripción en ambos microorganismos (*E. coli* y *B. subtilis*) son estructural y funcionalmente similares, al igual que los factores que intervienen en su regulación.

En los siguientes apartados, a partir de la información disponible de *E. coli* y *B. subtilis*, se presenta una visión global del proceso de transcripción, describiendo la enzima fundamental que cataliza la síntesis del RNA, la RNA polimerasa DNA-dependiente y, las fases secuenciales en las que se divide el proceso de transcripción: iniciación, elongación y terminación.

4.1. Composición de la RNA polimerasa

En estructura y probablemente en función, la RNA polimerasa de *E. coli* es representativa de las RNA polimerasas de procariotas. La RNA polimerasa de procariotas está compuesta de varias subunidades proteicas unidas no covalentemente, y su núcleo está formado por las subunidades mayoritarias α , β y β' en una estequiometría 2:1:1, respectivamente (Yura y Ishihama, 1979). En el caso de la RNA polimerasa de *E. coli*, la subunidad α tiene 150 kDa, la β 155 kDa y, cada subunidad β' 37 kDa. El núcleo (o *core*) de la RNA polimerasa ($E_{2\alpha\beta\beta'}$) es capaz de catalizar la polimerización de ribonucleótidos en un RNA complementario al DNA molde, pero inicia la transcripción de manera ineficiente al hacerlo en sitios al azar. La asociación de la subunidad sigma (σ) con el núcleo origina la formación de la holoenzima (E_{σ}), que es capaz de unirse e iniciar la transcripción de promotores específicos. Los núcleos de RNA polimerasa de bacterias Gram-positivas caracterizados hasta la actualidad parecen estar compuestos de subunidades de tamaño similar a las que forman el núcleo de la RNA polimerasa de *E. coli* (Tabla 1.1).

Además de los factores sigma, otras proteínas aparecen asociadas al núcleo de la RNA polimerasa, como ocurre en *E. coli* con la subunidad ω . Este factor no es esencial para reconstituir la actividad *in vitro*, y no existe un fenotipo asociado con la disrupción del gen estructural ω (Gentry y Burgess, 1986). Una proteína de tamaño similar aparece también asociada con la RNA polimerasa de *B. subtilis* (Tjian *et al.*, 1977), pero al igual que en *E. coli* su función también permanece desconocida. En *B. subtilis* también se ha identificado otra proteína, ν , asociada con la RNA polimerasa, que *in vitro* se une al núcleo y a una variedad de formas holoenzimáticas inhibiendo la transcripción de moldes no específicos (Tjian *et al.*, 1977). La disrupción del gen estructural ν no conlleva ningún fenotipo asociado, por lo que su función también permanece desconocida (Lampe *et al.*, 1988). El producto del gen *nusA* de *E. coli* se asocia con la RNA polimerasa después de la iniciación y se mantiene asociado durante la fase de elongación (Friedman *et al.*, 1984).

Debido a la función tan importante que desempeñan los factores σ de la RNA polimerasa en la regulación de la expresión génica, en concreto sobre la iniciación de la transcripción, estas proteínas se tratan con más detalle en un apartado posterior.

Tabla 1.1
Subunidades del núcleo de la RNA polimerasa en bacterias Gram-positivas

Microorganismo	Subunidad	Peso molecular (kDa)	Referencia
<i>Bacillus subtilis</i>		140	Doi <i>et al.</i> , 1981
		130	Doi <i>et al.</i> , 1981
		34.8	Boylan <i>et al.</i> , 1989
<i>Streptomyces coelicolor</i>		150	Buttner y Brown, 1985
		140	
		47	
<i>Clostridium perfringens</i>		145	Garnier y Cole, 1988
		135	
		44	
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	A	128	Pich y Bahl, 1991
	B	117	
	D	42	
<i>Lactobacillus curvatus</i>		151	Stetter y Zilling, 1974
		145	
		42.5	
<i>Mycobacterium smegmatis</i>		150	Levin y Hatfull, 1993
		150	
		45	

4.2. Iniciación de la transcripción

La iniciación de la transcripción es compleja e incluye múltiples procesos (Figura 1.2). La RNA polimerasa tiene que localizar un promotor, separar las cadenas de DNA para acomodar el apareamiento de los ribonucleótidos con la cadena de DNA a transcribir, unir el ribonucleótido inicial y subsiguientes y, catalizar la formación del primer enlace fosfodiéster y subsiguientes. La RNA polimerasa también se tiene que desplazar a lo largo del DNA, alejándose del promotor. En general, las etapas del inicio de la transcripción se pueden dividir en:

a. Reconocimiento del promotor por la RNA polimerasa. La interacción RNA polimerasa-promotor se produce mediante contactos específicos, probablemente puentes de hidrógeno, que permiten la discriminación de secuencias promotoras y la orientación de la RNA polimerasa en la dirección adecuada de transcripción a partir del promotor. Los contactos del núcleo de la RNA polimerasa con el promotor, que está en forma de doble cadena o complejo binario cerrado (*closed binary complex*) (Figura 1.2), aseguran que la RNA polimerasa se posicione adecuadamente sobre la región del promotor que debe separarse. La formación del complejo binario cerrado es un proceso reversible de equilibrio.

b. Separación de las cadenas del DNA (*melting*). La RNA polimerasa establece una serie de contactos fuertes inespecíficos, probablemente iónicos, con las dos cadenas del DNA en el complejo binario cerrado y se produce un corte en el DNA para separar las dos hebras del DNA. Este corte da origen a la burbuja de transcripción, que permite a la RNA polimerasa acceder a la cadena de DNA molde, formándose el complejo binario abierto (*open binary complex*) (Figura 1.2).

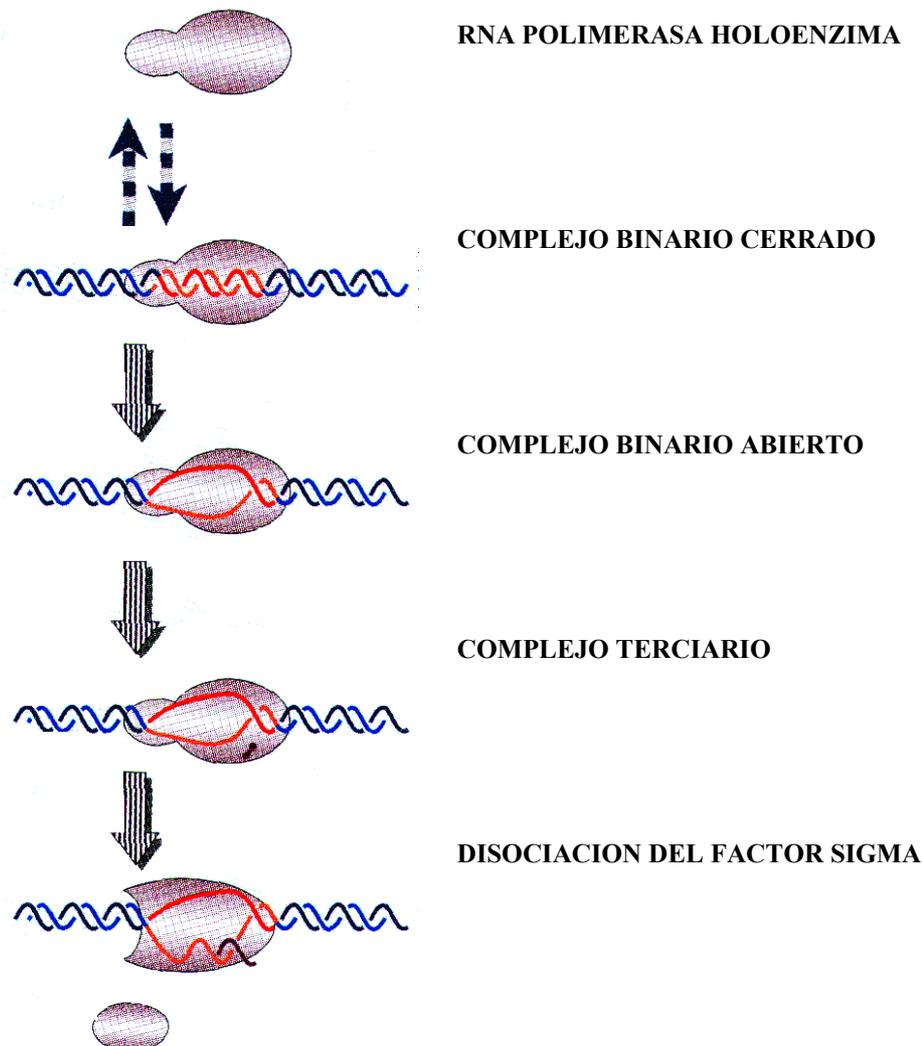


Figura 1.2. Etapas de la iniciación de la transcripción, previas a la elongación del RNA por la RNA polimerasa.

En el complejo abierto los contactos del núcleo de la RNA polimerasa y el factor σ se mantienen. Todo este entramado de interacciones estabiliza el centro catalítico del núcleo de la RNA polimerasa alrededor del sitio de iniciación, de tal manera que en el complejo binario abierto se establece un sitio activo completo. Del hecho de que las interacciones electrostáticas en el complejo binario abierto, directamente relacionadas con la fuerza del promotor, sean fuertes o débiles dependerá que la iniciación siga su curso y, no se produzca la disociación de la RNA polimerasa. En la transición del reconocimiento del promotor a la separación de las cadenas del DNA no se produce desplazamiento de la RNA polimerasa a lo largo del DNA.

c. *Iniciación de la síntesis del RNA*. Una vez que el complejo binario abierto está establecido, se inicia la síntesis del RNA con cinéticas muy rápidas. El núcleo de la RNA polimerasa acepta el primer y segundo ribonucleótidos trifosfato complementarios al DNA molde en el sitio de iniciación (+1) y, cataliza el primer enlace fosfodiéster. Este primer ribonucleótido trifosfato constituirá el extremo 5' de la cadena de RNA en crecimiento, en *E. coli* corresponde casi siempre a ATP o GTP. Este estadio de la transcripción también se conoce como complejo ternario (*ternary complex*) o también como estado abortivo de la iniciación (Figura 1.2), ya que, dependiendo del tipo de promotor, la RNA polimerasa puede abortar el proceso con una probabilidad del 50% o superior, bien disociándose del DNA o bien volviendo al complejo binario abierto. No se conoce la causa de tan alta tendencia inicial a abortar la transcripción, aunque esta inestabilidad del complejo ternario puede deberse a que la burbuja de transcripción o el híbrido DNA-RNA no han alcanzado todavía su longitud madura.

4.3. Elongación de la transcripción

Se trata de la etapa de la transcripción durante la cual la RNA polimerasa se desplaza a lo largo del DNA y extiende la cadena de RNA en crecimiento. Poco después de la iniciación, aproximadamente cuando el RNA alcanza una longitud de 8-9 nucleótidos de longitud, ocurren varios cambios profundos en el complejo ternario, que se manifiestan en una mayor estabilidad y en un gran incremento de la capacidad operativa del complejo transcripcional (Yager y von Hippel, 1987):

a. *Disociación del factor del núcleo enzimático* (Figura 1.2). Puede ser debida al arrastre del factor a secuencias de DNA con las que no interactúa favorablemente. Como resultado de lo anterior se pierden muchos de los contactos físicos específicos que la RNA polimerasa mantenía previamente con el promotor. La pérdida del factor puede favorecer la unión de la proteína NusA a la RNA polimerasa.

b. *Cambios significativos en la conformación, topología e interacciones de la RNA polimerasa*. El tamaño de la región del DNA protegida por la RNA polimerasa varía de los 75-80 bp durante la iniciación, a 30 bp durante la elongación. El tamaño del híbrido RNA-DNA aumenta hasta 12 bp y, el de la burbuja de transcripción alcanza su longitud madura 18 bp (en la iniciación era de 12 pb).

La burbuja de transcripción se desplaza al modificarse la estructura de la hélice de DNA, que se desenrolla exponiendo un nuevo segmento de DNA molde en forma de cadena sencilla para permitir el apareamiento con el RNA en crecimiento. Durante la elongación se repiten sucesivamente los siguientes pasos: unión del ribonucleótido-trifosfato al extremo 3' de la cadena de RNA en crecimiento, formación del enlace fosfodiéster con liberación de PPi y translocación de la RNA polimerasa a lo largo del DNA. En la región de DNA desenrollada se forma el híbrido DNA-RNA y, por detrás de esta región, el DNA molde se aparea de nuevo con su cadena complementaria para recuperar la doble hélice, mientras el RNA va surgiendo en forma de cadena sencilla.

La elongación no es un proceso uniforme en cuanto a su velocidad, ya que se han descrito sitios de pausa para la RNA polimerasa, que provocan una interrupción temporal o permanente. Estos

sitios de pausa dependen de la secuencia molde y suelen ser normalmente secuencias palindrómicas. El nucleótido regulador ppGpp es capaz de originar pausas durante la elongación de la región líder del operón *rrnB* de *E. coli*, reduciendo la velocidad de elongación a la mitad y, disminuyendo de este modo la expresión de los operones ribosomales (Kingston y Chamberlin, 1981). La proteína NusA también puede estar involucrada en pausas durante la elongación (Schmidt y Chamberlin, 1984). También se ha descrito que la velocidad de elongación *in vivo* se encuentra afectada por la inhibición de la DNA girasa en presencia de novobiocina, lo cuál alteraría el grado de superenrollamiento del DNA (von Hippel *et al.*, 1984).

4.4. Terminación de la transcripción

La terminación implica el reconocimiento de una secuencia terminadora a partir de la cuál no se deben incorporar más bases en el RNA. Para que termine la transcripción, la formación de enlaces fosfodiéster debe cesar y, el complejo transcripcional debe disociarse. Cuando se añade la última base a la cadena de RNA, la burbuja de transcripción se colapsa y se deshace el híbrido DNA-RNA, el DNA recupera su forma de doble hélice, separándose RNA polimerasa y RNA. Se han descrito dos tipos de terminación según como la RNA polimerasa abandone la etapa de elongación:

a. Terminación simple. Se trata del mecanismo de terminación que ocurre al atravesar un terminador de *Tipo I* o Rho independiente, tipo de secuencia de DNA que codifica en el RNA una secuencia palindrómica rica en G-C seguida de una serie de residuos de Us. Este proceso puede ocurrir *in vitro* en ausencia de factores proteicos distintos de la RNA polimerasa. El proceso de terminación simple se cree que ocurre en dos fases secuenciales. Primero, en la región que precede al extremo 3' la RNA polimerasa encuentra y transcribe una secuencia rica en G-C invertida repetida, que en el RNA transcrito corresponde a una estructura de horquilla. El proceso anterior ocurre dentro de la burbuja de transcripción y puede provocar que la RNA polimerasa se detenga (Farnham y Platt, 1980). La pausa de la RNA polimerasa también puede ocurrir por disminución del contenido de ribonucleótidos-trifosfato (Kassavetis y Chamberlin, 1981). La segunda fase de la terminación simple consiste en la separación del RNA, el cierre de la burbuja de transcripción y, la disociación de la RNA polimerasa del DNA, la mayoría de ello, originado por un cambio en la conformación de la RNA polimerasa. La separación del RNA probablemente se debe a una inestabilidad termodinámica del híbrido RNA-DNA.

b. Terminación compleja. Por exposición del complejo transcripcional, en situación de pausa, al factor de terminación Rho (Roberts, 1969) o, en casos especiales, a otros factores proteicos. La proteína Rho posee una actividad ribonucleótido-trifosfato fosfohidrolasa dependiente de RNA de cadena simple (Lowery-Goldhammer y Richardson, 1974). La acción de Rho implica la unión de esta proteína a la cadena de RNA. La liberación Rho dependiente del RNA de un complejo transcripcional puede ocurrir en una variedad de sitios naturales de pausa, indicando que el sitio exacto 3' de terminación de los transcritos Rho dependientes está determinado más por las secuencias de pausa para la RNA polimerasa, que por el reconocimiento directo de Rho. Por otra parte, también se ha observado la existencia de sitios de pausa fuerte para la RNA polimerasa donde Rho no produce terminación (Kassavetis y Chamberlin, 1981), lo cuál indica que Rho no actúa inespecíficamente en todos los sitios

de pausa. De lo anterior se puede concluir que la interacción de dos componentes independientes determina la especificidad y eficiencia del sitio de acción de la terminación Rho dependiente. La especificidad de unión de Rho al RNA en crecimiento, provoca hidrólisis de diribonucleótido-trifosfato y separación del complejo ternario, determinando la región de unión sobre la que actúa Rho; y, la localización y fuerza de la pausa de la RNA polimerasa determinan el extremo 3' del RNA transcrito (von Hippel *et al.*, 1984).

5. Factores sigma

La especificidad de transcripción en las eubacterias está determinada por los distintos holoenzimas formados por la RNA polimerasa, en los cuales los factores σ desempeñan un papel fundamental en esta maquinaria transcripcional al reconocer los sitios de iniciación o promotores. En procariontes, la presencia de múltiples factores σ con preferencias por diferentes tipos de promotores, permite la sustitución de un factor σ en un momento determinado del ciclo de vida. Esto constituye un importante mecanismo de regulación génica, ya que permite la reprogramación de la RNA polimerasa.

La existencia de múltiples factores σ en bacterias como reguladores génicos fue propuesta por Burgess *et al.* en 1969, al describir las propiedades del primer factor σ , el σ^{70} de *E. coli*. En 1980, esta hipótesis se confirmó con la descripción del primer factor σ alternativo en *B. subtilis*, σ^B , capaz de transcribir el promotor *spoVG* en ausencia del factor σ principal (Haldenwang y Losick, 1980). Múltiples factores σ de la RNA polimerasa han sido identificados y caracterizados en eubacterias, tanto Gram-negativas como Gram-positivas. *B. subtilis*, con 10 factores σ diferentes, es el microorganismo con mayor número de factores σ caracterizados (Handelwang, 1995).

La mayor parte de la transcripción celular requiere el factor σ predominante o principal (Harris *et al.*, 1978), que en *E. coli* corresponde al σ^{70} y en *B. subtilis* al σ^A . En muchas bacterias existen también factores σ alternativos que controlan la transcripción conjunta y regulada de conjuntos de genes a partir de secuencias promotoras que son bastante distintas a las reconocidas por el factor principal (Losick y Pero, 1981). La implicación de factores σ alternativos ha sido descrita en distintos procesos: en *B. subtilis* en el control de la esporulación (Losick y Pero, 1981; Losick *et al.*, 1986) y la regulación del fago SPO1 (Losick y Pero, 1981), en *E. coli* en la producción de proteínas de choque térmico (*heat-shock*) (Grossman *et al.*, 1984; Yura *et al.*, 1993) y en el desarrollo del fago T4 (Kassavetis y Geiduschek, 1984) y, en bacterias entéricas en la utilización de nitrógeno (Hunt y Magasanik, 1985).

5.1. Actividades bioquímicas de los factores sigma

Los factores σ desempeñan distintas funciones bioquímicas (Chamberlin, 1974):

a. Unión al núcleo de la RNA polimerasa. Los factores σ se unen al núcleo de la RNA polimerasa para constituir la holoenzima, estructura activa para la formación del complejo binario

cerrado. Como parece existir competición entre los factores σ , parece posible que los diferentes factores σ interaccionen con la misma región del núcleo de la RNA polimerasa y, por tanto, muchos factores sigma pueden tener una estructura proteica con dominios comunes que les permiten la unión al núcleo.

b. Activación del reconocimiento de promotores. Una vez formada la holoenzima, puede tener lugar el reconocimiento de promotores. Como muchos factores σ pueden interaccionar con un núcleo común de la RNA polimerasa para el reconocimiento de distintas secuencias promotoras (Doi y Wang, 1986), los factores σ necesitan tener contactos específicos directos con los promotores.

c. Separación del DNA de doble cadena en la burbuja de transcripción. Como la formación del complejo binario abierto sólo ocurre cuando la holoenzima está unida al promotor, la separación de las cadenas de DNA está mediada bien por el mismo factor σ o bien por un sitio controlado por el factor σ en una de las subunidades del núcleo de la RNA polimerasa

d. Inhibición de la transcripción no específica. El factor σ^{70} de *E. coli* reduce la afinidad de la RNA polimerasa de unión a regiones de DNA no promotoras aproximadamente por 10^4 . Esta actividad resulta importante para favorecer el reconocimiento de promotores, frente al DNA no específico.

5.2. Clasificación y estructura de los factores sigma

La identificación, caracterización y análisis de secuencias de múltiples factores σ de bacterias ha permitido agruparlos en dos familias principales, entre las cuales no existen similitudes de estructura o función. Una de estas familias es similar a la subunidad Sigma-70 de *E. coli* (Lonetto *et al.*, 1992), a la que pertenecen la gran mayoría de factores σ de bacterias Gram-positivas y negativas. La otra familia está compuesta por el factor Sigma-54 (o Sigma-N) de bacterias entéricas y los factores σ relacionados que se han encontrado en un gran número de procariotas (Merrick, 1993).

5.2.1. Familia Sigma-70

El alineamiento de secuencias dentro de la familia Sigma-70 ha permitido dividir este grupo de proteínas en tres grupos (Figura 1.3) (Lonetto *et al.*, 1992):

Grupo 1: factores σ principales. En condiciones celulares normales, los factores σ principales son los más abundantes y, se encargan de expresar los genes de mantenimiento del metabolismo, por lo que son responsables de la mayor parte de la síntesis de RNA durante el crecimiento exponencial. Los factores σ principales de distintos organismos son muy similares en su secuencia, presentando al menos un 51% de aminoácidos idénticos. Las regiones de estas proteínas implicadas en el reconocimiento de promotores están altamente conservadas, lo cual no es sorprendente, ya que todos los factores σ principales parecen reconocer secuencias promotoras relacionadas. De los tres segmentos de aminoácidos que presentan casi conservación completa entre factores sigma principales, dos de ellos corresponden a regiones de interacción con promotores: la "RpoD box" que reconoce la región -10 del promotor y, otros 20 aminoácidos conservados, en la región 4.2, que interaccionan con

la región -35 (Figura 1.4). La tercera región conservada corresponde a 14 aminoácidos que siguen inmediatamente a la "RpoD box". Estas tres secuencias conservadas permiten discriminar el *Grupo 1* del *Grupo 3* de factores Sigma-70. Cuando se comparan las relaciones de las secuencias proteicas del *Grupo 1*, se observa que los factores principales están agrupados en función de sus relaciones evolutivas (Figura 1.3).

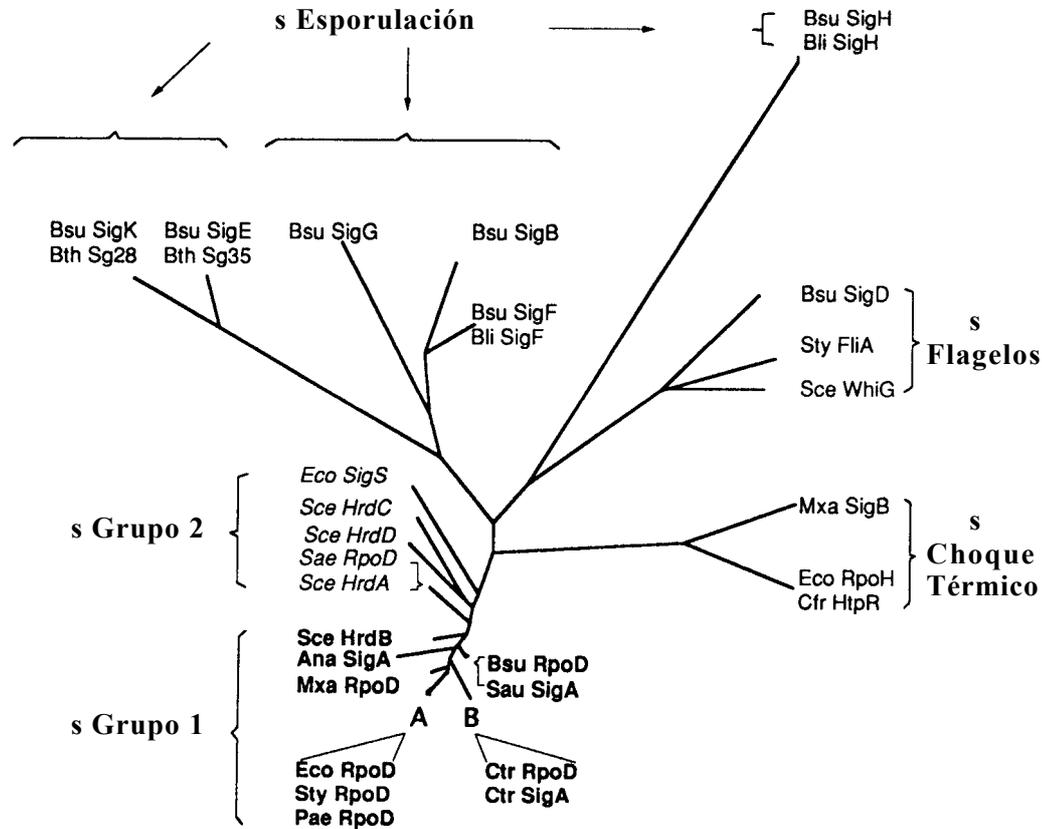


Figura 1.3. Árbol filogenético de factores Sigma-70 (Lonetto *et al.*, 1992). El tamaño de las líneas representa las distancias filogenéticas basadas en la comparación de las secuencias proteicas. Los *Grupos 1* y *2* están indicados por paréntesis. Las letras A y B corresponden a la localización de los factores sigma del *Grupo 1* altamente relacionados, que se presentan bajo estas letras. También se señala la posible función de cada subgrupo de factores sigma de *Grupo 3*.

Ana, *Anabaena*; Bsu, *Bacillus subtilis*; Bli, *Bacillus licheniformis*; Bth, *Bacillus thuringiensis*; Cfr, *Citrobacter freundii*; Ctr, *Chlamydia trachomatis*; Eco, *Escherichia coli*; Mxa, *Myxococcus xanthus*; Pae, *Pseudomonas aeruginosa*; Sae, *Streptomyces aureofaciens*; Sau, *Staphylococcus aureus*; Sce, *Streptomyces coelicolor*; Sty, *Salmonella typhimurium*.

El hecho de que la divergencia de las secuencias se pueda explicar por relaciones filogenéticas sugiere que las pequeñas diferencias observadas entre los factores principales están originadas por la deriva genética. En consistencia con esta idea, la mayoría de los cambios observados entre los factores sigma principales están limitados a regiones poco o no conservadas.

Grupo 2: factores no esenciales de *Streptomyces* y ^s de *E. coli*. Este grupo incluye tres factores de *S. coelicolor* (HrdA, HrdC y HrdD) y uno de *E. coli* (SigS ó KatF) (Figura 1.3). Estos factores no son esenciales para el crecimiento exponencial (Buttner *et al.*, 1990; Mulvey y Loewen, 1989) y, además son menos similares a los factores principales. Aunque, sus regiones de

reconocimiento de DNA son altamente similares a los factores sigma principales, lo que sugiere que pueden reconocer las mismas secuencias promotoras.

Grupo 3: otros factores alternativos. Los factores alternativos intervienen en la regulación de genes implicados en diversos procesos celulares concretos, como genes de choque térmico, genes flagelares y de esporulación, y genes de funciones extracitoplasmáticas. Estos factores alternativos son ligeramente divergentes de los factores principales, observándose entre ambos una identidad máxima de secuencia de aminoácidos del 27%. Curiosamente, la divergencia de secuencia entre los factores alternativos no se explica por su posición filogenética. Por otra parte, estos factores parecen estar agrupados en subgrupos funcionales que incluyen miembros de organismos diversos (Figura 1.3). Los miembros de un subgrupo son más similares que los factores principales y alternativos en el mismo organismo, lo que sugiere que los factores que regulan actividades similares tienen dominios comunes.

5.2.2. Estructura y función de las regiones de los factores Sigma-70

El alineamiento de proteínas de la familia Sigma-70 ha permitido identificar cuatro regiones de alta conservación (Figura 1.4). Las regiones 1 y 3 exhiben menos conservación y son ácidas, mientras que las regiones 2 y 4 son las más altamente conservadas y tienden a ser muy básicas, con un punto isoeléctrico calculado cercano a 10.

En la estructura secundaria consenso para la familia Sigma-70, obtenida a partir de la estructura secundaria deducida para cada factor por separado, las regiones 1 y 2 se espera que formen una lámina con hélices asociadas, mientras que las regiones 3 y 4 parecen ser casi totalmente helicoidales (Lonetto *et al.*, 1992). Estos dos grandes bloques de diferentes estructuras secundarias tienen poca probabilidad de interactuar ampliamente entre sí, lo que sugiere que los extremos N-terminal y C-terminal constituyen dominios separados.

Región 1. Está dividida en las subregiones 1.1 y 1.2 (Figura 1.4). La subregión 1.1, que presenta escasa conservación, parece estar restringida a factores principales y a σ^S de *E. coli*. Por otra parte en la subregión 1.2, salvo algunas excepciones, aparecen conservados varios residuos entre todos los factores principales y alternativos. La función de la región 1 es desconocida, pero la conservación de la subregión 1.2 a lo largo de la familia Sigma-70, implica una importancia estructural y funcional.

Región 2. La región 2 es la porción más conservada de todo el polipéptido y está compuesta de 4 subregiones: 2.1, 2.2, 2.3 y 2.4 (Figura 1.4). La delección de la subregión 2.1 reduce la unión del factor σ^{70} de *E. coli* al núcleo de la RNA polimerasa, lo que sugiere que esta porción participa en la unión al núcleo (Lesley y Burgess, 1989). Las zonas conservadas de esta subregión tienen alto contenido en aminoácidos hidrófobos y básicos. La subregión 2.2 es el segmento de secuencia más conservada entre todos los grupos de factores, sin embargo hasta el momento no se le ha asignado ninguna función. La subregión 2.3 está altamente conservada entre la mayoría de los factores, además in-

cluye nueve residuos invariables entre los diversos factores principales de eubacterias. Esta subregión, junto a la 2.1, puede participar en la separación del DNA de doble cadena durante la formación del complejo abierto (Juang y Helmann, 1994; Waldburger y Susskind, 1994), en base a la similitud de su secuencia con la de una gran familia de ribonucleoproteínas eucarióticas, especialmente por la presencia y localización de un gran número de residuos aromáticos (Helmann y Chamberlin, 1988) y, la proximidad a los aminoácidos de la subregión 2.4 que interactúan con la región promotora -10. La subregión 2.4 está implicada en el reconocimiento de la región -10 del promotor según se ha descrito en diversos estudios genéticos que identifican los aminoácidos que participan en los contactos en esta región del promotor (Zuber *et al.*, 1989; Siegele *et al.*, 1989, Daniels *et al.*, 1990; Waldburger *et al.*, 1990). Esta subregión 2.4 contiene residuos hidrofóbicos (Phe, Tyr, Trp) localizados cada cuatro aminoácidos seguidos por residuos básicos conservados. La estructura secundaria deducida para esta subregión sugiere que los determinantes de reconocimiento estarían localizados en una hélice, rodeada de cadenas- (Gribskov y Burgess, 1986). La subregión 2.4 está altamente conservada entre los factores principales, ya que todos ellos reconocen un hexámero -10 casi idéntico; por el contrario, está menos conservada entre los factores alternativos, que reconocen secuencias -10 diferentes.

Región 3. La región 3 se ha dividido en 2 subregiones que esencialmente se extienden desde el final de la subregión 2.4 hasta el inicio de la región 4 (Fig. 1.4). La subregión 3.1 es la más conservada y comparte una débil semejanza con dominios de unión a DNA hélice-giro-hélice (HTH, *Helix-Turn-Helix*), mientras que en la subregión 3.2 los aminoácidos conservados son principalmente ácidos.

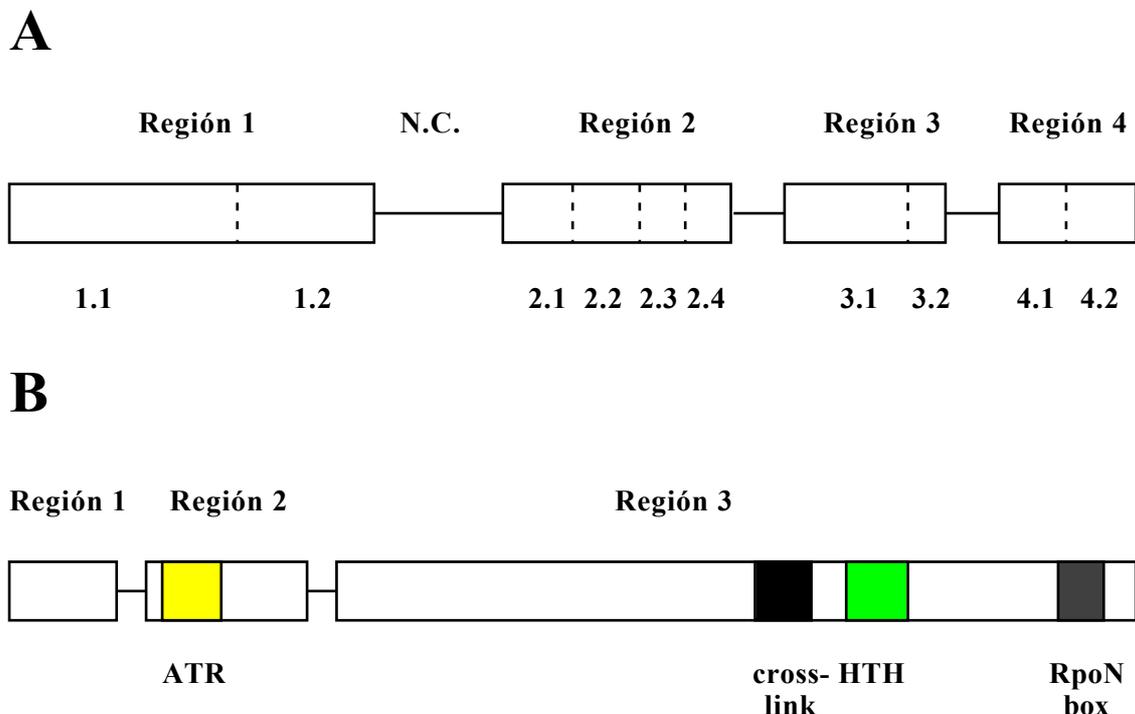


Figura 1.4. Estructura primaria de los miembros de la familia (a) Sigma-70 y (b) Sigma-54 (Sigma-N). Las correspondientes regiones y subregiones conservadas están indicadas. N.C., corresponde a secuencias de DNA no conservadas. ATR, dominio *acid trimer repeat*. HTH, dominio *helix-turn-helix*.

La subregión 3.2 está altamente conservada entre el grupo de factores principales, pero está débilmente conservada o ausente entre los factores alternativos, en algunos factores se especula con su implicación en la unión al núcleo.

Región 4. Participa en el reconocimiento de la región -35 de la secuencia promotora y, consiste en dos subregiones, 4.1 y 4.2, separadas por un corto espaciador variable en longitud y secuencia. La subregión 4.1 puede modelarse como una α -hélice anfipática. La subregión 4.2 tiene una secuencia similar a dominios de unión a DNA HTH y, está altamente conservada entre factores principales, pero no tanto entre los alternativos.

Una simple representación linear permitiría relacionar la disposición de los determinantes de unión a DNA en los factores de la familia Sigma-70 con las regiones consenso del promotor: la porción más distal del extremo C-terminal (región 4.2) alinea con la región -35, mientras que otra porción en el extremo N-terminal (región 2.4) está alineada con la región -10 del promotor.

5.2.3. Familia Sigma-54 (sigma-N)

Estudios del factor Sigma-54 (Sigma-N) han demostrado que esta familia de factores es bastante diferente estructural y funcionalmente de la familia Sigma-70 y, que el proceso de iniciación de la transcripción en el que interviene tiene mucho más en común con el de la polimerasa II de eucariotas, que con el que tiene lugar en la familia Sigma-70. El factor Sigma-N ha sido identificado en diversas bacterias Gram-positivas y negativas, y también dentro del grupo de las proteobacterias y firmibacterias (Merrick, 1993). El Sigma-N no es esencial para el crecimiento, pero está implicado en la expresión de una amplia variedad de genes implicados en muy diversas funciones: transporte de ácidos dicarboxílicos, catabolismo de tolueno y xileno, formación del pili, asimilación y fijación de nitrógeno y, biosíntesis de hidrogenasa. A pesar de la diversidad de funciones, un número de características unificadoras sugieren que la expresión de todos los genes dependientes de Sigma-N ocurre mediante un mecanismo común (Kustu *et al.*, 1989).

Entre los miembros de la familia Sigma-70, las secuencias consenso -35 y -10 no están altamente conservadas para casi ninguno de los promotores (Gross *et al.*, 1992); en cambio, los promotores Sigma-N, presentan una secuencia consenso definida localizada entre las posiciones -26 y -11 (± 1) (Morett y Buck, 1989). Otra diferencia entre Sigma-N y Sigma-70, es que Sigma-N es capaz de unirse específicamente al promotor en ausencia de la RNA polimerasa (Buck y Cannon, 1992). La holoenzima (E·Sigma-N) puede formar un complejo cerrado de transcripción con el promotor, pero es incapaz de separar las cadenas del DNA y formar el complejo abierto en ausencia de una proteína activadora (Popham, 1989). La proteína activadora se une aproximadamente 100 bp por delante del promotor, y cataliza la formación del complejo abierto al interaccionar con la RNA polimerasa mediante la curvatura del DNA que separa ambas proteínas.

5.2.4. Estructura y función de las regiones de los factores Sigma-54 (Sigma-N)

Ninguno de los miembros de la familia Sigma-54 muestra similitud con alguna de las regiones de la familia Sigma-70, y tampoco hay evidencias de relaciones evolutivas entre la familia Sigma-70 y Sigma-54 (Lonetto *et al.*, 1992). El análisis de las secuencias proteicas correspondientes a factores Sigma-N de distintos organismos, revela un alto grado de conservación y permite la identificación de tres regiones diferentes (Merrick, 1993, Cannon *et al.*, 1994) (Figura 1.4).

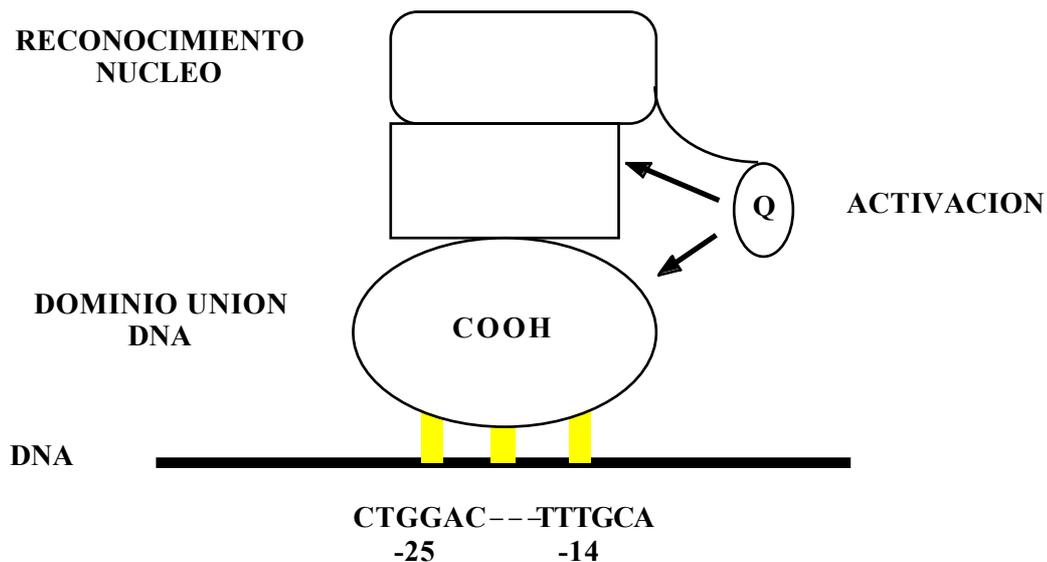


Figura 1.5. Modelo de la proteína Sigma-N basado en el análisis funcional de péptidos (Cannon *et al.*, 1995). La acción de Sigma-N está dirigida a través de la interacción con el promotor del dominio de unión a DNA localizado en la *Región I*.

El ensayo de las funciones de péptidos derivados de Sigma-N purificados ha permitido asignar diferentes actividades dentro del mapa peptídico lineal (Cannon *et al.*, 1995).

Región I. La región N-terminal comprende alrededor de 50 aminoácidos altamente conservados y, es rica en residuos de Leu y Gln. La predicción de la estructura secundaria para esta región sugiere que es una α -hélice. La susceptibilidad de activación requiere los aminoácidos 1 al 56 de la región I.

Región II. Situada en la porción central, se extiende usualmente entre los residuos 60 y 110. La conservación de aminoácidos es escasa, incluso ausente, pero presenta un exceso significativo de residuos ácidos: en bacterias entéricas, los primeros 33 aminoácidos de la región II contienen un dominio designado como *acid trimer repeat* (ATR) (Figura 1.4), en el que cada tercer aminoácido es de tipo ácido. Se especula con la posibilidad de que la curvatura formada por los residuos ácidos en la región II intervenga en los cambios conformacionales que conducen a la separación de las cadenas de DNA en el promotor (Sasse-Dwight y Gralla, 1990).

Región III. Corresponde a la porción C-terminal con una longitud de 400 aminoácidos y presenta alta conservación. Se pueden distinguir dos dominios notables: un dominio potencial de unión a DNA HTH y, un grupo de 10 aminoácidos totalmente conservados, que ha sido denominado "RpoN box", de función desconocida. Los determinantes de unión al núcleo de la RNA polimerasa residen entre los residuos 107 y 303. El reconocimiento del promotor requiere a su vez los residuos 329 a 477.

Aunque las funciones dentro del factor Sigma-N pueden estar físicamente separadas, también parece que son interdependientes dentro de la proteína intacta (Cannon *et al.*, 1995). La eliminación de la región I incrementa la actividad de unión a DNA de Sigma-N y, la eliminación de las regiones I y III la reduce. Aunque los determinantes de unión a DNA residen claramente en el extremo C-terminal de la proteína, estos no son completamente específicos en ausencia del resto de la proteína. De manera similar, la eliminación de las Regiones I y II disminuye la unión al núcleo de la RNA polimerasa. De todo lo anterior, se puede concluir que las interacciones intramoleculares entre los diferentes dominios son importantes para controlar la actividad de Sigma-N (Figura 1.5).

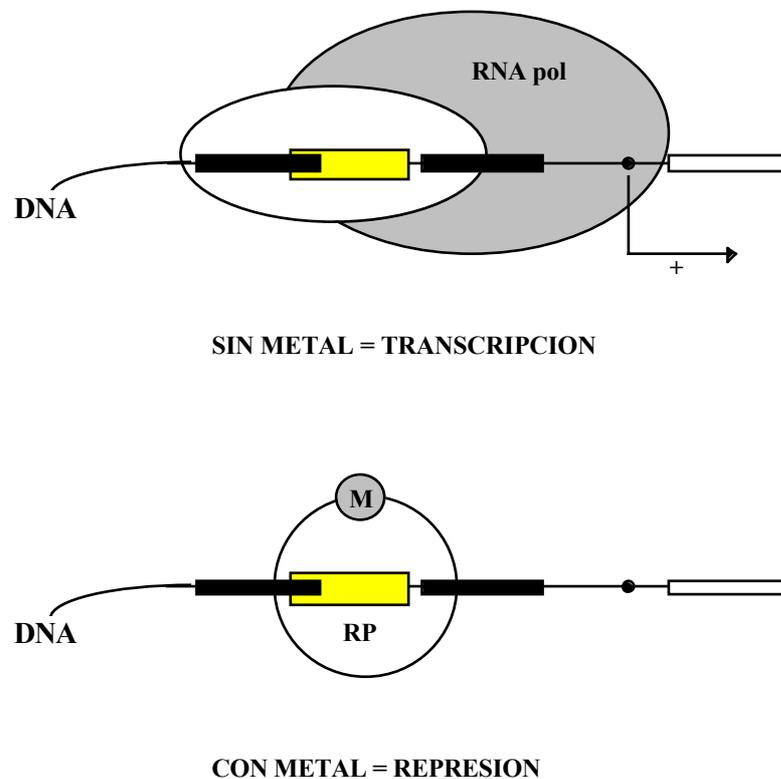


Figura 1.6. Mecanismo de regulación negativa de la transcripción mediante un complejo metal-represor. Los sitios de unión del represor están indicados mediante cuadros grises. Los cuadros negros corresponden a las regiones promotoras -35 y -10 y, el punto negro al sitio de inicio de la transcripción (+1, combinado con una flecha sólo cuando hay transcripción). El cuadro blanco representaría el gen u operón sometido a regulación. RNA pol, RNA polimerasa. RP, represor, M, ión metálico.

6. Regulación por hierro

En bacterias, la regulación de la transcripción dependiente de iones metálicos se puede ejercer mediante control positivo o negativo (Hennecke, 1990). En los casos de control negativo, la RNA polimerasa transcribe el gen regulado con máxima eficiencia en ausencia del metal correspondiente. Cuando el metal está presente, forma un complejo con el regulador transcripcional, que entonces asume la función de un represor capaz de unirse a secuencias específicas de reconocimiento en el DNA que solapan con las secuencias promotoras, impidiendo la transcripción del gen (Figura 1.6).

En corinebacterias, el mecanismo de control negativo de la transcripción dependiente de iones metálicos mejor conocido es el observado en *Corynebacterium diphtheriae*, donde la expresión de la toxina de la difteria está controlada por el represor DtxR y la presencia de hierro (Boyd *et al.*, 1990). En este estudio se describe la presencia en *B. lactofermentum* de una proteína homóloga DtxR y de un mecanismo de regulación por hierro similar al observado en *C. diphtheriae*. Esto viene a apoyar la hipótesis de que este mecanismo de regulación por hierro no está únicamente limitado sólo a corinebacterias patógenas, sino que también puede estar distribuido entre distintas bacterias Gram-positivas.

6.1. Regulación modulada por hierro en organismos procariotas

En la mayoría de los casos, la regulación modulada por hierro en procariotas está relacionada con el transporte y almacenamiento de hierro. Debido a la flexible combinación química y al favorable potencial redox, el hierro es utilizado como cofactor de múltiples enzimas metabólicas y proteínas de transporte. Con la excepción de algunos *Lactobacillus*, la mayoría de los organismos vivos requieren hierro como un elemento nutricional esencial para su crecimiento (Neilands, 1974; Archibald *et al.*, 1983).

El hierro es uno de los elementos más abundantes en la corteza terrestre, pero debido a su baja solubilidad no está generalmente disponible para los organismos vivos. En soluciones acuosas, el hierro está presente tanto en forma ferrosa (Fe^{2+}) como férrica (Fe^{3+}). En condiciones aeróbicas el hierro ferroso se oxida rápidamente a la forma férrica, que es menos soluble; y como consecuencia, las concentraciones biológicamente disponibles a pH neutro pueden ser tan bajas como 10^{-18} M. Esta concentración de hierro está bastante alejada de los requerimientos de los organismos vivos. Como consecuencia, las bacterias han desarrollado sistemas de transporte altamente eficaces para facilitar la captación de hierro del medio circundante. Aunque el hierro es un elemento esencial, en altas concentraciones puede ser perjudicial para la célula (Crichton y Charlotiaux-Wauters, 1987). Por lo tanto, la regulación de la captación de hierro tiene que estar estrechamente controlada. En la mayoría de los microorganismos, los genes implicados en la síntesis de compuestos implicados en la captación de hierro están también regulados por hierro.

En procariotas y eucariotas inferiores, moléculas de bajo peso molecular quelantes de hierro, los *sideróforos*, actúan en condiciones ambientales de limitación de hierro como agentes extracelulares solubilizadores de hierro a partir de minerales y compuestos orgánicos, transportándolo al interior del

citoplasma (Crosa, 1989). Hasta la actualidad se han identificado más de 200 sideróforos naturales diferentes (Neilands, 1981). Aunque los sideróforos tienen una diversidad estructural considerable, todos ellos forman complejos octahédricos coordinados con el hierro en forma férrica y, a su vez, todos ellos tienen una afinidad extremadamente alta por el hierro en forma férrica con constantes de estabilidad en el rango de 10^{23} - 10^{52} (Neilands, 1981). En contraste, las constantes de estabilidad para el hierro en forma ferrosa han resultado ser de relativa baja afinidad. De hecho, uno de los mecanismos por los que el hierro se disocia del complejo formado con el sideróforo es su reducción de forma férrica a ferrosa. Cuando la concentración de hierro en el ambiente es baja, los genes que codifican para la mayoría de los sideróforos y sus receptores son expresados *de novo*. El complejo hierro-sideróforo es captado por las células mediante receptores específicos de los sideróforos localizados en la membrana externa (Payne, 1988).

Principalmente, a partir de los estudios realizados en el mecanismo de captación de hierro en *E. coli*, se conoce que la síntesis de los sideróforos y sus receptores está regulada por hierro. *E. coli* es capaz de sintetizar sus propios sideróforos (enterobactina, aerobactina) y, también tiene receptores para sideróforos de otras especies (ferricromo y coprógeno que son sideróforos fúngicos), además el citrato también puede ser utilizado como portador de hierro. En cada caso, un receptor específico y varias proteínas citoplásmicas de membrana están implicadas en la captación de hierro (Bagg y Neilands, 1987). En *E. coli*, la regulación modulada por hierro de la expresión génica se realiza a nivel de la transcripción mediante una proteína represora Fur (*Ferric uptake regulator*) (Hantke, 1984), de peso molecular 17 kDa y rica en residuos de His (Schaffer *et al.*, 1985). En presencia de iones metálicos divalentes, el represor Fur se une específicamente a secuencias de DNA llamadas *cajas de hierro* localizadas cerca de promotores sensibles bloqueando la transcripción (de Lorenzo *et al.*, 1987).

Aunque la principal función de los sideróforos es la de asimilar hierro, la presencia de estos quelantes de hierro de alta afinidad a menudo también desempeña una importante función en los procesos de virulencia bacteriana. Para sobrevivir como parásito, los patógenos bacterianos tienen que responder a su ambiente y alternar de manera coordinada la expresión de grupos de genes que les permitan sobrevivir en diferentes condiciones. Como el hierro es un elemento esencial, tanto para la bacteria patógena como para el huésped animal, la competición por el hierro se convierte en un componente esencial del proceso de infección. El hierro libre disponible para la bacteria invasora está extremadamente limitado, ya que en el huésped se encuentra asociado a proteínas de unión de hierro (ferritina, hemoglobina, transferrina, lactoferrina). Por lo tanto en condiciones de baja concentración de hierro, muchos patógenos bacterianos expresan un grupo de genes para competir con el huésped por la adquisición de hierro. Entre estos productos bacterianos relacionados con la virulencia se encuentran factores de colonización, sideróforos, hemolisinas y toxinas. De hecho, la principal característica de plásmidos asociados a factores de virulencia es la presencia de sistemas de transporte de hierro (Williams, 1979). Se ha observado que plásmidos que codifican la síntesis de distintos sideróforos están correlacionados con la virulencia en *E. coli* (Smith y Huggins, 1976), *Klebsiella pneumoniae* (Nassif y Sansonetti, 1986) y *Vibrio anguillarum* (Crosa, 1989). También la expresión de varias toxinas bacterianas está negativamente regulada por los niveles de hierro en el ambiente, aunque no desempeñen ninguna función en los sistemas de captación de hierro.

6.2. Expresión del gen de la toxina de la difteria en *Corynebacterium diphtheriae*

Corynebacterium diphtheriae es el agente causante de la difteria, esta corinebacteria secreta una toxina proteica responsable de la mayoría de las lesiones presentes en esta enfermedad. La expresión del gen *tox*, que codifica para la toxina de la difteria, está sometida a una regulación modulada por hierro. Pappenheimer y Johnson en 1936, demostraron que la adicción de hierro en bajas concentraciones al medio de cultivo, provocaba la inhibición de la producción de la toxina en *C. diphtheriae*. Posteriormente, se observó que la toxina de la difteria sólo se expresaba a niveles máximos en estadios terminales de crecimiento en los que el hierro se convierte en el sustrato limitante y el contenido en hierro celular en las bacterias comienza a decrecer (Pappenheimer, 1955). El gen estructural *tox* contenido en el genoma del corinebacteriófago λ , se integra en el cromosoma de *C. diphtheriae* y su expresión es dependiente del estado fisiológico del huésped bacteriano (Uchida *et al.*, 1971). El modelo inicialmente propuesto para la regulación del gen *tox* propone la existencia de un elemento codificado en el genoma de *C. diphtheriae* y un elemento del corinebacteriófago λ , ambos implicados en la regulación de la expresión de la toxina (Murphy y Bacha, 1979). Este modelo postula que *C. diphtheriae* contiene un gen que codifica un aporepresor, que en presencia de hierro forma un complejo activo que se une específicamente al operador *tox* en el genoma del fago y bloquea su transcripción al desplazar o impedir la unión de la RNA polimerasa del promotor *tox* (Figura 1.6). Aunque todos los resultados obtenidos a partir de análisis bioquímicos y genéticos eran consistentes con este modelo, la confirmación rigurosa de esta hipótesis sólo podía realizarse mediante experimentos a nivel molecular.

El análisis de la secuencia de DNA en la región 5' del gen *tox* permitió, además de la identificación de secuencias promotoras consenso -35 y -10 (Leong y Murphy, 1985; Boyd y Murphy, 1988), la localización de una secuencia palindrómica interrumpida de 27 bp, que solapa con la región -10, que fue considerada como el operador *tox* (Figura 1.7). La consideración de esta secuencia palindrómica como el operador *tox* se debe a que muchos operadores de procariontes están localizados próximos a sus promotores y presentan estructuras palindrómicas similares (Kaczorek *et al.*, 1983; Greenfield *et al.*, 1983; Ratti *et al.*, 1983).

También se demostró la presencia en extractos crudos de *C. diphtheriae* de una proteína que podía unirse al promotor/operador *tox* (*toxPO*) y, protegerlo de la digestión con DNasa I (Fourel *et al.*, 1989). Como la protección era dependiente de la presencia de hierro en la mezcla de reacción, se sugirió que este factor podría ser el represor de la toxina de la difteria. Boyd *et al.* (1990) describieron la clonación y caracterización del gen que codifica para un elemento regulador dependiente de hierro: la proteína reguladora de la toxina de la difteria, DtxR (*Diphtheria toxin Regulatory protein*). En *E. coli*, se ha observado que en función de la presencia de hierro la proteína DtxR reprime la expresión de la β -galactosidasa a partir de una fusión transcripcional *toxPO/lacZ* (Boyd *et al.*, 1990).

6.3. Características de la proteína DtxR de *Corynebacterium diphtheriae*

El análisis de la secuencia del gen *dtxR* indicó que codifica una proteína de Mr 25.3 kDa (Boyd *et al.*, 1990). Aunque la función de la proteína DtxR parece ser similar a la Fur de *E. coli*, ya que ambas reprimen la transcripción en dependencia directa del hierro, tras la comparación de sus secuencias de aminoácidos sólo se observó un 25% de homología. La proteína DtxR tampoco presenta una homología significativa con ningún dominio de unión a metales. Por el contrario, la región C-terminal de la proteína Fur es suficiente para la unión de iones metálicos y, los residuos de Cys e His pueden estar implicados en la interacción directa o indirecta con metales (Coy y Neilands, 1991).

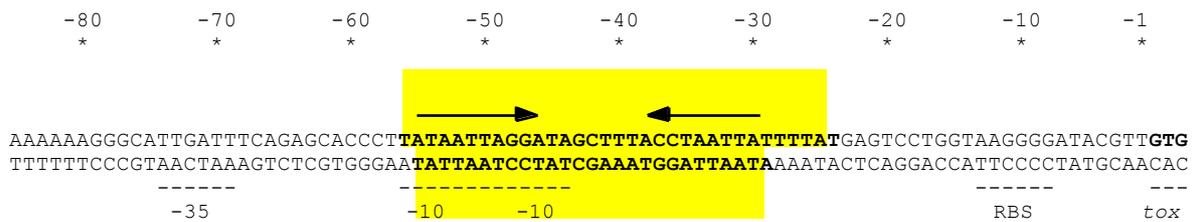


Figura 1.7. Secuencia nucleotídica de la región reguladora *tox*, en la que se han señalado las regiones -35 y -10 del promotor *tox*, así como la secuencia palindrómica interrumpida de 27 bp del operador *tox*. La zona sombreada corresponde a las regiones de la cadena codificante y no codificante protegidas de la digestión con DNasa I en presencia de la proteína DtxR activada con Fe^{2+} (Tao y Murphy, 1992). También se indican el sitio de unión a ribosomas (RBS) y el codón de inicio (GTG).

También se ha observado que la proteína DtxR es capaz de funcionar como un elemento regulador global y, aparte del operón *tox*, controla la expresión de varios genes de sideróforos de *C. diphtheriae*, de un modo análogo a la proteína Fur de *E. coli* (Schmitt y Holmes, 1991a).

Los alelos *dtxR* de las cepas de *C. diphtheriae* PW8(-), 1030(-) y C7hm723(-) también han sido clonados y secuenciados (Boyd *et al.*, 1992). El alelo *dtxR* de la cepa PW8(-) se encontró que era idéntico al de la cepa C7(-). En contraste, la cepa 1030(-) presentaba seis sustituciones de aminoácidos en la región C-terminal de la proteína DtxR; pero estas sustituciones parecen ser silentes y no afectan a la actividad reguladora dependiente de hierro de DtxR (1030). En cambio, el alelo *dtxR* de la cepa mutante C7hm723(-) lleva una transición en la región N-terminal de G a A, que resulta en la sustitución de la Arg-47 a His (Schmitt y Holmes, 1991b; Boyd *et al.*, 1992). Esta mutación casi elimina la actividad reguladora de la proteína DtxR y, en base al análisis de otros mutantes DtxR y a la identificación del dominio de unión a DNA HTH, parece que la Arg-47 está implicada en la interacción entre el elemento regulador y el operador *tox* (Tao *et al.*, 1994a).

6.3.1. La unión DtxR-operador *tox* es dependiente de iones metálicos divalentes

La clonación del gen *dtxR* apoyó la hipótesis de la regulación del gen *tox* del corinebacteriófago mediante un represor de unión a hierro. Pero se necesitaban evidencias directas de que la proteína DtxR era una proteína de unión a hierro y de que el complejo DtxR-hierro era capaz de

unirse selectivamente al operador *tox*. La interacción entre la proteína DtxR activada por iones metálicos y el operador *tox* se analizó mediante retraso en geles (*gel mobility shift*), observándose que la proteína pura DtxR requería la presencia de iones metálicos divalentes para su unión específica a una sonda del operador *tox* marcada con [³²P] (Tao *et al.*, 1992a).

La protección del operador *tox* de la digestión con DNasa I por parte de la proteína DtxR activada por un ión metálico divalente también ha sido analizada, observándose que el tamaño de la región protegida del operador *tox* es función del ión metálico divalente añadido a la mezcla de reacción (Tao y Murphy, 1992). En presencia tanto de Co²⁺, Fe²⁺ o Mn²⁺, la proteína DtxR protege regiones de 33 nucleótidos en la cadena codificante y 27 nucleótidos en la cadena no codificante (Figura 1.7). En estas condiciones, la protección en la cadena no codificante coincide directamente con la secuencia palindrómica interrumpida de 27 bp. La activación por Ni²⁺ provoca una protección de la digestión con DNasa I ligeramente menor, 31 nucleótidos en la cadena codificante y 26 nucleótidos en la cadena no codificante. El Cd²⁺ también es capaz de activar la proteína DtxR, y por otra parte, la adicción de Zn²⁺ sólo es capaz de activarla parcialmente, mientras que el Cu²⁺ es incapaz de activar este elemento regulador *in vitro* (Tao y Murphy, 1992b; Schmitt y Holmes, 1993).

6.3.2. Dominios funcionales de la proteína DtxR

El análisis de la secuencia de la proteína DtxR reveló la presencia de un único residuo de Cys en la posición 102 (Boyd *et al.*, 1990). La proteína DtxR pura forma dímeros mediante puentes disulfuro en condiciones oxidantes, y la Cys-102 parece estar expuesta en la superficie de esta proteína reguladora. Además, la proteína DtxR en forma dimérica es incapaz de unirse al operador *tox* ni siquiera en presencia de elevadas concentraciones de iones metálicos divalentes (Schmitt *et al.*, 1992), requiriéndose una activación por iones metálicos divalentes previa a la formación del dímero. Para determinar si la Cys-102 estaba posicionada en el sitio de activación por unión a metales, Tao y Murphy (1993) utilizaron mutagénesis dirigida sobre el codon-102. Aislando y caracterizando alelos mutantes *dtxR* portando cada uno de los 20 aminoácidos en esa posición. De todos los alelos estudiados, se observó que únicamente eran capaces de codificar un elemento regulador dependiente de la activación por iones metálicos el alelo con el codon original para Cys (TGC) y dos alelos mutantes, uno con un codon alternativo para Cys (TGT) y el otro con un codon para Asp (GAC).

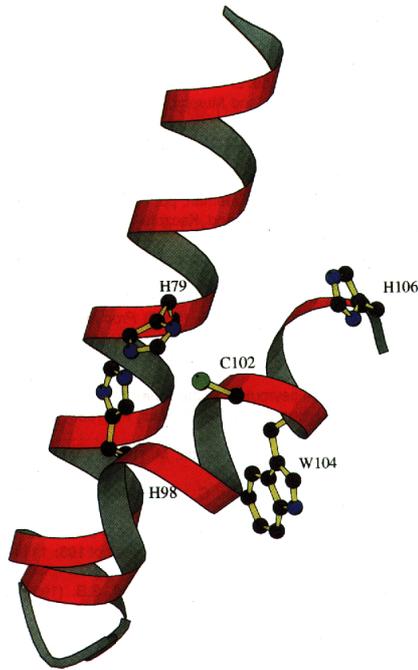


Figura 1.8. Representación parcial de la proteína DtxR de *Corynebacterium diphtheriae* (aminoácidos 70 a 107) a partir de la estructura deducida mediante cristalografía de rayos-X. El sitio posible de unión a metales iónicos estaría compuesto por los aminoácidos His-79, His-98, Cys-102 y His-106.

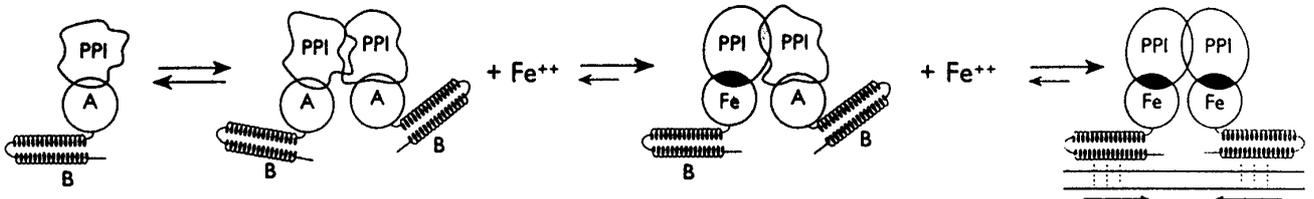


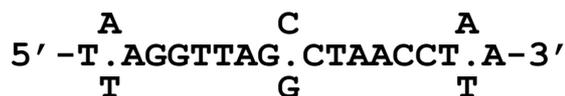
Figura 1.9. Modelo del proceso de activación de la proteína DtxR por hierro (Fe^{2+}). Los distintos dominios de la proteína DtxR en forma monomérica están indicados: B, dominio de unión a DNA; A, dominio de activación por Fe^{2+} ; PPI, dominio de interacción proteína-proteína.

La observación de que sólo el Asp podía sustituir a la Cys en la posición 102, manteniendo las propiedades de la proteína DtxR, aportó un argumento sólido a la hipótesis de que el residuo de Cys-102 desempeña una importante función en la actividad reguladora ejercida por la proteína DtxR. Los aminoácidos Cys y Asp tienen diferentes propiedades físicas, pero se ha observado que ambos sirven como residuos de unión a metales en muchas metaloproteínas (Creighton, 1993). En la misma región de la Cys-102 se han descrito una serie de mutaciones que inactivan la proteína DtxR, en particular en las posiciones Glu-100, Trp-104 e His-106, conduciendo a un marcado descenso en la función represora, lo que es consistente con el posicionamiento del dominio de activación mediante unión a iones metálicos divalentes en esta región del elemento regulador. La cristalización de la proteína DtxR ha permitido identificar tres dominios funcionales (Figura 1.9): un dominio de unión a DNA HTH (B), un dominio de activación mediante unión a iones metálicos (A) y un dominio de interacción proteína-proteína (PPI) (Schiering *et al.*, 1995). El dominio HTH, característico de proteínas de unión a DNA, estaría localizado entre los aminoácidos 27 y 50 en el extremo N-terminal. El dominio de unión a iones metálicos localizado en los 120 aminoácidos del extremo N-terminal parece estar compuesto por dos α -hélices en las cuales los aminoácidos His-79, His-98, His-106 y Cys-102, formarían una estructura tetrahédrica coordinada para la unión del ión metálico (Figura 1.8). También se ha observado que cada molécula de DtxR tiene un sitio único de unión a iones metálicos (Wang *et al.*, 1994). La unión del ión metálico por el elemento regulador es cooperativa, en solución y en ausencia de iones metálicos pesados, la proteína DtxR existe como un dímero débilmente asociado y la unión del primer ión metálico induce un cambio conformacional que facilita la unión al complejo del segundo ión metálico, provocando la subsecuente estabilización del complejo dimérico al incrementarse las interacciones proteína-proteína entre los monómeros y, la consiguiente activación de la función represora (Tao *et al.*, 1995) (Figura 1.9).

6.3.3. Secuencia consenso de unión de la proteína DtxR

La utilización de la técnica de CASTing (*Cyclic Amplification and Selection of Targets*) (Wright *et al.*, 1991), técnica muy poderosa para la generación y selección *in vitro* de secuencias de unión, ha permitido seleccionar *in vitro* a partir de un universo de $6.9 \cdot 10^9$ potenciales sitios de unión de la proteína DtxR sintetizados al azar una familia de DNAs de doble cadena que presentan una afinidad de unión a la proteína DtxR equivalente a la del operador *tox* (Tao y Murphy, 1994). De esta manera, ha sido posible la identificación de la secuencia mínima de nucleótidos esencial para la unión de la proteína DtxR y la determinación de la secuencia consenso de unión de la proteína DtxR (Tao y Murphy, 1994).

El análisis de la secuencia de los DNAs de doble cadena seleccionados por afinidad *in vitro* revela que la secuencia consenso de unión de la proteína DtxR es, de hecho, menor que el operador *tox* nativo de 27 bp. La secuencia mínima requerida para la unión de la proteína DtxR es de 19 bp y, se trata de una secuencia palindrómica perfecta alrededor de una C o G central. La secuencia consenso de unión de la proteína DtxR, tal como ha sido determinada mediante selección por afinidad *in vitro* (Tao y Murphy, 1994), es la siguiente:



También se ha demostrado que los sitios de unión seleccionados por su afinidad de unión *in vitro* a la proteína DtxR son operadores funcionales *in vivo* (Tao y Murphy, 1994).

6.3.4. Genes regulados por hierro en *C. diphtheriae*

La proteína DtxR, al igual que la Fur de *E. coli*, funciona como un elemento regulador global activado por iones metálicos en la regulación de una variedad de genes del cromosoma de *C. diphtheriae* (Tai *et al.*, 1990; Schmitt y Holmes, 1994). Aparte del operador *tox* se han clonado y caracterizado en *C. diphtheriae* dos promotores regulados por la proteína DtxR, IRP1 e IRP2, que presentan una secuencia consenso de unión de DtxR de 19 bp (Schmitt y Holmes, 1994), idéntica a la determinada por métodos genéticos *in vitro*. La secuencia IRP1 aparece localizada en la región promotora de un gen que codificaría para una lipoproteína, que podría servir como receptor de membrana para el complejo hierro-sideróforo (Schmitt y Holmes, 1994).

Mediante análisis de los perfiles de proteínas obtenidos en electroforesis en geles desnaturizantes de proteínas se ha determinado la respuesta de *C. diphtheriae* a condiciones de alta y baja concentración de hierro (Tai y Zhu, 1995). En condiciones de limitación de hierro en el medio de crecimiento se han observado incremento en los niveles de al menos 14 proteínas diferentes en *C. diphtheriae*. A su vez esto ha permitido la identificación del gen *dirA*, que codifica una proteína inducible por limitación de hierro. La proteína DirA presenta homologías con una familia de proteínas antioxidantes y podría corresponder a una actividad alquil-hidroperóxido reductasa (Tai y Zhu, 1995), enzima desintoxicante que interviene en la eliminación y reparación del daño causado en ácidos nucleicos, proteínas y lípidos por intermediarios reactivos del oxígeno (Farr y Kogoma, 1991). El hierro participa en la síntesis de estos intermediarios, por lo que el acoplamiento de la síntesis de alquil-hidroperóxido reductasa con la adquisición de hierro mediada por sideróforos, podría ser beneficioso para el crecimiento de *C. diphtheriae* en condiciones limitantes de hierro.

6.4. Proteínas homólogas DtxR en otros microorganismos

En las bacterias Gram-positivas, *Streptomyces pilosus* y *Streptomyces lividans*, se ha descrito en la zona promotora del gen *desA*, una región esencial para la regulación por hierro de este promotor y que probablemente es reconocida por un factor regulador de control negativo (Gunter *et al.*, 1993). Esta posible región promotora-operadora del gen *desA* también se trata de una secuencia palindrómica y es homóloga al operador *tox* de *C. diphtheriae* (Figura 1.10). El gen *desA* codifica para la enzima lisina decarboxilasa, que cataliza la primera reacción de la síntesis del principal sideróforo de *Streptomyces*, la desferroxiamina B, y su expresión está inducida en condiciones limitantes de hierro (Schupp *et al.*, 1987; Schupp *et al.*, 1988). Aunque en estos estudios realizados en *Streptomyces* no se

ha identificado un elemento de control negativo para el gen *desA*, la remarcable similitud entre las secuencias reguladoras de este gen con la secuencia consenso de unión de la proteína DtxR sugiere la existencia en *Streptomyces* de una proteína reguladora similar a la DtxR de *C. diphtheriae* (Tao *et al.*, 1994).

En múltiples especies de microorganismos Gram-negativos se han encontrado proteínas Fur y similares, como es el caso de *E. coli* (Schaffer *et al.*, 1985), *Vibrio cholerae* (Litwin *et al.*, 1992), *Yersinia pestis* (Staggs y Perry, 1991), *Pseudomonas aeruginosa* (Prince *et al.*, 1993), *Neisseria gonorrhoeae* (Berish *et al.*, 1993) y *Campylobacter jejuni* (Wooldridge *et al.*, 1994), observándose que las secuencias de aminoácidos de esta familia Fur de proteínas reguladoras y las secuencias de nucleótidos de los respectivos sitios de unión son homólogas. De acuerdo con esto, una hipótesis posible es que la proteína DtxR sea un miembro de una familia de proteínas reguladoras activadas por metales de transición en bacterias Gram-positivas, que intervienen en la regulación de genes mediada por hierro.



Figura 1.10. Alineamiento de las secuencias de DNA de unión de la proteína DtxR del operador *tox* (Boyd *et al.*, 1990) y de los plásmidos IRP1 y IRP2 (Schmitt y Holmes, 1994) de *C. diphtheriae*, y del posible sitio de unión de la proteína DtxR en la región promotora -10 del gen *desA* de *S. pilosus* (Günter *et al.*, 1993). Las secuencias palindrómicas están indicadas por flechas. Los nucleótidos estrictamente conservados están sombreados. También se presenta la secuencia consenso de unión de la proteína DtxR determinada mediante selección *in vitro* (Tao y Murphy, 1994)

7. Regulación de la terminación de la transcripción: aminoacil-tRNA sintetasas

Además de los procesos implicados en el inicio de la transcripción, los procesos de terminación/antiterminación también desempeñan un papel central en la regulación de la expresión génica. La existencia de un mecanismo de regulación mediante antiterminación de la transcripción parece estar ampliamente distribuido entre genes de aminoacil-tRNA sintetasas y/o genes biosintéticos de aminoácidos en diversos grupos de bacterias Gram-positivas (Henkin, 1994). Estudios realizados sobre el operón *argS-lysA* de *B. lactofermentum*, han apuntado la posible regulación de la transcripción de este operón mediante un mecanismo de antiterminación.

7.1. Propiedades generales de las aminoacil-tRNA sintetasas

Las aminoacil-tRNA sintetasas (aaRS) están presentes en todos los seres vivos, y constituyen una clase de enzimas que desempeñan un papel primordial en el proceso de traducción del mensaje genético, ya que catalizan la unión selectiva de cada uno de los veinte aminoácidos naturales a su(s) tRNA(s) específico(s), asegurando de esta manera la correspondencia entre un codon y un aminoácido.

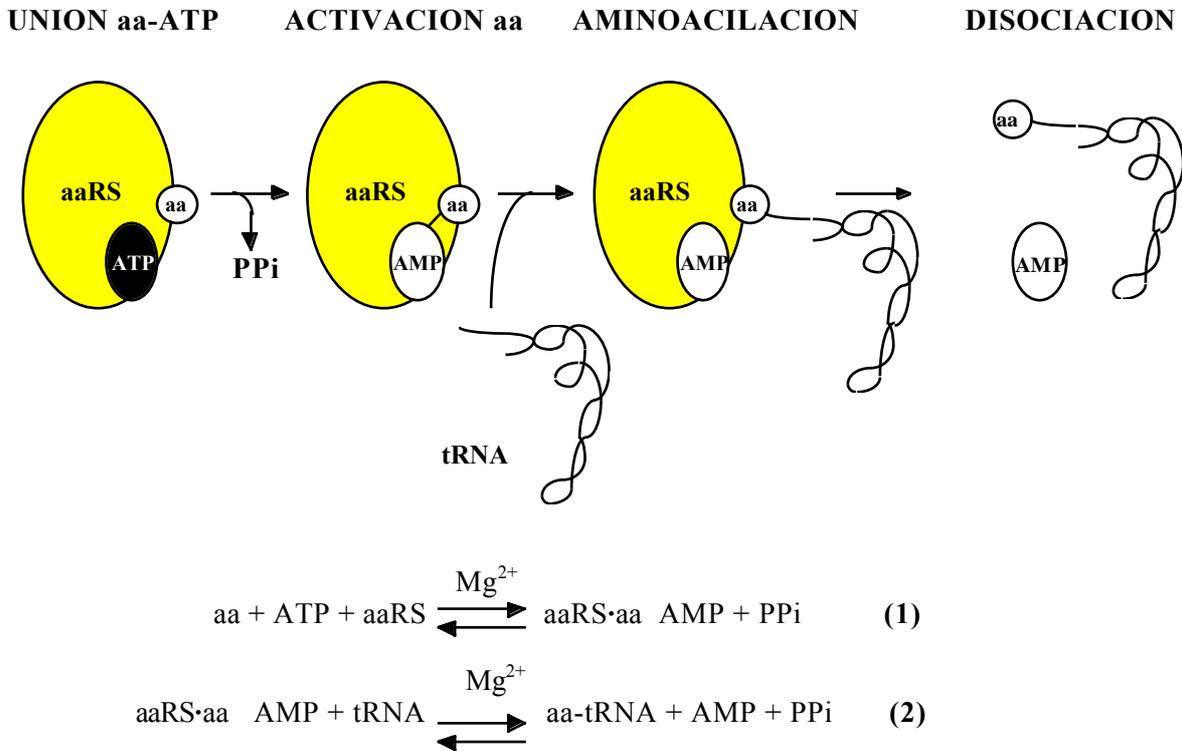


Figura 1.11. Representación esquemática del proceso de aminoacilación o síntesis de un aminoacil-tRNA. Las dos etapas principales de este proceso también se indican en forma de reacciones.

La síntesis de un aminoacil-tRNA (aa-tRNA) supone un complejo proceso catalítico que comprende en general dos etapas principales (Figura 1.11):

1. Activación del aminoácido mediante formación de aminoacil-adenilato (aaRS·aa~AMP) en presencia de ATP con liberación de PPi.
2. Transferencia del aminoácido activado sobre el grupo 2' o 3'-hidroxilo de la ribosa del último nucleótido del tRNA correspondiente.

El resultado global de la reacción es la formación de una unión éster y la hidrólisis de una molécula de ATP en AMP y PPi. Experimentalmente, la velocidad de la primera reacción se puede determinar por la medida del intercambio $\text{ATP}-[^{32}\text{P}]\text{PPi}$, y la segunda reacción por la medida de la formación de $[^{14}\text{C}]\text{aminoacil-tRNA}$. Los valores de K_m de diferentes aaRSs para el aminoácido varían considerablemente, situándose para la mayoría en el intervalo 5-150 μM ; para el ATP los valores de

Km se sitúan entre 30 y 400 μM , y estos valores son inferiores generalmente en lo que respecta al tRNA, 0.001-1 μM . La ArgRS, GluRS y GlnRS poseen una propiedad inusual: no catalizan la reacción de intercambio ATP-PPi en ausencia del tRNA correspondiente (Mehler y Mitra, 1967). Este sustrato probablemente interactúa con el correspondiente sitio catalítico de activación para conferirle su conformación funcional (Eriani *et al.*, 1990a).

7.2. Características estructurales de las aminoacil-tRNA sintetasas: clasificación

El avance en los estudios sobre aaRSs ha permitido constatar que a pesar de que todas estas proteínas tienen el mismo sustrato común, ATP, y catalizan la esterificación de un aminoácido sobre la adenosina terminal del extremo CCA conservado de la molécula de tRNA, presentan una considerable divergencia en sus pesos moleculares y estructuras oligoméricas (Schimmel y Söll, 1979). En el caso de *E. coli* las masas moleculares para enzimas monoméricas se extienden desde 44 kDa para la CysRS hasta 112 kDa para la IleRS. Para el mismo organismo existen cuatro tipos de estructuras oligoméricas: α_2 , α_4 , $\alpha_2\beta_2$, y el rango de masas moleculares varía desde 247 kDa para la PheRS ($\alpha_2\beta_2$) hasta 380 kDa para la AlaRS (α_4).

En las bacterias, existe al menos una aaRS para cada tipo de aminoácido, con las excepciones de la presencia de 2 LysRS en *E. coli* y 2 ThrRS en *Bacillus subtilis*, y la ausencia de GlnRS entre las bacterias Gram-positivas, donde el Glu-tRNA^{Gln} se convierte en Gln-tRNA^{Gln} mediante transaminación.

En organismos eucariotas, en general existen aaRSs diferentes para un mismo aminoácido en los diferentes compartimentos celulares (citoplasma, mitocondria o cloroplasto), aunque enzimas específicas de un mismo aminoácido pueden coexistir en el mismo compartimento celular (Schimmel y Söll, 1979; Pape *et al.*, 1985). Las enzimas eucarióticas tienen una masa molecular sensiblemente superior a sus homólogas bacterianas, como consecuencia de la presencia de un dominio N-terminal suplementario, sin función catalítica aparente, adquirido en el curso de la evolución.

A partir de la clonación y secuenciación de genes que codifican aaRSs, la comparación de las secuencias de aminoácidos ha permitido observar la falta de homología entre ellas, aunque entre algunas enzimas se detectaron homologías significativas pero limitadas. Así todo, basándose en la presencia de dominios conservados característicos ha sido posible la división de estas enzimas en dos clases (Eriani *et al.*, 1990b) (Tabla 1.2):

Clase I. El alineamiento de las secuencias primarias de estas aaRSs, revela la presencia de los dominios conservados HIGH y KMSKS característicos en el extremo N-terminal de la proteína. En el dominio HIGH (*Rossmann fold*), se ha demostrado que los dos residuos de His están implicados en la unión del ATP. El segundo residuo de Lys del dominio KMSKS resulta esencial para la activación del aminoácido catalizada por la aaRS.

Clase II. Presentan tres dominios específicos: Dominio 1, compuesto de 20 residuos, en los que sólo se mantiene invariable un residuo de Pro, y sólo se observa en aaRSs de forma α_2 asociado a la interfase dimerica; Dominios 2 y 3, localizados en el extremo C-terminal y caracterizados por presentar una única Arg invariable.

Esta división en dos clases de las aaRSs se puede relacionar con una propiedad de estas enzimas: todas las aaRSs de *Clase I*, realizan la unión del aminoácido activado sobre el grupo 2' hidroxilo de la adenosina terminal del tRNA, mientras que todas las de *Clase II* lo hacen sobre el grupo 3' (Moras, 1992) (Tabla 1.2).

Tabla 1.2
Clasificación de las aminoacil-tRNA sintetetasas

Clase	I			II			
Sitio de aminoacilación en la ribosa terminal del tRNA	2'-OH			3'-OH			
Dominios característicos^a	HIGH			(1)... P ...			
	KMSKS			(2) FRXE ...			
				(3)... GXGXGXER ...			
Miembros de las subclases	a	b	c	a	b	c	
	LeuRS	TyrRS	ArgRS	HisRS	AsnRS	GlyRS	PheRS
	IleRS	TrpRS	GlnRS	ProRS	AspRS	AlaRS	
	ValRS		GluRS	SerRS	LysRS		
	CysRS			ThrRS			
	MetRS						

^a Los dominios señalados en negrita corresponden a residuos conservados.

7.3. Implicación de las aminoacil-tRNA sintetetasas en otras funciones celulares

Las aaRSs aparte de desempeñar una función central en los mecanismos de traducción del mensaje genético, catalizando la carga de manera precisa de un tRNA con su correspondiente aminoácido, también están implicadas en otros procesos biosintéticos. Intervienen en la síntesis de la pared celular de algunas bacterias Gram-positivas, donde los aminoacil-tRNAs sirven como donadores en la formación de puentes peptídicos en la cadena pentapeptídica, proceso que se inicia con la unión de un aminoácido al grupo -amino de la lisina o el DAP del pentapéptido (Neidhardt *et al.*, 1975). Las aaRSs también están implicadas en la represión de algunas rutas biosintéticas de aminoácidos, el control de la formación de mRNA (Akins y Lambowitz, 1987; Herbert *et al.*, 1988), la iniciación de la replicación del DNA, el control de la degradación proteica, el transporte de aminoácidos (Quay *et al.*, 1975; Moore *et al.*, 1977), la aminoacilación post-traducciona de las proteínas (Deutsch *et al.*, 1978) y la regulación del inicio de la traducción (Pollard *et al.*, 1989). Desde las cianobacterias hasta los cloroplastos de las plantas superiores, la GluRS participa en la primera etapa de la síntesis de clorofila, convirtiendo el Glu cargado por el tRNA^{Glu} en glutamato-1-semialdehído más ácido -aminolevulínico, precursor universal de las porfirinas (Schön *et al.*, 1986; O'Neill *et al.*, 1988).

7.4. Regulación de la expresión de genes de aminoacil-tRNA sintetasas

En la célula de *E. coli* la abundancia de las diferentes aaRSs es notable: a 37°C en medio mínimo hay una media de 500 moléculas de cada enzima por bacteria y 800 moléculas en medio complejo, lo que representa un número 20 veces inferior que el de ribosomas (Neidhardt *et al.*, 1977). *In vivo*, un 80-85% de los tRNAs están permanentemente aminoacilados, y también es constante la actividad de carga de las aaRSs que está ajustada a la velocidad de incorporación de aminoácidos a las proteínas (Jakubowski y Goldman, 1984) y no constituye un elemento limitante de la síntesis proteica.

En lo concerniente a la regulación de la biosíntesis de estas proteínas, la realización de numerosos estudios fisiológicos ha conducido a proponer la existencia de múltiples tipos de regulación (Grunberg-Manago, 1987). Una regulación general o regulación metabólica que está presente en todas las aaRSs estudiadas hasta el momento (Reeh *et al.*, 1977), en la que la concentración intracelular de enzimas depende de la velocidad de crecimiento de la célula. Este mecanismo es común a todos los constituyentes del aparato de traducción: proteínas ribosomales, rRNAs, factores de elongación (Neidhardt *et al.*, 1977), de lo que surge la idea de una síntesis coordinada de todas estas macromoléculas.

Una regulación más específica se superpone a la regulación general, y conduce a una desrepresión de la síntesis de ciertas enzimas en respuesta a una carencia del aminoácido correspondiente (Naas y Neidhardt, 1967; Neidhardt *et al.*, 1975; Morgan y Söll, 1978).

La regulación de la biosíntesis de determinadas aaRSs de *E. coli* ocurre a nivel transcripcional, como es el caso de la TrpRS (Hall y Yanofsky, 1982) y de la GlnRS (Cheung *et al.*, 1985). También se ha demostrado la existencia de otros mecanismos de control de la expresión de genes que codifican para estas enzimas:

La AlaRS, molécula tetramérica (α_4), regula su nivel de expresión mediante la represión de la transcripción de su gen *alaS*, al unirse a secuencias de DNA palindrómicas que flanquean el sitio de inicio de la transcripción (Putney y Schimmel, 1981).

Un mecanismo de atenuación es evidente en el caso del operón PheRS, que funciona según un modelo similar al de operones biosintéticos de aminoácidos (Springer *et al.*, 1983; Mayaux *et al.*, 1985).

En el caso de la ThrRS, un mecanismo de autoregulación actúa sobre la traducción al unirse el intermediario de la enzima a la región promotora del gen *thrS* en una zona de estructura similar a la de ciertos isoaceptores de tRNA^{Thr}. La inhibición de la traducción se produce al no poder unirse los ribosomas sobre la secuencia de Shine-Dalgarno (Springer *et al.*, 1985; Butler *et al.*, 1986; Moine *et al.*, 1988; Springer *et al.*, 1989).

8. Objetivos del presente trabajo

Debido a la utilización de las corinebacterias *Brevibacterium lactofermentum* y *Corynebacterium glutamicum* en la producción de aminoácidos y al desarrollo de técnicas de biología molecular

eficientes para estos microorganismos (Martín *et al.*, 1987), en los últimos años se ha producido un amplio desarrollo en el estudio de las vías biosintéticas de aminoácidos y de los mecanismos moleculares de estas vías (Kalinowski *et al.*, 1991; Schrupf *et al.*, 1991; Follettie *et al.*, 1993; Pisabarro *et al.*, 1993; Mateos *et al.*, 1994). Todo ello, ha permitido acumular una cantidad considerable de información genética referente a estos microorganismos.

Por otra parte, es necesario conocer los mecanismos de control de la expresión génica en corinebacterias, y la información disponible al respecto hasta este momento corresponde principalmente a secuencias específicas de control transcripcional localizadas en el DNA (promotores, terminadores y secuencias reguladoras). En este trabajo se ha pretendido abordar el estudio de tres mecanismos moleculares diferentes implicados en el control transcripcional en corinebacterias:

1. Los factores sigma principales de la RNA polimerasa, que desempeñan un papel central en el reconocimiento de los sitios de inicio de la transcripción o promotores.

2. La proteína represora DtxR que controla la transcripción de determinados genes en dependencia directa de la presencia de hierro.

3. El operón *argS-lysA*, que presenta un mecanismo de antiterminación de la transcripción en dependencia directa de un tRNA específico, ampliamente distribuido entre genes de aminoacil-tRNA sintetasas y genes biosintéticos de aminoácidos en bacterias Gram-positivas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

1.1. Microorganismos utilizados

Los microorganismos utilizados en este trabajo están recopilados en la Tabla 2.1, donde se indican sus características, así como su procedencia.

1.2. Medios y condiciones de cultivo

Para todos los medios de cultivo se indica la composición para volúmenes de un litro. Todos los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

Medio Luria-Bertani, LB (Miller, 1972). Bacto-triptona, 10 g; extracto de levadura, 5 g; NaCl, 10 g.

Ajustar el pH a 7.3 con NaOH. Para medio sólido, **LA**, suplementar con agar 2%.

Medio mínimo Vogel-Bonner, VB (Vogel y Bonner, 1956). A 975 ml de H₂O esteril añadir, glucosa 50%, 4 ml; solución VB (x50), 20 ml; MgSO₄ 1 M, 0.8 ml. *Solución VB (x50)*: Mg SO₄·7H₂O, 10 g; ácido cítrico, 100 g; KH₂PO₄, 500 g; NaH₂NH₄NaPO₄H·4H₂O, 175 g, H₂O destilada, 670 ml; ajustar a pH 7.2; esterilizar por filtración. Para medio sólido añadir agar 2%.

Medio JLB. Triptona, 12 g; extracto de levadura, 24 g; glicerol, 4 ml. Después de esterilizar en autoclave añadir 1/10 de tampón fosfato (K₂HPO₄ +KH₂PO₄) 17 mM, pH 7.4.

Medio 2xTY. Bacto-triptona, 20 g; Extracto de levadura, 10 g. Ajustar el pH a 7.2 con NaOH.

Medio SOB (Hanahan, 1983). Bacto-triptona, 20 g; extracto de levadura, 5 g; NaCl, 0.5 g. Ajustar a pH 7.5. Añadir antes de utilizar: MgCl₂·6H₂O, 1 mM; MgSO₄·7H₂O, 1 mM.

Medio TSB. Peptona de caseína, 17 g; peptona de soja, 3 g; NaCl, 5 g; K₂HPO₄, 5 g; dextrosa, 2.5 g. Para medio sólido, **TSA**, suplementar con agar 2%.

Medio mínimo para corinebacterias MMC. SO₄(NH₄)₂, 10 g; urea, 3 g; KH₂PO₄, 1 g, MgSO₄·7H₂O, 0.41 g; FeSO₄·4H₂O, 2 mg; MnSO₄·4H₂O, 2 mg; NaCl, 50 mg; biotina 50 µg, tiamina 200 µg;

glucosa, 20 g. Las vitaminas se esterilizan por filtración y la glucosa se esteriliza en autoclave por separado. Ajustar el pH a 7.3. Para medio sólido suplementar con agar 2%.

Tabla 2.1.
Microorganismos utilizados

<i>Cepas</i>	<i>Características</i>	<i>Referencia</i>
<u>Corinebacterias</u>		
<i>B. lactofermentum</i> <i>ATCC 13869</i>	Cepa silvestre; Nal ^R	ATCC
<i>B. lactofermentum</i> <i>R31</i>	MeLys ^R , Aec ^R , Nal ^R ; derivada de la ATCC 13869	Santamaria <i>et al.</i> , 1985
<i>C. glutamicum</i> <i>ATCC 13032</i>	Cepa silvestre; Nal ^R	ATCC
<i>C. glutamicum</i> <i>AS019</i>	Nal ^R , Rif ^R	K. Dunican
<u>Escherichia coli</u>		
<i>DH5</i>	F ⁻ (80d <i>lacZ</i> M15) (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1hsdR17</i> (rk ⁻ ,mk ⁻)	BRL
<i>DH10B</i>	F ⁻ <i>mcrA</i> (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) 80d <i>lacZ</i> M15 <i>lacX74 endA1 recA1 deoR</i> (<i>ara-leu</i>)7697 <i>araD139 galU -galK nupG rpsL</i>	BRL
<i>JM101</i>	<i>supE thi</i> (<i>lacZ-proAB</i>), [F ⁺ <i>proAB</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q Z M15]	Yanish-Perron <i>et al.</i> , 1985
<i>WK6 mutS</i>	F ⁺ <i>lacI</i> ^q Z M15 <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ (<i>lac-proAB</i>) <i>galE strA</i> <i>mutS215::Tn10</i>	Kramer <i>et al.</i> , 1984
<i>RLA11</i>	<i>lysA::Mu araD139</i> (<i>lacIPOZYA</i>)U169 <i>rpsL thiA</i>	C. Richaud
<i>TGE900</i>	F ⁻ <i>su ilv his bio</i> (c1857 con una delección en el sitio <i>Bam</i> HI)	Courtney <i>et al.</i> , 1984
<i>S17-1</i>	<i>hsdR pro recA</i> conteniendo RP4-2 Tc ^r ::Mu integrado en el cromosoma	Simon <i>et al.</i> , 1983
<i>DH5 : RS45</i> <i>toxPO/lacZ</i>	Como DH5 , pero lisogénica para RS45 (<i>toxPO/lacZYA</i> , Km ^R)	Boyd <i>et al.</i> , 1990

Los aditivos a los medios de cultivo se añadieron esencialmente siguiendo las indicaciones de Maniatis *et al.* (1989). Los aditivos más utilizados fueron antibióticos, aminoácidos e indicadores de complementación del gen *lacZ*. Si no se indica lo contrario, las soluciones fueron preparadas en agua.

Ampicilina (Ap): preparación en solución a 200 mg/ml. La concentración final utilizada fue de 100 µg/ml para plásmidos de alto número de copias y de 50 µg/ml para plásmidos de bajo número de copias.

Cloranfenicol (Cm): preparación en solución 100 mg/ml en etanol. La concentración final utilizada fue de 200 µg/ml para amplificación de cósmidos recombinantes.

Kanamicina (Km): preparación en solución a 50 mg/ml. La concentración final utilizada es de 50 µg/ml para selección de plásmidos replicándose en *E. coli* y de 25 µg/ml en corinebacterias.

Ácido nalidíxico (Nal): preparación en solución a 12.5 mg/ml en 1 N NaOH. La concentración final utilizada para corinebacterias varía entre 30-50 µg/ml.

Lisina (Lys): preparación en solución a 10 mg/ml, utilizándose a una concentración final de 50 µg/ml.

X-Gal: preparación en solución a 20 mg/ml en dimetilformamida, diluyéndose en agua hasta una concentración final de 40 µg/ml.

IPTG: preparación en solución 100 mM en agua, se usa a una concentración final de 0.05 mM.

2,2'-dipiridil: preparación en solución 5 mM en dimetilformamida, utilizándose a una concentración final de 50-300 µM.

1.3. Soluciones de uso general

Tampón TAE (x10): 400 mM Tris-HCl; 5 mM acetato sódico; 20 mM EDTA; pH 8.0.

Tampón TBE (x10): 900 mM Tris-HCl; 900 mM ácido bórico; 20 mM EDTA; pH 8.3.

Tampón TE: 10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1mM EDTA.

Tampón SSC (x20): 300 mM citrato sódico; 3 M NaCl; pH 7.0.

Tampón TES: 20 mM Tris-HCl, pH 8.0; 25 mM EDTA; 10.3% sacarosa.

Solución de Denhardt (x100): 2% (p/v) Ficoll; 2% (p/v) BSA; 2% (p/v) PVP.

Solución despurinizante: 0.25 M HCl.

Solución desnaturalizante: 1.5 M NaCl; 0.5 M NaOH.

Solución neutralizante: 1.5 M NaCl; 0.5 M Tris-HCl, pH 7.2; 1 mM EDTA.

Fenol ácido: 500 g fenol, 0.5 g hidroxiquinoleina; 100 ml H₂O.

Fenol neutro: extraer varias veces la mezcla de fenol ácido con 1 volumen de 1 M Tris-HCl, pH 8.0, hasta que la fase acuosa tenga un pH igual o superior a 7.6.

1.4. Plásmidos utilizados

En la tabla 2.2, se indican los plásmidos y fagos utilizados en el presente trabajo. Otras cepas y derivados plásmidicos o fágicos, desarrollados a lo largo de este trabajo, serán descritos en el apartado correspondiente.

Tabla 2.2
Plásmidos y fagos utilizados

<i>Plásmidos o fagos</i>	<i>Características</i>	<i>Referencia</i>
<i>pUC13</i>	Vector de <i>E. coli</i> , Ap ^R , <i>lacZ</i>	Vieira y Messing, 1982
<i>pUC18/pUC19</i>	Vectores de <i>E. coli</i> , Ap ^R , <i>lacZ</i>	Vieira y Messing, 1982
<i>pUC118/119</i>	Vectores de <i>E. coli</i> , Ap ^R , <i>lacZ</i> , oriM13	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
<i>pBluescript KS(+)</i>	Vector de <i>E. coli</i> , Ap ^R , <i>lacZ</i> , orif1	Stratagene
<i>pTG908</i>	Vector de expresión en <i>E. coli</i> que contiene el promotor p _L del fago	Transgene
<i>Fago lambda ()</i>	Marcador de peso molecular	Promega
<i>M13K07</i>	Fago derivado del M13, Km ^R	Mead y Kemper, 1988
<i>pRS551/toxPO</i>	Ap ^R , <i>toxPO-lacZ</i>	Boyd <i>et al.</i> , 1990
<i>pRS551toxPO/VN1200</i>	Ap ^R , <i>toxPO-lacZ</i> , <i>dtxR</i> (<i>C. diphtheriae</i>)	Boyd <i>et al.</i> , 1990
<i>pK18-mob</i>	Vector de <i>E. coli</i> movilizable, Km ^R	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
<i>pHC79.4</i>	Cósmido pHC79 con dos sitios <i>cos</i> separados por un sitio <i>PvuII</i>	Hohn y Collins, 1980
<i>pUL610M</i>	Vector corinebacterias- <i>E. coli</i> , Ap ^R , Km ^R , Hyg ^R	Martín <i>et al.</i> , 1990

1.5. Reactivos químicos y bioquímicos

En este trabajo se han utilizado productos químicos adquiridos a las siguientes casas comerciales: Merck (Darmstadt, Alemania), Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, USA), Bethesda Research Laboratories (California, USA), Bio-RAD (California, USA), United States Biochemical (Cleveland, Ohio, USA), Aldrich Chemie GmbH & Co. (Steinheim, Alemania), Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Alemania), Promega Co. (Madison, Wisconsin, USA), Amersham International (Gran Bretaña), Difco (Detroit, Michigan, USA), Carbo Elba (Milán, Italia), Pharmacia (Uppsala, Suecia), Probus (Barcelona) y Panreac (Barcelona).

Los productos radioactivos empleados fueron adquiridos a Amersham international (Gran Bretaña), ICN (Costa Mesa, California, USA), CEA (Saclay, Francia) y Dupont (Boston, Massachusetts, USA).

Las diferentes enzimas utilizadas fueron adquiridas a Boehringer Mannheim, Bethesda Research Laboratories, New England Biolabs y Promega Co.

1.6. Análisis informático

El análisis y la comparación de secuencias nucleotídicas y proteicas se ha realizado principalmente con la ayuda de los programas:

DNASTAR	(Dnastar Inc., Madison, Wisconsin, USA)
PCGENE	(Amos Bairoch, University of Geneva, Suiza)
CLUSTAL V	(Higgins y Sharp, 1989)

Las bases de datos con actualización periódica a las que se ha tenido acceso para las búsquedas de homologías han sido las siguientes

GenBank	(Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, USA)
EMBL	(European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Alemania)
PIR-NBRF Protein	(NBRF Foundation; Washington DC, Washington, USA).

2. Métodos relativos al estudio de ácidos nucleicos

2.1. Preparación del DNA

2.1.1. Preparación de DNA total de corinebacterias

Este método permite la rápida preparación de DNA total de cultivos de un volumen comprendido entre 5 y 100 ml, obteniéndose entre 4-5 µg de DNA por ml de cultivo.

Aislamiento de DNA cromosómico de corinebacterias

1. Crecer un inóculo de la cepa en 10 ml medio TSB a 30°C con agitación durante 16-24 horas.
2. Recoger las células por centrifugación.
3. Resuspender las células en 1 ml TES y añadir lisozima a una concentración final: 20 mg/ml. Incubar a 37°C durante 2 horas.
4. Añadir 1 ml de una solución: 25 mM EDTA, pH 8.0; SDS 2%; proteinasa K 10 µg/ml. Incubar a 42°C durante 2 horas.
5. Añadir RNasa a una concentración final de 5 µg/ml. Incubar a 37°C durante 15 minutos.
6. Extraer con un volumen de fenol neutro. Centrifugar .
7. Extraer la fase acuosa con un volumen de fenol neutro-CIA. Centrifugar.
8. Extraer la fase acuosa con un volumen de CIA. Centrifugar.
9. Precipitar a -20°C con 2 volúmenes de etanol y 0.1 volumen de acetato sódico 3 M, pH 7.0.
10. Centrifugar a 12.000 rpm a 4°C durante 30 minutos. Lavar con etanol al 70%. Secar el precipitado.
11. Resuspender en 100 µl TE. Cuantificar la cantidad de DNA aislado (1 DO₂₆₀ = 50 µg DNA).

2.1.2. Minipreparación de DNA plasmídico de *Escherichia coli*

Este método fue descrito por Holmes y Quigley (1981) y, permite la extracción rápida de plásmidos a partir de transformantes de *E. coli* para su posterior análisis.

Minipreparación de plásmidos de *E. coli*

1. A partir de una colonia aislada, inocular 1 ml de medio JLB suplementado con el antibiótico adecuado. Incubar a 37°C con agitación durante 8-16 horas.
 2. Sedimentar las células mediante centrifugación a 6.000 rpm, 5 minutos.
 3. Resuspender las células en 150 µl de solución *STET*.
STET: Sacarosa 8%; 10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 50 mM EDTA; Triton X-100 0.5%.
 4. Añadir 5 µl de una solución de lisozima (10 mg/ml).
 5. Hervir los Eppendorfs durante 50 segundos. Centrifugar a 12.000 rpm durante 10 minutos.
 6. Eliminar el precipitado viscoso con un palillo estéril. Precipitar el sobrenadante con un volumen de isopropanol. Centrifugar a 12.000 rpm durante 10 minutos.
 7. Lavar con etanol al 70%. Secar y resuspender el precipitado en 40 µl de TE.
-

2.1.3. Lisis alcalina

Este método fue descrito por Birnboim y Doly (1979) para la obtención de plásmidos de *E. coli*, aunque también es aplicable para el aislamiento de plásmidos de corinebacterias.

Lisis alcalina de plásmidos

1. Inocular 100 ml del medio correspondiente, JLB para *E. coli* o TSB para corinebacterias, suplementado con el antibiótico correspondiente. Cultivar las células a 37°C para *E. coli* o 30°C para corinebacterias, con agitación durante la noche.
 2. Sedimentar las células mediante centrifugación a 5.000 rpm durante 10 minutos. Resuspender el precipitado celular en 2 ml de TES y añadir lisozima a una concentración final de 5 mg/ml. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente para *E. coli* o 3-4 horas a 37°C para corinebacterias.
 3. Añadir 4 ml de solución alcalina: 0.2 N NaOH, SDS 0.1%. Mezclar bien por inversión y mantener 10 minutos en hielo.
 4. Añadir 3 ml de una solución 7.5 M acetato amónico, pH 7.5. Mezclar bien por inversión y mantener 10 minutos en hielo.
 5. Centrifugar a 4°C durante 10 minutos a 12.000 rpm.
 6. Recuperar la fase acuosa y precipitar con 0.6 volumen de isopropanol a temperatura ambiente.
 7. Centrifugar durante 30 minutos a 12.000 rpm. Lavar con etanol al 70% .
 8. Resuspender el precipitado en 0.5-1 ml de TE. El DNA puede limpiarse mediante fenolización.
-

2.1.4. Preparación de DNA monocatenario (ssDNA)

Los métodos de secuenciación requieren un DNA de cadena sencilla (ssDNA) como molde para que actúe la DNA polimerasa. Los fagémidos, vectores híbridos de fago y plásmido con el origen de replicación y las propiedades del plásmido añadidas al origen de replicación de un fago, se utilizan ampliamente para la preparación de ssDNA para secuenciar.

En este estudio, los fagémidos empleados han sido pUC118, pUC119 y pBluescript KS(+). Estos vectores contienen la información necesaria para que una vez en el interior celular y con la ayuda del fago ayudante M13KO7 (Mead y Kemper, 1988), llevar a cabo las funciones de replicación y empaquetamiento. El fragmento a secuenciar tiene que ser subclonado en uno de estos fagémidos y, el plásmido recombinante resultante se introduce en una cepa de *E. coli* WK6 *mutS*, portadora del episoma F' y susceptible de infección por el fago auxiliar. El fago auxiliar M13KO7 contiene el gen de resistencia a Km, facilitando la selección de las células infectadas. De esta manera se obtienen partículas fágicas que contienen el DNA que se desea secuenciar en forma monocatenaria.

Extracción de ssDNA

-
1. Inocular 1ml de medio 2xTY + Ap, con una colonia de la cepa que contiene el plásmido correspondiente. Incubar a 37°C, durante 4-5 horas.
 2. Cuando la DO₆₀₀ alcanza un valor entre 0.6 y 1, mezclar en un tubo de volumen 10 ml, 5·10⁸ células con 1·10¹⁰ fagos. Incubar a 37°C durante 2 horas, agitando levemente a intervalos de 15-30 minutos.
 3. Añadir 1.5 ml de medio 2xTY con 100 µg/ml de Ap y 50 µg/ml de Km. Incubar a 37°C durante 12-16 horas con agitación.
 4. Centrifugar 5 minutos a 12.000 rpm, para eliminar las células. Recoger el sobrenadante en otro tubo y repetir la centrifugación.
 5. Precipitar el sobrenadante con 0.4 volumen de una solución PEG 6.000 20% y 2.5 M NaCl. Mezclar bien por inversión y mantener en hielo al menos durante 30 minutos.
 6. Centrifugar a 4°C durante 30 minutos a 12.000 rpm. Desechar el sobrenadante. Lavar el precipitado con etanol al 70%. Secar.
 7. Resuspender en 400 µl de TE. Romper los fagos y eliminar el componente proteico mediante fenolización.
 8. Precipitar la fase acuosa final de la fenolización con 0.1 volumen de acetato sódico 3 M pH 7.0 y 2 volúmenes de etanol frío. Mantener a -20°C un mínimo de 2 horas.
 9. Centrifugar a 4°C durante 30 minutos a 12.000 rpm. Lavar con etanol al 70% y resuspender en 10 µl de agua estéril.
 10. Cuantificar el ssDNA obtenido mediante electroforesis de alícuotas (1-2 µl).
-

2.2. Digestión y modificaciones enzimáticas del DNA

2.2.1. Hidrólisis por endonucleasas de restricción

La digestión del DNA se llevó a cabo siguiendo las condiciones de temperatura y tampones recomendadas por los fabricantes (Boehringer Mannheim, Bethesda Research Laboratories, New England Biolabs y Promega). La proporción de la enzima en la solución final de digestión debe ser menor del 10%, debido al alto contenido en glicerol de las soluciones de almacenaje de las enzimas. Normalmente una digestión de DNA con enzimas de restricción se lleva a cabo en volúmenes de 10 a 50 μ l conteniendo 0.1 a 5 μ g de DNA y 1 a 5 u de enzima por μ g de DNA.

2.2.2. Modificaciones enzimáticas de los extremos del DNA

Desfosforilación de los extremos 5' libres: Este tratamiento se aplica a los vectores para evitar su religación. La fosfatasa alcalina hidroliza los extremos 5'-fosfato del DNA impidiendo la formación de enlaces fosfodiéster entre los dos extremos de la misma molécula. La reacción se efectúa en un tampón 50 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0, en presencia de 2 u de fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim) durante 1 hora a 37°C. La enzima se elimina por extracción fenólica, seguida de precipitación del DNA.

Fosforilación del extremo 5': La enzima T4 polinucleótido kinasa cataliza la transferencia del grupo fosfato del ATP sobre el extremo 5'-hidroxilo libre del DNA o RNA. La reacción se efectúa en un tampón 50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 10 mM MgCl₂; 5 mM DTT; 0.1 mM EDTA en presencia de 1 mM ATP y a razón de 5 u de T4 polinucleótido kinasa por cada 5 pmoles de DNA, durante 1 hora a 37°C. Esta reacción se puede utilizar para el marcaje de oligonucleótidos si se sustituye el ATP por [⁻³²P]ATP (3.000 Ci/mmol).

Rellenado de extremos 5' protuberantes: Los extremos 5' protuberantes generados por determinadas enzimas de restricción pueden ser rellenados y convertidos en extremos romos por la acción de determinadas enzimas: fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* y T4 DNA polimerasa. En el caso del fragmento Klenow se utilizan 2 u de enzima por μ g de DNA y, la reacción se realiza en un volumen final de 20 μ l de una solución 10 mM MgCl₂; 50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 1 mM DTT y 0.5 mM de cada uno de los cuatro dNTPs. La reacción se incuba durante 15-30 minutos a 37°C. Esta reacción también se puede emplear para el marcaje del DNA, donde el nucleótido [⁻³²P]dNTP correspondiente se utiliza en una proporción de 50 a 100 μ Ci por pmol de DNA.

2.2.3. Ligación de fragmentos de DNA

La DNA ligasa del fago T4 cataliza las uniones fosfodiéster entre los extremos 3'-hidroxilo y 5'-fosfato del DNA de doble cadena, requiriendo Mg^{2+} y ATP como cofactores. La reacción se efectúa en un volumen de 10 a 50 μ l de tampón de ligación: 50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 10 mM $MgCl_2$; 20 mM DTT; 1 mM ATP y, BSA 50 μ g/ml. Se añaden 2 u de enzima por μ g de DNA y, la temperatura de incubación es de 12-15°C durante 12 horas.

2.3. Separación y purificación de fragmentos de DNA

2.3.1 Electroforesis en geles de agarosa

La migración en geles de agarosa es un método simple y eficaz para la separación de fragmentos de DNA entre 0.2 y 30 kb. Se emplearon concentraciones de agarosa variables entre 0.5-2%, en función del tamaño de los fragmentos de DNA a separar (Ausubel *et al.*, 1989). El tampón de electroforesis normalmente utilizado fue TAE y, a las muestras se les añadió 0.6 volumen de *tampón de carga* (azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25%, sacarosa 40%) previamente a su aplicación en el gel. La electroforesis se desarrolló normalmente a voltajes entre 1 y 5 V/cm. Después de la electroforesis, los geles se sumergieron en una solución de bromuro de etidio (EtBr) 5 μ g/ml. Las bandas de DNA fueron visualizadas sobre un transiluminador de UV y posteriormente fotografiadas. Para la determinación del tamaño de los fragmentos de DNA separados en los geles de agarosa se utilizaron como marcadores de peso molecular digestiones del DNA del fago con diferentes enzimas de restricción (Southern, 1979).

2.3.2. Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa

Para la extracción de fragmentos de DNA separados en geles de agarosa se utilizaron sistemas comerciales basados en la utilización de matrices de sílice: *GeneClean II* (BIO 101 Inc.) y *Qiaex Gel Extraction Kit* (Qiagen), siguiendo los protocolos descritos por los fabricantes. También se emplearon otros métodos que se describen a continuación.

2.3.2.1. Electroelución sobre papel DEAE NA45

El papel DEAE NA45 (Schleicher y Schull) permite la recuperación rápida y con un buen rendimiento de fragmentos de DNA de tamaño inferior a 1 kb, con una capacidad de fijación de 7 μ g de DNA por cm^2 . El papel DEAE NA45 se introduce en una pequeña incisión realizada en el gel de agarosa delante de la banda de DNA a eluir. Se continúa la electroforesis hasta que la banda de DNA

ha migrado totalmente sobre el papel, tras lo cual se retira del gel. El papel se lava con 1.5 ml de *solución NET I* (20 mM Tris-HCl, pH 8.0; 150 mM NaCl y, 0.1 mM EDTA). Después el DNA se eluye del papel mediante incubación a 60°C durante 30 minutos en 350 µl de *solución NET II* (1 M NaCl; 0.1 mM EDTA; 20 mM Tris-HCl, pH 8.0). El rendimiento de la elución es generalmente del 80% del DNA. El DNA eluido se somete a fenolización y precipitación con etanol.

2.3.2.2. Método del butanol-CTAB

Este método está basado en la formación de complejos entre un catión cuaternario de amonio, bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), y los ácidos nucleicos como aniones, en soluciones acuosas de baja concentración de sales (Langridge *et al.*, 1980).

Método del butanol-CTAB

1. Separar el DNA en geles de agarosa de bajo punto de fusión.
2. Visualizar el gel en el transiluminador y cortar el fragmento de agarosa del gel que contenga la banda de DNA de interés. Exponer el menor tiempo posible el DNA a la luz UV.
3. Introducir el fragmento de agarosa en un Eppendorf y calentar a 65-70°C para fundir la agarosa.
4. Añadir 1 volumen de *butanol-CTAB* y 1 volumen de *agua-CTAB*, previamente calentados a 37°C. *Agua-CTAB/butanol-CTAB*: disolver 1 g de CTAB en 100 ml de butanol saturado en agua y, posteriormente añadir 100 ml de agua saturada con butanol. Mezclar bien las fases mediante agitación y, dejar que se separen las fases durante toda la noche. La fase superior corresponde al butanol-CTAB y la inferior al agua-CTAB, decantarlas y guardarlas por separado.
5. Centrifugar 1-2 minutos a 12.000 rpm. Recuperar la fase superior. Se puede repetir esta extracción.
6. Añadir 0.25 volumen de acetato sódico 0.3 M, pH 7.0 a la fase superior obtenida anteriormente. Agitar.
7. Centrifugar 1-2 minutos a 12.000 rpm. Recuperar la fase inferior.
8. Añadir 1 volumen de cloroformo. Agitar. Incubar en hielo durante 5-10 minutos.
9. Centrifugar 1-2 minutos a 12.000 rpm. Recuperar la fase acuosa superior. Precipitar con 3% acetato sódico 3 M, pH 7.0 y 3 volúmenes de etanol frío. Dejar al menos durante 2 horas a -20°C.
10. Centrifugar a 4°C durante 30 minutos a 12.000 rpm. Lavar con etanol al 70%. Secar. Resuspender el DNA en agua o TE.

2.3.3. Geles para secuenciación de DNA

Los productos de extensión de reacciones de secuenciación se separan mediante electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes; utilizándose diferentes concentraciones de poliacrilamida, generalmente 6% y 8% con una concentración 7 M de urea, en función de la longitud de los fragmentos a separar. El sistema de geles de secuenciación utilizado en este trabajo fue el *Sequi-Gen* (Bio-Rad).

El tampón de electroforesis utilizado fue TBE, realizándose un precalentamiento del gel para que este alcance una temperatura entre 45-50°C, para posteriormente comenzar a aplicar las muestras que previamente se habían calentado 2-5 minutos a 95°C. La potencia aplicada a las cubetas depende

del tamaño de estas: para las de 21x50 cm es de 45 W y para las de 38x50 cm de 85 W. El tiempo de electroforesis (4-15 horas) también es función del tamaño de los productos de extensión que se pretenda resolver en los geles.

Una vez finalizada la electroforesis, para la fijación y eliminación parcial de la urea del gel se sumerge en una solución de metanol 10% y ácido acético 10%. Tras lo cuál se transfiere a un papel Whatman 3MM para su secado al vacío y posterior autoradiografía.

2.4. Técnicas de transformación de DNA en bacterias

2.4.1. Transformación de *E. coli*

El protocolo de transformación de células competentes de *E. coli* (Hanahan, 1983) permite su uso en cualquier cepa, independientemente del método que se haya utilizado para inducir la competencia de las células. La transformación se efectúa en hielo mezclando 200 μ l de células competentes con la solución de DNA (1-20 μ l). La mezcla se incuba 30 minutos en hielo. Tras esto se somete a las células a un choque térmico a 42°C durante 90 segundos y, se vuelven a colocar en hielo 1-2 minutos. Se añaden 4 volúmenes de LB a las células y se incuban a 37°C, durante 45-60 minutos. Finalmente las células se siembran en placas de medio selectivo.

2.4.1.1. Preparación de células competentes con cloruro de calcio

El método utilizado se basa en la permeabilización de la membrana celular obtenida con el tratamiento con iones de Ca^{2+} , descrito por Cohen *et al.* (1972) con pequeñas variaciones, y permite la obtención de eficiencias de transformación en el rango de 10^7 transformantes/ μ g DNA.

Células competentes de *E. coli* con cloruro de calcio

1. Poner un preinóculo de la cepa de *E. coli* en medio LB a partir de una colonia. Incubar a 37°C con agitación.
2. Inocular 100 ml de LB con 1 ml del preinóculo. Incubar a 37°C con agitación hasta que el cultivo alcance una $\text{DO}_{700} = 0.3$ (fase exponencial).
3. Centrifugar a 5.000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Resuspender el precipitado celular en 20 ml de una solución estéril 50 mM CaCl_2 , 10 mM Tris-HCl, pH 8.0. Dejar en hielo durante 30-60 minutos.
4. Tras este tiempo, volver a centrifugar y resuspender en 4 ml de la solución de CaCl_2 .
5. La solución de células competentes se puede conservar a 4°C si se va a utilizar a corto plazo, o se puede repartir en alícuotas de 200 μ l, congelar en nitrógeno líquido y guardar a -70°C.

2.4.1.2. Preparación de células competentes con cloruro de rubidio

Este método ha sido descrito por Hanahan (1983, 1985) y permite conseguir eficiencias de transformación altas (10^8 transformantes/ μg DNA) en cepas derivadas de *E. coli* DH1 (DH5 y DH5).

Células competentes de *E. coli* con cloruro de rubidio

1. Preparar una placa de medio SOB a partir de un stock de *E. coli* DH5 a -20°C . Incubar a 37°C durante la noche.
2. Inocular 100 ml de medio SOB con 3-4 colonias de la placa anterior. Incubar a 37°C con agitación, hasta que el cultivo alcance una $\text{DO}_{600} = 0.3-0.4$.
3. Centrifugar a 2.500 rpm durante 5 minutos a 4°C .
4. Resuspender el precipitado celular en 30 ml de *solución RF1*. Incubar las células 15 minutos en hielo.
Solución RF1: 100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM acetato potásico, 10 mM CaCl₂, glicerol 15% (v/v). Ajustar a pH 5.8 con ácido acético 0.2 M. Esterilizar por filtración.
5. Centrifugar a 2.500 rpm durante 5 minutos a 4°C .
6. Resuspender el precipitado celular en 8 ml de *solución RF2*. Incubar las células 15 minutos en hielo.
Solución RF2: 10 mM MOPS, pH 7.0; 10 mM RbCl; 75 mM CaCl₂; glicerol 15% (v/v). Ajustar a pH 6.8 con NaOH. Esterilizar por filtración.
7. Distribuir en alícuotas de 200 μl y congelar en nitrógeno líquido. Conservar a -70°C .

2.4.1.3. Preparación de células competentes con solución TSS

El método TSS (*Transformation Storage Solution*) fué descrito por Chung *et al.* (1989) y, permite la inducción del estado de competencia en células de *E. coli* de manera rápida, aunque las frecuencias de transformación no resultan elevadas (10^6-10^7 transformantes/ μg DNA).

Células competentes de *E. coli* por el método TSS

1. Preparar un preinóculo de la cepa de *E. coli* en medio LB, a partir de una colonia. Incubar a 37°C con agitación.
2. Inocular 100 ml de LB con 1 ml del preinóculo. Incubar a 37°C hasta que la $\text{DO}_{600} = 0.3-0.4$.
3. Centrifugar a 4°C , 5 minutos a 5000 rpm.
4. Resuspender las células en 4-5 ml de *solución TSS*.
Solución TSS: LB suplementado con PEG 3350 10%, 5% DMSO, 20-50 mM MgSO₄, pH 6.5.
5. Distribuir en alícuotas de 200-300 μl . Congelar en nitrógeno líquido y conservar a -70°C .

2.4.2. Transformación de *Brevibacterium lactofermentum*

La introducción de DNA en corinebacterias se puede realizar bien por transformación de protoplastos o bien por electroporación. En este estudio, se utilizó la electroporación de corinebacterias mediante un generador de pulsos *Gene Pulser* (Bio-Rad), siguiendo un protocolo

basado en los desarrollados para *E. coli* (Dower *et al.*, 1988) y *Corynebacterium glutamicum* (Dunican y Shivnan, 1989).

Electroporación de corinebacterias

Preparación de las células

1. Inocular 100 ml de TSB con 1-2 ml de preinóculo crecido durante toda la noche. Incubar a 30°C con agitación vigorosa hasta una $DO_{600} = 0.6$. Mantener en hielo durante 30 minutos.
2. Centrifugar a 4.000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
3. Resuspender las células en 100 ml de agua estéril fría. Centrifugar.
4. Resuspender las células en 50 ml de agua estéril fría. Centrifugar.
5. Resuspender las células en 2 ml de glicerol 10% estéril. Congelar en nitrógeno líquido. Dejar descongelar en hielo y añadir 8 ml de glicerol 10%. Centrifugar.
6. Resuspender en 0.2 ml de glicerol 10% y repartir en alícuotas de 40 μ l. Congelar en nitrógeno líquido. Conservar a -70°C.

Electrotransformación

1. Enfriar la cámara portacubetas y las cubetas. Descongelar las células en hielo.
 2. Mezclar el DNA (1-5 μ l) con las células. Añadir la mezcla a la cubeta de electroporación.
 3. Someter la cubeta a un pulso de 12.5 kV/cm. El tiempo de pulso debe ser de 4-5 milisegundos.
 4. Añadir 960 μ l de medio TSB en la cubeta. Transferir a un tubo estéril e incubar durante 1-2 horas a 30°C con agitación. Sembrar sobre medio selectivo.
-

2.4.3. Transferencia por conjugación de plásmidos desde *E. coli* a corinebacterias

Los experimentos de conjugación se realizaron siguiendo las descripciones de Schäfer *et al.* (1990) con ligeras modificaciones. El plásmido a transferir con resistencia a Km se transformó mediante las técnicas habituales en la cepa de *E. coli* S17-1. Para la transferencia del plásmido a partir de esta cepa donadora a cepas de corinebacterias receptoras, la cepa donadora conteniendo el plásmido de interés se creció en medio LB+Km (50 μ g/ml) hasta una $DO_{580} = 1-1.2$ (fase exponencial tardía). La cepa receptora de corinebacterias se creció en medio TSB hasta una DO_{580} de 3-4. Las células donadoras se lavaron dos veces con medio LB y se centrifugaron a 3.000 rpm, resuspendiéndose con agitación suave. Las células receptoras se sometieron a un choque térmico a 49°C durante 9 minutos para disminuir su sistema de restricción, tras lo cual se lavaron dos veces con TSB. Para la mezcla de conjugación se utilizaron $4 \cdot 10^8$ células donadoras y $4 \cdot 10^8$ células receptoras (relación 1:1), que se centrifugaron a 3.000 rpm durante un corto periodo de tiempo. La mezcla de conjugación se resuspendió cuidadosamente en 0.5-1 ml de LB, aplicándose sobre un filtro de acetato de celulosa con diámetro de poro 0.45 μ m (Millipore) colocado sobre una placa de TSA. Después de 20 horas de incubación a 30°C, las células se separaron del filtro mediante lavado con 1 ml de LB, centrifugándose posteriormente 5 minutos a 3.000 rpm. Las corinebacterias transconjugantes se seleccionaron en medio TSA suplementado con Km (25 μ g/ml) y Nal (50 μ g/ml). La mayoría de las corinebacterias presentan

resistencia natural al Nal. Las corinebacterias transconjugantes se lisaron utilizando los métodos habituales y, la presencia del plásmido de interés se analizó mediante electroforesis.

2.5. Análisis de fragmentos de DNA mediante hibridación

2.5.1. Transferencia del DNA en geles de agarosa

La transferencia de fragmentos de DNA separados en geles de agarosa se conoce como *Southern blotting* (Southern, 1979), el soporte más utilizado en la actualidad para este proceso son las membranas de nylon.

Southern blotting

1. Después de la electroforesis, sumergir el gel en *solución despurinizante* hasta que los colorantes hayan cambiado de color, cuando esto ocurra dejarlo otros 10 minutos en esta solución.
 2. Lavar con agua destilada y sumergir el gel en *solución desnaturalizante*. Incubar 30 minutos con agitación.
 3. Lavar con agua destilada y sumergir el gel en *solución neutralizante*. Incubar 30 minutos con agitación.
 4. Preparar el sistema de transferencia. Colocar sobre una bandeja con SSCx20 una plataforma y cubrirla con tres piezas de papel Whatman 3MM saturadas con SSCx20, de tal manera que los extremos queden en contacto con el SSCx20 de la bandeja.
 5. Colocar el gel sobre la plataforma. Cortar una membrana de nylon de tamaño similar al gel, humedecerla con agua destilada y luego con SSCx20. Colocar la membrana sobre el gel y eliminar las burbujas.
 6. Colocar tres papeles Whatman 3MM saturados con SSCx20 sobre la membrana. Sobre lo anterior colocar papeles de filtro secos del mismo tamaño hasta una altura aproximada de 5 cm. Encima de todo el sistema de transferencia colocar un peso de 0.75-1 kg.
 7. Mantener la transferencia entre 2-16 horas.
 8. Desmontar el sistema y lavar la membrana en SSCx2 durante 5 minutos. Fijar el DNA a la membrana con luz UV.
-

2.5.2. Transferencia *in situ* del DNA de colonias

Transferencia del DNA de colonias de *E. coli*

1. Las colonias de *E. coli* a transferir tienen que estar bien distribuidas por toda la placa.
2. Colocar una membrana de nitrocelulosa sobre la placa y dejarla 1-2 minutos. Durante este tiempo con una aguja impregnada en tinta marcar la membrana y la placa de forma asimétrica, para posteriormente poder analizar los resultados.
3. Preparar 4 bandejas con papel Whatman 3MM saturado de las soluciones que se describen en los apartados siguientes. Retirar la membrana de la placa y colocarla con las colonias hacia la parte superior en una bandeja con solución desnaturalizante. Dejar 3 minutos.
4. Transferir la membrana a otra bandeja con *solución neutralizante* (1.5 M NaCl, 1 M Tris-HCl, pH 8.0). Incubar 5 minutos.
5. Transferir la membrana a otra bandeja con solución neutralizante. Incubar 5 minutos.
6. Transferir la membrana a otra bandeja con SSCx2. Incubar 10 minutos.
7. Dejar secar la membrana a temperatura ambiente durante 30 minutos entre papel de filtro.
8. Fijar el DNA a la membrana en un horno de vacío a 80°C durante 1-2 horas.

2.5.3. Marcaje radioactivo de fragmentos de DNA

Se han utilizado diferentes métodos de incorporación de nucleótidos radioactivos en función del tamaño y tipo de DNA. En el caso de oligonucleótidos se empleó la enzima T4 polinucleótido kinasa que cataliza la transferencia del grupo fosfato del [^{-32}P]ATP sobre el extremo 5'-hidroxilo libre del oligonucleótido. Para fragmentos de DNA de tamaño entre 100-300 bp se utilizó el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* que permite el rellenado de extremos 5' protuberantes con nucleótidos [^{-32}P]dNTPs. También se han utilizado sistemas comerciales:

a. Desplazamiento de mallas (Nick Translation System, Promega). Este método ha sido desarrollado para la incorporación eficaz de [^{-32}P]dNTPs en el DNA de doble cadena (Rigby *et al.*, 1977). Se basa en la generación de huecos o extremos 3'-hidroxilo libres en el DNA por la enzima DNasa I. A partir de aquí, la DNA polimerasa I cataliza la incorporación de un nuevo nucleótido al extremo 3'-hidroxilo terminal de la mella, al mismo tiempo que elimina el nucleótido del extremo 5'-fosfato de la mella. De esta manera, el desplazamiento en dirección 3' de la mella permite la adición secuencial de [^{-32}P]dNTPs en el DNA, mientras que los preexistentes son eliminados. La reacción se lleva a cabo en un volumen de 25 μl con: 0.5-1 μg de DNA; 1 mM dATP, dGTP y dTTP; 50 mM Tris-HCl, pH 7.2; 10 mM MgSO_4 ; 0.1 mM DTT; 2 μl mezcla enzimática DNasa I (0.2 ng/ μl) y DNA polimerasa I (1 u/ μl); y, 2 μl de [^{-32}P]dCTP (3.000 Ci/mmol). Esta mezcla de reacción se incuba durante 1 hora a 60°C.

b. Oligonucleótidos al azar (Rediprime DNA Labelling System, Amersham). Este método se basa en el uso de secuencias oligonucleotídicas al azar para el inicio de la síntesis de DNA en sitios múltiples sobre el DNA desnaturalizado, mediante el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I (Feinberg y Vogelstein, 1983). La reacción se lleva a cabo con 2.5-25 ng de DNA desnaturalizado en un volumen de 50 μl durante 10-60 minutos a 37°C.

En los casos en los que fue necesario la eliminación de los nucleótidos radioactivos no incorporados se utilizaron columnas *Elutip-D* (Sigma) o el *Wizard DNA Clean-Up System* (Promega), siguiendo las especificaciones de los fabricantes.

2.5.4. Hibridación

Una vez realizada la transferencia del DNA (o el RNA) sobre una membrana, se realiza la hibridación con una sonda marcada radioactivamente con [³²P]. Para ello, se introducen los tubos en bolsas de plástico o tubos de vidrio, y se añaden 10-30 ml de solución de hibridación en función del tamaño de la membrana. Esta prehibridación se coloca en un baño con agitación (para las bolsas) o en un horno de hibridación (para los tubos de vidrio), a la temperatura de hibridación seleccionada durante 2-8 horas. La sonda marcada radioactivamente se desnaturaliza a 100°C durante 5-10 minutos. Una vez terminada la prehibridación se desecha la solución y, se añade nueva solución de hibridación junto con la sonda desnaturalizada. La hibridación se desarrolla durante 1-24 horas a la misma temperatura.

En las hibridaciones realizadas en este estudio con sondas de DNA, la temperatura de hibridación utilizada ha sido 42°C y la composición de la solución de hibridación: SSCx5, solución de Denhardt (x5), SDS 0.5% y formamida 40%. En las hibridaciones con sondas oligonucleotídicas, la temperatura también fue de 42°C, pero la composición de la solución de hibridación fue diferente: solución de Denhardt (x5); 0.9 M NaCl; 180 mM Tris-HCl, pH 8.0; 6 mM EDTA. En ambos casos, se añadieron 50 µg/ml de esperma de salmón desnaturalizado en la prehibridación y 10 µg/ml en la hibridación. En algunas de las hibridaciones se utilizó una solución de hibridación comercial (*Rapid-hyb buffer*, Amersham), que permite disminuir el tiempo de prehibridación a 15-60 minutos y el de hibridación a 1-3 horas. La temperatura de hibridación con sondas oligonucleotídicas fue también de 42°C, pero con sondas de DNA se incrementó a 60-65°C.

Transcurrido el tiempo de hibridación, la membrana se lava en solución SSCx2, SDS 0.1%, primero 15 minutos a temperatura ambiente y luego 15 minutos adicionales a la temperatura de hibridación. Se continúa con lavados en solución SSCx0.1, SDS 0.1%, 15 minutos a temperatura ambiente y 15 minutos a la temperatura de hibridación. Finalizados los lavados la membrana se seca y se analiza mediante autoradiografía.

2.6. Técnicas de secuenciación de DNA

2.6.1. Generación de deleciones unidireccionales

A continuación se describe el protocolo a seguir para generar clones delecionados unidireccionalmente de un plásmido conteniendo un inserto de 6.5 kb.

Erase-a-Base

1. Digerir 5-10 µg de plásmido con el inserto a deleccionar utilizando enzimas adecuadas para tener los extremos 5' y 3' (o en su defecto 5' rellenado con -fosfotiol dNTPs).
2. Resuspender el DNA en 60 µl de *tampón de Exo III* y calentar a 37°C (a esta temperatura, la digestión es de 450 bases/minuto). Añadir 300-500 u de Exo III, mezclar e incubar a 37°C. La reacción tarda 20-30 segundos en iniciarse.
Tampón de Exo III: 66 mM Tris-HCl, pH 8.0; 0.66 mM MgCl₂.
3. Tomar alicuotas cada 30 segundos y transferirlas a un Eppendorf con 7.5 µl de *mezcla S1*. Incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
Mezcla S1: 338 mM NaCl, 40 mM acetato potásico, pH 4.6; 1.35 mM ZnSO₄; glicerol 6.75%; 2.5 u nucleasa S1.
4. Terminar la reacción con 1 µl de solución de parada S1 (0.3 M Tris; 0.05 M EDTA) y calentar 10 minutos a 70°C. Separar 2 µl, para analizar en un gel de agarosa las deleciones.
5. Transferir las muestras a 37°C y añadir 1 µl de *mezcla de Klenow*. Incubar a 37°C durante 3 minutos.
Mezcla de Klenow: 20 mM NaCl; 100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 0.1 u fragmento Klenow.
6. Añadir 1 µl de mezcla de dNTPs (0.125 mM de cada uno). Incubar a 37°C durante 5 minutos.
7. Añadir a cada tubo 40 µl de *mezcla de ligación*. Mezclar e incubar 1 hora a temperatura ambiente.
Mezcla de ligación: 50 mM Tris-HCl, pH 7.6; 10 mM MgCl₂; 1 mM ATP; PEG 5%; 1 mM DTT; 0.01 u T4 DNA ligasa.
8. Transformar 10 µl de cada ligación en células competentes de *E. coli*. Analizar mediante electroforesis el tamaño de los plásmidos presentes en los transformantes.

El sistema *Erase-a-Base* (Promega) permite la rápida construcción de clones para secuenciar a partir de progresivas deleciones unidireccionales de un inserto de DNA clonado en un plásmido. Este sistema está basado en el protocolo desarrollado por Henikoff (1984), en el que la enzima exonucleasa III (Exo III) es utilizada para digerir DNA desde extremos 5' protuberantes o romos, dejando en cambio intactos los extremos 3' protuberantes o 5' rellenados con -fosfotiol dNTPs. La tasa uniforme de digestión de la enzima permite la aparición de una serie de deleciones de mayor tamaño a medida que se van tomando alicuotas de la reacción en el tiempo.

Para la utilización de este sistema, el fragmento de DNA de interés debe ser clonado en un vector apropiado, como lo son el pUC118/119 o el pBluescript KS(+). Al menos tiene que haber dos sitios únicos de restricción: un sitio de restricción que genere extremos romos o 5' protuberantes situado al final del inserto a deleccionar, de tal manera que la digestión de la ExoIII proceda desde este extremo hacia el interior del inserto; y un sitio de restricción que genere extremos 5' protuberantes, que se rellenará con -fosfotiol dNTPs o extremos 3' próximo al sitio de unión del iniciador para que quede protegido de la digestión por ExoIII. La digestión con Exo III es un proceso dependiente de la temperatura. Los pasos siguientes a la digestión con Exo III son el tratamiento con nucleasa S1

(eliminación de la cadena de DNA no digerida por la Exo III), el relleno de los extremos con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I, para que sea posible la ligación de los plásmidos deleccionados con la T4 DNA ligasa y la transformación de las ligaciones en *E. coli*.

2.6.2. Reacciones de secuencia

El protocolo de secuenciación por el método de los didesoxinucleótidos (ddNTPs) fue desarrollado por Sanger *et al.* (1977). Las reacciones de secuencia se han llevado a cabo con el sistema *Sequenase* (*Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit*, USB) y, consisten en la síntesis de un DNA complementario a partir del extremo 3' de un oligonucleótido o iniciador (*primer*) llevada a cabo por la T7 DNA polimerasa, en presencia de dCTP, dGTP, dTTP y [^{-35}S]dATP. Esta síntesis de DNA se detiene por la introducción de un análogo de los desoxinucleótidos (dNTPs), los didesoxinucleótidos (ddNTPs), que al carecer del grupo 3'-hidroxilo necesario para la formación de un nuevo enlace fosfodiéster, provocan la terminación específica de la elongación. Manteniendo una proporción adecuada ddNTP/dNTP en cada una de las cuatro reacciones (una con cada ddNTP), es posible provocar una detención estadística de la síntesis al nivel de cada residuo polimerizado. La separación de los productos de extensión en un gel desnaturizante permitirá determinar la secuencia nucleotídica. Los pasos del protocolo seguidos fueron:

a. Anillamiento. Hibridar el ssDNA (1 μg) con el iniciador (*primer* -20, Boehringer Mannheim) en tampón de secuenciación en un volumen de 10 μl . Incubar 2 minutos a 65°C y dejar que la temperatura descienda hasta 30°C.

b. Marcaje. Añadir al anillamiento 2 μl de mezcla de marcaje: 1 μl DTT 0.1 M, 0.5 μl [^{-35}S]dATP y 2 μl de enzima *Sequenase* (diluida 1/8). Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.

c. Terminación. Transferir 3.5 μl de la mezcla anterior a 4 tubos, previamente incubados a 37°C, que contienen 2.5 μl de la mezcla de de terminación correspondiente a cada ddNTP. Incubar 5 minutos a 37°C. Detener las reacciones con 4 μl de tampón de parada (95% formamida, 20 mM EDTA, 0.05% azul de bromofenol, 0.05% xilencianol).

2.7. Métodos de estudio del RNA

La mayor dificultad para la manipulación del RNA reside en su extrema sensibilidad a la acción de las RNasas, enzimas particularmente activas y extraordinariamente estables. Todas las manipulaciones llevadas a cabo con el RNA tienen que realizarse en ausencia de RNasas, por lo que todas las soluciones fueron preparadas en agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) al 2% y, todo el material que se utiliza fue previamente esterilizado.

2.7.1. Preparación de RNA total de *Brevibacterium lactofermentum*

Aislamiento de RNA de corinebacterias

1. Cultivar las células en 100 ml TSB a 30°C, con agitación vigorosa (250 rpm).
2. Transferir el cultivo a un tubo GSA frío y añadir 100 ml NaCl 0.9% frío. Centrifugar 5 minutos a 6.000-8.000 rpm.
3. Resuspender el precipitado celular en 3-4 ml de *mezcla de Kirby* (1% Na⁺ triisopropilnaftaleno sulfonato, 6% Na⁺ 4-amino salicilato, 6% fenol).
4. Triturar en mortero con alúmina esterilizada en el horno y nitrógeno líquido.
5. Transferir a Eppendorfs de 2.2 ml, 0.75-1 ml del lisado en polvo. Añadir 0.75-1ml *fenol-TLE* (250 ml fenol ácido + 250 ml TLE + 0.5 ml NaOH 15 N).
TLE: 0.2 M Tris-HCl, 0.1 M LiCl, 4.5 mM EDTA, pH 8.0.
6. Incubar en un baño a 50°C durante 10 minutos. Centrifugar a 12.000 rpm durante 5 minutos.
7. Recoger la fase superior y tratarla con fenol-TLE + cloroformo. Centrifugar a 12.000 rpm durante 5 minutos. Recoger la fase superior, repetir el proceso 3-4 veces hasta la eliminación de la interfase. Finalmente tratar con cloroformo.
8. Precipitar la fase acuosa a 4°C con 1/3 volumen de 8 M LiCl durante toda la noche.
9. Centrifugar a 12.000 rpm (4°C) durante 30 minutos. Lavar el precipitado con 2 M LiCl.
10. Resuspender en 600 µl de agua tratada con dietilpirocarbonato (H₂O-DEPC) al 2%. Incubar a 65°C hasta la disolución del precipitado.
11. Precipitar nuevamente con 1/3 volumen de 8 M LiCl a 4°C, al menos durante 2 horas.
12. Centrifugar a 12.000 rpm (4°C) durante 30 minutos. Lavar con 2M LiCl.
13. Resuspender en H₂O-DEPC. Incubar a 65°C hasta la disolución del precipitado celular. Determinar la concentración de RNA (1 DO₂₆₀ = 40 µg RNA). Precipitar con 0.1 volumen 3M acetato sódico, pH 5.2 y 3 volúmenes de etanol. Conservar a -20°C hasta su utilización.

El método de aislamiento de RNA descrito, se emplea habitualmente para hongos y *Streptomyces.*, en este caso se ha utilizado para la lisis de corinebacterias como procedimiento alternativo al de la Prensa de French.

2.7.2. Separación electroforética del RNA

En la electroforesis de muestras de RNA se utilizan geles de agarosa desnaturalizantes de la concentración necesaria en *tampón MOPS* (20 mM MOPS, 5 mM acetato sódico, 1 mM EDTA, pH 7.8) con formaldehído 2.2 M. Una vez preparado el gel se sumerge en una cubeta de electroforesis tratada con H₂O₂, el tampón de electroforesis empleado fue tampón MOPSx1.

Las muestras de RNA se resuspendieron en *tampón desnaturalizante* (MOPSx1, formamida 50%, formaldehído 5%), calentándose a 65°C durante 5 minutos. El colorante de electroforesis empleado se preparó concentrado x5 (Ficoll 30%, SDS 0.1%, 40 mM EDTA, azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25%) y, se añadió a las muestras en hielo después de la desnaturalización. Antes de la carga de las muestras en el gel, el gel se precalentó 30 minutos a un voltaje de 80 V. Una vez cargadas las muestras en el gel, la migración se realiza a un voltaje constante de 80-100 V.

2.7.3. Hibridación de *Northern*

Una vez que las muestras de RNA han sido sometidas a electroforesis en un gel desnaturalizante, los fragmentos de RNA se pueden transferir a una membrana de nylon (*Northern blotting*). Si en el gel desnaturalizante las muestras están duplicadas, es posible dividirlo en dos partes: una parte para tinción con EtBr y la otra para transferencia. Es conveniente lavar varias veces el gel con H₂O-DEPC para eliminar el formaldehído. Si el gel es de un porcentaje de agarosa superior al 1% y se pretenden detectar fragmentos mayores de 2.5 kb, debe lavarse el gel con 0.05 N NaOH durante 5 minutos; de esta manera se hidroliza parcialmente el RNA, aumentando la transferencia. Se lava nuevamente el gel con H₂O-DEPC durante 15 minutos y, luego se sumerge en SSCx20 durante 45 minutos. A partir de aquí todos los pasos del montaje del sistema de transferencia, así como la fijación del RNA a la membrana son idénticos a los descritos para la transferencia de DNA (*Southern*). Las condiciones de hibridación de Northern son idénticas a las de Southern.

La fijación del RNA (o DNA) a las membranas, en el caso de que no sea necesario efectuar la separación de los fragmentos por su tamaño, se puede realizar depositando las muestras de RNA (o DNA) directamente sobre la membrana colocada en un sistema de filtración al vacío (Bio-Rad), proceso conocido como *dot blotting* (Thomas, 1983).

3. Métodos relativos al estudio de proteínas

3.1. Determinación de la concentración de proteínas

La cuantificación de proteínas existentes en extractos celulares se realizó por el método de Bradford (1976), usando reactivos de Bio-Rad y siguiendo las instrucciones del fabricante. Este ensayo está basado en el cambio de absorción de 465 a 595 nm del azul de Coomassie al reaccionar con proteínas. Se utilizó ovoalbúmina (Sigma) como proteína control. Otro método alternativo utilizado para la determinación de la concentración de proteínas fue el descrito por Ehresmann *et al.* (1973).

3.2. Medida de actividades enzimáticas

3.2.1. Reacción de aminoacilación

Ensayo de la actividad de aminoacilación ArgRS

1. Las reacciones se efectúan en un volumen de 100 μ l de *mezcla de aminoacilación*. Para la ArgRS la mezcla de aminoacilación está compuesta de: 100 mM Tris-HCl; 30 mM KCl, pH 7.5; 20 mM MgCl₂; 10 mM ATP; 0.1 mM [¹⁴C]arginina (25 μ Ci·mmol); tRNA total de *E. coli* 5 mg/ml; BSA 0.1 mg/ml.
2. Precalentar 2 minutos a 37°C el tubo Eppendorf conteniendo 90 μ l de mezcla de aminoacilación.
3. La reacción se incuba a 37°C y se inicia con la adición de 10 μ l de solución enzimática (extracto crudo o fracción proteica purificada) a la mezcla de aminoacilación.
4. Extraer alicuotas de 20 μ l cada minuto y aplicarlas sobre filtros Whatmann 3MM (diámetro 6 mm).
5. Una vez extraídas todas las muestras, la eliminación de la [¹⁴C]arginina libre se realiza mediante lavados sucesivos en TCA 5%.
6. Tras esto, dos lavados sucesivos con etanol, para la eliminación del agua. Secado de los filtros en el horno.
7. Una vez secos los filtros, se colocan en viales con 200 μ l de líquido de centelleo. La incorporación de [¹⁴C]arginina se mide en el contador de centelleo.

En el curso de este trabajo, fue necesario cuantificar la actividad ArgRS. La velocidad de la reacción de aminoacilación del tRNA se determinó siguiendo el protocolo de Mans y Novelli (1961). La medida de la reacción de esterificación del tRNA para un aminoácido específico radioactivo, implica que el tRNA portando el aminoácido pueda ser aislado y separado del aminoácido libre. Esto se realiza mediante lavados sucesivos del tRNA aminoacilado precipitado sobre un soporte de papel Whatman 3MM.

Una unidad (*u*) de actividad aaRS se define como la cantidad de proteína que cataliza la incorporación de 1 nmol de aminoácido en el tRNA en un minuto. Para la realización de este cálculo es necesario determinar la cantidad de proteína total en las soluciones enzimáticas o extractos crudos utilizados.

3.2.2. Actividad β -galactosidasa

La hidrólisis de β -galactósidos puede ser fácilmente cuantificada, al tratarse de sustratos incoloros que al hidrolizarse se convierten en productos coloreados. El *o*-nitrofenil-galactósido (ONPG) es un compuesto incoloro, que en presencia de β -galactosidasa se convierte a galactosa y *o*-nitrofenol. El *o*-nitrofenol es amarillo y puede ser cuantificado por su absorción a 420 nm. Para que el ensayo sea lineal, la concentración de ONPG tiene que estar en exceso de tal manera que la cantidad de *o*-nitrofenol producido sea proporcional a la cantidad de enzima β -galactosidasa presente y al tiempo de reacción. El protocolo utilizado para cuantificar la actividad β -galactosidasa fue el descrito

por Miller (1972), de acuerdo a las modificaciones de Putnam y Koch (1975). Los resultados se dedujeron a partir de tres ensayos independientes.

Actividad β -galactosidasa

1. Inocular las cepas de *E. coli* a ensayar en 2 ml de medio LB con los aditivos necesarios. Incubar a 37°C con agitación.
2. Cuando el cultivo adquiera una $DO_{600} = 1$, añadir 10 μ l de *mezcla de lisis* a 0.5 ml de cultivo. *Mezcla de lisis*: tolueno, 0.02 M $MnSO_4$, 10% SDS, β -mercaptoetanol [1:1:1:5].
3. Transferir 20 μ l del lisado a 1 ml de *Tampón Z* a 28°C. *Tampón Z*: 60 mM $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, 40 mM $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 10 mM KCl, 1 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 50 mM β -mercaptoetanol. No autoclavar. Llevar a pH 7.0.
4. La reacción se inicia con la adición de 200 μ l de *solución ONPG* (4 mg/ml), seguida de la incubación durante 30-60 minutos. Detener la reacción con 0.5 ml de CO_3Na_2 1M.
5. Medir la absorbancia a 420 y 550 nm.

Las unidades de β -galactosidasa vienen dadas por la formula:

$$u = \frac{DO_{420} - 1.75 DO_{550}}{t \cdot v \cdot DO_{600}}$$

DO_{420}/DO_{550} , absorbancias de la reacción. La DO_{550} corresponde a la densidad óptica de las células, a descontar del valor DO_{420} . El factor de corrección para *E. coli* es $DO_{420} = 1.75 \cdot DO_{550}$.

DO_{600} , refleja la densidad celular del cultivo ensayado

t, tiempo de reacción (en minutos)

v, volumen de cultivo utilizado en el ensayo (en ml)

3.3. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes

El SDS es un detergente iónico que disocia las proteínas oligoméricas en sus monómeros y rompe los enlaces de hidrógeno e hidrófobos entre los polipéptidos. El SDS desenrolla la estructura tridimensional de las proteínas y les confiere, por su fijación uniforme, una carga negativa proporcional a la longitud de la cadena polipeptídica. Los geles de poliacrilamida utilizados costaban de dos fases, una superior o *Pregel* (*stacking gel*) de pH 6.5, y otra inferior *Gel de separación* (*separating gel*) con un pH mayor. La electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10-15% se realizó según el método de Laemmli (1970).

Para la preparación de un gel de poliacrilamida al 10% desnaturalizante en una cubeta *Mini-Protean* (Bio-Rad), se preparan las siguientes soluciones:

	PREGEL	GEL DE SEPARACION
Solución 30-0.8% (p/v) acrilamida/bis-acrilamida	1.3 ml	5.00 ml
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	2.5 ml	-----
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	-----	3.75 ml
SDS 10%	0.1 ml	0.15 ml
H ₂ O	6.1 ml	5.25 ml
TEMED	10 µl	4 µl
Persulfato amónico 10%	50 µl	50 µl

Del gel de separación se vierten 3.4 ml en la cubeta, de manera que quede espacio suficiente para el pregel. El gel de separación se cubre con 1 ml de agua y, se deja polimerizar. Una vez polimerizado se lava abundantemente con agua y se rellena el espacio restante con el pregel, colocando el peine adecuado.

Las muestras de proteínas se someten a un tratamiento de disociación, hirviéndolas durante 5-10 minutos con 0.25 volumen de *tampón de carga* (400 mM Tris-HCl, pH 6.8; 4% SDS; 4% -mercaptoetanol; 30% glicerol; 0.05 M azul de bromofenol).

Una vez completamente polimerizado el gel y preparadas las muestras se monta el sistema de electroforesis y se añade el *tampón de electroforesis* (25 mM Tris, 192 mM glicina, SDS 0.1%, pH 9.2). La migración de las muestras se realiza a una intensidad constante entre 15-30 mA.

La tinción del gel se realiza con una *solución de Azul de Coomassie* (Azul de Coomassie 1 g/l, metanol 50%, ácido acético 0.1%) (Diezal *et al.*, 1972). Para la decorolación se utiliza una solución de ácido acético 7% y etanol 5%.

3.4. Preparación de proteínas

3.4.1. Preparación de extractos crudos de *E. coli*

Los cultivos bacterianos (500 ml) se crecen en agitación vigorosa durante 16 horas a 37°C en el medio de cultivo apropiado. Los cultivos se recogen por centrifugación durante 5 minutos a 5.000xg y el precipitado celular se resuspende en 10 ml de *tampón de lisis* (100 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, pH 8.0) Para la lisis, se utilizó un sonicador Ultrasons-Annemasse 250TS20K. El tamaño de la sonda del sonicador depende de la cantidad de células y del tipo de tubo a utilizar: para volúmenes de 1-2 ml es conveniente utilizar la sonda de 3 mm de diámetro y 40 V; para volúmenes entre 5-10 ml, la sonda de 5 mm de diámetro y 100 V. Los pulsos de sonicación fueron de 20-30 segundos hasta la clarificación del lisado celular. En todo momento se evitó que el lisado alcanzase

temperaturas elevadas. Para eliminar los restos celulares, es suficiente con una centrifugación durante 10 minutos a 6.000-12.000xg; en el caso de que sea necesario eliminar los ribosomas de la preparación, esto se puede conseguir mediante centrifugación a 105.000xg, con un rotor Beckman Ti60 a 45.000 rpm durante 2-3 horas.

El extracto celular libre de ribosomas puede dializarse durante toda la noche a 4°C, para su concentración y conservación a -20°C. El tampón de diálisis utilizado fue 50 mM Tris-HCl, pH 7.5; glicerol 60%; 1 mM MgCl₂; 0.1 mM EDTA.

3.4.2. Preparación de extractos crudos de *B. lactofermentum*

La lisis de corinebacterias resulta dificultosa debido a la presencia de ácidos micólicos en la pared celular de estas bacterias. La sonicación es un buen método para la obtención de extractos celulares de corinebacterias, a partir de cultivos crecidos generalmente en TSB durante 18-24 horas a 30°C con agitación. El método descrito en el apartado anterior es perfectamente aplicable a corinebacterias.

Otro método ampliamente utilizado para lisar corinebacterias, está basado en las altas presiones que se alcanzan en la prensa de French (SLM Instruments). El precipitado celular se resuspende en *tampón de lisis TENS* (20 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 100 mM NaCl; SDS 1%) procurando que la solución quede densa y sin burbujas. Posteriormente se somete a las células a una presión de 15.000 psi (libra/pulgada²) haciéndolas pasar lentamente por el poro de la prensa. El lisado celular se congela inmediatamente en nitrógeno líquido y se puede conservar a -70°C hasta su utilización.

3.4.3. Extracción rápida de proteínas mediante la lisis de bacterias con SDS

Este método fue descrito por Stanley (1983). Las células de un cultivo de 1-1.5 ml crecido hasta el final de la fase exponencial se recogen por centrifugación durante 5 minutos a 12.000xg. El precipitado celular se resuspende en 100 µl de tampón de lisis (25 mM Tris, 192 mM glicina, SDS 0.5%, pH 9.2). La suspensión celular se somete a ciclos sucesivos de congelación/descongelación y posteriormente se incuba a 100°C durante 5-10 minutos. Los restos celulares se eliminan por centrifugación a 12.000xg durante 10 minutos. A 50 µl del sobrenadante se le añaden 15 µl de tampón de carga y, 8 µl de esta mezcla son suficientes para el fraccionamiento de las proteínas en un gel de poliacrilamida desnaturalizante.

3.5. Expresión de la proteína arginil-tRNA sintetasa

De los múltiples sistemas de expresión de proteínas, se empleó el plásmido pTG908 (Figura 5.7) construido por Transgene (Courtney *et al.*, 1984). Este vector permite la expresión inducida por temperatura: las secuencias clonadas se colocan bajo el control del promotor P_L del

bacteriófago , cuya transcripción está reprimida por el represor C_I que es termosensible. La inducción térmica a 37°C inactiva el represor C_I permitiendo la transcripción a partir del promotor P_L del fago . Al clonar el gen de interés en fase con el promotor C_{II} del fago , se produce una proteína de fusión con los 13 primeros aminoácidos del gen C_{II} . La utilización de este vector requiere la transformación de la cepa de *E. coli* TGE900, que contiene el represor C_I con una mutación termosensible.

Para la expresión de la proteína ArgRS de *B. lactofermentum*, un cultivo de *E. coli* TGE900 [pULJS84], cepa que contiene el gen *argS* de *B. lactofermentum* clonado en el plásmido pTG908 en fase con el promotor C_{II} del fago (Figura 5.7), se crece a 30°C con agitación vigorosa durante 3-4 horas hasta una $DO_{595} = 0.5$. Una vez alcanzada esta densidad óptica, se procede a la inducción de la expresión de la proteína ArgRS incubando los cultivos a 37°C durante toda la noche. Como control negativo de la expresión, se utiliza un cultivo de *E. coli* TGE900 [pTG908], en las mismas condiciones descritas. Una vez expresada la proteína, se procede a la preparación de los extractos crudos.

3.6. Purificación de la proteína recombinante DtxR

La proteína DtxR recombinante de *B. lactofermentum* fue purificada a partir de extractos crudos de la cepa de *E. coli* DH10B [pULJSX4], mediante cromatografía de inmunoafinidad. El plásmido pULJSX4 contiene el gen *dtxR* de *B. lactofermentum* y, previamente se había observado la expresión de este gen en *E. coli* a partir de su propio promotor.

Para la preparación de las columnas de inmunoafinidad, 2 mg de anticuerpos IgG anti-DtxR purificados (Tao y Murphy, 1992) fueron inmovilizados en 2 ml de gel AminoLink mediante el *Ag/Ab Immobilization Kit*, de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Pierce, Rockford, Illinois, USA).

La cepa de *E. coli* DH10B [pULJSX4] se creció a 37°C en 1 litro de medio LB+Ap durante 14 horas. Las células se recogieron por centrifugación y el precipitado celular se resuspendió en 20 ml de 0.1 mM Tris-HCl, pH 7.5. La suspensión celular se lisó en la prensa de French a 14.000 psi. El lisado celular fue centrifugado a 30.000xg, durante 30 minutos a 4°C para eliminar los restos celulares.

El lisado clarificado se aplicó a la columna de inmunoafinidad anti-DtxR, que había sido previamente equilibrada con 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5. Seguidamente se lavó con un tampón de lavado (1 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5) para la eliminación de sales y proteínas no unidas a la columna. La elución de la proteína recombinante DtxR de *B. lactofermentum* se realizó con 50mM glicina-HCl, pH 2.8, recogiendo fracciones de 1 ml que se neutralizaron inmediatamente con 40 μ l de 1M Tris-HCl, pH 9.5. Todos los pasos de la purificación se realizaron a 4°C. Las fracciones conteniendo la proteína DtxR recombinante de *B. lactofermentum* fueron identificadas mediante SDS-PAGE e inmunodetección.

3.7. Inmunodetección de la proteína DtxR

Las proteínas fraccionadas mediante SDS-PAGE se transfirieron a membranas de PVDF (Millipore, Bedford, Massachussets, USA) utilizando el *Mini-Protean Blotting System* (Bio-Rad), en

un *tampón de transferencia* (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol, pH 9.2) en un campo eléctrico de 200 V durante 2 horas a 4°C.

Después de la transferencia la membrana conteniendo las proteínas, se saturó mediante el tratamiento durante un mínimo de 30 minutos con una solución de BSA al 4%. Para la inmunodetección se incubó la membrana con una dilución 1:3.000 de suero anti-DtxR de *C. diphtheriae*, seguida de tratamiento con anticuerpos anti-IgG de conejo conjugados con fosfatasa alcalina (Promega). El resultado de la inmunodetección se observó mediante revelado con NBT/BCIP utilizando el *ProtoBlot AP system* (Promega) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

3.8. Análisis de la interacción DtxR-región *toxPO*

3.8.1. Retraso en geles

Un método comúnmente empleado para el análisis de interacciones proteína-DNA es el retardo (disminución de la movilidad electroforética) observado en geles de poliacrilamida entre la proteína libre y la proteína unida a una región de DNA específica (*gel electrophoresis mobility shift assay*). Cuando la proteína y el DNA interactúan la movilidad electroforética es menor, y por tanto se observa un retraso del complejo con respecto a la proteína libre en geles de poliacrilamida.

La unión de la proteína DtxR a la sonda [³²P]*toxPO*, se llevó a cabo en un volumen de 16 µl de *mezcla de reacción* (20 mM Tris-HCl, pH 7.5; 5 mM MgCl₂, 40 mM KCl; 2 mM DTT; 125 µM MnCl₂; glicerol 10%; 1 µg poli (dI-dC); 5 µg BSA; proteína DtxR purificada y, 3-5 fmol de sonda [³²P]*toxPO*. La sonda conteniendo la región *toxPO* se marcó radioactivamente mediante rellenado del extremo 3' con [³²P]dATP, siguiendo los procedimientos habituales. En los ensayos de competición la sonda sin marcar se añadió a la mezcla de reacción 10 minutos antes de la adición de la sonda marcada. En los ensayos de neutralización con anticuerpos anti-DtxR, las reacciones se preincubaron con el antisuero durante 2 horas a 4°C antes de la adición de la sonda *toxPO* marcada. En todos los casos, una vez añadida la sonda marcada, la mezcla de reacción se incubó durante 15 minutos a 25°C.

Para el fraccionamiento de las reacciones, se utilizó un gel de poliacrilamida al 7% en el tampón: 40 mM Bis-Tris borato, pH 7.5; 125 µM MnCl₂; glicerol 2.5%. La electroforesis se realizó en el mismo tampón que el gel, sin adición de glicerol, a un voltaje constante de 200 V. Después de la electroforesis, se procedió al secado de los geles y análisis mediante autoradiografía.

3.8.2. Protección de la digestión por DNasa I

Para la localización del sitio de unión en el DNA de alguna proteína, se emplean las técnicas de protección (*footprinting*): la formación de un complejo proteína-DNA impide el ataque por nucleasas en el sitio de unión. La endonucleasa DNasa I hidroliza el DNA preferiblemente en lugares adyacentes a nucleótidos de pirimidina.

La región reguladora *toxPO* contenida en el plásmido pRS551 *toxPO*/VN1200 (Boyd *et al.*, 1990) se digirió con *Bam*HI y *Eco*RI y, fue subclonada en el pBluescript KS(+), generando el plásmido pBS23/*toxPO*. El fragmento de DNA correspondiente a la región reguladora se extrajo del plásmido pBS23/*toxPO* mediante digestión con *Bss*HIII. Este fragmento de DNA se rellenó en ambos extremos con [³²P]dCTP, [³²P]dGTP y el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I. La sonda marcada se digirió con *Sac*I o *Xho*I para la eliminación de uno de los dos extremos marcados, según se fuese a analizar la cadena codificante o no codificante, respectivamente. Las reacciones de protección a la digestión con DNasa I se llevaron a cabo de acuerdo a los protocolos publicados (Ausubel *et al.*, 1988). La proteína DtxR purificada se pre-incubó con 20.000 cpm del fragmento *toxPO* marcado en un extremo, en un volumen de 38 µl de *mezcla de reacción* (20 mM Tris-HCl, pH 7.5; 5 mM MgCl₂; 40 mM KCl, 2 mM DTT, glicerol 10%; 5 µg BSA y, 100 µM NiCl₂·6H₂O como fuente de iones metálicos divalentes. Después de 40-60 minutos de incubación a 25°C, se añadió a la mezcla de reacción 2 µl de solución conteniendo 0.34 ng de DNasa I (Boehringer Mannheim) y, la mezcla se incubó durante 5 minutos a 25°C. La reacción de digestión se detuvo mediante la adición de 60 µl de *tampón de parada* (acetato sódico 0.5 M, pH 5.2; 20 mM EDTA; 75 µg/ml tRNA). Los ácidos nucleicos se precipitaron con etanol y, después del secado en vacío, el precipitado se resuspendió en tampón de carga conteniendo 98% formamida. Las muestras se calentaron a 90°C durante 5-10 minutos e inmediatamente se colocaron en hielo. Para la resolución de los patrones de protección a la digestión con DNasa I, las muestras se sometieron a electroforesis en un gel de secuencia desnaturizante al 8%, tras lo cual se secó el gel para su posterior análisis mediante autoradiografía.

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS: Factores sigma en corinebacterias

Para el conocimiento de los mecanismos de control de la expresión génica en corinebacterias, un primer requisito es clarificar las maquinarias que toman parte en la expresión génica. La etapa inicial del proceso de expresión génica es la transferencia de la información contenida en los genes al RNA mensajero, por lo que resulta de particular importancia el estudio de las maquinarias de transcripción. La especificidad de la transcripción en eubacterias está determinada por las distintas holoenzimas que forma la RNA polimerasa, en las cuales los factores sigma desempeñan un papel central para el reconocimiento de los sitios de iniciación o promotores. Por lo tanto, la caracterización de las holoenzimas que forma la RNA polimerasa de corinebacterias, en particular de sus factores sigma principales, es un punto esencial en el conocimiento de los mecanismos de iniciación de la transcripción en corinebacterias.

1. Clonación de genes *rpoD* de *Brevibacterium lactofermentum*

Para la clonación de factores sigma principales de *B. lactofermentum* se utilizaron como sondas de hibridación: fragmentos de DNA de 1.16 kb *SalI*-*ApaI* del gen *hrdB* de *Streptomyces griseus* y 1.0 kb *ApaI* del gen *hrdT* de *S. griseus* (Marcos *et al.*, 1995), así como un oligonucleótido sintético "RpoD box" de 20 bases, modificado de acuerdo con el uso de codones en corinebacterias. El oligonucleótido "RpoD box" se diseñó a partir del subdominio B (subregiones 2.3 y 2.4), altamente conservado en los factores sigma principales de *E. coli* y *B. subtilis* (Figura 3.1), y que había resultado efectivo previamente en la identificación de múltiples genes *rpoD* homólogos para factores sigma principales en diferentes eubacterias: *Streptomyces*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* (Tanaka *et al.*, 1988).

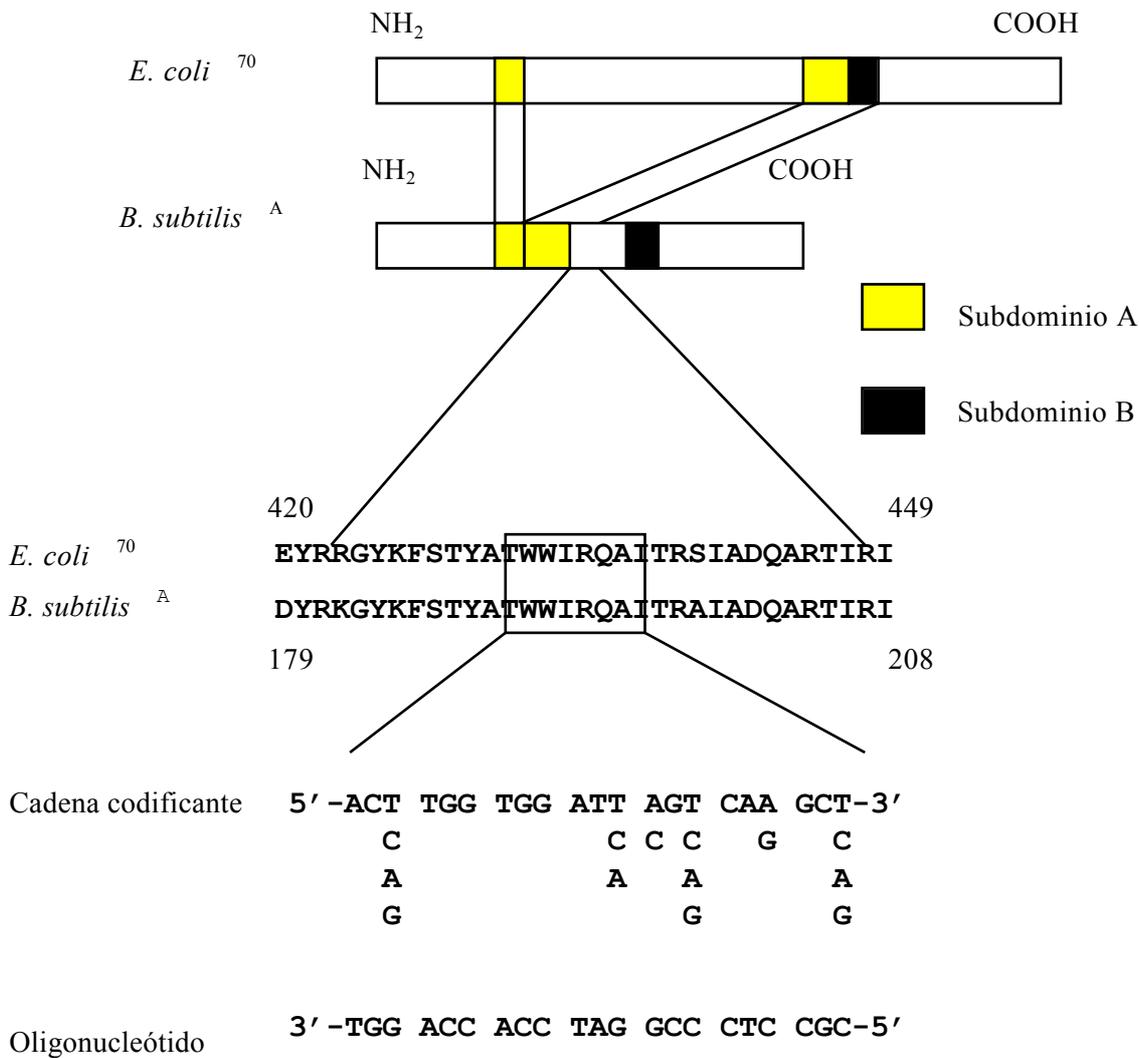


Figura 3.1. Diseño del oligonucleótido sintético "RpoD box" a partir del alineamiento de los factores sigma principales de *E. coli* y *B. subtilis*. Las dos regiones altamente conservadas, subdominios A y B están indicadas. El oligonucleótido "RpoD box" se diseñó a partir de la región señalada del subdominio B, teniendo en cuenta el uso de codones en corinebacterias.

Las sondas anteriores se marcaron radioactivamente y, fueron hibridadas por separado con DNA total de *B. lactofermentum* digerido con distintas enzimas de restricción (Figura 3.3). En las hibridaciones realizadas con las sondas *hrdB* y *hrdT*, se observan en todas las digestiones del DNA total de *B. lactofermentum* dos bandas de hibridación (Figura 3.3a). Cuando se utilizó como sonda el oligonucleótido "RpoD box" se detectaron cuatro señales de hibridación *rpoD* diferentes (Figura 3.3b). Dos de estas bandas de hibridación *rpoD* estaban en correspondencia con las previamente obtenidas en las hibridaciones con las sondas *hrdB* y *hrdT* de *S. griseus*, pero las otras dos bandas *rpoD* eran completamente diferentes. Estos resultados indicaban que el cromosoma de *B. lactofermentum* contiene cuatro posibles genes homólogos *rpoD* (Oguiza *et al.*, 1995b) y, dos de ellos estarían próximamente relacionados con los genes *hrdB* y *hrdT* de *S. griseus*. También se identificaron dos

señales de hibridación con las sondas *hrdB* y *hrdT* de *S. griseus* en hibridaciones del DNA total de *Corynebacterium glutamicum* digerido con diferentes enzimas de restricción (Figura 3.2).

Posteriormente una genoteca de DNA total de *B. lactofermentum* construida en el cósmido Cos4 (Correia *et al.*, 1995) se hibridó con las mismas sondas anteriores, lo que permitió el aislamiento de una serie de cósmidos positivos. A partir del cósmido pULAC5A2, que presentaba hibridación positiva en todos los casos independientemente de la sonda utilizada, fue posible identificar dos bandas de hibridación de 1.6 y 2.4 kb *Hind*III. Estas dos bandas *Hind*III eran idénticas a las observadas en las hibridaciones previas con DNA total de *B. lactofermentum* digerido con *Hind*III (Figura 3.3), lo que a su vez demostraba que no había ocurrido reorganización del DNA en el cósmido pULAC5A2. La disposición próxima en el cromosoma de dos genes que codifican factores sigma, no está restringida a corinebacterias; también ha sido observada para los genes *mysA* y *mysB* de micobacterias, que codifican factores sigma principales y están separados por una región intergénica de 3.5 kb en *Mycobacterium smegmatis* y de 3.8 kb en *M. tuberculosis* (Predich *et al.*, 1995).

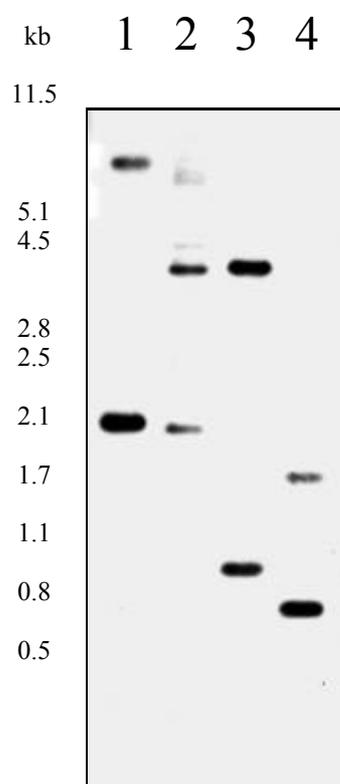


Figura 3.2. Hibridación con las sondas *hrdB* o *hrdT* de *Streptomyces griseus* de DNA total de *Corynebacterium glutamicum* digerido con *Pvu*II (línea 1), *Sal*I (línea 2), *Eco*RV (línea 3) y *Hind*III (línea 4). El tamaño de los marcadores de peso molecular se indica en kb.

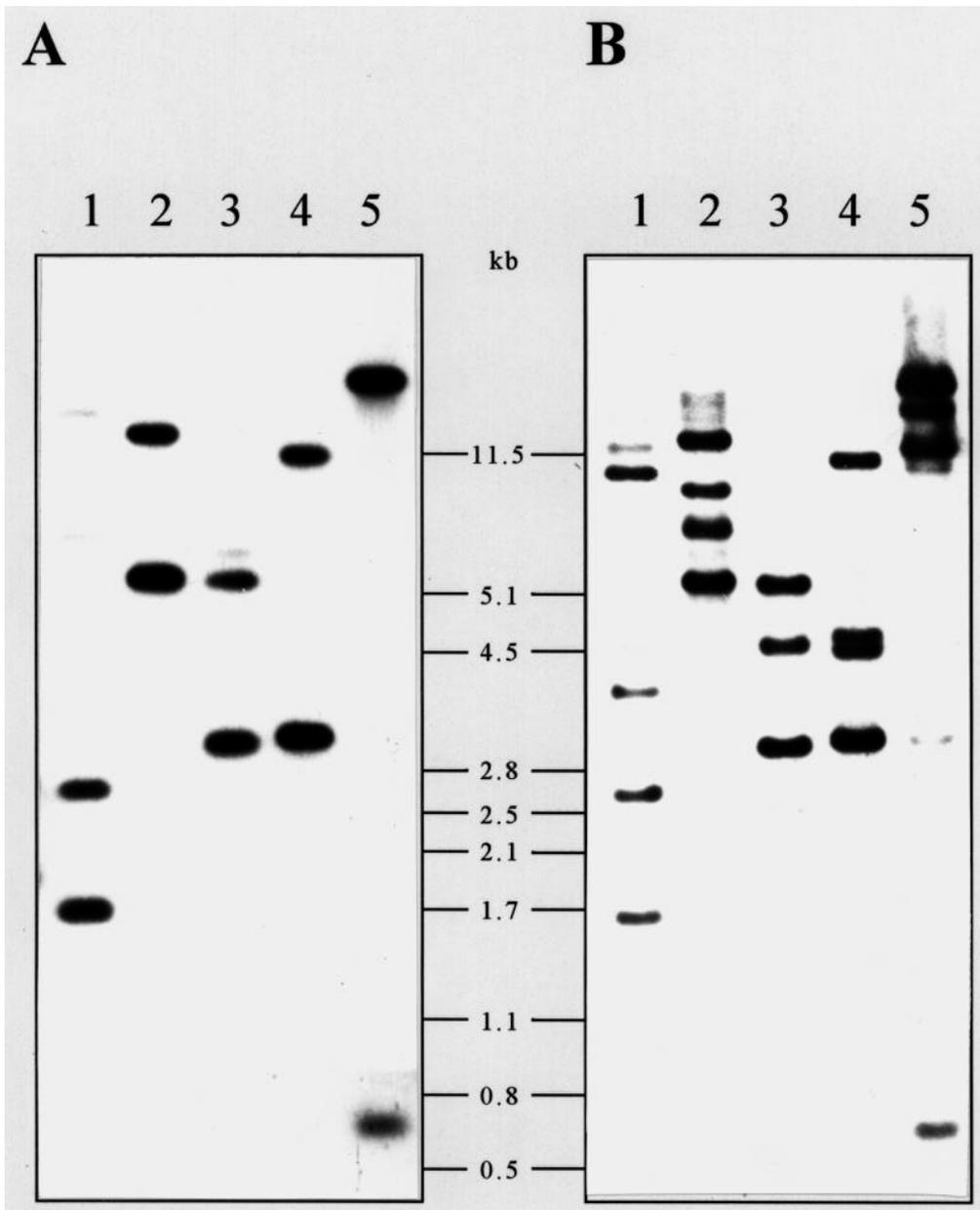


Figura 3.3. Hibridaciones de DNA total de *Brevibacterium lactofermentum* digerido con *Hind*III (línea 1), *Eco*RV (línea 2), *Sal*I (línea 3), *Pvu*II (línea 4) y *Xho*I (línea 5), utilizando como sondas: **a.** el gen *hrdB* o *hrdT* de *Streptomyces griseus*, **b.** el oligonucleótido "RpoD box". Entre los paneles se indica los tamaños de los marcadores de peso molecular en kb.

2. Identificación del gen *sigA* de *B. lactofermentum*

El fragmento de restricción correspondiente a la banda de hibridación *Hind*III de 1.6 kb del cósmido pULAC5A2 se subclonó en el vector pUC119 dando lugar al plásmido pULJS92 (Figura 3.4). La secuenciación del inserto de DNA clonado en este plásmido reveló la presencia de un marco de lectura abierto (ORF), con una homología significativa a factores sigma principales. Debido a que este ORF estaba incompleto en el plásmido pULJS92, se subclonó en el vector pBluescript KS(+) un fragmento de 2.5 kb *Eco*RV-*Sal*I procedente del cósmido pULAC5A2 originando el plásmido pULJS25 (Figura 3.4). La secuenciación en ambas orientaciones del fragmento de DNA de 3.5 kb *Eco*RV-*Hind*III comprendido entre los plásmidos pULJS25 y pULJS92 permitió la localización de un ORF de 1494 bp (Figura 3.5), que codificaba una proteína de 497 aminoácidos y Mr 54.8 kDa.

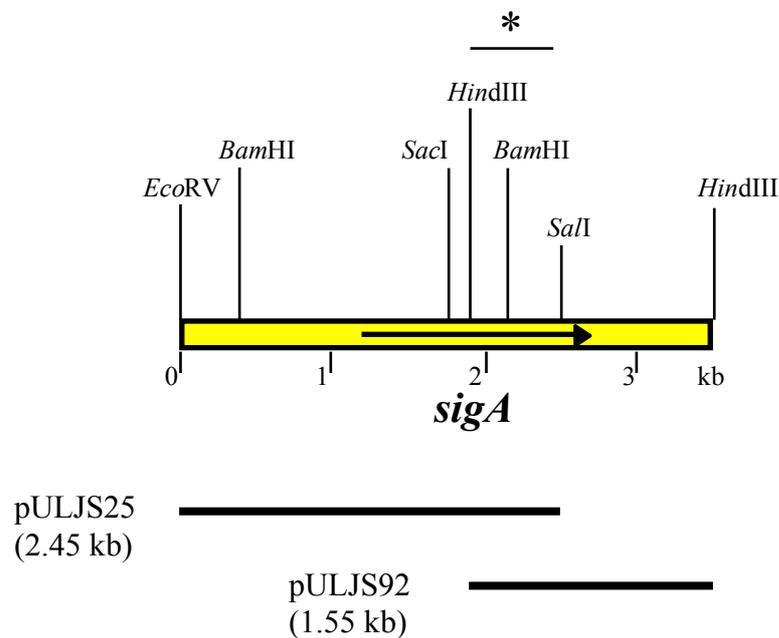


Figura 3.4. Mapa físico del fragmento de DNA *Eco*RV-*Sal*I de 3.5 kb conteniendo el gen *sigA* de *Brevibacterium lactofermentum*. Las líneas indican el tamaño de los fragmentos de DNA clonados en los plásmidos pULJS25 y pULJS92. La región señalada con un asterisco corresponde al fragmento interno al gen *sigA* utilizado como sonda de hibridación en los experimentos de *Northern*.

1
GATATCGGTGGCTCCGGCATCAAAGGCGCCCGGTTAACCTTAAGACCGGTGAGTTTATTGATGAACGCATAAAAATCGCCACCCCGAAGCCAGCAACCC
101
CAGAGGCTGTGCGCGAAGTAGTCGCAGAGATTATTTCTCAAGCCGAATGGGAGGGTCCGGTCCGGAATTACCTGCGCTGTGTGTTCCGGGCAGATCGC
201
GCTATCCGCAGCCAACTTGTGACAAGTCTGGATCGGCACCGATGTGCACGAACCTTTTGGACCGCCACCTAAATGGCCGAGAGATCACCGTCTCAATGACG
301
CAGAGCCGCCGCATCGCCGAAGCAACCTTTGGCAACCTGCCGCACGCGAAGGGCAGTCTACCTGCTGACCTTGGTACAGGTATTGGATCCGCATTCTC
401
TGTGGATGGCCAACCTGTTCCCAACACAGAATCGGTACATGATCGTTGACGGCGAGGAAGCAGAACACCTTGCAGCAGCAGCCGTCAAAGAAAACGAA
501
GATCTGTCATGGAAGAAATGGGCGAAGCACCTGAACAAGGTGCTGAGCGATCGAGAAACTTTTCTCCCATCCGTCTTCATCATCGGTGGCGGAATTTCC
601
AGAAGCACGAAAAGTGGCTTCCATTGCTGGAAGTACACTGACACTGACATTGTCCAGCTGACGTGCGCAATCGAGCCGGAATCGTAGGAGCTGCCATGGCAGT
701
AAACCAACACCTCACCCATAAGTTATCGAAAGGTGATTTTTGCCAGGGTCTTGATTACAACGCGCCTTGCTGTAGGAAAAACAGGCCCTTTGTGAC
801
ATCGGCGCAGTTGTTCAACTATAATGGAACGCTGATCGTGGACAAGAGTTAACCATGAGATTGATTCACCCCTTTAAGCCTCCAAGAAGTAGTTGACTC
901
AACGCATTTCCGGCATTAAAAAAGCCGAGAGCAAATGAGACTTTCCAGGAGAAGGCACCAGGGACATGAACAATTGATCGGCTGACCAACTCTATAAGAG
1001
ATGCACCTCAAGTTGGGGATACTTATTCGGCGTTTGGGGAACAAATACGTTTCCGTTTGTGTATATAGGTATTTCGCACTTAAGAACTCTCTCA
1101
TGGAAAGAAGCTAGGCGGAAAGGGCGTTAAGT**-35** **TTGCCA**TTTAACTCCTCAGCATCA**-10** **TCGGAT**CAGTCGGAGATGTCGATGAAAATGCAC**AGGAG**CCG
sigA  V

1201
TGGAGAGCAGCATGGTAGAAAACAACGTAGCAAAAAAGACGGTCGCTAAAAAGACCGCAGCGCAAGACCGCAGCGCAAAGCAGCCCGCGCGTGGCAACCC
E S S M V E N N V A K K T V A K K T A R K T A R K A A P R V A T P
1301
ATTGGAGTCGCATCCCATTTCCGGCCACCCCTGCGCGCAGCATCGATGGAACCTCAACCCCTGTTGAAGCTGCTGACACCATAGAGACCACCGCCCTGCA
L E S H P I S A T P A R S I D G T S T P V E A A D T I E T T A P A
1401
CGAAGGCTCCTGCGGCCAAGGCTCCCGCTAAAAAGGTTGCCAAGAAGACAGCTCGCAAGGCACCTGCGAAAAAGACTGTGCGCAAGAAGGCCACACCCG
A K A P A A K A P A K K V A K K T A R K A P A K K T V A K K A T T A
1501
CCAAGGCTGCACCTGCAACTGCCAAGGACGAAAACGCACCTGTTGATGACGACGAGGAGAACCTCGCTCAGGATGAACAGGACTTTCGACGGCGATGACTT
K A A P A T A K D E N A P V D D D E E N L A Q D E Q D F D G D D F
1601
CGTAGACGGCATCGAAGACGAAGAAGATGAAGATGAAGACGGCGTGAAGCCCTCGGTGAAGAAAGCGAAGACGACGAAGAGGACGGCTCATCCGTTTGG
V D G I E D E E D E D E D G V E A L G E E S E D D E E D G S S V W
1701
GATGAAGACGAATCCGCAACCCCTGCGTCAGGCACGTAAAGATGCCGAGCTCACCGCTTCCGCCGACTCTGTTGCGGCTTACCTGAAGCAAAATCGGTAAAG
D E D E S A T L R Q A R K D A E L T A S A D S V R A Y L K Q I G K V
1801
TTGCCCTGCTGAACGCTGAACAGGAAGTCTCCCTGGCAAAGCGCATCGAAGCAGGCCCTTACGCCACCCACCGCATGGAGGAAATGGAAGAAGCTTTCGC
A L L N A E Q E V S L A K R I E A G L Y A T H R M E E M E E A F A
1901
AGCCGGTGACAAGGACGCGAAACTCACCCAGCCGTCAAGCGTGACCTCCGCGCCATCGCTCGTGACGGCCGAAGGCGAAAAACCACCTCCTGGAAGCC
A G D K D A K L T P A V K R D L R A I A R D G R K A K N H L L E A
2001
AACCTTCGTCTGGTTGTCTCCCTGGCAAAGCGCTACACCGGCCGTGGCATGGCATTCTGGACCTCATCCAGGAAGGCAACCTCGGTCTGATTCTGTGCCG
N L R L V V S L A K R Y T G R G M A F L D L I Q E G N L G L I R A V
2101
TAGAGAAGTTCGACTACTCCAAGGGTACAAGTTCTCCACCTATGCAACCTGGTGGATCCGTCAGGCAATCACCCGCGCCATGGCAGACCAAGCACGAAC
E K F D Y S K G Y K F S T Y A T W W I R Q A I T R A M A D Q A R T
2201
CATCCGTATCCAGTCCACATGGTTGAAGTGAATCAACAACTTGGTTCGATCCAACGTGAACCTTTCAGGAACCTCGGCCGGAACCAACCCACAGGAA
I R I P V H M V E V I N K L G R I Q R E L L Q E L G R E P T P Q E
2301
CTGTCCAAAGAAATGGACATCTCCGAGGAAAAGTACTGAAAATCCAGCAGTACGCCCGCAACCAATCTCCCTGGACCAAAACCATCGGCGACGAAGGCG
L S K E M D I S E E K V L E I Q Q Y A R E P I S L D Q T I G D E G D
2401
ACAGCCAGCTCGGCGACTTCATCGAAGACTCCGAAGCCGTCGTCGAGTTCGACGCGCTCCTTACCCTGCTGCAAGACCAGCTACAGGACGTCCTAGA
S Q L G D F I E D S E A V V A V D A V S F T L L Q D Q L Q D V L E
2501
GACCCTCCTCCGAACGTGAAGCCGGCGTGGTTAAACTCCGCTTCGGACTCACCGACGGAATGCCACGCACTTTAGACGAAATCGGCCAAGTTTACGGTGTG
T L S E R E A G V V K L R F G L T D G M P R T L D E I G Q V Y G V
2601
ACCCGTGAGCGCATCCGCCAGATTGAGTCCAAGACCATGTCTAAGCGGCGCCACCCATCACGCTCCCAGGTTCTTCGCGACTACCTGGACTAAAACCCCA
T R E R I R Q I E S K T M S K R R H P S R S Q V L R D Y L D ***
2701
GTCGGGCTCAAGACCGGGCCGCACTGTTTTCTCTGCGGGAAACGGTGGTGGCCGGTTTTTCTGTTGCTTTGGTTCCGGCTGGTACAGTTCCGGTGGG
2801
GTGTTTTAAGTTTGAATTTACATTGCCGATTTCTTAACGCCGAGTTCTCGGATTCGAGACCTTACCTGCAATTTACGGTTACAATTTCTCGTTAGCACT

Figura 3.5. Secuencia de nucleótidos del gen *sigA* de *B. lactofermentum* y regiones adyacentes. Se indican las secuencias promotoras -35 y -10 y, un posible sitio de unión a ribosomas (RBS). Los asteriscos representan codones de terminación. El número de acceso en la base de datos EMBL es Z49822.

Precediendo al potencial codon de inicio (GTG) se encontraron secuencias similares a las consenso -35 y -10 de *E. coli* y a posibles sitios de unión a ribosomas (RBS) (Figura 3.5). La secuencia de aminoácidos deducida de este marco de lectura abierto presentó altos valores de similaridad con factores sigma principales de microorganismos relacionados (Tabla 3.1).

Tabla 3.1
Identities of SigA with other factors (% of amino acids identical)

<i>M. smegmatis</i>	MysA	69.9%	Predich <i>et al.</i> , 1995
<i>M. smegmatis</i>	MysB	57.4%	Predich <i>et al.</i> , 1995
<i>S. coelicolor</i>	HrdB	60.9%	Buttner <i>et al.</i> , 1990
<i>S. aureofaciens</i>	HrdB	58.2%	Kormanec <i>et al.</i> , 1992
<i>S. griseus</i>	HrdB	57.9%	Marcos <i>et al.</i> , 1995
<i>S. griseus</i>	HrdT	51.9%	Marcos <i>et al.</i> , 1995

El alineamiento de este posible factor sigma de *B. lactofermentum* con las proteínas HrdB de *S. coelicolor* y MysA de *M. smegmatis* mostraba las regiones conservadas en los factores sigma de la familia Sigma-70 (Figura 3.11), indicando que esta proteína de *B. lactofermentum* desempeñaba una función similar a las de micobacterias y *Streptomyces*. De lo anterior se podía concluir que este gen codificaba un factor sigma de *B. lactofermentum* y, siguiendo la terminología empleada para otros factores sigma de bacterias Gram-positivas se denominó *sigA*.

3. Identificación de la región ORF1-*sigB-dtxR-galE* de *B. lactofermentum*

Por otra parte, el fragmento de restricción correspondiente a la banda de hibridación *Hind*III de 2.4 kb del cósmido pULAC5A2 se subclonó en el vector pBluescript KS(+) originando el plásmido pULJSH7 (Figura 3.6). Este plásmido presentaba un ORF incompleto, por lo que fue necesaria la subclonación de un fragmento de 4.4 kb *Eco*RV-*Sal*I que solapaba con el anterior, dando como resultado el plásmido pULJSX4 (Figura 3.6). Al determinarse la secuencia nucleotídica en ambas orientaciones del fragmento de DNA de 5.3 kb *Hind*III-*Sal*I contenido entre los plásmidos pULJSH7 y pULJSX4 (Figura 3.6) se identificaron cuatro ORFs: ORF1, ORF2, ORF3 y ORF4 (Figura 3.7).

ORF1 constaba de 435 bp y codificaba un producto de 144 aminoácidos y Mr 15.1 kDa. La presencia de un potencial RBS adjacente al codon de inicio de la transcripción de ORF1 (Figura 3.7), sugiere que este ORF probablemente es traducido en proteínas. La secuencia de aminoácidos deducida de ORF1 presentaba una homología significativa con dos proteínas de función desconocida: la proteína o145 de *E. coli* localizada en el cromosoma de *E. coli* entre los minutos 87.2 y 89.2 (34.2% aminoácidos idénticos) (Plunkett *et al.*, 1993) y, la proteína ORF1 de *Streptococcus equisimilis* H46A en la región de la estreptoquinasa (41.1% aminoácidos idénticos) (Mechold *et al.*, 1993) (Figura 3.8). En la región intergénica entre ORF1 y ORF2 también se han encontrado estructuras secundarias en el mRNA, sin tallos de poli-Us, que podrían actuar como terminadores o atenuadores transcripcionales, tal como ha sido descrito previamente en *Streptomyces* (Deng *et al.*, 1987; Ingham *et al.*, 1995).

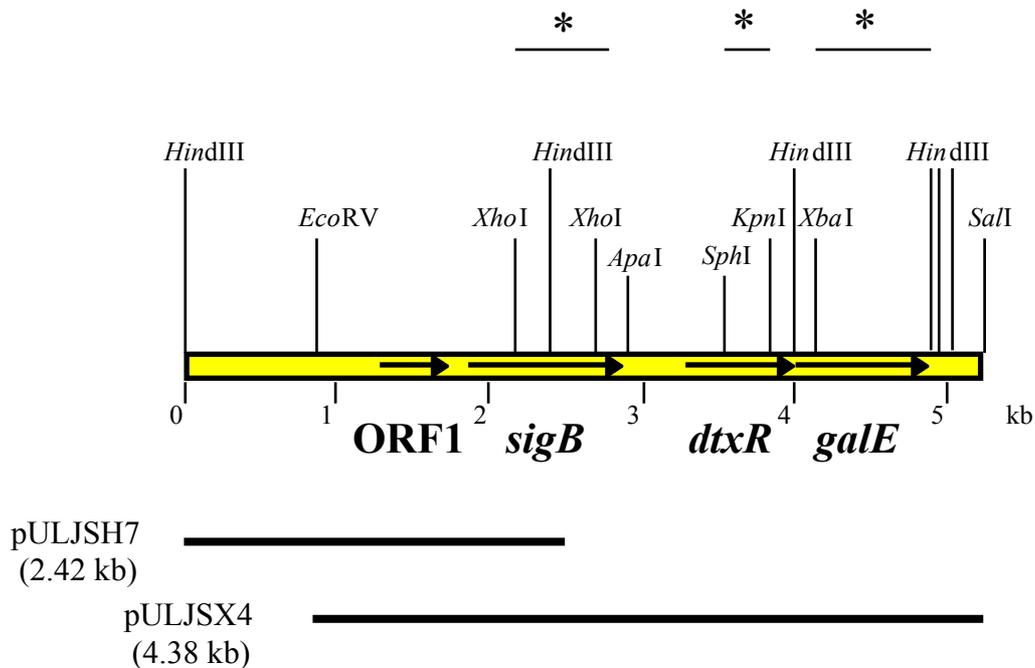


Figura 3.6. Mapa físico del fragmento de DNA *HindIII-SalI* de 5.3 kb conteniendo los genes ORF1-*sigB*-*dtxR*-*galE* de *Brevibacterium lactofermentum*. Las líneas indican el tamaño de los fragmentos de DNA clonados en los plásmidos pULJSH7 y pULJSX4. Las regiones señaladas con asteriscos corresponden a los fragmento internos de estos genes utilizados como sondas de hibridación en los experimentos de *Northern*.

1
AAGCTTGTCTGCTTTGCTCGGGGAAGCGCTCAAGACGCTTGTGACGCCGCTCTCGTTGAAATTTCCGGCGAGTACGCCAATTCTTAATTGATATTCGTC
101
CGCATTGATTGCTGGGCGTCAGCAGTGGGTATTTTCTGATGCTGATGCGTCCATGACTCAACATGTTCCAGGCCCTGATCATGTGTTGGGCGTCGGTGC
201
GGCCAGCCTGTCGTTGTTGCAAGCAACGCCACCTCCCCACTGGTCTGTGTTGGATTGGGTACTGGTTCGGGTATCAGGTGCTTGGTCAGGCAGGTG
301
CCGCGCGAGGAAATCATCGCCACCGATGTGCATCCGCGCGCTCTCGATTTGCTGAAAGCCACGCTTGTGATTCCGGCATTCCCACGCAGTTGGTGGAGG
401
GCAGCTGGTTTGAACGGTTCGCGGCGCACCTTTGACCGCATCATCGCAACCCGCGCTTCGTAGTGGGACCACCGGAAATGGGCATGTGACCGCGATT
501
CCGGCATGGATCTAGACGGCGGACCCGCTTGGTAGTCAAAGAAGCCTGCGCGCATCTCAACCCTGGTGGCACCCGTCACCTGCTCGGCGCATGGGTGCA
601
TTCCGGGATCAATCGTGGCAGCAGCGGTTGCAGAATGGTTGCCGATAACGGTTATGTTGCTTGGGTTATTGAGCGGTACGCCGTGAGCCCCGCGCA
701
GTATGTTGGGCACGTGGCTTAGTGATGAGTCCCTCGATCTGCGTAGCCCCGAGGCAGCAGCAGCACCACGCGTGGCTTAACCACTTTGAAAAAGCCAAGG
801
TTCAAGGCGTTGGTTTTGGTTTCATCGCCATCCAACGCTCTGGAGGAAGACGAGGCGGATGAGAAATCCGATATCTTGGCTGAATCCATGACCCAGTACTT
901
CGAGGATCCTCTCGGCCCTGAAATTGAGGAGTACTTACCCGCACTGCATGGCTTCGTGAACAACTCGCGATTCCATTCTGAGCTCCCGCTTCAAAGTT
1001
CGCCCTGGCGTGGCCCCGGGAACAAATCAGCCTGGCCGATGCGGAAGAAAGCATGGGCTTTAGTCTGTACGTTGAGGCTCACCCGCACCGATGGTCCTC
1101
GTTGGTCCCATGATGTTGATGAGCATGTGGCTTCCATCGTCGAGGACTTAACCCACATGGACTCCCTTTGAAGAAATCCTGAAATGTACGCGATGGC
1201
TCAAGGTATCGAGGGAGAATCCCTGCACAACGGCGCCATTGCGGCGTTGGTGGATCTCATCCGCCACGGATTAGTGTGCCCGCTGATCTTCTCGATTCT
1301
TAAAT **RBS** **AGG** CTGTTTGTGAAAGCCGTTTTAACCCGTGTGAGTTCGCCAGCGTCAGCGTGGATGATGAAATTTATGGAGCCATCGATTGCCCCGACACC
ORF1 → V K A V L T R V S S A S V S V D D E I I G A I D C P D T
1401
GGAGGCATTTTGGCGCTGGTTGGAGTCGCGCGTCTGATAGCGACGACGCTGGGAAACCATGGTGCGAAAAATTGCTGACGTGCGCATCTTGGATGGCG
G G I L A L V G V G A A D S D D A W E T M V R K I A D V R I L D G E
1501
AACAAATCCGTCAGTGTCAATGCTCCCGTACTGCTTGTAGCCAAATTCACCCCTGCATGGTTCGCACCGCAAAGCCGGCGCCATCGTGGTCTGATGC
Q S V S D V N A P V L L V S Q F T L H G R T A K G R R P S W S D A
1601
AGCACCTGGTGAGGTGGCTGAGCCGGTATTGAAAAGATTGCACAAGGTTTACGTGAGCGCGGAATCACCCGTGGAACAAGGACGATTCCGGCGCAATGATG
A P G E V A E P V I E K I A Q G L R E R G I T V E Q G R F G A M M
1701
AAGGTACATCGGTTAACGAAGGCCCTTACCCTTTGGTTCGAGTGCTAACCCAGTCAAGCCTAAGAGCTTGAACGCCCAATGTGGGGGTGTTAAGAA
K V T S V N E G P F T V L V E C ***
1801
CTCCACAAAAGCGCTTGGGAACTTTTTGTGGAAGCAGTCCGTTGAACCTCTGAACCCGGAAT **RBS** **AGGAGC** CCAGTTATGACAGCACCGTCCACGCAGGA
sigB → M T A P S T Q D
1901
TCTCGCAACGACTGAACGTGAGGTAGATCCCGGCGAGCAGAAGGGGCCAAACCAACGACAATCCCTCGCAGGACCTTGTTCGCGTTTACCTCAACGGCATC
L A T T E R E V D P G S R R G Q T N D N P S Q D L V R V Y L N G I
2001
GGCAAAACTGCCTTGCTTACC GCGGAGGATGAAGTTGAGCTCGCACAGACCATTGAGGTTGGCCTTTATGCAGAGCACCTTCTGAAAACTCTGAAGAGC
G K T A L L T A E D E V E L A Q T I E V G L Y A E H L L K N S E E P
2101
CACTCACCCGCGCCATGAAGCGGATCTAAAGGTTCTTGCCAAGGACGGCAAGAAGGCTCGTTCACCTCCTCGAGGCAAACCTGCGCCTGGTGGTGTCT
L T R A M K R D L K V L A K D G K K A R S H L L E A N L R L V V S
2201
CCTTGCTAAGCGCTACACCGCCGCGGCATGCCACTGCTGGATCTTATCCAGGAGGGCAACCTCGGACTGATCCGCGCGATGGAAAAGTTTGATTACTCC
L A K R Y T G R G M P L L D L I Q E G N L G L I R A M E K F D Y S
2301
AAGGGCTTTAAGTTCTCCACCTACGCAACCTGGTGGATCCGCCAGGCAATCACCCGCGGCATGGCAGATCAGTCCCGCACCATCCGCCTCCAGTCCACC
K G F K F S T Y A T W W I R Q A I T R G M A D Q S R T I R L P V H L
2401
TTGTGGAGCAGGTGAACAAGCTTTCCCGCATCAAGCGGAGTTGTACCAGCACTTGGCCGTGAAGCCACCAATGAGGAACCTCGCAGAAGAGTCCGGCAT
V E Q V N K L S R I K R E L Y Q H L G R E A T N E E L A E E S G I
2501
TGAAGAGTCCAAGATTGAAATGCTGCTTCGTCAGTCTCGCATCCAGTGAGCTTGGACATGCCAGTCCGGCGCCGATGAAGAAGCTCCTTTGGGTGACTTC
E E S K I E M L L R Q S R D P V S L D M P V G A D E E A P L G D F
2601
ATTGAGGATTCTGAGGCCACCGATGCAGAATCCGCGAGTGGTTGCCTCCATGCGCCACTCCGATATTCGCGCGGTCTTAACACTCTCGAGCCACGCGAGC
I E D S E A T D A E S A V V A S M R H S D I R A V L N T L E P R E Q
2701
AGGATGTCATCCGTTTGGCGTACGGCCTCGATGACGGTGTGCCACGCACCCTTGATCAGATTGGTTCGTCGCTTCGGACTGTCCCGTGAGCGCGTCCGCCA
D V I R L R Y G L D D G V P R T L D Q I G R R F G L S R E R V R Q
2801
GATCGAGCGTGAAGTCATGAGTAAGCTCCGCGATGGAGAGCGCGCATCACGCTTCTGTCGAGTACGCCAGTAAAAGCGTGAACCTAACAATCGAAGCGTCCG
I E R E V M S K L R D G E R A S R L R E Y A Q ***
2901
GGCCCCACCTACCGTGGCCTCGGCGTTTTAGTGGTTCCCTGGACCATATTTTACCGGCGAGTCCCAAGGCGTGAGATGACAGATCAGGTAACCTTTAGTTAT

3001
 TATTCGCTAGACTTTAATACGTTCAACTGAAGTAAAACCACGGATACGGGGAAGTTTTCTTTCCTATTAACAACATGCGCCAGCATCACTACTGTGCGATG
 3101
 GAGATCCCTCATCAGTCGATCGATAGAAAAATCGGTAGACTATGTGAAAGTGTGTTCTCTGTCGAGCTCATCTCTCTGAACATTTACGTTGTTTTAAGA
 3201
 AGTGTTTTTAAGAGAATACGCATTGAAGTAGTTTTCCCTGCTGGCAGCGGCATAAATTGAGTTTGAAAAACAAGGAAGGCAGCCTCCTGTGAAGGATCT
dtxR → V K D L
 3301
 GGTGATACCACCGAAATGTATCTGCGCACTATTTACGAGCTGGAAGAAGAGGGCATTGTTCTCTGCGTGTCTGATCGCAGAACGCCTTGAGCAGTCC
 V D T T E M Y L R T I Y E L E E E G I V P L R A R I A E R L E Q S
 3401
 GGCCCAACTGTGAGCCAGACTGTGCGCCGTATGGAACGCGACGGTCTTGTGCACGTCAGCCCCGACCGCAGCCTCGAAATGACTCCAGAGGGACGTTCCC
 G P T V S Q T V A R M E R D G L V H V S P D R S L E M T P E G R S L
 3501
 TCGCCATCGCCGTGATGCGTAACGACCGCCTAGCAGAACGCCTCCTTACCGACATCATCGGCTTGGACATCCACAAAGTCCACGACGAAGCATGCCGCTG
 A I A V M R N D R L A E R L L T D I I G L D I H K V H D E A C R W
 3601
 GGAGCACGTGATGAGTGATGAGGTTGAACGTCGCTCGTTGAAGTCTTACGATGTGCATCGCTCCCCTTTCGGTAACCAATTCCTGGCCTCGGCGAA
 E H V M S D E V E R R L V E V L D D V H R S P F G N P I P G L G E
 3701
 ATCGGTTTGGATCAAGCAGATGAGCCTGATTCCGGCGTTCGTGCCATCGATCTGCCTCTCGGTGAGAACCTGAAGGCTCGCATCGTACAGCTCAACGAGA
 I G L D Q A D E P D S G V R A I D L P L G E N L K A R I V Q L N E I
 3801
 TCCTGCAGGTAGATCTTGTAGCAGTCCAGGCACCTACCGACGCGGGTGTGAAATCGGTACCGAAGTAGACATCAATGAGCAGGGCCGGGTCGTGAT
 L Q V D L E Q F Q A L T D A G V E I G T E V D I I N E Q G R V V Y
 3901
 CACCCACAACGGCTCCAGCGTAGAACTGATTGACGATCTTGACATGCAGTCCGCGTAGAAAAGGTTGAGGGCTAACACATGAAGCTTCTGGTTACC
 T H N G S S V E L I D D L A H A V R V E K V E G *galE* → M K L L V T
 4001
 GGTGGCGCTGGCTATGTTGGCAGCGTTCGTGCCGCTGTTCTTCTAGAACATGGGCACGATGTACAATCATTGACAATTTACAGTACCGGCAACCGTGAAG
 G G A G Y V G S V R A A V L L E H G H D V T I I D N F S T G N R E A
 4101
 CAGTCCCTGCTGACGCTCGCCTGATAGAAGGTGACGTCAACGATGTCGTTGAGGAAGTCTTCTGGAAGGCGGATTGAGGGTGTCTCCACTTCGCTGC
 V P A D A R L I E G D V N D V V E E V L L E G G F E G V V H F A A
 4201
 TCGCTCATTTGGTAGGCAATCAGTGGAAAAGCCCAATGAATACTGGCAGACAATGTGGTCACGGCGCTCACCTTGCTCGATGCAATGCGTGCCCATGGG
 R S L V G E S V E K P N E Y W H D N V V T A L T L L D A M R A H G
 4301
 GTGAACAACCTTGTGTTCTCTCCACTGTGCTACCTACGGTGAACCAGACGTTGTTCCCATCACCGAGGACATGCCACCCAGCCACCAATGCTTATG
 V N N L V F S S T A A T Y G E P D V V P I T E D M P T Q P T N A Y G
 4401
 GCGCAACGAAGCTGTCCATCGACTACGCAATTACGTCCTACGCTGTGCCTTTGGTCTGGCTGCAACAGCTTGGCTACTTCAACGTTGCTGGCGCATA
 A T K L S I D Y A I T S Y A A A F G L A A T S L R Y F N V A G A Y
 4501
 CGGAAACATCGGTGAAAATCGTGAAGTTGAACTCACCTCATTCCACTAGTGTGTCAGGTAGCAACCGGTACCAGGAGAAAATCTTCATGTTCCGGCGAT
 G N I G E N R E V E T H L I P L V L Q V A T G H R E K I F M F G D
 4601
 GACTGGCCAACTCCCGATGGAACCGCGGTCCGCGATTACATCCACATTTCTTGATCTTGCCAAAGCACACGTGTTGGCTTTGGAATCCAACGAAGCCGGTA
 D W P T P D G T A V R D Y I H Y L D L A K A H V L A L E S N E A G K
 4701
 AGCACCGCATTTTCAACCTTGGTTCCGGAGATGGCTACAGCGTGAACAGGTTGTGGAGATGTGCCGTGAAGTAACCGGACATCCCATCCCGGAGAGGT
 H R I F N L G S G D G Y S V K Q V V E M C R E V T G H P I P A E V
 4801
 CGCACCCAGGCGTGCAGGAGATCCAGCAACACTAATTGCATCTTCTGAGAAGCAAAGCAAGAACTGGGTTGGACCCCTGAGCACACTGATCTGCGCACCC
 A P R R A G D P A T L I A S S E K A K Q E L G W T P E H T D L R T
 4901
 ATCGTTGAGGACGCTTGGGCGTTTACATCCGCACTGGGCGATCGTTCATGCTGCAAGAAGAAAGCTTAAGCTTTTCGGTACGGGACGTTGAAAGTCCG
 I V E D A W A F T S A L G D R S H A A K K K A ***
 5001
 CAATTGCTGGTTGCCGCGGAGGCGTTCGTAAGCTTTGTTGTTTCGCCGTTGAACAACCTTTCGCGCAGCAGATTGCTCAAGTTGTGCCGCGGCGTGG
 5101
 CTTGATGGCGGCTTCCAGCGCGGTGAGGCCTTCATGCTCAGCCCATGGCGATGACCGACAATGCGTAAAGGCACAGAGCATTAGATCGGAACCTCGCC
 5201
 TGTGAAGGTACATGCCGACGACGAGGAGCAGCGCGGCTTCCCGAGGGAAGTCGAC

Figura 3.7. Secuencia de nucleótidos del fragmento *HindIII-SalI* de 5.3 kb que contiene los genes ORF1, *sigB*, *dtxR* y *galE* de *B. lactofermentum*. Los cuadros sombreados indican posibles sitios de unión a ribosomas (RBS). Los asteriscos representan codones de terminación. Las flechas definen secuencias invertidas repetidas localizadas entre los genes ORF1 y *sigB*. Los números de acceso en la base de datos EMBL para las secuencias *dtxR*, ORF1-*sigB* y *galE* son L35906, Z49824 y Z49823, respectivamente.

b1ORF1	VKAVLIRVSSASVSVDIEITGAI	DCPDTG	GILLALVGVG	AADSDD	AWETMVR	51																																													
seORF1	MKIVLQRVKEASVSDGKTAGAINQ	GLLLLVGVG	PDDAAE	DLAYAVR	47																																													
ecO145	MIALIQRVTRASVIVEGEVIGA	GLLVLLGV	EKDD	EQKANRLCE	47																																													
b1ORF1	KIADVRIILDGEOSVSDV	NAEVLIVSQFTL	HGR	IAKGR	RPSWSDAAP	97																																												
seORF1	KIVNMRIFSDALGKMNC	SIQDIK	GSILSVSQFTL	YADT	KKGN	REAFETGAAK	98																																												
ecO145	RVLGYRIFSDAE	GKMNL	INVCQAC	GSVLV	VSQFTL	AADTERGM	RPSFSK	98																																											
b1ORF1	G	EV	AE	P	V	E	K	I	A	O	G	L	R	E	R	G	I	T	V	E	Q	G	R	F	G	A	M	K	V	T	S	V	N	E	G	P	F	T	V	L	V	E	..	C	144						
seORF1	P	D	M	A	S	Q	F	Y	D	R	F	N	E	Q	..	L	A	D	F	V	P	V	E	R	G	V	F	G	A	D	M	Q	V	S	L	I	N	D	G	P	V	T	I	I	L	D	T	K	C	H	147
ecO145	P	D	R	A	E	A	I	Y	D	Y	E	V	E	R	C	R	Q	Q	E	M	N	T	Q	T	G	R	F	A	A	D	M	Q	V	S	L	V	N	D	G	P	V	T	F	W	I	Q	V	-	145		

Figura 3.8. Comparación de la secuencia de aminoácidos deducida de ORF1 de *B. lactofermentum* (bl) con la proteína o145 de *E. coli* (ec) (Plunket *et al.*, 1993) y con la proteína ORF1 de *Streptococcus equisimilis* (se) (Mechold *et al.*, 1993). Se presentan sombreados los aminoácidos idénticos y homólogos (A-S-T, D-E, N-Q, I-L-M-V,F-Y-W, K-R) con cuadros negros y grises, respectivamente.

ORF2 de 1089 pb, codificaba un producto de 331 aminoácidos y Mr de 37.5 kDa. El posible codon de inicio (ATG), está precedido por un sitio de unión a ribosomas. La secuencia de aminoácidos deducida de ORF2, al igual que la proteína SigA, presentaba altos valores de identidad con factores sigma principales de microorganismos relacionados (Tabla 3.2).

Tabla 3.2
Identities de SigB con otros factores (% de aminoácidos idénticos)

<i>B. lactofermentum</i>	SigA	57.9%	Este trabajo
<i>C. diphtheriae</i>	ORF2	92.3%	Boyd <i>et al.</i> , 1992
<i>M. smegmatis</i>	MysA	55.6%	Predich <i>et al.</i> , 1995
<i>M. smegmatis</i>	MysB	73.3%	Predich <i>et al.</i> , 1995
<i>S. coelicolor</i>	HrdB	54.8%	Buttner <i>et al.</i> , 1990
<i>S. aureofaciens</i>	HrdB	54.5%	Kormanec <i>et al.</i> , 1992
<i>S. griseus</i>	HrdB	53.4%	Marcos <i>et al.</i> , 1995

En *C. diphtheriae* el ORF2 correspondía a un marco de lectura abierto incompleto situado en la región 5' del gen *dtxR* (Boyd *et al.*, 1990), que codificaba 143 aminoácidos con 92.3% de aminoácidos idénticos con el producto de ORF2 de *B. lactofermentum*, por lo que de la comparación anterior se dedujo que correspondía a un factor sigma. La proteína deducida ORF2 de *B. lactofermentum* presentaba también altos valores de identidad (73.3% aminoácidos idénticos) y similar peso molecular deducido (35 kDa) con la proteína MysB de *M. smegmatis* (Predich *et al.*, 1995). Estos resultados, han permitido llegar a la conclusión de que ORF2 codificaba otro factor sigma de *B. lactofermentum*, que se ha designado como *sigB*. El hecho de que la identidad entre las proteínas SigA y SigB de

B. lactofermentum fuese alta (57.9% aminoácidos idénticos) pero a la vez presentaban suficiente divergencia, indicaba que no se trata de copias duplicadas del mismo gen.

ORF3 estaba separada de ORF2 por 417 bp, y constaba de 687 bp (Figura 3.7). La proteína deducida ORF3 tenía 228 aminoácidos y Mr de 25.4 kDa, correspondiendo a una proteína represora de genes regulados por hierro y otros metales divalentes, de modo análogo al represor de la toxina de la difteria, DtxR, de *C. diphtheriae* (Oguiza *et al.*, 1995a). Además, en la región 5' de ORF3, se han identificado secuencias similares a las secuencias promotoras consenso -10 y -35 de *E. coli*, así como posibles RBS (Figura 3.7). La secuencia de este posible promotor también estaba en correspondencia con la de los promotores de *Tipo I* de corinebacterias.

ORF4 codificaba una proteína de 329 aminoácidos y Mr de 35.4 kDa. La secuencia de aminoácidos deducida a partir ORF4 presentaba muy buenas homologías con una proteína hipotética de 35.4 kDa (75.8% aminoácidos idénticos) codificada en el ORF localizado en la región 3' del gen *dtxR* de *C. diphtheriae* (Boyd *et al.*, 1990) y, con enzimas UDP-galactosa 4-epimerasa de bacterias Gram-positivas: *Streptomyces lividans* (53.5% aminoácidos idénticos) (Adams *et al.*, 1988) y *Streptococcus thermophilus* (48.9% aminoácidos idénticos) (Poolman *et al.*, 1990). Debido a esta similitud con enzimas UDP-galactosa 4-epimerasas de las proteínas deducidas de la ORF4 de *B. lactofermentum* y la ORF en la región 3' del gen *dtxR* de *C. diphtheriae* (Figura 3.9), los genes correspondientes fueron denominados *galE* (Oguiza *et al.*, 1995c). La enzima UDP-galactosa 4-epimerasa cataliza la conversión reversible de UDP-galactosa en UDP-glucosa en el catabolismo de galactosa o ruta de Leloir (Figura 3.10). Esta ruta metabólica genera un intermediario glicolítico (glucosa-1-fosfato) y substratos (UDP-glucosa y UDP-galactosa) para las reacciones biosintéticas de glicosilación (Adhya, 1987). También se investigó la posibilidad de que el gen *galE* de *B. lactofermentum* pudiese complementar la cepa de *E. coli* WK6, mutante *galE*. El plásmido pULJSX4 (Figura 3.6), que contiene el gen *galE* completo de *B. lactofermentum* se utilizó para transformar *E. coli* WK6, cepa incapaz de metabolizar galactosa. La selección de los clones se llevó a cabo en medio mínimo Vogel-Bonner (libre de glucosa) suplementado con galactosa 2% como fuente de carbono. En estas condiciones, el gen *galE* de *B. lactofermentum* fue capaz de restablecer el crecimiento de la cepa de *E. coli* WK6, mutante *galE*.

B1	MKLLVTGGAGYVGSV RAAV LEHGHD-VTIIDNFS TGNREAV PAD ARLIEGDV--NDV	55
Cd	MKLLVTGGAGYVGSV CSTV LEQGE-VTIVDNL TGNRD AVPLG ATFVEGDI--KDV	55
S1	MSG KYLVTGGAGYVGSV VAQH LVEAGNE-VVVLHNL TGFR EVCRRVPR-SSRR---HPG	55
St	MAILVLGGAGYIGS HMVDR LEKGEKVVVV DSLVTGHR AVHPD AIFYQGD LSDQDF	58
B1	VEE V LEGG- FEGVVHFAARS SLVGESVEKPN E Y HDN VVTALTLLD AMRAH GVNNL VFSS	114
Cd	AEN V LSSDS- FD AV LHFAARS SLVGESVEKPN DE Y QHN MVTTLALLD AMKRNN VRNI VFSS	114
S1	RRQ V RGRLS- FD GV LHFAAF SQVGESV KPEKY WDNN VGGTMALL EAMRGA GVRR L VFSS	114
St	MRK V FKENPDV DA V I HFAA Y SLVGES MEKPL K Y FDNN NTAGMVKLL EV MNEC GVKYI VFSS	118
B1	TAATYGE PDVV PI TE DMPTQ PTNA YGAT KL S IDYA ITSYAA AFGLA AT SLRYFNVAGAYG	174
Cd	TAATYGE PE TV PI TE DA PTH PTNP YGAT KL S IDYA ITSYAH AYG FA AT SLRYFNVAGAYG	174
S1	TAATYGE PE Q VP I VE S AP TR PTNP YGAS KL A VDHM ITGEAA AHGL G AV S VP Y FNVAGAYG	174
St	TAATYGI PE E PI LE TT P Q N PI NP YG ES KL MMETIMK WSDQ AYG IK Y VP L RYFNVAGANL	178
B1	NI GENRE-V ETHLIPLVLQVA T G REKI FM FGDD W PTPD GT AV RDY I H IL DLAKAH V L AL	233
Cd	LV GENRE-I ETHLIPLVLQVA L G HRDKI FM FGDD W PT ED GT P IRD Y I H IR DLADAH I L AL	233
S1	E Y GE RHD-PE SH LIPLVLQVA Q G RE A IS VY GDD Y PT PD RPVCATT ST SPT W PRPT C WP-	232
St	MVRLV R TRS ETHL L PI L QVA Q G REKI M I FGDD YN T PD GT N V RD Y V H PF DLADAH LL AV	238
B1	ESNEA G K H RI- FNLGSGD GY SVKQV EMC RE VT G H P IAE V APRR AGDPAT LIASSE KAK	292
Cd	QSNVE G S H RI- FNLGSGE GY SVKQV ID T CR EV T G H P IAE V APRR AGDPA VLIASS AKAQ	292
S1	CAAAP G E H LI- CNLGN NG F SV RE V ETV RR VTGHP IP E IM APRR GR DPA V LVAS AG TAR	291
St	EYLRK G NE STA FNLGS ST G F S N LQ ILE AARK VT G KE IPAE K ARR P GDP D ILIASSE K AR	298
B1	QE L GW T PE H T DL RT I VE DAWA FT S ALGDRSHA AKKKA	329
Cd	SE L GW K P Q RT DL HT I V S DAWA FT S QL GDKAHSAS RG-	328
S1	E K L GW N P SR ADL - A I V S DAW ELP QRR AG Q-----	319
St	TV L GW K P Q FD N IE K I IAS AWA WH S S HPKGYDD RG---	332

Figura 3.9. Alineamiento múltiple de las proteínas UDP-galactosa 4-epimerasas de *B. lactofermentum* (B1), *C. diphtheriae* (Cd) (Boyd *et al.*, 1990), *Streptomyces lividans* (S1) (Adams *et al.*, 1988) y *Streptococcus thermophilus* (St) (Poolman *et al.*, 1990). Los aminoácidos idénticos conservados en al menos tres de las cuatro proteínas comparadas están sombreados.

En *E. coli*, los genes *gal* están organizados en un operón, en el orden *galE*, *galT* y *galK* (Lemaire y Muller-Hill, 1986). Idéntica organización para este operón se observa en *Salmonella* y *Klebsiella* (Houng *et al.*, 1990; Peng *et al.*, 1992). En *Streptomyces lividans*, el operón *gal* tiene una organización diferente: *galT*, *galE* y *galK* (Adams *et al.*, 1988). Por el contrario, en las corinebacterias estudiadas el gen *galE* no aparece asociado a otros genes del catabolismo de galactosa, pero sí está física y transcripcionalmente unido al gen *dtxR*, que codifica para un elemento regulador dependiente de hierro. La región intergénica entre el codon de terminación del gen *dtxR* y el codon de inicio del gen *galE* es únicamente de 6 bp en *B. lactofermentum* y de 22 bp en *C. diphtheriae*. No se han identificado terminadores transcripcionales en la región 3' del gen *galE* de *B. lactofermentum*.

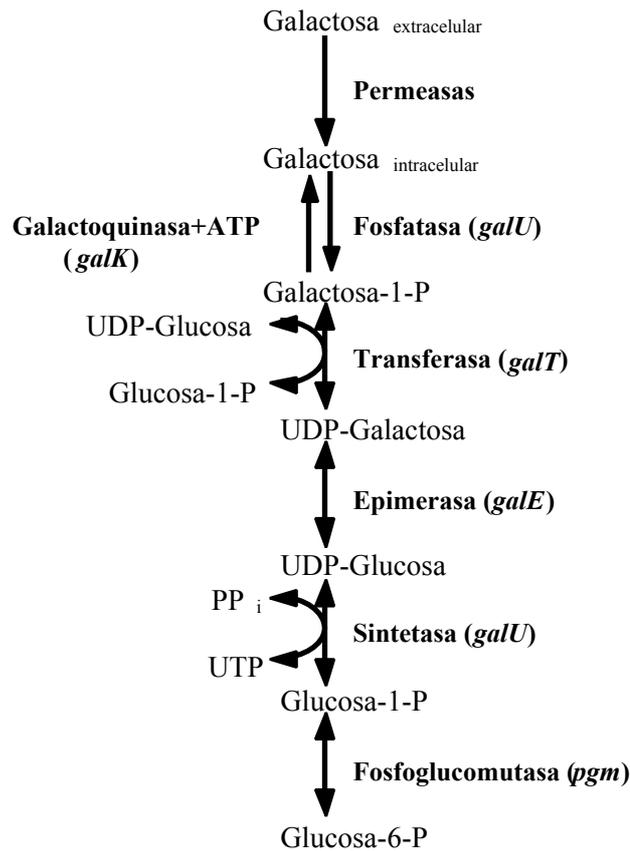


Figura 3.10. Ruta de Leloir para el metabolismo de galactosa. Entre paréntesis se indican los genes correspondientes que codifican para cada enzima.

4. Dominios funcionales de los factores sigma SigA y SigB de *B. lactofermentum*

El alineamiento de las proteínas SigA y SigB con otros factores sigma principales muestra una alta identidad de secuencia en las cuatro regiones consenso de la familia Sigma-70 (Figura 3.11). La *Región 1*, compuesta de las subregiones 1.1 y 1.2, es la más variable entre las proteínas SigA y SigB. La longitud de la subregión 1.1 en la proteína SigA es intermedia con respecto a la de las proteínas HrdB de *S. coelicolor* y MysA de *M. smegmatis*, con presencia de pocos residuos conservados, pero con varias repeticiones características en todas estas proteínas de una corta secuencia pentapeptídica que comienza siempre con dos aminoácidos básicos (KKXXX ó KRXXX). La subregión 1.1 de la proteína SigB es muy corta, pero de mayor longitud que la de la proteína MysB de *M. smegmatis*. La subregión 1.2 está altamente conservada en todas las proteínas comparadas (Figura 3.11), lo que sugiere que debe tener alguna importancia estructural y funcional.

La *Región 2* y sus correspondientes subregiones: 2.1, 2.2, 2.3 y 2.4 están altamente conservadas entre los factores sigma SigA, SigB y los de microorganismos relacionados (Figura 3.11).

Todos los cambios que ocurren en la subregión 2.4 son conservativos, con la excepción del residuo Gly¹⁶¹ de SigB y MysB. La alta conservación de la subregión 2.4, implicada en el reconocimiento de la región promotora -10, viene a sugerir que las proteínas comparadas pueden reconocer el mismo hexámero -10 del promotor.

La *Región 3* (dividida en las subregiones 3.1 y 3.2) y la *Región 4* (dividida en las subregiones 4.1 y 4.2) separadas por una corta secuencia espaciadora están también altamente conservadas. La subregión 4.2 participa en el reconocimiento de la región promotora -35 mediante un dominio de unión a DNA HTH está particularmente bien conservada en el factor sigma SigA, pero no tanto en el SigB.

La conservación de la subregión 1.1 y la alta similitud del resto de las regiones con las de otros factores sigma principales, permite concluir que la proteína SigA corresponde al factor sigma principal de *B. lactofermentum*. La proteína SigB, en cambio, presenta una subregión 1.1 muy corta, pero mantiene completamente conservadas las subregiones 2.4 y 4.2 que se unen al DNA promotor, todo esto sugiere que el factor sigma SigB permite reconocer a la holoenzima secuencias promotoras similares a las que reconoce el SigA, aunque quizás con una menor afinidad o especificidad para determinado tipo de promotores.

5. Organización en el cromosoma de los genes *sigA* y *sigB* de *B.lactofermentum*

La organización de los genes *sigA* y *sigB* de *B. lactofermentum* es similar a la observada en micobacterias para los genes *mysA* y *mysB*, que codifican factores sigma (Predich *et al.*, 1995), y que están localizados relativamente próximos uno del otro en el cromosoma; pero es completamente diferente a la observada en *Streptomyces coelicolor* (Buttner *et al.*, 1990), donde los genes *hrdA*, *hrdB*, *hrdC* y *hrdD* están localizados en diferentes regiones del cromosoma (van Wezel *et al.*, 1995). En micobacterias se ha observado que los genes *mysA* y *mysB* sigma están localizados en una región de 10 kb (Predich *et al.*, 1995) y, en *B. lactofermentum*, los genes *sigA* y *sigB* están localizados en el mismo cosmido (pULAC5A2) y la distancia entre ambos genes es menor de 20 kb.

En bacterias Gram-negativas, el gen que codifica para el factor sigma principal (*rpoD*) forma parte de un operón de síntesis macromolecular que contiene tres genes esenciales, *rpsU*, *dnaG* y *rpoD*, cuyos respectivos productos: proteína ribosomal S21, DNA primasa y factor sigma principal, son necesarios para la iniciación de la síntesis de proteínas, DNA y RNA (Versalovic *et al.*, 1993). En algunas bacterias Gram-positivas, el operón de síntesis macromolecular carece del gen *rpsU* pero mantiene el gen *dnaG* próximo al *rpoD*, como ocurre en *B. subtilis* (Wang y Doi, 1986), *Clostridium acetobutylicum* (Sauer *et al.*, 1994) y *Lactococcus lactis* (Araya *et al.*, 1993). No se ha encontrado evidencia de la existencia de un gen para DNA primasa formando un operón con el gen del factor sigma principal de *B. lactofermentum*, *sigA*, o con el gen *sigB*. Esta organización diferente del gen que codifica el factor sigma principal también ha sido observada en otros actinomicetos: en *S. coelicolor* el gen *hrdB* no está asociado con el *dnaG* o *rpsU* y, estos genes están también separados de los genes *hrdA*, *hrdC* o *hrdD* (van Wezel *et al.*, 1995). Observaciones similares se han realizado en el caso de

los genes *hrdB*, *hrdD* y *hrdT* de *S. griseus* (Marcos *et al.*, 1995) y, los genes *mysA* y *mysB* de *M. smegmatis* (Predich *et al.*, 1995).

Otro hecho que resulta de interés es la conservación del gen *dtxR*, que codifica una proteína represora del metabolismo del hierro unido al gen *sigB*, que codifica un factor sigma, en *B. lactofermentum* y *C. diphtheriae*. Esta organización no está únicamente presente en corinebacterias, sino que también ocurre en micobacterias (*mysB-dtxR*). Estos dos genes podrían formar una unidad que ha evolucionado asociada en bacterias Gram-positivas relacionadas.

Figura 3.11. Alineamiento de las proteínas HrdB de *Streptomyces coelicolor* (Sc) (Buttner *et al.*, 1990), SigA y SigB de *B. lactofermentum* (Bl), MysA y MysB de *Mycobacterium smegmatis* (Ms) (Predich *et al.*, 1995). Los aminoácidos idénticos están sombreados y también se indican las regiones características de los factores sigma de la familia Sigma-70 (Lonetto *et al.*, 1992).

← 1.1 —

ScHrdB	VSASTSRTLPPPEIAESVSVSMALIER·GKAEGQIAGDDVRRAFADQIFATQWKNVLRSLNQLLEEGVITLMVSAAEPKRTRKSVAAKSFAKRTATKAVAAANPVTIS	104
BlSigA	VESSMVENNVAKKTVAKKTARKTARKAAPRVATFEISHEISATIPARSIDGTSTFV·EAAADTIETTAPAAKAPAAKAPAKVAKKTARKAFKKTVAK	96
MsMysA	MAATKASATEEIVKRIATKT·PAKKAPA·KRAAKSAAAKAGGKAPAKKAPAKRAAKGTAAK·PEDGVTD	67

→

ScHrdB	RKATAFAAPAFAATEFAAVEEEAPAKKAAAKKTTAKKATAKKTTAKKAAAKKTTAKKEDGELLLEDEATEEPKAAATEEPEGTENAGFVLSDEDEDDA·PAQQVAA	207
BlSigA	KATTAKAAPATAKDNAPVLDDEENLAQDEQDFDGDDEVDGIEDEEDEDGDV·EALGEESEDD·EEDGSSVWDEDESATLRQARKDAE	183
MsMysA	DLEVTDDLEAEEGED·IDVEDTDLLELDLDDSDDTAVEDEEEADAA TPAVATAKAADDDIDEPSEKD·KASGDFVWDEEESALRQARKDAE	158
BlSigB	MTAPSTQDLATTEREVDPGSRRGQTN	26
MsMysB	MANATTSRVDTD·LDA	15

1.2 2.1

ScHrdB	AGATADPVKDYLKQIGKVI LLNAEQEVELAKRIEAGLFAEDKIAN·SDKLAPKIKRELEITAEEDGRRAKNHLLEANLRLVVS LAKRYTGRGMIFLD	302
BlSigA	LTASADSVRAYLKQIGKVALLNAEQEVSLAKRIEAGLYATHRMEEMEEAFAAGDKDAKLTHAVKRDLRATARDGRKAKNHLLEANLRLVVS LAKRYTGRGMIFLD	288
MsMysA	LTASADSVRAYLKQIGKVALLNAEFEVELAKRIEAGLYATQPIAELAE·KGEKLPVQQRDMQWLICRDGDRAKNHLLEANLRLVVS LAKRYTGRGMIFLD	257
BlSigB	DNEFSDIIVRVYLNIGK TALLTAEDEVELAQTEVGLYAFHIIKN·SEEPLTRAMKRD LKVLAKDGKARS HLLLEANLRLVVS LAKRYTGRGMIFLD	122
MsMysB	QSPAADIIVRVYLNIGK TALLNNADEVELAKRIEAGLYAQHII·D·TKKR LGEARKRD LQAVV RDGEAARR HLLLEANLRLVVS LAKRYTGRGMIFLD	110

2.2 2.3 2.4 3.1

ScHrdB	LIQEGNLGLIRAVEKFDYTKGYKFS TYATFWWIRQAITRAMADQARTIRIPVHMVEVINKIARVOROMLQELGREPTPEELAKEIDMTFEKVI EVC KYCREPISIH	407
BlSigA	LIQEGNLGLIRAVEKFDYTKGYKFS TYATFWWIRQAITRAMADQARTIRIPVHMVEVINKIARVOROMLQELGREPTPEELAKEIDMTFEKVI EVC KYCREPISLD	393
MsMysA	LIQEGNLGLIRAVEKFDYTKGYKFS TYATFWWIRQAITRAMADQARTIRIPVHMVEVINKIARVOROMLQELGREPTPEELAKEIDMTFEKVI EVC KYCREPISLD	362
BlSigB	LIQEGNLGLIRAVEKFDYTKGYKFS TYATFWWIRQAITRAMADQARTIRIPVHMVEVINKIARVOROMLQELGREPTPEELAKEIDMTFEKVI EVC KYCREPISLD	227
MsMysB	LIQEGNLGLIRAVEKFDYTKGYKFS TYATFWWIRQAITRAMADQARTIRIPVHMVEVINKIARVOROMLQELGREPTPEELAKEIDMTFEKVI EVC KYCREPISLD	215

3.2 4.1 4.2

ScHrdB	TPITGHDGDS EFGDI IEDSEAVVPA DAVSF TLLQEQ LHSVLI TLSEREAGVVSMRFG L TDGQPK TLDEIGKVYGVTRERIRQIESKTMSKLRHPSRSQVLRDYLD	511
BlSigA	QTICDEGDSQLGDFIEDSEAVVAV DAVSF TLLQEQ LQVLE TLSEREAGVVKLRFG L TDGMPRTLDEIGOVYGVTRERIRQIESKTMSKLRHPSRSQVLRDYLD	497
MsSysA	QTICDEGDSQLGDFIEDSEAVVAV DAVSF TLLQEQ LQSVLE TLSEREAGVVRLRFG L TDGQPRTLDEIGOVYGVTRERIRQIESKTMSKLRHPSRSQVLRDYLD	466
BlSigB	MPVGADEEAF LGDFIEDSEAVVAVASMRHSDIRAVLNTLEHREQDVI RLRYGLDDGVPRTLDQIGRRFGLSRERVRQIEREVMSKLRDGERASRLREYQAQ	331
MsMysB	MPVGTDEEAF LGDFIEDSEAVVAVASEAVVISELLHTDIRYVLA TLLEHREQDVI RLRYGLDDGQPRTLDEIGKLEGLSRERVRQIEREVMAKLRNGERADQPAVYAS	319

6. Análisis transcripcional del gen *sigA* y de la región génica ORF1-*sigB-dtxR-galE* de *B. lactofermentum*

6.1. Análisis transcripcional de los genes *sigA* y *sigB*

Un objetivo adicional de este estudio fue investigar la organización transcripcional de los genes *sigA* y *sigB* de *B. lactofermentum*, así como para determinar la cantidad de sus mRNAs durante las fases de crecimiento en medio complejo (TSB). Se aisló RNA total de cultivos de *B. lactofermentum* crecidos en medio complejo a 30°C a diferentes tiempos: 6, 10, 12, 18, 24, 36 y 48 horas (Figura 3.12). Muestras de cada tiempo (75 µg de RNA) fueron separadas en geles desnaturalizantes de agarosa-formaldehído y transferidas a membranas de nylon.

La hibridación con una sonda interna al gen *sigA* de 0.5 kb *HindIII-SalI* (Figura 3.4) presentó un transcrito de 1.7 kb (Figura 3.12); dado que el gen *sigA* tiene 1493 bp, este resultado sugiere que su transcripción ocurre en forma de un mRNA monocistrónico. Además del transcrito de 1.7 kb, se observaba un transcrito adicional de 1.0 kb, que podía originarse bien por procesamiento del transcrito de 1.7 kb o bien por utilización de un sitio alternativo de inicio de la transcripción.

En la hibridación con una sonda específica al gen *sigB* de 0.5 kb *XhoI* (Figura 3.6) se observaron dos transcritos de 1.5 y 1.1 kb (Figura 3.12). Considerando el tamaño del gen *sigB*, que es de 996 bp y, la presencia de estructuras secundarias que podrían actuar como terminadores transcripcionales en la región 5' del gen *sigB*, los transcritos de 1.5 y 1.1 kb podían corresponder a un mRNA monocistrónico *sigB* formado por terminación de la transcripción en diferentes sitios de la región intergénica *sigB-dtxR*. En hibridaciones con una sonda interna a ORF1 no se detectaron transcritos durante el crecimiento en medio complejo.

La transcripción de los genes *sigA* y *sigB* en función de las fases de crecimiento en medio complejo seguía una pauta idéntica (Figura 3.12): los mRNAs de estos factores sigma se formaban a lo largo de la fase exponencial de crecimiento (6-18 horas) y, la transcripción de estos genes cesaba cuando las células alcanzaban la fase de crecimiento estacionario (24-48 horas). Aunque se utilizó exactamente la misma cantidad de RNA de cada uno de los tiempos (75 µg), no se observaban señales de hibridación a partir de las 24-36 horas de crecimiento. Durante la fase de crecimiento exponencial (6 horas), el nivel de transcrito *sigA* era claramente predominante sobre el mRNA *sigB*, lo que venía a corroborar en parte que el gen *sigA* podía corresponder al factor sigma principal. Por otra parte, no se observaban diferencias entre la cantidad de los transcritos *sigB* de 1.5 y 1.1 kb, en ninguna de las fases de crecimiento.

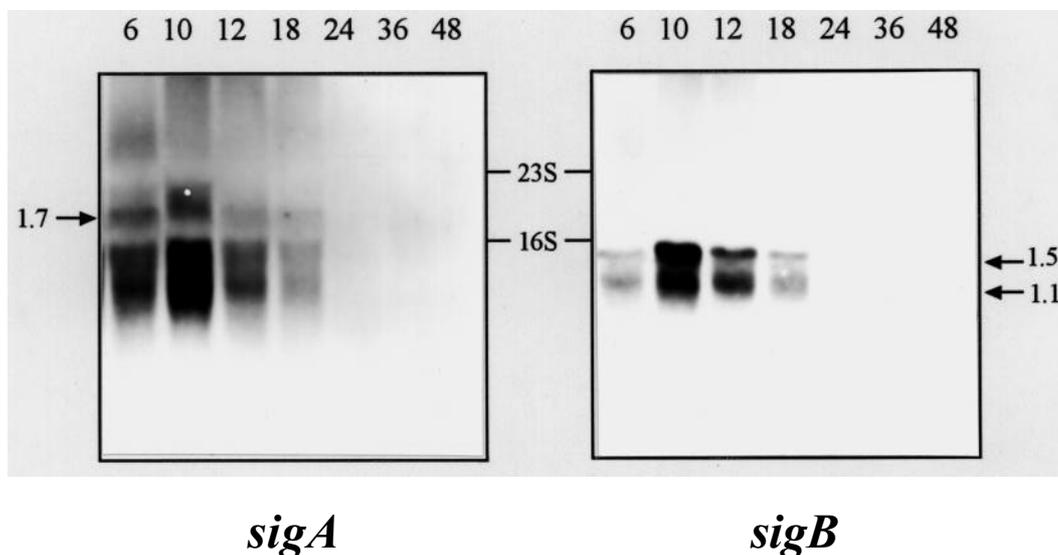
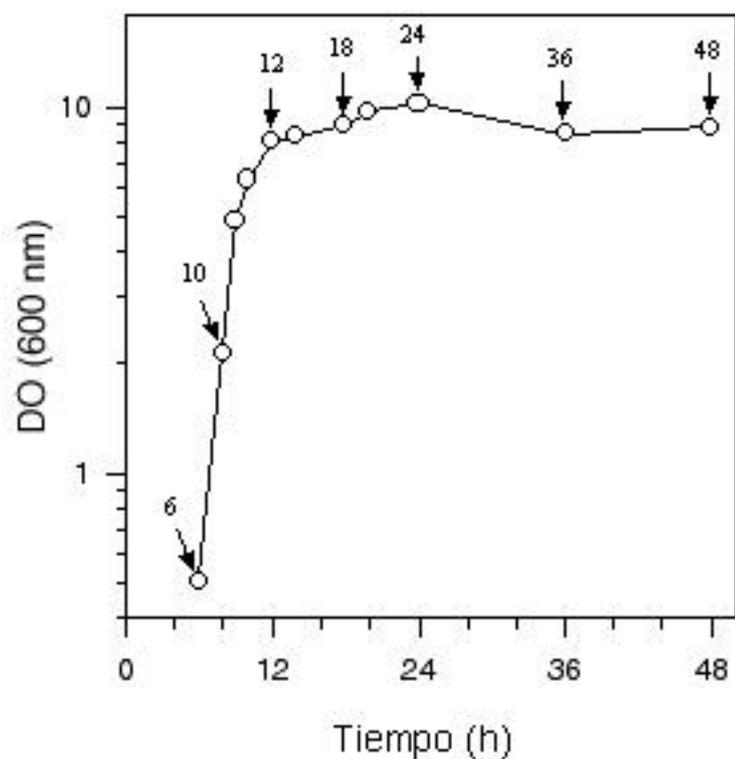


Figura 3.12. Análisis mediante la técnica de *Northern* de los mRNAs transcritos de los genes *sigA* y *sigB* de *B. lactofermentum*. En la curva de crecimiento se indican los tiempos a los que se realizó la extracción de las muestras de RNA de cultivos de *B. lactofermentum* crecidos en medio TSB: 6 horas (línea 1), 10 horas (línea 2), 12 horas (línea 3), 18 horas (línea 4), 24 horas (línea 5), 36 horas (línea 6) y 48 horas (línea 7). En cada carril de un gel de agarosa-formaldehído desnaturalizante se cargaron 75 μ g de RNA total. Las sondas internas a los genes *sigA* y *sigB* se indican en las figuras 3.4 y 3.6, respectivamente. Las flechas corresponden al tamaño de los transcritos en kb y la posición de los rRNAs 23S y 16S está señalada entre los paneles.

La alta homología de las proteínas SigA y SigB, homólogas a la HrdB de *Streptomyces*, con los factores sigma principales de *M. smegmatis* MysA y MysB, respectivamente, la conservación de las subregiones 2.4 y 4.2, que intervienen en la unión del DNA promotor, así como la expresión predominante de los genes *sigA* y *sigB* durante la fase de crecimiento exponencial, apoyan la hipótesis de que ambos factores sigma están implicados en la transcripción de genes de metabolismo primario (*house-keeping genes*), y confieren a la holoenzima la especificidad para reconocer promotores similares. Tampoco hay que descartar que las diferentes holoenzimas que forman con la RNA polimerasa los factores sigma SigA y SigB puedan competir en la transcripción de los genes de metabolismo primario, en función de las distintas afinidades para cada promotor.

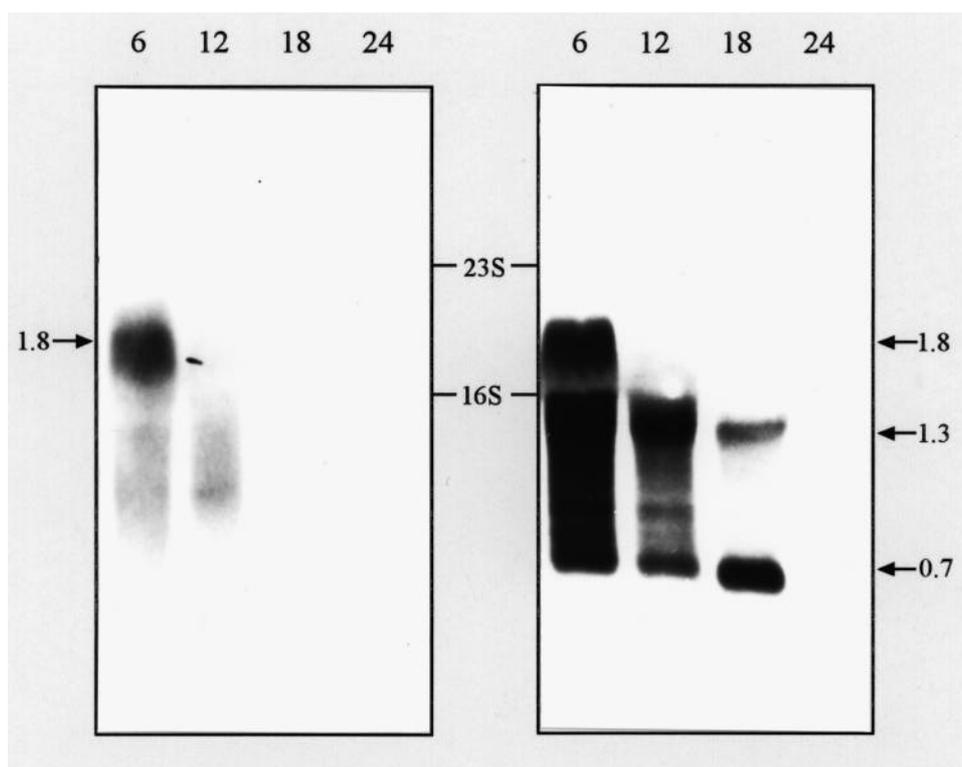
La presencia de transcritos predominantes de los factores sigma SigA y SigB durante la fase de crecimiento exponencial, hace pensar en la existencia de otros factores sigma que puedan aparecer secuencialmente en otros estadios del crecimiento: fase de crecimiento estacionaria, choque térmico, cambios osmóticos...

6.2. Análisis transcripcional de los genes *dtxR* y *galE*

La organización transcripcional de los genes *dtxR* y *galE* de *B. lactofermentum*, así como su expresión en función de la fase de crecimiento en medio complejo (TSB), también fueron analizadas mediante hibridaciones de *Northern*. Muestras conteniendo 50 µg de RNA total de cultivos de *B. lactofermentum* crecidos en medio complejo extraído a 6, 10, 12 y 24 horas (Figura 3.12), fueron separadas en geles desnaturalizantes de agarosa-formaldehído y transferidos a membranas de nylon.

En hibridaciones con una sonda interna al gen *dtxR* de 0.26 kb *SphI-KpnI* y con una sonda interna al gen *galE* de 0.95 kb *XbaI-HindIII* (Figura 3.6), se observaba un transcrito predominante de 1.8 kb en RNAs obtenidos durante la fase exponencial de crecimiento (6 horas) (Figura 3.13). En RNAs obtenidos al final de la fase exponencial (12 horas) y al inicio de la fase estacionaria (18 horas), el nivel del transcrito de 1.8 kb decrecía en hibridaciones con la sonda *dtxR* o *galE*, y desaparece a lo largo de la fase estacionaria (24 horas). Estos resultados indican que los genes *dtxR* y *galE*, que únicamente están separados por 6 bp, forman un operón que durante las fases de crecimiento exponencial e inicio de la fase estacionaria se transcribe como un mRNA bicistrónico de 1.8 kb desde el promotor situado en la región 5' del gen *dtxR*.

Dos bandas de hibridación adicionales, de 1.3 y 0.7 kb, aparecen en la hibridación con la sonda *dtxR*, pero no con la sonda *galE*. La presencia de estos mRNAs también es función del crecimiento en medio complejo: la transcripción ocurre durante el crecimiento activo pero es reprimida en niveles de crecimiento estacionario. El transcrito de 0.7 kb podría corresponder a un mRNA monocistrónico *dtxR*, mientras que el transcrito de 1.3 kb puede originarse por terminación incompleta en la región 3' del gen *dtxR*, como se ha observado en el cluster *gap-pgk-tpi-ppc* de *C. glutamicum* (Schwinde *et al.*, 1993).



galeE

dtxR

Figura 3.13. Análisis mediante la técnica de *Northern* de los mRNAs transcritos de los genes *galeE* y *dtxR* de *B. lactofermentum*. En la curva de crecimiento (Figura 3.12) se indican los tiempos en los que se realizó la extracción de las muestras de RNA de cultivos de *B. lactofermentum* crecidos en medio TSB: 6 horas (línea 1), 12 horas (línea 2), 18 horas (línea 3) y 24 horas (línea 4). En cada carril de un gel de agarosa-formaldehído desnaturalizante se cargaron 50 µg de RNA total. Las sondas internas a los genes *galeE* y *dtxR* se indican en la figura 3.6. Las flechas corresponden al tamaño de los transcritos en kb y la posición de los rRNAs 23S y 16S está señalada entre los paneles.

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS: Regulación por hierro en *Brevibacterium lactofermentum*

En el apartado anterior de este estudio se ha descrito la identificación en la región 3' del gen *sigB* de *Brevibacterium lactofermentum* del gen estructural *dtxR*, que codifica para un elemento regulador activado por iones metálicos divalentes, homólogo al represor de la toxina de la difteria (DtxR) de *Corynebacterium diphtheriae*. En *C. diphtheriae*, la proteína DtxR es un elemento regulador global que controla la expresión de varios genes de sideróforos y del gen de la toxina de la difteria. Hasta la actualidad, todos los estudios relativos a la regulación por hierro en corinebacterias habían estado centrados en *C. diphtheriae*. El análisis a nivel molecular de la proteína represora DtxR de *B. lactofermentum*, así como, del mecanismo de control transcripcional dependiente de hierro podía proporcionar información adicional sobre la expresión génica en corinebacterias.

1. Identificación del gen *dtxR* de *B. lactofermentum*

En la región 3' del gen *sigB* de *B. lactofermentum*, se localizó un marco de lectura abierto de 686 bp (ORF3) que codificaba un polipéptido de 228 aminoácidos (Figura 3.7). La proteína deducida de ORF3 de Mr 25.4 kDa y correspondía a una proteína análoga a la del represor de la toxina de la difteria, DtxR, de *C. diphtheriae* (Oguiza *et al.*, 1995a). La comparación de las secuencias de aminoácidos de la proteína DtxR de *C. diphtheriae* y la proteína homóloga de *B. lactofermentum* reveló que eran idénticas en un 70.8%, y además un 10.2% adicional de los aminoácidos de las secuencias alineadas eran similares (Figura 4.1). Sólo 15 aminoácidos (10.5%) de los 145 aminoácidos de la porción N-terminal en las secuencias alineadas eran diferentes, mientras que 29 (39%) de los 83 aminoácidos de la porción C-terminal eran distintos. En el caso de la proteína DtxR de *C. diphtheriae* se ha observado que en el extremo N-terminal están localizados los dominios funcionales de unión a DNA HTH, de activación mediante unión a iones metálicos y de interacción proteína-proteína entre los monómeros (Schiering *et al.*, 1995). Basándose en esta observación, era posible anticipar que la proteína homóloga DtxR de *B. lactofermentum* también se comportaría como un elemento regulador activado por iones metálicos de transición.

CdDTXR	MKDLVDTTEMYLRTIYELEEEGVTPLRARIAERLEQSGPTVSQTVARMER	50
B1DTXR	VKDLVDTTEMYLRTIYELEEEGIVPLRARIAERLEQSGPTVSQTVARMER	50
CdDTXR	DGLVVVASDRSLQMTPTGRTLATAVMRKHRLAERLLTDIIGLDINKVHDE	100
B1DTXR	DGLVHVSPDRSLEMTPEGRSLAIAVMRNDRLAERLLTDIIGLDIHKVHDE	100
CdDTXR	ACRWEHVMSDEVERRLVKVLKDVSRSPFGNPI PGLDELGVGNSDAAAPGT	150
B1DTXR	ACRWEHVMSDEVERRLVEVLDDVHRSRSPFGNPI PGLGEIGLDQADEPDSGV	150
CdDTXR	RVIDAATSMRPRKVRIVQINEIFQVETDQFTQLLDADIRVGSEVEIVDRDG	200
B1DTXR	RAIDLPLGENLKARIVQLNEILQVDLEQFQALTDAGVEIGTEVDIINEQG	200
CdDTXR	HITLSHNGKDVELLDDLAHTIRIE--EL	226
B1DTXR	RVVITHNGSSVELIDDLAHAVRVEKVEG	228

Figura 4.1. Comparación de las secuencias de aminoácidos de las proteínas DtxR de *C. diphtheriae* (Cd) (Boyd *et al.*, 1990) y de *B. lactofermentum* (B1). Las líneas indican aminoácidos idénticos y los puntos aminoácidos homólogos (A-S-T, D-E, N-Q, R-K, I-L-M-V, F-Y-W).

2. Inmunodetección de la proteína DtxR de *B. lactofermentum*

Se empleó suero conteniendo anticuerpos policlonales anti-DtxR obtenidos contra la proteína purificada DtxR de *C. diphtheriae* (Tao *et al.*, 1992) en estudios de inmunodetección de extractos de proteína total de *E. coli* DH10B [pULJSX4], y *B. lactofermentum*. Extractos celulares de *B. lactofermentum* y *E. coli* DH10B [pULJSX4] separados mediante SDS-PAGE e inmunodetección, presentaron bandas proteicas inmunoreactivas frente a anticuerpos policlonales anti-DtxR de *C. diphtheriae* (Figura 4.2). La movilidad electroforética de la proteína DtxR de *B. lactofermentum* detectada, con una Mr de 27 kDa, fue ligeramente superior a la observada para la proteína DtxR purificada de *C. diphtheriae* (Tao *et al.*, 1992) (Figura 4.2). En *E. coli* DH10B [pULJSX4] se detectaron tres bandas proteicas inmunoreactivas con Mr de 27, 26.5 y 18 kDa. Esta presencia de formas inmunoreactivas menores sugiere que la proteína DtxR de *B. lactofermentum* con Mr de 27 kDa puede sufrir degradación parcial en *E. coli* por una endoproteasa(s). En extractos crudos de *E. coli* DH10B [pBluescript KS(+)] no se detectaron proteínas inmunoreactivas.

Con los mismos anticuerpos policlonales anti-DtxR se ha detectado en *S. lividans* la presencia de una proteína inmunoreactiva con Mr de 28 kDa. Esta evidencia sugiere la existencia de elementos reguladores similares al DtxR también en *Streptomyces*. La posible existencia de un elemento regulador negativo homólogo al DtxR en *S. pilosus* y *S. lividans* (aunque todavía no se ha identificado su gen estructural) está también sugerida por la presencia en la región promotora del gen *desA*, que codifica la enzima lisina descarboxilasa y está inducido por la deficiencia de hierro, de un sitio de unión del represor que es responsable de la regulación por hierro de la expresión de este gen (Günter *et al.*, 1993). Este sitio de unión del represor es homólogo al operador *tox* presente en *C. diphtheriae* y esencialmente idéntico a la secuencia mínima de nucleótidos requerida para la unión de la proteína DtxR (Tao y Murphy, 1994).

La presencia de genes que codifican para proteínas similares a DtxR, también ha sido observada en distintas especies de *Mycobacterium*. De los resultados anteriores se puede adelantar la existencia de una familia de elementos reguladores similares al DtxR, al menos en determinados grupos de bacterias Gram-positivas: corinebacterias, micobacterias y *Streptomyces*. Estas proteínas reguladoras probablemente tienen dominios similares de unión a DNA y de activación por iones metálicos de transición, genes similares bajo su control y reconocen secuencias de DNA similares.

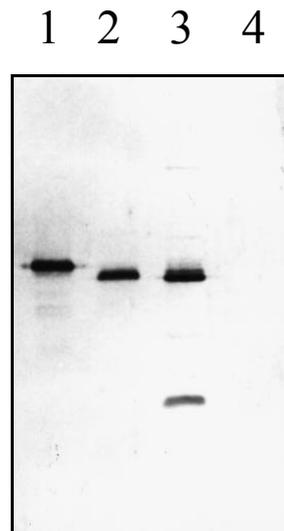


Figura 4.2. Inmunodetección (*immunoblot*) en extractos crudos de cepas de *B. lactofermentum* y *E. coli*. Línea 1, proteína purificada DtxR de *C. diphtheriae*; Línea 2, *B. lactofermentum* BL13869; Línea 3, *E. coli* DH10B [pULJSX4]; Línea 4, *E. coli* DH10B [pBluescript KS(+)].

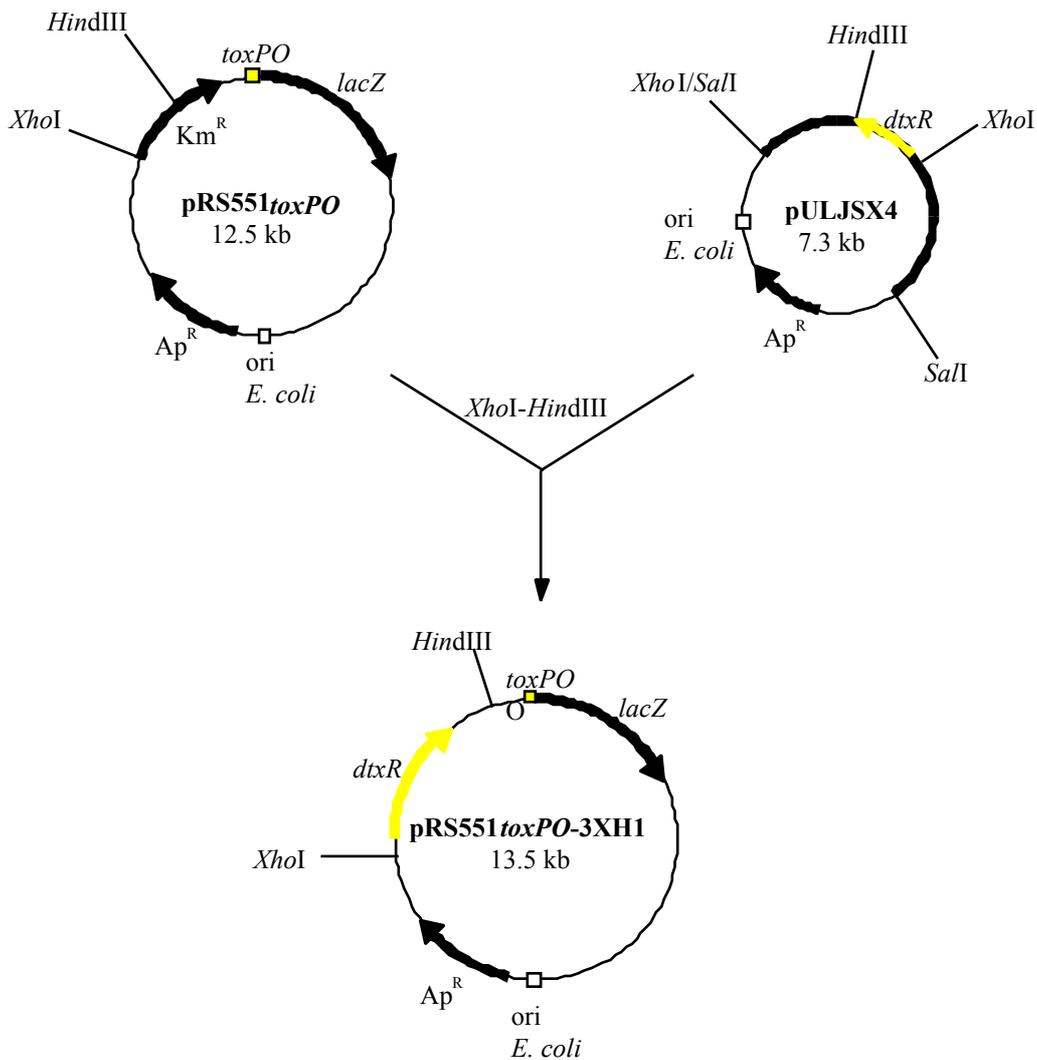


Figura 4.3. Esquema de la construcción del plásmido pRS551toxPO3XH1 a partir del plásmido pRS551toxPO y pULJSX4.

3. La proteína DtxR de *B. lactofermentum* es un elemento regulador activado por hierro

Se ha demostrado que en la región N-terminal de la proteína DtxR de *C. diphtheriae* residen los dominios de unión a DNA y metales (Tao *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1994), además del dominio de interacción proteína-proteína (Schiering *et al.*, 1995). Debido a la alta conservación observada en la región N-terminal, se procedió a investigar la posibilidad de que la proteína DtxR de *B. lactofermentum* pudiera funcionar como un elemento regulador activado por hierro y fuese capaz de controlar la expresión de la enzima β -galactosidasa a partir de una fusión transcripcional del promotor/operador *tox* (*toxPO-lacZ*) en el cromosoma de *E. coli*. Para ello, se transformó el plásmido pULJSX4 que contiene el gen *dtxR* de *B. lactofermentum* así como su región promotora (Figura 3.6) en la cepa de *E. coli* DH5 : RS45*toxPO-lacZ*. En esta cepa de *E. coli*, la expresión del gen de la

-galactosidasa (*lacZ*) está controlada por el promotor/operador *tox* y se ha demostrado previamente que estaba sometido a regulación dependiente de hierro por la proteína DtxR de *C. diphtheriae* (Boyd *et al.*, 1990). En ausencia de proteína DtxR, *E. coli* DH5 : RS45*toxPO-lacZ* expresa constitutivamente la enzima -galactosidasa y en medio LB suplementado con Ap y X-Gal, el fenotipo de la cepa es azul. En el caso de los transformantes que contenían el plásmido pULJSX4 se observó que en este medio poseían un fenotipo blanco, al estar reprimida la expresión del gen *lacZ* por la proteína DtxR, al actuar la proteína DtxR de *B. lactofermentum* como un elemento regulador sobre el promotor/operador *tox* (*toxPO*) en las condiciones anteriores.

Debido a que el nivel de expresión de la -galactosidasa es bajo en la cepa de *E. coli* DH5 : RS45 *toxPO-lacZ*, se subclonó un fragmento de 1.3 kb *XhoI-HindIII* del plásmido pULJSX4, fragmento correspondiente al gen *dtxR* completo de *B. lactofermentum*, en el plásmido multicopia pRS551*toxPO* que contiene una fusión transcripcional entre el promotor/operador *tox* (*toxPO*) y el gen *lacZ* (Boyd *et al.*, 1990) (Figura 4.3).

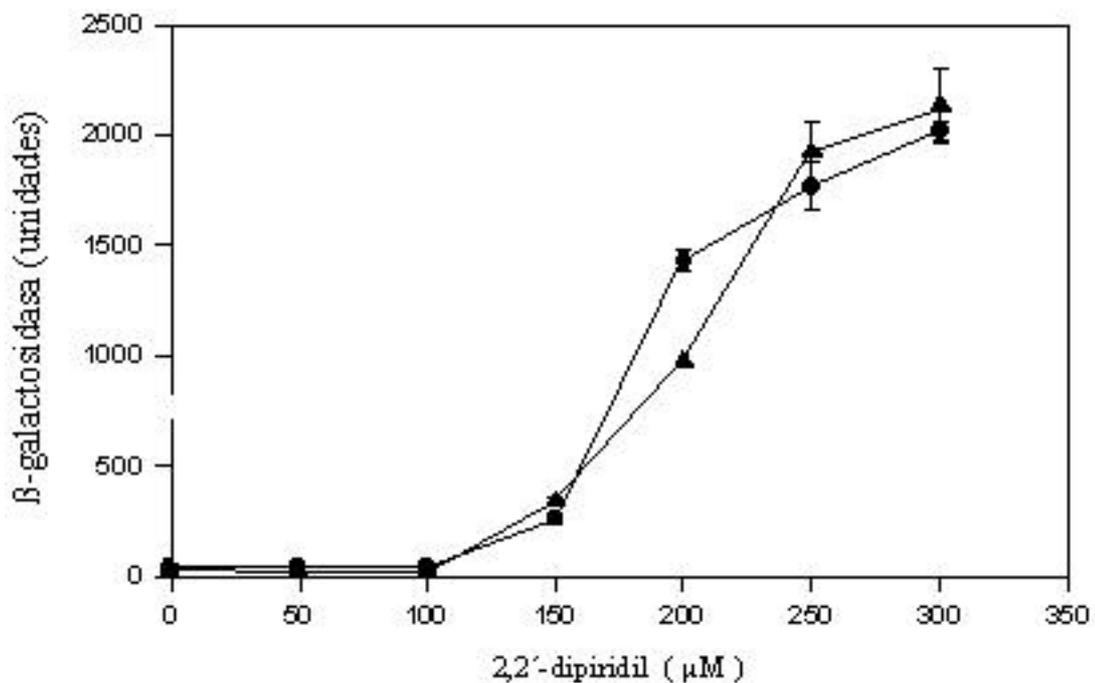


Figura 4.4. Expresión de -galactosidasa a partir de una fusión transcripcional *toxPO-lacZ* en *E. coli* DH5 [pRS551*toxPO*-3XH1] (●) y en *E. coli* DH5 [pRS551*toxPO*-VN1200] (▲) en ausencia de 2,2'-dipiridil y en presencia de concentraciones crecientes de 2,2'-dipiridil.

El plásmido resultante, pRS551*toxPO*-3XH1 (Figura 4.3), se transformó en *E. coli* DH5 para estudiar la regulación dependiente de hierro de la expresión del gen *lacZ* por la proteína DtxR de *B. lactofermentum*. Como control positivo de regulación, se utilizó el plásmido pRS551 *toxPO*-VN1200 que contiene el gen *dtxR* de *C. diphtheriae* (Boyd *et al.*, 1990). La proteína DtxR de *B. lactofermentum* regula la expresión de -galactosidasa de un modo dependiente de hierro (Figura 4.4): en ausencia del compuesto quelante de hierro 2,2'-dipiridil, el gen *lacZ* estaba completamente reprimido; al alcanzarse concentraciones de 2,2'-dipiridil próximas a 150 μM, se

producía la desrepresión del gen *lacZ*. Por lo tanto, la proteína DtxR de *B. lactofermentum* ejercía una regulación dependiente de hierro sobre la expresión del gen *lacZ* a partir de la fusión transcripcional con el promotor/operador *tox*. Además se observó que en presencia de concentraciones variables de 2,2'-dipiridil la regulación de la expresión del gen *lacZ* en *E. coli* por la proteína DtxR de *B. lactofermentum*, era esencialmente idéntica a la observada para la proteína DtxR de *C. diphtheriae* (Figura 4.4). Las pequeñas diferencias observadas en la expresión del gen *lacZ* posiblemente eran debidas en su mayoría a diferencias en la fuerza de los promotores que dirigen la expresión de cada uno de los genes *dtxR*.

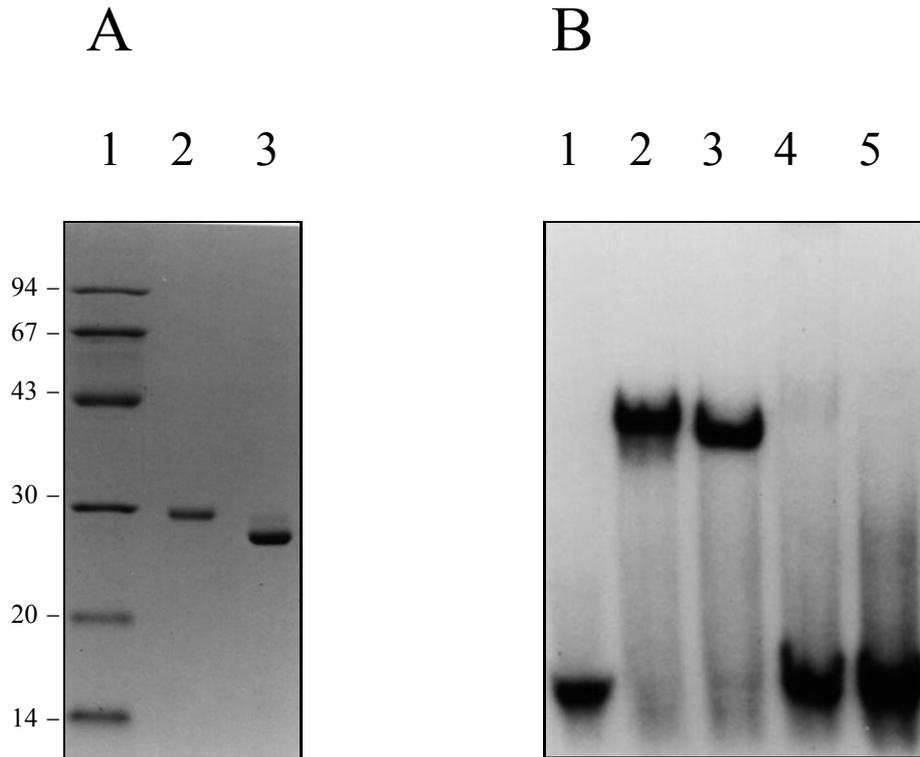


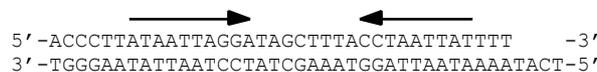
Figura 4.5. a. SDS-PAGE de la fracción conteniendo la proteína DtxR recombinante de *B. lactofermentum* purificada mediante cromatografía de inmunoafinidad. Línea 1, marcadores de peso molecular ($M_r \times 10^{-3}$); 2, fracción de la proteína DtxR purificada de *C. diphtheriae*; 3, fracción de la proteína DtxR recombinante purificada de *B. lactofermentum*. **b.** Retraso en geles de la región *toxPO* de *C. diphtheriae* marcada con $[^{32}P]$. Línea 1, región *toxPO* de *C. diphtheriae* marcada con $[^{32}P]$; 2, en presencia de proteína DtxR de *C. diphtheriae*; 3, en presencia de proteína DtxR recombinante de *B. lactofermentum*; 4, en presencia de proteína DtxR recombinante de *B. lactofermentum* y suero anti-DtxR; 5, en presencia de proteína DtxR recombinante de *B. lactofermentum* y sonda *toxPO* sin marcar.

4. Interacción entre la proteína DtxR de *B. lactofermentum* y el promotor/operador *tox* de *C. diphtheriae* (*toxPO*)

Para analizar la interacción entre el operador/promotor *toxPO* de *C. diphtheriae* y la proteína DtxR de *B. lactofermentum*, se purificó esta proteína a partir de extractos celulares de *E. coli* DH10B†[pULJSX4] mediante cromatografía de inmunoafinidad. El plásmido pULJSX4 contiene el gen *dtxR* de *B. lactofermentum* y se expresa a partir de su propio promotor en *E. coli*. Las fracciones que contenían la proteína DtxR recombinante de *B. lactofermentum* fueron identificadas mediante SDS-PAGE e inmunodetección. La proteína pura DtxR de *B. lactofermentum* recombinante de 27 kDa presentó una movilidad electroforética ligeramente superior a la observada para la proteína DtxR purificada de *C. diphtheriae* (Tao *et al.*, 1992) (Figura 4.5a).

4.1. Reconocimiento del promotor/operador *tox* por la proteína DtxR de *B. lactofermentum* activada

Para examinar la interacción entre la proteína recombinante DtxR de *B. lactofermentum* y la región reguladora *tox*, se utilizó un ensayo de retraso de la movilidad electroforética de la región *toxPO* en geles de poliacrilamida. La sonda conteniendo la región *toxPO* se marcó en el extremo 3' con [³²P]dATP mediante relleno del extremo siguiendo los procedimientos habituales:



Como se observa en la Figura 4.5b, la interacción entre la proteína recombinante DtxR de *B. lactofermentum* y el promotor/operador *toxPO* es específica. En presencia de iones metálicos pesados (Mn^{2+}) el retraso en la movilidad electroforética de *toxPO* provocado por la unión de la proteína DtxR de *B. lactofermentum* es esencialmente idéntica a la observada para la proteína DtxR de *C. diphtheriae*. En contraste, la adición de suero con anticuerpos anti-DtxR a la mezcla de reacción bloquea la unión de la proteína DtxR a la sonda *toxPO* marcada. Al añadir sonda *toxPO* sin marcar a la mezcla de reacción también se produce una inhibición competitiva de la interacción entre la proteína DtxR purificada de *B. lactofermentum* y la sonda *toxPO* marcada.

4.2. Protección de la digestión por DNasa I de la secuencia palindrómica del promotor/operador *tox* por la proteína DtxR de *B. lactofermentum* activada

Para determinar en mayor profundidad la interacción entre la proteína recombinante DtxR de *B. lactofermentum* y la región reguladora *tox* de *C. diphtheriae* también se realizaron estudios de protección a la digestión por DNasa I (*footprinting*). La región reguladora *toxPO* contenida en el

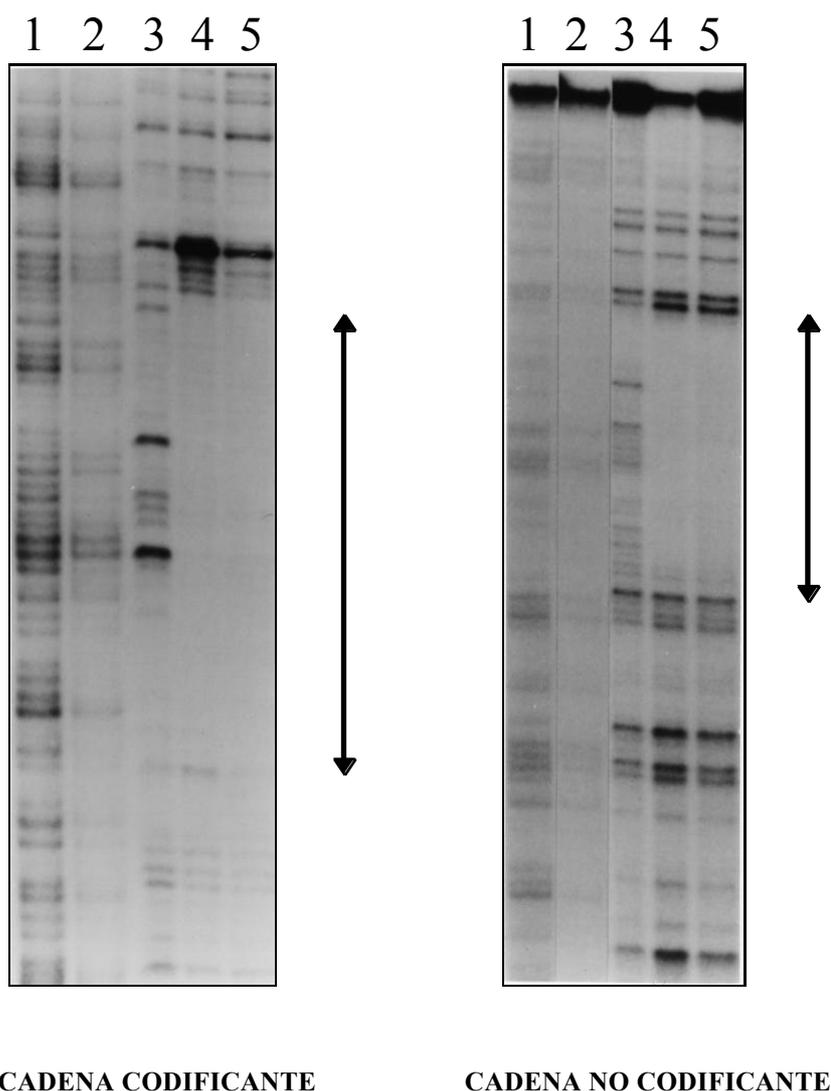


Figura 4.6. Análisis de protección a la digestión por DNasa I de la región *toxPO* de *C. diphtheriae* en la cadena codificante y no codificante en presencia de 100 mM Ni²⁺. Línea 1, C+T; 2, C; 3, reacción en ausencia de proteína DtxR; 4, reacción en presencia de proteína DtxR de *C. diphtheriae*; 5, reacción en presencia de proteína DtxR recombinante de *B. lactofermentum*. A la derecha de cada panel se indica con una flecha la región de *toxPO* protegida por la proteína DtxR de la digestión con DNasa I en cada una de las cadenas. En la página anterior, la representación de la región promotora/operadora del gen *tox* de *C. diphtheriae* presenta sombreada la región protegida de la digestión por DNasa I en presencia de 100 mM Ni²⁺.

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS: Cataracterización del operón *argS-lysA* de *Brevibacterium lactofermentum*: Mecanismo de antiterminación

En *Corynebacterium glutamicum*, existen evidencias funcionales y moleculares de que el último gen de la ruta biosintética de lisina, *lysA*, se expresa como un mRNA policistrónico con un gen *orfX*, de función desconocida (Marcel *et al.*, 1990), a partir de un promotor común localizado en la región 5' del gen *orfX*. El gen *lysA*, codifica para la enzima meso-diaminopimelato descarboxilasa, que cataliza la conversión del ácido meso-diaminopimélico (meso-DAP) para formar lisina (Marquez *et al.*, 1985; Yeh *et al.*, 1988) (Figura 5.1). En *C. glutamicum*, se ha observado que el producto del gen *orfX* no está directamente ligado a la vía biosintética de lisina, aunque la existencia de uniones físicas y genéticas entre los genes *orfX* y *lysA* en *C. glutamicum*, puede implicar la existencia de una unión bioquímica (Marcel *et al.*, 1990). Las actividades enzimáticas del producto del gen *orfX* que inicialmente se investigaron como posibles, fueron la actividad UDP-N-acetilmuramil-L-ala- -D-glu-meso-DAP sintasa (E.C. 6.3.2.13), que incorpora meso-DAP al precursor del peptidoglicano, y la actividad DAP epimerasa (E.C. 5.1.1.7) que corresponde al gen *dapF* (Marcel *et al.*, 1990). Ninguna de estas dos enzimas correspondía al producto del gen *orfX*. También, se ha especulado con la posibilidad de que el producto del gen *orfX* estuviese implicado en el transporte de lisina a través de la membrana celular. En *B. lactofermentum* era también de gran interés el estudio del operón *orfX-lysA*, la determinación del producto del gen *orfX* y su posible implicación en la biosíntesis de lisina.

1. Clonación del operón *argS-lysA* de *B. lactofermentum*

Para la clonación del operón *argS-lysA* de *B. lactofermentum* se utilizaron genotecas de *B. lactofermentum* ATCC 13869. Las genotecas, cuya construcción ha sido descrita previamente (Malumbres, 1993), se realizaron a partir de fragmentos de DNA total cromosómico de *B. lactofermentum* digerido con *Sau3AI* (digestión parcial) y *HindIII* (digestión total) y se aislaron por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa fragmentos con un rango de tamaño entre 4 y 10 kb. Las mezclas de ligación de estos fragmentos con pUC13 digerido con *BamHI* (que genera extremos

compatibles con los obtenidos por digestión con *Sau3AI*) o con *HindIII*, respectivamente, fueron inicialmente transformadas en *E. coli* DH5 para amplificar las genotecas.

El procedimiento seguido para la clonación del gen *lysA* de *B. lactofermentum* fue el de complementación de cepas mutantes *lysA* de *E. coli* (Marquez *et al.*, 1985). Las cepas de *E. coli* mutantes *lysA*, CGSC4505 y RLA11, fueron transformadas con las genotecas *Sau3AI* y *HindIII* procedentes del DNA cromosómico de *B. lactofermentum* ATCC 13869.

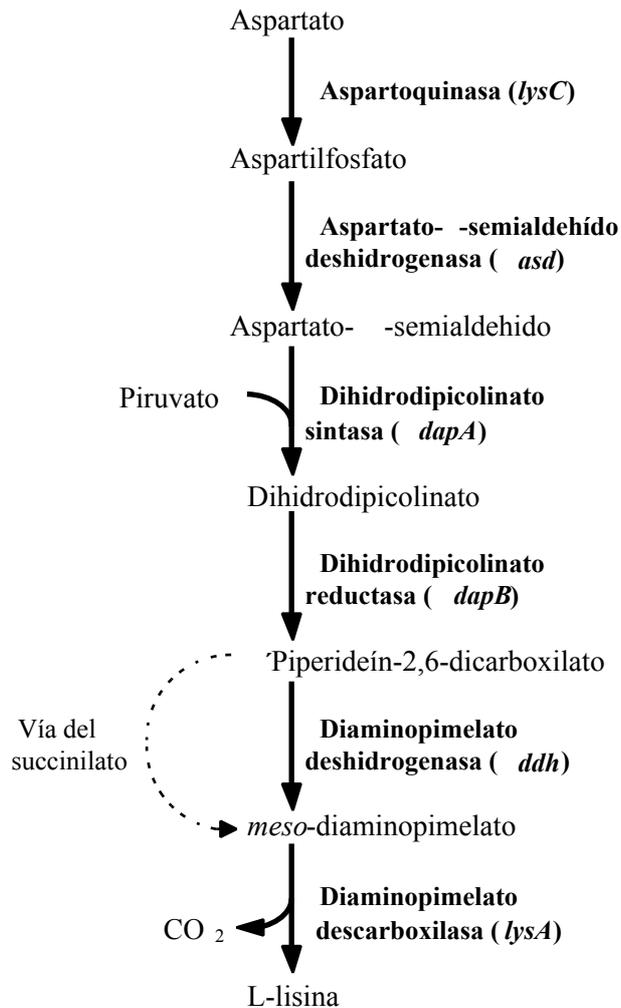


Figura 5.1. Esquema general de la biosíntesis de lisina en corinebacterias. En cada paso biosintético aparece el nombre de la enzima que lo cataliza y el gen correspondiente.

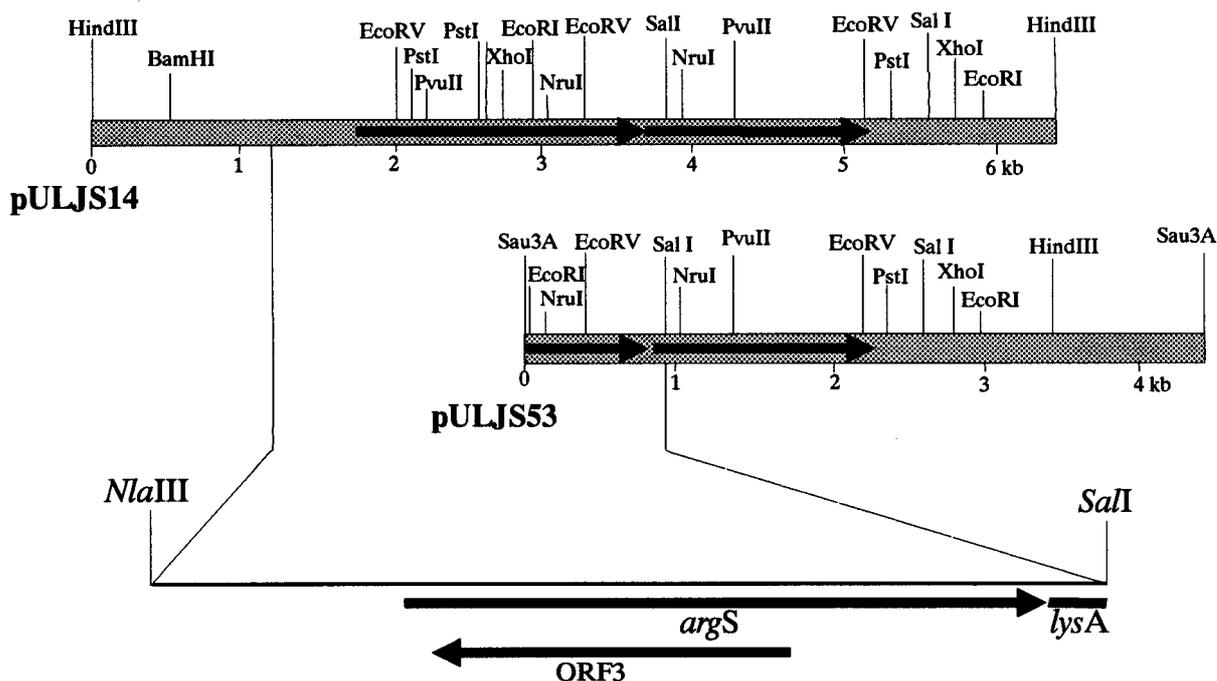


Figura 5.2. Mapa físico de los fragmentos de 6.4 kb *Hind*III y 4.4 kb *Sau*3AI contenidos en los plásmidos pULJS14 y pULJS53, respectivamente. Estos plásmidos son capaces de complementar las mutaciones *lysA* de *E. coli*. Las flechas representan las regiones codificantes, también se indica el fragmento de 2.5 kb *Nla*III-*Sal*I secuenciado.

La selección de los clones recombinantes se realizó en placas de medio mínimo Vogel-Bonner+Ap, ya que los mutantes *lysA* tienen un requerimiento específico de lisina, en estas condiciones únicamente se seleccionarían aquellos clones en los que ocurría complementación de la mutación por el gen *lysA* de *B. lactofermentum*. De esta manera se aislaron dos plásmidos: pULJS14, conteniendo un inserto *Hind*III de 6.4 kb y, pULJS53, con un inserto *Sau*3AI de 4.4 kb (Figura 5.2).

La presencia en el cromosoma de *B. lactofermentum* de los insertos contenidos en estos plásmidos fue confirmada por hibridación de *Southern*. En hibridaciones de DNA total de *B. lactofermentum* ATCC 13869 y *C. glutamicum* AS019 digerido con *Hind*III y *Bam*HI, utilizando como sonda radioactiva el plásmido pULJS53 marcado con [32 P]dCTP, se identificaron bandas de hibridación que correspondían a los tamaños esperados, en relación al mapa de restricción del plásmido pULJS53 (Malumbres, 1993). Las señales de hibridación obtenidas para ambas corinebacterias fueron idénticas y, no se observaron en el DNA total de *E. coli* digerido con *Bam*HI utilizado como control.

2. Identificación del gen *argS* de *B. lactofermentum*

La determinación de la secuencia de nucleótidos del fragmento *NlaIII-SalI* de 2.5 kb (Figura 5.3) y el posterior análisis de ORFs en el fragmento secuenciado (Figura 5.2), ha permitido identificar un marco de lectura abierto completo (ORF1) y otro incompleto (ORF2). ORF1 de 1.7 kb estaría localizado en la misma orientación que ORF2 (Figura 5.3). Se encontraron dos sitios posibles de inicio de la transcripción en ORF1, considerando la primera Met (AUG) como el extremo N-terminal, el producto de ORF1 sería de 550 aminoácidos con una Mr de 59.8 kDa; si se considera la Val (GUG) como tal, la proteína codificada en ORF1 constaría de 517 aminoácidos y Mr de 56.2 kDa. Se localizó un ORF adicional (ORF3) divergente con respecto a los anteriores interno a ORF1, que codificaría un producto de 328 aminoácidos y Mr de 36.3 kDa (Figura 5.2). El contenido en G+C de ORF1 es de 57%, similar a los valores descritos para genes de corinebacterias.

La comparación de la secuencia nucleotídica del fragmento secuenciado y las secuencias de aminoácidos deducidas de los marcos de lectura abiertos, demostró que el ORF1 de *B. lactofermentum* es casi idéntico al gen *orfX* de *C. glutamicum* (Marcel *et al.*, 1990), presentando únicamente 11 nucleótidos diferentes, y sólo 3 se traducen en cambios de aminoácidos en la secuencia proteica. Asimismo, las secuencias de aminoácidos deducida de ORF1 de *B. lactofermentum* y de *orfX* de *C. glutamicum* son bastante homólogas con la arginil-tRNA sintetasa de *E. coli* (Eriani *et al.*, 1989), presentando un 28% de aminoácidos idénticos y 49% similares (Figura 5.4). Recientemente, se ha descrito el gen *lysA* de *Mycobacterium tuberculosis* (Andersen y Hansen, 1993); al analizar la región 5' secuenciada hemos identificado un ORF incompleto que presentaba clara homología con las proteínas anteriores (Figura 5.4).

El análisis del ORF2 incompleto demuestra que corresponde al gen *lysA*, previamente descrito en *C. glutamicum* (Yeh *et al.*, 1988). No se encontraron homologías para ORF3.

Esta observación de que la misma organización *argS-lysA* existe en *Mycobacterium tuberculosis* pero no en *E. coli* (donde los genes *argS* y *lysA* están localizados en los minutos 41.3 y 61.4, respectivamente) (Kröger *et al.*, 1992), *Bacillus subtilis* (Yamamoto *et al.*, 1991) o *Pseudomonas aeruginosa* (Jann *et al.*, 1990), viene a apoyar la proximidad filogenética entre los generos *Corynebacterium*, *Brevibacterium* y *Mycobacterium*, que han sido incluidos en la subdivisión de bacterias Gram-positivas de alto contenido en G+C en base a estudios de rRNAs (Woese, 1987).

Simultáneamente, a esta caracterización del gen *argS* de *B. lactofermentum* (Oguiza *et al.*, 1993), se postuló que el gen *orfX* de *C. glutamicum* podía codificar una arginil-tRNA sintetasa (Sharp y Mitchell, 1993), en base a la reexaminación de la secuencia previamente publicada.

1
 CATGCCAAGTGCTTGGCGACGCGTCCCAGTGCTTGGCGGTGTTGTGCGTGGTCAGGCTGGAGGTGTAGCCGGGTGCCGATCTCGCAGGATCTTAACGAA
 101
 AGGCCTTCGCGGGTGAGCAGCGAGAGAAATCGTATCCTGGTGCATGTTGTGCGAGTTAACCGTGTGGAGCCGACCATTCCGCGAGGCTGCAC TGCAAC
 201
 GAGGTGCTAGTTTTTGGTACATGGCTTCTGGCCAGTTCATGGATTGGCTGCCGAAGAAGCTATAGGCATGCCACCAGGGCCACCGGAGTTACCGAAGATG
 301
 GTGCCGTGCTTTTCGCCTTGGGCGAGGACCTTGACAAAAGCCACGCTGATATCGCCAAGTGAGGGATCAGAATAGTGATGGGCACGTCGATGCTGCCAC
 401
 ATTGAGCGGAGCAATATCTACCTGAGGTGGGCATTCTTCCAGCGGATGTTTTCTTGGCTGCTGCAGTGGGCATTGATACCAAAAAGGGGCTAAGCGC
 501
 AGTCGAGGCGGCAAGAAGTCTACTACCCTTTTTATTGTGCAACGGGGCATTACGGCTCCAAGGACGTTTGTCTTGGGTGAGTTACCCCAAAAAGCAT
 601
 ATACAGAGACCAATGATTTTTTCATTA AAAAGG CAGGGATTTGTTATAAGTATGGGTGCTATTCTGTGCGACGGGTGACCTCGGCTAGAATTTCTCCCA
 701
 TGACACCAGCTGATCTCGCAACATTGATTAAGAGACCGCGGTAGAGGTTTTGACCTCCCGGAGCTCGATACTTCTGTTCTTCCGGAGCAGGTAGTTGT
 T P A D L A T L I K E T A V E V L T S R E L D T S V L P E Q V V V
 801
 GGAGCGTCCGCGTAACCCAGAGCAGCGGATTACGCCACCAACATTGCATTGCAGGTGGCTAAAAAGGTCGGTCAGAACCCTCGGGATTTGGCTACCTGG
 E R P R N P E H G D Y A T N I A L Q V A K K V G Q N P R D L A T W
 901
 CTGGCAGAGGCATTGGTGCAGATGACGCCATTGATTCTGCTGAAATCGCTGGCCAGGCTTTTTGAACATTCCGCTTGTGCAGCAGCGCAGGGTGAAA
 L A E A L A A D D A I D S A E I A G P G F L N I R L A A A A Q G E I
 1001
 TTGTGGCCAAGATTCTGGCACAGGGCAGACTTTCGAAAACCTCCGATCACCTTTCCACTTGGACGTGAACCTCGAGTTCGTTTCTGCAAAACCCAAACCGG
 V A K I L A Q G E T F G N S D H L S H L D V N L E F V S A N P T G
 1101
 ACCTATCCACCTTGGCGGAACCCGCTGGGCTGCCGTGGGTGACTCTTTGGGTGCTGTGCTGGAGGCTTCCGGCGCGAAAGTGACCCGCGAATACTACTTCC
 P I H L G G T R W A A V G D S L G R V L E A S G A K V T R E Y Y F
 1201
 AACGATCACGGTCGCCAGATCGATCGTTTCGCTTTGTCCCTTCTGCAGCGCGAAGGGCGAGCCAACGCCAGAAGACGGTTATGGCGCGAATACATTA
 N D H G R Q I D R F A L S L L A A A K G E P T P E D G Y G G E Y I K
 1301
 AGGAAATTGCGGAGGCAATCGTCGAAAAGCATCCTGAAGCGTTGGCTTTGGAGCCTGCCGCAACCCAGGAGCTTTTCCGCGCTGAAGGCGTGGAGATGAT
 E I A E A I V E K H P E A L A L E P A A T Q E L F R A E G V E M M
 1401
 GTTCGAGCACATCAAACTTCCCTGCATGAGTTCGGCACCGATTTCGATGTCTACTACCACGAGAACTCCCTGTTCGAGTCCGGTGGGACAAAGGCC
 F E H I K S S L H E F G T D F D V Y Y H E N S L F E S G A V D K A
 1501
 GTGCAGGTGCTGAAGGACAACGGCAACCTGTACGAAAACGAGGGCGCTTGGTGGCTGCGTTCCACCGAATTCCGCGATGACAAAGACCGGTGGTGATCA
 V Q V L K D N G N L Y E N E G A W W L R S T E F G D D K D R V V I K
 1601
 AGTCTGACGGCGACGCAGCCTACATCGCTGGCGATATCGCGTACGTGGCTGATAAGTTCTCCCGCGGACACAACCTAAACATCTACATGTTGGGTGCTGA
 S D G D A A Y I A G D I A Y V A D K F S R G H N L N I Y M L G A D
 1701
 CCACCATGGTTACATCGCGCGCTGAAGGCAGCGCGCGGCGCACTTGGCTACAAGCCAGAAGACGTTGAAGTCTGATTGGCCAGATGGTGAACCTGCTT
 H H G Y I A R L K A A A A A L G Y K P E D V E V L I G Q M V N L L
 1801
 CGCGACGGCAAGGCAGTGCGTATGTCCAAGCGTGCAGGCACCGTGGTACCCTAGATGACCTCGTTGAAGCAATCGGCATCGATGCGGCGCGTTACTCCC
 R D G K A V R M S K R A G T V V T L D D L V E A I G I D A A R Y S L
 1901
 TGATCCGTTCCCTCCGTGGATTCCCTCCCTGGATATGGATCTTGGCCTGTGGGAATCCAGTCCCTCCGACAACCCGTGTACTACGTGAGTACGGACACGC
 I R S S V D S S L D M D L G L W E S Q S S D N P V Y Y V Q Y G H A
 2001
 TCGCCTTTGCTCCATCGCGCGCAAGGCAGAGACCTTGGGTGTACCCGAGGAAGGCGCAGACCTATCTCTACTGACCCACGACCGGAAGGCGATCTCATC
 R L C S I A R K A E T L G V T E E G A D L S L L T H D R E G D L I
 2101
 CGCACACTCGGAGAGTTCCAGCAGTGGTGAAGGCTGCCGCTGACCTACGTGAACCACACCGCATTTGCCGCTATGCTGAGGAATTAGCTGGAACCTTTCC
 R T L G E F P A V V K A A A D L R E P H R I A R Y A E E L A G T F H
 2201
 ACCGCTTCTACGATTCTCGCCACATCCTTCCAAGGCTGATGAGGATACGGCACCAATCCACACAGCAGTCTGGCACTGTCAGCAGCAACCCGCCAGAC
 R F Y D S C H I L P K A D E D T A P I H T A R L A L A A A T R Q T
 2301
 CCTCGCTAACGCCCTGCGCCTGGTGGCGTTTTCCGACCGGAGAAGATGTAACAATGGCTACAGTTGAAAATTTCAATGAACCTCCCGCACACGTATGGC
 L A N A L R L V G V S A P E K M * * * M A T V E N F N E L P A H V W P
 2401
 CACGCAATGCAGTGCGCCAAGAAGACGGCGTTGTACCGTGCCTGGTGTGCCTTGCCTGACCTCGCTGAAGAATACGGAACCCCACTGTTCTGATGTCGA
 R N A V R Q E D G V V T V A G V P L P D L A E E Y G T P L F V V D
 2501
 C

Figura 5.3. Secuencia de nucleótidos del fragmento *NlaIII-SalI* de 2.5 kb que contiene los genes *argS* y *lysA* (parcial) de *B. lactofermentum*. Los asteriscos representan codones de terminación. El número de acceso en la base de datos EMBL para esta secuencia es Z21501.

			<u>a</u>		<u>b</u>	<u>c</u>
<i>B. lactofermentum</i>	ArgRS	130	ANPTGPIHLGGTRWAAVGDLSLGRVLEASG		369	DGKAVRMSKRACTVTVTLDDIVEAIGIDAAR
<i>E. coli</i>	ArgRS	122	PRVAKEMHVGHLSRTIIGDAAVRTLEPLG		374	GKDGPFPKTRAGGGTVLADLLDEALERARR
<i>B. stearothermophilus</i>	ValRS	49	PNVTGKHLHGAWDTLQDIITRMKRMOG		520	DAQGRKMSKL.GNGVDPMDVIDQYGADALR
<i>E. coli</i>	ValRS	42	PNVTGSLHMGHAFQQTIMDTMIRYQRMQG		549	DDEGQKMSKSKGNVIDPLDMVDGSLPELL
<i>S. cerevisiae</i>	ValRS	190	PNVTGALHIGHLTIAIQDLSLIRYNRMKG		698	DAQGRKMSKL.GNVIDPLDVIITGKLDLH
<i>E. coli</i>	LeuRS	42	PYPGRLHMGHVRYNYTIGDVIARYQHMLG		614	YTGMSKMSKSKNGIDPQVMVERYGADTVR
<i>N. crassa</i>	LeuRS	55	PYMNGRLHAGHAFSFSKIEYHTGFARMQG		752	QLNGEKMSKSTGNFMFLDDVVKYGADAAR
<i>N. crassa (mit)</i>	LeuRS	41	PYPGHLHLGHLRVYTIADVIARFOTLQG		640	NVSYEKMSKSKHNGVDPPTFFIAQYGADATR
<i>S. cerevisiae</i>	LeuRS	84	PYMNGVMHAGCFTLKVEFSIGFERMNG		724	MLNNSKMSKSTGNFMFLDQTVKFGADAAR
<i>S. cerevisiae (mit)</i>	LeuRS	56	PYPGALHIGHLRVYVISDSLNRFYKQKG		641	VVSYEKMSKSKYNGADPNECILRHGPDATR
<i>S. douglasi (mit)</i>	LeuRS	56	PYPGVLHIGHLRVYVISDSLNRFYKQKG		641	MVSYFKMSKSKHNGADPNECILRHGADATR
<i>E. coli</i>	IleRS	58	PYANGSIHIGHSVNKILKDIIVKSKGLSG		597	DGGRKMSKSTENTVSPQVMNKLGADILR
<i>S. cerevisiae</i>	IleRS	47	PFATGTFPHYGHILASTIKDIVFRYATMTG		597	AADGRKMSKSLKNYPDPISVLNKYGADALR
<i>E. coli</i>	GlnRS	33	PEPNGYLHGHAKSICLNFGIAQDYKQGC		262	NLEYTVMSKSKKLNLLVTDKHVLE..GWD DPR
<i>S. cerevisiae</i>	GlnRS	258	PEPNGYLHGHASKAINVMFGYAKYHNGTC		490	NITGTVLKSKKIAQLVDEKFPV..GWD DPR
<i>H. sapiens</i>	GlnRS	37	PEASGYLHGHAKALLNQHYQVNFRTGKL		260	NLNNTVLKSKLTLWTFVNEGL.VD..GWD DPR
<i>E. coli</i>	GluRS	9	PSPTGYLHVGGARTLALYSWLFARNHGGEF		232	GDDGKLSKSKRHGAVSVMQYRDD..GYLPEA
<i>B. subtilis</i>	GluRS	11	PSPTGHLHIGARTLALFNLYFARNQGGKF		247	NESRKKLSKSKRDESI IQFIEQYKELGYLPEA
<i>B. stearothermophilus</i>	GluRS	11	PSPTGHLHIGARTLALFNLYFARNHGGKM		248	NEQRKLSKSKRDESI IQFVSQYKELGILPEA
<i>R. meliloti</i>	GluRS	11	PSPTGEPHVGTAYIALFNLYFAKKHGGKF		248	NADKSKLSKSKRNPTS..ISYYTALGYLPEA
<i>E. coli</i>	MetRS	14	PYANGSIHLGHMLEHIQADVVRVYQRMRG		227	TVNGAKMSKSRGTFIKASTWLNHFDAISLR
<i>T. thermophilus</i>	MetRS	12	YVVAEPLHGHAYTTVADFLARWRLDG		292	GPDGRKMSKTLGNVDDPFALEKYISPSVW
<i>S. cerevisiae</i>	MetRS	205	PYVNVPHLGNIIIGSVLSADIFARYCKGR		520	QYENKFSKSRGVGVFGNNAQDSGGRDALR

Figura 5.5. Comparación de los dominios conservados de la ArgRS de *B. lactofermentum* y de algunas aminoacil-tRNA sintetasas de Clase I. Los aminoácidos idénticos entre la ArgRS de *B. lactofermentum* y las otras aminoacil-tRNA sintetasas comparadas están sombreados. Los dominios conservados (a) HIGH, (b) KMSKS y (c) GADXXR están indicados. Todas las secuencias fueron obtenidas de la base de datos GenBank, con la excepción de la LeuRS de *S. cerevisiae* (Hohmann y Thevelein, 1992), la IleRS de *E. coli* (Webster *et al.*, 1984) y las GluRSs de *B. subtilis* y *B. stearothermophilus* (Breton *et al.*, 1990).

3. Comparación de la arginil-tRNA sintetasa con otras aminoacil-tRNA sintetasas

La comparación de la secuencia proteica de la arginil-tRNA sintetasa (ArgRS) de *B. lactofermentum* con diversas aminoacil-tRNA sintetasas (aaRSs) de procariotas y eucariotas (Figura 5.5), permitió identificar los correspondientes dominios conservados HIGH y KMSKS en esta enzima y clasificarla como una aminoacil-tRNA sintetasa de Clase I. La secuencia peptídica HIGH esta localizada cerca del extremo N-terminal de las aaRSs de Clase I, y está implicada probablemente en la unión de ATP (Webster *et al.*, 1984), el sustrato común de estas enzimas. En el caso de la TyrRS de *Bacillus stearothermophilus* se ha demostrado que las dos His del dominio HIGH están implicadas en esta unión (Leatherbarrow *et al.*, 1985). En la ArgRS de *B. lactofermentum*, el tetrapéptido HIGH (en este caso, HLGK) está localizado entre los aminoácidos 137 al 140, y la otra secuencia peptídica KMSKS, comienza en el aminoácido 374 (RMSKR). Se ha descrito que la secuencia KMSKS, está implicada en la unión del tRNA, en el caso de la MetRS y la TyrRS de *E. coli* (Hountondji *et al.*, 1986). Las LeuRS, IleRS y MetRS de distintos organismos también presentan un dominio adicional en la proximidad de la secuencia KMSKS, compuesto por la secuencia GADXXR (donde X, corresponde a aminoácidos no conservados). Este dominio GADXXR se presenta también conservado en la ArgRS de *B. lactofermentum*, y parece mantenerse en otras aaRSs de Clase I, como las GlnRSs de *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae* y humanos y, la ValRS de *Bacillus stearothermophilus* (Figura 5.5).

4. Expresión del operón *argS-lysA* en *B. lactofermentum* y *E. coli*

La expresión del operón *argS-lysA* de *B. lactofermentum* se ensayó en el vector bifuncional pUL610M, para uso en *E. coli* y *B. lactofermentum* (Martín *et al.*, 1990). La subclonación en este vector del fragmento *Hind*III de 6.4 kb procedente de pULJS14 que contenía el operón *argS-lysA*, dió como resultado el plásmido pUL610M15 (Figura 5.7). La actividad ArgRS dependiente del fragmento clonado fue ensayada en extractos crudos de *B. lactofermentum* R31 y R31 [pUL610M15]. El nivel de actividad ArgRS de *B. lactofermentum* R31 [pUL610M15], resultó cuatro veces superior al observado en la cepa R31 (Tabla 5.1).

Tabla 5.1
Actividades arginil-tRNA sintetasa

Cepa	Actividad específica ^a (u/mg proteína)	Actividad relativa ^b
<i>B. lactofermentum</i> R31	0.35	1.00
<i>B. lactofermentum</i> R31 [pUL610M15]	1.49	4.25
<i>E. coli</i> TGE900 [pTG908]	16.38	1.00
<i>E. coli</i> TGE900 [pULJS84]	53.70	3.28

^a Una unidad de actividad ArgRS (*u*) se define como la cantidad de proteína que cataliza la conversión de 1 nmol de aminoácido en el aminoacil-tRNA en 1 minuto en las condiciones descritas.

^b Una actividad relativa de 1.00 es la cantidad de ArgRS de las cepas control correspondientes: *B. lactofermentum* R31 y *E. coli* TGE900 [pTG908].

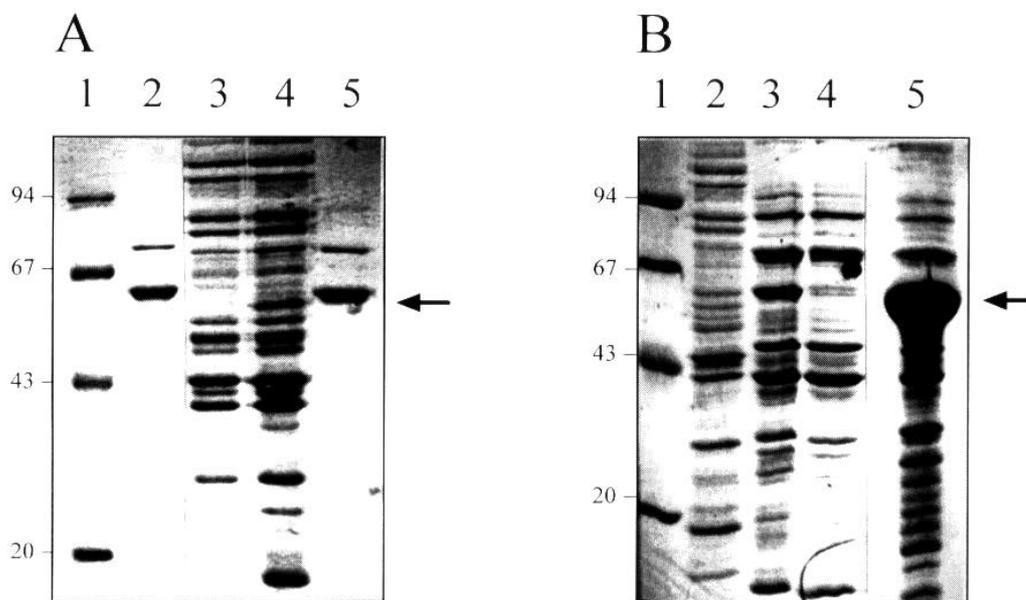


Figura 5.6 a. Análisis mediante SDS-PAGE de extractos crudos de *B. lactofermentum* R31. Las proteínas fueron teñidas con Azul de Coomassie. Línea 1, marcadores de peso molecular ($M_r \times 10^3$); 2 y 5, fracción conteniendo la proteína ArgRS de *E. coli* purificada; 3, extracto crudo de *B. lactofermentum* R31 (control); 4, extracto crudo de *B. lactofermentum* R31 [pUL610M15]. La flecha indica la posición de la ArgRS de *B. lactofermentum*. **b.** Expresión de la proteína ArgRS de *B. lactofermentum* como un polipéptido de fusión en *E. coli* TGE900. Línea 1, marcadores de peso molecular ($M_r \times 10^3$); 2, extracto crudo de *B. lactofermentum* R31 [pUL610M15]; 3, extracto crudo de *E. coli* TGE900 [pULJS84] inducido; 4, extracto crudo de *E. coli* TGE900 [pTG908]; 5, células de *E. coli* TGE900 [pULJS84] lisadas con SDS (Stanley, 1983). La flecha indica la posición del polipéptido de fusión de la ArgRS de *B. lactofermentum*.

El análisis mediante SDS-PAGE de los extractos crudos anteriores muestra en *B. lactofermentum* R31 [pUL610M15] una clara banda proteica de tamaño similar a la proteína ArgRS purificada de *E. coli* (Figura 5.6a). Esta banda con una Mr de 60 kDa está en correspondencia con el tamaño de la proteína codificada por ORF1: si se considera como inicio de la traducción la primera Met, la Mr es de 59.8 kDa. Para la expresión de la proteína ArgRS (Figura 5.6b), un fragmento de 1.7 kb *PvuII-SalI* procedente de pULJS14 conteniendo el gen *argS* completo de *B. lactofermentum*, fue clonado por modificación de extremos romos en el sitio único *BamHI* del vector de expresión pTG908 (Courtney *et al.*, 1984), y el plásmido resultante conteniendo la fusión transcripcional del gen *argS* se denominó pULJS84 (Figura 5.7). Cuando un fragmento de 1.65 kb *SacI-SalI* fue utilizado en lugar del fragmento *PvuII-SalI*, la proteína expresada resultaba inactiva, insoluble y de tamaño inferior al de la proteína original ArgRS de *B. lactofermentum* (Figura 5.6). Estos resultados apoyaban la asignación de la primera Met (localizada junto al sitio *PvuII*) como aminoácido N-terminal de la proteína, en lugar de la Val (situada junto al sitio *SacI*) propuesto por Marcel *et al.* (1990) para *C. glutamicum*. Extractos celulares crudos de *E. coli* TGE900 [pULJS84] presentaban una actividad ArgRS específica, cuatro veces mayor que la observada en extractos de *E. coli* TGE900 [pTG908] (Tabla 5.1). La actividad detectada en extractos crudos de *E. coli* TGE900 [pTG908], corresponde a la actividad endógena de la ArgRS de *E. coli*.

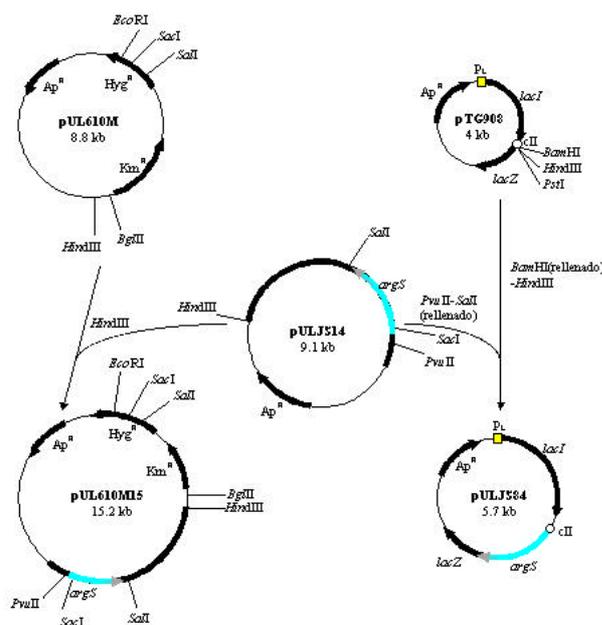


Figura 5.7. Esquema de la construcción de los plásmidos pUL610M15 y pULJS84 conteniendo el gen *argS* de *B. lactofermentum* a partir de los plásmidos pUL610M (vector bifuncional *E. coli*-corinebacterias) y pTG908 (vector de expresión en *E. coli*), respectivamente.

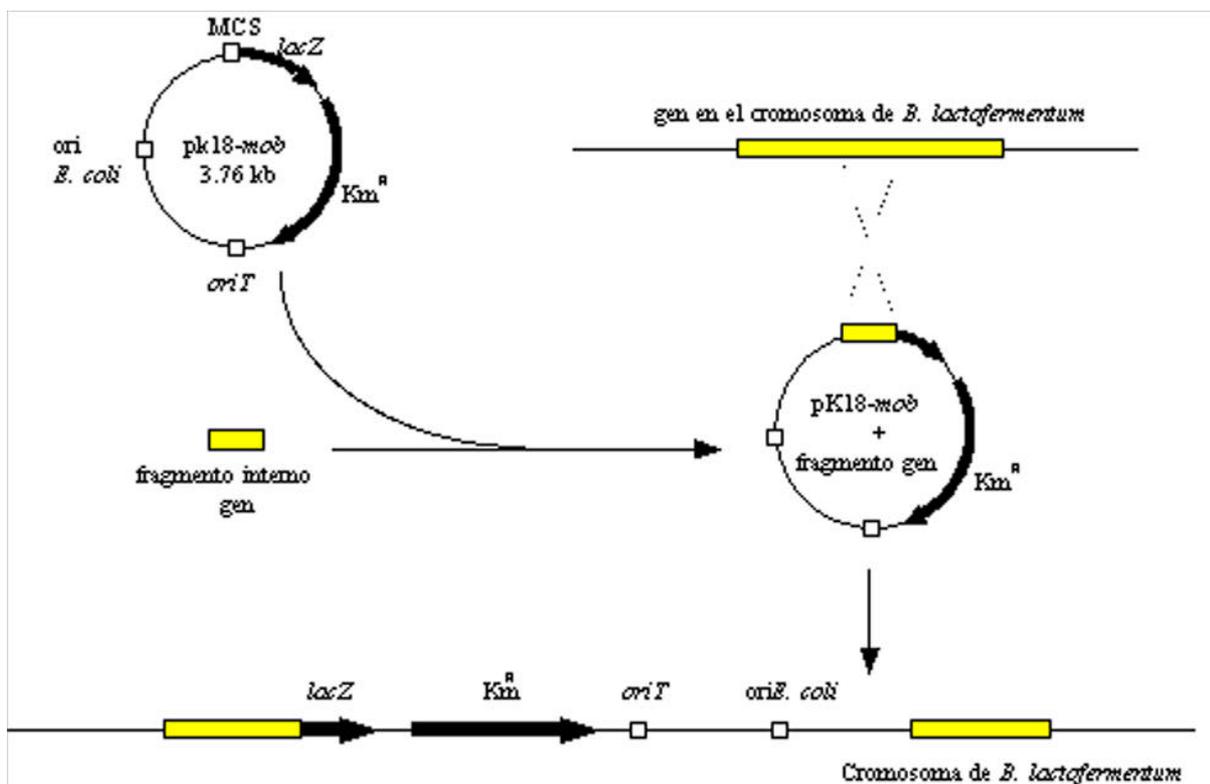


Figura 5.8. Representación esquemática de la inserción de un gen en el cromosoma de *B. lactofermentum* mediante un proceso de recombinación simple entre el plásmido pK18-*mob* conteniendo un fragmento de DNA interno al gen de interés y la región homóloga de este gen en el cromosoma, dando como resultado un cointegrado.

5. Ensayos de inserción génica del gen *argS* en el cromosoma de *B. lactofermentum*

Para analizar las propiedades de una posible cepa de *B. lactofermentum* mutada en el gen *argS* mediante inserción génica en el cromosoma, se utilizó el plásmido movilizable de *E. coli* pK18-*mob* (Figura 5.8), plásmido que contiene el origen RP4 de transferencia (*oriT*), el gen *neo* (Km^R) y el origen para la replicación vegetativa en *E. coli* (*ori*), y por tanto es incapaz de replicarse en *B. lactofermentum* al no tener origen de replicación en corinebacterias (Schäfer *et al.*, 1994). De esta manera, cualquier fragmento incompleto de un gen subclonado en este vector, mediante recombinación simple produciría la fragmentación del gen funcional en el cromosoma y como consecuencia la ausencia de la actividad enzimática correspondiente (Figura 5.8). Fragmentos internos al gen *argS* de 0.6 kb *PstI-EcoRI* y al gen *lysA* de 1.0 kb *NruI-EcoRV* se subclonaron en el plásmido pK18-*mob*. La transferencia por conjugación de los plásmidos resultantes desde *E. coli* S17-1, cepa que contiene un derivado del plásmido conjugativo *IncP* RP4 (Datta *et al.*, 1971) integrado en el cromosoma, a las cepas de *B. lactofermentum* ATCC 13869 y R31, permitiría la selección de transconjugantes resistentes a Km en los que habría ocurrido la integración del plásmido en el cromosoma. En los experimentos control de inserción realizados con el plásmido conteniendo el fragmento interno del gen *lysA* de *B. lactofermentum*, se obtuvieron múltiples transconjugantes resistentes a Km y auxótrofos para lisina, tal como ha sido descrito previamente para el gen *lysA* de *C. glutamicum* (Schwarzer y Puhler, 1991).

Por el contrario, en ninguno de los experimentos realizados con el plásmido conteniendo el fragmento interno al gen *argS* se obtuvieron transconjugantes resistentes a Km, independientemente de la suplementación o no del medio con lisina. De esto, se deducía que el producto del gen *argS* resultaba esencial para el crecimiento celular y su disrupción era letal para el microorganismo.

6. Análisis transcripcional del operón *argS-lysA* y regulación por lisina y arginina de la vía biosintética de lisina

La determinación de la organización transcripcional de los genes *argS* y *lysA* de *B. lactofermentum* se llevó a cabo mediante hibridaciones de *Northern* de RNA total de *B. lactofermentum* ATCC 13869 [pUL610M15] con sondas radioactivas correspondientes a fragmentos internos de ambos genes: un fragmento de 1.2 kb *EcoRV* del gen *argS* y un fragmento de 1.0 kb *NruI-EcoRV* del gen *lysA*. Los cultivos de *B. lactofermentum* ATCC 13869 [pUL610M15] utilizados para la obtención del RNA total se crecieron en medio mínimo MMC hasta que las células alcanzaron la fase estacionaria. Las hibridaciones de *Northern* con cada una de las sondas revelaba la presencia de un único transcrito, que correspondería a un mRNA de 3.0 kb (Figura 5.9a). La organización del operón *argS-lysA* de *B. lactofermentum* y el tamaño de su transcrito era idéntico al del operón *orfX-lysA* de *C. glutamicum* (Marcel *et al.*, 1990). También se obtuvo RNA total de cultivos de *B. lactofermentum* ATCC 13869 [pUL610M15] crecidos en medio mínimo MMC suplementado con lisina y/o arginina. Diferentes cantidades de estos RNAs se aplicaron sobre una membrana de nylon y, posteriormente se hibridaron con la sonda interna al gen *argS* de *B. lactofermentum* previamente descrita. La suplementación con lisina provocaba una disminución del 32% en el nivel del mRNA específico *argS*, mientras que en presencia de arginina ocurría un incremento de 3.12 ordenes (Figura 5.9b). Cuando ambos aminoácidos eran añadidos simultáneamente, se observaba un efecto intermedio (1.94 ordenes de incremento). Se obtuvieron similares resultados cuando la sonda utilizada correspondía al fragmento interno al gen *lysA* de *B. lactofermentum*. De lo anterior, se podía concluir que la transcripción del operón *argS-lysA* de *B. lactofermentum* estaba fuertemente inducida por arginina y ligeramente reprimida por una concentración 10 mM de lisina. Similares resultados han sido obtenidos en *C. glutamicum*, donde se ha observado que la expresión del gen *lysA* está reprimida por una concentración de lisina 20 mM (Cremer *et al.*, 1988).

Este mecanismo de regulación puede representar un ejemplo de interconexión metabólica (Jensen, 1969). El acoplamiento de la transcripción de los genes *argS* y *lysA* de *B. lactofermentum* indica que la arginina interviene directamente en la regulación de la vía biosintética de lisina en corinebacterias.

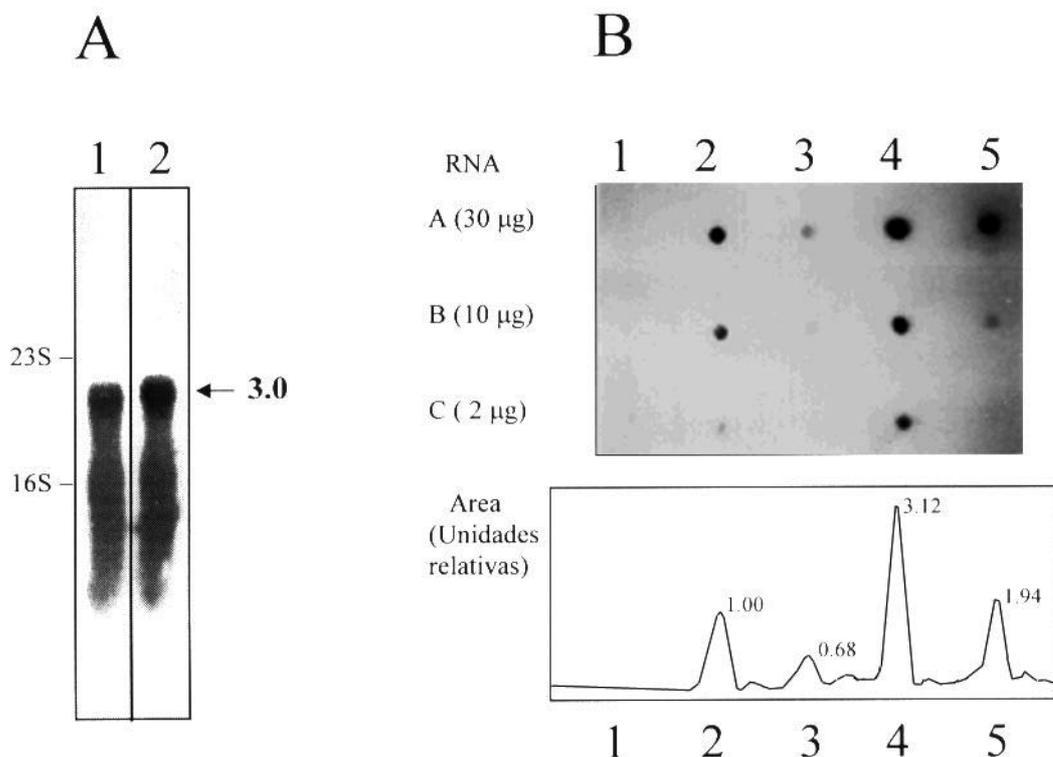


Figura 5.9. a. Análisis mediante la técnica de *Northern* del mRNA transcrito de los genes *argS* (línea 1) y *lysA* de *B. lactofermentum* ATCC13869 [pUL610M15] crecido en MMC. La flecha corresponde al tamaño del transcrito en kb y se indica la posición de los rRNAs 23S y 16S.

b. Hibridación mediante *dot blot* de RNA total de *B. lactofermentum* [pUL610M15] con una sonda interna al gen *argS*. Los rRNAs 23S y 16S de *E. coli* se utilizaron como control (línea 1). *B. lactofermentum* [pUL610M15]: crecido en MMC (línea 2), MMC suplementado con 10 mM lisina (línea 3), MMC suplementado con 10 mM arginina (línea 4) y, MMC suplementado con 10 mM lisina y arginina (línea 5). Se utilizaron diferentes cantidades de RNA (2, 10 y 30 µg) en todas las muestras. El panel inferior muestra la integración realizada con un espectrodensitómetro Shimadzu de los *dot blots* correspondientes a la muestra A (30 µg).

Al expresarse únicamente el gen *lysA* a partir del promotor del *argS*, las corinebacterias pueden limitar la síntesis de lisina, de esta manera se podría aprovechar DAP para la biosíntesis de la pared celular, mediante el nivel de ArgRS, y probablemente esta limitación esta relacionada con la síntesis proteica.

El modelo propuesto para la regulación de la expresión del gen *lysA* en *E. coli*, difiere de lo observado en corinebacterias. En *E. coli*, una proteína activadora codificada en el gen *lysR*, es el efector positivo requerido para la plena expresión de este gen (Stragier *et al.*, 1983a); y, la modulación de la eficiencia de la proteína LysR es ejercida por DAP y lisina que causan inducción y represión, respectivamente (Stragier *et al.*, 1983b; Stragier y Patte, 1983).

7. Mecanismo de regulación mediante antiterminación de la transcripción

La asociación de genes que codifican aaRSs y enzimas biosintéticas de aminoácidos también ha sido descrita en otros microorganismos. En *Campylobacter jejuni*, el gen *lysS*, que codifica la LysRS, está situado delante del gen *glyA*, que codifica una serina hidroximetil-transferasa, y ambos genes pueden expresarse independientemente o como un único transcrito (Chan *et al.*, 1992). En *Bacillus subtilis*, el

gen *gluX*, que codifica la GluRS, y los genes *cysE* y *cysS*, que codifican respectivamente una serina acetil-transferasa y una CysRS, respectivamente, se transcriben conjuntamente y están regulados por un mecanismo de antiterminación (Gagnon *et al.*, 1994). Esta disposición génica parece haber sido seleccionada a lo largo de la evolución, al requerirse un uso eficiente de las secuencias de DNA.

La existencia de un mecanismo de regulación mediante antiterminación de la transcripción está ampliamente distribuido entre genes de aaRSs y/o genes biosintéticos de aminoácidos en diversos grupos de bacterias Gram-positivas: *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Brevibacterium* y *Corynebacterium* (Tabla 5.2) (Henkin, 1994).

Este mecanismo de antiterminación responde individualmente a la limitación para el aminoácido apropiado, y no a la limitación general de aminoácidos (Henkin *et al.*, 1992; Putzer *et al.*, 1992). En todos estos genes se observan terminadores en la región líder del mRNA que precede el inicio de la secuencia codificante, así como una fuerte conservación de determinados elementos estructurales (Grundy y Henkin, 1993; 1994).

Tabla 5.2
Familia de antiterminación "T-box" (Henkin, 1994)

Especie	Gen	Codon	Aminoácido	Referencia
<i>B. subtilis</i>	<i>tyrS</i>	UAC	Tyr	Henkin <i>et al.</i> , 1992
<i>B. subtilis</i>	<i>tyrZ</i>	UAC	Tyr	Glaser <i>et al.</i> , 1990
<i>B. stearothermophilus</i>	<i>tyrS</i>	UAC	Tyr	Waye y Winter, 1986
<i>B. subtilis</i>	<i>pheS</i>	UUC	Phe	Brakhage <i>et al.</i> , 1990
<i>B. stearothermophilus</i>	<i>trpS</i>	UGG	Trp	Barstow <i>et al.</i> , 1986
<i>B. subtilis</i>	<i>thrS</i>	ACC	Thr	Putzer <i>et al.</i> , 1992
<i>B. subtilis</i>	<i>thrZ</i>	ACC	Thr	Putzer <i>et al.</i> , 1992
<i>B. stearothermophilus</i>	<i>valS</i>	GUC	Val	Borgford <i>et al.</i> , 1987
<i>B. subtilis</i>	<i>leuS</i>	CUC	Leu	Van der Horn y Zahler, 1992
<i>B. subtilis</i>	<i>cysE-cysS</i>	UGC	Cys	Gagnon <i>et al.</i> , 1994
<i>B. stearothermophilus</i>	<i>cysE-cysS</i>	UGC	Cys	Gagnon <i>et al.</i> , 1994
<i>B. subtilis</i>	<i>ilv-leu</i>	CUC	Leu	Grandoni <i>et al.</i> , 1992
<i>L. casei</i>	<i>valS</i>	GUA	Val	Grundy y Henkin, 1993
<i>L. casei</i>	<i>trp</i>	UGG	Trp	Natori <i>et al.</i> , 1990
<i>L. lactis</i>	<i>trp</i>	UGG	Trp	Bardowski <i>et al.</i> , 1992
<i>L. lactis</i>	<i>his</i>	CAC	His	Delorme <i>et al.</i> , 1992
<i>B. lactofermentum</i>	<i>argS</i>	CGC	Arg	Este trabajo
<i>C. glutamicum</i>	<i>argS</i>	CGC	Arg	Sharp y Mitchell, 1993

Estos elementos incluyen tres estructuras secundarias de horquilla I, II y III originadas por secuencias invertidas repetidas (*stem-loop*) I, II y III, que preceden a una secuencia de 14 bp altamente conservada ("T-box") y al terminador que precede al sitio de inicio de la transcripción (Figura 5.10).

Cada uno de estos mRNAs líder contiene un codon específico para el aminoácido apropiado situado en una posición definida dentro de la estructura global, en un apéndice lateral de la estructura secundaria I (Figura 5.10). La importancia para la antiterminación de las estructuras anteriores en la región líder del mRNA ha sido demostrada para los genes: *tyrS* (Henkin *et al.*, 1992; Grundy y Henkin, 1993; Grundy *et al.*, 1994), *ilv-leu* (Grandoni *et al.*, 1992) y *thrS* (Putzer *et al.*, 1992).

En el caso del gen *argS* de *B. lactofermentum* al examinar la secuencia líder del mRNA se observa en la región 3' (nucleótidos 370-783) (Figura 5.10) las estructuras secundarias I, II y III correspondientes, la secuencia "T-box", el antiterminador y el terminador, así como un codon específico de arginina CGC en la estructura secundaria I (Figura 5.10). Todo ello viene a apoyar el hecho de que la expresión del operón *argS-lysA* de *B. lactofermentum* está inducida por la limitación de arginina. Se observan algunas diferencias entre esta estructura del mRNA líder del operón *argS-lysA* y las de los otros genes de bacterias Gram-positivas, que puede ser un reflejo de la divergencia evolutiva entre las corinebacterias y las otras bacterias que presentan este mecanismo de antiterminación. Las secuencias CAGAGA en la estructura secundaria I y CGUUA entre la II y III, altamente conservadas en los genes de *Bacillus* (Grundy y Henkin, 1993), están sustituidas por CUGAGG y CAUUA en el caso del mRNA líder del operón *argS-lysA*. También el tamaño del tallo de la estructura secundaria I localizado inmediatamente adyacente al codon para Arg es de 12 bp, muy superior al observado en otros mRNA líderes que suele ser de 4 o 5 bp de longitud. También se observan diferencias en la secuencia "T-box" (CGGGUGUACCUCG) en la que ha desaparecido un residuo G que está absolutamente conservado en el resto de los genes (AGGGUGGNACCGCG).

El mecanismo de antiterminación de la transcripción propuesto para todos estos genes (Grundy y Henkin, 1993) es similar al observado en otros sistemas de antiterminación de la transcripción: el mRNA forma una estructura alternativa que actúa como antiterminador, y la formación del antiterminador impide la formación del terminador, y por tanto previene la terminación (Houman *et al.*, 1990). La estructura antiterminadora se forma en el mRNA líder por el apareamiento de bases complementarias en el segmento de la secuencia "T-box", elemento conservado que precede al terminador, y por tanto la presencia de esta estructura en el mRNA previene la formación del terminador (Figura 5.10). En todos los casos observados, la región central de la secuencia "T-box" está localizada en un apéndice lateral del antiterminador (Figura 5.10). La estabilidad predicha para la estructura antiterminadora es inferior a la del terminador, lo que requiere de algún acontecimiento adicional para que ocurra la formación o estabilización del antiterminador. El triplete de nucleótidos o codon parece actuar como señal primaria de respuesta al aminoácido correspondiente, y el candidato más lógico para interactuar con este codon es un anticodon, o tRNA. Al inducirse la expresión por la limitación del aminoácido correspondiente, en condiciones en las que se acumula tRNA sin cargar, el tRNA descargado promueve la antiterminación (Figura 5.11). Otro punto de interés, es la interacción del tRNA con el mRNA líder mediante contactos codon-anticodon, que produce en la estabilización de la estructura antiterminadora físicamente separada del punto de interacción con el tRNA. Este segundo sitio de interacción entre el mRNA líder y el tRNA ocurre por el apareamiento de los nucleótidos localizados en la porción central de la "T-box"(UGGN, en el caso del mRNA líder del operón *argS-lysA*: UGUA) que forma parte del apéndice lateral del antiterminador y la secuencia XCCA situada en

el extremo aceptor 3' del tRNA (Grundy *et al.*, 1994). La existencia de esta interacción explica simultáneamente la estabilización de la estructura antiterminadora, así como la discriminación entre tRNA cargado y descargado, ya que el grupo aminoacilo en el extremo 3' del tRNA cargado puede interferir en la interacción con el mRNA líder (Figura 5.11).

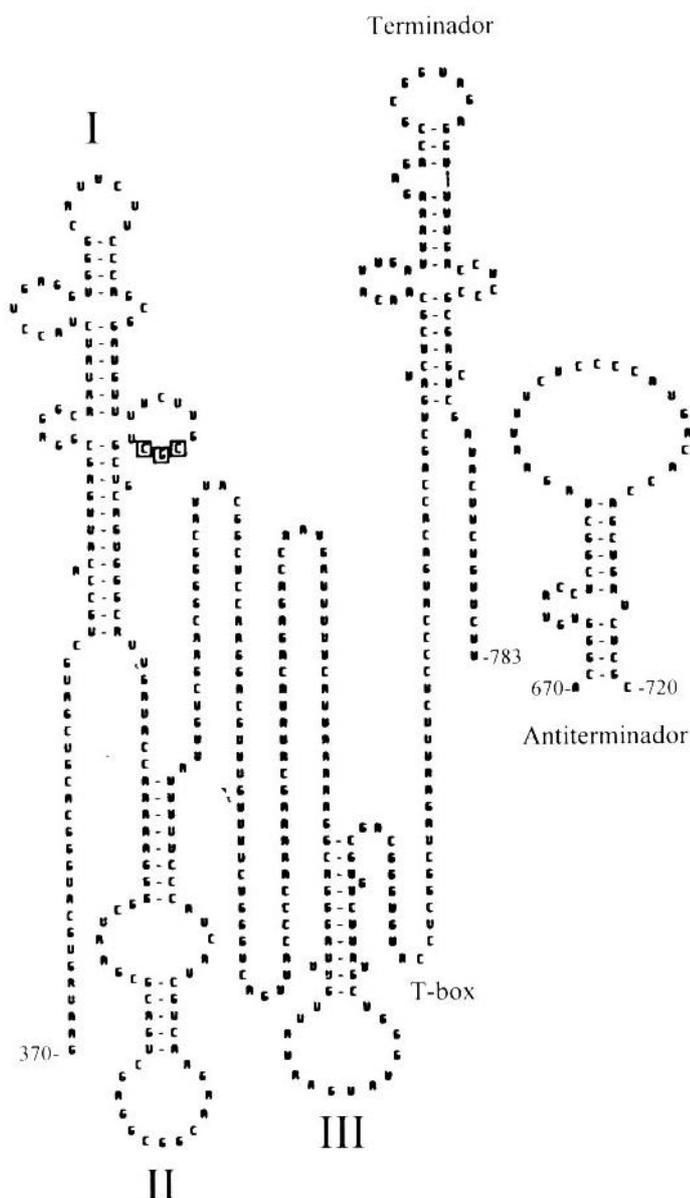


Figura 5.10. Modelo estructural del mRNA líder del operón *argS-lysA* de *B. lactofermentum*. La secuencia específica del codón de Arg (CGC) en la estructura secundaria I está señalada. Se indican las estructuras secundarias I, II y III y la secuencia "T-box" que precede al terminador. La estructura alternativa de antiterminación se presenta adjacente al modelo estructural. También se indica la posición de estas regiones con respecto a la secuencia de nucleótidos presentada en la Figura 5.3.

Lo anterior no descarta la existencia en el mRNA líder y en el tRNA de elementos adicionales que puedan ser importantes en la interacción efectiva. También existe la posibilidad de que el tRNA cargado desempeñe una función adicional en este sistema: en condiciones normales la antiterminación puede responder quizás mediante un simple mecanismo de competición, en función de la proporción de tRNA cargado y descargado.

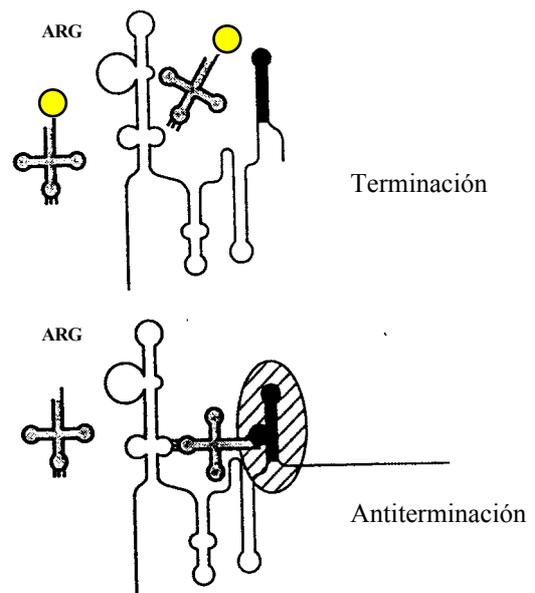
En todos los mecanismos de antiterminación caracterizados hasta la actualidad se ha observado la implicación de una o más proteínas en el proceso de antiterminación y en la comunicación con la maquinaria transcripcional (Debarbouille *et al.*, 1990; Houman *et al.*, 1990; Roberts, 1993). En el caso que nos ocupa, el tRNA descargado específico para un determinado aminoácido actúa como señal efectora del requerimiento de antiterminación para un gen determinado, pero todavía no se conoce si el tRNA es suficiente para activar la antiterminación en ausencia de factores proteicos. Estos posibles factores proteicos pueden ser específicos para un gen individual o generales. La presencia de elementos altamente conservados en la secuencia primaria del mRNA líder hace suponer la existencia de uno o más factores generales que interactúan con estos elementos en todos los mRNA líder (Henkin, 1994; Putzer *et al.*, 1995).

La expresión coordinada de los genes *argS* y *lysA* en *B. lactofermentum* viene a apoyar la hipótesis de que la expresión de los genes biosintéticos de aminoácidos y de aaRSs están, al menos en algunos casos, sometidos a una regulación coordinada en bacterias Gram-positivas. Los niveles de tRNAs y aaRSs normalmente se mantienen en un balance estricto (Jakubowski y Goldman, 1984), que parece ser crítico para la eficiencia y fidelidad de la síntesis proteica.

El exceso de tRNAs o aaRSs puede producir la misacilación de los tRNAs por aaRSs no específicas (Sherman *et al.*, 1992a,b); por lo que la inducción de la expresión de las aaRSs en respuesta directa a los niveles de tRNA específico descargado, proporciona un mecanismo para mantener el balance y una aminoacilación precisa.

La utilización del mismo mecanismo de control para las vías biosintéticas de aminoácidos, puede acoplar la biosíntesis de aminoácidos a los requerimientos necesarios para la síntesis proteica.

Figura 5.11. Modelo para la inducción por arginina (ARG) del operón *argS-lysA* de *B. lactofermentum* por el tRNA^{Arg} descargado. Se representa el tRNA^{Arg} descargado o cargado con Arg (círculo), así como posibles factores implicados en la antiterminación. La estructura superior representa la forma terminadora del mRNA líder y la inferior la antiterminadora. Ambas estructuras son mutuamente exclusivas. Cuando los niveles de Arg son altos, la mayor parte del tRNA^{Arg} está cargado y es incapaz de interactuar adecuadamente con el mRNA líder, por lo que se forma la estructura terminadora y, termina la transcripción. Cuando los niveles de Arg son bajos, se incrementa la presencia de tRNA^{Arg} descargado. El tRNA^{Arg} descargado interactúa con el transcrito en crecimiento mediante interacciones codon-anticodon, estabilizando la estructura antiterminadora e impidiendo la terminación.



6. DISCUSIÓN

La aplicación de las técnicas del DNA recombinante ha permitido acumular en los últimos años una cantidad considerable de datos genéticos y moleculares en corinebacterias, concretamente de las especies *Brevibacterium lactofermentum* y *Corynebacterium glutamicum*, dado el alto interés que presentan por su utilización en la producción industrial de aminoácidos. De toda esta información ha sido posible obtener una visión preliminar de los mecanismos de control transcripcional, a partir de las secuencias específicas de control de la transcripción localizadas en el DNA (promotores, terminadores y secuencias reguladoras). Para profundizar en los mecanismos de control de la expresión génica en corinebacterias, en esta memoria se describen tres mecanismos moleculares diferentes que mediante productos génicos interactúan con el DNA y la RNA polimerasa controlando la transcripción.

En eubacterias, la especificidad de transcripción está determinada por las distintas holoenzimas que forma la RNA polimerasa con diferentes factores, lo cual permite el reconocimiento de secuencias promotoras específicas de genes y operones. El estudio de las maquinarias de transcripción y, en particular la caracterización de los factores principales de la RNA polimerasa de corinebacterias, resultaba esencial para empezar a comprender el mecanismo de inicio de la transcripción en corinebacterias.

La identificación de una proteína homóloga a DtxR en *B. lactofermentum*, ha permitido a su vez el análisis de un mecanismo adicional de control de la expresión génica, la regulación modulada por hierro ejercida por el represor DtxR. Este mecanismo únicamente había sido descrito en la corinebacteria patógena *C. diphtheriae* (Boyd *et al.*, 1990), pero los resultados obtenidos en este trabajo apoyan la hipótesis de la presencia de este mecanismo de regulación por hierro en distintas bacterias Gram-positivas.

Finalmente, se describe la posible presencia de un mecanismo de antiterminación de la transcripción en dependencia directa de un tRNA específico, en el operón *argS-lysA* de *B. lactofermentum*, que a su vez regula la ruta biosintética de lisina en función de la presencia de arginina. Estos mecanismos de antiterminación están ampliamente distribuidos entre genes de aminoacil-tRNA sintetasas y genes para biosíntesis de aminoácidos en bacterias Gram-positivas.

1. Factores sigma en *Brevibacterium lactofermentum*

En esta memoria se ha descrito la identificación de cuatro señales de hibridación *rpoD* en el cromosoma de *B. lactofermentum*, lo que ha permitido la posterior clonación y secuenciación de los genes *sigA* y *sigB*, que codifican factores principales de la RNA polimerasa (Oguiza *et al.*, 1995b). Las secuencias de aminoácidos de las proteínas SigA y SigB presentan altos valores de similaridad con factores de géneros relacionados (*Mycobacterium*, *Streptomyces*) y mantienen los dominios conservados de los factores de la familia Sigma-70.

La mayor conservación de las regiones de unión a DNA (subregiones 2.4 y 4.2) entre la proteína SigA y otros factores principales, así como la expresión predominante del gen *sigA* durante la fase exponencial de crecimiento temprana, permiten considerar la posibilidad de que la proteína SigA corresponda al factor principal de la RNA polimerasa de corinebacterias, que confiere a la holoenzima la especificidad de reconocer promotores de *Tipo I*. La posible función del factor SigB resulta más compleja de establecer. La proteína SigB, a pesar de carecer prácticamente de subregión 1.1, presenta una alta similitud con factores principales y dominios de unión a DNA idénticos con la proteína SigA. A su vez la transcripción del gen *sigB* sigue una pauta casi idéntica a la del gen *sigA*. Todo ello parece indicar que ambos factores, SigA y SigB, dirigen a la RNA polimerasa al reconocimiento de un mismo tipo de promotores (*Tipo I*), pero las diferencias en la subregión 1.1 pueden conferir diferentes afinidades o especificidades por algún grupo o grupos de estos promotores.

2. Regulación mediante el represor DtxR de *B. lactofermentum* en presencia de metales

A partir de la identificación en la región 3' del gen *sigB* de *B. lactofermentum* de un gen estructural homólogo al *dtxR* de *C. diphtheriae*, se procedió a investigar la posible existencia de un sistema regulador similar al represor de la toxina de la difteria (DtxR) en *B. lactofermentum* (Oguiza *et al.*, 1995a). El represor de la toxina de la difteria (DtxR) es un regulador global que controla la transcripción del gen *tox* y de genes que participan en la biosíntesis de sideróforos en *C. diphtheriae*, en dependencia directa de la presencia de hierro. El producto del gen *dtxR* de *B. lactofermentum* es inmunoreactivo frente a anticuerpos policlonales anti-DtxR de *C. diphtheriae* y funciona como un elemento represor activado por hierro capaz de regular la expresión de la enzima α -galactosidasa a partir de una fusión transcripcional del promotor/operador *tox* (*toxPO-lacZ*) en *E. coli*. Además, en presencia de concentraciones crecientes del quelante 2-2' dipiridil se ha observado que la inducción del gen *lacZ* bajo el control de la proteína DtxR es idéntica en células que expresan la proteína DtxR de *C. diphtheriae* o *B. lactofermentum*.

También se ha demostrado la unión de la proteína recombinante DtxR de *B. lactofermentum* al promotor/operador *tox* de *C. diphtheriae* mediante un ensayo de retraso en geles de poliacrilamida. Esta interacción es específica y dependiente de una elevada concentración de iones metálicos

divalentes en la mezcla de reacción. También se observa protección de la digestión por DNasa I de la secuencia palindrómica del promotor/operador *tox* de *C. diphtheriae* por la proteína recombinante DtxR de *B. lactofermentum* activada por iones metálicos divalentes (Ni^{2+}). La proteína DtxR activada de *B. lactofermentum* se une al promotor/operador *tox* protegiendo 31 nucleótidos en la cadena codificante y 26 nucleótidos en la cadena no codificante de la digestión por DNasa I. Esta región protegida corresponde a la secuencia palindrómica de 27 bp interrumpida en el promotor/operador *tox* de *C. diphtheriae*.

Estos resultados apoyan la hipótesis de la existencia de una familia de elementos reguladores activados por iones metálicos relacionados al DtxR, al menos en algunas especies de bacterias Gram-positivas relacionadas con corinebacterias (*Mycobacterium*, *Streptomyces*). Estas proteínas probablemente constituyan una familia con dominios similares de unión a DNA, dominios similares de activación por iones metálicos y reconocimiento de secuencias operadoras similares.

3. Regulación mediante antiterminación en el operón *argS-lysA* de *B. lactofermentum*

Durante la clonación de genes específicos de la biosíntesis de lisina, en concreto del gen *lysA* de *B. lactofermentum*, se identificó en la región 3' del gen *lysA* el gen *argS* que codifica la enzima arginil-tRNA sintetasa (Oguiza *et al.*, 1993). La comparación de la ArgRS con otras aminoacil-tRNA sintetasas permitió la asignación de los dominios conservados HIGH y KMSKS y su clasificación como una aaRS de Clase I. La expresión del gen *argS* en *B. lactofermentum* y en *E. coli* provoca un aumento en la actividad ArgRS, correlacionado con la observación mediante SDS-PAGE de una clara banda proteica del tamaño esperado para esta enzima. Intentos de disrupción del gen *argS* de *B. lactofermentum* resultaron infructuosos, probablemente debido a que el producto del gen *argS* es esencial para el crecimiento celular.

El análisis transcripcional de los genes *argS* y *lysA* de *B. lactofermentum* muestra que ambos genes se transcriben conjuntamente en forma de un único transcrito. El acoplamiento de la transcripción de los genes *argS* y *lysA* de *B. lactofermentum* indica que la arginina desempeña un papel importante en la regulación de la vía biosintética de lisina, lo cual está apoyado por el hecho de que la expresión de este operón está fuertemente inducida por arginina (aproximadamente tres ordenes). La presencia de esta unión metabólica entre la biosíntesis de lisina y la síntesis proteica puede explicarse por la existencia de un mecanismo común de regulación mediante antiterminación de la transcripción, similar al observado en bacterias Gram-positivas para genes que codifican las aaRSs y/o genes implicados en la biosíntesis de aminoácidos. La región del mRNA líder del operón *argS-lysA* presenta elementos estructurales fuertemente conservados, que pueden permitir la terminación o antiterminación de la transcripción del operón *argS-lysA* en función de la presencia o ausencia de arginina, respectivamente.

4. Perspectivas futuras

En esta memoria se han presentado resultados iniciales sobre el estudio de varios mecanismos de control transcripcional en corinebacterias, pero esta investigación está aún lejos de completarse. A continuación se indican algunos de los aspectos por los que se pueden canalizar las investigaciones futuras.

Una aproximación complementaria a la determinación de los factores de corinebacterias es el desarrollo de un sistema de transcripción *in vitro*, a partir de la purificación del núcleo de la RNA polimerasa y de los factores SigA y SigB. Mediante ensayos de reconstitución de la holoenzima con cada factor†, permitirían observar la actividad de inicio de la transcripción a partir de diferentes promotores de corinebacterias y contrastar la especificidad de transcripción dependiente de SigA y SigB. Esto a su vez permitiría una clasificación de los promotores de corinebacterias.

También es de interés el conocimiento de la función normal de la proteína DtxR en corinebacterias. Hasta el momento, sólo se ha demostrado que la proteína DtxR está implicada en la regulación del gen *tox* y de algunos genes del sistema de asimilación de hierro. Pero la proteína DtxR debe funcionar como un elemento regulador global que controla la expresión de un gran número de genes en el cromosoma. Aunque virtualmente no se conoce nada de la naturaleza global de la regulación génica mediada por la proteína DtxR en corinebacterias, la clonación de secuencias reguladoras adicionales podría ser muy útil. Se podrían emplear múltiples aproximaciones en la clonación de secuencias de unión de la proteína DtxR y de los genes asociados a ellas. Una de ellas podría ser el análisis de genotecas de DNA cromosómico utilizando como sondas de hibridación oligonucleótidos correspondientes a la secuencia consenso de unión de la proteína DtxR (Tao y Murphy, 1994). Otra alternativa sería el empleo de un sistema bidimensional de retraso en geles para el análisis de secuencias de unión de la proteína DtxR en digestiones de DNA cromosómico, para ello se dispone de la proteína DtxR purificada. La caracterización de los genes estructurales correspondientes, proporcionaría nueva información sobre la regulación global desempeñada por la proteína DtxR tanto en corinebacterias patógenas como no patógenas.

En relación al mecanismo de antiterminación de la transcripción en el operón *argS-lysA*, sería necesaria la comprobación directa de la inducción de la antiterminación por la limitación del aminoácido arginina. Esto se podría llevar a cabo mediante el análisis de la expresión de fusiones transcripcionales *argS-lacZ* en condiciones de limitación de arginina. La mutagénesis de los determinantes específicos en la secuencia del mRNA líder: el codon específico de arginina (CGC), la secuencia conservada de la "T box" y la estructura antiterminadora, también deben permitir observar alteraciones en la respuesta a la limitación de arginina.

7. CONCLUSIONES

1. Se han identificado cuatro señales de hibridación *rpoD* en el cromosoma de *B. lactofermentum*. Dos genes, *sigA* y *sigB*, que codifican factores sigma principales de la RNA polimerasa han sido clonados y secuenciados. El gen *sigA* de *B. lactofermentum* está formado por 1494 bp y codifica una proteína deducida de 497 aminoácidos y Mr de 54.8 kDa. El gen *sigB*, de 1089 bp, codifica una proteína de 331 aminoácidos y Mr de 37.5 kDa. Las proteínas SigA y SigB presentan los dominios conservados característicos de la familia Sigma-70.
2. El gen *sigB* se encuentra localizado en el cromosoma de *B. lactofermentum* en la región ORF1-*sigB-dtxR-galE*. El gen ORF1 consta de 435 bp y codifica un producto génico de 144 aminoácidos y Mr de 15.1 kDa de función desconocida. El gen *dtxR*, de 687 bp, codifica una proteína de 228 aminoácidos y Mr de 25.4 kDa, homóloga al represor de la toxina de la difteria, DtxR, de *Corynebacterium diphtheriae*. El gen *galE* codifica una proteína de 329 aminoácidos y Mr de 35.4 kDa. La proteína GalE de *B. lactofermentum* es altamente similar a enzimas UDP-galactosa 4-epimerasas de bacterias Gram-positivas, implicadas en la conversión reversible de UDP-galactosa en UDP-glucosa en el catabolismo de galactosa.
3. El gen *sigA* de *B. lactofermentum* se transcribe como un mRNA monocistrónico de 1.7 kb, en tanto que la transcripción del gen *sigB* da lugar a dos transcritos de 1.1 y 1.5 kb. La transcripción de los genes *sigA* y *sigB* en función de las fases de crecimiento en medio complejo presenta una pauta similar: los mRNAs de estos genes están presentes a lo largo de la fase de crecimiento exponencial cesando su transcripción al alcanzarse la fase estacionaria.
4. Los genes *dtxR* y *galE* de *B. lactofermentum*, separados por 6 bp, forman un operón que se transcribe en forma de un mRNA bicistrónico de 1.8 kb. A partir del gen *dtxR* se originan otros dos mRNAs adicionales de 0.7 y 1.3 kb. La transcripción de estos genes en medio complejo, de modo similar que la de los genes *sigA* y *sigB*, también es función del crecimiento celular: la transcripción tiene lugar durante la fase de crecimiento exponencial y se detiene en la fase de crecimiento estacionario.
5. La proteína DtxR de *B. lactofermentum* es inmunoreactiva frente a anticuerpos policlonales anti-DtxR de *C. diphtheriae* y funciona como un elemento represor activado por hierro capaz de

regular la expresión de la enzima β -galactosidasa a partir de una fusión transcripcional del promotor/operador *tox* (*toxPO-lacZ*) en *E. coli*. En presencia de concentraciones crecientes del quelante 2-2' dipiridil la inducción del gen *lacZ* bajo el control de la proteína DtxR es idéntica en células expresando la proteína DtxR de *C. diphtheriae* y de *B. lactofermentum*.

6. La proteína recombinante DtxR de *B. lactofermentum* purificada mediante cromatografía de inmunoafinidad se une específicamente a la región promotora/operadora *tox* de *C. diphtheriae* en presencia de iones metálicos (Mn^{2+}). Asimismo, la proteína recombinante DtxR de *B. lactofermentum* activada por iones metálicos (Ni^{2+}) protege la secuencia palindrómica del promotor/operador *tox* de la digestión por DNasa I. La protección sobre la secuencia palindrómica de 27 bp interrumpida en el promotor/operador *tox* de *C. diphtheriae* es de 31 nucleótidos en la cadena codificante y 26 nucleótidos en la cadena no codificante. Nuestros resultados indican la existencia de una familia de elementos reguladores activados por iones metálicos relacionados con el DtxR, distribuida al menos en algunos generos de bacterias Gram-positivas tales como corinebacterias, micobacterias y *Streptomyces*. Estas proteínas compartirían dominios similares de unión a DNA, dominios similares de activación por iones metálicos y reconocimiento de secuencias operadoras similares.
7. En la región 3' del gen *lysA* se encuentra localizado el gen *argS* de *B. lactofermentum* que codifica una arginil-tRNA sintetasa. Esta proteína de 550 aminoácidos y Mr de 59.8 kDa, presenta dominios conservados característicos (HIGH y KMSKS) de la Clase I de aminoacil-tRNA sintetasas. La disrupción del gen *argS* de *B. lactofermentum* no ha sido posible, probablemente debido a que la proteína arginil-tRNA sintetasa es esencial para el crecimiento celular.
8. Los genes *argS* y *lysA* de *B. lactofermentum* forman un operón que se transcribe en un único transcrito de 3.0 kb. La expresión del operón *argS-lysA* está ligeramente reprimida por lisina y fuertemente inducida por arginina.
9. En la región correspondiente al mRNA líder que precede al operón *argS-lysA* de *B. lactofermentum*, se han identificado elementos estructurales conservados, similares a los observados para mecanismos de antiterminación de la transcripción de bacterias Gram-positivas. Este mecanismo puede permitir la terminación o antiterminación de la transcripción del operón *argS-lysA* en función de la presencia o ausencia de arginina, respectivamente. Esta interacción metabólica por medio de un mismo mecanismo de regulación puede acoplar la biosíntesis de lisina a los requerimientos necesarios para la síntesis proteica.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abe, S., Takayama, K. and Kinoshita, S.** 1967. Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria. *J Gen Appl Microbiol* **13**, 279-301.
- Adams, C.G., Fornwald, J.A., Schmidt, F.J., Rosenberg, M. and Brawner, M.E.** 1988. Gene organization and structure of the *Streptomyces lividans gal* operon. *J Bacteriol* **170**, 203-212.
- Adhya, S.** 1987. The galactose operon. En: *Escherichia coli y Salmonella typhimurium, cellular and molecular biology*. Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Low, K.B., Magasanik, B., Schaechter, M. and Umberger, H.E., eds. American Society for Microbiology, Washington DC. pp. 1503-1512.
- Akins, R.A. and Lambowitz, A.M.** 1987. A protein required for splicing group I introns in *Neurospora crassa* mitochondria is mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetase or a derivative. *Cell* **50**, 331-345.
- Andersen, A.B. and Hansen, E.B.** 1993. Cloning of the *lysA* gene from *Mycobacterium tuberculosis*. *Gene* **124**, 105-109.
- Araya, T., Ishibashi, N., Shimamura, S., Tanaka, K. and Takahashi, H.** 1993. Genetic and molecular analysis of the *rpoD* gene from *Lactococcus lactis*. *Biosci Biotech Biochem* **50**, 88-92.
- Archibald, F.** 1983. *Lactobacillus plantarum*, an organism not requiring iron. *FEMS Microbiol Lett* **19**, 29-32.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K.** 1989. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley and Sons. New York.
- Bagg, A. and Neilands, J.B.** 1987. Molecular mechanism of regulation of siderophore-mediated iron assimilation. *Microbiol Rev* **51**, 509-518.
- Barkdowski, J., Ehrlich, S.D. and Chopin, A.** 1992. Tryptophan biosynthesis genes in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *J Bacteriol* **174**, 6563-6570.
- Barksdale, L.** 1970. *Corynebacterium diphtheriae* and its relatives. *Bacteriol Rev* **36**, 407-477.
- Barstow, D.A., Sharman, A.F., Atkinson, T. and Minton, N.P.** 1986. Cloning and complete nucleotide sequence of the *Bacillus stearothermophilus* tryptophanyl-tRNA synthetase gene. *Gene* **46**, 37-45.

- Berish, S.A., Subbarao, S., Chen, C.-Y., Trees, D.L. and Morse, S.A.** 1993. Identification and cloning of a *fur* homolog from *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* **61**, 4599-4606.
- Birnboim, B. C. and Doly, J.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523.
- Borgford, T.J., Brand, N.J., Gray, T.E. and Fersht, A.R.** 1987. The valyl-tRNA synthetase from *Bacillus stearothermophilus* has considerable sequence homology with the isoleucyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **26**, 2480-2486.
- Boyd, J. and Murphy, J.R.** 1988. Analysis of the diphtheria *tox* promoter by site-directed mutagenesis. *J Bacteriol* **170**, 5949-5952.
- Boyd, J.M., Oza, M.N. and Murphy, J.R.** 1990 Molecular cloning and DNA sequence analysis of a diphtheria *tox* iron-dependent regulatory element (*dtxR*) from *Corynebacterium diphtheriae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 5968-5972.
- Boyd, J.M., Hall K.M. and Murphy, J.R.** 1992. DNA sequencing and characterization of *dtxR* alleles from *Corynebacterium diphtheriae* PW8(-), 1030(-), and C7hm723(-). *J Bacteriol* **174**, 1268-1272.
- Boylan, S.A., Suh, J.-W., Thomas, S.M. and Price, C.W.** 1989. Gene encoding the alpha core subunit of *Bacillus subtilis* RNA polymerase is cotranscribed with the genes for initiation factor 1 and ribosomal proteins B, S13, S11 and L17. *J Bacteriol* **173**, 2553-2562.
- Bradford, M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Brakhage, A.A., Wozny, M. and Putzer, H.** 1990. Structure and nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis* phenylalanine-tRNA synthetase genes. *Biochimie* **72**, 725-734.
- Breton, R., Watson, D., Yaguchi, M. and Lapointe, J.** 1990. Glutamyl-tRNA synthetases of *Bacillus subtilis* 168T and of *Bacillus stearothermophilus*. *J Biol Chem* **265**, 18248-18255.
- Buck, M. and Cannon, W.** 1992. Specific binding of the transcription factor ⁵⁴ to promoter DNA. *Nature* **358**, 422-424.
- Burgess, R.R., Travers, A.A., Dunn, J.J. and Bautz, E.K.F.** 1969. Factor stimulating transcription by RNA polymerase. *Nature* **21**, 43-46.
- Butler, J.S., Springer, M., Dondon, J. and Grunberg-Manago, M.** 1986. Posttranscriptional autoregulation of *Escherichia coli* threonyl-tRNA synthetase expression *in vivo*. *J Bacteriol* **165**, 198-203.
- Buttner, M.J. and Brown, N.L.** 1985. RNA polymerase-DNA interactions in *Streptomyces*. *J Mol Biol* **185**, 177-188.
- Buttner, M.J., Chater, K.F., and Bibb, M.J.** 1990 Cloning, disruption, and transcriptional analysis of three RNA polymerase sigma factor genes of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* **172**, 3367-3378.
- Cannon, W., Claverie-Martin, F., Austin, S. and Buck, M.** 1994. Identification of a DNA-contacting surface in the transcription factor ⁵⁴ (^N). *Mol Microbiol* **11**, 227-236.

- Cannon, W., Missaidilis, S., Smith, C., Cottier, A., Austin, S., Moore, M. and Buck, M.** 1995. Core RNA polymerase and promoter DNA interactions of purified domains of σ^{N} : bipartite functions. *J Mol Biol* **248**, 781-803.
- Chamberlin, M.** 1974. The selectivity of transcription. *Ann Rev Biochem* **43**, 721-772.
- Chan, V.L. and Bingham, H.L.** 1992. Lysyl-tRNA synthetase gene of *Campylobacter jejuni*. *J Bacteriol* **174**, 695-701.
- Cheung, A.Y., Watson, L. and Söll, D.** 1985. Two control systems modulate the level of glutamyl-tRNA synthetase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **161**, 212-218.
- Chung, C.T., Niemela, S.L., and Miller, R.H.** 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 2172-2175.
- Cohen, S.N., Chang, A.C.Y. and Hsu, L.** 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **69**, 2110-2115.
- Correia, A., Pisabarro, A., Castro, J.M. and Martín, J.F.** 1995. Cloning and characterization of an IS-like element present in the genome of *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869. *Gene*, en prensa.
- Courtney, M., Buchwalder, A., Tessier, L.H., Jaye, M., Benavente, A., Balland, A., Kohli, V., Lathe, R., Tolstoshev, P. and Lecocq, J.P.** 1984. High-level production of biologically active human α_1 -antitrypsin in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**, 669-673.
- Coy, M. and Neilands, J.B.** 1991. Structural dynamics and functional domains of the *fur* protein. *Biochemistry* **30**, 8201-8210.
- Creighton, T.E.** 1993. Proteins: structure and molecular properties. Freeman, New York.
- Cremer, J., Treptow, C., Eggeling, L. and Sahm, H.** 1988. Regulation of enzymes of lysine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *J Gen Microbiol* **134**, 3221-3229.
- Crichton, R.R. and Charloteaux-Wauters, M.** 1987. Iron transport and storage. *Eur J Biochem* **164**, 485-506.
- Crosa, J.H.** 1989. Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. *Microbiol Rev* **53**, 517-530.
- Cure, G.L. and Keddie, R.M.** 1973. Methods for the morphological examination of aerobic coryneform bacteria. En: *Sampling Microbiological Monitoring of Environments*. Board, R.G. and Lovelock, D.M., eds. Society for Applied Bacteriology Technical Series 7. Academic Press, New York. pp. 123-135.
- Daniels, D., Zuber, P. and Losick, R.** 1990. Two amino acids in an RNA polymerase sigma factor involved in the recognition of adjacent base pairs in the -10 region of a cognate promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 8075-8079.
- Datta, N., Hedges, R.W., Shaw, E.J., Sykes, R.B. and Richmond, M.H.** 1971. Properties of an R-factor from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **108**, 1244-1249.

- Debarbouille, M., Arnaud, M., Fouet, A., Klier, A. and Rapoport, G.** 1990. The *sacT* gene regulating the *sacPA* operon in *Bacillus subtilis* shares strong homology with transcriptional antiterminators. *J Bacteriol* **172**, 3966-3973.
- de Lorenzo, V., Herrero, M., Giovannini, F. and Neilands, J.B.** 1987. Operator sequences of the aerobactin operon of plasmid ColV-K30 binding the ferric uptake regulation (*fur*) repressor. *J Bacteriol* **169**, 2624-2630.
- Delorme, C., Godon, J.-J., Ehrlich, S.D. and Renault, P.** 1993. Gene inactivation in *Lactococcus lactis*: histidine biosynthesis. *J Bacteriol* **175**, 4391-4399.
- Deng, Z., Kieser, T. and Hopwood, D.A.** 1987. Activity of a *Streptomyces* transcriptional terminator in *E. coli*. *Nucl Acids Res* **15**, 2665-2675.
- Deutsch, C.E., Sarpulla, R.C. and Soffer, R.L.** 1978. Post-translational NH₂-terminal aminoacylation. *Curr Top Cell Regul* **13**, 1-28.
- Diezal, W., Kopperschlager, G. and Hofmann, E.** 1972. An improved procedure for protein staining in polyacrylamide gels with a new type of Coomassie Brilliant Blue. *Anal Biochem* **48**, 617-624.
- Doi, R.H., Kudo, T. and Dickel, C.** 1981. RNA polymerase forms in vegetative and sporulating cells of *Bacillus subtilis*. En: *Sporulation and Germination*. Levinson, H.S., Soneshein, A.L. and Tipper, D.J., eds. American Society for Microbiology, Washington DC. pp. 219-223.
- Doi, R.H., and Wang, L.-F.** 1986. Multiple procaryotic ribonucleic polymerase sigma factors. *Microbiol Rev* **50**, 227-243.
- Dower, W.J., Miller, J.F. and Ragsdale, C.W.** 1988. High efficiency transformation of *Escherichia coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**, 6127-6145.
- Dunican, L.K. and Shivnan, E.** 1989. High frequency transformation of whole cells of amino acid producing coryneform bacteria using high voltage electroporation. *Bio/technology* **7**, 1067-1070.
- Ehresmann, B., Imbault, P. and Weil, J.H.** 1973. Spectrophotometric determination of protein concentration in cell extracts containing tRNA's and rRNA's. *Anal Biochem* **54**, 454-463.
- Epstein, W. and Beckwith, J.** 1968. Regulation of gene expression. *Ann Rev Biochem* **37**, 411-450.
- Eriani, G., Dirheimer, G. and Gangloff, J.** 1989. Isolation and characterization of the gene coding for *Escherichia coli* arginyl-tRNA synthetase. *Nucleic Acids Res* **17**, 5725-5736.
- Eriani, G., Dirheimer, G. and Gangloff, J.** 1990a. Structure-function relationship of arginyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli*: isolation and characterization of the *argS* mutation MA5002. *Nucleic Acids Res* **18**, 1475-1479.
- Eriani, G., Delarue, M., Poch, O., Gangloff, J., and Moras, D.** 1990b. Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature* **347**, 203-206.
- Farnham, P.J. and Platt, T.** 1980. A model for transcription termination suggested by studies on the *trp* attenuator *in vitro* using base analogs. *Cell* **20**, 739-748.
- Farr, S.B. and Kogoma, T.** 1991. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol Rev* **53**, 517-530.
- Follettie, M.T., Peoples, O.P., Agoropoulou, C. and Sinskey, A.J.** 1993. Gene structure and expression of the *Corynebacterium flavum* N13 *ask-asd* operon. *J Bacteriol* **175**, 4096-4103.

- Fourel, G., Phalipon, A. and Kaczorek, M.** 1989. Evidence for direct regulation of diphtheria toxin gene transcription by an Fe²⁺-dependant DNA-binding repressor, DtoxR, in *Corynebacterium diphtheriae*. *Infect Immun* **57**, 3221-3225.
- Friedman, D.I., Olson, E.R., Georgopoulos, C., Tilly, K., Herskowitz, I. and Banuett, F.** 1984. Interactions of bacteriophage and host macromolecules in the growth of bacteriophage. *Microbiol Rev* **48**, 299-325.
- Gagnon, Y., Breton, R., Putzer, H., Pelchat, M., Grunberg-Manago, M. and Lapointe, J.** 1994. Clustering and co-transcription of the *Bacillus subtilis* genes encoding the aminoacyl-tRNA synthetases specific for glutamate and for cysteine and the first enzyme for cysteine biosynthesis. *J Biol Chem* **269**, 7473-7482.
- Garnier, T. and Cole, S.T.** 1988. Studies of UV-inducible promoters from *Clostridium perfringens* in vivo and in vitro. *Mol Microbiol* **2**, 607-614.
- Gentry, D.R. and Burgess, R.R.** 1986. The cloning and sequence of the gene encoding the omega subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Gene* **48**, 33-40.
- Gilbert, W.** 1976. Starting and stopping sequences for the RNA polymerase. En: *RNA polymerase*. Losick, R. and Chamberlin, M., eds. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. pp. 193-205.
- Glaser, P., Danchin, A., Kunst, F., Debarbouille, M., Vertes, A. and Dedonder, R.** 1990. A gene encoding a tyrosine tRNA synthetase is located near *sacS* in *Bacillus subtilis*. *DNA Seq* **1**, 251-261.
- Grandoni, J.A., Zahler, S.A. and Calvo, J.M.** 1992. Transcriptional regulation of the *ilv-leu* operon of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **174**, 3212-3219.
- Greenfield, L., Bjorn, M.J., Horn, G., Fong, D., Buck, G.A., Collier, R.J. and Kaplan, D.A.** 1983. Nucleotide sequence of the structural gene for diphtheria toxin carried by corynephage . *Proc Natl Acad Sci USA* **80**, 6853-6857.
- Gross, C.A., Lonetto, M. and Losick, R.** 1992. Sigma factors. En: *Transcriptional regulation*. Yamamoto, K. and McKnight, S., eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. pp. 129-176.
- Grossman, A.D., Erickson, J.W. and Gross, C.A.** 1984. The *htpR* gene product of *E. coli* is a sigma factor for heat-shock promoters. *Cell* **38**, 383-390.
- Grunberg-Manago, M.** 1987. Regulation of the expression of aminoacyl-tRNA synthetases and translation factors. En: *Escherichia coli y Salmonella typhimurium, cellular and molecular biology*. Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Low, K.B., Magasanik, B., Schaechter, M. and Umberger, H.E., eds. American Society for Microbiology, Washington DC. pp. 1386-1409.
- Grundy, F.J. and Henkin, T.M.** 1993. tRNA as a positive regulator of transcription antitermination in *B. subtilis*. *Cell* **74**, 475-482.
- Grundy, F.J. and Henkin, T.M.** 1994. Conservation of a transcription antitermination mechanism in aminoacyl-tRNA synthetase and amino acid biosynthesis genes in Gram-positive bacteria. *J Mol Biol* **235**, 798-804.

- Grundy, F.J., Rollins, S.M. and Henkin, T.M.** 1994. Interaction of the acceptor end of tRNA and the T box stimulates antitermination in the *Bacillus subtilis tyrS* gene: a new role for the discriminator base. *J Bacteriol* **176**, 4518-4526.
- Guerrero, C.** 1992. Análisis molecular de los mecanismos que controlan la expresión del operón de biosíntesis de triptófano en *Brevibacterium lactofermentum*. Tesis doctoral. Universidad de León. León.
- Guerrero, C., Mateos, L.M., Malumbres, M. and Martín, J.F.** 1994. Directed mutagenesis of a regulatory palindromic sequence upstream from the *Brevibacterium lactofermentum* tryptophan operon. *Gene* **138**, 35-41.
- Günter, K., Toupet, C. and Schupp, T.** 1993. Characterization of an iron-regulated promoter involved in desferrioxamine B synthesis in *Streptomyces pilosus*: repressor-binding site and homology to the diphtheria toxin gene promoter. *J Bacteriol* **175**, 3295-3302.
- Haldenwang, W.G. and Losick, R.** 1980. A novel RNA polymerase sigma factor from *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**, 7000-7004.
- Haldenwang, W.G.** 1995. The sigma factors of *Bacillus subtilis*. *Microbiol Rev* **59**, 1-30.
- Hall, C.V. and Yanofsky, C.** 1982. Cloning and characterization of the gene for *Escherichia coli* tryptophanyl-transfer ribonucleic acid synthetase. *J Bacteriol* **148**, 941-949.
- Hanahan, D.** 1983. Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- Hanahan, D.** 1985. Techniques for transformation of *E. coli*. En: *DNA cloning. A practical approach*. Glover, D.M., ed. Irl. Press. Oxford. pp. 109-135.
- Hantke, K.** 1984. Cloning of the repressor protein gene of iron-regulated systems in *Escherichia coli* K12. *Mol Gen Genet* **197**, 337-341.
- Harris, J.D., Heiling, J.S., Martinez, I.I., Calendar, R. and 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**, 6277-6181.
- Hawley, D.K. and McClure, W.R.** 1983. Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. *Nucleic Acids Res* **11**, 2237-2255.
- Helmann, J.D., and Chamberlin, M.J.** 1988. Structure and function of bacterial sigma factors. *Ann Rev Biochem* **57**, 839-879.
- Henikoff, S.** 1984. Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. *Gene* **28**, 351-359.
- Henkin, T.M., Glass, B.L. and Grundy, F.J.** 1992. Analysis of the *Bacillus subtilis tyrS* gene: conservation of a regulatory sequence in multiple tRNA synthetase genes. *J Bacteriol* **174**, 1299-1306.
- Henkin, T.M.** 1994. tRNA-directed transcription antitermination. *Mol Microbiol* **13**, 381-387.
- Hennecke, H.** 1990. Regulation of bacterial gene expression by metal-protein complexes. *Mol Microbiol* **4**, 1621-1626.

- Herbet, C.J., Labousse, M., Dujardin, G. and Slonimski, P.P.** 1988. The NAM2 proteins from *S. cerevisiae* and *S. douglasii* are mitochondrial leucyl-tRNA synthetases and are involved in mRNA splicing. *EMBO J* **7**, 473-483.
- Higgins, D.G. and Sharp, P.M.** 1989. CLUSTAL V: a package for performing multiple sequence alignments on a microcomputer. *Gene* **73**, 237-244.
- Hohmann, S. and Thevelein, J.M.** 1992. The cell division cycle gene CDC60 encodes cytosolic leucyl-tRNA synthetase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **120**, 43-49.
- Hohn, B. and Collins, J.** 1980. A small cosmid for efficient cloning of large DNA fragments. *Gene* **11**, 291-298.
- Holmes, D.S. and Quigley, M.** 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacteria plasmids. *Anal Biochem* **114**, 193-197.
- Houman, F., Díaz-Torres, M.R. and Wright, A.** 1990. Transcriptional antitermination in the *bgl* operon of *E. coli* is modulated by a specific RNA binding protein. *Cell* **62**, 1153-1163.
- Houng, H.S.H., Kopecko, D.J. and Baron, L.S.** 1990. Molecular cloning and physical and functional characterization of the *Salmonella typhimurium* and *Salmonella typhi* galactose utilization operons. *J Bacteriol* **172**, 4392-4398.
- Hountondji, C., Lederer, F., Dessen, P. and Blanquet, S.** 1986. *Escherichia coli* tyrosyl- and methionyl-tRNA synthetases display sequence similarity at the binding site for the 3'-end of tRNA. *Biochemistry* **25**, 16-21.
- Hunt, T.P. and Magasanik, B.** 1985. Transcription of *glnA* by purified *Escherichia coli* components: core RNA polymerase and the products of *glnF*, *glnG* and *glnL*. *Proc Natl Acad USA* **82**, 8453-8457.
- Ingham, C.J., Hunter, I.S. and Smith, C.M.** 1995. Rho-independent terminators without 3' poly-U tails from the early region of the actinophage C31. *Nucl Acids Res* **23**, 370-376.
- Jakubowski, H. and Goldman, E.** 1984. Quantities of individual aminoacyl-tRNA families and their turnover in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **158**, 769-776.
- Jann, A., Cavard, D., Martin, C., Cami, B. and Patte, J.C.** 1990. A lipopeptide-encoding sequence upstream from the *lysA* gene of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **4**, 677-682.
- Jakubowski, H. and Goldman, E.** 1984. Quantities of individual aminoacyl-tRNA families and their turnover in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **158**, 769-776.
- Jensen, R.A.** 1969. Metabolism interlock. Regulatory interaction exerted between biochemical pathways. *J Biol Chem* **244**, 2816-2823.
- Jones, D. and Collins, M.D.** 1986. Irregular nonsporing Gram-positive rods. En: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol.2. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G., eds. Williams and Wilkins, Baltimore. pp. 1261-1434.
- Juang, Y.-L. and Helmann, J.D.** 1994. A promoter melting region in the primary σ factor of *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* **235**, 1470-1488.
- Kaczorek, M., Delpeyroux, F., Chenciner, N., Streeck, R.E., Murphy, J.R., Boquet, P. and Tiollais, P.** 1983. Nucleotide sequence and expression of the diphtheria *tox228* gene in *Escherichia coli*. *Science* **221**, 855-858.

- Kaczorek, M., Zettmeissl, G., Delpeyroux, F. and Streeck, R.E.** 1985. Diphtheria toxin promoter function in *Corynebacterium diphtheriae* and *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **13**, 3147-3159.
- Kalinowski, J., Cremer, J., Bachmann, B., Eggeling, L., Sahm, H. and Pühler, A.** 1991. Genetic and biochemical analysis of the aspartokinase from *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Microbiol* **5**, 1197-1204.
- Kassavetis, G.A. and Chamberlin, M.J.** 1981. Pausing and termination of transcription within the early region of bacteriophage T7 DNA *in vitro*. *J Biol Chem* **256**, 2777-2786.
- Kassavetis, G.A. and Geiduschek, E.P.** 1984. Defining a bacteriophage T4 late promoter: bacteriophage T4 gene 55 protein suffices for directing late promoter recognition. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**, 5101-5105.
- Kingston, R.E. and Chamberlin, M.J.** 1981. Pausing and attenuation of *in vitro* transcription in the *rrnB* operon of *E. coli*. *Cell* **27**, 523-531.
- Kormanec, J., Farkasovsky, M. and Potuckova, L.** 1992. Four genes in *Streptomyces aureofaciens* containing a domain characteristic of principal sigma factors. *Gene* **122**, 63-70.
- Kramer, W., Drutsa, V., Jansen, H.-W., Kramer, B., Pflugfelder, M. and Fritz, H.K.** 1984. The gapped duplex method DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction. *Nucl Acids Res* **12**, 9441-9456.
- Kröger, M., Wahl, R., Schachtel, G. and Rice, P.** 1992. Compilation of DNA sequences of *Escherichia coli* (update 1992). *Nucleic Acids Res* **20**, 2119-2144.
- Kustu, S., Santero, E., Keener, J., Popham, D. and Weiss, D.** 1989. Expression of ⁵⁴ (*ntrA*)-dependent genes is probably united by a common mechanism. *Microbiol Rev* **53**, 367-376.
- Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lampe, M., Binnie, C., Schmidt, R. and Losick, R.** 1988. Cloned gene encoding the delta subunit of *Bacillus subtilis* RNA polymerase. *Gene* **67**, 13-19.
- Langridge, J., Langridge, P. and Bergquist, P.L.** 1980. Extraction of nucleic acids from agarose gels. *Anal Biochem* **103**, 264-271.
- Leatherbarrow, R.J., Fersht, A.R. and Winter, G.** 1985. Transition-state stabilization in the mechanism of tyrosyl-tRNA synthetase revealed by protein engineering. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**, 7840-7844.
- Lemaire, H.-G. and Müller-Hill, B.** 1986. Nucleotide sequences of the *galE* gene and the *galT* gene of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **14**, 7705-7711.
- Leong, D. and Murphy, J.R.** 1985. Characterization of the diphtheria *tox* transcript in *Corynebacterium diphtheriae* and *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **163**, 1114-1119.
- Lesley, S.A. and Burgess, R.R.** 1989. Characterization of the *Escherichia coli* transcription factor ⁷⁰: localization of a region involved in the interaction with core RNA polymerase. *Biochemistry* **28**, 7728-7734.

- Levin, M.E. and Hatfull, G.F.** 1993. *Mycobacterium smegmatis* RNA polymerase: DNA supercoiling, action of rifampicin and mechanism of rifampicin resistance. *Mol Microbiol* **8**, 277-285.
- Litwin, C.M., Boyko, S.A. and Calderwood, S.B.** 1992. Cloning, sequencing and transcriptional regulation of the *Vibrio cholerae fur* gene. *J Bacteriol* **174**, 1897-1903.
- Lonetto, M., Gribskov, M., and Gross, C.A.** 1992. The ⁷⁰ family: sequence conservation and evolutionary relationships. *J Bacteriol* **174**, 3843-3849.
- Losick, R. and Pero, J.** 1981. Cascades of sigma factors. *Cell* **25**, 582-584.
- Losick, R., Youngman, P. and Piggot, P.J.** 1986. Genetics of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Ann Rev Genet* **20**, 625-669.
- Lowery-Goldhammer, C. and Richardson, J.P.** 1974. An RNA-dependent nucleoside triphosphate phosphohydrolase (ATPase) associated with *rho* termination factor. *Proc Natl Acad Sci USA* **71**, 2003-2007.
- Malumbres, M., Mateos, L.M. and Martín, J.F.** 1988. Nucleotide sequence of the threonine synthase (*thrC*) gene of *Brevibacterium lactofermentum*. *Nucleic Acids Res* **16**, 9859.
- Malumbres, M.** 1993. Clonación y caracterización molecular de los genes biosintéticos de treonina (*thrC*) y lisina de *Brevibacterium lactofermentum*. Tesis doctoral. Universidad de León. León.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J.** 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Mans, R.J. and Novelli, G.D.** 1961. Measurement of the incorporation of radioactive amino acids into proteins by a filter-paper disk method. *Arch Biochem Biophys* **94**, 48-53.
- Marcel, T., Archer, J.A.C., Mengin-Lecreux, D. and Sinskey, A.J.** 1990. Nucleotide sequence of the upstream region of the *Corynebacterium glutamicum lysA* gene. *Mol Microbiol* **4**, 1819-1830.
- Marcos, A.T., Gutiérrez, S., Díez, B., Fernández, F.J., Oguiza, J.A. and Martín, J.F.** 1995. Three genes *hrdB*, *hrdD* and *hrdT* of *Streptomyces griseus* IMRU 3570, encoding sigma factor-like proteins, are differentially expressed under specific nutritional conditions. *Gene* **153**, 41-48.
- Márquez, G., Fernández Sousa, J.M. and Sánchez, F.** 1985. Cloning and expression in *Escherichia coli* of genes involved in the lysine pathway of *Brevibacterium lactofermentum*. *J Bacteriol* **164**, 379-383.
- Martín J.F., Santamaría, R., Sandoval, H., del Real, G., Mateos, L.M., Gil, J.A. and Aguilar, A.** 1987. Cloning systems in amino acid-producing corynebacteria. *Bio/Technology* **5**, 137-146.
- Martín, J.F.** 1989. Molecular genetics of amino acid producing corynebacteria. En: *Microbial Products: new approaches*. Baumber, S., Hunter, I. and Rhodes, M. eds. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 25-59.
- Martín, J.F., Cadenas, R.F., Malumbres, M., Mateos, L.M., Guerrero, C. and Gil, J.A.** 1990. Construction and utilization of promoter-probe and expression vectors in corynebacteria. Characterization of corynebacterial promoters. En: *Genetics of Industrial Microorganisms '90*. Heslot, H., Davies, J., Florent, J., Bobichon, L., Durant, G. and Penasse, L., eds. Société Française de Microbiologie, Strasbourg. pp. 283-292.

- Mateos, L.M., del Real, G., Aguilar, A. and Martín, J.F.** 1987. Nucleotide sequence of the homoserine kinase (*thrB*) gene of *Brevibacterium lactofermentum*. *Nucleic Acids Res* **15**, 3922.
- Mateos, L.M., Pisabarro, A., Pátek, M., Malumbres, M., Guerrero, C., Eikmanns, B.J., Sahm, H. and Martín, J.F.** 1994. Transcriptional analysis and regulatory signals of the *hom-thrB* cluster of *Brevibacterium lactofermentum*. *J Bacteriol* **176**, 7362-7371.
- Mayaux, J.F., Fayat, G., Fromant, M., Springer, M., Grunberg-Manago, M. and Blanquet, S.** 1983. Structural and transcriptional evidence for related *thrS* and *infC* expression. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**, 6152-6156.
- Mead, D.A. and Kemper, B.** 1988. Chimeric single strand DNA phage-plasmid cloning vectors. En: *Vectors: a survey of molecular cloning and their uses*. Rodriguez, R.L. and Denhardt, D.T. eds. Butterworth, Stoneham, MA. pp. 85-102
- Mechold, U., Steiner, K., Vettermann, S. and Malke, H.** 1993. Genetic organization of the streptokinase region of the *Streptococcus equisimilis* H46A chromosome. *Mol Gen Genet* **241**, 129-140.
- Mehler, A.H. and Mitra, S.K.** 1967. The activation of arginyl transfer ribonucleic acid synthetase by ribonucleic acid. *J Biol Chem* **242**, 5495-5499.
- Merrick, M.J.** 1993. In a class of its own-the RNA polymerase sigma factor σ^{54} (σ^N). *Mol Microbiol* **10**, 903-909.
- Miller, J.H.** 1972. En: *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Moine, H., Romby, P., Springer, M., Grunberg-Manago, M., Ebel, J.P., Ehresmann, C. and Ehressman, B.** 1988. Messenger RNA structure and gene regulation at the translational level in *Escherichia coli*: the case of threonine: tRNA^{Thr} ligase. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 7892-7896.
- Moore, P.A., Jayne, O.W. and Oxender, D.L.** 1977. A role for aminoacyl-tRNA synthetases in the regulation of amino acid transport in mammalian cell lines. *J Biol Chem* **252**, 7427-7430.
- Moras, D.** 1992. Structural and functional relationships between aminoacyl-tRNA synthetases. *TIBS* **17**, 159-164.
- Morett, E. and Buck, M.** 1989. *In vivo* studies on the interaction of RNA polymerase- σ^{54} with the *Klebsiella pneumoniae* and *Rhizobium meliloti nifH* promoters. *J Mol Biol* **210**, 65-77.
- Morgan, S. and Söll, D.** 1978. Regulation of the biosynthesis of amino acid:tRNA ligases and of tRNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **21**, 181-207.
- Mulvey, M.R. and Loewen, P.C.** 1989. Nucleotide sequence of *katF* of *Escherichia coli* suggests that KatF protein is a novel transcription factor. *Nucleic Acids Res* **17**, 9979-9991.
- Murphy, J.R. and Bacha, P.** 1979. Regulation of diphtheria toxin. En: *Microbiology 1979*. American Society for Microbiology, Washington DC. pp.181-186.
- Naas, G. and Neidhardt, F.C.** 1967. Regulation of formation of aminoacyl ribonucleic acid synthetases in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **134**, 347-359.
- Nakanishi, S., Adhya, S., Gottesman, M.E. and Pastan, I.** 1973. *In vitro* repression of transcription of *gal* operon by purified *gal* repressor. *Proc Natl Acad Sci USA* **70**, 334-338.

- Nassif, X. and Sansonetti, P.J.** 1986. Correlation of the virulence of *Klebsiella pneumoniae* K1 and K2 with the presence of a plasmid encoding aerobactin. *Infect Immun* **54**, 603-608.
- Natori, Y., Kano, Y. and Imamoto, F.** 1990. Nucleotide sequences and genomic constitution of five tryptophan genes of *Lactobacillus casei*. *J Biochem* **107**, 248-255.
- Neidhardt, F.C., Parker, J. and McKoover, W.G.** 1975. Function and regulation of aminoacyl-tRNA synthetases in prokaryotic and eukaryotic cells. *Ann Rev Microbiol* **29**, 215-250.
- Neidhardt, F.C., Bloch, P.L., Pedersen, S. and Reeh, S.** 1977. Chemical measurements of steady state levels of 10 aminoacyl-tRNA synthetases in *E. coli*. *J Bacteriol* **129**, 378-387.
- Neilands, J.B.** 1974. Iron and its role in microbial physiology. En: *Microbial iron metabolism*. Neilands, J.B., ed. Academic Press, New York. pp. 3-34.
- Neilands, J.B.** 1981. Microbial iron compounds. *Ann Rev Biochem* **50**, 715-731.
- Oguiza, J.A., Malumbres, M., Eriani, G., Pisabarro, A., Mateos, L.M., Martín, F. and Martín, J.F.** 1993. A gene encoding arginyl-tRNA synthetase is located in the upstream region of the *lysA* gene in *Brevibacterium lactofermentum*: regulation of *argS-lysA* cluster expression by arginine. *J Bacteriol* **175**, 7356-7362.
- Oguiza, J.A., Tao, X., Marcos, A.T., Martín, J.F. and Murphy, J.R.** 1995a. Molecular cloning, DNA sequence analysis, and characterization of the *Corynebacterium diphtheriae dtxR* homolog from *Brevibacterium lactofermentum*. *J Bacteriol* **177**, 465-467.
- Oguiza, J.A., Marcos, A.T., Malumbres, M. and Martín, J.F.** 1995b. Multiple sigma factor genes in *Brevibacterium lactofermentum*: characterization of *sigA* and *sigB*. *J Bacteriol* **178**, en prensa.
- Oguiza, J.A., Marcos, A.T., Malumbres, M. and Martín, J.F.** 1995c. The *galE* gene encoding the UDP-galactose 4-epimerase from *Brevibacterium lactofermentum* is coupled transcriptionally to the *dtxR* gene. Enviado a publicación.
- O'Neill, G., Peterson, D.M., Schön, A., Chen, M.W. and Söll, D.** 1988. Formation of the chlorophyll precursor δ -aminolevulinic acid in cyanobacteria requires aminoacylation of a tRNA^{Glu} species. *J Bacteriol* **170**, 3810-3816.
- Pape, L.K., Koerner, T.J. and Tzagoloff, A.** 1985. Characterization of a yeast nuclear gene (*MST1*) coding for the mitochondrial threonyl-tRNA synthetase. *J Biol Chem* **260**, 15362-15370.
- Pappenheimer, A.M., Jr. and Johnson, S.J.** 1936. Studies in diphtheria toxin production. I: The effect of iron and copper. *Brit J Exp Path* **17**, 335-341.
- Pappenheimer, A.M., Jr.** 1955. The pathogenesis of diphtheria. *Symp Soc Gen Microbiol*, pp. 40-56.
- Payne, S.** 1988. Iron and virulence in the family *Enterobacteriaceae*. *CRC Crit Rev Microbiol* **16**, 81-111.
- Peng, H.L., Fu, T.F., Liu, S.F. and Chang, H.Y.** 1992. Cloning and expression of the *Klebsiella pneumoniae* galactose operon. *J Biochem* **112**, 604-608.
- Pich, A. and Bahl, H.** 1991. Purification and characterization of the DNA-dependent RNA polymerase from *Clostridium acetobutylicum*. *J Bacteriol* **173**, 2120-2124.
- Pisabarro, A., Malumbres, M., Mateos, L.M., Oguiza, J.A. and Martín, J.F.** 1993. A cluster of three genes *dapA*, *orf2* and *dapB* of *Brevibacterium lactofermentum* encodes

dihydrodipicolinate synthase, dihydrodipicolinate reductase and a third polypeptide of unknown function. *J Bacteriol* **175**, 2743-2749.

- Plunkett, G., III, Burland, V., Daniels, D.L. and Blattner, F.R.** 1993. Analysis of the *Escherichia coli* genome. III. DNA sequence of the region from 87.2 to 89.2 minutes. *Nucleic Acids Res* **21**, 3391-3398.
- Pollard, J.W., Galpine, A.R. and Clemens, M.J.** 1989. A novel role for aminoacyl-tRNA synthetases in the regulation of polypeptide chain initiation. *Eur J Biochem* **182**, 1-9.
- Poolman, B., Royer, T.J., Mainzer, S.E. and Schmidt, B.F.** 1990. Carbohydrate utilization in *Streptococcus thermophilus*: characterization of the genes for aldose 1-epimerase (mutarotase) and UDP-glucose 4'-epimerase. *J Bacteriol* **172**, 4037-4047.
- Popham, D., Keener, J. and Kustu, S.** 1991. Purification of the alternative factor, σ^{54} , from *Salmonella typhimurium* and characterization of σ^{54} holoenzyme. *J Biol Chem* **266**, 19510-19518.
- Predich, M., Doukhan, L., Nair, G. and Smith, I.** 1995. Characterization of RNA polymerase and two sigma-factor genes from *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* **15**, 355-366.
- Pribnow, D.** 1979. Genetic control signals in DNA. En: *Biological Regulation and Development*. Vol. 1. Goldberger, R.F., ed. Plenum Press, New York, pp. 219-279.
- Prince, R.W., Cox, C.D. and Vasil, M.L.** 1993. Coordinate regulation of siderophore and exotoxin A production: molecular cloning and sequencing of the *Pseudomonas aeruginosa fur* gene. *J Bacteriol* **175**, 2589-2598.
- Putman, S.L. and Koch A.L.** 1975. Complications in the simplest cellular assay: lysis of *Escherichia coli* for the assay of β -galactosidase. *Anal Biochem* **63**, 350-360.
- Putney, S.D. and Schimmel, P.** 1981. An aminoacyl-tRNA synthetase binds to a specific DNA sequence and regulates its gene transcription. *Nature* **291**, 623-635.
- Putzer, H., Gendron, N. and Grunberg-Manago, M.** 1992. Coordinate expression of the two threonyl-tRNA synthetase genes in *Bacillus stearothermophilus*: control by transcriptional antitermination involving a conserved regulatory sequence. *EMBO J* **11**, 3117-3127.
- Putzer, H., Laalami, S., Brakhage, A.A., Condon, C. and Grunberg-Manago, M.** 1995. Aminoacyl-tRNA synthetase gene regulation in *Bacillus subtilis*: induction, repression and growth-rate regulation. *Mol Microbiol* **16**, 709-718.
- Quay, S.C., Kline, E.L. and Oxender, D.L.** 1975. Role of leucyl-tRNA synthetase in regulation of transport. *Proc Natl Acad Sci USA* **72**, 3291-3924.
- Ratti, G., Rappuoli, R. and Giannini, G.** 1983. The complete nucleotide sequence of the gene coding for diphtheria toxin in the corynephage (*tox+*) genome. *Nucl Acids Res* **11**, 6589-6595.
- Reeh, S., Pedersen, S. and Neidhardt, F.C.** 1977. Transient rates of synthesis of five aminoacyl-transfer ribonucleic acid synthetases during a shift-up of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **129**, 702-706.
- Roberts, J.W.** 1969. Termination factor for RNA synthesis. *Nature* **224**, 1168-1174.
- Roberts, J.W.** 1993. RNA and protein elements of *E. coli* and transcription antitermination complexes. *Cell* **72**, 653-655.

- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, R.A.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 5463-5467.
- Santamaría, R., Gil, J.A. and Martín, J.F.** 1985. High-frequency transformation of *Brevibacterium lactofermentum* protoplasts by plasmid DNA. *J Bacteriol* **162**, 463-467.
- Sasse-Dwight, S. and Gralla, J.D.** 1989. KMnO_4 as a probe for *lac* promoter DNA melting and mechanism *in vivo*. *J Biol Chem* **264**, 8074-8081.
- Sauer, U., Treuner, A., Buchholz, M., Santangelo, J.D. and Durre, P.** 1994. Sporulation and primary sigma factor homologous genes in *Clostridium acetobutylicum*. *J Bacteriol* **176**, 6572-6582.
- Schäfer, A., Kalinowski, J., Simon, R., Seep-Feldhaus, A. and Pühler, A.** 1990. High frequency conjugal plasmid transfer from gram-negative *Escherichia coli* to various gram-positive coryneform bacteria. *J Bacteriol* **172**, 1663-1666.
- Schäfer, A., Schwarzer, A., Kalinowski, J. and Pühler, A.** 1994. Cloning and characterization of a DNA region encoding a stress-sensitive restriction system from *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 and analysis of its role in intergenic conjugation with *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **176**, 7309-7319.
- Schaffer, S., Hantke, K. and Braun, V.** 1985. Nucleotide sequence of the iron regulatory gene *fur*. *Mol Gen Genet* **200**, 111-113.
- Schiering, N., Tao, X., Zeng, H.-Y., Murphy, J.R., Petsko, G.A. and Ringe, D.** 1995. Structure of the diphtheria *tox* repressor from *Corynebacterium diphtheriae*. *Nature*, en prensa.
- Schimmel, P. and Söll, D.** 1979. Aminoacyl-tRNA synthetases: general features and recognition of transfer RNAs. *Ann Rev Biochem* **56**, 125-158.
- Schleifer, K.H. and Stackebrandt, E.** 1983. Molecular systematics of prokaryotes. *Ann Rev Microbiol* **37**, 143-187.
- Schmidt, M.C. and Chamberlin, M.J.** 1984. Binding of *rho* factor to *Escherichia coli* RNA polymerase mediated by *nusA* protein. *J Biol Chem* **259**, 15000-15002.
- Schmitt, M.P. and Holmes, R.K.** 1991a. Iron-dependent regulation of diphtheria toxin and siderophore expression by the cloned *Corynebacterium diphtheriae* repressor gene *dtxR* in *C. diphtheriae* C7 strains. *Infect Immun* **59**, 1899-1904.
- Schmitt, M.P. and Holmes, R.K.** 1991b. Characterization of a defective diphtheria toxin repressor (*dtxR*) allele and analysis of *dtxR* transcription in wild type and mutant strain of *Corynebacterium diphtheriae*. *Infect Immun* **59**, 3903-3908.
- Schmitt, M.P., Twiddy, E.D. and Holmes, R.K.** 1993. Purification and characterization of the diphtheria toxin repressor. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 7576-7580.
- Schmitt, M.P. and Holmes, R.K.** 1993. Analysis of diphtheria toxin repressor-operator interaction and characterization of a mutant repressor with decreased binding activity for divalent metals. *Mol Microbiol* **9**, 173-181.
- Schmitt, M.P. and Holmes, R.K.** 1994. Cloning, sequence and footprint analysis of two promoter/operators from *Corynebacterium diphtheriae* that are related by the diphtheria toxin repressor (DtxR) and iron. *J Bacteriol* **176**, 1141-1149.

- Schön, A., Krupp, A., Gough, S., Berry-Lowe, S., Kannangara, C.G. and Söll, D. 1986. The tRNA required in the first step of chlorophyll biosynthesis is a chloroplast glutarate tRNA. *Nature* **322**, 281-284.
- Schrumpf, B., Schwarzer, A., Kalinowski, J., Pühler, A., Eggeling, L. and Sahn, H. 1991. A functional split pathway for lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **173**, 4510-4516.
- Schupp, T., Waldmeier, U. and Divers, M. 1987. Biosynthesis of desferrioxamine B in *Streptomyces pilosus*: evidence for the involvement of lysine decarboxylase. *FEMS Microbiol Lett* **42**, 135-139.
- Schupp, T., Toupet, C. and Divers, M. 1988. Cloning and expression of two genes of *Streptomyces pilosus* involved in the biosynthesis of siderophore desferrioxamine B. *Gene* **64**, 179-188.
- Schwarzer, A. and Pühler, A. 1991. Manipulation of *Corynebacterium glutamicum* by gene disruption and replacement. *Biotechnology* **9**, 84-87.
- Schwinde, J.W., Thum-Schmitz, N., Eikmanns, B.J. and Sahn, H. 1993. Transcriptional analysis of the *gap-pgk-tpi-ppc* gene cluster of *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **175**, 3905-3908.
- Sharp, P.M. and Mitchell, K.J. 1993. *Corynebacterium glutamicum* arginyl-tRNA synthetase. *Mol Microbiol* **8**, 200.
- Sherman, J.M., Rogers, K., Rogers, M.J. and Soll, D. 1992a. Synthetase competition and tRNA context determine the *in vivo* identity of tRNA discriminator mutants. *J Mol Biol* **228**, 1055-1062.
- Sherman, J.M., Rogers, M.J. and Soll, D. 1992b. Competition of aminoacyl-tRNA synthetases for tRNA ensures the accuracy of aminoacylation. *Nucl Acids Res* **20**, 2847-2852.
- Siegele, D.A., Hu, J.C., Walter, W.A. and Gross, C.A. 1989. Altered promoter recognition by mutant forms of the sigma 70 subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J Mol Biol* **206**, 591-603.
- Smith, H.W. and Huggins, M.B. 1976. Further observations on the association of the colicine V plasmid of *Escherichia coli* with pathogenicity and with survival in the alimentary tract. *J Gen Microbiol* **92**, 335-350.
- Sneath, P.H.A., Mair, N.S. and Sharpe, M.E., eds. 1986. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 2. The Williams and Wilkins Company, Baltimore.
- Southern, E.M. 1979. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-517.
- Springer, M., Trudel, M., Graffe, M., Plumbridge, J.A., Mayaux, J.F., Fayat, G., Sacerdot, C., Blanquet, S. and Grunberg-Manago, M. 1983. *Escherichia coli* phenylalanyl-tRNA synthetase operon is controlled by attenuation *in vivo*. *J Mol Biol* **171**, 263-279.
- Springer, M., Plumbridge, J.A., Butler, J.S., Graffe, M., Dondon, J., Mayaux, J.F., Fayat, G., Lestiennes, P., Blanquet, S. and Grunberg-Manago, M. 1985. Autogenous control of *Escherichia coli* threonyl-tRNA synthetase expression *in vivo*. *J Mol Biol* **185**, 93-104.

- Springer, M., Graffe, M., Dondon, J. and Grunberg-Manago, M.** 1989. tRNA-like structures and gene regulation at the translational level: a case of molecular mimicry in *Escherichia coli*. *EMBO J* **8**, 2417-2427.
- Staggs, T.M. and Perry, R.D.** 1991. Identification and cloning of a *fur* regulatory gene in *Yersinia pestis*. *J Bacteriol* **173**, 417-425.
- Stanley, K.K.** 1983. Solubilization and immune-detection of β -galactosidase hybrid proteins carrying foreign antigenic determinants. *Nucleic Acids Res* **11**, 4079-4092.
- Stetter, K.O. and Zilling, W.** 1974. Transcription in *Lactobacillaceae*. *Eur J Biochem* **48**, 527-540.
- Stragier, P., Richaud, F., Borne, F. and Patte, J.C.** 1983a. Regulation of diaminopimelate decarboxylase synthesis in *E. coli*: I. Identification of a *lysR* gene encoding an activator of the *lysA* gene. *J Mol Biol* **168**, 307-320.
- Stragier, P., Danos, O. and Patte, J.C.** 1983b. Regulation of diaminopimelate decarboxylase synthesis in *E. coli*: II. Nucleotide sequence of the *lysA* gene and its regulatory region. *J Mol Biol* **168**, 321-331.
- Stragier, P. and Patte, J.C.** 1983. Regulation of diaminopimelate decarboxylase synthesis in *E. coli*: III. Nucleotide sequence and regulation of the *lysR* gene. *J Mol Biol* **168**, 333-350.
- Tai, S.S., Krafft, A.E., Nootheti, P. and Holmes, R.K.** 1990. Coordinate regulation of siderophore and diphtheria toxin production by iron in *Corynebacterium diphtheriae*. *Microb Pathog* **9**, 267-273.
- Tai, S.S. and Zhu, Y.Y.** 1995. Cloning of a *Corynebacterium diphtheriae* iron-repressible gene that shares sequence homology with the AhpC subunit of alkyl hydroperoxide reductase of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **177**, 3512-3517.
- Tanaka, K., Shiina, T. and Takahashi, H.** 1988. Multiple principal sigma factor homologs in eubacteria: identification of the "*rpoD* box". *Science* **242**, 1040-1042.
- Tao, X., Boyd, J. and Murphy, J.R.** 1992. Specific binding of the diphtheria *tox* regulatory element DtxR to the *tox* operator requires divalent cations and a 9-base pair interrupted palindromic sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 5897-5901.
- Tao, X. and Murphy, J.R.** 1992. Binding of the metalloregulatory protein DtxR to the diphtheria *tox* operator requires a divalent heavy metal ion and protects the palindromic sequence from DNase I digestion. *J Biol Chem* **267**, 21761-21764.
- Tao, X. and Murphy, J.R.** 1993. Cysteine 102 is positioned in the metal binding activation site of the *Corynebacterium diphtheriae* regulatory element DtxR. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 8524-8528.
- Tao, X., Schiering, N., Zeng, H.-Y., Ringe, D. and Murphy, J.R.** 1994. Iron, DtxR, and the regulation of diphtheria toxin expression. *Mol Microbiol* **14**, 191-197.
- Tao, X. and Murphy, J.R.** 1994. Determination of the minimal essential nucleotide sequence for diphtheria *tox* repressor binding by *in vitro* affinity selection. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 9646-9650.
- Tao, X., Zeng, H.-Y. and Murphy, J.R.** 1995. Transition metal ion activation of DNA binding by the diphtheria *tox* repressor (DtxR) requires the formation of stable homodimers. *Proc Natl Acad Sci USA*, en prensa.

- Thomas, P.S.** 1983. Hybridization of denatured RNA transferred or dotted to nitrocellulose paper. *Methods Enzymol* **100**, 255-266.
- Tjian, R., Losick, R., Pero, J. and Hinnenbush, A.** 1977. Purification and comparative properties of the delta and sigma subunits of RNA polymerase from *Bacillus subtilis*. *Eur J Biochem* **74**, 149-154.
- Uchida, T., Gill, D.M. and Pappenheimer, A.M., Jr.** 1971. Mutation in the structural gene for diphtheria toxin carried by temperate phage . *Nature* **233**, 8-11.
- Van der Horn, P.B. and Zahler, S.A.** 1992. Cloning and nucleotide sequence of the leucyl-tRNA synthetase gene of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **174**, 3928-3935.
- van Wezel, G.P., Buttner, M.J., Vijgenboom, E., Bosch, L., Hopwood, D.A. and Kieser, H. M.** 1995. Mapping of genes involved in macromolecular synthesis on the chromosome of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* **177**, 473-476.
- Versalovic, J., Koeuth, T., Britton, R., Geszvain, K. and Lupski, J.R.** 1993. Conservation and evolution of the *rpsU-dnaG-rpoD* macromolecular synthesis operon in bacteria. *Mol Microbiol* **8**, 343-355.
- Vertés, A.A., Inui, M., Kobayashi, M., Kurusu, Y. and Yukawa, H.** 1994. Isolation and characterization of IS31831, a transposable element from *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Microbiol* **11**, 739-746.
- Vieira, J. and Messing, J.** 1982. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**, 259-268.
- Vogel, H. and Bonner, D.M.** 1956. Acetylornithinase of *Escherichia coli*: partial purification and some properties. *J Biol Chem* **218**, 97-106.
- von Hippel, P.H., Bear, D.G., Morgan, W.D. and McSwiggen, J.A.** 1984. Protein-nucleic acid interactions in transcription: a molecular analysis. *Ann Rev Biochem* **53**, 389-446.
- Waldburger, C., Gardella, T., Wong, R. and Susskind, M.M.** 1990. Changes in conserved region 2 of *Escherichia coli* ⁷⁰ affecting promoter recognition. *J Mol Biol* **215**, 267-276.
- Waldburger, C. and Susskind, M.M.** 1994. Probing the informational content of *Escherichia coli* ⁷⁰ region 2.3 by combinatorial cassette mutagenesis. *J Mol Biol* **235**, 1489-1500.
- Wang, L.F. and Doi, R.H.** 1986 Nucleotide sequence and organization of *Bacillus subtilis* RNA polymerase major sigma operon. *Nucleic Acids Res* **14**, 4293-4307.
- Wang, Z., Schmitt, M.P. and Holmes R.K.** 1994. Characterization of mutations that inactivate the diphtheria toxin repressor gene (*dtxR*). *Infect Immun* **62**, 1600-1608.
- Waye, M.M.Y. and Winter, G.** 1986. A transcription terminator in the 5' non-coding region of the tyrosyl-tRNA synthetase gene from *Bacillus stearothermophilus*. *Eur J Biochem* **158**, 505-510.
- Webster, T.A., Tsai, H., Kula, M., Mackie, G.A. and Schimmel, P.** 1984. Specific sequence homology and three dimensional structure of an aminoacyl transfer RNA synthetase. *Science* **226**, 1315-1317.
- Williams, P.H.** 1979. Novel iron uptake system specified by ColV plasmid: an important component in the virulence of invasive strain of *Escherichia coli*. *Infec Immun* **26**, 925-932.
- Woese, C.R.** 1987. Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **51**, 221-271.

- Wooldridge, K.G., Williams, P.H. and Ketley, J.M.** 1994. Iron-responsible genetic regulation in *Campylobacter jejuni*: cloning and characterization of a *fur* homolog. *J Bacteriol* **176**, 5852-5856.
- Wright, W.E., Binder, M. and Funk, W.** 1991. Cyclic amplification and selection of targets (CASTing) for the myogenin consensus binding site. *Mol Cell Biol* **11**, 4104-4110.
- Yager, T.D. and von Hippel, P.H.** 1987. Transcript elongation and termination in *Escherichia coli*. En: *Escherichia coli and Salmonella typhimurium, cellular and molecular genetics*. Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Low, K.B., Magasanik, B., Schaechter, M. and Umberger, H.E., eds. American Society for Microbiology, Washington DC. Vol. 1. pp. 1241-1275.
- Yamamoto, J., Shimizu, M. and Yamane, K.** 1991. Molecular cloning and analysis of nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis lysA* gene region using *B. subtilis* phage vectors and a multi-copy plasmid, pUB110. *Agric Biol Chem* **55**, 1615-1626.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J.** 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.
- Yanofsky, C.** 1987. Operon-specific control by transcription attenuation. *TIG* **3**, 356-360.
- Yeh, P., Sicard, A.M. and Sinskey, A.J.** 1988. Nucleotide sequence of the *lysA* gene of *Corynebacterium glutamicum* and possible mechanisms for modulation of its expression. *Mol Gen Genet* **212**, 112-119.
- Yura, T. and Ishihama, A.** 1979. Genetics of bacterial RNA polymerase. *Ann Rev Genet* **13**, 59-97.
- Yura, T., Nagai, H. and Mori, H.** 1993. Regulation of the heat-shock response in bacteria. *Ann Rev Microbiol* **47**, 321-350.
- Zuber, P., Healy, J., Carter III, H.L., Cutting, S., Moran, Jr, C.P. and Losick, R.** 1989. Mutation changing the specificity of an RNA polymerase sigma factor. *J Mol Biol* **206**, 605-614.