

312232



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ANALISIS DE LA REGION ACTIVADORA DEL  
PROMOTOR *flOp* DE *Rhodobacter sphaeroides*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

URSULA FLORES PEREZ



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ROSA LAURA CAMARENA MEJIA

2002



FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA**

Jefa de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunico a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

Análisis de la región activadora del promotor *fliOp* de *Rhodobacter sphaeroides*

realizado por Úrsula Flores Pérez

con número de cuenta 092347056 , quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
Propietario

Dra. Rosa Laura Camarena Mejía *Rosa Laura Camarena*

Propietario

Dra. María del Carmen Gómez Eichelmann *María del Carmen Gómez Eichelmann*

Propietario

Dra. María Elena Álvarez-Buylla Roces *María Elena Álvarez-Buylla Roces*

Suplente

Dr. Luis Servín González *Luis Servín González*

Suplente

Dr. Jesús Ramírez Santos *Jesús Ramírez Santos*

FACULTAD DE CIENCIAS  
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

*Juan Manuel Rodríguez Chávez*  
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGIA

Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Rosa Laura Camarena Mejía en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

## Agradecimientos

Agradezco a la Dra. Laura Camarena Mejía la oportunidad de trabajar bajo su dirección y el apoyo para concretar esta tesis.

A la Q.F.B. Aurora Osorio Franco y al Lic. en I.B.B. Sebastián Poggio Ghilarducci por la asesoría técnica.

Agradezco la revisión de este trabajo a mis sinodales, la Dra. Carmen Gómez Eichelmann, el Dr. Luis Servín González, la Dra. Elena Álvarez-Buylla Rocas y el Dr. Jesús Ramírez Santos.

# Índice

Abreviaturas	xi
<b>Introducción</b>	1
El flagelo	4
El factor de transcripción sigma 54	9
El sistema genético flagelar de <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	14
<b>Objetivos</b>	19
<b>Materiales y métodos</b>	21
Cepas bacterianas	21
Plásmidos	21
Oligonucleótidos	22
Condiciones de cultivo	22
Métodos genéticos	23
Métodos de biología molecular	24
Métodos enzimáticos	29
<b>Resultados</b>	31
Localización de la UAS del promotor <i>fliOp</i> :	
efecto de diferentes deleciones en la región activadora	31
Interacción de proteínas con la región activadora del	
promotor <i>fliOp</i> : retardo de la movilidad electroforética	35
Inserción de nucleótidos en la región activadora:	
efecto sobre la expresión del promotor <i>fliOp</i>	39
<b>Discusión y conclusiones</b>	41
<b>Referencias</b>	45

## Abreviaturas

cAMP	adenosín 3'.5'-monofosfato cíclico
CAP	proteína activadora de gen por catabolito
CW	rotación en sentido de las manecillas del reloj
CCW	rotación en sentido contrario a la de las manecillas del reloj
DMSO	dimetil sulfóxido
dNTPs	desoxinucleótidos trifosfatos
DO	densidad óptica
DTT	ditiotreitól
EBPs	proteínas activadoras
EDTA	ácido etilendiamino-tetraacético
E $\sigma^{54}$	RNAP holoenzima asociada al factor sigma 54
HEPES	ácido N-2-hidroxietilpiperazín-N $\zeta$ -2-etanosulfónico
MCPs	proteínas quimiotácticas aceptoras de metilo
NtrC	proteína reguladora de nitrógeno C
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
RNAP	<i>core</i> de la RNA polimerasa
UASs	secuencias de activación reconocidas por las EBPs ubicadas río arriba del inicio de la transcripción
<i>uidA2</i>	gen que codifica para la enzima $\beta$ -glucuronidasa

## Introducción

Muchas especies bacterianas son capaces de responder a estímulos ambientales desplazándose en el medio que habitan mediante uno de los dos mecanismos conocidos a la fecha: el deslizamiento y el nado. El primero, conocido principalmente en especies que carecen de apéndices como *Flavobacterium johnsoniae* y *Myxococcus xanthus*, es un movimiento lento sobre superficies sólidas y depende de secreciones celulares (Aizawa, 2000). Por otro lado, el nado es llevado a cabo por flagelos, apéndices que protruyen de la célula. A diferencia del deslizamiento, este mecanismo parece ser similar en todas las especies sugiriendo un solo evento evolutivo para su origen (Armitage, 1999).

En las bacterias, la motilidad es importante para enfrentar condiciones diversas de su ambiente natural. Las bacterias flageladas siguen un patrón azaroso de nado en condiciones homogéneas cambiando de dirección cada pocos segundos. Esta conducta se basa en el control de la rotación del flagelo; *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium, tienen un motor flagelar que fluctúa entre dos estados: la rotación en sentido contrario a la de las manecillas del reloj (CCW, *counterclockwise*) genera la formación de una trenza de flagelos que empuja a la célula hacia adelante a velocidades de 40  $\mu\text{m/s}$ ; el segundo estado es de rotación breve, ocurre en sentido de las manecillas del reloj (CW, *clockwise*), y propicia que la bacteria se reoriente (Figura 1b) (Stock & Surette, 1996).

En las bacterias no entéricas se encuentran diferentes formas de nado dependiendo del número y localización de los filamentos flagelares. Por ejemplo, *Rhodobacter sphaeroides* y *Sinorhizobium meliloti* cambian de dirección cuando paran o reducen la velocidad de rotación de sus filamentos (Figura 1a, 1c).



*R. sphaeroides* tiene un motor unidireccional CW que para y cambia su velocidad de rotación periódicamente para que la célula se reoriente. Por otro lado, *S. meliloti* forma una trenza de flagelos que también rotan solo en dirección CW, cuando la tasa de rotación de cada motor cambia, los filamentos se separan y la célula puede reorientarse (Armitage & Schmitt, 1997).

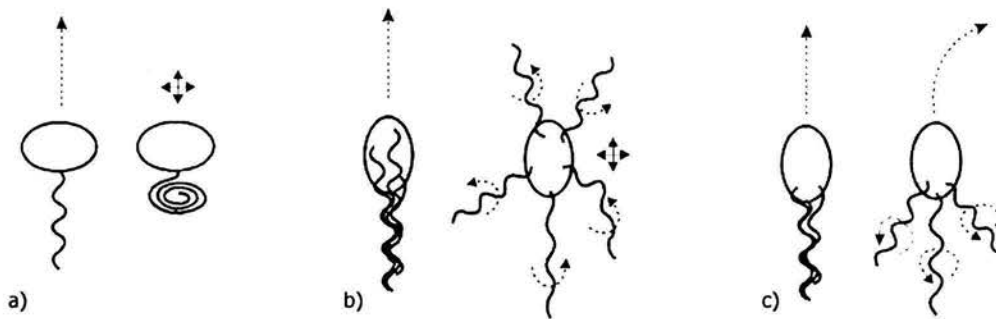
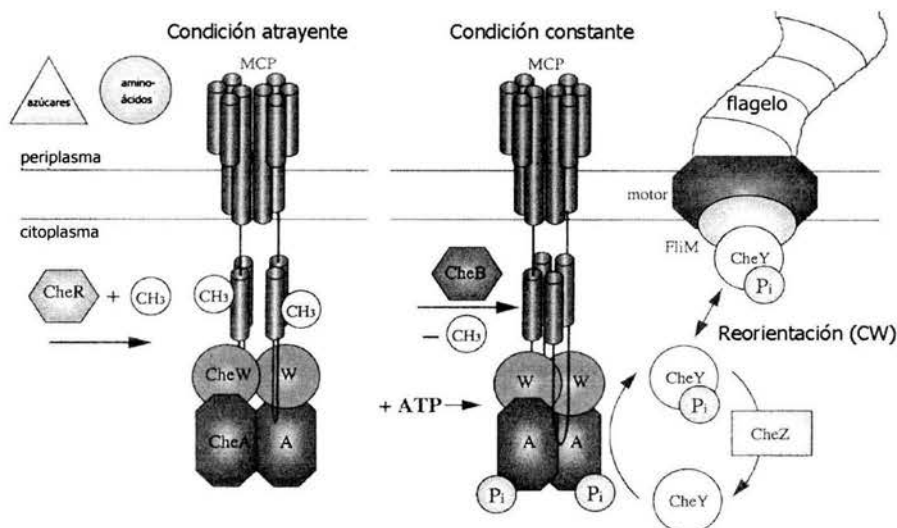


Figura 1. Arreglo flagelar y mecanismos de nado de a) *R. sphaeroides*, b) *E. coli* y c) *S. meliloti*. Todos los mecanismos resultan en un patrón de nado azaroso (Modificada de Armitage & Schmitt, 1997).

La frecuencia de cambio en la dirección del nado está controlada por un sistema de dos componentes que transduce la señal desde el ambiente hasta el flagelo. Los estímulos externos son detectados por un grupo de receptores transmembranales o MCPs (*methyl-accepting chemotaxis proteins*); en *E. coli* son Tsr, Tar, Trg, Tap y Aer (Armitage, 1999). Entre los atrayentes que detectan estas proteínas se incluyen la serina, alanina, glicina (Tsr); aspartato, glutamato, maltosa (Tar); ribosa, galactosa, glucosa (Trg), y dipéptidos (Tap); y entre los repelentes están el pH extremo, ciertos iones de metales así como aminoácidos hidrofóbicos (Stock & Surette, 1996).

Una señal se inicia cuando los cambios conformacionales inducidos por la unión del ligando se transmiten a la cara citoplasmática de los receptores, donde son reconocidos por el complejo asociado CheA/CheW. La actividad de la proteína

CheA de autocinasa se inhibe por la unión de atrayentes a los receptores y se estimula cuando los receptores están libres de atrayentes o tienen unido un repelente. CheA dona su fosfato a los reguladores de respuesta CheY y CheB (Burkart *et al.*, 1998). La forma fosforilada de CheY interactúa con FliM del complejo del *switch* flagelar y genera rotación CW en el motor. Para terminar esta señal, la proteína CheZ forma multímeros con CheY-P, compitiendo con FliM e incrementando desfosforilación de CheY (Figura 2).



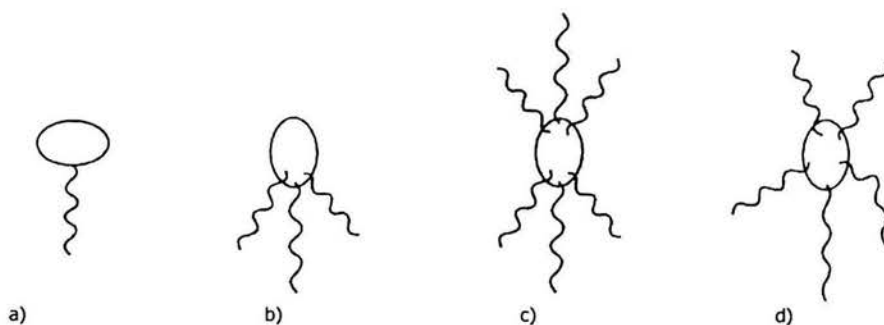
**Figura 2.** Modelo de las interacciones proteicas y modificación covalente durante la quimiotaxis en bacterias entéricas. La unión y/o liberación de un quimioefector propicia un cambio conformacional en la cara transmembranal de la MCP, lo que altera la actividad de la cinasa CheA, así como la susceptibilidad de la MCP a ser metilada o desmetilada. CheA-P puede donar su fosfato a CheY; CheY-P interactúa con FliM en el cuerpo basal del flagelo para determinar la dirección de la rotación flagelar (Modificada de Aizawa, 2000).

La quimiotaxis es una función bacteriana que muestra adaptación. El patrón de nado cambia rápidamente en respuesta a la presencia de un quimioefector pero gradualmente regresa a su comportamiento original, aún cuando la señal continúa presente. Esta adaptación involucra la metilación reversible de dos regiones con

residuos de glutamato situados en el dominio citoplasmático de las proteínas transductoras que sirven como sustrato de CheR y CheB. La proteína CheR posee actividad de metil-transferasa que parece ser constitutiva; por otro lado, la actividad de la metil-esterasa CheB es controlada por fosforilación (Stock & Surette, 1996). En *E. coli*, las mutantes  $\Delta cheR$  no pueden metilar los receptores y constantemente se reorientan, mientras que las mutantes  $\Delta cheB$  tienen los receptores sobremetilados y su nado es continuo (Burkart *et al.*, 1998).

## El flagelo

Existen diferentes arreglos flagelares según el número y localización en el cuerpo celular (Figura 3). Los flagelos son estructuras estables en un amplio intervalo de condiciones químicas y, conceptualmente, la estructura flagelar puede ser dividida en tres partes: el filamento, el gancho y el cuerpo basal (Macnab, 1996) (Figura 4a). La fuente de energía para la rotación del flagelo es la fuerza protón-motriz ( $\Delta p$ ). En bacterias alcalófilas se utiliza el gradiente de  $\text{Na}^+$ . A la fecha se desconoce el mecanismo molecular que permite la transformación de la energía electroquímica en energía de rotación.



**Figura 3.** Clasificación de las bacterias según su arreglo flagelar: a) monótricas o polares, b) lofótricas, c) anfítricas y d) perítricas.

El filamento es una estructura helicoidal semi-rígida, que rota en su base y no presenta actividad enzimática. En *E. coli*, cada filamento consta de ~20,000 monómeros de flagelina (FliC); sin embargo, algunas especies como *S. meliloti* y *Caulobacter crescentus* forman una hélice completamente funcional con cuatro flagelinas diferentes (Wu & Newton, 1997; Scharf *et al.*, 2001). La longitud del filamento y su polimerización parecen estar controladas por la proteína de coronamiento FliD (o HAP2, *hook-associated protein 2*) que, al formar un complejo pentamérico en el extremo distal del filamento podría (i) prevenir la pérdida de los monómeros de flagelina cuando son transportados y (ii) catalizar activamente su ensamblaje (Macnab, 2000).

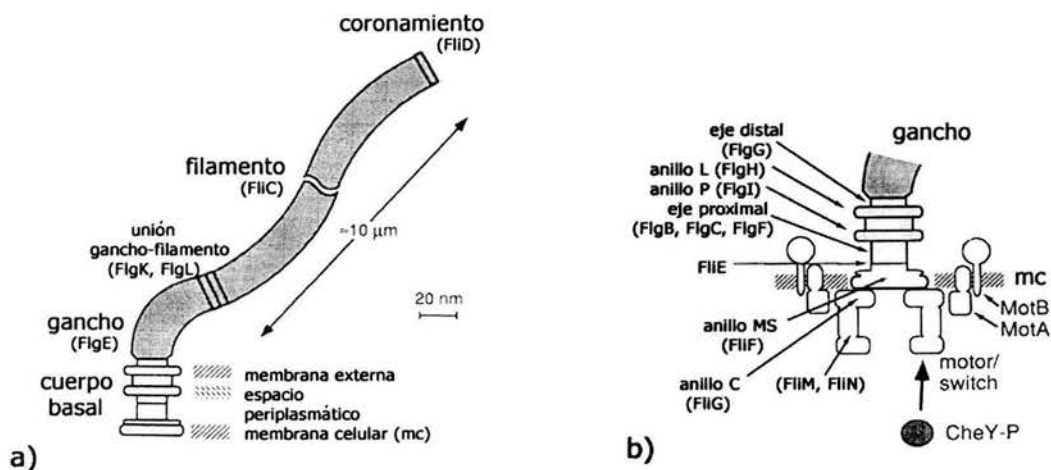


Figura 4. a) Estructura flagelar (filamento-gancho-cuerpo basal) de *E. coli* y *S. enterica*. b) Detalles del cuerpo basal y estructuras asociadas (complejos del *switch* y Mot) (Modificada de Macnab, 1996).

El filamento está conectado al gancho (FlgE) a través de las proteínas FlgK (HAP1) y FlgL (HAP3) y éste, a su vez, se ancla al cuerpo basal. Esta última estructura consta de un eje proximal, formado por las proteínas FlgB, FlgC y FlgF, que atraviesa el espacio periplásmico. Los anillos P y L se localizan en la pared y en la membrana

externa, respectivamente. El eje atraviesa estos anillos y se forma el eje distal, formado por la proteína FlgG (Figura 4b). En la membrana citoplasmática se localiza el anillo MS, el cual está formado por la proteína FliF y sirve como base para la formación de la estructura flagelar. La proteína FliE también es componente del cuerpo basal y constituye la zona de unión entre el anillo MS y el eje, actuando posiblemente como un adaptador estructural entre ambas estructuras que podría facilitar la translocación de las proteínas del eje (Minamino *et al.*, 2000).

La rotación del filamento se lleva a cabo por un motor embebido en la membrana celular, que consiste en un rotor y un estator. El anillo MS constituye el andamiaje para ensamblar las proteínas que forman la parte activa del rotor en la cara citoplasmática del mismo. Alrededor de la base del anillo MS, las proteínas FliG, FliM y FliN forman el anillo C (o complejo del *switch*) que rota con el paso de los iones que se mueven a través del estator e interactúan, quizás electrostáticamente, con los grupos conservados de la proteína FliG (Zhou *et al.*, 1998). En enterobacterias, el anillo C regula la velocidad y la dirección de rotación del flagelo (DeRosier, 1998). El estator está compuesto por un anillo de ~8 repeticiones del complejo transmembranal MotA-MotB; el control del *switch* depende del sistema quimiotáctico citoplasmático.

La estructura flagelar se ensambla desde la superficie celular hacia el extremo distal. Los componentes externos a la célula se exportan desde el citoplasma a través del canal central del flagelo en crecimiento (Namba *et al.*, 1989; Macnab, 2000). El ensamblaje ocurre en diferentes etapas: las proteínas asociadas a la membrana (excepto las Mot) son las primeras estructuras en ser adicionadas. Las proteínas FlhA, FlhB, FliH, FliI, FliP, FliO, FliQ y FliR forman el aparato de exportación del tipo III que parece residir en el centro del anillo MS (Minamino & Macnab, 1999). Este tipo de sistemas de exportación, cuyos componentes se localizan en la membrana interna,

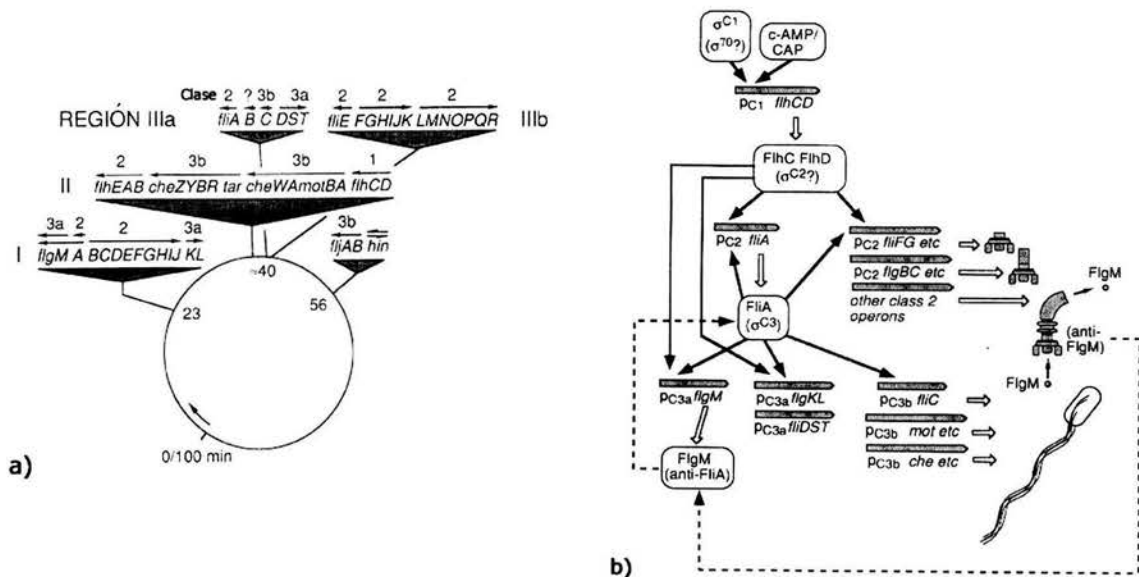
es independiente de la vía *sec* de secreción de proteínas; es decir, las proteínas secretadas por el sistema tipo III no muestran secuencias peptídicas que puedan funcionar como señales de secreción. FliI -uno de los componentes del sistema flagelar de exportación- se une a la flagelina y a las proteínas del gancho, tiene actividad de ATPasa y podría ser una “puerta” selectiva para la translocación de proteínas desde el citoplasma al canal de exportación. Otro componente de este posible “sistema de puerta” es FliK, que podría controlar la longitud del gancho regulando la entrada de substratos en la ruta de exportación o midiendo directamente la longitud del gancho como una "regla molecular" (Aizawa, 2000). El estado final de ensamblaje involucra las proteínas MotA y MotB que se insertan en la membrana después de que el resto de la estructura ha sido ensamblada, permitiendo la rotación del flagelo.

**Expresión de los genes flagelares.** La expresión de los genes involucrados en la síntesis, ensamblaje y función del flagelo ha sido estudiada principalmente en *E. coli* y *S. enterica*; en estas bacterias se han identificado más de 50 genes involucrados en la formación de dicha estructura. Los productos de sólo una fracción de estos genes se encuentran en la estructura flagelar final, la mayoría se requiere en el control de la transcripción y el ensamblaje.

Los genes flagelares de motilidad y de quimiotaxis se encuentran organizados en el cromosoma en forma de *clusters* o agrupaciones continuas conocidas como regiones flagelares I, II, IIIa y IIIb (Figura 5a) (Macnab, 1996). Con base en su expresión, los operones flagelares se organizan a manera de jerarquía en un regulón de tres clases (Figura 5b).

La clase 1 contiene sólo al operón maestro *flhDC*, que es activado por el complejo cAMP-CAP a través del sistema de represión catabólica. Los productos de

*FlhDC* son indispensables en la expresión de los otros genes del regulón flagelar, ya que el complejo FlhD/FlhC actúa como heterotetrámero para activar la transcripción de los genes de clase 2 (Liu & Matsumura, 1995).



**Figura 5.** a) Organización cromosomal de los genes flagelares de *S. enterica*. Se muestran la extensión y la orientación de los operones, así como su clasificación dentro de la jerarquía del regulón flagelar. b) Regulación del sistema genético flagelar: la expresión de los operones recae en una jerarquía de clases. La regulación positiva se indica con flechas negras y la regulación negativa con flechas punteadas;  $P_C$  indica los promotores de las diferentes clases (Modificadas de Macnab, 1996).

Entre los genes de clase 2 se hallan la mayoría de los genes estructurales de los componentes iniciales del ensamblaje del flagelo (*i.e.*, el cuerpo basal, el aparato de exportación y el gancho), y un factor sigma específico de genes flagelares ( $\sigma^{28}$  o FliA) y su factor anti-sigma FlgM. Los operones de las clases 1 y 2 tienen la secuencia consenso específica **GCCGATAA** en la región -10 del promotor y son reconocidos por el factor  $\sigma^{70}$ , mientras que los de clase 3 tienen la secuencia específica **TAAA** en la región -35; lo que sugiere que la expresión de las clases 1 y 2 puede diferir de la clase

3 (Macnab, 1996). La expresión de los operones de clase 3 es dependiente del factor  $\sigma^{28}$ . La proteína FlgM se asocia al factor  $\sigma^{28}$  e impide la transcripción de sus promotores hasta que se ha formado completamente el gancho (Figura 5b). En este punto, la proteína FlgM se exporta fuera de la célula y, en consecuencia, el factor  $\sigma^{28}$  se asocia con el *core* de la RNA polimerasa para transcribir los genes de clase 3. Los genes de esta última clase codifican para la flagelina (FliC), la proteína de coronamiento (FliD), las proteínas MotA y MotB, así como las proteínas del sistema de quimiotaxis (CheA, CheB, CheR, CheW, CheY y CheZ).

En otras bacterias, los genes flagelares también se expresan siguiendo una jerarquía; sin embargo, en ocasiones ésta es dependiente de otros factores sigma alternativos (por ejemplo  $\sigma^{54}$ ) y muestran puntos de regulación adicionales.

## El factor de transcripción sigma 54

Para iniciar la transcripción, el *core* de la RNA polimerasa (RNAP) de Eubacterias, constituida por las subunidades:  $\beta$ ,  $\beta'$ ,  $\alpha_2$  y  $\omega$ , requiere la asociación transitoria de un factor sigma para formar la holoenzima ( $E\sigma$ ) y efectuar el reconocimiento de las secuencias promotoras (Helmann & Chamberlin, 1988). La mayoría de las bacterias sintetizan diferentes factores  $\sigma$ , que guían y especifican a la RNAP a iniciar la transcripción desde diferentes tipos de promotores, lo que resulta en la oportunidad de mantener la expresión genética basal, así como la regulación en respuesta a estímulos ambientales específicos.

Los factores sigma conocidos se han agrupado en dos familias según la similitud de su secuencia de aminoácidos (Wösten, 1998). La mayoría de los factores  $\sigma$  pertenecen a la familia  $\sigma^{70}$ , mientras que la segunda familia está constituida sólo



por  $\sigma^{54}$ , el producto del gen *rpoN* (Tabla 1). Ambos tipos de proteínas difieren estructural y funcionalmente (Merrick, 1993); sin embargo, ambas se unen a la misma RNAP *core* para producir holoenzimas con diferentes propiedades: el factor  $\sigma^{54}$  le confiere la habilidad de reconocer e iniciar la transcripción en los promotores del tipo -24/-12, cuya secuencia consenso TGGCAC-N<sub>5</sub>-TTGC, contiene dos elementos altamente conservados (*i.e.*, GG y GC) en las posiciones -24 y -12, así como dos o más residuos T que parecen modular la estabilidad del complejo promotor-E $\sigma^{54}$  (Buck & Cannon, 1992; Shingler, 1996; Barrios *et al.*, 1999).

Familia $\sigma^{70}$ (promotores tipo -35/-10)	Ejemplos
Factores $\sigma$ primarios	RpoD ( $\sigma^{70}$ ), SigA
Factores $\sigma$ no esenciales	
factor $\sigma$ de fase estacionaria	RpoS ( $\sigma^{38}$ )
Factores $\sigma$ alternativos	
factores $\sigma$ flagelares	FliA ( $\sigma^{28}$ ), SigD
factores $\sigma$ de función extracitoplasmática (ECF)	SigE ( $\sigma^F$ )
factores $\sigma$ de <i>heat-shock</i>	RpoH ( $\sigma^{32}$ ), SigB ( $\sigma^B$ )
factores $\sigma$ de esporulación	SpoOH ( $\sigma^H$ ), SpoIIAC ( $\sigma^I$ ), SpoIIGB ( $\sigma^G$ ), SpoIIIG ( $\sigma^O$ ), SpoIIIC ( $\sigma^K$ )
Familia $\sigma^{54}$ (promotores tipo -24/-12)	
	RpoN ( $\sigma^N$ ), SigL

Tabla 1. Familias de los factores  $\sigma$  de Eubacteria.

La transcripción mediada por E $\sigma^{70}$  puede ser iniciada espontáneamente en ausencia de proteínas activadoras; por el contrario, E $\sigma^{54}$  forma complejos cerrados estables en el promotor que se isomerizan a complejos abiertos exclusivamente en presencia de proteínas reguladoras de la familia de las EBPs (*enhancer-binding proteins*) (Tabla 2). Estos son los únicos reguladores bacterianos conocidos cuyos sitios de reconocimiento UASs (*upstream activation sequences*) son secuencias

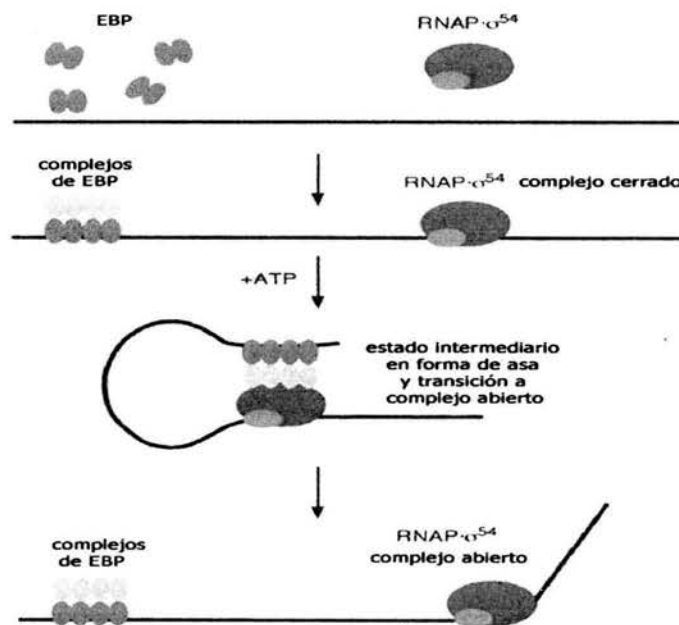
repetidas invertidas (o palindrómicas) y pueden localizarse a cientos de nucleótidos del promotor, por lo que son funcionalmente similares a los *enhancers* de los genes eucariotes (Reitzer & Magasanik, 1986; Morett & Segovia, 1993; Gralla & Collado-Vides, 1996).

Activador	Organismo	Genes activados y su función
NtrC	bacterias entéricas; rizobia	<i>glnA</i> , asimilación de nitrógeno
DctD	<i>Sinorhizobium meliloti</i> ; <i>Rhizobium leguminosarum</i>	<i>dctA</i> , transporte de ácido C <sub>4</sub> -dicarboxílico
FlbD	<i>Caulobacter crescentus</i>	genes <i>fla</i> de nivel 3 y 4, proteínas flagelares del gancho y del filamento
RocR	<i>Bacillus subtilis</i>	operones <i>rocABC</i> & <i>rocDEF</i> ; transporte y utilización de arginina/ornitina
NifA	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ; <i>Azotobacter vinelandii</i> ; <i>Rhodobacter capsulatus</i> ; rizobia	Genes <i>nif</i> , fijación de nitrógeno
XylR	<i>Pseudomonas putida</i>	operón <i>xylS</i> , catabolismo de tolueno y de xileno
DmpR	<i>Pseudomonas sp.</i> CF600	operón <i>dmp</i> , catabolismo de fenol
PspF	<i>Escherichia coli</i>	operón <i>psp</i> , estabilización de células bajo estrés
HrpS	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	genes <i>hrp</i> , determinantes de virulencia

Tabla 2. Algunas proteínas activadoras (EBPs) de E $\sigma^{54}$  de diferentes especies bacterianas (Modificada de Xu & Hoover, 2001).

Los activadores o EBPs consisten de tres dominios funcionales. El dominio N-terminal está involucrado en la recepción de señales; el dominio central (de ~240 residuos de aminoácidos) es responsable de la hidrólisis de ATP y de la activación transcripcional; y el dominio C-terminal que reconoce la UAS. A diferencia del dominio N-terminal, el dominio central es altamente conservado y se subdivide en 7 regiones (*i.e.*, C1-C7) (Osuna *et al.*, 1997). La región *Switch I*, contenida en C3, parece ser el sitio de contacto entre la EBP y E $\sigma^{54}$  (Xu & Hoover, 2001).

Para activar la transcripción, las EBP se unen a los sitios de reconocimiento e interactúan directamente con el complejo cerrado. El resultado es la formación de un asa en el DNA intermedio que facilita esta interacción al incrementar la concentración local de la EBP alrededor de la holoenzima  $E\sigma^{54}$  (Su *et al.*, 1990; Rippe *et al.*, 1997) (Figura 6). La iniciación de la transcripción mediada por  $E\sigma^{54}$  requiere de energía, la cual se obtiene de la hidrólisis de ATP catalizada por las EBP (Popham *et al.*, 1989; Wedel & Kustu, 1995); un buen ejemplo es la proteína activadora NtrC de *E. coli*, cuya forma fosforilada tiene actividad de ATPasa (Weiss *et al.*, 1991). Una vez formado el complejo abierto, la EBP ya no se requiere para mantenerlo ni para iniciar la transcripción (Popham *et al.*, 1989).



**Figura 6.** Proceso de activación de la transcripción por  $E\sigma^{54}$ . El complejo cerrado se forma en el promotor en ausencia de la proteína activadora (EBP). En presencia de ATP, el oligómero de EBP interactúa simultáneamente con la UAS y el complejo cerrado  $E\sigma^{54}$  formando un asa en el DNA intermedio, y cataliza la transición a complejo abierto; esta isomerización es acompañada por un cambio en el ángulo de la curvatura del DNA promotor (Popham *et al.*, 1989; Rippe *et al.*, 1997) (Modificada de Rippe *et al.*, 1997).

Los factores  $\sigma$  contienen múltiples dominios que desempeñan distintas actividades, entre ellas el reconocimiento del promotor y la regulación en la iniciación de la transcripción. Por ejemplo, la proteína  $\sigma^{54}$  por sí sola se une específicamente al DNA y es responsable de muchos de los contactos entre la RNAP y el promotor (Buck & Cannon, 1992). El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de  $\sigma^{54}$  identificada en diferentes organismos indica que la proteína puede dividirse en tres regiones (Merrick, 1993) (Figura 7).

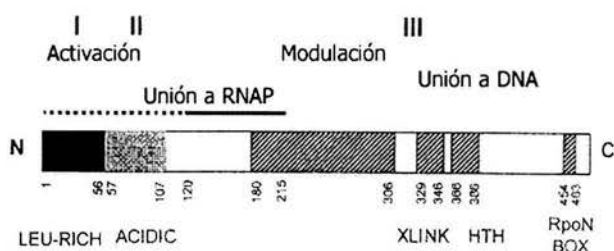


Figura 7. Organización de los dominios de la proteína  $\sigma^{54}$  de *E. coli* (Modificada de Buck *et al.*, 2000).

La región I comprende el dominio N-terminal y está formada por un segmento de ~50 aminoácidos, rico en residuos de glutamina y de leucina. Esta región está implicada en la interacción con la proteína activadora: inhibe la isomerización del complejo cerrado y la iniciación de la transcripción previas a la activación, y estimula la iniciación en respuesta a la activación (Sasse-Dwight & Gralla, 1990; Cannon *et al.*, 1999; Kelly & Hoover, 2000). La región II es ácida en la mayoría de las bacterias, y promueve la transición del complejo cerrado al abierto (Buck *et al.*, 2000). Las zonas de interacción de  $\sigma^{54}$  con el DNA se localizan en el extremo N-terminal de la región III; y en el extremo C-terminal de la proteína, donde se hallan dos motivos altamente conservados: (i) un motivo hélice-vuelta-hélice (HTH, *helix-turn-helix*) implicado en el

reconocimiento de la región -12 del promotor y, (ii) el dominio RpoN-box, que es una secuencia altamente conservada de 10 aminoácidos, y se piensa que puede estar involucrada en el reconocimiento de la secuencia -24 del promotor (Taylor *et al.*, 1996).

Las regiones I y III de  $\sigma^{54}$  interactúan con el activador para la formación del complejo abierto. A pesar de estar separadas por casi 300 aminoácidos, parecen ocupar posiciones cercanas con respecto a la RNAP y el elemento -12 (GC) del promotor; este par de bases afecta positivamente la habilidad del activador para formar complejos abiertos (Guo *et al.*, 1999; Wigneshweraraj *et al.*, 2001). La isomerización del complejo cerrado ocurre a través de interacciones de los nucleótidos de ambas cadenas de la secuencia -12 con las secuencias de la región I, mismas que cambian en respuesta a la interacción con el activador y a la hidrólisis de ATP (Cannon *et al.*, 2000).

### El sistema genético flagelar de *Rhodobacter sphaeroides*

La especie *Rhodobacter sphaeroides* pertenece al subgrupo- $\alpha$  de las bacterias, caracterizado por un alto contenido de G+C en su DNA (>60%) y que incluye especies distribuidas en un amplio rango de ambientes naturales (*Agrobacterium tumefaciens*, *Azospirillum brasilense*, *Caulobacter crescentus* y *Sinorhizobium meliloti*, por ejemplo). *R. sphaeroides* es una bacteria móvil, quimiotáctica, capaz de crecer y dividirse en una gran variedad de condiciones, incluyendo aerobiosis y anaerobiosis. A diferencia de las bacterias entéricas, muchos miembros de este subgrupo tienen motores flagelares que rotan en una sola dirección. Esta especie tiene un solo flagelo subpolar que rota sólo en dirección CW (Armitage & Macnab, 1987), aunque se ha encontrado una variante espontánea de *R. sphaeroides* WS8 cuyo

flagelo rota CCW (Packer & Armitage, 1993). Los cambios en la dirección del nado son dirigidos por movimientos Brownianos durante los eventos de paro en la rotación del flagelo; cabe mencionar que durante estos eventos de paro, el  $\Delta\rho$  permanece constante (Armitage & Macnab, 1987). El paro en la rotación resulta en la relajación del filamento flagelar desde la forma normal, con amplitud pequeña y longitud de onda larga usada en la propulsión, a una forma enrollada, con amplitud de onda grande y longitud de onda corta (Figura 1). Además de la quimiotaxis, ésta y otras especies presentan quimioquinesis o incremento en la velocidad de nado en respuesta al aumento de concentración de algunos compuestos, usualmente ácidos orgánicos (Packer & Armitage, 1994).

Hasta el momento no se conoce con precisión la señal que controla el nado de *R. sphaeroides*; sin embargo, han sido identificados algunos genes homólogos que codifican para las MCPs. Dos de éstos, *tlpA* y *tlpB*, se hallan río arriba de uno los operones quimiotácticos (Ward *et al.*, 1995). La organización de los genes quimiotácticos de las especies del subgrupo- $\alpha$  estudiados hasta el momento es muy similar entre ellas, pero diferente a la de *E. coli*. En estas bacterias se han hallado al menos cinco genes *cheY*, pero el gen *cheZ* está ausente. *R. sphaeroides* tiene al menos dos *clusters* funcionales e independientes de genes que codifican para homólogos de los genes de motilidad y quimiotaxis de bacterias entéricas, con al menos dos copias de *cheA* y tres de *cheY* (Armitage & Schmitt, 1997).

Aunque no se conoce con exactitud cómo se lleva a cabo la expresión del sistema genético flagelar de *R. sphaeroides*, se sabe que ésta presenta un esquema regulatorio diferente al de las bacterias entéricas. Recientemente se han caracterizado algunos de los componentes estructurales del flagelo; en una de las clonas obtenidas en el laboratorio, se identificaron ocho marcos abiertos de lectura que presentaron

homología con las proteínas flagelares FliL, FliM, FliN, FliO, FliP, FliQ, FliR y FlhB presentes en diferentes especies bacterianas (García, *et al.*, 1998). El estudio que permitió caracterizar este *cluster* flagelar también sugirió la presencia de un promotor río abajo de *fliN*, localizado en la región intercistronica *fliN-fliO* (Figura 8) (García *et al.*, 1998).

Posteriormente, la funcionalidad de este promotor (*fliOp*) fue comprobada a través de un estudio de mutagénesis dirigida; éste es reconocido por  $E\sigma^{54}$ , su secuencia -24/-12 es GGCACGGATGTTGCA, y es responsable de la expresión de los genes *fliO*, *fliP*, *fliQ*, *fliR* y *flhB*. Es importante destacar que los genes *flgB*, *fliK* y *motA* también presentan secuencias promotoras dependientes de  $E\sigma^{54}$  (Poggio *et al.*, 2000).

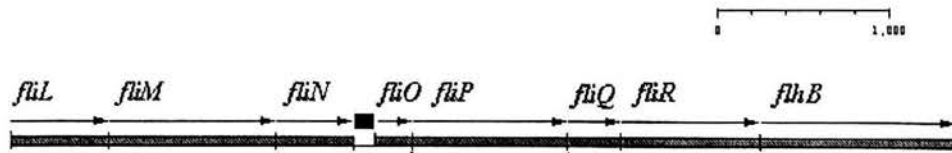


Figura 8. Organización del *cluster* flagelar de *fliL-FlhB* de *R. sphaeroides*. Las flechas indican la dirección de la transcripción; el rectángulo negro refiere al promotor *fliOp* (Modificada de García *et al.*, 1998).

La actividad del promotor *fliOp* y la expresión del gen *fliM* han mostrado ser insensibles a la presencia de otras mutaciones en los genes flagelares *fliR*, *fliM* y *flgE*; lo que sugiere la pertenencia de todos estos genes a la misma clase transcripcional (Poggio *et al.*, 2000).

Es notable que la expresión de los genes flagelares de *R. sphaeroides*, cuyos productos están involucrados en el ensamblaje del cuerpo basal, del *switch*, y del gancho, es dependiente de  $E\sigma^{54}$ , como ocurre en la formación del eje y del gancho en *Caulobacter crescentus* (Wu & Newton, 1997; Poggio *et al.*, 2000). Sin embargo, la región reguladora de *fliC* es dependiente de  $E\sigma^{28}$ , como ocurre con la transcripción de los genes de clase 3 en las bacterias entéricas (Rueda, 2001). Los datos anteriores sugieren que el sistema genético flagelar de *R. sphaeroides* combina características de ambos sistemas; asimismo, también favorecen la idea de que los genes flagelares de esta especie podrían expresarse a través de una jerarquía en la que los genes de clase 2 dependen de  $E\sigma^{54}$  (cuyas proteínas reguladoras corresponderían a la clase 1, ver adelante) y los genes de clase 3 serían dependientes de  $E\sigma^{28}$  (Poggio *et al.*, 2000). En el caso particular del operón *fliOPQRflhB*, existe evidencia provista de estudios de mutagénesis dirigida que indica que el promotor *fliOp* es dependiente de la RNAP asociada con el factor  $\sigma^{54}$ . De acuerdo con el conocimiento sobre el mecanismo de activación por este factor de transcripción, es posible proponer la existencia de una proteína activadora (EBP) así como su sitio de reconocimiento río arriba del promotor *fliOp*.



## Objetivos

- 1 Identificar la UAS en la región activadora del promotor *fliOp*.
- 2 Caracterizar la interacción entre la región activadora y su posible EBP.
  - 2.1 Determinar el efecto sobre la funcionalidad del promotor tras la inserción de 4 nucleótidos en la región de DNA ubicada entre la UAS y el promotor *fliOp*.

## Materiales y métodos

### Cepas bacterianas

#### *Escherichia coli*:

JM103:  $\Delta(lac-pro)$ , *thi*, *strA*, *supE*, *endA*, *sbcB*, *hsdR*<sup>-</sup>, F'*tra D36*, *proAB*, *lacP*, Z  $\Delta M15$  (Vieira & Messing, 1982).

S17-1: *thi*, *pro*, *hsdR*<sup>-</sup>, *hsdM*<sup>+</sup>, *recA*, RP4 2-Tc::Mu-Km::Tn7(Tp<sup>r</sup>/Sm<sup>r</sup>) (Simon *et al.*, 1983).

CJ236: *dut*, *ung*<sup>+</sup> F' (Ausubel *et al.*, 1989).

#### *Rhodobacter sphaeroides*:

WS8N: cepa silvestre con resistencia espontánea a ácido nalidixico.

WS8/pProm: cepa WS8N transformada con el plásmido pRK415, en el cual se clonaron 391 pares de bases (pb), desde -254 hasta +137, que incluyen al promotor *fliOp* y su región activadora, fusionado con el cassette *uidA2-aadA* río abajo de dicho promotor.

WS8-IKan: WS8 *actI* $\Delta$ ::Kan

WS8-IIKan: WS8 *actII* $\Delta$ ::Kan

### Plásmidos

pTZ19R: fagémido multifuncional de ~2870 pb, con orígenes de replicación f1 y ColE1; *lacZ*, Amp<sup>r</sup> y sitio múltiple de clonación (MCS) de pUC19.

pTZ19R*ins*: pTZ19R que contiene el promotor *fliOp* y su secuencia activadora en un fragmento de 391 pb.

pRK415: derivado de pRK404, con un MCS modificado, Mob<sup>+</sup>, Tc<sup>r</sup>, *oriT*, *lac*  $\Delta\alpha$  IncP, RK2 *oriV* (promotor *lac*) (Keen *et al.*, 1988).

pWM5: *oriColE1*, contiene el cassette *uidA2-aadA*, que codifican las enzimas  $\beta$ -glucuronidasa y la aminoglicósido-3-adeniltransferasa (Sp<sup>r</sup>), respectivamente (Metcalf & Wanner, 1993).

### Oligonucleótidos

$\Delta 1$	5' CTA GAG CTC GGT GGT GAT GGT GGG CG
$\Delta 2$	5' CTA GAG CTC GCC GAA AGC CTC TGA CG
$\Delta 3$	5' CTA GAG CTC GCG TCC GCC TGC GGA TC
$\Delta 4$	5' CTA GAG CTC AGC GGT TCG GCA TCC GCT TCG
$\Delta 5$	5' CTA GAG CTC TTC GGC CAG ATC ATC GAG
Prom2	5' TCC CCC GGG CTG GCG AAG CGC GAA ATG
Ret1	5' GAG GTA CCG CAG GCG GAC GCG C
UPPROM	5' GCC GCC CGC CAG CGT GAG GAT C

### Condiciones de cultivo

Las cepas JM103 y S17-1 de *Escherichia coli* siempre se cultivaron aeróbicamente [agitación a 300 revoluciones por minuto (rpm)] a 37°C en medio Luria-Bertani (LB) (10 g bacto triptona, 5 g extracto de levadura, 10 g NaCl por litro). La cepa CJ236 se creció en medio TY 2X (16 g bacto triptona, 10 g extracto de levadura, 5 g NaCl por litro).

Las células de *Rhodobacter sphaeroides* se cultivaron en medio mínimo de succinato (Sistrom, 1960). Las condiciones de crecimiento heterotrófico consistieron en cultivos con agitación vigorosa (300 rpm), a 30°C en la oscuridad.

Cuando se requirió, se adicionaron antibióticos en las siguientes concentraciones: para *E. coli* ampicilina 100 µg/mL, tetraciclina 25 µg/mL, kanamicina 50 µg/mL y espectinomicina 50 µg/mL. Para *R. sphaeroides*, ácido nalidíxico 25 µg/mL, tetraciclina 1 µg/mL y espectinomicina 50 µg/mL.

## Métodos genéticos

**Transformación de *Escherichia coli* por el método de cloruro de calcio (Cohen *et al.*, 1972)**

Se prepara un cultivo de 10 mL de LB de la cepa deseada. Cuando éste alcanza la fase exponencial ( $D.O_{600} \sim 0.5$ ) se incuba en hielo por 10 minutos. Las células se colectan por centrifugación a 4 Krpm por 5 minutos a 4°C, se resuspenden cuidadosamente en lo que queda de medio y se agregan 5 mL de CaCl<sub>2</sub> 100 mM para incubarlo en hielo por 20 minutos. Tras una nueva centrifugación, las células se resuspenden en 600 µL de CaCl<sub>2</sub> 100 mM y se incuban en hielo por 1 hora. Una alícuota (200 µL) de estas células se transfiere a un tubo de microcentrífuga y se agregan 20-50 ng de plásmido. Después de incubarlo en hielo por 30 minutos se da un choque térmico (42°C) por 2 minutos y se regresa al hielo por otros 2 minutos. Se añaden 800 µL de LB y se incuban a 37°C por 20 minutos. Las células se colectan y platean en medio selectivo.

**Conjugación biparental (Donohue & Kaplan, 1991)**

A partir de cultivos de toda la noche de las cepas *R. sphaeroides* WS8N y de *E. coli* S17-1 (con el plásmido donador pRK415 que contiene la inserción de interés), se preparan subcultivos de 10 mL de medio.

En la fase exponencial se colectan las células de 500 µL de cultivo. Cada paquete celular se lava en 500 µL de medio LB fresco y se resuspenden en ~50 µL de

LB. Las células se mezclan en un tubo, posteriormente se colocan en un filtro de nitrocelulosa (de ~1.5 x 1.5 mm, con poros de 0.45  $\mu\text{m}$ ) colocado previamente sobre LB sólido semiseco y se incuban a 30°C por 6 horas. Las células se lavan del filtro en un tubo de microcentrífuga con 1 mL de LB y se colectan por centrifugación para platearlas en medio selectivo e incubarlas a 30°C por ~3 días.

## Métodos de biología molecular

### Amplificación de DNA por el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*)

Las reacciones se llevaron a cabo en 50 o en 100  $\mu\text{L}$  de volumen total con concentraciones finales de: ~50 ng de templado (plásmido pTZ19R*ins*), buffer para PCR 1X, 260  $\mu\text{M}$  dNTPs, 10% DMSO (Sigma), 2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 100 pmoles de cada oligonucleótido (*forward* y *reverse*) y 2.5 U enzima *Taq* Platinum High Fidelity (Gibco BRL).

Los fragmentos de DNA marcados radiactivamente, se sintetizaron conservando las concentraciones excepto la de los dNTPs, cuya concentración final fue de 130  $\mu\text{M}$  dAGT, 26  $\mu\text{M}$  dCTP; además, se agregaron 5  $\mu\text{L}$  de dCTP[ $\alpha\text{-P}^{32}$ ] (3,000 Ci/mmol).

Las mezclas se incubaron en un termociclador y, después del paso inicial de desnaturalización a 94°C por 1 minuto, el DNA se amplificó en 30 ciclos con los siguientes pasos: 94°C por 30 segundos para desnaturalizar, 55°C por 30 segundos para alinear, 68°C por 40 segundos para polimerizar y, una extensión final de 10 minutos a 68°C.

### Digestión de DNA con enzimas de restricción

Todas las enzimas de restricción utilizadas se adquirieron comercialmente (BioLabs y GIBCO-BRL, principalmente), y se siguieron las condiciones recomendadas por el fabricante para cada enzima.

### Desfosforilación de DNA (Chaconas & Van de Sande, 1980)

En las reacciones de desfosforilación se utilizó la enzima fosfatasa alcalina de camarón (SAP, shrimp alkaline phosphatase; de USB Lab.); la concentración final de la misma en cada reacción dependió del tipo de extremos y concentración de DNA (se siguieron las recomendaciones del fabricante). Las reacciones se llevaron a cabo en buffer Tris-HCl 20 mM pH 8.0, con MgCl<sub>2</sub> 10 mM y 20 µg/mL de DNA en un volumen total de ~50 mL; a 37°C por ≥1 hora. La enzima se inactivó calentándola a 65°C por 15 minutos.

### Ligación de secuencias específicas de DNA en vectores de clonación (Bahl *et al.* 1976)

Las reacciones se llevaron a cabo ligando el vector de clonación con el inserto en una reacción de ~16 horas a 16°C en buffer de ligación, catalizada por la enzima ligasa del fago T4.

Cada reacción de unión de fragmentos de DNA se preparó en un volumen total de 10 µL, con 20-40 ng del vector de clonación y del triple a diez veces de exceso molar del DNA a insertar, buffer de ligación 1X y 1 U de enzima.

### Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa

Para lograr la extracción y purificación de fragmentos de DNA se utilizó el *kit* de extracción QIAEX II de QIAGEN. El procedimiento se llevó a cabo conforme a las instrucciones del fabricante.

### **Purificación de cadena sencilla para secuenciación (Schreir & Cortese, 1979)**

Se prepara un cultivo de 10 mL de medio selectivo LB de la cepa JM103 transformada con el pTZ19R con la inserción de interés, y a D.O.<sub>600</sub> ~0.5 se agregan  $1 \times 10^5$  fagos M13 K07 a 2 mL del cultivo e incuba 1 hora en agitación a 37°C. Con 200  $\mu$ L de este cultivo se inoculan 6 mL de LB con kanamicina y se incuba toda la noche.

Al día siguiente se centrifuga el cultivo y se reúne el sobrenadante en cuatro tubos. A cada uno se les agregan 250  $\mu$ L de polientilenglicol (20% PEG 8000, 2.5M NaCl), se mezcla cuidadosamente e incuba por 30 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar durante 15 minutos a 14 Krpm y eliminar completamente el sobrenadante. Resuspender cada pastilla en 100  $\mu$ L de agua. Hacer una extracción con  $\frac{1}{2}$  volumen de fenol (equilibrado con Tris-Cl, pH 8), una con 1 volumen de fenol:cloroformo y una tercer extracción con 1 volumen de cloroformo.

Las cadenas sencillas de DNA se precipitan con  $\frac{1}{10}$  de volumen de acetato de sodio (3 M, pH 4.8) y 2 volúmenes de etanol absoluto. Después se incuba la mezcla por 30 minutos en hielo seco y se centrifuga a 14 Krpm por 30 minutos a 4°C. La pastilla se resuspende en ~25  $\mu$ L de agua, y se toman 3  $\mu$ L para correr en un gel de agarosa al 1%. Asimismo, se cuantifica el DNA a una densidad óptica de 260 nm.

### **Secuenciación de DNA por el método de terminación de cadena (Sanger *et al.*, 1977)**

Las cadenas sencillas se utilizan como templado de cada reacción de secuenciación. Las reacciones de alineación se prepararon como sigue: en un volumen final de 13  $\mu$ L de agua, se alinean los templados (0.5-1.0 pmol) con 0.5 pmol de primer reverse y 2  $\mu$ L de buffer de alineación 5X (200 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 mM NaCl). La reacción se incuba a 65°C por 3 minutos y se deja enfriar a temperatura

ambiente. Esta reacción de alineación se agrega a la mezcla: 1  $\mu\text{L}$  de dATP, 1  $\mu\text{L}$  dTTP, 1  $\mu\text{L}$  de 7-deaza-dGTP (todos en una concentración 3  $\mu\text{M}$ ), 0.5  $\mu\text{L}$  de dCTP[ $\alpha$ - $^{35}\text{S}$ ] (3 000 Ci/mol) y 2  $\mu\text{L}$  de termosecuensasa (del *kit Thermosequensase Amersham*), y se incuba a 45°C por 5 minutos.

Simultáneamente se preparan las mezclas de terminación: 150  $\mu\text{M}$  de cada dATP, dCTP, dTTP, 7-deaza-dGTP, y 1.5  $\mu\text{M}$  de ddGTP para la mezcla ddG, 1.5  $\mu\text{M}$  de ddCTP para la mezcla ddC, 1.5  $\mu\text{M}$  ddATP para la mezcla ddA y 1.5  $\mu\text{M}$  de ddTTP para la mezcla ddT. A cada una de éstas se agregan 4  $\mu\text{L}$  de la reacción y se incuba a 72°C por 10 minutos. Las reacciones se detienen agregando 4  $\mu\text{L}$  de la solución de terminación (95% formamida, 20 mM EDTA, 0.05% azul de bromofenol, 0.05% xilen-cianol FF).

Para cargar el gel de secuencia, las muestras se calientan a 75°C por 7 minutos y se cargan  $\sim 3 \mu\text{L}$  en cada pozo. El gel se prepara con acrilamida al 5% y 8 M de urea; se corre a 40 watts por  $\sim 9$  horas y se deja secar a 60°C durante toda la noche; se expone sobre una placa Kodak X-OMAT K durante  $\sim 72$  horas, se revela y se lee la secuencia.

### **Purificación de plásmidos por el método de minipreparaciones hervidas (Holmes & Quingley, 1981)**

Inocular 3 mL de medio selectivo con una colonia de *E. coli* e incubar el cultivo toda la noche a 37°C. Colectar las células de 1.5 mL de cultivo por centrifugación; el paquete celular se resuspende en lo que queda de medio después de decantar y se agregan 300  $\mu\text{L}$  de STET (8% sacarosa, 5% tritón, 50 mM EDTA pH 8.0, 50 mM Tris-HCl pH8.0) y 30  $\mu\text{L}$  de lisozima (10 mg/mL). La mezcla se agita vigorosamente por 2 segundos, se hierve 45 segundos exactamente y se centrifuga a temperatura



ambiente por 12 minutos a ~12 Krpm. Los plásmidos se precipitan agregando 300  $\mu\text{L}$  de isopropanol al sobrenadante y centrifugando a 14 Krpm por 30 minutos en frío. La pastilla se lava con etanol al 70% y se seca al vacío durante 10 minutos. Se resuspende en 30  $\mu\text{L}$  de agua y se utilizan 3  $\mu\text{L}$  para analizar en un gel de agarosa al 1%.

### **Purificación de plásmidos por columna de QIAGEN**

Este procedimiento se basa en la lisis alcalina (Birnboim, 1983), seguido de la unión de los plásmidos a la resina de intercambio aniónico de la columna QIAGEN en condiciones apropiadas de pH y de concentraciones de sales. El procedimiento se lleva a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **Retardo de la movilidad electroforética (Ausubel *et al.*, 1989)**

Para llevar a cabo los retardos de los complejos DNA-proteína se preparan extractos totales de proteínas; para ello, las células de un cultivo de 10 mL en fase exponencial se colectan por centrifugación a 4°C, se resuspenden en 150  $\mu\text{L}$  de buffer de unión (12 mM HEPES pH 7.9, 12% glicerol, 0.5 mM EDTA, 1mM DTT), y se lisan por sonicación (Dumay *et al.*, 1999). La concentración de proteína se determina por el método de Bradford (ver adelante). Los fragmentos de DNA (dCTP[ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]) que van a ser utilizados como sonada se sintetizan por PCR.

La sonda de DNA marcado radiactivamente (~80,000 cpm/ $\mu\text{L}$ ) se incuba (30°C, 30 minutos) con las cantidades indicadas de extracto de proteína (ver Resultados) y BSA a concentración final 1 M en un volumen total de 20  $\mu\text{L}$  en buffer de unión. Las muestras se corren por 3 horas a voltaje constante de 100 V en geles de poliacrilamida al 6% (30:0.8 acril:bisacrilamida) y glicerol al 2.5% en buffer TBE (89 mM Tris base, 89 mM ácido bórico, EDTA 2 mM pH 8). Los geles se exponen en una placa Kodak X-OMAT K por ~6 horas antes de revelar.



### Mutagénesis dirigida (Kunkel, 1985)

El templado de DNA uracilado se obtiene propagando el fagémido de interés en la cepa CJ236. La cadena sencilla del fagémido se purifica a partir de un cultivo en medio TY 2X. El oligonucleótido que lleva el cambio deseado se fosforila en una reacción de un volumen total de 30  $\mu$ L con 4.5 U de T4 kinasa con concentraciones finales de 6.6 picomoles del oligonucleótido, 100 mM Tris·Cl pH 8, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT (ditiotretitol), 430 nM ATP, a 37°C por 45 minutos. La alineación se lleva a cabo en una reacción con concentraciones finales de 0.01 picomoles de cadena sencilla uracilada, 0.2 picomoles de oligonucleótido fosforilado y buffer de alineación 1X en un volumen total de 20  $\mu$ L. Esta mezcla se incuba a 70°C por 3 minutos y se permite que la temperatura disminuya paulatinamente hasta alcanzar 30°C.

Para llevar a cabo la síntesis de la doble cadena se agregan buffer de síntesis 1X (0.4 mM de cada dNTP, 0.75 mM ATP, 17.5 mM Tris-HCl pH 7.4, 3.75 mM MgCl<sub>2</sub>, 21.5 mM DTT), proteína 32 del bacteriófago T4 (250 ng/ $\mu$ L en la reacción), 1 U de T4 DNA polimerasa y 1 U de T4 ligasa, y se incuba: 5 minutos en hielo, 5 minutos a 25°C y 90 minutos a 37°C; la reacción se termina agregando 1  $\mu$ L de EDTA 250 mM y se analiza por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, y se transforma la cepa JM103 con la mezcla de síntesis.

### Métodos enzimáticos

#### Determinación de la actividad enzimática de la $\beta$ -glucuronidasa (GUS) (Jefferson, 1986)

Se preparan cultivos de las cepas de interés en 10 mL de medio selectivo. Cuando el cultivo se halla en una D.O.<sub>600</sub> ~0.5, las células de 1.5 mL de cultivo se colectan por centrifugación en frío. La pastilla se resuspende en 200  $\mu$ L de buffer de extracción (50

mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 7; 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol; 10 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ; 0.1% Triton X-100). Las células se lisan por sonicación y por centrifugación se separan las proteínas citoplasmáticas de los restos celulares.

El ensayo de la  $\beta$ -glucuronidasa se lleva a cabo en buffer de extracción con 4-metilumbeliferil  $\beta$ -D-glucuronido (1 mM). Las reacciones se incuban a  $37^\circ\text{C}$  en alícuotas de 400  $\mu\text{L}$  de buffer de ensayo precalentado a las que se agregan 100  $\mu\text{L}$  del sobrenadante de la muestra. La reacción se detiene en tres tiempos transfiriendo alícuotas de 100  $\mu\text{L}$  a un tubo con 900  $\mu\text{L}$  de buffer de paro (0.2 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) a temperatura ambiente. Las muestras se miden en un fluorómetro calibrado con una solución blanco de 4-metilumbeliferona (10  $\mu\text{M}$ ), con una longitud de onda de excitación de 365 nm y de emisión de 455 nm.

*Determinación de proteína por el método de Bradford.* Cada reacción se lleva a cabo mezclando 20  $\mu\text{L}$  del extracto con 3 mL de reactivo de Bradford (solución de ensayo de proteínas Bio-Rad Laboratories) diluido con agua (1:5). Después de agitar vigorosamente, cada mezcla se incuba a temperatura ambiente por 10 minutos. Se prepara una curva estándar con muestras de concentración conocida de la proteína albúmina de suero bovino (BSA). Las reacciones se leen en un espectrofotómetro a D.O.<sub>595</sub>.

## Resultados

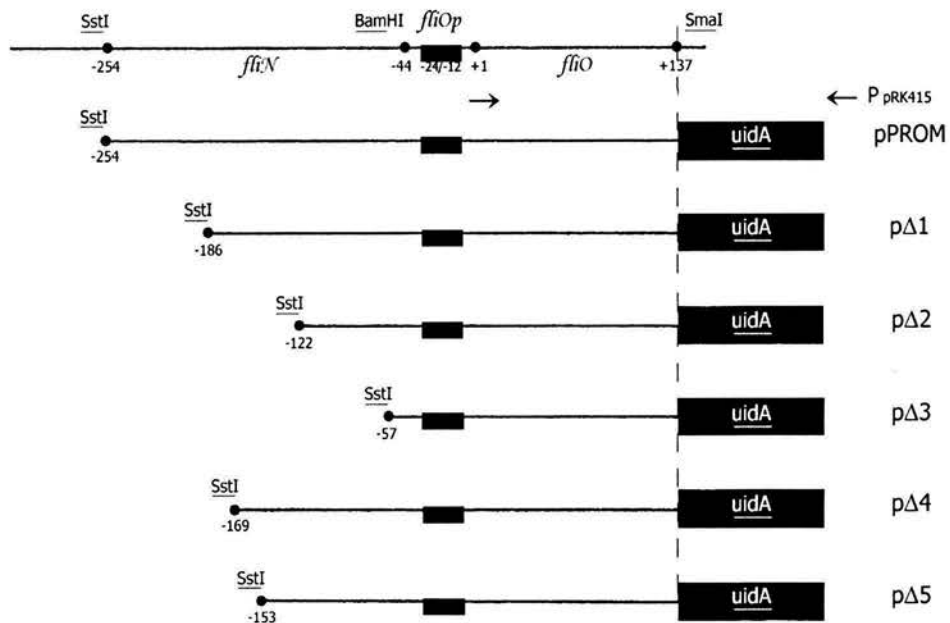
### Localización de la UAS del promotor *fliOp*: efecto de diferentes deleciones en la región activadora

El reconocimiento del promotor flagelar *fliOp* de *Rhodobacter sphaeroides* es mediado por  $E\sigma^{54}$ , y de su funcionalidad depende la expresión del operón flagelar *fliOPQRflhB*. Dado que *fliOp* es un promotor dependiente del factor  $\sigma^{54}$ , debe existir una secuencia activadora en la región río arriba al mismo. Para identificar esta secuencia se llevó a cabo un análisis de deleción a partir de un fragmento de DNA de 391 pares de bases (pb) (pPROM). Esta región de 391 pb comprende 254 pb río arriba del promotor *fliOp*, y una vez fusionada al gen reportero *uidA*, promueve la expresión del mismo a un nivel similar al observado utilizando un fragmento de 1.1 Kb que contiene *fliOp*; lo cual sugiere que en este fragmento de 391 pb se encuentra la información necesaria para la adecuada transcripción a partir de dicho promotor (Poggio *et al.*, 2000).

Inicialmente cada una de las deleciones elimina 68, 132 y 197 pb a partir del extremo distal al promotor *fliOp*. Las deleciones fueron construidas por PCR utilizando oligonucléotidos con sitios creados para su reconocimiento por las enzimas *SstI* y *SmaI* en sus extremos 5' y 3', respectivamente (Figura 9). Los productos sintetizados por PCR:  $\Delta 1$  (-186 a +137),  $\Delta 2$  (-122 a +137) y  $\Delta 3$  (-57 a +137) de 338, 274 y 208 pb, respectivamente, se digirieron para obtener fragmentos de 323, 259 y 194 pb de DNA con extremos *SstI-SmaI* y se ligaron al vector pTZ19R. Posteriormente, el fragmento de 3.8 Kb que contiene los genes '*uidA2-aadA* fue ligado en el sitio *SmaI* ubicado río abajo en cada una de las construcciones, a fin de que la expresión del gen reportero *uidA* (que codifica para la  $\beta$ -glucuronidasa) quedara sujeta al promotor *fliOp* previamente insertado. Cada uno de los fragmentos

que lleva la fusión fue subclonado en el plásmido pRK415 utilizando los sitios *EcoRI*-*XbaI* (Figura 9).

Estas construcciones fueron introducidas por conjugación a *R. sphaeroides* WS8N. La expresión del promotor *fliOp* fue estudiada en el plásmido pRK415.



**Figura 9.** Análisis de deleción de la región activadora de *fliOp*. Representación esquemática de la región 5' río arriba del promotor *fliOp* de WS8N (1<sup>er</sup> línea) y de los fragmentos de DNA fusionados a *uidA*. Las flechas indican la dirección de la transcripción del promotor *fliOp* y del vector pRK415

El efecto que las diferentes deleciones ejercen sobre la expresión del promotor *fliOp* fue medido mediante la actividad de la β-glucuronidasa (GUS) en cada una de las transconjugantes de WS8N. Los ensayos enzimáticos se realizaron al menos tres veces de forma cualitativa, y se realizaron tres ensayos cuantitativos independientes.

En los ensayos cualitativos sólo se observó actividad en la transconjugante WS8/p $\Delta$ 1. Los resultados de los ensayos cuantitativos de actividad específica se muestran en la Figura 10a.

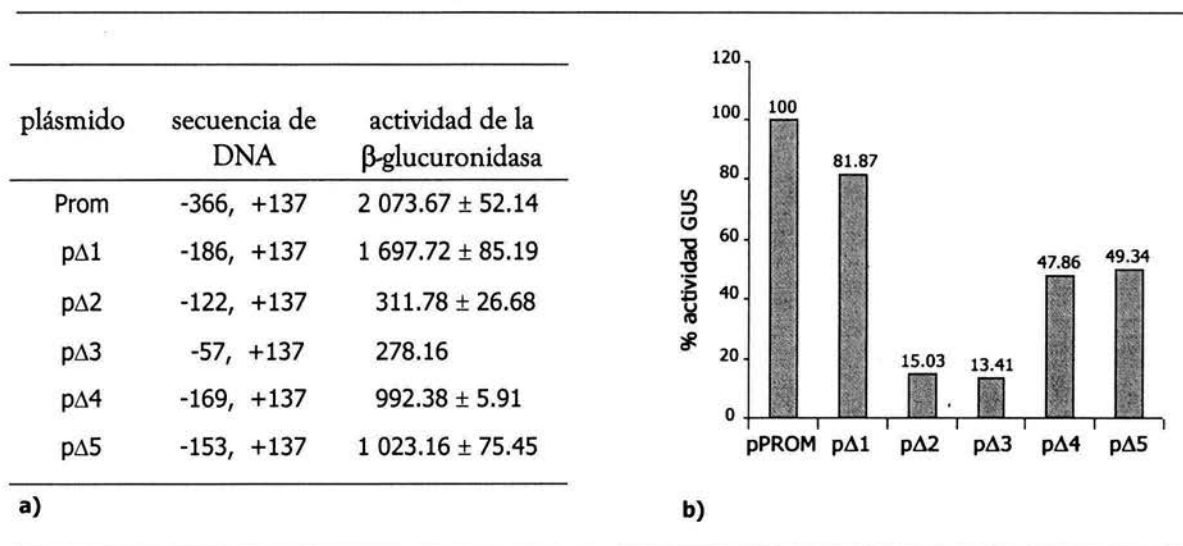


Figura 10. a) Actividad específica de la  $\beta$ -glucuronidasa expresada a partir de las fusiones del promotor *fliOp* con *uidA*. Las actividades específicas están expresadas en pmoles de 4-metilumbeliferona producida por minuto por mg de proteína. b) Actividades específicas expresadas en porcentaje con respecto a la actividad completa del promotor *fliOp* (WS8/pPROM).

La actividad específica de la  $\beta$ -glucuronidasa de estas construcciones representa la actividad del promotor *fliOp* en cada fragmento de DNA. La actividad en WS8/pPROM refiere a la completa expresión del promotor (100%) (Figura 10b). Inicialmente se construyeron las fusiones *fliOp* $\Delta$ 1-*uidA*, *fliOp* $\Delta$ 2-*uidA* y *fliOp* $\Delta$ 3-*uidA*; en éstas se observó que la expresión del promotor es de  $\sim$ 81.87% en la primer deleción; en el plásmido p $\Delta$ 2 la expresión del promotor es de  $\sim$ 15.03%, mientras que en p $\Delta$ 3 la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa se reduce hasta expresar sólo el  $\sim$ 13.41% de la actividad completa del promotor. La diferencia en la expresión del gen reportero entre los plásmidos pProm o p $\Delta$ 1 y, p $\Delta$ 2 o p $\Delta$ 3, sugirió que la UAS podría localizarse entre las deleciones  $\Delta$ 1 y  $\Delta$ 2, en la región de -186 a -122.

Al revisar detalladamente la secuencia comprendida entre los sitios -186 y +137, se encontró una secuencia repetida invertida de 18 nucleótidos (nt) (5' AGCGGTTTCGGCATCCGCT), que podría ser la secuencia de unión (UAS) de la EBP (Figura 11).

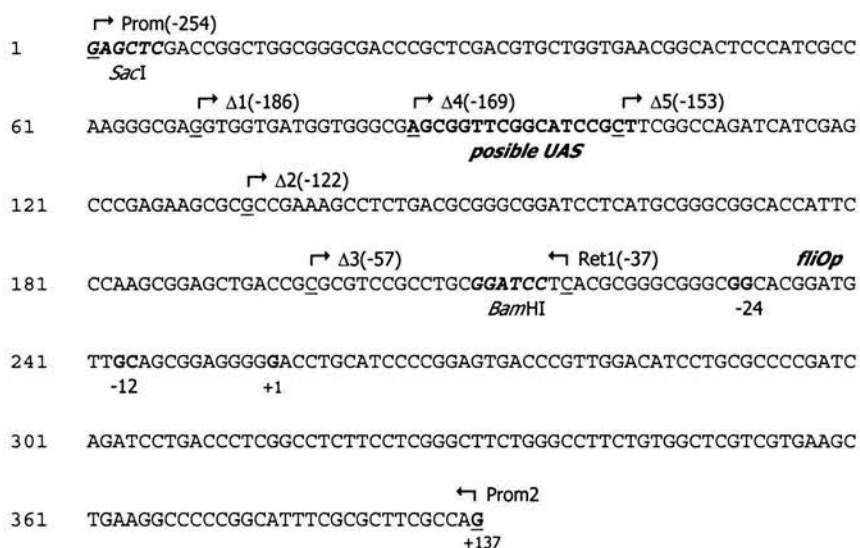


Figura 11. Secuencia de nucleótidos desde -366 hasta +137 con respecto al promotor *fliOp*. La secuencia palindrómica que podría representar la UAS se localiza en la región -169, -152.

Para determinar si la secuencia palindrómica comprendida entre las bases -169 a -152 río arriba de *fliOp* efectivamente se trataba de la UAS, se construyeron otras dos delecciones denominadas  $\Delta 4$  (-169, +137) y  $\Delta 5$  (-153, +137) (Figura 9). Las fusiones se realizaron de la misma manera que las anteriores. La actividad específica de la  $\beta$ -glucuronidasa se muestra en la Figura 10a.

La construcción WS8/p $\Delta 4$  contiene toda la secuencia de la posible UAS mientras que la WS8/p $\Delta 5$  incluye sólo los últimos 2 nt de la misma. En estas dos últimas fusiones, las actividades de la  $\beta$ -glucuronidasa con respecto a la del promotor

silvestre representan un ~47.86% y ~49.34%, respectivamente (Figura 10b). La presencia de 169 y 153 nt río arriba del promotor *fliOp* no es suficiente para la activación transcripcional completa, por lo que es posible que la secuencia palindrómica no represente la UAS funcional. Asimismo, la disminución del ~50% en la actividad del gen reportero, sugiere que la UAS de *fliOp* podría consistir de más de un sitio de reconocimiento.

### Interacción de proteínas con la región activadora del promotor *fliOp* de *Rhodobacter sphaeroides*: retardo de la movilidad electroforética

Para probar que en la región contenida en el fragmento  $\Delta 1$  se localiza la UAS del promotor *fliOp* se llevaron a cabo experimentos de retardo de la movilidad electroforética de los complejos DNA-proteínas en geles de poliacrilamida de baja fuerza iónica. El fragmento  $\Delta 1$ -Ret1 correspondiente a los nucleótidos -186 a -37 fue amplificado por PCR (Figura 11) y utilizado en los ensayos de retardo con los extractos de proteínas de *R. sphaeroides* WS8N.

En la Figura 12 se muestra que la incubación del fragmento  $\Delta 1$ -Ret1 con un extracto total de proteínas de *R. sphaeroides* WS8N causó un cambio en la movilidad electroforética del mismo (líneas 2 y 3). La especificidad de esta unión fue probada mediante experimentos que incluyen el uso de competidores de DNA no marcados. En la línea 4 se observa la competencia del mismo fragmento ( $\Delta 1$ -Ret1) no marcado por las proteínas; y en la línea 5 se observa que con mayor concentración de proteínas la mayoría de las moléculas del fragmento pudieron interaccionar, lo que genera retardo del fragmento marcado. En las líneas 6 y 7 se incluyó el DNA de timo como competidor inespecífico, en este caso el fragmento marcado se hace más visible como fragmento libre. Lo anterior indica que las proteínas del extracto formaron complejos



con el DNA de timo y por ello, la interacción de las proteínas con el fragmento  $\Delta 1$ -Ret1 pueden ser inespecíficas aunque una fracción de proteínas permanece asociada al fragmento marcado, esta última podría representar las interacciones específicas.

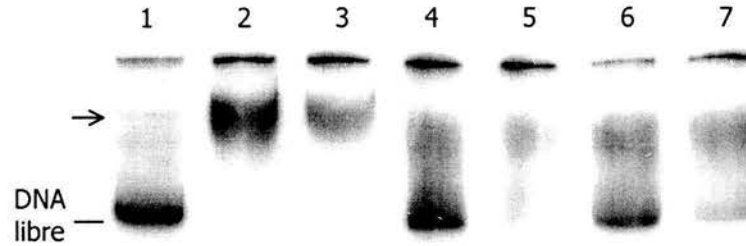
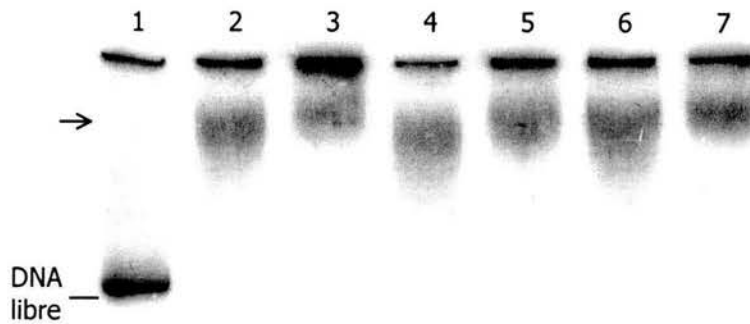


Figura 12. Gel del retardo de la secuencia activadora (-186, -37) del promotor *fliOp* en interacción con las proteínas del extracto de *R. sphaeroides* WS8N. La sonda de DNA marcada  $\Delta 1$ -Ret1(dCTP[ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]) (80,000 cpm) fue incubada sin extracto de proteínas (línea 1); con 20 y 50  $\mu$ g de extracto de proteínas (líneas 2 y 3, respectivamente); con 20 y 50  $\mu$ g de extracto de proteínas previamente incubados con  $\sim$ 70 ng del fragmento  $\Delta 1$ -Ret1 no marcado (líneas 4 y 5, respectivamente); y, con 20 y 50  $\mu$ g de extracto de proteínas previamente incubados con 1  $\mu$ g de DNA de timo (líneas 6 y 7, respectivamente). La flecha indica el retardo de la movilidad electroforética en el gel.

Para detallar más sobre el tipo de interacciones con el fragmento  $\Delta 1$ -Ret1 se prepararon dos extractos de proteínas a partir de cepas diferentes a la silvestre. Para ello se utilizaron las cepas WS8-*actI* $\Delta$ ::Kan y WS8-*actII* $\Delta$ ::Kan, en las que se generaron deleciones en los genes que codifican para dos probables activadores de la expresión los genes flagelares que fueron identificados en el laboratorio. Los productos de los genes *actI* y *actII* son similares a las secuencias de las EBPs.

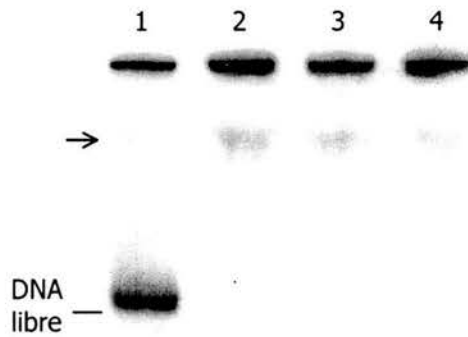
La Figura 13 muestra el gel del retardo de las interacciones entre el fragmento  $\Delta 1$ -Ret1 con las proteínas de los diferentes extractos.



**Figura 13.** Gel del retardo de la secuencia activadora (-186, -37) del promotor *flfOp* en interacción con las proteínas del extracto de *R. sphaeroides*. La sonda de DNA marcada  $\Delta 1$ -Ret1 (dCTP[ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]) (80,000 cpm) fue incubada sin extracto de proteínas (línea 1); con 20 y 50  $\mu$ g de extracto de proteínas de WS8N (líneas 2 y 3, respectivamente); con 20 y 50  $\mu$ g de extracto de proteínas de WS8-IKan (líneas 4 y 5, respectivamente); y con 20 y 50  $\mu$ g de extracto de proteínas de WS8-IIKan (líneas 6 y 7, respectivamente). La flecha indica el del retardo de la movilidad electroforética en el gel.

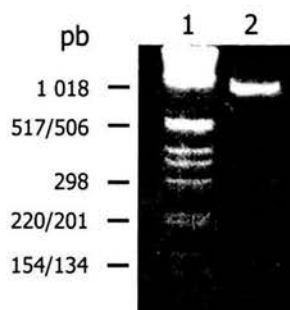
Los retardos observados en este gel muestran las interacciones del fragmento marcado con las proteínas del extracto sin competidores. Los complejos de DNA-proteínas formados en todas las pruebas indican que el fragmento de DNA interactúa con las proteínas del extracto. Para evaluar la especificidad de la interacción se llevó a cabo un último gel en el que se incrementó la concentración de las proteínas del extracto y se utilizó DNA de timo como competidor inespecífico (Figura 14).

Al incrementar la cantidad del extracto de proteínas en estas mezclas se esperaba que se incrementara la concentración de la(s) EBP(s) en el extracto de WS8N que pudiera formar complejos con las moléculas del fragmento marcado  $\Delta 1$ -Ret1, y que esto ocurriera simultáneamente a la formación de complejos de otras proteínas con el competidor inespecífico (DNA timo). Dado que en todos los casos se observa el complejo proteína-DNA, se presume que existen interacciones específicas entre la sonda  $\Delta 1$ -Ret1 y las proteínas en el extracto.



**Figura 14.** Gel del retardo de la secuencia activadora (-186, -37) del promotor *fliOp* en interacción con las proteínas del extracto de *R. sphaeroides*. La sonda de DNA marcada  $\Delta 1$ -Ret1(dCTP[ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]) (80,000 cpm) fue incubada sin extracto de proteínas (línea 1); con 180  $\mu$ g de extracto de proteínas de WS8N (línea 2); con 180  $\mu$ g de extracto de proteínas de WS8-IKan (línea 3); y, con 180  $\mu$ g de extracto de proteínas de WS8-IIKan (línea 4). Las mezclas 2, 3 y 4 fueron previamente incubadas con 1 mg de DNA de tимо. La flecha indica el retardo de la movilidad electroforética en el gel.

Es importante mencionar que el fragmento Prom-Ret1 (Figura 11) presenta una movilidad electroforética anómala; es decir, el tamaño predicho para este fragmento es de 217 pb; sin embargo, su migración en un gel de acrilamida lo ubica en ~1 Kpb (Figura 15); por tal motivo, los experimentos anteriores se realizaron con el fragmento  $\Delta 1$ -Ret1.



**Figura 15.** Marcador X de peso molecular de DNA (Boehringer Mannheim) y fragmento Prom-Ret1 obtenido por PCR (líneas 1 y 2, respectivamente) en un gel de acrilamida al 6%.

## Inserción de nucleótidos en la región activadora: efecto sobre la expresión del promotor *fliOp*

Con el mismo objetivo de verificar la presencia de una UAS en la región río arriba del promotor *fliOp* se llevó a cabo una mutagénesis dirigida para insertar 4 nucleótidos en la posición -91 (Figura 16). La mutagénesis se efectuó en el plásmido pTZ19R*ins*, el cual lleva la región de 254 pb que contiene el promotor *fliOp*. Para la reacción de mutagénesis se utilizó un oligonucleótido que aparee con la secuencia de DNA ubicada de -99 a -82 pero con 4 nucleótidos adicionales en la zona central del oligonucleótido (Figura 16). Posterior a la mutagénesis, los genes *uidA2-aad* se clonaron río debajo de *fliOp*. La fusión *fliOp*mut-*uidA2-aad* que contiene el fragmento mutado se subclonó en el plásmido pRK415. Esta construcción fue introducida por conjugación a *R. sphaeroides* WS8N y la expresión del promotor *fliOp*mut se midió mediante la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa.

---

```

1      GAGCTCGACCGGCTGGCGGGCGACCCGCTCGACGTGCTGGTGAACGGCACTCCCATCGCC
      SacI

61     AAGGGCGAGGTGGTGGTGGGGCGAGCGGTTTCGGCATCCGCTTCGGCCAGATCATCGAG
      posible UAS

      G → Δ2          CGCTG
121    CCCGAGAAGCGCGCCGAAAGCCTCTGACGCGGGCGGATCCTCATGCGGGCGGCACCATTG
      -122          ↑      -91          ↑
181    CCAAGCGGAGCTGACCGCGCTCCGCTGCGGATCCTCACGCGGGCGGGCGGCACGGATG
      BamHI          -24
      fliOp

241    TTGCAGCGGAGGGGG
      -12          +1

```



---

Figura 16. Secuencia de la región activadora de *fliOp*. En la posición -91 se introdujeron 4 nucleótidos a través de mutagénesis dirigida; la T en negritas es substituida por los nucleótidos indicados arriba de la misma. Las flechas indican la región en la que hibridó el oligonucleótido UPPROM (5' GCCGCCCGC CAGCG TGAGGATC).

La actividad específica de la GUS indica que la expresión del promotor *fliOp* es afectada negativamente tras la adición de 4 nt entre la posible UAS, que debe estar

ubicada río arriba del extremo 5' de  $\Delta 2$  y *fliOp* (Tabla 3). Estos resultados sugieren que río arriba de  $\Delta 2$ , es decir, de -186 a -122, efectivamente se encuentra uno o varios sitios de reconocimiento para una EBP, pues al incrementar la distancia por 4 nt, la formación del asa en el DNA intermedio puede generar una interacción inapropiada entre la EBP y  $\sigma^{54}$ .

---

... posible UAS ...		<i>fliOp</i>	plásmido	actividad de la $\beta$ -glucuronidasa		
	-	<b>N<sub>x</sub></b>	-	<b>GG N<sub>10</sub> GC</b>	pPROM	~ 2 000
	-	<b>N<sub>x</sub> + 4 nt</b>	-	<b>GG N<sub>10</sub> GC</b>	pUPPROM	~ 100

---

**Tabla 3.** Efecto en la expresión del promotor por la adición de 4 nt entre la posible UAS y *fliOp*. Las actividades específicas están expresadas en pmoles de 4-metilumbeliferona producida por minuto por mg de proteína. La caja oscura representa la UAS.

## Discusión y conclusiones

La activación de la transcripción -a través de una variedad de mecanismos- es un punto crucial en la regulación de la expresión de genes. Entre estos mecanismos se incluyen cambios estructurales en el DNA por parte de las proteínas activadoras para propiciar su unión con la RNAP holoenzima (Rippe *et al.*, 1997; 1998). Se ha reportado que el sistema de transcripción mediado por  $\sigma^{54}$  responde a estos activadores, cuyos sitios de contacto se ubican -en promedio- en la posición -120 (Reitzer & Magasanik, 1986; Merrick, 1993; Gralla & Collado-Vides, 1996). Los genes sujetos a este tipo de regulación generalmente contienen dos o más sitios de unión para los dímeros de las EBPs, aunque sólo algunos presentan secuencias de alta afinidad para los mismos (Reitzer & Magasanik, 1987; Xu & Hoover, 2001).

En *Caulobacter crescentus* se han descrito secuencias palindrómicas denominadas *ptr* (*flagellar transcription regulation*) con función similar a las UASs que son requeridas para la expresión de los genes flagelares de clase 3, cuya transcripción es dependiente de  $E\sigma^{54}$ . Estudios genéticos han mostrado que la proteína FlbD es esencial para la transcripción de los genes *fla* en promotores dependientes de  $\sigma^{54}$ ; esta proteína es homóloga a NtrC y hace contacto con tres residuos de guanina simétricos y altamente conservados en *ptr1* y *ptr1\** (Benson *et al.*, 1994).

En *Rhodobacter sphaeroides* WS8N, la transcripción de varios genes flagelares es dependiente de  $E\sigma^{54}$ . El objetivo de este trabajo consistió en tratar de identificar las secuencias específicas (UASs) a las que se une la(s) proteína(s) activadora(s) del operón flagelar *fliOPQRflhB*. A través del análisis de diferentes deleciones se identificó una región ubicada entre las deleciones  $\Delta 1$  y  $\Delta 2$  que es necesaria para lograr la expresión del promotor *fliOp*. En esta zona se identificó una secuencia repetida invertida

AGCGGTTTCGGCATCCGCT ubicada en la posición -169 a -151, que podría representar una posible secuencia activadora del promotor *fliOp* (Figura 11). La expresión del promotor en las dos últimas deleciones construidas (*i.e.*,  $\Delta 4$  y  $\Delta 5$ ) muestran que un fragmento que inicia 169 nt río arriba de *fliOp* y que incluye dicho palíndromo no es suficiente para lograr la completa activación de la transcripción en *fliOp*; asimismo, la deleción casi completa (16 nt) de la posible UAS en  $\Delta 5$  también mantiene el nivel de expresión en un  $\sim 50\%$ . Estos resultados no son consistentes con la hipótesis de que el palíndromo pudiera representar la UAS de *fliOp*. En este sentido, es importante recordar que esta especie bacteriana contiene una alta proporción de G+C en su cromosoma; por lo que es probable que la secuencia identificada como la posible UAS sea una secuencia repetida invertida que se forma por la alta frecuencia de estos nucleótidos, sin estar relacionada con la función de activación. Sin embargo, los resultados de las deleciones  $\Delta 1$  y  $\Delta 2$ , en los que la diferencia de 64 pb reduce drásticamente la expresión del promotor *fliOp*, sugieren que la UAS se encuentra en la región -186 a -122 (Figura 10). Dado el conocimiento que se tiene con respecto a los sitios de unión de las EBPs en los que se ha observado que la respuesta de los promotores a la activación puede depender de la calidad y número de sitios de unión (Reitzer & Magasanik, 1986), es posible especular que en el caso de *fliOp* pueda existir más de un sitio para la unión de la EBP, quizás uno ubicado río arriba del límite de  $\Delta 4$ , y el otro río abajo del límite de  $\Delta 5$  pero arriba de  $\Delta 2$ .

La inserción de 4 nucleótidos entre el promotor *fliOp* y la región activadora reduce drásticamente la expresión del mismo (Figura 16, Tabla 3). La adición de nucleótidos entre las regiones activadoras, específicamente entre los sitios de reconocimiento (UASs) y el promotor han sido bien estudiadas en otros promotores dependientes de  $\sigma^{54}$  (Reitzer & Magasanik, 1986; Bageshwar *et al.*, 1998). La activación del promotor *vnfH* de *Azotobacter vinelandii* es mediada por la proteína

VnfA; la expresión de este promotor se reduce por la introducción de casi media vuelta en el DNA (4 nt) entre la UAS y *vnfHp*, pero no se bloquea con la introducción de casi una vuelta completa (10 nt) (Bageshwar *et al.*, 1998). El contacto adecuado que propicia la formación de interacciones específicas entre las regiones del activador y el factor  $\sigma^{54}$  depende de la ubicación de ambos complejos (EBP y  $E\sigma^{54}$ ) en la cara de la hélice del DNA, después de la formación del asa en el DNA intermedio.

Es importante mencionar que la formación del asa en el DNA intermedio entre la UAS y el promotor  $\sigma^{54}$  puede ser favorecida por curvaturas intrínsecas de la secuencia (Bageshwar *et al.*, 1998), lo que aparentemente no ocurre con el fragmento  $\Delta 1$ -Ret1. Sin embargo, el fragmento Prom-Ret1 sí mostró una movilidad electroforética alterada (Figura 15), lo que sugiere que en esta zona el DNA podría adquirir una curvatura intrínseca que favorecería la interacción de la EBP con la holoenzima  $E\sigma^{54}$ . Asimismo, proteínas de unión a DNA, como IHF (*integration host factor*) han sido relacionadas en la promoción de la activación transcripcional mediada por  $E\sigma^{54}$  principalmente en promotores débiles (Dworkin *et al.*, 1998); sin embargo la región activadora del promotor *fliOp* no parece contener secuencias reconocidas por este tipo de proteínas (Poggio *et al.*, 2000).

Para confirmar que existe una secuencia activadora en la región comprendida entre -186 y el promotor, se llevaron a cabo los experimentos de retardo de la movilidad electroforética del fragmento  $\Delta 1$ -Ret1. Los ensayos con competidores de DNA no marcados y una concentración constante del fragmento marcado mostraron que las proteínas de los extractos interactúan con el fragmento  $\Delta 1$ -Ret1. Esta formación de complejos con proteínas se reflejó por la migración lenta de la muestra en el gel (Figura 14).



El reconocimiento de la UAS por los activadores tiene importantes consecuencias porque facilita el ensamblaje de un complejo activador multimérico. El modelo de activación de NtrC propone que esta proteína puede unirse a la UAS pero sólo su forma fosforilada puede activar la transcripción. La proteína NtrC tipo silvestre es fosforilada *in vivo* por la proteína NtrB, lo que favorece la unión a DNA en sus sitios de contacto además de inducir su actividad de ATPasa (Weiss *et al.*, 1991; Rippe *et al.*, 1998). A la fecha no se conoce con precisión el mecanismo por el que opera la proteína activadora del promotor *fliOp*.

Actualmente, en el laboratorio se han identificado dos proteínas (Activador I y Activador II) involucradas en la activación de *fliOp*. Ninguna de estas proteínas presenta sitios de fosforilación en su secuencia y, ambas se requieren para la expresión del operón flagelar *fliOPQRflhB*, de modo que éstas podrían interactuar como un heterodímero (Poggio & Camarena, datos no publicados). Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, es posible suponer que cada una de estas proteínas es capaz de unirse a la UAS (quizás formando homodímeros), como lo sugieren los retardos de la Figura 14. Sin embargo, sólo el heterodímero podría ser funcional para lograr la activación.

En este trabajo se demuestra la existencia de un elemento regulador (una secuencia palíndrome) situado en el fragmento de -186 a -122 río arriba del promotor *fliOp*. El efecto sobre la expresión de *fliOp* tras la inserción de nucleótidos entre el fragmento y el promotor apoyan fuertemente la existencia de dicho elemento regulador. Los ensayos de retardo de la movilidad electroforética representan estudios preliminares en el análisis de la interacción entre las EBPs (Activador I y Activador II) y esta secuencia; experimentos posteriores de retardo o ensayos de *footprinting* con las proteínas puras proporcionarán una idea más clara con respecto a la unión de estas EBPs con el DNA.

## Referencias

- Aizawa, S.I., C.S. Harwood & R.J. Kadner. 2000. Signaling components in bacterial locomotion and sensory reception. *J. Bacteriol.* 182:1459-1471
- Armitage, J.P. 1999. Bacterial tactic responses. *Adv. Microb. Physiol.* 41:229- 289
- Armitage, J.P. & R.M. Macnab. 1987. Unidirectional, intermittent rotation of the flagellum of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* 169:514-518
- Armitage, J.P. & R. Schmitt. 1997. Bacterial chemotaxis: *Rhodobacter sphaeroides* and *Sinorhizobium meliloti*- variations on a theme? *Microbiol.* 143:3671-3682
- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Sedman, J.A. Smith & K. Struhl (ed.). 1989. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, USA
- Bageshwar, U.K., R.M. Raina, N.R. Choudhury & H.K. Das. 1998. Analysis of upstream activation of the *vnfH* promoter of *Azotobacter vinelandii*. *Can. J. Microbiol.* 44:405-415
- Bahl, C.P., K.J. Marians, R.W.J. Slawinsky & S.A. Narang. 1976. A general method for inserting specific DNA sequences. *Gene* 1:81-85
- Barrios, H., B. Valderrama & E. Morett. 1999. Compilation and analysis of  $\sigma^{54}$ -dependent promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* 27:4305-4313
- Benson, A., G. Ramakrishnan, N. Otha, J. Feng, A. J. Ninfa & A. Newton. The *Caulobacter crescentus* FlbD protein acts at *ptr* sequence elements both to activate and to repress transcription of cell cycle-regulated flagellar genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:4989-4993
- Birnboim, H.C. 1983. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* 100:243-255
- Buck, M. & W. Cannon. 1992. Specific binding of the transcription factor sigma-54 to promoter DNA. *Nature* 358:422-424
- Buck, M., M.T. Gallegos, D.J. Studholme, Y. Guo & J.D. Gralla. 2000. Bacterial enhancer-dependent  $\sigma^{54}$  ( $\sigma^N$ ) transcription factor. *J. Bacteriol.* 182:4129-4136
- Burkart, M., A. Toguchi & R.M. Harshey. 1998. The chemotaxis system, but not chemotaxis, is essential for swarming motility in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:2568-2573

- Cannon, W., M.T. Gallegos & M. Buck. 1999. Amino-terminal sequences of  $\sigma^{54}$  ( $\sigma^N$ ) inhibit RNA polymerase isomerization. *Genes & Dev.* 13:357-370
- Cannon, W.V., M.T. Gallegos & M. Buck. 2000. Isomerization of a binary sigma-promoter DNA complex by transcription activators. *Nat. Struct. Biol.* 7:594-601
- Chaconas, G. & J.H. Van de Sande. 1980. 5'-<sup>32</sup>P labeling of RNA and DNA restriction fragments. *Methods Enzymol.* 65:75-80
- Cohen, S.N., A.C.Y. Chang & L. Hsu. 1972. Non chromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:2110-2114
- DeRosier, D.J. 1998. The turn of the screw: the bacterial flagellar motor. *Cell* 93:17-20
- Donohue, T.J. & S. Kaplan. 1991. Genetic techniques in *Rhodospirillaceae*. *Methods Enzymol.* 204:459-485
- Dumay, V., M. Inui & H. Yukawa. 1999. Molecular analysis of the *recA* gene and SOS box of the purple non-sulfur bacterium *Rhodopseudomonas palustris* no. 7. *Microbiol.* 145:1275-1285
- Dworkin, J., A.J. Ninfa & P. Model. 1998. A protein-induced DNA bend increases the specificity of a prokaryotic enhancer-binding protein. *Gen. Dev.* 12:894-900
- García, N., A. Campos, A. Osorio, S. Poggio, B. González-Pedrajo, L. Camarena & G. Dreyfus. 1998. The flagellar switch genes *fliM* and *fliN* of *Rhodobacter sphaeroides* are contained in a large flagellar gene cluster. *J. Bacteriol.* 180:3978-3982
- Gralla, J.D. & J. Collado-Vides. 1996. Organization and function of transcription regulatory elements, p. 1232-1245. En F. C. Neidhart, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter & H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. 2<sup>a</sup> edición, ASM Press, Washington, D. C.
- Guo Y., L. Wang & J.D. Gralla. 1999. A fork junction DNA-protein switch that controls promoter melting by the bacterial enhancer-dependent sigma factor. *EMBO J.* 18:3746-3756
- Helmann, J.D. & M.J. Chamberlin. 1988. Structure and function of bacterial sigma factors. *Annu. Rev. Biochem.* 57:839-872

- Holmes, D.S. & M. Quigley. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114(1):193-197
- Jefferson, R.A., S.M. Burgess & D. Hirsh. 1986.  $\beta$ -glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:8447-8451
- Keen, N.T., S. Tamaki, D. Kobayashi & D. Trollinger. 1988. Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in Gram-negative bacteria. *Gene* 70:191-197
- Kelly, M.T. & T.R. Hoover. 2000. The amino terminus of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium  $\sigma^{54}$  is required for interactions with an enhancer-binding protein and binding to fork junction DNA. *J. Bacteriol.* 182:513-517
- Kunkel, T.A. 1985. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492
- Liu, X. & P. Matsumura. 1995. The FlhD/FlhC complex, a transcriptional activator of the *Escherichia coli* flagellar class II operons. *J. Bacteriol.* 176:7345-7351
- Liu, X. & P. Matsumura. 1996. Differential regulation of multiple overlapping promoters in flagellar class II operons in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 21:613-620
- Macnab, R.M. 1996. Flagella and motility, p. 123-145. En F.C. Neidhart, R. Curtiss III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter & H.E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. 2<sup>a</sup> edición, ASM Press, Washington, D. C.
- Macnab, R.M. 2000. Action at a distance - bacterial flagellar assembly. *Science* 290:2086-2087
- Merrick, M.J. 1993. In a class of its own - the RNA polymerase sigma factor  $\sigma^{54}$  ( $\sigma^N$ ). *Mol. Microbiol.* 10:903-909
- Metcalf, W.W. & B.L. Wanner. 1993. Construction of new  $\beta$ -glucuronidase cassettes for making transcriptional fusions and their use with new methods for allele replacement. *Gene* 129:17-25
- Minamino, T. & R.M. Macnab. 1999. Components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and classification of export substrates. *J. Bacteriol.* 181:1388-1394
- Minamino, T., S. Yamaguchi & R.M. Macnab. 2000. Interaction between FliE and FlgB, a proximal rod component of the flagellar basal body of *Salmonella*. *J. Bacteriol.* 182:3029-3036

- Morett, E. & L. Segovia. 1993. The  $\sigma^{54}$  bacterial enhancer-binding protein family: mechanism of action and phylogenetic relationship of their functional domains. *J. Bacteriol.* 175:6067-6074
- Namba, K., I. Yamashita & F. Vondervistz. 1989. Structure of the core and central channel of bacterial flagella. *Nature* 342:648-654
- Osuna, J., X. Soberón & E. Morett. 1997. A proposed architecture for the central domain of the bacterial enhancer-binding proteins based on secondary structure prediction and fold recognition. *Protein Sci.* 6:543-555
- Packer, H.L. & J.P. Armitage. 1993. The unidirectional flagellar motor of *Rhodobacter sphaeroides* WS8 can rotate either clockwise or counterclockwise: characterization of the flagellum under both conditions by antibody decoration. *J. Bacteriol.* 175:6041-6045
- Packer, H.L. & J.P. Armitage. 1994. The chemokinetic and chemotactic behavior of *Rhodobacter sphaeroides*: two independent responses. *J. Bacteriol.* 176:206-212
- Poggio, S., C. Aguilar, A. Osorio, B. González-Pedrajo, G. Dreyfus & L. Camarena. 2000.  $\sigma^{54}$  promoter control expression of genes encoding the hook and basal body complex in *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* 182:5787-5792
- Popham, D.L., D. Szeto, J. Keener & S. Kustu. 1989. Function of a bacterial activator protein that binds to transcriptional enhancers. *Science* 243:629-635
- Reitzer, L.J. & B. Magasanik. 1986. Transcription of *glnA* in *E. coli* is stimulated by activator bound to sites far from the promoter. *Cell* 45:785-792
- Rippe, K., M. Guthold, P.H. von Hippel & C. Bustamante. 1997. Transcriptional activation *via* DNA-looping: visualization of intermediates in the activation pathway of *E. coli* RNA polymerase- $\sigma^{54}$  holoenzyme by scanning force microscopy. *J. Mol. Biol.* 270:125-138
- Rippe, K., N. Mücke & A. Schulz. 1998. Association states of the transcription activator protein NtrC from *E. coli* determined by analytical ultracentrifugation. *J. Mol. Biol.* 278:915-933
- Rueda, N. 2001. Caracterización y regulación de la expresión del gen *fliC* (flagelina) en *Rhodobacter sphaeroides*. Tesis Lic. en Investigación Biomédica Básica. Fac. Medicina, UNAM

- Sanger, F., S. Nicklen & A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467
- Sasse-Dwight, S. & J.D. Gralla. 1990. Role of eukaryotic-type functional domains found in the prokaryotic enhancer receptor factor  $\sigma^{54}$ . *Cell* 62:945-954
- Scharf, B., H. Schuster-Wolff-Bühring, R. Rachel & R. Schmitt. 2001. Mutational analysis of the *Rhizobium lupini* H13-3 and *Sinorhizobium meliloti* flagellin genes: importance of flagellin A for flagellar filament structure and transcriptional regulation. *J. Bacteriol.* 183:5334-5342
- Schreir, P.H. & R. Cortese. 1979. A fast and simple method for sequencing DNA cloning in the single stranded bacteriophage M13. *J. Mol. Biol.* 129:169-172
- Shingler, V. 1996. Signal sensing by  $\sigma^{54}$ -dependent regulators: derepression as a control mechanism. *Mol. Microbiol.* 19:409-416
- Simon, R., U. Priefer & A. Pühler. 1983. A broad host-range mobilization system for in vivo genetic engineering, transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Bio/Technology* 1:784-791
- Sistrom, W.R. 1960. A requirement for sodium in the growth of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *J. Gen. Microbiol.* 22:778-785
- Stock, J.B. & M.G. Surette. 1996. Chemotaxis, p. 1103-1129. En F.C. Neidhart, R. Curtiss III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter & H.E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. 2ª edición, ASM Press, Washington, D. C.
- Su, W., S. Porter, S. Kustu & H. Echols. 1990. DNA-looping and enhancer activity: association between DNA-bound NtrC activator and RNA polymerase at the bacterial *glnA* promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:5504-5508
- Taylor, M., R. Butjer, S. Chambers, M. Casimiro, F. Badii & M. Merrick. 1996. The RpoN-box motif of the RNA polymerase sigma factor  $\sigma^N$  plays a role in promoter recognition. *Mol. Microbiol.* 22:1045-1054
- Vieira, J. & J. Messing. 1982. The pUC plasmids and M13mp7-derived system of insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19:259-268
- Ward, M.J., D.M. Harrison, M.J. Ebner & J.P. Armitage. 1995. Identification of a methyl accepting chemotaxis protein in *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol. Microbiol.* 18:115-121

- Wedel, A. & S. Kustu. 1995. The bacterial enhancer-binding protein NtrC is a molecular machine: ATP hydrolysis is coupled to transcriptional activation. *Genes & Dev.* 9:2042-2052
- Weiss, D.S., J. Batut, K.E. Klose, J. Keener & S. Kustu. 1991. The phosphorylated form of the enhancer-binding protein NTRC has an ATPase activity that is essential for activation of transcription. *Cell*67:155-167
- Wigneshweraraj, S.R., M.K. Chaney, A. Ishihama & M. Buck. 2001. Regulatory sequences in sigma 54 localise near the start of DNA melting. *J. Mol. Biol.* 306:681-701
- Wösten, M.M.S.M. 1998. Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microbiol. Rev.* 22:127-150
- Wu, J. & A. Newton. 1997. Regulation of the *Caulobacter* flagellar gene hierarchy; not just for motility. *Mol. Microbiol.* 24:233-239
- Xu, H. & T.R. Hoover. 2001. Transcriptional regulation at a distance in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 4:138-144
- Zhou, J., S.A. Lloyd & D.F. Blair. 1998. Electrostatic interactions between rotor and stator in the bacterial flagellar motor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:6436-6441