

90  
2 ej<sup>o</sup>



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Mutagénesis Oligo Dirigida de la Región Promotora -10/-35 del Operón fixRnifA de Bradyrhizobium japonicum

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

RICARDO ALFREDO GRANDE CANO



MEXICO, D. F.

1996

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TESIS CON FALLA DE ORIGEN





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  
AVENIDA DE  
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Mutagénesis Oligo Dirigida de la Región Promotora -10/-35  
del Operón fixRnifA de Bradyrhizobium japonicum

realizado por Ricardo Alfredo Grande Cano

con número de cuenta 8411885-3 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tests

Propietario Dr. Juan Enrique Horro Gutiérrez

Propietario Biol. Carlos Alberto Castillo Pompeyo

Propietario Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez

Suplente M. en C. José Adolfo Escalante Lozada

Suplente M. en C. Víctor Manuel Valdés López

Consejo Departamental de Biología

Este trabajo se llevo a cabo en el Instituto de Biotecnología, bajo la asesoría del Dr. J.  
Enrique Morett Sánchez

A mis padres, a  
quienes debo  
todo en esta vida.

Gracias.

A Alan.

A Yola por sobre  
todas las cosas

Y a todas aquellas personas que de alguna manera estuvieron involucradas en la realización e impresión de esta tesis. Gracias.

## Agradecimientos

Atravez de estas líneas quiero expresar mi mas profundo agradecimiento a:

Enrique Morett por la confianza, tiempo y asesorías brindadas para la realización de esta tesis, así como la oportunidad de pertenecer a su grupo.

A mis padres Francisca Cano y Daniel Grande quienes siempre me brindaron todo su apoyo y confianza, aun en las situaciones mas difíciles.

A mis hermanos, Jesús Daniel y José Luis quienes siempre han sido para mi un ejemplo a seguir. A mis hermanas María Elena, Rosa María, Eloiza, Martha Soffa y Angélica todo el cariño, apoyo y confianza que siempre me han tenido. A Omar por esa confianza puesta en mi.

A Alex y Cris, esos pequeños latosos que son quienes me obligan a seguir adelante y ser cada día mejor, y porque siempre sean igual de alegres.

A Alan y Fer, quienes me estimulan a seguir adelante.

A mis amigos de la Facultad de Ciencias Javier Serna, Ignacio de la Mora, Fernando G. Vargas, Vicente Castrejón, Elsa G. Chimal, C. Carolina, Mimi, Eduardo Rendón, Vicente Anislado, Roberto Negrete, Aristides III, Itzia, Gumersindo, Genaro, Jorge el Moustro y a muchos otros que por el momento se me escapan pero sin embargo comparto una gran amistad.

A mi amigo Juan Mauricio Tellez Sosa por esa invaluable y verdadera amistad que nos une. A Humberto Barrios por esa gran amistad y por todas esas aventuras y "piruetas" vividas, además de haber tenido confianza en mi.

A mis compañeros de vivienda: Ernesto Pérez, Agustino Martínez, Josué Reyes y Sergio el "Guanajuato".

A todos los Soberones y Morett's, a Lorenzo Segovia y a sus alumnas

Quiero agradecer a Leticia Olvera el apoyo técnico brindado durante la realización de este trabajo, apoyo sin el cual hubiera sido imposible la realización de esta tesis.



## INDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	3
2.1 REGULACION DE LA TRANSCRIPCION	5
2.2 FACTOR TRANSCRIPCIONAL $\sigma^{54}$	9
2.3 ACTIVADOR TRANSCRIPCIONAL NifA	13
2.4 FIJACION BIOLOGICA DEL NITROGENO	16
2.5 REGULACION GENETICA DE LA FIJACION BIOLOGICA DEL NITROGENO	17
3. ANTECEDENTES	18
4. OBJETIVOS	23
4.1 OBJETIVO GENERAL	23
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES	24
5. METODOLOGIA	25
5.1 CEPAS BACTERIANAS Y PLASMIDOS	25
5.2 MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	25
5.3 DETERMINACION DEL PATRON DE DIGESTION DE LOS DIFERENTES PLASMIDOS UTILIZADOS Y CONSTRUIDOS	27
5.4 REACCIONES DE LIGACION	27
5.5 PURIFICACION DE PLASMIDO	28
5.6 PURIFICACION DE PLASMIDO PARA SECUENCIACION	29
5.7 SECUENCIACION DE PLASMIDOS MUTANTES	31
5.8 ENSAYOS DE ACTIVIDAD $\beta$ -GALACTOSIDASA	32
5.9 CELULAS COMPETENTES DE CALCIO	33
5.10 CELULAS ELECTROCOMPETENTES PARA ELECTROPORACION	34
5.11 TRANSFORMACION DE CELULAS COMPETENTES DE CALCIO	34

5.12 ELECTROPORACION DE CELULAS ELECTROCOMPETENTES	35
5.13 CONSTRUCCION DEL PLASMIDO pRJ7211	35
5.14 PCR (POLIMERASE CHAIN REACTION)	35
5.15 OLIGONUCLEOTIDOS	37
6. RESULTADOS Y DISCUSION	39
6.1 MUTAGENESIS OLIGO DIRIGIDA	39
6.2 CONSTRUCCION DE LOS PLASMIDOS pRJ-10GGG, pRJ-10GC, pRJ-35 Y pRJ-3568	42
6.3 CONSTRUCCION DE LOS PLASMIDOS pSUP-10GGG, pSUP-10GC, pSUP-35 Y pSUP-3568	44
6.4 INTEGRACION DE LAS FUSIONES TRANSCRIPCIONALES <i>fixR'</i> - <i>lacZ</i> EN EL CROMOSOMA DE LA CEPA SILVESTRE DE <i>B. japonicum</i>	46
6.5 CONFIRMACION DE INSERCIÓN DE LAS MUTACIONES EN EL CROMOSOMA SILVESTRE DE <i>B. japonicum</i>	49
6.6 ANALISIS DE LAS MUTACIONES INTEGRADAS EN EL CROMOSOMA	55
A) LOS NUCLEOTIDOS ALREDEDOR DE GC (-13/-12) SON ESENCIALES PARA EL FUNCIONAMIENTO DE AMBOS PROMOTORES	55
B) MUTACIONES EN LA REGION -35 QUE ACERCAN SU SECUENCIA A UNA SECUENCIA CONSENSO HACEN QUE EL PROMOTOR SE VUELVA "UP" PERO NO LO HACEN INDEPENDIENTE DEL ACTIVADOR TRANSCRIPCIONAL	56
7. CONCLUSIONES	59
8. BIBLIOGRAFIA	61
9. APENDICES	67

## Resumen

El estudio del operón *fixRnifA* de *Bradyrhizobium japonicum* es de gran importancia, no solamente por encontrarse codificada en este operón la proteína NifA que es el activador central en el proceso de la fijación biológica del nitrógeno, sino por el mecanismo tan fino que presenta para regular su expresión.

Se tiene evidencia que sugiere que este operón presenta dos promotores que se encuentran sobrelapados y responden a dos RNA polimerasas holoenzimas diferentes (Barrios et al 1995). Por un lado un promotor del tipo -12/-24 dependiente de  $\sigma^{54}$ , se encuentra inmerso y compartiendo una de sus regiones promotoras con un promotor aparentemente del tipo -10/-35, dependiente al parecer de otro factor  $\sigma$  alternativo.

Análisis previos de la secuencia de las regiones promotoras -10/-35 del promotor *fixRnifA*, con las secuencias de otros dos genes de *B. japonicum* que al parecer se expresan constitutivamente, revelaron una cierta similitud en ambas regiones.

Con el fin de separar y conocer los nucleótidos esenciales para el promotor del tipo -10/-35, en este trabajo estudiamos por medio de mutagénesis dirigida la región promotora de este operón.

Mutaciones en la región -10 donde son cambiadas a G tres bases adyacentes a la GC -13, -12 que se mantiene invariable en los promotores  $\sigma^{54}$  dependientes, provocan un marcado fenotipo "down" en ambos promotores, mientras que un par de cambios de TA hacia CG en la región -10 provocan una caída en la expresión del promotor dependiente del factor  $\sigma$  alternativo, sin afectar significativamente la expresión del promotor  $\sigma^{54}$  dependiente.

Por el contrario, mutaciones en la región -35 de este operón, donde su secuencia es acercada a la secuencia "consenso" dictada por genes no dependientes de  $\sigma^{54}$  (expresados al parecer constitutivamente), mediante 4 cambios de bases, incrementan la expresión de este operón de dos a tres veces, sin embargo estas mutaciones no son suficientes para hacer independiente a este promotor de la regulación positiva de una proteína activadora que se sabe se une a la región -68.

## Introducción

La fijación biológica del nitrógeno es el proceso mediante el cual se lleva a cabo la reducción del dinitrógeno atmosférico a amonio. Es un proceso altamente demandante de energía, requiriéndose in vivo de hasta 16 mol de ATP por cada mol de amonio producido (Merrick, 1993).

Los genes que codifican para las proteínas involucradas en el proceso de la fijación biológica del nitrógeno son denominados *fix* y *nif*, y su expresión esta generalmente regulada por las condiciones de oxido-reducción de la célula, a través de cascadas de genes regulatorios organizados de una manera jerárquica.

En *Rhizobium meliloti*, al igual que en *Bradyrhizobium japonicum*, la expresión de los genes *nif* y *fix* esta mediado por la proteína NifA, que es el activador central en el proceso de la fijación del nitrógeno. La expresión de *nifA* en *R. meliloti*, esta regulada directamente por las proteínas del sistema de dos componentes FixL y FixJ. FixL, una hemoproteína transmembranal, actua como sensor de microaerobiósis en el exterior de la célula y transduce su señal a FixJ por una modificación covalente. FixJ de manera directa estimula la expresión de *nifA* y de una manera indirecta a los promotores *fixN* y *fixG*, a través de FixK (Fig 3).

NifA, es capaz de activar otros genes *nif* y *fix*, ademas de autoactivar su transcripción, siendo ademas su expresión regulada de una manera negativa por FixK (Fischer, 1994).

La expresión de NifA en *B. japonicum*, el endosimbionte de la soya (*Glycine max*) que se encuentra codificada en el operón *fixRnifA*, no es totalmente dependiente de la cascada de las proteínas del sistema de dos componentes FixLJ y FixK, existiendo solo una pequeña relación vía el sistema FixLJ-FixK2, a través de la activación del gene *rhoN1*.

## Introducción

La fijación biológica del nitrógeno es el proceso mediante el cual se lleva a cabo la reducción del dinitrógeno atmosférico a amonio. Es un proceso altamente demandante de energía, requiriéndose in vivo de hasta 16 mol de ATP por cada mol de amonio producido (Merrick, 1993).

Los genes que codifican para las proteínas involucradas en el proceso de la fijación biológica del nitrógeno son denominados *fix* y *nif*, y su expresión esta generalmente regulada por las condiciones de oxido-reducción de la célula, a través de cascadas de genes regulatorios organizados de una manera jerárquica.

En *Rhizobium meliloti*, al igual que en *Bradyrhizobium japonicum*, la expresión de los genes *nif* y *fix* esta mediado por la proteína NifA, que es el activador central en el proceso de la fijación del nitrógeno. La expresión de *nifA* en *R. meliloti*, esta regulada directamente por las proteínas del sistema de dos componentes FixL y FixJ. FixL, una hemoproteína transmembranal, actua como sensor de microaerobiósis en el exterior de la célula y transduce su señal a FixJ por una modificación covalente. FixJ de manera directa estimula la expresión de *nifA* y de una manera indirecta a los promotores *fixN* y *fixG*, a través de FixK (Fig 3).

NifA, es capaz de activar otros genes *nif* y *fix*, ademas de autoactivar su transcripción, siendo ademas su expresión regulada de una manera negativa por FixK (Fischer, 1994).

La expresión de NifA en *B. japonicum*, el endosimbionte de la soya (*Glycine max*) que se encuentra codificada en el operón *fixRnifA*, no es totalmente dependiente de la cascada de las proteínas del sistema de dos componentes FixLJ y FixK, existiendo solo una pequeña relación vía el sistema FixLJ-FixK2, a través de la activación del gene *rpoN1*.

Una vez que FixL sensa las condiciones del exterior celular, transduce su señal a FixJ, el cual promueve la expresión de *fixK2*, un gene homologo a *fixK*, que en el caso de *B. japonicum* no juega un papel fundamental en el proceso de fijación. FixK2 activa de manera positiva la expresión del gene *rpoN 1*. Mientras que el gene *rpoN 2* es autoregulado negativamente. Estos genes codifican para la proteína  $\sigma^{54}$  que es un factor transcripcional que le confiere especificidad a la RNA polimerasa para el reconocimiento de promotores del tipo -12/-24, y que es necesario para la activación del operón *fixRnifA* (Fischer, 1994) (Fig 4).

*Bradyrhizobium japonicum*, presenta una muy particular forma de regular la expresión de *nifA*, se ha demostrado que la expresión del operón *fixRnifA* esta controlada por dos mecanismos diferentes. Un mecanismo es dependiente de NifA y  $\sigma^{54}$ , y es expresado en condiciones de crecimiento anaerobio y en simbiosis. El otro sistema es independiente de NifA y de  $\sigma^{54}$  pero es dependiente de una proteína activadora diferente, que a la fecha aun no se ha podido caracterizar a nivel génico (Thöny, et al 1989; Barrios and Morett, 1995). Este ultimo mecanismo es el encargado de activar la expresión del operón *fixRnifA* en condiciones de crecimiento aerobio.

Se sabe ademas que la expresión del operón mediante este mecanismo es dependiente de la integridad de la región -68 (upstream) respecto al inicio de la transcripción (Thöny, et al 1989). Recientemente, Barrios et al (1995) han demostrado que la expresión del operón *fixRnifA* de *B. japonicum* es regulado por dos promotores que se encuentran sobrelapados y positivamente regulados y que muy probablemente responden a dos RNA polimerasas distintas. El promotor *fixRp1* dependiente de NifA, presenta una secuencia similar a la de promotores del tipo -24/-12 dependientes de  $\sigma^{54}$ , es expresado solo en condiciones de crecimiento anaerobio y en simbiosis.

Por el contrario, el promotor *fixRp2* presenta una estructura homologa a las de algunos promotores del tipo -35/-10 encontradas en otros genes housekeeping de *B. japonicum*, y que presumiblemente son activados por la RNA polimerasa conteniendo algún otro factor  $\sigma$  alternativo aun desconocido. (Barrios and Morett 1995).

## Regulación de la transcripción

La transcripción es un paso central en el crecimiento y desarrollo celular en donde los genes son selectivamente localizados, reconocidos y transcritos por la RNA polimerasa holoenzima dependiente de DNA, para producir un mRNA que posteriormente sera traducido a una proteína (von Hippel et al 1984) . La RNA polimerasa dependiente de DNA es la proteína central en el proceso de la transcripción, esta constituida de 3 subunidades distintas con características propias cada una de estas. Comprende 2 subunidades  $\alpha$ , una subunidad  $\beta$  y una subunidad  $\beta'$ .

El sitio catalítico de la polimerización del mRNA esta localizado en la subunidad  $\beta$ , mientras que la unión no especifica de la RNA polimerasa al DNA esta mediado por la subunidad  $\beta'$ . Finalmente las subunidades  $\alpha$  unen a las subunidades  $\beta$  y  $\beta'$  dentro de la enzima completa. El "core" de la RNA polimerasa es diferenciado funcionalmente dentro de varias formas de holoenzima por la unión de uno de los diferentes factores  $\sigma$ . (Doi, 1991)

En *E. coli*, seis han sido los diferentes factores  $\sigma$  que se han identificado (Ishihama, 1993) (Tabla 1).

El elemento regulatorio de la transcripción y el blanco inicial que debe ser reconocido por la RNA polimerasa es el promotor.



Organismo	P.M.	Gene	Nombre	Control
<i>E. coli</i>	70 000	<i>rpoD</i>	$\sigma^{70}$	Housekeeping
	32 000	<i>rpoH</i>	$\sigma^{32}$	Heat-Shock
	24 000	<i>rpoE</i>	$\sigma^{24}$	Extremo Heat-Shock
	54 000	<i>rpoN</i>	$\sigma^{54}$	Limitación Nitrógeno
	28 000	<i>rpoF</i>	$\sigma^{28}$	Para Flagelo
	38 000	<i>rpoS</i>	$\sigma^{38}$	Respuesta a Stress Oxidativo y Fase Estacionaria

Tabla 1

Un promotor es generalmente definido como un segmento de DNA que contienen las señales que dirigen la adecuada unión de la RNA polimerasa holoenzima y su subsecuente activación a la forma capaz de iniciar transcripción. En algunas ocasiones dentro o inmediatamente adyacente al promotor existen secuencias de DNA que controlan la unión específica de proteínas activadoras o represoras involucradas en la regulación de la transcripción de genes específicos (von Hippel, et al 1984).

En *E. coli* promotores típicos reconocidos por la RNA polimerasa conteniendo el factor  $\sigma^{70}$  tienen un número de características comunes, estas consisten principalmente de dos hexanucleótidos bastante conservados, localizados en la vecindad de las posiciones -10 y -35 en relación al inicio de la transcripción. La secuencia consenso de este tipo de promotores es:

### **TTGACA-N<sub>17</sub>-TATAAT-N<sub>5-7</sub> INICIO**

Mutantes en donde decrece la similitud de su secuencia con la secuencia arriba señalada, decrece también la actividad del promotor. Mientras que mutaciones en donde se acerca su secuencia a la secuencia consenso aumentan la actividad de este promotor. ●

Promotores regulados positivamente por definición no funcionan bien en presencia de la RNA polimerasa sola, y esto puede deberse a varias razones. Una posibilidad es que su secuencia nucleotídica en su región -35 difiera mucho de la secuencia consenso arriba señalada, de tal manera que no pueda ser reconocida por la RNA polimerasa y requiera entonces de una proteína activadora unida al DNA para permitir la unión de la RNA polimerasa y el inicio de la transcripción.

Por otro lado tal promotor puede presentar un sitio funcional de unión a la RNA polimerasa, pero que esta unión se vea inhibida por secuencias que alteren la conformación local del DNA, de tal forma que una proteína unida en la región upstream permita un cambio conformacional, y con esto el inicio de la transcripción (Raibaud and Schwartz 1984).

Recientemente un tercer elemento de reconocimiento se ha observado en algunos promotores bacterianos y mas específicamente en *E. coli*. Una región de 20 pb rica en A+T se ha encontrado arriba del "core" del promotor de genes que se expresan constitutivamente y es denominado elemento UP (Ross, et al 1993).

Las observaciones realizadas por Busby et al (1994) sugieren que el dominio carboxilo terminal de la subunidad  $\alpha$  de la RNA polimerasa es la que interactúa con el elemento UP, y que esta unión es la responsable de la fuerza de este tipo de promotores.

Proponen un modelo para explicar como la ausencia de un elemento UP adyacente a la región -35 de algunos promotores de *E. coli* so ve compensado con la presencia de sitios de unión de proteínas activadoras que interactúan mediante contactos proteína-proteína con el dominio carboxilo terminal de la subunidad  $\alpha$ , para permitir un correcto posicionamiento de la RNA polimerasa.

De tal manera que la fuerza del promotor esta en función de los tres elementos regulatorios, los promotores muy fuertes, como los ribosomales, presentan secuencias -10 y -35 cercanas a los consensos, además del elemento UP, mientras que los promotores débiles tienen uno, dos o tres elementos promotores no acorde con el consenso (Busby and Ebright, 1994).

Algunos genes y operones son controlados por múltiples promotores que pueden ser arreglados en tandem o en una forma sobrelapada.

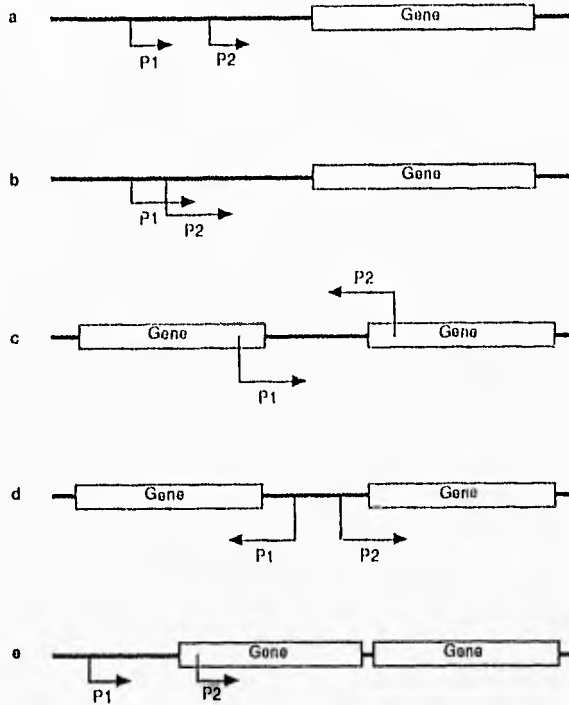
Los promotores además pueden ser convergentes o divergentes para genes y operones cercanamente espaciados. Los múltiples promotores pueden ser transcritos por la misma o diferente RNA polimerasa holoenzima. Varios papeles han sido propuestos para este tipo de regiones promotoras complejas. Para el caso de promotores sobrelapados que dirigen la síntesis de proteínas distintas, las regiones promotoras pueden facilitar la regulación simultánea de la expresión de ambos genes, ahora bien para el caso de promotores en tandem se puede permitir la expresión de proteínas diferentes codificadas en la región "downstream" dependiendo de cual promotor es usado (Fig 1).

Promotores sobrelapados pueden actuar como señales regulatorias positivas o negativas. Si una RNA polimerasa holoenzima se une a uno de los promotores sobrelapados, previene el uso del segundo promotor. El primer promotor actúa entonces como un sitio de regulación negativa para el segundo y la RNA polimerasa actúa como el represor.

En otro modo de acción, el primero de dos promotores sobrelapados puede actuar a manera de regulación positiva. En este caso, el primer promotor puede actuar como "zona colectora" para moléculas de RNA polimerasa que fueron liberadas al segundo promotor a partir del primero en donde la transcripción fue iniciada (Doi, 1991).

### **Factor transcripcional $\sigma^{54}$**

Como se menciona anteriormente, las bacterias sintetizan un número de factores sigma diferentes, en demanda de una expresión coordinada de diferentes genes bajo diferentes condiciones. Estos factores le confieren a la RNA polimerasa la especificidad para el reconocimiento de diferentes promotores.



**Fig 1** Arreglo esquemático de promotores. a) Promotores en tandem; b) Promotores superpuestos; c) Promotores convergentes; d) Promotores divergentes; e) Promotores en tandem con un promotor localizado dentro del primer gene del operón.

Existen dos familias de factores  $\sigma$ , la mayoría de estos pertenecen a la familia del factor sigma de *Escherichia coli*  $\sigma^{70}$ , los cuales le confieren especificidad a la RNA polimerasa para reconocer cajas centradas entre -35 y -10. El segundo grupo lo conforma  $\sigma^{54}$ , el cual esta codificado por el gene *rpoN* y que representa una segunda familia de factores sigma que se encuentra ampliamente distribuido en procariotes y que le dan especificidad a la RNA polimerasa para reconocer cajas relativamente cercanas entre -24 y -12 (Merrick, 1993).

Debido a que no se presentan homologías entre las secuencias de los genes que codifican para los factores  $\sigma^{70}$  y  $\sigma^{54}$  se postula que ambos evolucionaron de una manera independiente.

Inicialmente se pensaba que el factor transcripcional  $\sigma^{54}$  estaba involucrado en el reconocimiento de genes relacionados a la fijación y asimilación del nitrógeno, pero en la actualidad se sabe que  $\sigma^{54}$  interviene en la transcripción de numerosos genes que se encuentran involucrados en funciones muy diversas, como son: transporte de ácidos dicarboxílicos, catabolismo del xileno y el tolueno, biosíntesis de hidrogenasas, producción del pili y fijación del nitrógeno entre otras (Kustu, et al 1989).

Entre los miembros de la familia  $\sigma^{70}$ , las regiones -35 y -10 no se encuentran altamente conservadas, en contraste los promotores que son reconocidos por la RNA polimerasa conteniendo el factor  $\sigma^{64}$ , estos presentan una relativamente bien conservada secuencia consenso:

**YTGGYAYR-N3-YYTGCW-N11**

Localizada entre -26 y -11 (+/- 1pb), dentro de este consenso GG -24 se mantiene siempre invariable y GC -12 esta siempre conservada (Morett and Buck 1993). A diferencia de los promotores del tipo -35/-10, la distancia entre la región -24 y -12 es crítica para el buen funcionamiento del promotor, ya que cambios de tan solo 1pb lo inactivan, mientras que para los promotores del tipo -35/-10 se pueden tolerar variaciones de hasta 3 pb de espaciamiento entre las regiones -35 y -10 (Merrick, 1993).

Una característica del factor  $\sigma^{54}$  es que por si mismo es capaz de unirse a la región promotora específica en ausencia de la RNA polimerasa, a diferencia del factor  $\sigma^{70}$ , en donde es necesario que primero se de el ensamblaje de la RNA polimerasa-holoenzima antes de unirse a su secuencia específica.

$\sigma^{70}$  y otros factores sigma relacionados se cree funcionan de una manera mas o menos similar, la RNA polimerasa-holoenzima forma un complejo cerrado estable el cual isomeriza a una forma abierta sin el requerimiento de factores transcripcionales accesorios. Por el contrario, la RNA polimerasa-holoenzima conteniendo el factor  $\sigma^{54}$  forma un complejo de promotor cerrado, pero es incapaz de proceder a la formación de un complejo abierto en ausencia de una proteína activadora para el inicio de la transcripción (Merrick, 1993).

## Activador transcripcional NifA

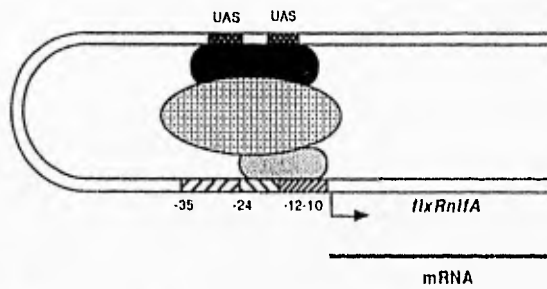
NifA pertenece a la familia de las "Enhancers Binding Proteins" (EBPs), estas proteínas activan genes que son transcritos por la RNA polimerasa conteniendo el factor sigma  $\sigma^{54}$ , uniéndose a secuencias del DNA que se encuentran a mas de 100 pb del inicio de la transcripción, denominadas UAS (Upstream Activator Sequences) (Morett and Segovia 1993).

Se ha demostrado por observación directa mediante microscopia electrónica, que la proteína activadora puede contactar su UAS y a la RNA polimerasa, mediante la formación de un "loop" del DNA, facilitado por la unión de la proteína IHF (Integration Host Factor) a la región entre el promotor y la UAS, causando un doblamiento del DNA (Su, et al 1990) (Fig 2). Una característica común de los genes que son activados por estas proteínas, es que están involucrados en procesos que no son absolutamente requeridos para la supervivencia del organismo (Morett and Segovia 1993) .

La comparación de secuencias de NifA de diversos organismos indican que estas constan de tres dominios diferentes de conservación variable, que tienen la capacidad de funcionar de manera independiente.

Huala et al (1992, 1989) demostraron que el dominio central de la proteínas NifA y DctD (que pertenecen a las EBPs) son capaces de llevar a cabo la activación de la transcripción, aunque a un nivel inferior de las proteínas completas.





NIJA
  RNA Polimerasa
   $\sigma 54$

Fig 2. Modelo de activación a distancia

Este dominio, el más conservado de los tres, presenta homologías que son agrupadas en 7 regiones, de las cuales algunas presentan cierta similitud con el sitio de unión de nucleótido que presenta la adenilato quinasa y varias otras proteínas que unen ATP, por lo que se postula este dominio es el encargado de llevar a cabo la isomerización de un complejo cerrado a un complejo abierto (para el inicio de la transcripción) mediante la hidrólisis de ATP.

El dominio COOH terminal, el más corto de los tres, contiene un motivo de unión a DNA, denominado hélice vuelta hélice, bastante bien conservado que es el responsable de la unión al DNA. Este dominio puede unirse específicamente al DNA independientemente de los otros dominios, pero es incapaz de llevar a cabo la activación de la transcripción.

Entre los dominios central y COOH se localizan 4 cisteínas conservadas que se postula pudieran estar involucradas en la regulación de la actividad de NifA por oxígeno (ver más adelante).

El dominio amino terminal es el menos conservado de los tres, y para las proteínas NifA no se le ha demostrado ninguna función característica. Para el caso de las proteínas que pertenecen a la familia de los sistemas de dos componentes, es a través de este dominio donde se lleva a cabo la regulación de la actividad, ya que presentan en esta región ciertas secuencias homologas entre miembros de esta familia (Morett and Segovia 1993).

A diferencia de NifA de *Klebsiella pneumoniae*, las proteínas NifA de *B. japonicum* y *R. meliloti* son sensibles al oxígeno.

El análisis de la secuencia de aminoácidos de NifA de *B. japonicum* y *R. meliloti*, reveló un motivo con varias cisteínas conservadas, este motivo no se encuentra en NifA de *K. pneumoniae* por lo que Fischer et al en 1988 propusieron que los residuos de cisteínas podrían coordinar un cofactor metálico, y que el estado redox de este complejo es el que regula la actividad de NifA en *B. japonicum* y *R. meliloti*. (Fischer, et al 1988)

## Fijación biológica del nitrógeno

El nitrógeno, elemento esencial para la vida, forma parte de muchas moléculas de importancia biológica como proteínas, ácidos nucleicos, cofactores enzimáticos y muchas otras moléculas. Mas del 79% en volumen de la atmosfera es nitrógeno, sin embargo esta gran cantidad del elemento no se encuentra disponible para la mayoría de los organismos, ya que estos solamente lo pueden utilizar de una manera "asimilada".

La fijación biológica del nitrógeno es un proceso enzimático llevado a cabo únicamente por organismos procariotes mediante el cual se da la reducción del nitrógeno atmosférico a amonio por medio de la enzima nitrogenasa. Este es un proceso altamente demandante de energía, que requiere in vivo de por lo meno 16 moles de ATP por cada mol de amonio fijado (Merrick, M. J. 1993). *B. japonicum* el endosimbionte de la soya (*Glycine max*), es un organismo capaz de establecer relaciones simbióticas con plantas de la familia de las leguminosas, e inducir a la formación de una estructura especial denominado nódulo, en cuyo interior se da una diferenciación a un estado denominado bacteroide, donde se lleva a cabo el proceso de fijación biológica del nitrógeno.

## Regulación genética de la fijación biológica del nitrógeno

Dos de los varios sistemas biológicos mas estudiados en cuanto a la regulación genética de la fijación simbiótica del nitrógeno son *R. meliloti* y *B.japonicum*, (endosimbiontes de la alfalfa y soya respectivamente), quienes presentan ciertas diferencias en la regulación de la expresión de los genes involucrados en este proceso.

Una de las primeras caracterizaciones de los genes involucrados en el proceso de la fijación biológica del nitrógeno se realizo en *K. pneumoniae*, organismo diazotrofo en donde se definieron por primera vez a los genes que se están involucrados en el proceso de la fijación (*nif*). Estos genes se encuentran a lo largo de un solo cluster de aproximadamente 20 Kb en este organismo, (Arnold, et al 1988).

Estudios posteriores en otros organismos demostraron que ademas de los genes encontrados en *K. pneumoniae*, existían otros que no se presentaban en este organismo, a los que se les denomino como (*fix*), y que ademas se encontraban dispersos en otros clusters de una manera especie especifica.

Los genes involucrados en la fijación biológica del nitrógeno en *R. meliloti* se encuentran distribuidos en dos grandes clusters, los cuales están localizados en uno de los dos megaplásmidos que posee esta bacteria, y su expresión esta regulada principalmente en base a las condiciones de oxido reducción de la célula mediado por proteínas pertenecientes a la familia de dos componentes.

FixL y FixJ, proteínas que pertenecen a los sistemas de dos componentes, son las encargadas de regular la expresión de NifA que es el activador central.

FixL, una hemoproteína transmembranal sensa las condiciones medioambientales de la célula y transmite su señal a FixJ mediante una modificación covalente. FixJ modificado entonces es capaz de activar de manera directa la expresión de *nifA*, cuyo producto activa otros genes involucrados en la fijación, (Fischer, 1994) (Fig 3).

*B. japonicum* presenta algunas diferencias en cuanto a la regulación de la expresión de NifA, dependiendo solo en algún momento de las proteínas de dos componentes FixL y FixJ. FixJ no activa directamente en la expresión de NifA, sino que activa la expresión de FixK2, FixK2 entonces activa por un lado a *fixK1*, que codifica para una proteína homóloga a FixK de *R. meliloti*, pero que para el caso de *B. japonicum* no juega un papel esencial en el proceso de la fijación del nitrógeno, y a *rpoN1* que codifica para el factor transcripcional  $\sigma^{54}$  necesario para la transcripción del resto de los genes *nif* (Fischer, 1994) (Fig 4).

## Antecedentes

La expresión del operón *fixRnifA* de *B. japonicum* obedece a un complejo mecanismo regulatorio, la expresión de este operón se da en condiciones de crecimiento anaerobio, y contrariamente a otras bacterias fijadoras de nitrógeno su expresión se da también en condiciones de crecimiento aerobio.

Este operón ha sido objeto de un intenso estudio puesto que codifica para el activador transcripcional NifA, que es el regulador central en el proceso de la fijación biológica del nitrógeno. En 1987 Thöny et al publican la secuencia completa de este operón, así como el inicio de transcripción y la presencia de un promotor dependiente de  $\sigma^{54}$ .

*Rhizobium meliloti*

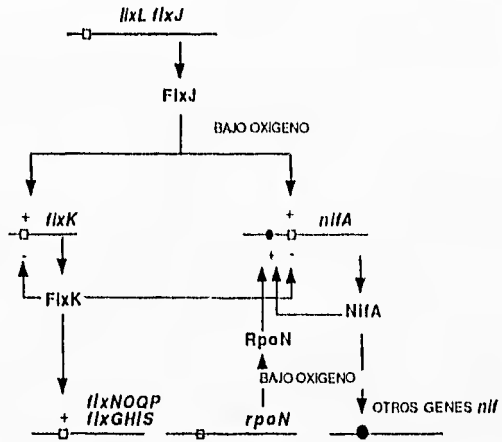


Fig 3. Cascada de regulación de la expresión de los genes *nif* y *fix* en *R. meliloti*.

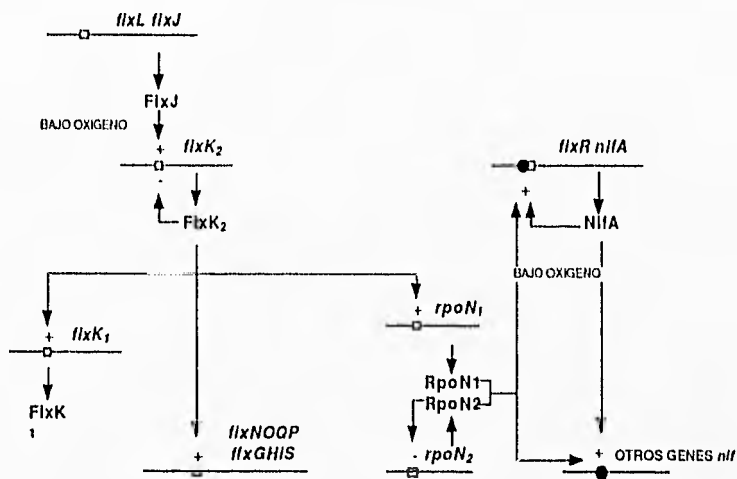


Fig. 4 Cascada de regulación de la expresión de los genes *nif* y *fix* de *B. japonicum*.

Dan cuenta además de que mutaciones en la región -12, ocasionan una caída en la expresión de este operón. Sin embargo mutaciones en la región -24 no disminuyen significativamente la expresión.

En 1989 demuestran, mediante mutagénesis, deleción y geles de retardamiento con extractos crudos de proteína, que la expresión aeróbica de este operón es dependiente de un segundo activador transcripcional y que se une a la región de -50 a -80, una región esencial para la expresión de este operón.

Más recientemente Barrios et al (1995), analizando secuencias promotoras de genes de *B. japonicum* que se sabe no son transcritos por  $E\sigma^{54}$  y que además se conocía el inicio de transcripción, demostraron la presencia de dos promotores sobrelapados que obedecen a dos distintas RNA polimerasas, y postulan además la presencia de otro factor sigma diferente a  $\sigma^{54}$  pudiera estar involucrado en la expresión de este promotor en condiciones de crecimiento aerobio.

El promotor *fixRp1*, del tipo -12/-24, dependiente de NifA y  $E\sigma^{54}$ , dirige la síntesis de un transcrito denominado p1 que comienza exactamente a doce nucleótido "downstream" de la región -12, y solo se expresa en condiciones limitadas de oxígeno. Por el contrario, el promotor *fixRp2* presenta una estructura y secuencia similar a la que presentan algunos promotores del tipo -10/-35 de *B. japonicum*, pero estas secuencias no se parecen a la secuencia de ningún factor  $\sigma$  conocido en procariotes, por lo que se propone que son reconocidos muy probablemente por la RNA polimerasa conteniendo otro factor  $\sigma$  alternativo (Fig 5).

Este promotor es el encargado de dirigir la expresión de un transcrito p2 que comienza en dos sitios diferentes.





El primero de ellos corresponde al de el transcrito p1, mientras que el mas abundante inicia solamente dos nucleótido "downstream".

La expresión de los transcritos originados a partir de este promotor son dependientes de la integridad de la región -68 "upstream" respecto al inicio de transcripción, pero independientes de NifA y  $\sigma^{54}$ , y su expresión solamente se observa en condiciones de crecimiento aerobio y anaerobio, pero no en simbiosis.

Por medio del análisis de mutantes con cambios de GC por AG en la región -12 del promotor  $\sigma^{54}$  dependiente (*fixRp1*) no muestran ningún transcrito debido a que simultáneamente se afecta al promotor *fixRp2*, mientras que mutaciones en la región -24 en donde solo se destruye la integridad de *fixRp1* solamente se afecta la expresión de este promotor sin tener ningún efecto sobre la transcripción a partir del promotor *fixRp2* (Barrios and Morett, 1995).

## Objetivo General

En base a los argumentos presentados que postulan la presencia de un segundo promotor del tipo -10/-35, así como un factor  $\sigma$  diferente al que controla también la expresión del operón *fixRnifA* de *B. japonicum*, el objetivo general de este trabajo es definir la funcionalidad de este promotor.

En base a los argumentos presentados que sugieren la presencia de un segundo promotor del tipo -35/-10 que dirige también la transcripción del operón *fixRnifA* tanto en condiciones de crecimiento aerobio como anaerobio, el objetivo general de este trabajo es el de confirmar la funcionalidad de este promotor, además de identificar los nucleótido esenciales y su separación del promotor del tipo -24/-12 mediante mutaciones específicas.

## Objetivos particulares

Para cumplir con el objetivo general, se requiere del análisis de mutaciones sobre la región promotora de este operón. Por lo que se requiere de lo siguiente:

Generación de fragmentos de DNA mediante PCR, con mutaciones específicas en las regiones -10 y -35 de la región promotora del operón *fixRnifA*.

Clonación de los productos de PCR con las mutaciones deseadas fusionados al gene reportero *lacZ* en un vector replicable en *E. coli* y capaz de movilizarse hacia *B. japonicum*.

Integración de los fragmentos mutados fusionados al gene *lacZ* en el cromosoma silvestre de *B. japonicum* mediante recombinación homologa sencilla, para generar cepas que porten las mutaciones deseadas integradas en el cromosoma.

Análisis del comportamiento de las mutaciones integradas en la región promotora -10/-35 bajo diferentes condiciones de crecimiento.

## Metodología

**Cepas bacterianas y plásmidos.** Todas las cepas bacterianas y los Plásmidos utilizados y contruidos para la realización de este trabajo se muestran en la tabla 2.

**Medios y condiciones de cultivo.** El medio rico utilizado para crecer aeróbicamente *B. japonicum* fue PSY (Peptona de caseína 3 grs/lit;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3 grs/lit;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.3 grs/lit;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 grs/lit;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.01 grs/lit; extracto de levadura 1 gr/lit), para crecimiento anaerobio se utilizó YEM (Extracto de levadura 1 gr/lit; sol A 100X 10 ml/lit; sol B 100X 10 ml/lit; D-Manitol 10 grs/lit; con  $\text{KNO}_3$  10 mM como aceptor de electrones).

El medio mínimo empleado fue ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3 grs/lit;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.3 grs/lit;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.12 grs/lit;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.321 grs/lit;  $\text{KNO}_3$  1.01 grs/lit;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.05 grs/lit; elementos traza 1000X 1 ml/lit; Borato 1000X 1 ml/lit;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1000X 1 ml/lit; Vitaminas 1000X 1 ml/lit; succinato 10mM)

El medio rico utilizado para el crecimiento de *E. coli* fue (LB) Luria-Bertani (Bacto triptona 1%; NaCl 1% extracto de levadura 0.5%). Para solidificar los medios se emplearon 15 grs/lit de bacto agar. Cuando se requirió, se utilizaron los siguientes antibióticos a las concentraciones señaladas. Para *B. japonicum* Espectinomicina 100  $\mu\text{g/ml}$ ; estreptomina 100  $\mu\text{g/ml}$ ; kanamicina 100  $\mu\text{g/ml}$ ; tetraciclina 100  $\mu\text{g/ml}$ ; para *E. coli* cloranfenicol 20  $\mu\text{g/ml}$ ; kanamicina 40  $\mu\text{g/ml}$ ; ampicilina 200  $\mu\text{g/ml}$ ; tetraciclina 15  $\mu\text{g/ml}$ .

Para la movilización de los plásmidos mutantes de *E. coli* a la cepa silvestre de *B. japonicum* se realizaron cruas triparentales utilizando el Plásmido pRK2013 como ayudador.

CEPA	MARCADOR	GENOTIPO	REFERENCIA
<b><i>B. japonicum</i></b>			
110 spc4	Spc	W. T.	Regensburgor and Honecke 1983
8091	Spc Tet	W. T. A → C -68 <i>flxR'</i> -' <i>lacZ</i>	Barrios and Morett 1995
W-10GGG	Spc Tet	W. T. <i>flxR-10GGG'</i> -' <i>lacZ</i>	Este trabajo
W-10GC	Spc Tet	W. T. <i>flxR-10GC'</i> -' <i>lacZ</i>	Este trabajo
W-35	Spc Tet	W. T. <i>flxR-35'</i> -' <i>lacZ</i>	Este trabajo
W-3568	Spc Tet	W. T. <i>flxR-3568'</i> -' <i>lacZ</i>	Este trabajo
<b><i>E. coli</i></b>			
HB101	Str	<i>hsdR, hsdM, recA 13</i>	Boyer and Rullan-Dusioux 1969
HC1061	Str	$\Delta(lacIPO2YA) X74, hsdR$	Casadaban et al 1983
DH5a	Nal	<i>hsdR17 recA1 qyrA96lacZΔM15</i>	Woodcock et al 1989
<b>Plasmidos</b>			
pRJ7211	Ap	<i>(-773/flxR'-'lacZ)</i>	Thöny et al 1987
pRJ7315	Tc	<i>(-773/flxR'-'lacZ A→C -68)</i>	Thöny et al 1989
pRK2013	Km	<i>Tra+</i>	Ditta et al 1980
pSUP202	Ap Cm Tc	<i>oriT de RP4</i>	Simon et al 1983
pRJ-10GGG	Ap	<i>(-773/flxR-10GGG'-'lacZ)</i>	Este trabajo
pRJ-10GC	Ap	<i>(-773/flxR-10GC'-'lacZ)</i>	Este trabajo
pRJ-35	Ap	<i>(-773/flxR-35'-'lacZ)</i>	Este trabajo
pRJ-3568	Ap	<i>(-773/flxR-3568'-'lacZ A→C-68)</i>	Este trabajo
pSUP-10GGG	Ap Tc	<i>(-773/flxR-10GGG'-'lacZ)</i>	Este trabajo
pSUP-10GC	Ap Tc	<i>(-773/flxR-10GC'-'lacZ)</i>	Este trabajo
pSUP-35	Ap Tc	<i>(-773/flxR-35'-'lacZ)</i>	Este trabajo
pSUP-3568	Ap Tc	<i>(-773/flxR-3568'-'lacZ A→C-68)</i>	Este trabajo

Tabla 2. Cepas y plasmidos utilizados y construidos en este trabajo

CEPA	MARCADOR	GENOTIPO	REFERENCIA
<b>D. japonicum</b>			
110 spc4	Spc	W. T.	Regensburger and Honecke 1983
8091	Spc Tot	W. T. A → C -68 <i>fixH'</i> -' <i>lacZ</i>	Barrios and Morett 1995
W-10GGG	Spc Tot	W. T. <i>fixR-10GGG'</i> -' <i>lacZ</i>	Este trabajo
W-10GC	Spc Tot	W. T. <i>fixR-10GC'</i> -' <i>lacZ</i>	Este trabajo
W-35	Spc Tot	W. T. <i>fixR-35'</i> -' <i>lacZ</i>	Este trabajo
W-3568	Spc Tot	W. T. <i>fixR-3568'</i> -' <i>lacZ</i>	Este trabajo
<b>E. coli</b>			
HB101	Str	<i>hsdR, hsdM, recA 13</i>	Boyer and Rullan-Dustlux 1969
MC1061	Str	$\Delta(lacIPOZYA) X74, hsdR$	Casadaban et al 1983
OH5a	Nal	<i>hsdR17 recA1 gyrA96lacZAM15</i>	Woodcock et al 1989
<b>Plasmidos</b>			
pRJ7211	Ap	(-773/ <i>fixR'</i> -' <i>lacZ</i> )	Thöny et al 1987
pRJ7315	Tc	(-773/ <i>fixR'</i> -' <i>lacZ</i> A→C -68)	Thöny et al 1989
pRK2013	Km	<i>Tra+</i>	Ditta et al 1980
pSUP202	Ap Cm Tc	<i>oriT de RP4</i>	Simon et al 1983
pRJ-10GGG	Ap	(-773/ <i>fixR-10GGG'</i> -' <i>lacZ</i> )	Este trabajo
pRJ-10GC	Ap	(-773/ <i>fixR-10GC'</i> -' <i>lacZ</i> )	Este trabajo
pRJ-35	Ap	(-773/ <i>fixR-35'</i> -' <i>lacZ</i> )	Este trabajo
pRJ-3568	Ap	(-773/ <i>fixR-3568'</i> -' <i>lacZ</i> A→C-68)	Este trabajo
pSUP-10GGG	Ap Tc	(-773/ <i>fixR-10GGG'</i> -' <i>lacZ</i> )	Este trabajo
pSUP-10GC	Ap Tc	(-773/ <i>fixR-10GC'</i> -' <i>lacZ</i> )	Este trabajo
pSUP-35	Ap Tc	(-773/ <i>fixR-35'</i> -' <i>lacZ</i> )	Este trabajo
pSUP-3568	AP Tc	(-773/ <i>fixR-3568'</i> -' <i>lacZ</i> A→C-68)	Este trabajo

**Tabla 2.** Cepas y plasmidos utilizados y construidos en este trabajo

Las conjugaciones bacterianas se realizaron sobre placas de MSY solido sin antibióticos (D-manitol 3 grs/lit;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3 grs/lit;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.3 grs/lit;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 grs/lit;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.01 grs/lit; extracto de levadura 1 gr/lit; bacto agar 15 grs/lit), en donde se puso una relación 5:1:1 de células receptoras, donadoras y ayudadora respectivamente. Después de 72 hrs las conjugaciones se resuspendieron en 1 ml de NaCl 0.9%; tween 20 0.01% y se platearon muestras de 200  $\mu\text{l}$  sobre cajas de MSY con sus antibióticos respectivos. Las colonias transconjugantes que crecieron después de 10 días se picaron sobre cajas de medio mínimo conteniendo 40  $\mu\text{g/ml}$  de X-gal con los antibióticos respectivos y se seleccionaron aquellas colonias que presentaron una coloración azul para su posterior análisis.

**Determinación del patrón de digestión de los diferentes plásmidos utilizados y construidos.** Todas las reacciones de digestión se realizaron en un volumen de 20  $\mu\text{l}$  excepto aquellas reacciones en que se requirió la purificación de una banda, en donde el volumen de la reacción fue 50-100  $\mu\text{l}$ . Cuando las digestiones fueron con dos enzimas diferentes, un solo buffer compatible con ambas fue empleado. Las digestiones se corrieron en geles de agarosa al 1.5%, y las purificaciones de bandas fueron de agarosa de bajo punto de fusión al 1.5%, teñidas en una solución de bromuro de etidio a una concentración de 5  $\mu\text{g/ml}$ .

**Reacciones de ligación.** Las reacciones de ligación se realizaron en un volumen de 50  $\mu\text{l}$ , utilizando para ello 50 ng de vector defosfatado y una concentración de 200 ng de inserto. La reacción se incubo a 16° C por espacio de 12 hrs.

Pasado este tiempo el producto de ligación se concentro con 1-butanol y se lavo con etanol al 70%, para finalmente resuspenderse en 10  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O. De este volumen se utilizo la mitad para transformación por calcio o de 1 a 2  $\mu$ l para electroporar.

**Purificación de plásmido.** La cepa con el plásmido de interés se creció en un tubo de ensaye conteniendo 3 ml de LB con los respectivos antibióticos por espacio de 12 horas. Pasado ese tiempo el cultivo se centrifugo en tubos eppendorf a velocidad máxima hasta haber centrifugado todo el volumen. La pastilla se resuspendió en 200 ml de la solución I y cuando el botón se disolvió completamente se le agregaron 200 ml de la solución II y se agito por inversión lentamente hasta que el lisado quedo completamente transparente, cuando esto sucedió se le agregaron 200 ml de la solución III y se agitó muy despacio hasta que aparecieron precipitados de color blanco. La reacción se centrifugó a velocidad máxima por 5 min. y el sobrenadante se paso a otro tubo limpio.

A partir de este paso dos métodos fueron los que se siguieron, por un lado al sobrenadante puesto en otro tubo se le agregó un mililitro de resina para purificación de DNA (Wizard, Promega) y se agito lentamente invirtiendo el tubo, para posteriormente transferirse la mezcla a una jeringa de 3 ml a la que previamente se le había acoplado una columna especial para este tipo de extracciones.

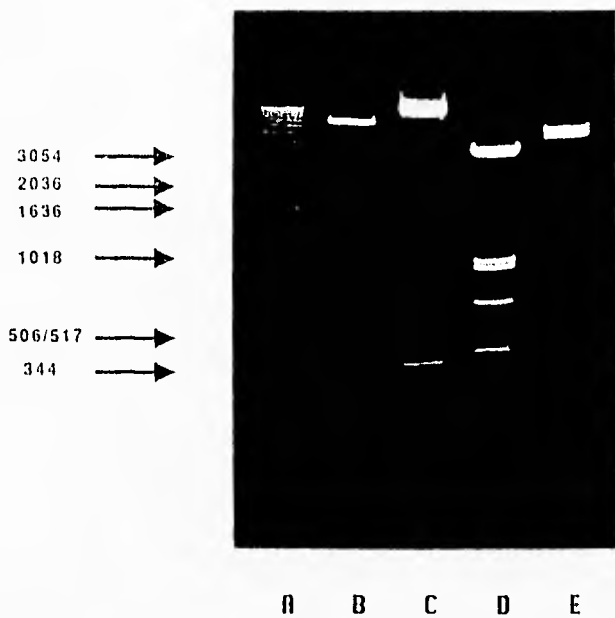
Se hizo pasar la mezcla de resina-DNA a través de la columna y se lavo con 3 ml de solución de lavado, para después centrifugarse por espacio de 2 min a velocidad máxima para descartar los residuos de esta solución. Una vez que se centrifugo, la columna se acoplo a otro tubo limpio y se le agregaron



50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O desionizada a una temperatura de 70-80° C (solo para plásmidos mayores de 10 Kb). El plásmido recuperado se corto con las enzimas de restricción apropiadas y se corrió en un gel de agarosa para determinar el patrón de digestión.

El protocolo alternativo que se uso fue el siguiente. Una vez que se el sobrenadante se transfirió a otro tubo limpio, se le agrego un mililitro de fenol saturado, se agito por espacio de 15 seg. y se centrifugo por 2 min. a velocidad máxima, el proceso se repitió dos veces. La fase acuosa se transfirió a otro tubo limpio y se le agrego un mililitro de cloroformo, se agito por espacio de 15 seg en el vortex y se centrifugo a velocidad máxima, nuevamente la fase acuosa se transfirió a otro tubo limpio y se precipito con un décimo de volumen de acetato de sodio o potasio 3 M y dos volúmenes de alcohol al 100 % dejando a -70° C por 30 min. Pasado ese tiempo, se centrifugo a velocidad máxima por 5 min. y se descarto el sobrenadante, la pastilla de ácidos nucleicos se lavo con un mililitro de alcohol al 70 % y se seco en el Savant, para finalmente resuspenderse en 50 ml de H<sub>2</sub>O desionizada. El DNA se corto con las enzimas apropiadas y se corrió en un gel de agarosa. (Figura 6)

**Purificación de plásmido para secuenciación.** La purificación de plásmido para secuenciación se realizo de una manera un poco diferente a la purificación de plásmido para uso convencional. Se partió un cultivo de 3 ml de LB con los antibióticos apropiados de la cepa de interés, se centrifugo por dos minutos a velocidad máxima y se resuspendio en 250  $\mu$ l de SET (20mM sacarosa, 25 mM EDTA y 10 mM Tris) conteniendo 4 mg/ml de lisosima, posteriormente se le agregaron 350  $\mu$ l de solución de lisis (SDS 1 % y NaOH 0.2 N) para dejar incubando a temperatura ambiente por espacio de 5 min.



**Fig 6. Digestión de vectores. A) Lader 1 kb. B) pSUP202 HindIII-BamHI. C) pRJ7211 HindIII-BamHI. D) pRJ-35 EcoRI-DraI. E) pSUP-35 HindIII-BamHI.**

A continuación se le agrego 250  $\mu$ l de solución neutralizante (acetato de sodio o potasio 3 M) y se dejó incubando en hielo por 10 min. La mezcla se centrifugó por 5 min a velocidad máxima y el sobrenadante se pasó a un tubo limpio. El DNA se precipitó con 2,5 vol de etanol o 0.6 volúmenes de isopropanol centrifugando a velocidad máxima por 5 min, para posteriormente secarlo en el Savant.

El pellet se resuspendió en 200  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O y se le agregaron 10  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 1 M mezclando con el vortex e incubando en hielo por 10 min. La mezcla se volvió a centrifugar a velocidad máxima por 10 min para precipitar el RNA y el sobrenadante se pasó a otro tubo para finalmente precipitarse con 2.5 volúmenes de etanol al 100 % y 1/10 de volumen de acetato de sodio o potasio 3 M. El plásmido se recuperó centrifugando por 10 min a velocidad máxima y resuspendiendo en 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O desionizada.

**Secuenciación de plásmidos mutantes.** Debido a que en la construcción de los plásmidos mutantes, el fragmento mutado proveniente de PCR se intercambió por el fragmento silvestre para cada caso, no existió un método de selección alternativo para identificar los plásmidos silvestres de los mutados, por lo que la selección de estos últimos fue necesario hacerlo a través de la secuenciación de las regiones de interés.

Para la secuenciación de los plásmidos mutantes se utilizó el método de chain-terminating desarrollado por Sanger et al (1977). Para esto se utilizó el kit de secuenciación por PCR (Thermo Sequenase Cycle Kit, Amersham). En un tubo de 0.5 ml se mezclaron 12  $\mu$ l de DNA (100-400 ng) previamente purificado, 2  $\mu$ l de buffer de reacción, 1  $\mu$ l (1 pmol/ $\mu$ l) de oligo marcado P<sup>32</sup> (200,000-300,000 cpm) y 2  $\mu$ l de Termosequenasa.

Posteriormente en cuatro tubos marcados como G, A, T y C se mezclaron 4  $\mu$ l de una mezcla de terminadores de acuerdo a la siguientes concentraciones:

150  $\mu$ M dATP, 150  $\mu$ M dCTP, 150  $\mu$ M 7-deaza-dGTP, 150  $\mu$ M dTTP y 1.5  $\mu$ M ddGTP; G  
150  $\mu$ M dATP, 150  $\mu$ M dCTP, 150  $\mu$ M 7-deaza-dGTP, 150  $\mu$ M dTTP y 1.5  $\mu$ M ddATP; A  
150  $\mu$ M dATP, 150  $\mu$ M dCTP, 150  $\mu$ M 7-deaza-dGTP, 150  $\mu$ M dTTP y 1.5  $\mu$ M ddTTP; T  
150  $\mu$ M dATP, 150  $\mu$ M dCTP, 150  $\mu$ M 7-deaza-dGTP, 150  $\mu$ M dTTP y 1.5  $\mu$ M ddCTP; C

y 3.5  $\mu$ l de la mezcla de DNA-Termostequisomasa, para finalmente cargarse cada tubo con 10  $\mu$ l de aceite mineral. La reacción de PCR se llevo a cabo por 50 ciclos a 95° C por 30 sec (meltting), 60° C por 30 sec (annealing) y 72° C por 120 sec (extensión). Pasados los 50 ciclos de PCR, las reacciones se pararon con 4  $\mu$ l de stop solution y se limpiaron del aceite mineral. Las muestras se cargaron en un gel de acrilamida al 6 % previo calentamiento de las muestras a 95° C por 5 min. Finalmente el gel se expuso toda la noche en placa para rayos X a -70° C.

**Ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa.** Las cepas de *B. japonicum* se crecieron aeróbicamente en PSY con sus respectivos antibióticos, a una temperatura de 30° C con agitación constante por espacio de 60 horas hasta alcanzar una DO<sub>560</sub> de 0.5 a 0.8. Se tomaron dos mililitros de cada cultivo y se centrifugaron a velocidad máxima por dos minutos, el sobrenadante se decanto y las células se resuspendieron en 850  $\mu$ l de buffer Z.

Las células se lisaron con 70  $\mu$ l de SDS al 0.2% y 30  $\mu$ l de cloroformo agitando suavemente. Ya lisadas las células se incubaron a 30° C por cinco minutos. La reacción se inició con 50  $\mu$ l de ONPG (*o*-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactoside) a una concentración de 16 mg/ml, tomando el tiempo hasta que esta alcanzó un color amarillo claro. La reacción se paró con 500  $\mu$ l de bicarbonato de sodio 1 M. Se determinó su DO<sub>420</sub> y se calcularon las unidades Miller de acuerdo a la siguiente fórmula.

$$\text{U.M.} = 1000 (\text{D.O. } 420 \text{ nm} / t \text{ v D.O. } 560 \text{ nm})$$

En donde la cantidad de *o*-nitrofenol es es proporcional a la concentración de enzima. Para determinar la actividad  $\beta$ -galactosidasa en condiciones de crecimiento anaerobio, las cepas de *B. japonicum* se crecieron sin antibióticos en botellas de 35 ml con 30 ml de YEM por espacio de 60 hrs. hasta alcanzar una DO<sub>560</sub> de 0.5 a 0.7. La cuantificación de  $\beta$ -galactosidasa en estas condiciones de crecimiento se calculó como se describió anteriormente.

**Células competentes de Ca<sup>++</sup>.** Se puso un cultivo de la cepa de interés en 3 ml de LB líquido con sus antibióticos apropiados por espacio de 12 hrs. Con este cultivo se inoculó un matraz con 100 ml de LB sin antibióticos y se dejaron crecer a 37° C hasta alcanzar una D.O. de 0.4-0.6 a 540 nm. Las células se centrifugaron 5 min. a 5000 r.p.m. y se resuspendieron en medio volumen del inicial con CaCl<sub>2</sub> 0.1 M manteniéndose en hielo por aproximadamente 30 min. Las células se volvieron a centrifugar 5 min. a 5000 r.p.m. para finalmente resuspenderse en un décimo del volumen original con CaCl<sub>2</sub> 0.1 M. Las células se mantuvieron en alícuotas de 100  $\mu$ l por tiempo indefinido a -70° C con glicerol al 20% o con DMSO 88  $\mu$ l/ml.

**Células electrocompetentes para electroporación.** Se creció la cepa de interés en un matraz con 25 ml de LB líquido con antibióticos apropiados a 37° C por 12 hrs con agitación constante. De este cultivo se tomaron 5 ml y se inoculó un matraz con un litro de LB líquido sin antibióticos, se incubó a 37° C hasta alcanzar una D.O. de 0.6-0.8 a 600 nm. Una vez que las células alcanzaron la D.O. apropiada se mantuvieron en hielo por espacio de 15 min y posteriormente se centrifugaron a 5000 r.p.m.

Las células se lavaron con 1 litro de agua fría desionizada estéril y se centrifugaron nuevamente como en el paso anterior, se resuspendieron en 0.5 litros de agua y se volvieron a centrifugar. Las células nuevamente se resuspendieron pero ahora en 20 ml de glicerol al 20% para finalmente centrifugarse y resuspenderse en 4-5 ml de glicerol al 20%. Se hicieron alícuotas de 50 µl cada una y se mantuvieron por tiempo indefinido a -70° C.

**Transformación de células competentes de Ca<sup>++</sup>.** Se utilizaron 100 µl de células competentes de Ca<sup>++</sup> para cada transformación. En un tubo de 1.5 ml se mezclaron las células competentes y 3-5 µl de DNA (100 ng/µl). La mezcla se mantuvo en hielo durante 45 min, y posteriormente se les dio un choque térmico a 42° C durante 90 segundos. Pasado ese tiempo se colocaron en hielo durante 2 min y se les agregó 1 ml de LB sin antibióticos para incubarse durante 1 hora a 37° C en agitación constante. Las células se platearon a diferentes diluciones en cajas de LB con antibióticos apropiados.

**Electroporación de células electrocompetentes.** Las células fueron descongeladas a temperatura ambiente y mantenidas en hielo. 50  $\mu$ l de células fueron transferidas a un tubo de 1.5 ml y se le adicionaron 1-2  $\mu$ l de DNA (50-100 ng/ $\mu$ l). La mezcla de células-DNA se colocó entre los electrodos de la celda para electroporar (0.1 cm) previamente enfriada y se pasó a la cámara de seguridad en donde el pulso fue aplicado.

Inmediatamente después del pulso, las células fueron removidas de la celda para electroporar y transferidas a un tubo de ensayo conteniendo 1 ml de SOC, (10mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub> y 20 mM de glucosa) para dejar recuperando a las células por espacio de una hora . Las células fueron seleccionadas en cajas de LB con sus antibióticos apropiados.

El electroporador fue programado para liberar una descarga de 1.8 Kv/cm con una resistencia de 200  $\Omega$  y una capacitancia de 25  $\mu$ FD.

**Construcción del plásmido pRJ7211.** El fragmento de 0.84 kb EcoRI-AvaII del operón *fixRnifA* de *B. japonicum* se clonó en el plásmido pMC1403 el cual fue previamente digerido con las enzimas EcoRI y BamHI. El sitio AvaII del fragmento de 0.84 kb fue rellenado y un linker con un sitio BamHI fue ligado. Toda la región promotora de *fixR* mas 14 codones fueron fusionados al gene de la  $\beta$ -galactosidasa dando como resultado el plásmido pRJ7211. (Fig 7)

**PCR (Polimerase Chain Reaction).** En 1985, Kary Mullis describió el proceso conocido como PCR (polimerase chain reaction), desde entonces a la fecha esta técnica se ha convertido en uno de los pilares de la biología molecular.

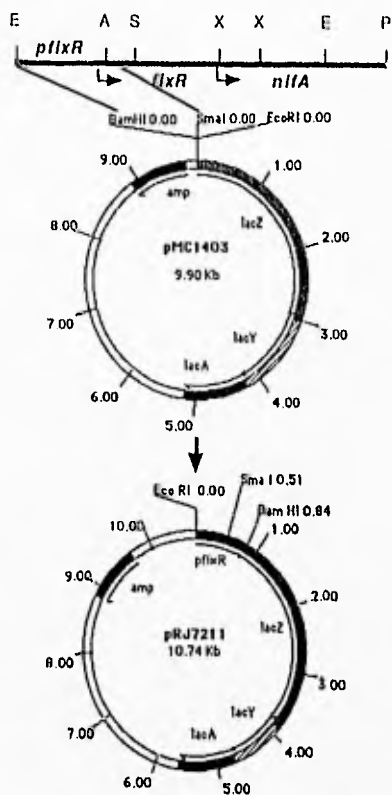


Fig 7. Construcción del Plásmido pRJ7211. El fragmento de 0.84 Kb *Eco*RI-AvaII del operón *fixnifA* se clonó en el Plásmido pMC1403. El sitio *Ava*II se relleno y un *linker* con un sitio *Bam*HI fue ligado. Toda la región promotora de *fixR* mas 14 codones fueron fusionados al gene *lacZ*.



La técnica de PCR es un método enzimático utilizado para la amplificación in vitro de fragmentos específicos de DNA, la reacción utiliza dos oligonucleótidos como "primers", los cuales hibridizan sobre cadenas opuestas, flanqueando la secuencia de DNA a ser amplificada. La elongación de los "primer" es catalizada por la enzima Taq DNA polimerasa, una polimerasa termoestable aislada de una eubacteria Termófila (*Thermus aquaticus*).

La reacción consiste de una repetida serie de ciclos que involucran desnaturalización de templado, apareamiento de "primer" y extensión de estos por la DNA polimerasa. Los productos de la extensión de "primers" en un ciclo dado pueden servir como templado para un siguiente ciclo y así sucesivamente, de tal manera que el número de fragmentos de DNA a ser amplificados se duplica con cada ciclo.

**Oligonucleótidos.** Para la realización del presente trabajo 6 oligonucleótidos fueron utilizados.

<b>Oligo</b>	<b>Secuencia 5' - 3'</b>
Mut-10	CGC AAA TCC NGC NNC GCG TGC G
Mut-35	GCA TTT ACG GGC TTG GCA GTG GC
5' Mut	TGT TGG GGC GGC TAA
Tail	AGC CGA TCG AGA TCT CTG GCG AAA GGG GGA TGT G
Tapón	GGA ATA GCC GAT CGA GAT CT
Lac4	AGT TGG GTA ACG CCA GGG

N = A o C o G o T

Las letras en **Negritas** son los cambios realizados.

N = A o C o G o T

Las letras en **Negritas** son los cambios realizados.

## Resultados y discusión

**Mutagénesis oligo dirigida.** Con el fin de demostrar que mediante mutaciones específicas en las regiones promotoras, era posible la identificación de nucleótido esenciales, así como una secuencia consenso, la obtención de fragmentos mutados en las regiones promotoras -10 y -35 se realizó mediante la técnica de PCR.

Para la región -10 un conjunto de 64 diferentes oligonucleótidos se generaron, esto debido a que tres fueron las posiciones que se mutaron y que se intercambiaron por sus cuatro posibles nucleótidos, mientras que para la región -35 solamente dos fragmentos fueron los que se generaron, uno con los 4 cambios específicos planeados y otro más con los mismos 4 cambios además de una transversión adicional de A por C en la región -68. La selección de las posiciones a mutar se hizo en base a un alineamiento previamente realizado y que mostró que al menos esas tres posiciones fueron las conservadas para este promotor y que no se afectaba el par GC -12 esencial para  $\sigma^{54}$ .

De los 64 posibles fragmentos generados para la región -10 solamente se generaron tres mutantes, con las cuales se alcanzó uno de los objetivos particulares que fue el de la separación de los promotores.

Para estas reacciones se utilizó el plásmido pRJ7211 como templado para la obtención de fragmentos mutados en la región -10 y en la región -35, y un producto de PCR, proveniente de la cepa 8091 de *B. japonicum* que porta una mutación en la región -68 integrada en el cromosoma para generar fragmentos con mutaciones en la región -35 con la mutación adicional en la región -68. Las reacciones de PCR se hicieron de manera individual y se requirieron 4 oligonucleótidos hasta la etapa final para cada reacción.

Inicialmente se generaron fragmentos de 191 y 213 pb para las regiones -10 y -35 respectivamente y estos mismos fragmentos se utilizaron posteriormente como megaprimer para la generación final de fragmentos de 467 pb. Para la obtención de los fragmentos pequeños se requirieron los oligonucleótido denominados como Mut-10, Mut-35 y Tail, además del plásmido pRJ7211 que sirvió como templado. Los oligos Mut-10 y -35 portaron los cambios de nucleótido a realizar, y el oligonucleótido tail que se utilizó para ambas reacciones portó 18 nucleótido que fueron complementarios al extremo 3' y además 15 nucleótido que no fueron complementarios a la cadena a amplificar.

Las reacciones de PCR se hicieron por 25 ciclos a temperaturas de 94, 55 y 72° C y a tiempos de 1,1 y 2 min respectivamente. Una vez que la reacción de PCR terminó, las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1.5%. (Fig 8)

Para la obtención de productos finales de 467 pb se realizó una segunda reacción de PCR, en donde los productos de la primera reacción se utilizaron como megaprimer. En esta segunda reacción se utilizaron los oligonucleótido 5' Mut y Tapón, así como los productos de PCR de 191 y 213 pb. El plásmido pRJ7211 y el fragmento de PCR proveniente de la cepa 8091 de *B. japonicum* (A (-68) -> C) fueron utilizados como templado.

El oligo 5' Mut hibrida en el extremo 5' de la región promotora, mientras que el oligo tapón es complementario a los 18 nucleótido que no hibridizan al generar los fragmentos pequeños, esto para asegurarnos que los fragmentos que finalmente se generaran portaran todas las mutaciones en los sitios deseados. Como mencione anteriormente, se requirieron fragmentos que portaran además de las mutaciones deseadas en la región -35 una mutación de A por C en la región -68, por lo que fue necesario la utilización del producto de PCR de 467 pb de la cepa 8091 como templado.

**Estrategia de mutagénesis para las regiones  
-10 y -35 de *B. japonicum***

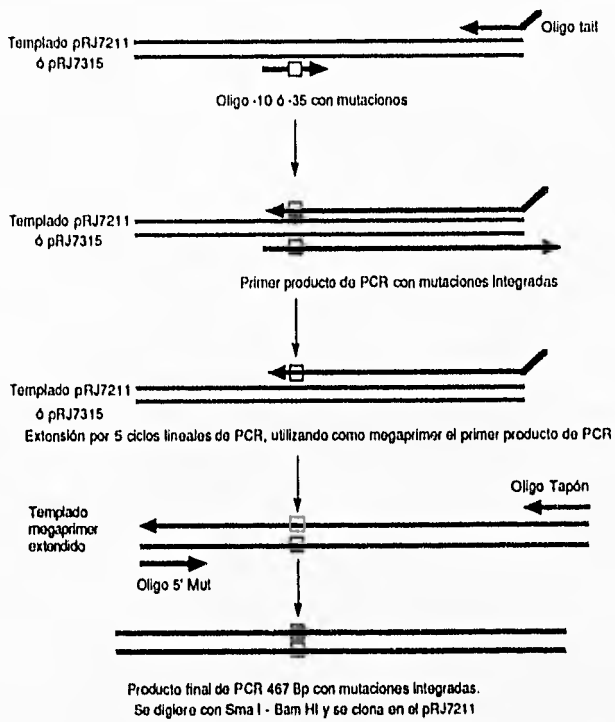


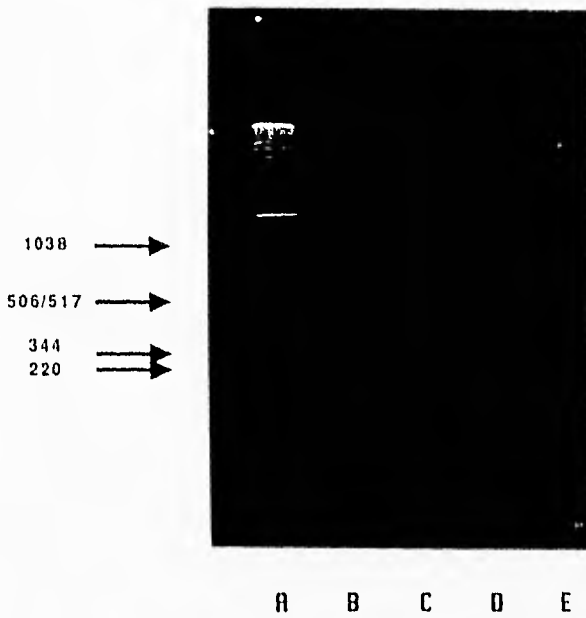
Figura 8. Estrategia de Mutagenesis mediante PCR para las regiones -10 y -35 del operón *fixRnifA* de *B. japonicum*.

Primero los fragmentos se extendieron durante 5 ciclos lineales a los mismos tiempos y temperaturas que para la primera reacción y posteriormente se le adicionó a la reacción la mezcla de oligos 5' Mut-Tapón para la generación de fragmentos de 467 pb. La reacción fue idéntica en tiempo y temperaturas como en el caso anterior, de manera similar los productos de las reacciones se corrieron en un gel de agarosa al 1.5 %. (Figura 9)

**Construcción de los plásmidos pRJ-10GGG, pRJ-10GC, pRJ-35 y pRJ-3568.** El primer paso en la mutagénesis fue la construcción de estos plásmidos, con las mutaciones en las regiones promotoras fusionadas al gene lacZ, en un vector que fuera replicable en *E. coli*, para posteriormente a partir de estos plásmidos construir los que fueran capaces de movilizarse a *B. japonicum* mediante conjugación.

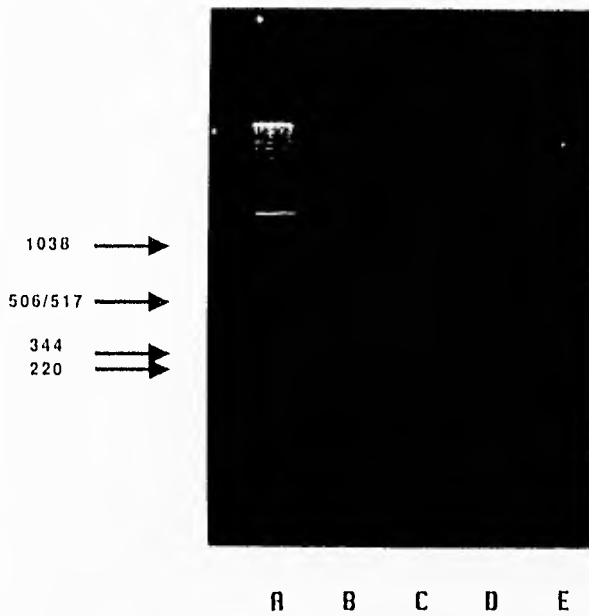
Estos plásmidos se derivan del plásmido pRJ7211. Los fragmentos de PCR de 467 pb con las mutaciones en los sitios deseados se purificaron con fenol-cloroformo, se precipitaron con 1-butanol y finalmente se resuspendieron en 50 µl de H<sub>2</sub>O. Para el caso de los fragmentos de 467 pb con mutaciones en la región -10, antes de su clonación en el plásmido pRJ7211 se cortaron con la enzima de restricción MluI, ya que fragmentos mutados en una posición del hexanucleotido que reconoce esta enzima hicieron que este sitio se perdiera, de tal manera que esta digestión enriqueció el juego de fragmentos mutados para esta región.

Los fragmentos con las mutaciones en -10 y -35 se cortaron con las enzimas de restricción SmaI y BamHI y con el fin de separar los fragmentos, el producto de la digestión se corrió en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1.5 % . Esta digestión dio como productos finales 3 fragmentos, uno de 35 pb, otro mas de 331 y uno de 101 pb.



**Figura 9. Productos de PCR. A) Ladder 1kb. B) Fragmento de 191 pb. C) Fragmento 212 pb. D) Fragmento de 467 pb. E) Fragmento digerido SmaI-BamHI de 331pb.**





**Figura 9. Productos de PCR. A) Ladder 1kb. B) Fragmento de 191 pb. C) Fragmento 212 pb. D) Fragmento de 467 pb. E) Fragmento digerido SmaI-BamHI de 331pb.**

La banda que correspondió a 331 pb se cortó y se purificó con fenol-cloroformo para precipitarse con 1-butanol y finalmente se resuspendió en 10  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O.

Paralelamente, el plásmido pRJ7211 se cortó con el mismo juego de enzimas que para los fragmentos liberando un fragmento de 331 pb similar en tamaño al que se liberó de la digestión de los productos de PCR. La digestión de igual manera, se corrió en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1.5 %, de este gel se cortó la banda que correspondió al vector (10.5 kb) y se purificó con fenol-cloroformo, se precipitó con 1-butanol y se resuspendió finalmente en 10  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O. Posteriormente el vector se defosfato con fosfatasa alcalina, para evitar que al momento de ligar el vector sin inserto pudiera religarse sobre si mismo y así dar falsos positivos.

Los fragmentos de PCR de 331 pb producto de la digestión se ligaron al vector. El producto de estas ligaciones se utilizó para transformar células competentes de calcio de la cepa DH5 $\alpha$ , las cuales se seleccionaron sobre cajas de LB conteniendo 200  $\mu$ g/ml de ampicilina. La identificación de plásmidos mutantes se realizó mediante secuenciación de la región promotora, ya que esta fue la única manera de identificarlos pues lo único que se hizo fue una sustitución de fragmentos silvestres por mutantes. (Fig 10)

**Construcción de los plásmidos pSUP-10GGG, pSUP-10GC, pSUP-35 y pSUP-3568.** Debido a que los plásmidos pRJ previamente construidos no fueron capaces de movilizarse de *E. coli* a *B. japonicum* mediante conjugación, fue necesaria la subclonación de las regiones promotoras fusionadas al gene *lacZ* en un plásmido movilizable. Estos plásmidos se derivan del pSUP202 en el cual se encuentra clonada la secuencia mob del plásmido RP4 necesaria para la movilización.

El plásmido pSUP202 se linearizó con la enzima de restricción NcoI, posteriormente se rasuro de sus extremos con la nucleasa mungbean y finalmente se cortó con la endonucleasa EcoRI. De esta digestión se liberó un fragmento de 300 pb quedando el vector con un extremo cohesivo EcoRI y con otro romo por la acción de la nucleasa sobre el sitio NcoI.

Paralelamente, las cepas con los plásmidos pRJ-10GGG, pRJ-10GC, pRJ-35 y pRJ-3568 se crecieron y los plásmidos se purificaron y se cortaron EcoRI-DraI obteniéndose un fragmento de 3.3 kb para cada caso. Estos fragmentos portaron toda la región promotora del operón *fixRnifA*, fusionado al gene *lacZ*. Los productos de esta última digestión y el vector pSUP202 cortado EcoRI-NcoI, rasurado y defosfatado se ligaron y se seleccionaron colonias que fueran Tc<sup>r</sup>, Ap<sup>r</sup> y Cm<sup>r</sup>. La identificación de los plásmidos se realizó en base al patrón de digestión, ya que este se modificó cuando el inserto EcoRI-DraI fue clonado en el vector (fig 11 y 12).

**Integración de las fusiones transcripcionales *fixR'*-'*lacZ* en el cromosoma de la cepa silvestre de *B. japonicum*.** Para el estudio del efecto que las mutaciones tuvieron sobre las regiones -10 y -35, fue necesario la integración de las fusiones transcripcionales *fixR'*-'*lacZ* en el cromosoma de *B. japonicum*, a través de un proceso de recombinación homóloga. El cromosoma silvestre de *B. japonicum* (USDA 110 spc4) fue el blanco para estas integraciones. La integración fue realizada mediante conjugación triparental transfiriendo los plásmidos respectivos hacia la cepa receptora y seleccionando transconjugantes resistentes a tetraciclina, esta resistencia es codificada por el pSUP202.

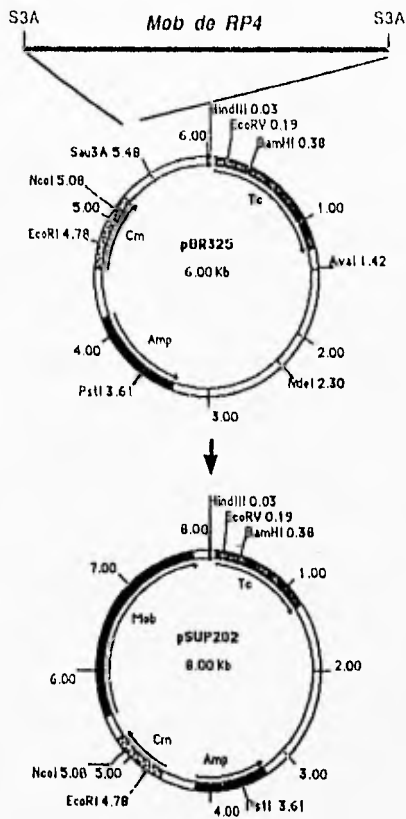


Fig 11. Construcción del plásmido pSUP202. Este plásmido deriva del pBR325. El fragmento Sau3A de 2.0 Kb del plásmido RP4 fue clonado en el plásmido pBR325 parcialmente digerido con Sau3A. Sitios de restricción: S3A (Sau3A).

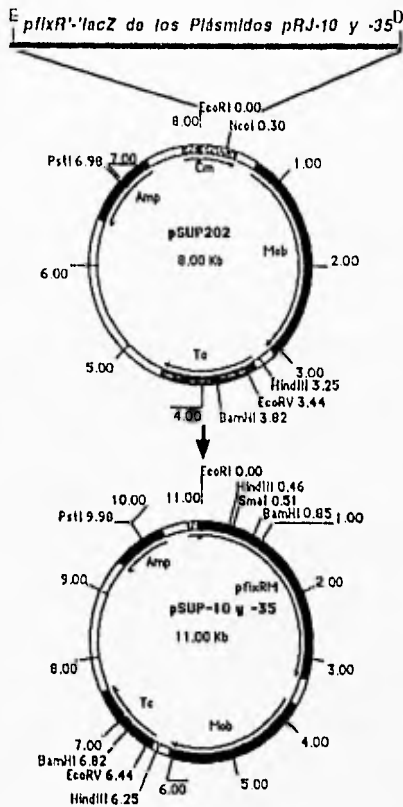


Fig 12. Construcción de los Plásmidos pSUP -10GGG, pSUP-10GC, pSUP-35 y pSUP-3568. Los Plásmidos pRJ-10 y -35 se cortaron con las enzimas de restricción EcoRI-DraI, liberando un fragmento de 3.3 Kb. El Plásmido psup 202 fue abierto EcoRI-NcoI. El sitio NcoI fue rasurado y el fragmento de 3.3 Kb fue ligado. Sitios de restricción: E (EcoRI); D (DraI).

Los plásmidos pSUP-10GGG, pSUP-10GC, pSUP-35 y pSUP-3568 fueron introducidos a la cepa 110 spc4 de *B. japonicum* por medio de cruza triparentales utilizando el plásmido pRK2013 como ayudador (Fig 13).

**Confirmación de la inserción de las mutaciones en el cromosoma silvestre de *B. japonicum*.** La identificación de transconjugantes de *B. japonicum* fue de vital importancia para conocer de que manera se había dado la integración de las mutaciones, ya que la recombinación se pudo haber generado de dos maneras distintas. Una en donde las regiones mutadas quedaran en la región "upstream" del gene *lacZ*, y la otra en donde estas mismas mutaciones quedaran "downstream" del gene reportero. Para nuestros propósitos, la primera forma de recombinación fue la requerida, ya que de esta manera podíamos monitorear a través de la expresión de *lacZ* el comportamiento de estas mutaciones, mientras que en la segunda forma, la menos probable pero la mas interesante, podríamos ver el efecto fisiológico que estas mutaciones tendrían sobre la expresión del operón *fixPnifA*.

Un acercamiento primario de que las transconjugantes portaron la fusión transcripcional fue mediante la técnica de PCR, la reacción se realizó utilizando como templado DNA total de las colonias que crecieron y un par de oligonucleótido (5' Mut y Lac4), complementarios por un lado al extremo 5' de la región promotora y otro que complementó a 30 pb downstream de la fusión transcripcional, de tal manera que solamente aquellas colonias que portaron la fusión transcripcional dieron un producto de 419 pb. Como control se realizó una reacción de PCR en donde se utilizó como templado DNA total de la cepa 110 spc4. Esta cepa no dio ningún producto puesto que no contiene el gene *lacZ*.

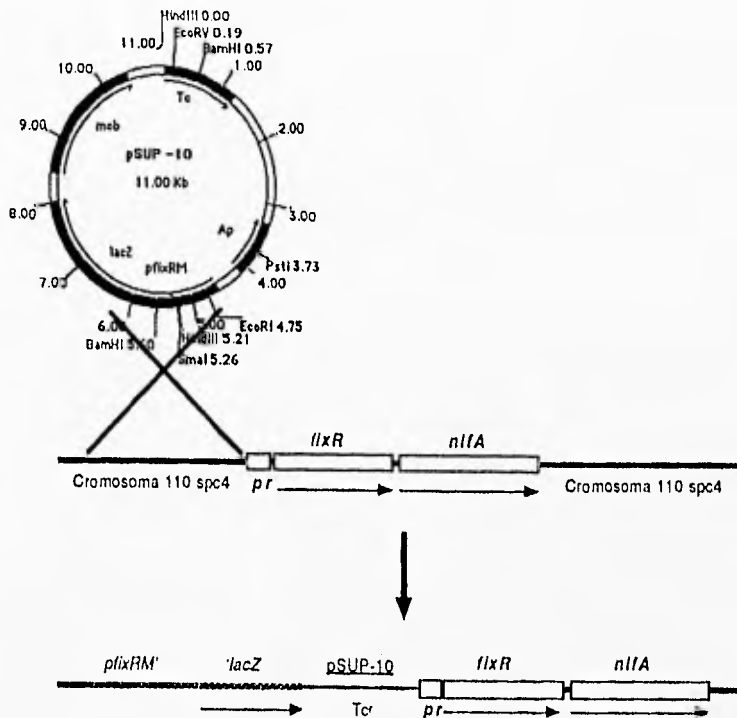


Fig 13. Mecanismo de Integración de las fusiones transcripcionales *plixRM'*-*lacZ* on el cromosoma silvestre de *B. japonicum*.

La secuenciación posterior de los productos de PCR de aquellas colonias que crecieron y que tuvieron el fenotipo esperado, nos indico que efectivamente las mutaciones estaban integradas en el cromosoma y que ademas la integración se había dado de la manera correcta. La secuenciación de estos productos se realizó de la misma manera en que se secuenciaron los plásmidos mutantes (Fig 14 y 15).



ACTIVIDAD  $\beta$ -GALACTOSIDASA

CEPA	GENOTIPO	AEROBIO	ANAEROBIO
110 spc4	<i>Wild Type</i>	0.0	0.0
8085	<i>fixR'-'lacZ</i>	541.0	961.0
N8091	<i>fixR'-'lacZ A-&gt;C/-68</i>	10.2	1.1
W-10GGG	<i>pfixRGGG'-'lacZ</i>	4.1	1.1
W-10CG	<i>pfixRCG'-'lacZ</i>	26.0	741.0
W-35	<i>pfixR-35'-'lacZ</i>	1710.0	2100.0
W-65/-68	<i>pfixR-35'-'lacZ A-&gt;C -68</i>	22.5	737.0

Tabla 3. Actividad  $\beta$ -galactosidasa de cepas mutantes y cepas control. (Unidades Miller)

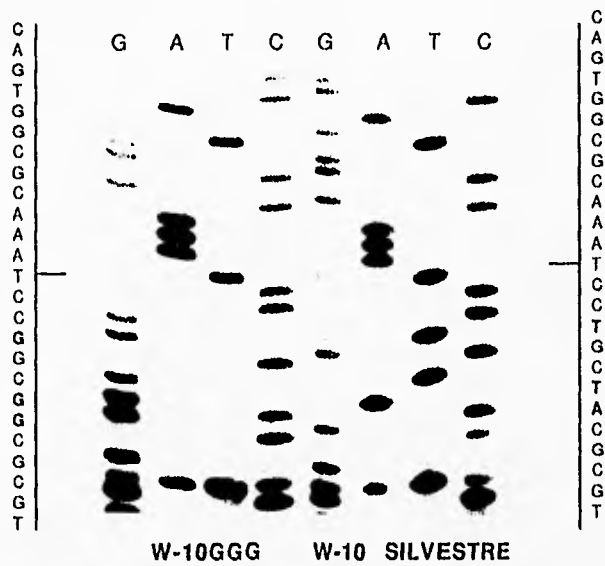


Fig 14. Comparación de secuencias de la cepa W-10GGG y la cepa silvestre

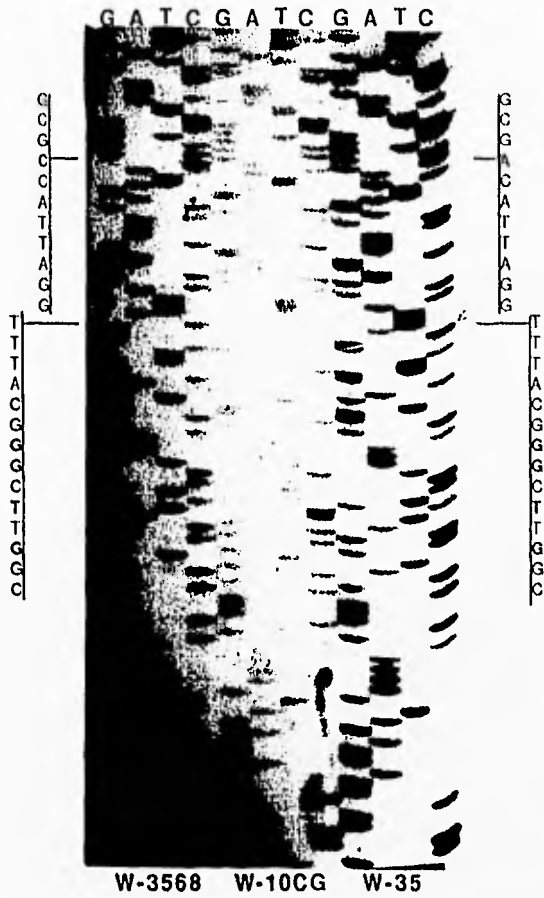


Fig 15. Comparación de secuencias de las cepas W-3568, W-10CG y W-35

**Análisis de las mutaciones integradas en el cromosoma.**  
 Los nucleótido alrededor de GC (-13,-12) son esenciales para el buen funcionamiento de ambos promotores. De acuerdo a los objetivos planteados al inicio del trabajo se obtuvieron cuatro cepas de *B. japonicum* silvestre con mutaciones en los sitios deseados, dos cepas con mutaciones en la región -10 y 2 cepas con mutaciones en la región -35, una silvestre en la región -68 y otra con un cambio de A por C en esa misma región.

Para la región -10 se obtuvo una cepa con cambios a G en las posiciones -14, -11 y -10 y otra con cambios hacia CG en las posiciones -11 y -10 (Fig 16)

-35	-10	
TTTACGTACAT_CGCAGTGGCGCAAATCC	IGCTA	CGCGTGC
TTTACGTACAT_CGCAGTGGCGCAAATCC	GCGCG	CGCGTGC
TTTACGTACAT_CGCAGTGGCGCAAATCC	TGCC	CGCGTGC

-10 Silvestre  
 -10 GGG  
 -10 CG

Fig 16. Comparación de secuencias de -10 silvestre, -10 GGG y -10CG

En base a los resultados presentados en la tabla 3, podemos determinar que cambios hacia G en las posiciones -14, -11 y -10 causan un fenotipo drástico "down" en la expresión de ambos promotores, sin embargo un cambio de CG en las posiciones -11 y -10 respectivamente solamente afectan la expresión del promotor independiente de NifA, mientras que el dependiente solamente se ve afectado en un pequeño porcentaje.

Deducimos entonces que las posiciones -14 y -11 son esenciales para el funcionamiento del promotor independiente de NifA.

Ya que de acuerdo a los datos obtenidos de la mutante CG en -11 y -10, la expresión a partir del promotor independiente de  $\sigma^{54}$  aun cuando la T -14 se mantiene invariable, pero la T -11 se cambia a C y la A -10 por G la expresión a partir de este promotor se ve afectada totalmente, mientras que la expresión a partir del promotor dependiente de  $\sigma^{54}$  solo se ve marginalmente reducida.

Ahora bien para este ultimo caso de la mutación de A por G en esta ultima mutante al parecer responde al factor sigma alternativo mientras que el reconocimiento por parte del factor  $\sigma^{54}$  de acuerdo a los datos arrojados para la esta doble mutante no es afectado o solo marginalmente, pero faltaría tener esa mutante en un contexto individual para determinar realmente a que factor sigma responde.

Al parecer el cambio de T por G en la posición -14 es lo que hace que el promotor dependiente de  $\sigma^{54}$  se vea afectado y que por esta razón no podamos detectar actividad a partir de este promotor en la triple mutante en donde todos los cambios son hacia G, y que este cambio de una base pirimidica por una purica en esta posición es lo que realmente hace que se afecte la transcripción a partir de este promotor.

**Mutaciones en la región -35, que acercan su secuencia a una secuencia consenso, hacen que el promotor se vuelva "up" pero no lo hacen independiente del activador transcripcional.** En la región -35 dos cepas con las mutaciones integradas se obtuvieron. Una con las mutaciones en la región -35 en donde se cambian las posiciones -35, -34, -32 y -30 y otra con las mismas mutaciones en esa posición además de un cambio de A por C en la región -68 (Fig 17).

-68

-35

GCGACATTAGGACGCAAAACGGAAGCGCATTTACGTTACATCGCA -35 *Silvestre*  
GCGACATTAGGACGCAAAACGGAAGCGCATTTACGGGCTTGGCA -35 *mutante*  
GCGCCATTAGGACGCAAAACGGAAGCGCATTTACGGGCTTGGCA -3568 *mutante*

Fig. 17. Comparación de secuencias de -35 *Silvestre* y -35 *mutante* y -3568 *mutante*.

Como podemos ver en la tabla 3 la expresión del operón a partir de la región -35 mutada, claramente nos indica que de acuerdo a la sustitución de los cambios introducidas en estas posiciones, el promotor independiente de NifA, triplica el nivel de transcripción que se observa en una cepa *Silvestre*, acorde a la hipótesis planteada al inicio del trabajo.

Sin embargo estos cambios en las posiciones arriba señaladas, no son suficientes para hacer que el promotor sea independiente del activador transcripcional al que esta sujeto en condiciones de crecimiento aerobio, ya que como podemos ver la expresión de esta cepa con la mutación en la región -68 (que es el sitio de unión del activador transcripcional) es muy semejante al de la mutante CG en la región -10 y es prácticamente nula, por lo que se deduce que la presencia del activador es necesaria para que se de la expresión de este promotor en estas condiciones de crecimiento.

Es muy probable que la independencia del activador transcripcional se alcance cuando se tenga una secuencia consenso para ambas regiones -10 y -35 en un mismo contexto, ya que como podemos observar las mutaciones de manera independiente para las regiones -10 y -35 no nos permiten alcanzar este objetivo.

Cabe la posibilidad también de que no se pueda hacer que el promotor se vuelva independiente del activador aun con una secuencia consenso, y de que el sigma alternativo tenga propiedades semejantes al factor  $\sigma^{54}$  en base al requerimiento de un activador transcripcional que se una en la región upstream para permitir el paso de un complejo de promotor cerrado a un complejo de promotor abierto. Aunque para este caso no existen reportes de la necesidad de activadores transcripcionales involucrados en el paso de un complejo de promotor cerrado a un complejo de promotor abierto en promotores del tipo -10/-35, sino que mas bien la función de tales activadores en este tipo de promotores es para el buen posicionamiento de la RNA polimerasa holoenzima para el inicio de la transcripción.

## Conclusiones

La presencia de dos promotores sobrelapados, que responden a dos RNA polimerasas holoenzimas, responde a la necesidad de un mecanismo eficaz para la producción de ambas proteínas en el momento indicado y bajo las condiciones adecuadas.

En la región -10, -12 los dos promotores presentan nucleótido que son esenciales para ambos, además de que también presentan nucleótido indispensables para cada uno de ellos, de tal manera, que es posible su separación mediante la manipulación eficaz de los nucleótido en esta región. Esta separación se alcanzó cuando se mutaron ciertas posiciones en la región -10 sin que estos cambios afectaran la expresión del promotor del tipo -24/-12.

La funcionalidad del promotor del tipo -35/-10 quedo demostrado cuando la región -35 se acerco al "consenso" mediante mutagénesis y esto hizo que ahora el promotor se reconociera mas eficazmente por la RNA polimerasa conteniendo algún otro factor  $\sigma$  diferente de  $\sigma^{54}$ .

No se logró la independencia del promotor del tipo -35/-10 de la activación positiva a la que se encuentra sujeta, aun cuando se paso de una región -35 pobre a una región -35 "consenso", tal vez porque se requiere además que la región -10 también sea lo mas cercano posible al consenso.

El paso a seguir dentro de este trabajo es el de alcanzar la independencia de este promotor del activador que se une a la región -68, como un modelo para la identificación de los dos moléculas que se encuentran involucradas en la transcripción de este operón.



## Conclusiones

La presencia de dos promotores sobrelapados, que responden a dos RNA polimerasas holoenzimas, responde a la necesidad de un mecanismo eficaz para la producción de ambas proteínas en el momento indicado y bajo las condiciones adecuadas.

En la región -10, -12 los dos promotores presentan nucleótido que son esenciales para ambos, además de que también presentan nucleótido indispensables para cada uno de ellos, de tal manera, que es posible su separación mediante la manipulación eficaz de los nucleótido en esta región. Esta separación se alcanzó cuando se mutaron ciertas posiciones en la región -10 sin que estos cambios afectaran la expresión del promotor del tipo -24/-12.

La funcionalidad del promotor del tipo -35/-10 quedo demostrado cuando la región -35 se acerco al "consenso" mediante mutagénesis y esto hizo que ahora el promotor se reconociera mas eficazmente por la RNA polimerasa conteniendo algún otro factor  $\sigma$  diferente de  $\sigma^{54}$ .

No se logró la independencia del promotor del tipo -35/-10 de la activación positiva a la que se encuentra sujeta, aun cuando se paso de una región -35 pobre a una región -35 "consenso", tal vez porque se requiere además que la región -10 también sea lo mas cercano posible al consenso.

El paso a seguir dentro de este trabajo es el de alcanzar la independencia de este promotor del activador que se une a la región -68, como un modelo para la identificación de los dos moléculas que se encuentran involucradas en la transcripción de este operón.

ESTA TESIS DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Por un lado la proteína activadora diferente de NifA que se une a la región -68 y que se encuentra en extractos crudos de proteína de *B. japonicum*, y por el otro el factor  $\sigma$  que reconoce las secuencias de los promotores del tipo -35/-10 de los genes *glnA*, *fbcFH* y *fixR*.

## Bibliografía

1. Acuña, G., A. Alvarez-Morales., M. Hahn, and H. Hennecke. 1987. A vector for site-directed, genomic integration of foreign DNA into soybean root-nodule bacteria. *Plant Mol. Biol.* 9:41-50.
2. Arnold, W., A. Rump, W. Klipp, U. B. Priefer, and A. Pühler. 1988. Nucleotide sequence of a 24206-base pair DNA fragment carrying the entire nitrogen fixation gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Mol. Biol.* 203:715-738.
3. Barrios, H., H.-M. Fischer., H. Hennecke, and E. Morett. 1994. Overlapping promoters for two different RNA polimerase holoenzymes control *Bradyrhizobium japonicum nifA* expresion. *J. Bacteriol.* 177:1760-1765.
4. Bolivar, F. 1978. Construction and characterization of new cloning vehicles. III. Derivatives of plasmid pBR322 carrying unique EcoRI sites for selection of EcoRI generated recombinant DNA molecules. *Cell.* 4:121-136.
5. Buck, M. and W. Cannon. 1992. Specific binding of the transcription factor sigma-54 to promoter DNA. *Nature (London)* 358:422-424.
6. Busby, S, and R. H. Ebright. 1994. Promoter Structure, Promoter Recognition, and Transcription Activation in Prokaryotes. *Cell* 79:743-746.

7. Casadaban, M. J., J. Chou, and S. N. Cohen. 1980. In vitro gene fusions that join an enzymatically active  $\beta$ -galactosidase segment to amino-terminal fragments of exogenous proteins: *Escherichia coli* plasmid vectors for detection and cloning of translational initiation signals. *J. Bacteriol.* 143:971-980.
8. Casadaban, M. J., A. Martinez-Arias, S. K. Shapira, and J. Chou. 1983.  $\beta$ -Galactosidase gene fusion for analyzing gene expression in *Escherichia coli* and yeast. *Methods Enzymol.* 100:293-308.
9. Collado-Vides, J., B. Magasanik, and J. D. Gralla. 1991. Control site location and transcriptional regulation in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 55:371-394.
10. Ditta, G., S. Stanfield, D. Corbin, and D. R. Helinski. 1980. Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank in *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77:7347-7351.
11. Dower, W. J., J. F. Miller, and C. W. Ragsdale. 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16:6127-6145.
12. Fischer, H.-M. 1994 Genetic regulation of nitrogen fixation in *Rhizobia*. *Microbiol. Rev.* 58:352-386.

13. Fischer, H.-M., D. Anthamatten., I. Kullik., E. Morett., G. Acuña, and H. Hennecke. 1991. Complex regulatory network for *nif* and *fix* gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*, p. 203-210. In H. Hennecke and D. P. S. Verma (ed.) **Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions.** Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
14. Fischer, H.-M., T. Bruderer, and H. Hennecke. 1988. Essential and non-essential domains in the *Bradyrhizobium japonicum* NifA protein: identification of indispensable cysteine residues potentially involved in redox activity and/or metal binding. **Nucleic Acids Res.** 16:2207-2224.
15. Hawley, D. K. and W. R. McClure. 1983. Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. **Nucleic Acids Res.** 11:2237-2255.
16. Huala. E. and F. M. Ausubel. 1992. The central domain of *Rhizobium leguminosarum* NifA is sufficient to activate transcription from the *R. meliloti nifA* promoter. **J. Bacteriol.** 171:3354-3365.
17. Ishihama, A. 1993. Protein-protein communication within the transcription apparatus. **J. Bacteriol.** 175:2483-2489.
18. Kullik, I., S. Fritsche., H. Knobel., H. Hennecke, and H.-M. Fischer. 1991. *Bradyrhizobium japonicum* has two differentially regulated, functional homologs of the  $\sigma^{54}$  gene (*rpoN*) **J. Bacteriol.** 173: 1125-1138.
19. Kunding, C., C. Beck., H. Hennecke, and M. Göttfert. 1995. A single rRNA gene region in *Bradyrhizobium japonicum*. **J. Bacteriol.** 177:5151-5154.

20. Kustu, S., A. K. North, and D. S. Weiss. 1991. Prokaryotic transcriptional enhancers and enhancer-binding proteins. *TIBS* 16:397-402.
21. Kustu, S., E. Santero., J. Keener., D. Popham, and D. Weiss. 1989. Expression of  $\sigma^{54}$  (*ntrA*)-dependent genes is probably united by a common mechanism. *Microbiol. Rev.* 53:367-376.
22. McClure, W. R. 1985. Mechanism and control of transcription initiation in prokaryotes. *Ann. Rev. Biochem.* 54:171-204.
23. Merino, E., J. Osuna., F. Bolivar, and X. Soberon. 1992. A general, PCR method for single or combinatorial oligonucleotide-directed mutagenesis on pUC/M13 vectors. *Biotechniques.* 12(4):508-509.
24. Merrick, M. J. 1993. In a class of its own-the RNA polymerase sigma factor  $\sigma^{54}$  ( $\sigma^N$ ). *Mol. Microbiol.* 10:903-909.
25. Miller, J. H. 1972. Experiments in molecular genetics. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, Cold Spring Harbor, N. Y.
26. Morett, E., and 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.

27. Morett, E., and M. Buck. 1989. In vivo studies on the interaction of RNA polymerase- $\sigma^{54}$  with the *Klebsiella pneumoniae* and *Rhizobium meliloti nifH* promoters: The role of NifA in the formation of an open promoter complex. **J. Mol. Biol.** 210:65-77.
28. Raibaud, O. and M. Schwartz. 1984. Positive control of transcription initiation in bacteria. **Ann. Rev. Genet.** 18:173-206.
29. Regensburger, B., and H. Hennecke. 1983. RNA polymerase from *Rhizobium japonicum*. **Arch. Microbiol.** 135:103-109.
30. Reznikoff, S. W., D. A. Siegele., D. W. Cowing, and C. A. Gross. 1985. The regulation of transcription initiation in bacteria. **Ann. Rev. Genet.** 19:355-387.
31. Ross, W., K. K. Gosink., J. Salomon., K. Igarashi, C. Zou., A. Ishihama., K. Severinov, and R. L. Gourse. A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the  $\alpha$  subunit of RNA polymerase. **Science** 262:1407-1413.
32. Sanger, F., S. Nicklen, and R. Coulson. 1977. DNA Sequencing with chain-termination inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 74:5463-5467.
33. Shapira, S. K., J. Chou., F. V. Richaud, and M. J. Casadaban. 1983. New versatile plasmid vectors for expression of hybrid proteins coded by a cloned gene fused to *lacZ* gene sequences encoding an enzymatically active carboxy-terminal portion of  $\beta$ -galactosidase. **Gene.** 25:71-83.

34. Simon, R., U. Priefer, and A. Pühler. 1983. Vector plasmids for in vitro and in vivo manipulation of Gram-negative bacteria. p. 98-106. In A. Pühler (ed.), **Molecular genetics of the bacteria-plant Interaction**. Springer Verlag, Heidelberg, Germany.
35. Su, W., S. Porter., S. Kustu, and H. Echols. 1990. DNA-looping and enhancer activity: Association between DNA-bound NtrC activator and RNA polimerase at the bacterial *plnA* promoter. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 85:8919-8923.
36. Thöny, B., D. Anthamatten, and H. Hennecke. 1989. Dual control of the *Bradyrhizobium japonicum* symbiotic nitrogen fixation regulatory operon *fixRnifA*: analysis of cis-and trans-acting elements. **J. Bacteriol.** 171:4162-4169.
37. Thöny, B., H.-M. Fischer, D. Anthamatten, T. Bruderer, and H. Hennecke. 1987. The symbiotic nitrogen fixation regulatory operon (*fixRnifA*) of *Bradyrhizobium japonicum* is expressed aerobically and is subject to a novel, NifA-independent type of activation. **Nucleic Acids Res.** 15:8479-8499.
38. Tintut, Y., C. Wong., Y. Jiang., M. Hsieh, and J. D. Gralla. 1994. RNA polimerase binding using a strongly acidic hydrophobic-repeat region of  $\sigma^{54}$ . **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 91:2120-2124.
39. Von Hippel, P. H., D. G. Bear., W. D. Morgan, and J. A. McSwiggen. 1984. Protein-nucleic acid interaction in transcription: A molecular analysis. **Ann. Rev. Biochem.** 53:389-446.



## Apendices

<b>Elementos traza</b>	<b>100 ml (1000X)</b>
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.4399 gr
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	0.077 gr
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.015 gr
NaMnO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.024 gr
Na <sub>3</sub> NO <sub>4</sub>	2.1 mM
NaScO <sub>3</sub>	0.5 mM

<b>Vitaminas</b>	<b>100 ml (1000X)</b>
Rivoflavina	2.0 mg
Biotina	1.2 mg
Tiamina	8.0 mg
Myo-Inositol	4.8 mg
Acido p-aminobenzoico	0.8 mg
Acido Nicotinico	5.0 mg
Pantotenato de calcio	8.0 mg
Cianocobalamina	10.0 µg

<b>Buffer Z</b>	<b>500 ml</b>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	8.05 gr
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	2.75 gr
KCl	0.375 gr
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.123 gr
β Mercaptoetanol	1.35 ml

<b>Solución I (GET)</b>	<b>50 ml</b>	
Glucosa	9.9	gr
EDTA	8.4	gr
Tris-Cl	7.88	gr
<b>Solución II</b>	<b>100 ml</b>	
NaOH 10 N	2.0	ml
SDS 20% (w/v)	5.0	ml
H <sub>2</sub> O	93.0	ml
<b>Solución III</b>	<b>100 ml</b>	
Acetato de potasio 5 M	60.0	ml
Acido acético glacial	11.5	ml
H <sub>2</sub> O	28.5	ml
<b>TAE</b>	<b>1000 ml (50X)</b>	
Tris-base	242.0	gr
Acido acético glacial	51.1	ml
EDTA 0.5 M pH 8	100.0	ml
H <sub>2</sub> O	606.9	ml

**Stop solution**

Formami	95%	
EDTA	20	mM
Azul de bromo	0.05%	
Xylen cyanol	0.05%	

**PAGE 6% (Poliacrilamida gel electroforesis)**

Acrilamida-bisacrilamida	9.0	ml
UREA	31.5	gr
TBE 5X	12.0	ml
H2O	10.0	ml
Persulfato de Amonio 10%	360.0	$\mu$ l
TEMED	60.0	$\mu$ l

<b>TBE 5X (Tris boratos)</b>	<b>1000</b>	<b>ml</b>
Tris base	54.0	gr
Acido borico	27.5	gr
EDTA 0.5 M	20.0	ml