



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**Aspectos moleculares del mecanismo de activación  
transcripcional de los promotores dependientes de  $\sigma^{54}$ :  
Comunicación funcional entre el motivo GAFTGA del  
Activador y la Región I de  $\sigma^{54}$  durante el inicio de la  
transcripción**

**T E S I S  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS  
P R E S E N T A  
BQ. ANGEL ERNESTO DAGO RODRÍGUEZ**

**DIRECTOR DE TESIS  
DR. ENRIQUE MORETT SÁNCHEZ**

CUERNAVACA, MOR.

ENERO 2007



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.

## **DEDICATORIA**

A Samuel, por ser el motor impulsor de mi vida. Por que atrapaste mi vida por completo desde la primera vez que sujetaste mi mano. Hijo, te amo profundamente.

A mi esposa Luisa, por hacer de mi un mejor hombre y lleno de felicidad, por tus cualidades como persona y mujer, por tu paciencia, delicadeza, por tu espíritu inquebrantable, por tu determinación ante la vida, por compartir esto conmigo y sobre todo por tu amor sincero y sin límites. Estoy infinitamente orgulloso de tenerte a mi lado. Te amo.

A mi madre, María Elena, por educarme en los principios en los que hoy creo, por tu sonrisa y alegría infinita a pesar de todo, por enseñarme a nunca rendirme ante los problemas de la vida y a afrontarlos sin perder la ternura. Por tu ejemplo intachable, por guiarme siempre por el camino correcto por difícil que sea. Por ser más que mi madre, una amiga. Te extraño.

A mi padre y amigo, Angel, por tu confianza y sabios consejos durante mi vida. Por enseñarme a enamorarme y respetar el trabajo. Por tu ejemplo y dedicación como científico, gracias.

A mi querido hermano, Pedrukito, siempre me esforzado en tratar de ser un buen ejemplo para ti. Estoy muy orgulloso de ti.

A mis abuelos, Cucha, Luis, Cándido y Celia por su cariño y amor a toda a prueba.

A mis primas Annete y Heidy, a tía cuchi y mis abuelos postizos Lourdes y Miguel por todos los momentos de gozo y amor.

A mi bella familia por lograr siempre estar unidos y en armonía bajo cualquier circunstancia. La distancia no hace mella en esto. Nunca estuvimos lejos.

A México, en especial a la UNAM, por aceptarme como un hijo más.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primeramente a mi tutor, Enrique Morett, por su dedicación, apoyo y por la retroalimentación y debate continuo durante la realización de mi doctorado. Por aprender de su razonamiento lógico y científico a la hora de abordar un problema. Por la confianza que deposito en mí y algo más valioso que es contar con su amistad.

A los miembros de mi comité tutorial, Dr. Víctor González y Dra. Gloria Soberón, por su valiosa participación, por los debates, comentarios y el análisis crítico y a fondo de mis resultados.

A los miembros del jurado de Tesis, Dra. Guadalupe Espín, Dra. Katy Juárez, Dra. Laura Camarena, Dr. Jorge Membrillo, Dr. José Luis Puente y Dr. David Romero por el tiempo dedicado a la revisión de la tesis que sin duda ha contribuido a mejorar su calidad.

A mis compañeros de grupo por permitir, nada fácil, que el laboratorio sea nuestro segundo hogar. En especial a Ricardo Grande, que más que un colaborador es mi amigo. A Humbe, por las cavilaciones y charlas científicas incluso ajenas a nuestros proyectos, y por su sana disposición. A Mary y Letty, que además de su innegable ayuda, por ser ejemplos de tenacidad ante el trabajo. A Alfredo, el nuevo miembro del clan de la paternidad, por su actitud y dedicación al trabajo que algún momento compartimos. Al Gabo, Cristian y Esmeralda por su amistad y por enseñarme que las vitaminas suelen ser tan esenciales que incluso te dificultan la vida. A todos, gracias por su cariño.

A los integrantes del Lab. de Martín Buck en el Imperial College de Londres, en especial al Dr. Siva Ramesh Wigneshweraraj por la estrecha colaboración y amistad, sin la cual la realización de parte de este trabajo no hubiera sido posible.

A los miembros del otro bando, distinguidos X.S, en particular a Joel Osuna por ser la amalgama que une al Lab. A Gloria Saab, por permitirme y enseñarme a usar el FPLC, además de su amistad. A los de siempre, Filly, Luis y Manolo, a los nuevos

Juanita, Paco, Lianet, Etién, y a los pasados y actuales integrantes con los que conviví. Gracias por aceptarme tal cual soy, en especial mi español, y por brindarme un espacio de trabajo que nunca olvidare.

A Nelly, por su amistad y llevar alegría al Lab, además de los tantos papeles y trámites por los cuáles me asesoraste.

A Pancho y Juana, por su gran cordialidad y afecto para conmigo, sin olvidar lo importante de los refrigerios de Pancho y los incontables medios, puntas y buffers preparados por la señora Juanita.

A mis amigos Beto, Viviana, Sonia, Brenda y Juan Téllez por enseñarme a disfrutar la esencia de este país, incluyendo los reventones.

A mis amigos de la comunidad cubana del IBT, Ernesto, Saida y Luis por tener un pedazo de tierra cerca. A los amigos del fútbol y el básquet, los que me conocen como "*chico*".

A las unidades de apoyo de nuestro Instituto, en especial a la de síntesis (Paúl Gaytán y Eugenio Bustos) y de secuencia, por su calidad en el servicio que sin duda fue parte vital de mi trabajo.

Por otra parte, quedó profundamente agradecido y en deuda con este país, en especial con la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM (DGEP) por la beca que me otorgo sin hacer ninguna distinción, la cual me posibilito llevar a cabo con tranquilidad económica mis estudios de Doctorado.

A México, por ser mi nueva patria y por recibirme con brazos abiertos y solidarios.

A los que faltaron y debieron de estar. Mil gracias.

**Este trabajo se realizó en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la UNAM, sobre una idea original y bajo la dirección del Dr. Enrique**

## TABLA DE CONTENIDO

<b>ABSTRACT</b>	1
<b>RESUMEN</b>	3
<b>INTRODUCCIÓN</b>	5
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	
<b>Capítulo 1. ARN Polimerasas</b>	
1.1 Características generales	7
1.2 ARN polimerasa bacteriana	8
1.3 La subunidad Alfa ( $\alpha$ )	10
1.4 La subunidad Beta ( $\beta$ )	12
1.5 La subunidad Beta prima ( $\beta'$ )	14
1.6 La subunidad omega ( $\omega$ )	15
1.7 Estructura del core de la ARNP bacteriana	16
<b>Capítulo 2. Factores sigma (<math>\sigma</math>)</b>	
2.1 Características generales	19
2.2 Familia $\sigma^{70}$	20
2.3 Organización y función de las regiones conservadas del factor $\sigma^{70}$	
2.3.1 Región 1	22
2.3.2 Región 2	23
2.3.3 Región 3	24
2.3.4 Región 4	24
2.4 Relación estructura-función de las regiones conservadas de $\sigma^{70}$	25
2.4.1 Flexibilidad estructural de la holoenzima $E\sigma^{70}$	26
<b>Capítulo 3. Familia <math>\sigma^{54}</math></b>	
3.1 Características generales	29
3.2 Organización y función de las diferentes regiones del factor $\sigma^{54}$	
3.2.1 Región I	33
3.2.2 Región II	36
3.2.3 Región III	37
3.3 Papel de la región -12 de los promotores $\sigma^{54}$ en el control de la transcripción	39
3.4 Mecanismo de activación transcripcional de los promotores dependientes de $\sigma^{54}$	40

3.5 Estructura de la ARNP- $\sigma^{54}$	43
<b>Capítulo 4. Regulación de la expresión genética</b>	
4.1 Regulación de la transcripción por represión o regulación negativa	45
4.2 Regulación de la transcripción por activación o regulación positiva	47
4.3 Regulación de la transcripción por diferentes factores $\sigma$	48
4.4 Regulación de la transcripción por factores Anti-sigma	49
4.5 Activadores a distancia o Familia de las EBPs	51
4.5.1 Organización estructural de las EBPs	52
4.5.2 Dominio Central	53
4.5.3 Dominio amino terminal	54
4.5.4 Dominio carboxilo terminal	55
4.5.5 Relación estructura-función de las EBPs	56
<b>Capítulo 5. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS</b>	62
<b>5.1 OBJETIVO GENERAL Y PARTICULARES</b>	66
<b>Capítulo 6. Apéndice I, Artículo en Colaboración (Genes &amp; Dev)</b>	68
6.1 Resultados y Discusión, apéndice I	69
<b>Capítulo 7. Apéndice II, Artículo en Colaboración (Mol. Microbiol)</b>	73
7.1 Resultados y Discusión, apéndice II	74
<b>Capítulo 8. Apéndice III, Contribución Original (J. Biol. Chem)</b>	78
8.1 Resultados y Discusión, apéndice III	79
<b>Capítulo 9. Apéndice IV, Contribución Original (Resultados a publicar)</b>	85
9.1 Resultados y Discusión, apéndice IV	86
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b>	93
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	95

## ABSTRACT

Transcription initiation of genes expressed by the bacterial RNA polymerase containing the alternative  $\sigma^{54}$  factor ( $E\sigma^{54}$ ) requires specialized activators which are members of the bacterial Enhancer Binding Proteins family (EBPs). The EBPs use the energy derived from the NTP binding and hydrolysis to induce conformational changes in  $E\sigma^{54}$  in order to allow the isomerisation of an inactive closed promoter complex into a proficient open complex form. Previous *in vivo* genetic evidence had indicated that the invariant threonine residue, within the well conserved GAFTGA motif of the AAA<sup>+</sup> domain of EBPs, is involved in transcriptional activation and in the energy coupling process.  $\sigma^{54}$  constitutes the primary interaction target for the activator. However, how the activator uses the NTP binding and hydrolysis to remodel the  $E\sigma^{54}$ -closed promoter complex, as well as the determinants that participate in the interaction between the activator and  $\sigma^{54}$ , are not well understood.

In order to shed light into these questions, here we describe and characterize for the first time, the formation of stable protein complexes between the AAA<sup>+</sup> domains of different activators (*Bj* NifA, *Ec* PspF) and  $\sigma^{54}$  by using an analog of ATP (ADP-aluminum fluoride, ADP-AlFx) that mimics ATP in the transition state for hydrolysis. Also, we provided evidence from *in vitro* and *in vivo* genetic suppression studies, that  $\sigma^{54}$  Region I constitutes the primary interaction target for the activator within the holoenzyme. Furthermore, we show that the ADP-AlFx-dependent complex formation between  $\sigma^{54}$  and the activator is strictly dependent upon the integrity of the GAFTGA motif of the EBPs, specially the threonine residue, which suggests a critical role for this residue in binding  $\sigma^{54}$ . Overall, we infer that one role of ATP hydrolysis in activation of the  $E\sigma^{54}$  is to promote formation of a functional state of activator that tightly binds  $\sigma^{54}$  in order that the energy transduction process coupled to open complex formation can take place. Finally, the use of ADP-AlFx allowed us to provide insights into the mechanochemical action of the activators of the EBPs family.

Additionally, we present a detailed characterization of the interaction between  $\sigma^{54}$  Region I and the EBPs during transcriptional activation. We employed an array of DNA-promoter probes that mimic the different conformations adopted by the  $\sigma^{54}$ -promoter *en route* to open complex formation to investigate the contribution of the threonine residue of the activator GAFTGA motif during transcriptional activation. Our results allow us to conclude that the conformational variations occurring in  $\sigma^{54}$  and in

DNA promoter structure *en route* to open complex formation is communicated to the activator via the conserved threonine residue of the GAFTGA motif.

Finally, we characterized by *in vivo* and *in vitro* experiments the molecular basis that allows to the  $E\sigma^{54}_{G4L}$  mutant to rescue the activation deficiency of a mutant activator carrying a threonine to serine substitution in the GAFTGA motif. Our results allows us to propose a new and novel role for the invariant threonine residue of the activator GAFTGA motif during transcriptional activation, which consists in sensing the conformation adopted by the DNA downstream of the -12 promoter region and coupling this information to the  $E\sigma^{54}$  via Region I to allow open complex formation. Overall, the results presented here highlight the level of regulatory precision and complexity that operates during transcription activation at  $\sigma^{54}$ -dependent promoters.

## RESUMEN

El inicio de la transcripción de los genes expresados por la ARN polimerasa asociada al factor transcripcional  $\sigma^{54}$  ( $E\sigma^{54}$ ), implica el reconocimiento de la secuencia promotora y la formación de un complejo cerrado transcripcionalmente inactivo. Este complejo cerrado, en contraste a la  $ARN-\sigma^{70}$ , es incapaz de isomerizar a un complejo de promotor abierto a menos que este presente una proteína activadora perteneciente a la familia de las *Enhancer Binding Proteins* (EBPs). Las EBPs utilizan la unión y la energía de hidrólisis del ATP para inducir cambios conformacionales en el complejo cerrado de  $E\sigma^{54}$ -promotor, permitiendo la isomerización del ADN y la formación del complejo abierto. Reportes anteriores habían mostrado que el residuo conservado de treonina dentro del motivo GAFTGA del dominio  $AAA^+$  catalítico de las EBPs, estaba involucrado en la activación transcripcional y en el acoplamiento de la energía de hidrólisis del ATP a través del establecimiento de un posible contacto con  $E\sigma^{54}$ . El factor  $\sigma^{54}$  constituye el principal blanco de interacción con el activador. Sin embargo, el mecanismo por el cual el activador acopla la unión e hidrólisis del ATP para alterar la conformación de  $\sigma^{54}$  dentro del complejo cerrado, así como los determinantes específicos que participan en la interacción entre el activador y  $\sigma^{54}$ , es aún poco conocido.

Para describir y caracterizar la interacción y formación del complejo estable *in vitro* entre el dominio  $AAA^+$  de varias EBPs y  $\sigma^{54}$ , empleamos un análogo del estado de transición del ATP en la hidrólisis (ADP-fluoruro de aluminio, ADP-AlFx). Estos experimentos nos permitieron inferir que una de las funciones que tiene la hidrólisis del ATP durante el mecanismo de activación transcripcional es la de generar un nuevo estado funcional en el activador (mimetizado por el ADP-AlFx) que le permite interaccionar establemente con  $\sigma^{54}$ , lo que garantiza la transducción satisfactoria de la energía del ATP hacia la  $E\sigma^{54}$  en vistas a promover la formación del complejo abierto. Estudios de supresión genética *in vivo*, así como evidencias *in vitro* nos permitieron concluir que la región I de  $\sigma^{54}$  constituye el principal blanco de interacción del activador dentro de la holoenzima. Por su parte, el motivo GAFTGA del activador, específicamente el residuo de treonina, está involucrado en la interacción estable con  $\sigma^{54}$ .

Por otra parte, caracterizamos de manera detallada la interacción funcional que se establece entre la región I de  $\sigma^{54}$  y el motivo GAFTGA del activador durante el

mecanismo de activación transcripcional. Haciendo uso de templados de ADN que mimetizan las diferentes conformaciones que adopta el promotor en vías a formar el complejo abierto, demostramos que el residuo de treonina del motivo GAFTGA forma parte de una vía de señalización interna que le permite al activador orquestar y dirigir los diferentes cambios conformacionales que ocurren tanto en  $\sigma^{54}$ , como en la estructura del promotor durante la formación del complejo abierto.

Por último, aislamos y caracterizamos mutantes supresoras de  $E\sigma^{54}$  capaces de rescatar *in vivo* la función de una mutante del activador afectada drásticamente en su capacidad para activar la transcripción. En general, nuestros resultados permitieron asignarle un nuevo papel funcional al motivo GAFTGA del activador durante la activación transcripcional, el cual consiste en reconocer la conformación que adopta el ADN ubicado corriente abajo de la región -12 del promotor y comunicar esta información a la ARN polimerasa a través de la región I de  $\sigma^{54}$  para proceder a la formación del complejo abierto. Nuestros datos ejemplifican el nivel de precisión y complejidad que opera en la regulación de la transcripción de los promotores dependientes de  $\sigma^{54}$ .

## INTRODUCCIÓN

Las condiciones nutricionales y ambientales en los diferentes hábitats bacterianos pueden estar sujetas a variaciones muy drásticas, lo que ha traído como consecuencia la evolución y desarrollo de un gran repertorio de mecanismos sofisticados que le permiten a la bacteria adaptarse a estos cambios que se producen en su medio. El proceso de adaptación implica, por una parte, el reconocimiento de ciertas señales captadas del medio externo y, por otra, la elaboración de una respuesta celular que generalmente se encuentra relacionada con el cambio o alteración de la expresión genética. Las señales del medio ambiente, tanto físicas como químicas, pueden ser detectadas de formas muy diferentes: el estímulo puede penetrar al interior celular (por ejemplo, el sustrato de una vía metabólica), o incluso puede ser detectado a nivel de la superficie celular a través de receptores específicos de membrana. Sin embargo, y de manera general, el proceso de recepción, internalización y procesamiento del estímulo tiene como blanco final de regulación la modificación o alteración de la expresión genética, lo que representa una estrategia muy útil para conseguir un aprovechamiento óptimo de la energía disponible.

En bacterias, la regulación de la expresión genética ocurre a diferentes niveles: a nivel de la transcripción (inicio, elongación y terminación), a nivel de procesamiento y estabilidad del ARN mensajero y por último a nivel traduccional. Debido a que en bacterias la traducción está acoplada a la transcripción, la regulación de la expresión genética ocurre principalmente en este último nivel, específicamente en el control del inicio de la transcripción. El hecho de que el control de la expresión genética se ejerza en este punto, contribuye a optimizar el gasto energético de la célula, ya que evita la síntesis de proteínas y ARN innecesarios, proceso energéticamente costoso.

Las bacterias han evolucionado diferentes mecanismos que permiten regular el inicio de la transcripción. La presencia de diferentes factores transcripcionales (factores sigma) que le confieren a la ARN polimerasa especificidad para reconocer e iniciar la transcripción en distintas clases de promotores, el grado de identidad del promotor con respecto a su secuencia consenso, la modificación del nivel de transcripción basal a través del uso de proteínas reguladoras (activadores o represores), así como los cambios en el grado de superenrollamiento del ADN, son solo algunos de los mecanismos más utilizados por las bacterias para controlar el inicio de la transcripción. Sin embargo, y a pesar de que el conocimiento actual acerca de estos mecanismos de regulación

transcripcional son muy amplios, en muchos casos desconocen las bases moleculares por los cuáles operan.

En este sentido, este trabajo tiene como objetivo general estudiar y aportar información precisa sobre el mecanismo de regulación transcripcional de los genes controlados por la ARN polimerasa asociada al factor  $\sigma^{54}$ , abordado desde un enfoque genético y molecular.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### **Capítulo 1. ARN Polimerasas**

#### **1.1 Características Generales**

La transcripción es el proceso mediante el cual la información almacenada de manera permanente en el ADN es transferida o copiada a una molécula de ácido ribonucleico (ARN). La enzima que cataliza este proceso es la ARN polimerasa dependiente de ADN (ARNP). Para la síntesis del ARN, la ARNP utiliza además del templado o molde de ADN, el ión magnesio como cofactor y los sustratos de ribonucleósidos trifosfatos (NTPs), los cuales constituyen las unidades precursoras del ARN. La reacción de la transcripción transcurre en la dirección 5'→ 3' y de manera análoga al mecanismo de síntesis del ADN, los sustratos de NTPs son acoplados al grupo hidroxilo del extremo 3' de la cadena de RNA en fase de elongación, mediante la formación de un enlace fosfodiéster (Cramer, 2002; Ebright, 2000).

Las ARNPs celulares pertenecientes a los tres dominios filogenéticos (arqueas, bacterias y eucariontes) están conformadas por múltiples subunidades proteicas, las cuales comparten un alto grado de similitud estructural, funcional y de secuencia entre ellas, lo que indica que comparten un origen evolutivo (Cramer, 2002; Ebright, 2000) (Ver Tabla 1.1). Adicionalmente, existen ARNP constituidas por un solo polipéptido, como las ARNPs mitocondriales, de cloroplastos y de bacteriófagos, las cuales son las encargadas de transcribir el genoma de dichos organelos o virus bacterianos, respectivamente. Ambas formas de ARNPs, sin embargo, comparten muchas de sus características bioquímicas y funcionales (Cheethman & Steitz, 2000). Por otra parte, las ARNPs de eucariotes están conformadas por un mayor número de subunidades proteicas en comparación con sus homólogos bacterianos, lo que evidencia una mayor complejidad estructural en las primeras. Para ilustrar esto, en la Tabla 1.1 se muestra la diferente composición de subunidades de las ARNPs de arqueas, bacterias y eucariontes, resaltándose las subunidades homólogas (Cramer, 2002; Cramer *et al.*, 2001; 2000; Ebright, 2000).

Otra diferencia básica entre las ARNPs de bacterias y eucariontes es la presencia en estas últimas de varias formas de ARNPs, las cuáles desempeñan funciones altamente especializadas. Nos referimos, por ejemplo, a que la transcripción de los genes en arqueas y bacterias es llevada a cabo por una única forma de ARNP, mientras que en organismos superiores existen tres formas de ARNP con finalidades funcionales

muy particulares. La ARNP I sintetiza la mayoría de los ARN ribosomales, la ARNP II transcribe los ARN mensajeros y algunos ARN nucleares pequeños, y por último la ARNP III se encarga de transcribir los ARN de transferencia y el ARN ribosomal 5S. De esto se desprende que en bacterias al existir

ARN POLIMERASAS DE SUBUNIDAD-MÚLTIPLE						
Bacterias	$\beta'$	$\beta$	$\alpha^I$	$\alpha^{II}$	$\omega$	-
Arqueas	A'/A''	B'/B''	D	L	K	+ 6 subunidades
Euc. pol I	RPA1	RPA2	RPA5	RPA9	RPA6	+ 9 subunidades
Euc. pol II	RPB1	RPB2	RPB3	RPB11	RPB6	+ 7 subunidades
Euc. pol III	RPC1	RPC2	RPC5	RPC9	RPC6	+ 11 subunidades

Tabla 1.1. Comparación entre ARNPs que muestran diferente composición de subunidades (adaptado de Geiduschek & Bartlett, 2000)

una única forma de ARNP no sólo es necesario que regule su actividad *per se*, sino también las diferentes señales que promueven que los distintos grupos de genes se transcriban correctamente. Esto se logra través del uso de diferentes factores sigma, los cuales le confieren a la ARNP la especificidad para posicionarse y reconocer secuencias de ADN altamente conservadas y específicas, conocidas como promotores, los cuales controlan el inicio de la transcripción (Burgess *et al.*, 1969).

## 1.2 ARN Polimerasa Bacteriana

La ARN polimerasa bacteriana está compuesta por un heterodímero de cinco subunidades ( $\alpha_2\beta\beta'\omega$ ), que en su conjunto conforman el núcleo catalítico de la enzima (*core*) (Ebright, 2000). El *core* es suficiente para llevar a cabo las reacciones catalíticas básicas de la transcripción (elongación y terminación), pero es incapaz de iniciarla en ausencia de la subunidad sigma ( $\sigma$ ). El complejo multiproteico formado por el ensamblaje del *core* de la ARNP y la subunidad  $\sigma$ , es conocido como holoenzima ( $E\sigma$ ) (Figura 1.1). La subunidad  $\sigma$ , o factor de especificidad como también se le conoce, es el encargado de conferir a la holoenzima la capacidad de reconocer los promotores para así iniciar la transcripción. La unión sitio específica al promotor garantiza la expre-

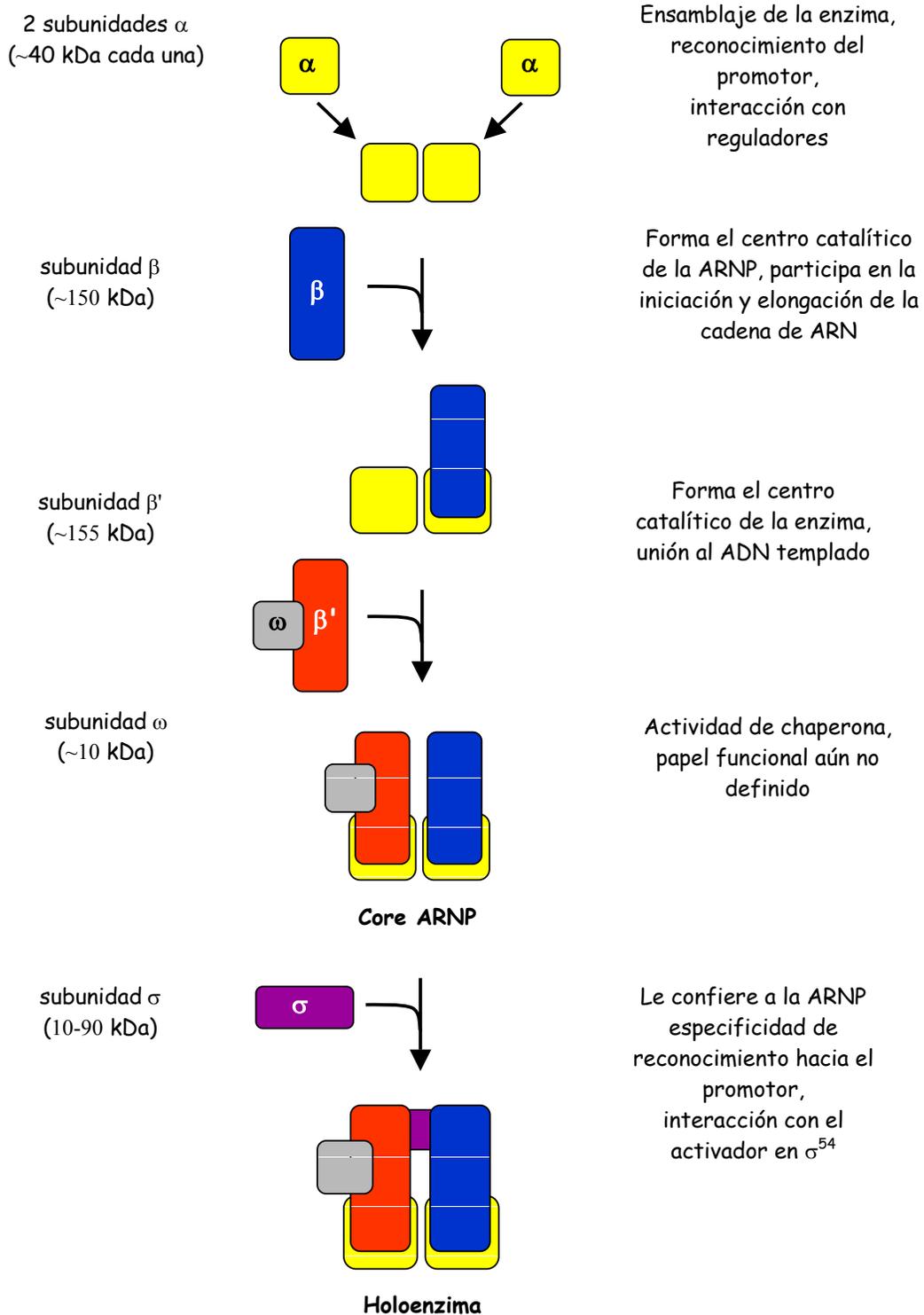


Figura 1.1. Esquema general donde se muestran la composición de subunidades y el ensamblaje de la ARNP bacteriana dependiente de ADN. En el texto se especifica la función individual de cada una de las subunidades.

si3n concertada en tiempo y espacio de una gran variedad de genes que se requieren bajo condiciones fisiol3gicas o est3mulos celulares externos muy particulares (Darst, 2001; Gross *et al.*, 1998). Otra subunidad adicional que forma parte del *core* es la omega ( $\omega$ ). Anteriormente se cre3a funcionalmente dispensable al no afectar la viabilidad celular una vez removida, sin embargo evidencias experimentales recientes han permitido atribuirle una nueva funci3n a esta subunidad (Minakhin *et al.*, 2001). En la siguiente secci3n nos enfocaremos en las propiedades, bioqu3micas y estructurales, de las diferentes subunidades de la ARNP de *Escherichia coli* (*E. coli*), que ha sido hasta el momento la enzima m3s estudiada.

### 1.3 La subunidad Alfa ( $\alpha$ )

La subunidad  $\alpha$  de la ARNP de *E. coli* (329 amino3cidos) es codificada por el gen *rpoA*, est3 constituida estructuralmente por dos dominios independientes conectados entre s3 por una secuencia espaciadora de aproximadamente 13 amino3cidos (a.a) de longitud, que no asume una estructura definida (Ver Figura 1.2) (Blatter *et al.*, 1994; Busby & Ebright, 1994). La subunidad  $\alpha$  forma una estructura dim3rica, tanto en el *core* de la ARNP como en la holoenzima, y entre sus funciones se encuentra la de permitir el ensamblaje del resto de las subunidades de la ARNP (Figura 1.1) (Ishihama, 1981).

En el dominio amino terminal ( $\alpha$ NTD), enmarcado por los residuos 1-235, radican los determinantes que participan en la formaci3n de la interfase de dimerizaci3n entre ambas subunidades  $\alpha$  (Figura 1.2, A). La estructura del d3mero formado por el dominio amino terminal muestra una topolog3a elongada y aplanada en donde los residuos involucrados en la interacci3n con el *core* se localizan en una cara del mismo, mientras que los residuos correspondientes a la secuencias espaciadoras se encuentran en la cara opuesta (Fujita *et al.*, 2000; Murakami *et al.*, 1997). Particularmente, estudios estructurales han mostrado que la interfase de dimerizaci3n establecida entre las subunidades  $\alpha$  ocurre a trav3s de una interacci3n antiparalela del tipo *coiled-coil* entre las h3lices H3 de los respectivos mon3meros (Zhang & Darst, 1998). El proceso de dimerizaci3n ocurre independientemente de la presencia del dominio carboxilo terminal ( $\alpha$ CTD), dado que la ausencia de esta regi3n no interfiere en dicho proceso. Espec3ficamente en el  $\alpha$ NTD se han identificado cinco regiones (A-E) que se encuentran significativamente conservadas en secuencia entre sus hom3logos de las principales divisiones bacterianas (Heyduk *et al.*, 1996). Estudios de protecci3n

mediante *footprinting* han mostrado que dos regiones conservadas de la subunidad  $\alpha$ , conocidas como motivos 1 y 2, interaccionan con las subunidades  $\beta$  y  $\beta'$ , respectivamente (Figura 1.2, A). Adicionalmente, estudios de mutagénesis han indicado que las subunidades  $\alpha I$  y  $\alpha II$  se unen principalmente a las subunidades  $\beta$  y  $\beta'$ , respectivamente (Gourse *et al.*, 2000).

El dominio carboxilo terminal 249-329 ( $\alpha$ CTD) se encuentra relativamente conservado en secuencia en las ARNPs de procariontes y ausente en las de eucariontes, lo que sugiere que su función en la transcripción está confinada a un solo dominio. Desde un punto de vista estructural, el  $\alpha$ CTD presenta una arquitectura globular compacta, conformada por cuatro  $\alpha$ -hélices, dos vueltas de hélices y una extensa asa en el carboxilo terminal con estructura definida (Fujita *et al.*, 2000).

Una de las funciones de este dominio es la de reconocer, a través de una interacción específica ADN-proteína, secuencias de promotores ricas en adeninas y timinas, conocidas como elementos UP, que se ubican entre 40 y 60 pares de bases corriente arriba del inicio de la transcripción (+1) (Ross *et al.*, 1993; Ebright & Busby, 1995; Chen *et al.*, 2003). En este sentido, el elemento UP mejor caracterizado es el que se encuentra en el promotor que controla síntesis de uno de los ARN ribosomales (*rnB P1*), el cual estimula la actividad transcripcional al menos 30 veces, posiblemente al incrementar la formación del complejo abierto (Yasuno *et al.*, 2001). Otra función atribuida al  $\alpha$ CTD es ser un blanco de interacción para reguladores transcripcionales, tal es el caso de la proteína reguladora de la represión catabólica CRP y OmpR (Lawson *et al.*, 2004; Busby & Ebright, 1999; Ebright & Busby, 1995). Las dos copias del dominio carboxilo terminal de la subunidad  $\alpha$  de la ARNP, denominadas  $\alpha$ CTD<sup>I</sup> y  $\alpha$ CTD<sup>II</sup>, son funcionalmente independientes. Por lo tanto una única copia del dominio carboxilo terminal es suficiente para interaccionar con promotores que contienen un sitio de unión para una molécula de CRP y un solo subsitio del elemento UP. Sin embargo, ambas se requieren en caso de promotores que presentan más de un sitio de unión para CRP y para el reconocimiento de los dos subsitios que presenta el elemento UP (Lloyd *et al.*, 2002).

Por su parte, la secuencia espaciadora facilita la movilidad estructural entre los dominios  $\alpha$ NTD y  $\alpha$ CTD para que puedan llevar a cabo sus funciones. Esto posibilita, por ejemplo, que cada uno de los  $\alpha$ CTD puedan comportarse como unidades móviles

independientes para interactuar con el ADN y/o proteínas, mientras que la ARN polimerasa se mantiene unida al promotor (Chen *et al.*, 2003; Fujita *et al.*, 2000).

#### 1.4 La subunidad Beta ( $\beta$ )

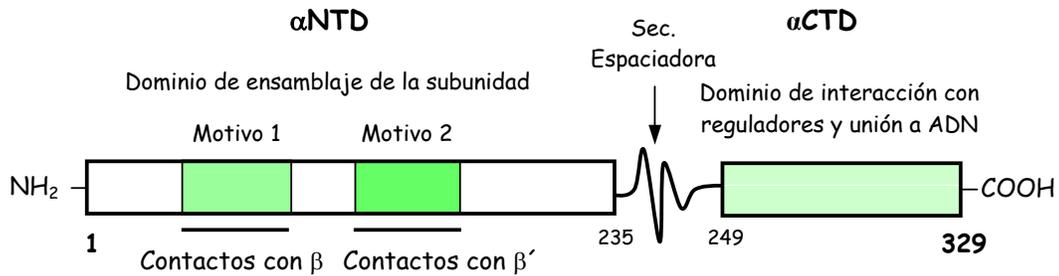
La subunidad  $\beta$  de la ARN polimerasa de *E. coli* consta de 1342 a.a y está codificada por el gen *rpoB*. Dentro de la misma se identifican varias regiones conservadas evolutivamente entre las principales divisiones filogenéticas. Estos motivos conservados, los cuales se distribuyen a lo largo de la molécula, se agrupan en 9 dominios (A-I) los cuales se encuentran separados por regiones pobremente conservadas en secuencia (Severinov *et al.*, 1994) (Figura 1.2, B). Las subunidades  $\beta$  y  $\beta'$  conforman el centro catalítico de la enzima.

Se ha mostrado que el antibiótico rifampicina inhibe la transcripción al bloquear directamente la salida del transcrito de ARN cuando el mismo consta entre dos o tres nucleótidos de longitud (Campbell *et al.*, 2001; Darst, 2004). Dentro de la subunidad  $\beta$ , principalmente en los dominios B, D y E, se han mapeado mutaciones que confieren resistencia a dicho antibiótico (Campbell *et al.*, 2001; Jin & Gross, 1988). Dado que la rifampicina afecta la velocidad de inicio de la transcripción, se ha sugerido que su sitio de unión dentro del *core* se encuentra muy cercano al sitio  $-i$  (sitio de unión del nucleótido que inicia la transcripción). Acorde con esto último, se conoce que los motivos conservados F,G, H e I de la subunidad  $\beta$  están involucrados en la formación del sitio-*i*, el cual se ubica estructuralmente a 15 Å de distancia aproximadamente del sitio de unión a rifampicina (Naryshkina *et al.*, 2001). Adicionalmente, estudios de entrecruzamiento han mostrado que ciertas regiones conservadas de la subunidad  $\beta$  se localizan próximas al extremo 5' de la cadena de ARN naciente. Finalmente, estas evidencias apuntan a que la subunidad  $\beta$  desempeña una función crítica en el control del inicio de la transcripción. En este mismo sentido, se han aislado mutantes dentro de esta subunidad que afectan las propiedades de pausa y elongación de la ARNP, lo que indica que no solo es importante en el control del inicio de la transcripción, sino en otros estadios del ciclo transcripcional.

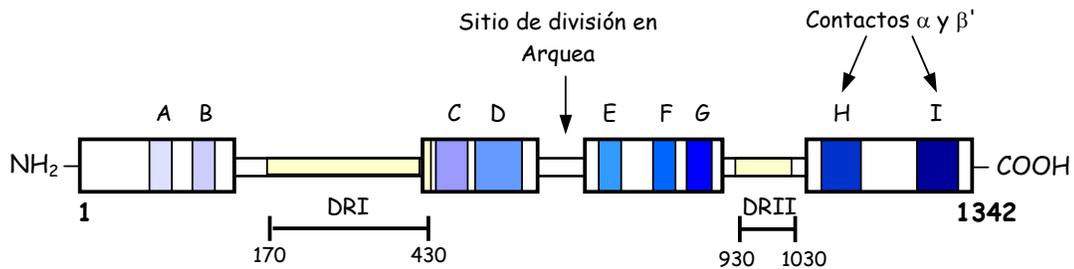
Por último, la subunidad  $\beta$  contiene dentro de la zona de secuencia hipervariable dos regiones que se han denominado dispensables (DRI y DRII) y que comprenden más del 25% de su longitud de aminoácidos (Figura 1.2, B). Específicamente, dichas regiones son dominios estructuralmente autónomos que sobresalen hacia la superficie exterior de la ARNP, particularmente el DRII. Acorde con esto, estas regiones pueden

removerse de la ARNP sin afectar su estructura global y, por ende, sus funciones básicas. Sin embargo, se ha documentado que la región DRI constituye un blanco de re-

### A) Subunidad Alfa ( $\alpha$ )



### B) Subunidad beta ( $\beta$ )



### C) Subunidad beta prima ( $\beta'$ )

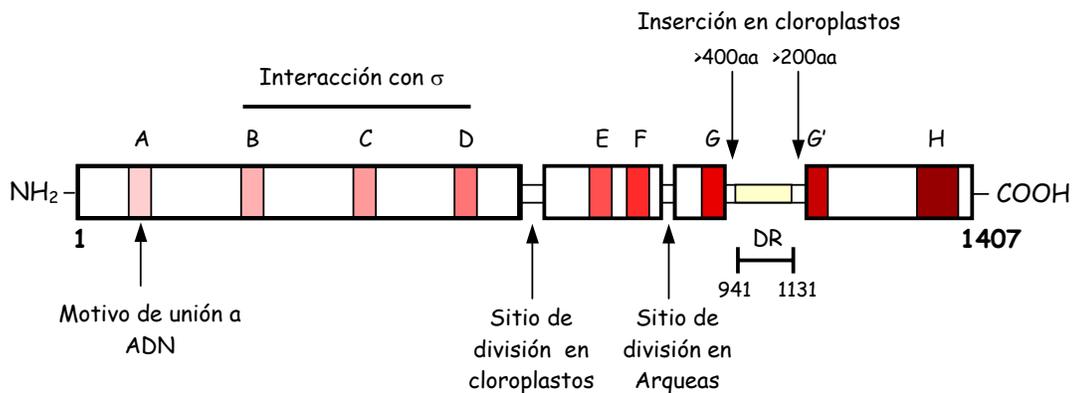


Figura 1.2. Esquema que muestra la organización estructural de las subunidades que componen al core de la ARNP ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\beta'$ ). (A) Organización de los dominios de la subunidad  $\alpha$ . Las regiones significativamente conservadas en secuencia dentro del dominio amino terminal se encuentran sombreadas en diferentes tonalidades de verde. (B) Organización de los dominios de la subunidad  $\beta$ . Las regiones conservadas A-I se muestran marcadas en azul. Igualmente se destacan las regiones dispensables, el sitio de división en arqueas, así como también las regiones que interaccionan con las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . (C) Organización de los dominios de la subunidad  $\beta'$  marcados como en (B).

gulación para la proteína Alc del bacteriofago T4, la cual es un factor de regulación que induce la terminación prematura de la transcripción de la célula huésped (Severinov *et al.*, 1994). De manera general, el acomodar estas dos grandes inserciones dentro de la estructura de la ARNP, es un indicativo de la organización modular de la ARNP en dominios discretos e independientes.

En arqueas, a diferencia de bacterias y eucariontes, las subunidades homólogas a la  $\beta$  y  $\beta'$ , se encuentran divididas en varios polipéptidos pequeños codificados por genes separados. De manera tal que durante el ensamblaje de la ARNP estos necesitan reunirse para formar una enzima funcional. Estudios *in vitro* mostraron que la separación de la subunidad  $\beta$  de la ARNP de *E. coli* en dos polipéptidos independientes, no afecta el ensamblaje ni la funcionalidad de la ARNP (Severinov *et al.*, 1996).

### 1.5 La subunidad Beta prima ( $\beta'$ )

Es la subunidad más grande de la ARNP de *E. coli*, consta de 1407 aminoácidos y está codificada por el gen *rpoC*. Esta subunidad, de manera similar a la  $\beta$ , presenta ocho diferentes regiones que se conservan evolutivamente (A-H) (Figura 1.2, C). Como se mencionó anteriormente, la subunidad  $\beta'$  forma el centro catalítico de la enzima conjuntamente con la subunidad  $\beta$ . La región conservada en el amino terminal (A) contiene un motivo del tipo dedo de zinc ( $\text{Cys}_4\text{-Zn}^{+2}$ ), el cual se cree que está involucrado en la unión del ADN templado. Por otra parte, se ha observado que las regiones C y G contactan el extremo 3' de la cadena de ARN naciente (Borukhov *et al.*, 1991).

Por otra parte, varios estudios han establecido que el motivo tipo *coiled-coil* conformado por los residuos 260-309 de la subunidad  $\beta'$ , es importante para la interacción con el factor  $\sigma^{70}$ , principalmente con las regiones 2.1 y 2.2 (Arthur *et al.*, 2000; Arthur & Burgess, 1998). Se ha observado que la subunidad  $\beta'$  libre es capaz de enmascarar los sitios de unión a ADN del factor  $\sigma^{70}$ , lo que sugiere que la interacción entre ambas subunidades es determinante para lograr ciertos rearrreglos de dominios asociados con la formación de la holoenzima (Kulbachinskiy *et al.*, 1999). La interacción entre el motivo *coiled-coil* y el factor  $\sigma^{70}$  es suficiente para disparar cambios conformacionales que exponen las regiones 2.3 y 2.4 de este último (Young *et al.*, 2001). De manera notable, la región 2.4 es la encargada de reconocer e interactuar con la caja -10 del promotor (Malhotra *et al.*, 1996). Por último, se ha inferido que este motivo, al encontrarse altamente conservado entre las diferentes especies de bacterias,

constituye un sitio importante de interacción con  $\sigma^{70}$ . De hecho se ha demostrado que este motivo interacciona con todos los diferentes factores  $\sigma$  presentes en *E.coli*, así como también con el factor  $\sigma^A$  de *Bacillus subtilis* (Young *et al.*, 2001).

La subunidad  $\beta'$  también contiene una región dispensable (DR) que se ubica a partir del a.a 1000; a diferencia de la subunidad  $\beta$ , esta se localiza en el dominio G, dividiéndolo en G y G' (Figura 1.2, C) (Zakharova *et al.*, 1998). Como se ha mencionado anteriormente, se presume que la remoción de esta región no afecta la funcionalidad de la ARNP. Sin embargo, se ha demostrado que la remoción de pequeños grupos de aminoácidos dentro de la misma causa un efecto dramático en la velocidad de elongación de la ARNP (Zakharova *et al.*, 1998). No obstante, el hecho que la DR se encuentre totalmente ausente en otros organismos sugiere que su papel puede ser indirecto al afectar las funciones de dominios conservados adyacentes, específicamente el dominio G, el cual se conoce que está involucrado en arrestar la transcripción en los sitios de pausa (Zakharova *et al.*, 1998).

Por otro lado, se han caracterizado mutantes dentro de la subunidad  $\beta'$ , localizadas en varios de los segmentos conservados (C, E, F, G y H), las cuales afectan la pausa y terminación de la ARNP. Esto sugiere fuertemente que la subunidad  $\beta'$  está íntimamente involucrada con el evento de terminación transcripcional.

### **1.6 La subunidad omega ( $\omega$ )**

Esta subunidad consta de 91 aminoácidos y es la única que no es esencial para la viabilidad celular bajo condiciones óptimas de crecimiento. En ensayos de transcripción *in vitro* no se observaron diferencias en la actividad entre la enzima silvestre y una variante de ARNP reconstituida en ausencia de esta subunidad (Tang *et al.*, 1995; Gentry *et al.*, 1991; Zalenskaya *et al.*, 1990). Sin embargo, cabe resaltar que existe una alta identidad de secuencia entre la subunidad  $\omega$  y sus homólogos de arqueas y eucariontes, lo que sugiere que juega una función importante, aunque no esencial, para la funcionalidad de la ARNP (Ver Tabla 1.1) (Minakhin *et al.*, 2001). El mismo estudio propone que la subunidad  $\omega$  promueve el ensamblaje de la ARNP, al actuar como un pestillo molecular que permite el anclaje del complejo preensamblado  $\alpha_2\beta$  con la subunidad  $\beta'$ . En este sentido, se ha descrito la existencia de ciertas regiones conservadas en la subunidad  $\omega$ , las cuales interaccionan simultáneamente con las regiones D, G y carboxilo terminal de la subunidad  $\beta'$ . Dicha interacción promueve una reorganización de la subunidad  $\beta'$  facilitando así la interacción con el complejo

preensamblado  $\alpha_2\beta$  (Minakhin *et al.*, 2001; Ebright, 2000). Por último, en un estudio llevado a cabo por Ghosh y colaboradores, se demostró que la subunidad  $\omega$  previene la agregación de la subunidad  $\beta'$  bajo condiciones de renaturalización *in vitro* (Ghosh *et al.*, 2001). Esto sugiere que la subunidad  $\omega$  se une simultáneamente a los dominios amino y carboxilo terminal de la subunidad  $\beta'$ , lo cual ayuda a mantener la subunidad  $\beta'$  en una conformación resistente a la agregación antes de reclutarse finalmente al complejo  $\alpha_2\beta$ . Por último, la subunidad  $\sigma$  se analizará con detalle en el capítulo siguiente.

### 1.7 Estructura del core de la ARNP bacteriana

En años recientes diversos estudios estructurales han permitido entender de manera substancial la relación estructura-función de la ARNP bacteriana (Borukhov & Nudler, 2003; Murakami & Darst, 2003). El primer hallazgo significativo proviene de la determinación a 3.3 Å de resolución de la estructura atómica del *core* de la ARNP de *Thermus aquaticus* (Zhang *et al.*, 1999). La estructura reveló que el *core* presenta una arquitectura molecular en forma de pinza de cangrejo (*crab-claw like shape*) con una dimensión aproximada de 150 Å de longitud (medido desde el fondo hasta la punta de las pinzas) por 115 Å de alto y 110 Å de ancho. Las subunidades  $\beta$  y  $\beta'$  del *core* forman dos lóbulos estructurales, entre los que se forma una depresión o hendidura dentro de la estructura conocida como canal principal (Figura 1.3). El canal principal tiene un diámetro de 27 Å, el cual es suficiente para acomodar el ADN de doble cadena, y en el fondo de la pared del mismo se asientan los residuos catalíticos. La pinza menor superior está compuesta mayoritariamente por la subunidad  $\beta$ , mientras que la pinza inferior la compone la subunidad  $\beta'$ . Segmentos conservados de ambas subunidades (I, C, G, H de la  $\beta$  y H, D de la  $\beta'$ ) interaccionan y forman una interfase extensa, principalmente donde se conforma el centro catalítico de la ARNP. El centro catalítico está compuesto por una secuencia de aminoácidos altamente conservados –**NADFDGD** pertenecientes a la subunidad  $\beta'$ , de los cuales los residuos de ácido aspártico son los encargados de quelar el ión  $Mg^{+2}$  requerido para llevar a cabo la catálisis (Borukhov & Nudler, 2003; Vassylyev *et al.*, 2002). Específicamente, las regiones H, I y D de las subunidades  $\beta$  y  $\beta'$  respectivamente, interaccionan para posicionar correctamente el motivo de quelación del magnesio dentro del sitio activo (Darst, 2001). De manera general, la topología y arquitectura molecular mostrada por la ARNP de *T. aquaticus* es muy parecida a la RNAP II de levadura, mientras que el plegamiento de los segmentos

altamente conservados alrededor del sitio activo son esencialmente idénticos (Murakami & Darst, 2003). Por otra parte, la estructura mostró que las subunidades  $\alpha_I$  y  $\alpha_{II}$  se encuentran en una posición distal respecto al sitio activo, y que el dímero formado por el dominio amino terminal de ambas subunidades  $\alpha_{NTD}$  sirven de andamiaje molecular para el ensamblaje del resto de las subunidades ( $\beta$  y  $\beta'$ ), sin tener algún papel en la catálisis. De hecho, ningún residuo del dímero  $\alpha_2$  tiene acceso al canal interno de la ARNP donde la catálisis tiene lugar. Elementos conservados de las subunidades  $\beta$  y  $\beta'$  establecen contacto directo con las subunidades  $\alpha_I$  y  $\alpha_{II}$ , respectivamente (Zhang *et al.*, 1999). Específicamente, el segmento conservado  $\beta I$  establece una serie de contactos críticos dentro del *core*, siendo la porción amino terminal de dicha región importante para interactuar con la subunidad  $\alpha_I$  y formar el intermediario  $\alpha_2\beta$ . La secuencia intermedia de la región  $\beta I$  establece contactos con ciertas regiones de la  $\beta'$  (C,G y H) que sirven para formar el centro catalítico, mientras que la porción carboxilo terminal es requerida para reclutar la subunidad  $\beta'$  al complejo intermediario  $\alpha_2\beta$ . Finalmente, la subunidad  $\omega$  se encuentra envolviendo y estableciendo contacto exclusivamente con la porción carboxilo terminal de la subunidad  $\beta'$ , lo cual ha sugerido que desempeña un papel de chaperona en el estadio final de ensamblaje de la ARNP (Minakhin *et al.*, 2001).

La reconstrucción estructural de la ARNP de *T. aquaticus* reveló otros elementos importantes para su funcionalidad, como los segmentos conservados de la hoja  $\beta$  ( $\beta$  *flap*) y el timón  $\beta'$  ( $\beta'$  *rudder*). La  $\beta$  *flap* está constituida por la región conservada G de la subunidad  $\beta$  ( $\beta_G$  *flap*), mientras que la  $\beta'$  *rudder* está conformada por la porción carboxilo terminal de la región C y una fracción de la secuencia ubicada entre las regiones B y C de la subunidad  $\beta'$  ( $\beta'_C$  *rudder*). Se ha propuesto que estos dos elementos estructurales determinan el progreso de la holoenzima durante la transcripción. Específicamente, la  $\beta_G$  *flap* se ubica cerca del canal de unión al ADN, y se ha sugerido que modula la velocidad de elongación de la RNAP. Por su parte, la  $\beta'_C$  *rudder* está involucrada en separar las cadenas del híbrido ADN-RNA (Figura 1.3) (Severinov, 2000; Zhang *et al.*, 1999).

Otra característica estructural importante para la funcionalidad de la ARNP es la región F de la subunidad  $\beta'$ , la cual atraviesa el canal principal, conectando de esta manera las subunidades  $\beta'$  y  $\beta$ . El segmento helicoidal que secciona a la mitad el canal

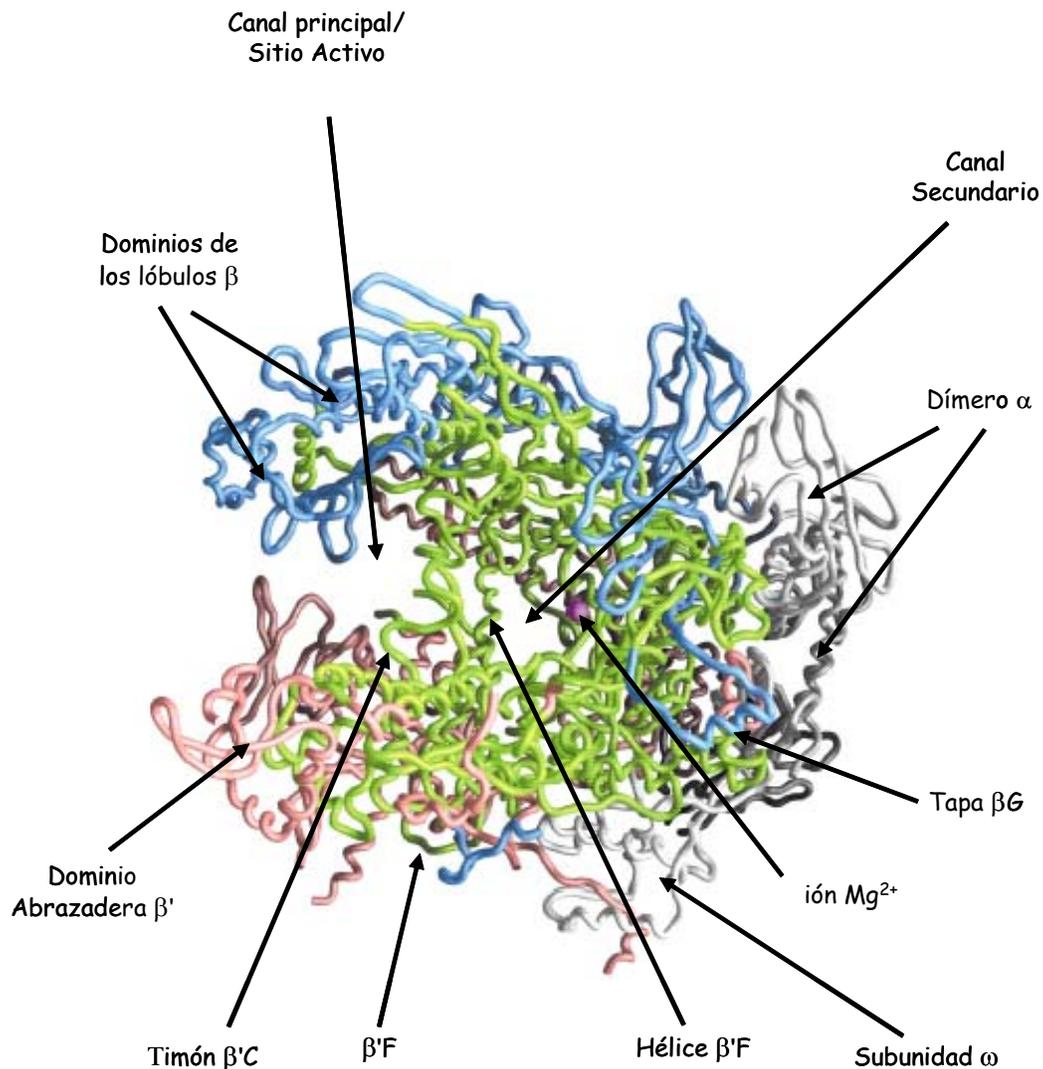


Figura 1.3. La figura muestra el trazo de la cadena de carbonos  $\alpha$  correspondientes a la estructura del core de la ARN Polimerasa de *T. aquaticus* (Darst, 2001). Los monómeros de las subunidades  $\alpha I$  y  $\alpha II$ , así como de la subunidad  $\omega$ , se muestran en color blanco. Las subunidades mayores  $\beta$  y  $\beta'$  se encuentran coloreadas en azul y rosado, respectivamente. Los segmentos evolutivamente conservados de ambas subunidades fueron resaltados en color verde. Los elementos que se ubican alrededor del sitio activo están altamente conservados en todas las especies por ser el sitio donde ocurre la catálisis. El ión magnesio  $Mg^{+2}$  requerido para la catálisis esta representado con una esfera en color morado. Con flechas se señalan varios elementos estructurales importantes para la funcionalidad de la ARNP.

central es conocido como la hélice de la subunidad  $\beta'_F$ . Esta hélice, junto con la región G de la subunidad  $\beta'$  ( $\beta'_G$ ), la cual sobresale hacia el canal principal, forman una estructura que bifurca el canal principal de la ARNP en dos canales separados (Figura 3). El menor de ellos, conocido como canal secundario, presenta 12 Å de diámetro el cual no es suficiente para acomodar el ADN de doble cadena. Se ha propuesto que la función de este canal secundario es la de suministrar los sustratos de ribonucleótidos hacia el sitio activo (Zhang *et al.*, 1999). En general, la forma y el tamaño del *core* de la ARNP de *T. aquaticus* corresponde muy bien con el mapa de densidad electrónica de la enzima de *E. coli* (Finn *et al.*, 2000).

## **Capítulo 2. Factores sigma ( $\sigma$ )**

### **2.1 Características Generales**

En 1969 se descubrió que la ARNP podía ser “disectada” en dos componentes principales, la ARNP o *core* y un nuevo elemento denominado factor  $\sigma$  (Burgess *et al.*, 1969). La subunidad  $\sigma$  al conferirle al *core* de la ARNP especificidad de reconocimiento para distintas secuencias promotoras, garantiza el inicio sitio específico de la transcripción, asegurando de esta manera que los grupos de genes específicos se transcriban coordinadamente bajo los estímulos celulares o del medio apropiados. La diferenciación funcional de la ARNP, asociada a diferentes subunidades  $\sigma$ , fue reportada por primera vez en la bacteria *B. subtilis* durante su fase de esporulación; posteriormente, este fenómeno fue observado en otras especies bacterianas (Kroos *et al.*, 1999; Fujita, 2000). Los proyectos de secuenciación genómica han revelado que el número de subunidades  $\sigma$  varía grandemente entre las diferentes especies de bacterias. Por ejemplo, *Mycoplasma genitalium* presenta un sólo factor transcripcional, mientras que *E. coli*, *B. subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa* presentan 7, 18 y 24 factores sigma, respectivamente. Hasta el momento, *Streptomyces coelicolor* ha sido el organismo descrito que presenta más subunidades  $\sigma$ , con 65, pero salvo esta excepción la mayoría de las especies bacterianas presentan al menos 3 de estos factores (Gruber & Gross, 2003; Bentley *et al.*, 2002; Mittenhuber, 2002).

Basados en criterios de similitud de función y de secuencia, los factores  $\sigma$  han sido agrupados en dos clases o familias filogenéticamente distintas. Una familia relacionada en secuencia al factor primario de *E. coli*  $\sigma^{70}$  y otra familia cuyo único miembro es el factor  $\sigma^{54}$  (Lonetto *et al.*, 1992). Ambas familias difieren en el mecanismo de inicio de la transcripción. La familia  $\sigma^{70}$  a su vez ha sido dividida en tres

diferentes grupos. Los factores del grupo 1 o primarios, presentan un alto grado de conservación entre ellos, y son los encargados de reconocer la mayoría de los genes que se transcriben en células en rápido crecimiento y que son esenciales para el desarrollo. El grupo 2 lo componen aquellos factores que son muy similares en secuencia a los factores primarios pero que no son indispensables para la supervivencia de la célula. Finalmente, los factores del grupo 3 conocidos como alternativos, difieren considerablemente en secuencia comparados con los primarios y son los responsables de la transcripción de regulones específicos (Helmann & Chamberlin, 1988; Lonetto *et al.*, 1992).

A juzgar por la pobre identidad de secuencia entre los miembros de ambas familias, se pensó por algún tiempo que las holoenzimas que formaban también presentaban variaciones estructurales. Sin embargo, actualmente se conoce que ambos tipos de factores  $\sigma$  se unen al mismo *core* de la ARNP para formar una holoenzima funcionalmente competente. Estudios usando fragmentos de péptidos han mostrado que la interfase formada por  $\sigma^{70}$  y  $\sigma^{54}$  con el *core* de la ARNP es muy similar (Tintut & Gralla, 1995; Svergun *et al.*, 2000; Wigneshweraraj *et al.*, 2000). Diversos estudios han mostrado que, dentro de la  $E\sigma^{70}$ , la subunidad  $\beta'$  provee el principal sitio de interacción para el factor  $\sigma^{70}$ , mientras que la subunidad  $\beta$  contribuye con interacciones adicionales (Katayama *et al.*, 2000; Traviglia *et al.*, 1999a; 1999b; Arthur & Burgess, 1998; Owens *et al.*, 1998; Greiner *et al.*, 1996). Aunque actualmente no se cuenta con una estructura de  $\sigma^{54}$  a alta resolución, la comparación de la estructura tridimensional de fragmentos de  $\sigma^{70}$  con los datos de dispersión de rayos x de ángulo pequeño que se tienen de  $\sigma^{54}$ , han servido para proponer que ambos factores se unen a regiones muy similares del *core* de la ARNP (Svergun *et al.*, 2000; Malhotra *et al.*, 1996).

## **2.2 Familia $\sigma^{70}$**

Estudios de alineamientos múltiples de secuencia han identificado cuatro regiones altamente conservadas entre los miembros de esta familia. Dichas regiones se han dividido en subregiones, cada una de las cuales presenta una función específica (Gruber & Gross, 2003; Lonetto *et al.*, 1992; Helmann & Chamberlin, 1988) (Figura 2.1).

FACTOR SIGMA	TAMAÑO (LONG. AA)	NOMBRE DEL GEN	SECUENCIA DE RECONOCIMIENTO <i>UPSTREAM</i>	SECUENCIA DE RECONOCIMIENTO <i>DOWNSTREAM</i>
Familia $\sigma^{70}$				
			-35	-10
$\sigma^{70}$	613	<i>rpoD</i>	TTGACA	TATAAT
$\sigma^{38}$	362	<i>rpoS</i>	-	CTATACT
$\sigma^{32}$	284	<i>rpoH</i>	TNtCNCCCTTGAA	CCCCATtTA
$\sigma^{28}$	239	<i>rpoF</i>	TAAA	GCCGATAA
$\sigma^E$	202	<i>rpoE</i>	GAACTT	TCTGAT
$\sigma^{18}$	173	<i>fecI</i>	AAGGAAAAT	TCCTTT
Familia $\sigma^{54}$				
			-24	-12
$\sigma^{54}$	477	<i>rpoN</i>	TtGGcaca	ttGCA

Tabla 2.1. Características de los siete factores transcripcionales presentes en *E. coli*

*E. coli* presenta 7 factores transcripcionales que reconocen distintas secuencias promotoras y transcriben grupos de genes acorde a situaciones fisiológicas específicas (Tabla 2.1). En este capítulo nos enfocaremos en el análisis del factor transcripcional primario  $\sigma^{70}$  de *E. coli*, que es parte de la forma de la ARNP que expresa la mayoría de los genes durante la fase de crecimiento exponencial. El factor  $\sigma^{70}$  está conformado por un solo polipéptido de 613 a.a de longitud y un peso molecular de 70.2 kDa. El factor  $\sigma^{70}$  reconoce específicamente promotores que presentan secuencias hexanucleótidas consensos ubicadas a -35 (5'-TTGACA-3') y -10 (5'-TATAAT-3') pares de bases con respecto al sitio de inicio de la transcripción (+1) (Ver Tabla 2.1). En los promotores dependientes de  $\sigma^{70}$ , el reconocimiento del elemento -10 está mediado por una estructura de  $\alpha$ -hélice anfipática presente en la subregión 2.4 (Malhotra *et al.*, 1996) Asimismo, un motivo del tipo hélice-vuelta-hélice (HVH) dentro de la subregión 4.2 es

el responsable de establecer contacto con el elemento o caja  $-35$  del promotor (Lonetto *et al.*, 1992; Campbell *et al.*, 2002).

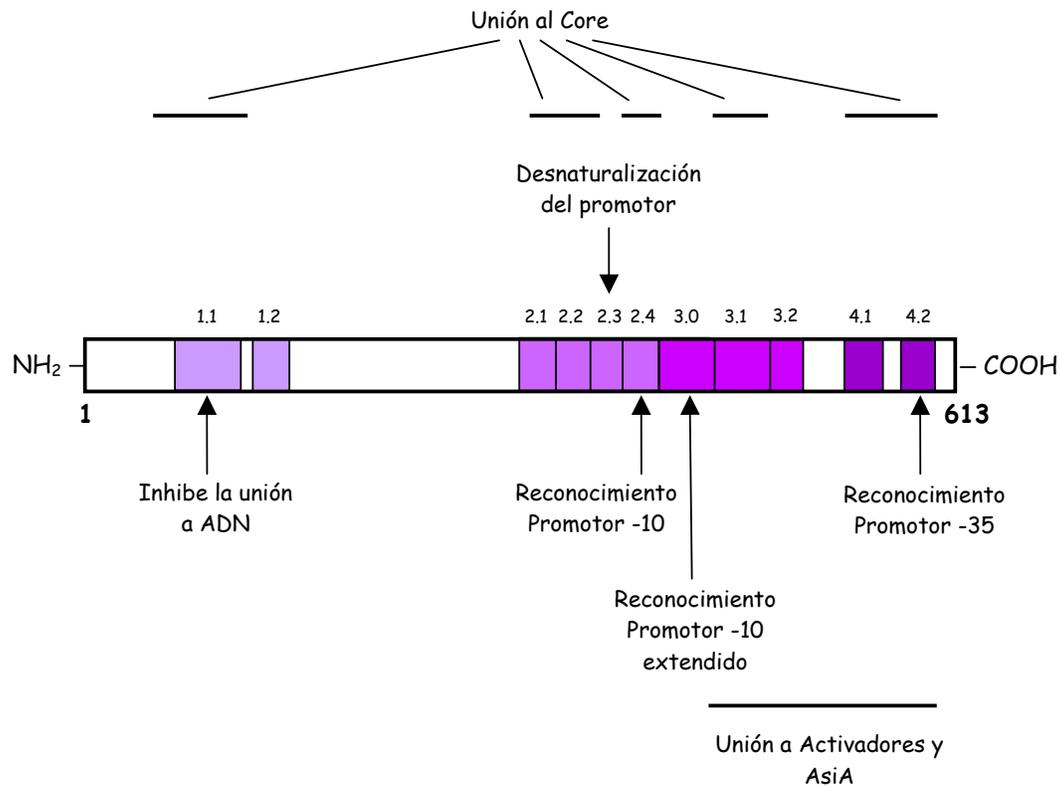


Figura 2.1. Esquema que muestra la organización y función de los dominios de la subunidad  $\sigma^{70}$  de *E. coli*. Las regiones conservadas están enmarcadas en recuadros con diferentes tonalidades de morado. Los dominios requeridos para el reconocimiento del promotor se detallan en el esquema, al igual que la región 1.1, la cual es única para  $\sigma^{70}$  y cuya función es la de inhibir la unión del factor  $\sigma^{70}$  al ADN, en ausencia del *core* (las flechas indican la función asignada a cada región). Las barras sólidas indican las regiones que participan en la unión al *core*, así como en la interacción con el factor AsiA (factor anti-sigma).

La interfase formada por el factor  $\sigma^{70}$  y el *core* de la ARNP es extensa, altamente conservada y funcionalmente especializada (Gruber & Gross, 2003; Sharp *et al.*, 1999). Estudios bioquímicos han mostrado que mutaciones en ciertos residuos de las subregiones 1.1, 2.2, 2.4, 3.1, 4.1 y 4.2 del factor  $\sigma^{70}$  afectan la interacción con el *core* de la ARNP. Estos residuos se encuentran idealmente localizados para comunicar al *core* de la ARNP información estructural acerca del estado de unión de  $\sigma^{70}$ .

## 2.3 Organización y función de las regiones conservadas del factor $\sigma^{70}$

### 2.3.1 Región 1

La región 1 del factor  $\sigma^{70}$  se localiza en el amino terminal y está dividida en dos subregiones, 1.1 y 1.2. Estas se encuentran poco conservadas en secuencia, aunque

presentan como rasgo distintivo la presencia de residuos ácidos. Se ha demostrado que ciertos determinantes dentro de la subregión 1.1 inhiben la unión del factor  $\sigma^{70}$  al ADN en ausencia del *core* de la ARNP. Estos residuos interactúan con el dominio de unión a ADN, ubicado en la región 4, lo que explica porqué el factor  $\sigma^{70}$  en solución es incapaz de unirse al ADN. Una vez que  $\sigma^{70}$  interactúa con el *core*, la región 1.1 sufre un cambio conformacional que permite que se exponga el dominio de unión a ADN, promoviendo así el reconocimiento y la unión al promotor. Por otra parte, la subregión 1.2 también ha sido implicada en la inhibición de la interacción de  $\sigma^{70}$  con el ADN, ya que sus residuos ácidos repelen electrostáticamente el ADN. Adicionalmente, se ha observado que la remoción de esta subregión afecta la progresión de la ARNP del complejo de promotor cerrado a abierto, por lo que se ha sugerido que se requiere para la formación del complejo abierto (Mekler *et al.*, 2002; Baldwin & Dombroski, 2001; Wilson & Dombroski, 1997).

Notablemente, el factor  $\sigma^{32}$  de *E. coli* presenta un segmento de 18 aminoácidos no conservados en la región amino terminal que exhibe analogía funcional con la región 1 del factor  $\sigma^{70}$ . Como podría esperarse, la remoción de dicha región posibilita que el factor  $\sigma^{32}$  se una al ADN en ausencia del *core* de la ARNP (Dombroski *et al.*, 1993).

### 2.3.2 Región 2

La región 2 de  $\sigma^{70}$  está dividida en cuatro subregiones y contiene los residuos de aminoácidos más altamente conservados dentro de la familia (Figura 2.1). La subregión 2.1 contiene los determinantes que participan en la unión del *core* de la ARNP (Gruber & Gross, 2003; Burgess & Anthony, 2001; Sharp *et al.*, 1999).

La subregión 2.3 contiene una secuencia de aminoácidos aromáticos conservados que están involucrados en la desnaturalización del ADN de la región promotora (Malhotra *et al.*, 1996). Se ha propuesto que las cadenas laterales de estos residuos se intercalan con las bases del ADN de doble cadena, desestabilizando su estructura, y originando un estado de desnaturalización local (Fenton *et al.*, 2000). La estabilización de esta zona de desnaturalización se logra por la interacción que ejerce la misma región 2.3 con la cadena no templado. Una evidencia que sustenta esta hipótesis es el hecho que el factor  $\sigma$  puede ser unido fotoquímicamente al ADN de cadena sencilla (Hillel & Wu, 1978; Hilton & Whiteley, 1985). Finalmente, y acorde con la función de esta subregión, se ha observado en la estructura del fragmento  $\sigma^{70}$  (114-446)

que estos residuos aromáticos se ubican en la cara expuesta al solvente de la  $\alpha$  hélice anfipática que conforman las subregiones adyacentes 2.3 y 2.4 (Tomisc *et al.*, 2001; Malhotra *et al.*, 1996).

Por último, evidencias provenientes de estudios genéticos, bioquímicos y estructurales indican que la subregión 2.4 participa en el reconocimiento del elemento –10 del promotor (Zuber *et al.*, 1989; Dombroski *et al.*, 1992; Chan *et al.*, 1996; Malhotra *et al.*, 1996).

### **2.3.3 Región 3**

La región 3 está subdividida en tres subregiones (3.0, 3.1 y 3.2) (Figura 2.1). Estructuralmente es un dominio compuesto por tres  $\alpha$  hélices compactas, una de las cuales es la encargada de interaccionar con el elemento –10 extendido del promotor (Sanderson *et al.*, 2003; Campbell *et al.*, 2002; Murakami *et al.*, 2002). Se ha observado que en algunos promotores el reconocimiento del elemento –10 extendido (motivo TG, de la posición –15 a la –13) por la subregión 3.0 puede reemplazar la presencia de la caja –35 consenso del promotor en caso que dicha región se encuentre ausente (Campbell *et al.*, 2002; Barne *et al.*, 1997). Sin embargo, recientemente se reportó el caso opuesto, en el cual los elementos –35 y –10 extendido del promotor P<sub>minor</sub> del bacteriofago T4 compensan la ausencia o la pobre conservación del elemento –10 de dicho promotor (Hook-Barnard *et al.*, 2006). La región 3 es considerada como un dominio de unión que conecta las regiones 2 y 4 del factor  $\sigma^{70}$ . Se ha propuesto que en este arreglo estructural la subregión 3.2 bloquea el canal de salida del ARN. La subregión 3.2, rica en residuos ácidos, produce un choque estérico entre la cadena de ARN naciente y el factor  $\sigma^{70}$ , causando así la disociación de los productos abortivos de ARN (Murakami *et al.*, 2002; Vassylyev *et al.*, 2002). Se ha observado que mutaciones en esta subregión reducen el número de transcritos abortivos y aumentan el escape de la ARNP de su promotor (Cashel *et al.*, 2003).

### **2.3.4 Región 4**

La región 4 está subdividida en dos subregiones (4.1 y 4.2). Esta región participa en la unión al *core* de la ARNP. Sin embargo, su función más relevante consiste en el reconocimiento del elemento –35 del promotor a través de un motivo de unión a ADN del tipo HVH, el cual se localiza en la subregión 4.2 (Campbell *et al.*, 2002). Además de las evidencias estructurales, estudios genéticos han mostrado que dos mutaciones en la

subregión 4.2 del factor  $\sigma^{70}$  son suficientes para suprimir de manera alelo-específica cambios en la región -35 de los genes *ant* del fago P22 y *lac* de *E.coli* (Siegele *et al.*, 1989).

Se piensa que el factor  $\sigma^{70}$  no se une simultáneamente a las regiones -10 y -35 del promotor, sino que ocurre de manera secuencial y comenzando por la región -35. Esto explica en parte, por qué el empleo de activadores transcripcionales ha sido seleccionado como mecanismo de regulación positiva en promotores cuya región -35 se encuentra ausente o poco conservada respecto al consenso. En este sentido, la asociación entre el activador y la ARNP compensa la débil unión de la ARNP al ADN y garantiza el reclutamiento y el correcto posicionamiento de la ARNP hacia estos promotores (Campbell *et al.*, 2002). Por otra parte, se ha documentado que una pequeña ventana de aminoácidos básicos ubicados después de la subregión 4.2 constituye un blanco de interacción para activadores como AraC, MalT, CRP y PhoB (Lonetto *et al.*, 1998). Adicionalmente, en la región carboxilo terminal de esta subregión se localiza un segmento de 63 aminoácidos que es blanco de regulación por la proteína AsiA del bacteriófago T4. Esta proteína es un factor anti-sigma que inhibe la transcripción al impedir la interacción entre la región 4 del factor  $\sigma^{70}$  y el dominio  $\beta$  *flap* de la ARNP (Gregory *et al.*, 2004; Kuznedelov *et al.*, 2002).

## 2.4 Relación estructura-función de las regiones conservadas del factor $\sigma^{70}$

Recientemente se determinó la estructura tridimensional de las holoenzimas de *T. aquaticus* y *T. thermophilus* en presencia del factor transcripcional  $\sigma^{70}$ . En general, ambas mostraron la misma topología en forma de pinza de cangrejo, igual a la exhibida por el *core* de la ARNP de *T. aquaticus* y la ARNP II de *Saccharomyces cerevisiae* (Vassilyev *et al.*, 2002).

En lo que respecta a  $\sigma^{70}$ , este presentó una estructura molecular conformada por cuatro dominios helicoidales flexibles e interconectados entre sí ( $\sigma_{1.1}$ ,  $\sigma_2$ ,  $\sigma_3$  y  $\sigma_4$ ), cada uno de los cuales contiene varias regiones conservadas. Los dominios globulares del factor  $\sigma^{70}$  se encuentran distribuidos a través de toda la cara superior de la ARNP. La interfase entre  $\sigma$  y el *core* es muy extensa y su interacción muy estable, con una constante de disociación estimada en  $10^{-9}$  M. La estructura de la holoenzima de *T. thermophilus* no reveló información estructural acerca de la región  $\sigma_{1.1}$  por encontrarse desordenada dentro del cristal; sin embargo, dos funciones le han sido asignadas

principalmente. Primero, esta región es la encargada de inhibir al factor  $\sigma^{70}$  en el reconocimiento de su promotor, no obstante a que dicha inhibición es eliminada al unirse al *core* de la ARNP para formar la holoenzima. Segundo, en el caso particular de algunos promotores, la región  $\sigma_{1.1}$  acelera la formación del complejo de promotor abierto. Adicionalmente, estudios de transferencia de la energía de fluorescencia (FRET) han revelado que esta región se posiciona dentro del canal del sitio activo de la ARNP, siendo posteriormente desplazada tras la formación del complejo abierto. Lo anterior explica cómo esta región puede afectar la cinética de formación del complejo abierto (Murakami & Darst, 2003). La subregión  $\sigma_{2.3}$  es esencial para la desnaturalización del ADN, la cual es mediada a través de la unión secuencia-específica de la subregión  $\sigma_{2.3}$  a la cadena no templado del elemento consenso  $-10$  del promotor, lo cual conlleva a la estabilización de la burbuja inicial de transcripción. Acorde con las evidencias genéticas y bioquímicas, las sub-regiones  $\sigma_{2.4}$  y  $\sigma_{4.2}$  se encuentran expuestas al solvente y distanciadas acordemente para el reconocimiento de los elementos consenso  $-10$  y  $-35$  del promotor, respectivamente (Figura 2.2, **a** y **b**). Por su parte, la subregión  $\sigma_{3.2}$  es un asa de conexión que permite la separación entre los determinantes de unión al promotor y además se interna dentro del sitio activo de la ARNP (Murakami *et al.*, 2002; Vassylyev *et al.*, 2002). Finalmente, los aminoácidos de la hélice amino terminal pertenecientes a la región  $\sigma_{3.0}$ , se encuentran bien posicionados para el reconocimiento de promotores con secuencia  $-10$  extendida (Murakami & Darst, 2003).

#### **2.4.1 Flexibilidad estructural de la Holoenzima $E\sigma^{70}$**

La conversión del *core* hacia la holoenzima es acompañada de cambios conformacionales en los lóbulos  $\beta$ , principalmente en los dominios de la abrazadera  $\beta'$  ( $\beta'$  clamp) y la  $\beta_G$  flap. El cambio más significativo ocurre en el dominio de la abrazadera  $\beta'$ . Se cree que la oscilación de la abrazadera  $\beta'$  está asociada con la apertura y cierre del canal principal. Se presume que el estado abierto es importante durante el inicio de la transcripción, en donde el ADN debe acceder al sitio activo de la ARNP, mientras que el cierre de la abrazadera está acoplado a la presencia del híbrido ADN-ARN y al aumento de la procesividad durante la fase de elongación (Murakami & Darst, 2003). Por su parte, el movimiento de la  $\beta_G$  flap está asociada al correcto posicionamiento de la subregión  $\sigma_{4.2}$ . En la holoenzima se distinguen principalmente dos módulos estructurales que se mueven concertadamente. Un módulo está formado por la región  $\sigma_4$  y la  $\beta_G$  flap ( $\sigma_4$ - $\beta_G$  flap), mientras que el otro está constituido por la

interacción que establecen las regiones  $\sigma_2$  y  $\sigma_3$  del factor  $\sigma^{70}$  con el dominio de la abrazadera  $\beta'$ . El movimiento de ambos módulos ocurre de manera independiente, lo que se cree que controla la distancia de separación entre las subregiones  $\sigma_{2,4}$  y  $\sigma_{4,2}$  encargadas de reconocer el promotor. Esta plasticidad es importante para el reconocimiento de promotores cuya distancia de separación tiende a variar entre las regiones del promotor  $-10$  y  $-35$  (Murakami *et al.*, 2002); (Ver Figura 2.2, **a** y **b**).

Durante la formación del complejo de promotor abierto, ciertos aminoácidos aromáticos conservados de la región  $\sigma_{2,3}$  del factor  $\sigma^{70}$  interactúan con las bases de ADN de la cadena no templado que son expuestas debido a la distorsión o desapareamiento inherente que sufre el tracto rico en AT de la región  $-10$  del promotor. Esta interacción estabiliza el pequeño segmento inicial de ADN desnaturalizado. Adicionalmente, esta interacción conlleva al desenrollamiento y a crear flexibilidad dentro de la burbuja, permitiendo que el ADN ubicado corriente arriba de la misma se curve o se doble hacia la entrada del canal del sitio activo. El proceso de entrada del ADN al sitio activo es acompañada por la salida simultánea de la subregión  $\sigma_{1,1}$  por un mecanismo aún desconocido (Mekler *et al.*, 2002; Murakami *et al.*, 2002). Posteriormente, la cadena templado es dirigida hacia el sitio activo a través de un túnel de cargas positivas creado por varios segmentos de proteína, mientras que el ADN de doble cadena ubicado corriente arriba es abrazado o encerrado en otro túnel diferente, conformado por las subunidades  $\beta$  y  $\beta'$  (Murakami & Darst, 2003) (Figura 2.2, **b**).

La síntesis del ARN naciente comienza cuando los sustratos de NTPs son suministrados al sitio catalítico a través del canal secundario. El proceso de iniciación abortiva comienza cuando el transcrito de poca longitud en nucleótidos se encuentra con la región  $\sigma_{3,2}$ , la cual estorba o bloquea su salida. En cada evento la cadena de ARN debe desplazar dicha región. De lo contrario, debe disociarse del complejo, para ser finalmente liberado a través del canal secundario. Eventualmente la cadena de ARN es elongada en una longitud de  $\sim 12$  nucleótidos, lo cual es suficiente para que el híbrido de ADN-ARN ocupe el canal de salida de ARN, el cual se halla completamente debajo de la  $\beta_G$  flap, permitiendo así desplazar el asa de la región  $\sigma_{3,2}$  (Murakami & Darst, 2003). Este desplazamiento está asociado con el evento de escape del promotor por la ARNP, al desestabilizarse la interacción entre la región  $\sigma_4$  y el dominio de la  $\beta_G$  flap, interrumpiendo así la interacción de la subregión  $\sigma_{4,2}$  con la secuencia consenso  $-35$  del

promotor. Finalmente, la ARNP se libera del promotor y se transloca corriente arriba del ADN a medida que continúa el proceso de elongación. Este último evento es acom-

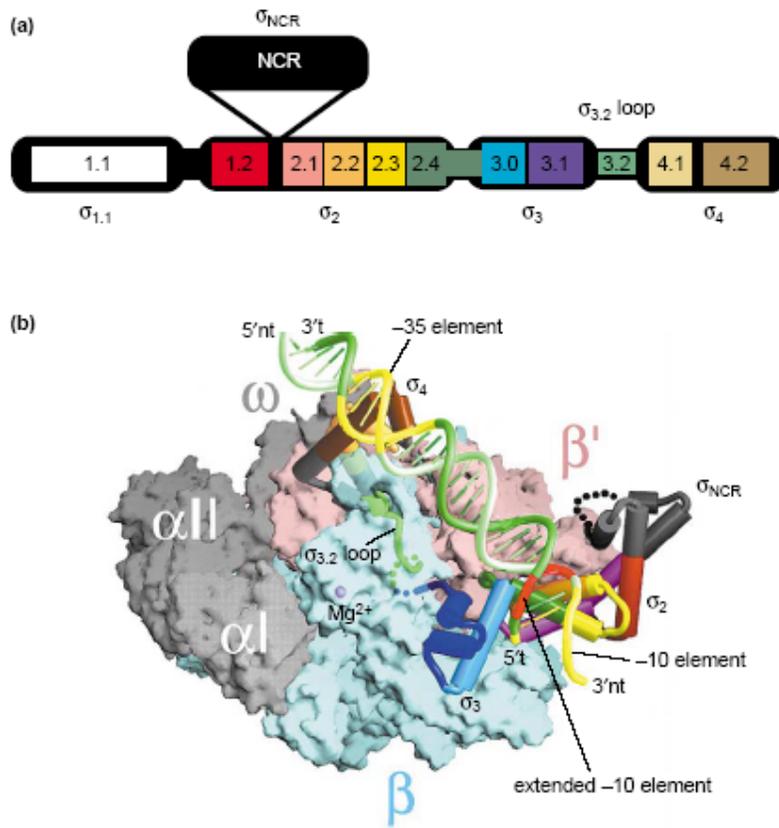


Figura 2.2. Estructura de la holoenzima asociada al factor  $\sigma^{70}$  bacteriano. En **a**) se muestra un esquema con la arquitectura y la organización funcional de los dominios del factor  $\sigma^{70}$ . Las regiones conservadas dentro de los diferentes dominios se muestran en diferentes colores. **b**) Figura que muestra la estructura del complejo holoenzima-ADN. Los componentes del *core* de la ARNP se muestran en forma de superficie molecular. Las subunidades  $\alpha I$ ,  $\alpha II$  y  $\omega$  se muestran en color gris, mientras que las subunidades  $\beta$  y  $\beta'$  se muestran en color azul y rosado, respectivamente. Dentro de la estructura se muestra el trazo de la cadena de los carbonos  $\alpha$  del factor  $\sigma^{70}$ , con las hélices representadas como cilindros y acorde con los colores mostrados en **a**. El ADN está representado como cadena de fosfatos con las cadenas no codificante y codificante coloreadas en verde oscuro y claro, respectivamente. Los elementos -10 y -35 del promotor están mostrados en amarillo, mientras que la región -10 extendida se muestra en rojo. (Tomado de Murakami & Darst, 2003).

pañado por la liberación del factor  $\sigma$ , en una etapa no definida aún. Recientemente han surgido evidencias muy interesantes que señalan que la unión de las región  $\sigma_2$  y  $\sigma_3$  al *core* de la ARN polimerasa no interfiere con la capacidad de elongación y tampoco con

el paso de los ácidos nucleicos dentro del complejo de elongación. Lo anterior sugiere que la disociación del factor  $\sigma$  de la holoenzima no es necesariamente un evento que debe suceder al inicio y antes de dar paso a la fase de elongación (Gnatt *et al.*, 2001; Mukhopadhyay *et al.*, 2001; Korzheva & Mustaev, 2000).

### Capítulo 3. Familia $\sigma^{54}$

#### 3.1 Características Generales

El factor transcripcional  $\sigma^{54}$ , codificado por el gen *rpoN*, está compuesto por un solo polipéptido de aproximadamente 477 aminoácidos y un peso molecular de 54 kDa. Este factor fue encontrado originalmente en bacterias entéricas. Sin embargo, actualmente se conoce que está ampliamente distribuido entre las especies bacterianas. La función histórica asignada a la holoenzima  $E\sigma^{54}$  de muchas proteobacterias ha sido asociada a la regulación del metabolismo nitrogenado, de ahí que este factor sea conocido como  $\sigma^N$ . Sin embargo, actualmente se conocen otras funciones fisiológicas reguladas o dependientes del factor  $\sigma^{54}$  (Merrick, 1993; Studholme & Buck, 2000). Entre estas podemos citar: la biosíntesis del flagelo en organismos como *Rhodobacter sphaeroides*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Caulobacter crescentus*. También en algunas bacterias el factor  $\sigma^{54}$  participa en la regulación de la expresión de proteínas involucradas en el transporte de ácidos dicarboxílicos y en el catabolismo de xileno y tolueno (Reitzer & Schneider, 2001). En la bacteria Gram-positiva *Bacillus subtilis*,  $\sigma^{54}$  está involucrado en la utilización de arginina y ornitina y en el transporte de fructosa. Entre el repertorio de funciones controladas también se encuentra el transporte de electrones, la respuesta a estrés por calor, la quimiotaxis y el uso de fuentes de carbono y nitrógeno (Buck *et al.*, 2000; Studholme & Buck, 2000). De manera notable, se ha propuesto que el factor  $\sigma^{54}$  regula la transcripción de factores  $\sigma$  alternativos, como es el caso del factor  $\sigma^{32}$  (*rpoH*) de *E. coli*, involucrado en respuesta a estrés por calor y el factor  $\sigma^{38}$  (*rpoS*) de *P. syringae* y *Borrelia burgdorferi*, durante la fase estacionaria (Pallen, 1999; Smith *et al.*, 2006). A pesar de esto, ninguno de los genes transcritos por  $E\sigma^{54}$  es esencial para el crecimiento y la supervivencia de la mayoría de las bacterias bajo condiciones favorables, excepto en *Myxococcus xanthus*, donde sí es esencial para su viabilidad celular (Buck *et al.*, 2000; Keseler & Kaiser, 1997).

Los proyectos de secuenciación genómica han revelado la presencia de marcos abiertos de lectura que codifican para factores  $\sigma^{54}$  en la mayoría de las bacterias, entre ellas podemos citar a: *Aquifex aeolicus* (termófilo extremo), parásitos intracelulares

como *Chlamydia pneumoniae*, *C. trachomatis* y espiroquetas. En los genomas bacterianos en los que se encuentra ausente destacan: la bacteria Gram-positiva *Mycobacterium tuberculosis*, el termófilo *Thermotoga maritima* y patógenos como *Mycoplasma genitalium* y *M. pneumoniae* (Studholme & Buck, 2000). La mayoría de los géneros bacterianos que contienen el gen *rpoN* presentan una sola copia cromosomal. Sin embargo, existen bacterias como *Rhodobacter sphaeroides*, *Bradyrhizobium japonicum* y *Rhizobium etli* que presentan más de una copia del gen *rpoN*. En *B. japonicum* se puede remover una de las dos copias del gen *rpoN* sin exhibir un nuevo fenotipo, mientras que en *R. etli*, la primera copia del gen *rpoN1* está involucrada en la asimilación de diversas fuentes de carbono y nitrógeno bajo condiciones de vida libre aeróbica. Por su parte, la copia *rpoN2*, se induce fuertemente en condiciones de baja tensión de oxígeno y está involucrada en la fijación de nitrógeno en condiciones de simbiosis (Michiels *et al.*, 1998; Shatters *et al.*, 1989; Ronson *et al.*, 1987; Kullik *et al.*, 1991; Powell *et al.*, 1995). Hasta el momento, *R. sphaeroides* es la única bacteria donde se han identificado cuatro copias funcionales del gen *rpoN*. Dos de las copias, *rpoN1* y *rpoN2*, controlan la expresión de diferentes grupos de genes involucrados en la fijación de nitrógeno y en la formación del aparato flagelar, respectivamente (Poggio *et al.*, 2004). Específicamente, Poggio y colaboradores demostraron que estas dos copias del gen *rpoN* en *R. sphaeroides* no son funcionalmente intercambiables, lo que pone de manifiesto la especialización de su función (Poggio *et al.*, 2004). Recientemente, estos autores demostraron que las bases moleculares que determinan esta especialización funcional radican en el reconocimiento o la unión diferencial de cada factor sigma por su respectivo promotor (*fliOp*, *nifUp*) los cuales difieren ligeramente en secuencia, particularmente en la identidad del nucleótido -11 (Poggio *et al.*, 2006). Adicionalmente, cada factor sigma es activado únicamente por una EBP de manera específica (Poggio *et al.*, 2005; 2006). Curiosamente, estos autores demostraron que el activador encargado de activar los genes expresados por el gen *rpoN2* está conformado funcionalmente por dos EBPs (FleQ/FleT), las cuales forman un heterolígmero (Poggio *et al.*, 2005). Hasta este momento el único caso conocido de formación de un heterolígmero funcional por dos EBPs (HrpR/HrpS) había sido reportado en *S. syringae* (Hutcheson *et al.*, 2001).

La expresión del gen *rpoN* es constitutiva generalmente, pero en algunas bacterias se regula por los niveles de oxígeno y nitrógeno (*Rhodobacter sphaeroides* y *rpoN1* de *B. japonicum*). En bacterias como *C. crescentus* se regula temporalmente

durante el ciclo celular, mientras que el gen *rpoN2* de *B. japonicum* es regulado negativamente (Kullik *et al.*, 1991; Brun & Shapiro, 1992; Powell *et al.*, 1995). En *Klebsiella pneumoniae* la expresión del gen *rpoN* es regulada por dos promotores sobrelapados dependientes de  $\sigma^{70}$ . En este caso, uno de los dos promotores dependientes de  $E\sigma^{70}$  es el responsable de transcribir mayoritariamente al gen *rpoN*, al estar más cerca de la secuencia consenso reportada para este tipo de promotores (Grande *et al.*, 1999).

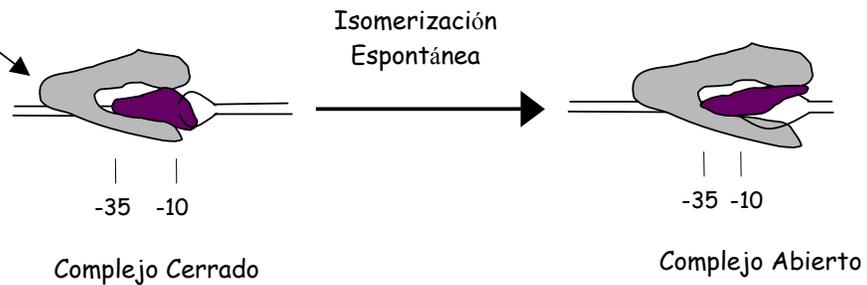
El factor transcripcional  $\sigma^{54}$  difiere de los miembros de la familia  $\sigma^{70}$  tanto en su secuencia primaria de aminoácidos como en el mecanismo de activación transcripcional. A diferencia de los promotores dependientes de  $\sigma^{70}$ , que presentan secuencias consenso del tipo -35 (TTGACA) y -10 (TATAAT), el factor  $\sigma^{54}$  reconoce promotores con secuencias consensos ubicadas a -12 y -24 pares de bases respecto al inicio de la transcripción. Alineamientos múltiples de diferentes secuencias promotoras dependientes de  $\sigma^{54}$  revelaron que dentro de la secuencia consenso (NrYTGGCACG-N<sub>4</sub>-TTGCWNNw) los dinucleótidos **GG** y **GC** se encuentran altamente conservados en las posiciones -25/-24 y -13/-12, respectivamente (Barrios *et al.*, 1999). El factor  $\sigma^{70}$  reconoce su secuencia promotora únicamente cuando está unido a la ARNP, mientras que  $\sigma^{54}$  es capaz de unirse a su secuencia promotora en ausencia del *core* de la enzima (Buck & Cannon, 1992). Además, el mecanismo de inicio de la transcripción en promotores dependientes de  $\sigma^{70}$  requiere que la holoenzima  $E\sigma^{70}$  se una al promotor, con la subsiguiente estabilización del complejo cerrado  $E\sigma^{70}$ -ADN. Este paso puede ser auxiliado por activadores transcripcionales que incrementan el reclutamiento de la  $E\sigma^{70}$  hacia su promotor (Ptashne & Gann, 1997). En cambio,  $E\sigma^{54}$  reconoce su promotor y forma un complejo cerrado estable, sin la necesidad de activadores o factores adicionales (Sasse-Dwight & Gralla, 1990; Buck & Cannon, 1992; Guo *et al.*, 1999; 2000). Sin embargo, a diferencia de  $\sigma^{70}$ , el complejo de promotor cerrado formado por  $E\sigma^{54}$  no puede isomerizar a complejo de promotor abierto si no está presente una proteína activadora (Ver Figura 3.1) (Popham *et al.*, 1989). Esto sugiere que los activadores dependientes de  $E\sigma^{54}$  actúan en pasos posteriores a la unión de  $E\sigma^{54}$  a su promotor y no en el reclutamiento, como ocurre en el caso de  $\sigma^{70}$ .

Los activadores de genes dependientes de  $\sigma^{54}$  pertenecen a la familia de las *Enhancer Binding Proteins* (EBPs). Los miembros de esta familia utilizan la unión y la

energía de hidrólisis del ATP para provocar cambios conformacionales en el complejo cerrado  $E\sigma^{54}$ -ADN, eliminando la inhibición que ejerce el factor  $\sigma^{54}$  sobre la ARNP en el control de la desnaturalización de la región promotora, permitiendo la isomerización y el inicio de la transcripción (Wedel & Kustu, 1995; Weiss *et al.*, 1991).

### A) Inicio de la Transcripción en $E\sigma^{70}$

Se requiere de Activadores para el reclutamiento de  $E\sigma^{70}$



### B) Inicio de la Transcripción en $E\sigma^{54}$

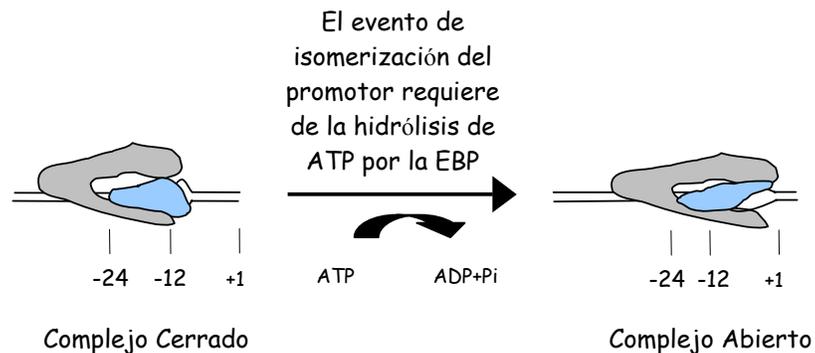


Figura 3.1 Esquema que ilustra las diferencias en el mecanismo de activación transcripcional entre  $E\sigma^{70}$  y  $E\sigma^{54}$ . (A) En el mecanismo de inicio de la transcripción de los promotores dependientes de  $\sigma^{70}$ , el paso limitante es la velocidad con la cual la ARNP se asocia o se une a su promotor. En este caso la función de este tipo de activadores es atar o reclutar la ARNP hacia su promotor. (B) En el mecanismo de activación de los promotores dependientes de  $E\sigma^{54}$  el paso limitante es la conversión del complejo de promotor cerrado a complejo abierto. El activador provee la energía química necesaria proveniente de la hidrólisis de ATP, la cual se requiere para la isomerización del complejo cerrado ( $E\sigma^{54}$ -ARNP-ADN).

De esto se desprende que la expresión de los genes regulados por  $E\sigma^{54}$  sea prácticamente nula cuando no está presente el activador. Los niveles de transcripción basal de estos genes es mínima bajo estas condiciones, permitiendo modular su expresión sin la necesidad de contar con proteínas represoras (Wang & Gralla, 1998). Sin embargo, y a pesar de estas ventajas regulatorias, existen pocos genes bacterianos transcritos por la  $E\sigma^{54}$ . En este sentido, Buck y colaboradores han postulado que una posible explicación a esta observación, se basa en cómo ocurre el mecanismo de activación. El activador requiere unirse a secuencias de ADN específicas llamadas, *Upstream Activation Sequences* (UAS) que se encuentran muy alejadas del promotor (Cannon *et al.*, 1990). Las UAS se ubican normalmente entre 150 y 200 pares de bases (pb) corriente arriba del promotor, pero pueden llegar a ubicarse a 1 kilobase (Kb) de distancia del promotor. En términos del mecanismo de activación, esto implica que el ADN se doble para formar un asa que permita el contacto entre el activador y la  $E\sigma^{54}$  unida a su promotor. Esta interacción posibilita acoplar la energía de hidrólisis del ATP a los cambios conformacionales requeridos para formar el complejo de promotor abierto (Su *et al.*, 1990; Weiss *et al.*, 1991). Según estos autores, la necesidad del asa para la unión productiva entre el activador y  $E\sigma^{54}$  requeriría contar con muchas regiones intergénicas de ADN en el cromosoma bacteriano y por ende estos últimos serían sumamente grandes (Buck *et al.*, 2000).

### **3.2 Organización y función de las diferentes regiones del factor $\sigma^{54}$**

Estudios de comparación de secuencia primaria del factor  $\sigma^{54}$  de diferentes especies han revelado que la proteína está dividida en tres regiones (Merrick, 1987). Análisis de mutantes de  $\sigma^{54}$  han permitido asignar algunas funciones cada una de estas regiones (Ver Figura 3.2) (Sasse-Dwight & Gralla, 1990).

#### **3.2.1 Región I**

La región I o amino terminal se encuentra altamente conservada entre los miembros de esta familia y presenta una longitud de aproximadamente 50 a.a. Esta región contiene varios motivos característicos, entre los que se encuentran una región rica en glutaminas, una héptada hidrofóbica de leucinas repetidas, un trímero de aminoácidos repetidos y una hécada de leucinas (Sasse-Dwight & Gralla, 1990). A esta región se le han asignado principalmente dos funciones:

- Inhibir la isomerización de la ARNP en ausencia del activador (Cannon *et al.*, 2000; Gallegos & Buck, 1999; Syed & Gralla, 1998; Sasse-Dwight & Gralla, 1990).
- Estimular el inicio de la transcripción en respuesta al activador (Sasse-Dwight & Gralla, 1990).

Las primeras evidencias acerca de la función de la región I en la regulación del inicio de la transcripción provienen de un estudio en el que los residuos de la héptada de leucinas fueron progresivamente cambiados por serinas. Estas mutantes de  $\sigma^{54}$  presentaron una pérdida progresiva de la función transcripcional y de producción de ARNm; sin embargo, la capacidad para formar complejos de promotor abierto no se vio afectada drásticamente. Estos resultados sugieren que los efectos de estas mutaciones ocurren en pasos posteriores a la formación del complejo abierto (Hsieh & Gralla, 1994). En este mismo análisis se encontró que mutaciones en los residuos de leucinas que mapean dentro de la subregión 25 a la 31 generan mutantes capaces de activar la transcripción independientemente de la presencia del activador. Las mutantes de  $\sigma^{54}$  que no requieren del activador para iniciar la transcripción son conocidas como *bypass*. Las mutantes *bypass* son capaces de alcanzar hasta un 15% de la capacidad de activación transcripcional *in vitro* en ausencia del activador, comparado con el 1% que presenta  $\sigma^{54}$  (Wang *et al.*, 1995; 1997).

En estas mutantes, la síntesis de ARNm procede a través de un complejo de pre-iniciación sensible al polianión heparina, a diferencia de los complejos abiertos formados por  $\sigma^{54}$  silvestre en presencia del activador y ATP que son resistentes a heparina. Esto indica que la transcripción en las mutantes *bypass* inicia a través de un complejo abierto defectuoso e ineficiente. En este mismo sentido, se ha observado que la remoción de la región I de  $\sigma^{54}$  ( $\Delta\text{RI}\sigma^{54}$ ) también origina un fenotipo de activación *bypass* (Chaney *et al.*, 2000). Tomando en cuenta estos resultados se ha propuesto que la región I de  $\sigma^{54}$  inhibe la capacidad de la ARNP de isomerizar en ausencia del activador, manteniendo la desnaturalización de la región promotora estrictamente controlada (Cannon *et al.*, 1999; Casaz *et al.*, 1999). De manera notable, un estudio *in vitro* mostró que la adición en *trans* del fragmento peptídico correspondiente a la región I de  $\sigma^{54}$  revierte el fenotipo *bypass* de la mutante  $\Delta\text{RI}\sigma^{54}$ , lo cual sugiere que el activador elimina o supera la inhibición que ejerce la región I de  $\sigma^{54}$  sobre la capacidad de isomerización de la  $\text{E}\sigma^{54}$  (Gallegos *et al.*, 1999).

Por otra parte, estudios de *footprinting* empleando orto-fenantrolina de cobre (o-CuP) el cual a diferencia del permanganato de potasio es sensible a la geometría del sur-

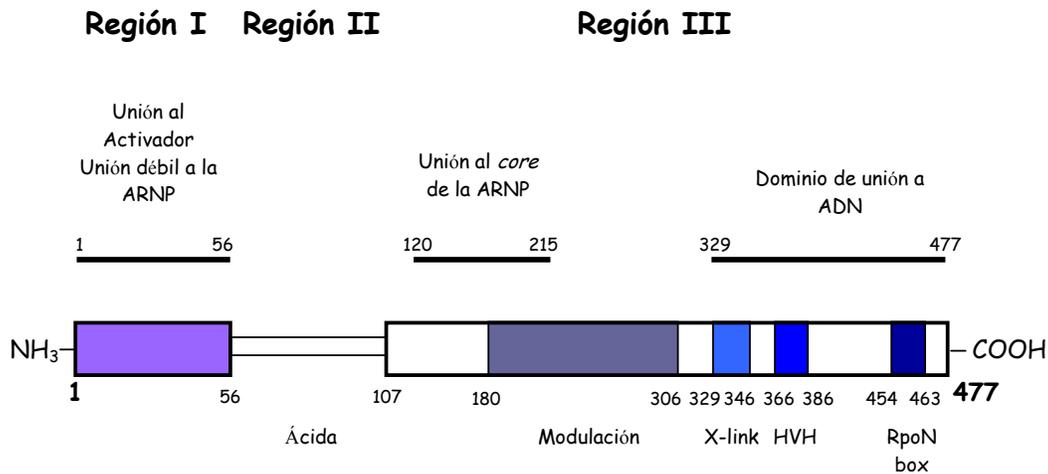


Figura 3.2. Esquema de la organización de las diferentes regiones de la proteína  $\sigma^{54}$  de *K. pneumoniae*. Las diferentes regiones y sus principales funciones se muestran en recuadros sombreados con diferentes colores. La porción que enmarca la región *X-link* es un subdominio dentro de la región III que se entrecruza con el ADN. La caja *rpoN* es una característica que presentan en común todos los miembros de la familia  $\sigma^{54}$  y que participa en el reconocimiento de la región promotora, conjuntamente con el motivo HVH.

co menor del ADN, reveló que en el complejo de promotor cerrado de  $E\sigma^{54}$  se genera un sitio hipersensible de corte en la región -12 del promotor. El sitio sensible al corte en la región -12 del promotor desaparece cuando se forma el complejo de promotor cerrado con la mutante  $\Delta RI\sigma^{54}$ , sin embargo, la adición *in trans* de la región I restituye el patrón de corte. Finalmente, estos datos sugieren que la región I de  $\sigma^{54}$  está involucrada en el reconocimiento e interacción con la región -12 de los promotores dependientes de  $\sigma^{54}$ . Asimismo, estos resultados indican que las mutantes de  $\sigma^{54}$  con fenotipo de activación *bypass* son deficientes en la interacción y reconocimiento de la región consenso -12 (Morris *et al.*, 1994; Cannon *et al.*, 1995; Cannon *et al.*, 2000; 2003).

Aunque los principales determinantes para la unión al *core* de la ARNP se encuentran ubicados en la región III (entre los residuos 120-215), se ha demostrado que la región I de  $\sigma^{54}$  también contribuye a la unión, pero en menor medida (Gallegos & Buck, 1999). Estudios de *footprinting* donde se emplearon proteasas para el corte proteico revelaron que la región I de  $\sigma^{54}$  sufre un cambio conformacional en la

transición de complejo de promotor cerrado a abierto (Buck & Casaz, 1997). Probablemente la interacción que se establece entre la región I y el *core* de la ARNP le confiere a la holoenzima propiedades funcionales muy diferentes, como puede ser el control en la isomerización del promotor en ausencia del activador (Gallegos & Buck, 1999; Gallegos & Buck, 2000). Por otra parte, experimentos de *footprinting* empleando radicales hidroxilo han mostrado que la conformación del dominio de unión a ADN, localizado en el extremo carboxilo terminal, se altera cuando la región I de  $\sigma^{54}$  se encuentra ausente. Esto sugiere que la región I es necesaria para que el dominio de unión a ADN en la  $E\sigma^{54}$  adopte una conformación funcionalmente óptima (Casaz & Buck, 1999). Tomando en cuenta todos estos datos, se ha propuesto que la región I de  $\sigma^{54}$  juega un papel de pivote funcional durante el mecanismo de activación transcripcional, ya que modula tanto las propiedades de unión al *core* de la ARNP, la interacción con su promotor, así como con otras regiones de la proteína.

### 3.2.2 Región II

La región II de  $\sigma^{54}$  es la menos conservada en secuencia primaria entre los miembros de la familia. Esta región se caracteriza por la presencia de residuos ácidos y es variable en cuanto a su longitud, oscilando entre 60 y 100 aminoácidos. En bacterias entéricas los primeros 33 residuos de esta región forman trímeros de aminoácidos ácidos repetidos (TAR), donde el tercer a.a del trímero es siempre un residuo ácido (Wong & Gralla, 1992). Sin embargo, el factor  $\sigma^{54}$  de bacterias como *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodobacter capsulatus* y *Bacillus subtilis* presentan una región II muy pequeña y sin abundancia de residuos ácidos (Merrick, 1993).

Se han propuesto varias funciones para la región II de la proteína, entre ellas que está involucrada en la desnaturalización del ADN en la región promotora. Esta evidencia proviene de estudios donde se removió un fragmento de 27 a.a dentro del dominio de residuos ácidos de la región II. En este estudio se comprobó que la mutante presenta una marcada reducción en la capacidad de formar complejos abiertos, mientras que una mutante en que se le duplicó dicho fragmento formó complejos abiertos utilizando una fracción de tiempo menor. Esto sugirió que los TAR determinan la rapidez con que se forma el complejo de promotor abierto (Wong & Gralla, 1992).

Recientes estudios *in vitro* donde se emplearon mutantes de  $E\sigma^{54}$  que carecen de la región I ( $\Delta$ RI- $E\sigma^{54}$ ) y de la región I y II ( $\Delta$ R(I+II)- $E\sigma^{54}$ ) demostraron que la región II es dispensable para la isomerización de la ARNP. Sin embargo, sí se requiere para la

correcta formación de la holoenzima, y también participa modulando las propiedades de unión de la holoenzima al ADN. En resumen, la región II de  $\sigma^{54}$  es muy variable en cuanto a su longitud de a.a y hasta ahora se le ha asignado tres principales funciones:

- Desnaturalizar la región promotora (Wong & Gralla, 1992).
- Modular la transición del complejo de promotor cerrado a abierto (Southern & Merrick, 2000).
- Contribuir a las interacciones entre  $\sigma^{54}$  y la ARNP para lograr la correcta formación de la holoenzima (Cannon *et al.*, 1999).

Sin embargo, la ausencia de conservación de esta región entre diferentes organismos bacterianos, y que en especies como *R. capsulatus* la misma se encuentre casi ausente, sugiere que ninguna de las funciones anteriores son esenciales para la funcionalidad de la  $\sigma^{54}$ -ARNP (Buck *et al.*, 2000).

### 3.2.3 Región III

La región III o carboxilo terminal se encuentra bastante conservada entre los miembros de la familia de  $\sigma^{54}$ . Esta región presenta una longitud de aproximadamente 400 a.a y está implicada en el reconocimiento y contacto de la región promotora (Merrick, 1993). En un estudio donde se usó un fragmento peptídico de 16 kDa de  $\sigma^{54}$  de *K. pneumoniae*, correspondiente a los últimos 149 residuos de la región carboxilo, reveló que dicho fragmento es capaz de unirse a la región promotora, al igual que la proteína silvestre (Cannon *et al.*, 1995).

La región III de  $\sigma^{54}$  contiene dos motivos de unión a ADN que se encuentran altamente conservados entre los miembros de esta familia. Uno de estos elementos es un motivo del tipo HVH. En un primer estudio donde se mutagenizó la hélice 2 o de reconocimiento del motivo HVH (Val<sub>366</sub>-Thr<sub>386</sub>) de  $\sigma^{54}$  de *K. pneumoniae*, se demostró mediante experimentos de *footprinting*, que las mutantes afectadas en su actividad transcripcional no protegían las posiciones de guanina -13, -24 y -25 del promotor *glnAp2* del ataque a dimetil sulfato. Sin embargo, las mutantes cuyos cambios de a.a fueron tolerados y que presentaban una actividad transcripcional similar a la proteína silvestre sí protegieron las guaninas del promotor. De igual manera, cuando los residuos que se encuentran expuestos en la hélice 2 fueron cambiados por alanina, la única mutante que resultó ser inactiva fue la arginina 383 (R383A) (Coppard & Merrick, 1991). Se ha propuesto que la arginina puede estar involucrada en establecer un

contacto específico con el promotor. De hecho, se conocen proteínas que unen ADN donde residuos de arginina participan fuertemente en el contacto con pares de bases de guanina y citosina (Siegele *et al.*, 1989). Por otra parte, estudios de supresión genética mostraron que una mutante de  $\sigma^{54}$  que presenta un cambio de arginina por lisina en la posición 383 es capaz de suprimir mutaciones en la región -13 del promotor (Merrick & Chambers, 1992). Tomando en cuenta estas evidencias se ha propuesto que el motivo HVH está involucrado específicamente en el reconocimiento de la región -12 de los promotores dependientes de  $\sigma^{54}$ .

La región III presenta una caja de 10 a.a cuya secuencia primaria (454-ARRTVAKYRE-463 en  $Kp\sigma^{54}$ ) está altamente conservada y que representa una firma diagnóstica única entre los miembros de la familia de  $\sigma^{54}$ . Basados en estudios de predicción de estructura secundaria y en análisis de mutantes puntuales de  $\sigma^{54}$  generadas en la caja *rpoN*, se sugirió que esta secuencia era un candidato potencial para el reconocimiento de la región consenso -24 (Taylor *et al.*, 1996; Wang & Gralla, 2001). Recientemente, evidencias estructurales como de estudios de *footprinting* han comprobado finalmente que la caja *rpoN* constituye la hélice de reconocimiento que se encarga de establecer contacto con la región consenso -24 de los promotores dependientes de  $\sigma^{54}$ . Adicionalmente, se ha mostrado que los residuos de lisina y arginina se encuentran expuestos para establecer contacto con esta región del promotor (Burrows *et al.*, 2003; Doucleff *et al.*, 2005).

La región -24 es esencial para la unión de  $\sigma^{54}$  al ADN, ya que mutantes de  $\sigma^{54}$  que no reconocen dicha región eliminan totalmente la unión de la holoenzima al promotor. En cambio, mutantes de  $\sigma^{54}$  que interfieren con el reconocimiento de la región -12 del promotor, aún le confieren a la holoenzima la capacidad de unirse a su promotor (Chaney & Buck, 1999; Chaney *et al.*, 2000; Wang & Gralla, 2001).

En esta región también se localizan los principales determinantes de unión al *core* de la ARNP (120-215 en  $Kp\sigma^{54}$ ). Ensayos de disociación y competencia *in vitro* demostraron que  $\sigma^{54}$  presenta la misma afinidad por la ARNP que el factor  $\sigma^{70}$ , y que la holoenzima  $E\sigma^{54}$  es tan estable como la holoenzima  $E\sigma^{70}$  (Gallegos & Buck, 1999). A pesar de que no existe una similitud significativa en secuencia entre estos dos factores, se ha observado que la región de  $\sigma^{70}$  implicada en la unión al *core* presenta cierta similitud en secuencia con  $\sigma^{54}$  (Tintut & Gralla, 1995). Esta región mapea dentro del fragmento mínimo de unión al *core* en  $\sigma^{54}$  (120-215). Aunque ha sido difícil comprobar

si los dominios de unión al *core* en ambos factores adoptan el mismo plegamiento, estudios de dispersión con rayos X indican que tienen formas similares. Es probable que los factores  $\sigma^{70}$  y  $\sigma^{54}$  ocupen posiciones similares en el *core* de la ARNP, pero sus diferencias en secuencia son suficientes para conferir a las holoenzimas respectivas propiedades diferentes (Wigneshweraraj *et al.*, 2000).

Adicionalmente, en la región III de  $\sigma^{54}$  de *K. pneumoniae* se han identificado dos subdominios. Uno de los subdominios (329-346) es capaz de entrecruzarse con el ADN al ser irradiado con luz ultravioleta, mientras que el otro subdominio, conocido como dominio de modulación (180-306), incrementa la afinidad de la  $E\sigma^{54}$  por el ADN (Cannon *et al.*, 1993; Chaney *et al.*, 2000). Ninguno de estos dos subdominios se requiere para la unión al *core* de la ARNP.

Finalmente, en esta región al igual que en la región I, también se han identificado mutantes de  $\sigma^{54}$  (F318A, R336A, y K388A) que muestran fenotipo de activación *bypass* (Wigneshweraraj *et al.*, 2001; Chaney & Buck, 1999; Wang & Gralla, 2001). Se ha postulado que estos residuos de la región III actúan a través de la región I para controlar las propiedades de regulación de la  $E\sigma^{54}$ .

### **3.3 Papel de la región -12 de los promotores $\sigma^{54}$ en el control de la transcripción**

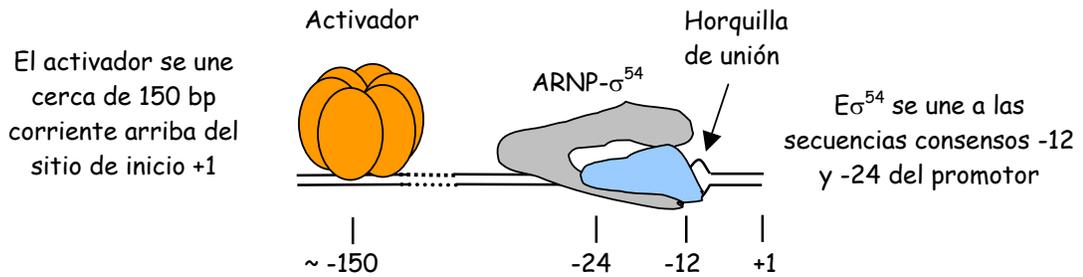
Las evidencias anteriores, sugieren que el reconocimiento de la región -12 de los promotores  $\sigma^{54}$  implica un complejo mecanismo donde están involucradas las regiones I y III de  $\sigma^{54}$  a través de las interacciones intramoleculares que se establecen entre ellas. Sin embargo, se ha descrito que la región -12 del promotor también tiene múltiples efectos en la activación de la transcripción. En este sentido, se ha mostrado que mutaciones en la secuencia consenso -12 GCA/T del promotor abaten drásticamente los niveles de la transcripción. Adicionalmente, se ha observado que ciertas secuencias mutantes en dicha región del promotor, incrementan significativamente los niveles de activación *bypass* en presencia de la proteína silvestre. En general, estos datos sugieren que el reconocimiento de la región -12 del promotor por parte de  $\sigma^{54}$  implica un complejo mecanismo que involucra no solo la unión de  $\sigma^{54}$ , sino donde además el ADN juega un papel importante en la regulación transcripcional de este tipo de promotores (Wang & Gralla, 1998; 1999).

### 3.4 Mecanismo de activación transcripcional de los promotores dependientes de $\sigma^{54}$

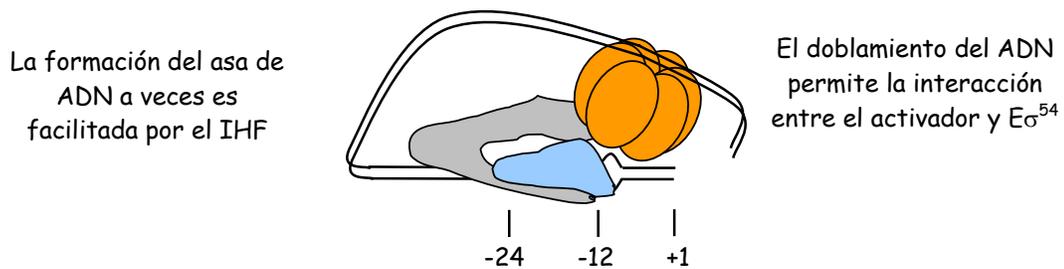
Como se mencionó anteriormente, el principal punto de regulación de los promotores dependientes de  $\sigma^{54}$  ocurre en el control de la desnaturalización y la formación del complejo de promotor abierto. Por ende, el paso limitante en la transcripción de este tipo de promotores consiste en la isomerización del complejo de promotor cerrado a complejo abierto. La isomerización del complejo de promotor cerrado requiere de la hidrólisis de nucleótidos trifosfatos por parte del activador o EBP para generar la energía necesaria para remodelar o producir los cambios conformacionales en el complejo holoenzima-DNA, permitiendo así la formación del complejo abierto y el inicio de la transcripción (Wyman *et al.*, 1997; Guo *et al.*, 2000; Cannon *et al.*, 2000). El activador en su forma funcionalmente activa (hexámero), se une a las UAS e interacciona con el complejo cerrado  $E\sigma^{54}$ -ADN a través de la formación de un asa en el ADN (Popham *et al.*, 1989; Wyman *et al.*, 1997; Su *et al.*, 1990; Rippek *et al.*, 1997). El contacto facilita el acoplamiento de la energía de hidrólisis del ATP entre el activador y  $E\sigma^{54}$ . Se ha mostrado que en algunos promotores el evento de doblamiento del ADN es facilitado por la proteína IHF (Integration Host Factor) (Hoover *et al.*, 1990). Se piensa que en los promotores  $\sigma^{54}$  la progresión de complejo cerrado a complejo de promotor abierto ocurre a través de diferentes estados intermediarios. Estos intermediarios abarcan cada uno de los numerosos ajustes o cambios conformacionales que se dan en la  $E\sigma^{54}$  y en las interacciones que esta establece con el promotor rumbo a la formación del complejo abierto.

A continuación resumó las evidencias recientes que han ayudado a proponer un modelo que explique el posible mecanismo molecular por el cual transcurre la isomerización del complejo de promotor cerrado a abierto. Diversos estudios mostraron que la  $E\sigma^{54}$ , al unirse al promotor *nifH* de *K. pneumoniae*, provoca un cambio conformacional alrededor de la región -12 del promotor (Cannon & Buck, 1993; Morris *et al.*, 1994). Esta distorsión originada en el promotor al unirse la holoenzima produce el desapareamiento del nucleótido -11, generando la formación de un promotor con estructura de heteroduplex (pequeño segmento de ADN de cadena sencilla unido en ambos extremos por segmentos de ADN de doble cadena, ver representación en Figura 3.3). Esta estructura adoptada por el promotor se conoce como horquilla de unión. Se ha demostrado que a partir de la horquilla de unión (*fork junction*) se origina la desnaturalización del promotor (Guo & Gralla, 1998; 1999). Esta estructura o interme-

### A) Formación del complejo cerrado



### B) Evento de doblamiento en el ADN



### C) Formación del complejo abierto

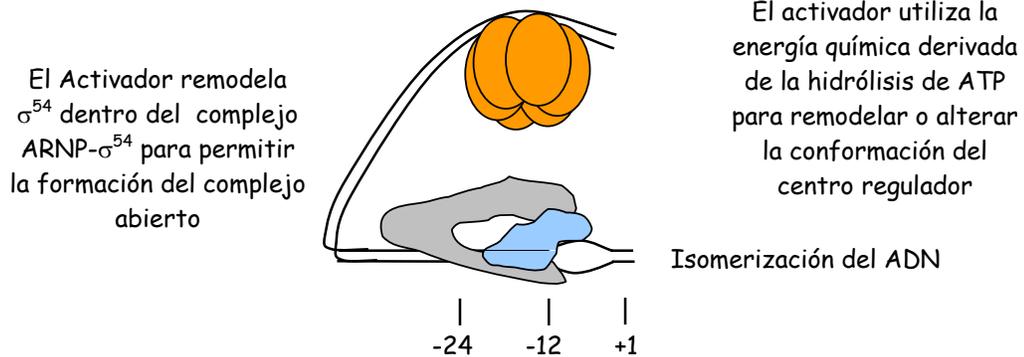


Figura 3.3. Esquema del mecanismo de formación del complejo de promotor abierto en  $\sigma^{54}$ . (A) El activador se une a las UAS adoptando una estructura hexámera en forma de anillo. La ARNP- $\sigma^{54}$  reconoce las secuencias conservadas -12 (GC) y -24 (GG) del promotor, formando así el complejo de promotor cerrado. Específicamente, la región I de  $\sigma^{54}$  interacciona con la estructura de horquilla de unión localizada en la posición -12. Esta interacción impide la isomerización de la ARNP. (B) La curvatura o asa en el ADN ayuda a la interacción entre el activador y  $\sigma^{54}$ , y al evento de acoplamiento o transducción de la energía química. (C) La hidrólisis de ATP por parte del activador provee la energía necesaria para remodelar y desestabilizar la interacción que se establece entre  $\sigma^{54}$  y la horquilla de unión. Los cambios conformacionales promueven la desnaturalización del promotor y la formación del complejo abierto.

diario de ADN se cree que mimetiza la conformación que adopta el promotor en el complejo cerrado (Ver Figura 3.3). Aunque los factores  $\sigma^{54}$  y  $\sigma^{70}$  reconocen promotores con secuencias consenso diferentes, ambos unen selectivamente la misma horquilla localizada en la posición -12/-11 donde el nucleótido -11 se encuentra desapareado. Esto evidencia un mecanismo común entre estos factores para regular el inicio de la transcripción. Sin embargo, la unión de estos factores transcripcionales a la horquilla ocurre de manera diferente, lo que está íntimamente relacionado con la forma como se regula la desnaturalización de los promotores en cada caso (Guo & Gralla, 1998; 1999).

En el caso particular de la activación de promotores dependientes de  $\sigma^{54}$  el reconocimiento óptimo de la horquilla es fundamental para mantener estricto control de la desnaturalización del complejo de promotor cerrado en ausencia del activador. En este sentido, varios estudios han mostrado que la región I de  $\sigma^{54}$  participa en el correcto reconocimiento de la horquilla, inhibiendo así la isomerización del promotor cuando no está presente el activador. De manera notable, mutantes *bypass* de  $\sigma^{54}$  cuyos cambios mapean en la región I, las cuales se encuentran desreguladas en el control de la desnaturalización del promotor ya no reconocen dicha estructura de ADN (Gallegos *et al.*, 1999). Por otra parte, se ha demostrado que la identidad y conservación del nucleótido -12 del promotor es otro factor importante que contribuye al correcto uso y reconocimiento de esta estructura por parte de  $\sigma^{54}$  (Guo & Gralla, 1999). En conjunto, estos resultados sugieren que existe una conexión funcional entre la región I de  $\sigma^{54}$  y la identidad del nucleótido consenso -12 del promotor, los cuales cooperan mutuamente para garantizar el correcto reconocimiento de la horquilla, manteniéndose la desnaturalización de la región promotora controlada en ausencia del activador (Guo & Gralla, 1998; 1999).

Se ha sugerido que la cooperación que se da entre la región I de  $\sigma^{54}$  y la estructura de horquilla formada en el promotor, conocido como centro regulador, funciona como un interruptor molecular (Figura 3.3). En un estado apagado, o cuando está ausente el activador,  $\sigma^{54}$  reconoce la horquilla -12/-11 pero la unión a la cadena no templado de la horquilla, evento necesario para propagar la desnaturalización del promotor hacia la región de inicio, resulta inhibida por la presencia del nucleótido -11 desapareado. En este contexto, la función del activador es la de contrarrestar tal inhibición a través de la hidrólisis de ATP. La energía de hidrólisis se transduce a la producción de cambios conformacionales en el centro regulatorio, promoviendo así que

se desenmascare la actividad de unión a ADN de cadena sencilla de  $\sigma^{54}$ . Finalmente, esto posibilita que  $\sigma^{54}$  se una fuertemente a la cadena no templado. El resultado final de este evento inducido por el activador es la propagación de la desnaturalización del promotor hacia la región de inicio para finalmente formar el complejo de promotor abierto (Guo & Gralla, 1998; 1999).

En general, este mecanismo y la arquitectura de  $\sigma^{54}$ , pueden verse como un diseño evolutivo que incrementa la potencialidad de los diversos mecanismos reguladores existentes en bacterias.

### 3.5 Estructura de la ARNP- $\sigma^{54}$

Actualmente los análisis estructurales se han enfocado básicamente en estudiar la ARNP bacteriana asociada al factor primario  $\sigma^{70}$ , debido a que es el principal responsable de orquestar la inmensa mayoría de la actividad transcripcional bacteriana. El factor  $\sigma^{54}$ , difiere de  $\sigma^{70}$  tanto en su secuencia primaria de aminoácidos como en su mecanismo de activación transcripcional. A pesar de que la interfase formada por el *core* y ambos factores transcripcionales es muy similar, aún no se dispone de datos estructurales de alta resolución correspondiente a la holoenzima- $\sigma^{54}$  ( $E\sigma^{54}$ ) (Wigneshweraraj *et al.*, 2000; 2002). De manera que todo el conocimiento concerniente a la particularidad del mecanismo de activación de la  $E\sigma^{54}$  ha sido inferido de evidencias bioquímicas.

En un intento por lograr avances en este sentido, Martín Buck y colaboradores, han usado técnicas de crio-microscopía electrónica y de procesamiento de imágenes de partículas sencillas, que han permitido resolver la estructura de la  $E\sigma^{54}$  a 14 Å de resolución (Finn *et al.*, 2002). En sentido general, la topología de la  $E\sigma^{54}$  es muy semejante a la adoptada por la  $E\sigma^{70}$  en forma de pinzas de cangrejo, aunque sus dimensiones son ligeramente menores comparada con esta última. De manera similar a la  $E\sigma^{70}$ , una región extra de densidad electrónica que atraviesa el canal del sitio activo y que conecta las subunidades  $\beta$  y  $\beta'$  es el sitio propuesto para ser ocupado por  $\sigma^{54}$ . Sin embargo, la ausencia de datos estructurales de alta resolución correspondientes al factor  $\sigma^{54}$  deja abierto a conjeturas la posible localización exacta de las tres regiones del factor  $\sigma^{54}$ . Este grupo ha abordado este problema intentando resolver la estructura de la holoenzima  $E\sigma^{54}$  usando fragmentos peptídicos de  $\sigma^{54}$ ,  $\sigma^{54}_{1-324}$  y  $\sigma^{54}_{70-215}$ , en los cuales están ausentes la región carboxilo terminal y la región amino y carboxilo,

respectivamente. Este acercamiento aportará en un futuro evidencia sobre la posible localización y organización de las diferentes regiones de  $\sigma^{54}$  dentro de la holoenzima.

Por otra parte, la comparación del mapa de densidad electrónica construido de ambas formas de la ARNP de *E. coli* reveló que las diferencias conformacionales entre las dos enzimas son pequeñas (Finn *et al.*, 2002). El posicionamiento de todas las subunidades de la ARNP se encuentra altamente conservado. Las variaciones conformacionales más grandes ocurren en los módulos estructurales de las subunidades  $\beta$  y  $\beta'$ , particularmente en la abrazadera de la  $\beta'$ . Esta evidencia estructural sugiere que un mecanismo común es empleado para la formación de la holoenzima, independientemente del factor  $\sigma$  que se encuentre unido.

Recientemente se determinó por resonancia magnética nuclear la estructura molecular del dominio carboxilo terminal del factor  $\sigma^{54}$  de *Aquifex aeolicus*, el cual contiene los determinantes de unión al ADN (Doucleff *et al.*, 2005). Dentro de este dominio (Thr<sub>323</sub>-Gly<sub>389</sub>) se encuentra un motivo sumamente conservado y típico dentro de los miembros de esta familia, denominado *rpoN box*. La estructura reveló que el dominio carboxilo terminal está compuesto por tres  $\alpha$ -hélices que se pliegan de manera compacta y que forman un motivo de unión a ADN del tipo hélice-vuelta-hélice. La tercera hélice está constituida por los aminoácidos de la caja *rpoN*, que a su vez constituyen la hélice de reconocimiento dentro del motivo HVH. Residuos conservados de arginina y lisina se encuentran estructuralmente bien posicionados sobre la cara hidrofílica de la hélice de reconocimiento para interactuar directamente con el surco mayor del ADN de los promotores  $\sigma^{54}$ . Interesantemente, la estructura reveló una alta similitud estructural con los dominios  $\sigma_3$  y  $\sigma_4$  del factor  $\sigma^{70}$ , siendo el dominio  $\sigma_3$  el más parecido en cuanto a tamaño y longitud de las hélices. Sin embargo, el dominio carboxilo de  $\sigma^{54}$  es funcionalmente análogo al dominio  $\sigma_4$  de  $\sigma^{70}$ , al presentar ambos una distribución de cargas positivas de superficie muy similar en las hélices de reconocimiento correspondientes, que son las encargadas de reconocer el surco mayor de los elementos consensos -35 y -24 de los promotores  $\sigma^{70}$  y  $\sigma^{54}$  respectivamente (Doucleff *et al.*, 2005).

#### **Capítulo 4. Regulación de la Expresión Genética**

Las bacterias viven en hábitats frecuentemente cambiantes y han desarrollado respuestas muy sofisticadas que les permiten contender con los cambios ambientales. Estas respuestas resultan generalmente en la activación y/o represión de diferentes

genes para poder adaptarse fisiológica y metabólicamente a las nuevas condiciones. En consecuencia las bacterias han evolucionado y desarrollado una amplia gama de mecanismos para regular la expresión genética. Estos mecanismos de control operan en diferentes procesos, que involucra desde el control del inicio de la transcripción hasta la inactivación de las proteínas o su degradación. En este sentido el control ejercido sobre el inicio de la transcripción es la estrategia utilizada más comúnmente.

Generalmente las bacterias, bajo condiciones nutricionales óptimas, expresan de manera constitutiva los genes que se requieren para el rápido crecimiento celular, mientras que la expresión de los genes que se requieren bajo ciertas condiciones ambientales se regulan mediante diferentes mecanismos, como pueden ser: la presencia de diferentes factores sigma, o la utilización de proteínas reguladoras, ya sea en función de activación o represión. Finalmente, estos mecanismos están diseñados para modular y controlar la actividad y especificidad de la ARNP.

#### **4.1 Regulación de la transcripción por represión o regulación negativa**

En bacterias el mecanismo de regulación negativa puede en principio llevarse a cabo por cualquier proteína de unión a ADN, siempre y cuando su región blanco de unión interfiera con la interacción entre la ARNP y su promotor.

El mecanismo que constituye el paradigma al modelo de represión, es la regulación de la transcripción del operón *lac*. Este operón consiste de tres genes estructurales *lacZ*, *lacY* y *lacA* que codifican para la  $\beta$ -galactosidasa, la lactosa permeasa y la transacetilasa, respectivamente. Los productos de estos genes están involucrados en el transporte y metabolismo de lactosa utilizada como fuente de carbono. La transcripción de los genes del operón es iniciada a partir del promotor *lac*, la cual es controlada por la secuencia operadora. Esta secuencia contiene el sitio de unión para una proteína de unión a ADN, conocida como represor LacI. El represor LacI, codificado por el gen *lacI*, se transcribe corriente arriba de los genes del operón *lac*.

En este caso en particular la regulación negativa de la transcripción ocurre cuando la bacteria crece en ausencia de lactosa. Bajo estas condiciones la afinidad del represor por su sitio de unión, secuencia operadora O1, es mayor que la afinidad de la ARNP por su promotor. Consecuentemente, el represor se une a la secuencia operadora, la cual sobrelapa con el promotor del operón *lac*, y boquea estéricamente la unión de la ARNP al promotor, reprimiendo de esta manera la transcripción (Muller-Hill, 1998). Por el contrario, en presencia de lactosa como principal fuente de carbono, la lactosa

(molécula inductora) se une al represor y genera cambios conformacionales alostéricos que alteran o disminuyen la especificidad del mismo por la secuencia operadora, despegándose finalmente del ADN y permitiendo la unión de la ARNP.

En algunos promotores las secuencias operadoras se localizan no solamente sobre el promotor, sino que se pueden encontrar sobre la región codificante del gen u operón que se está regulando. En este sentido, se han descrito otros dos operadores auxiliares O2 y O3 que regulan también la expresión del operón *lac*, y que se encuentran distantes del sitio de inicio de la transcripción (Reznikoff *et al.*, 1974; Gilbert *et al.*, 1975). El operador O2 se encuentra dentro de la región codificante a 400 pb del inicio de la transcripción, mientras que el operador O3 se ubica 93 pb corriente arriba del operador O1. Se ha descrito que ambos operadores unen al represor débilmente, sin embargo al ser inactivados el nivel de represión decae unas 1300 veces (Oehler *et al.*, 1990). Las causas moleculares de este efecto de represión por estos tres operadores se debe principalmente a que el represor LacI adopta una conformación tetramérica, sin embargo solamente un dímero del mismo es suficiente para unirse al ADN, de manera que el otro dímero libre puede unirse a otro operador. Esta hipótesis ha sido comprobada mediante la observación directa del asa que se forma en el ADN y que permite la unión simultánea del represor con los operadores O1 y O2 u O2 y O3 (Mossing & Record, 1986; Borowiec *et al.*, 1987; Kramer *et al.*, 1987). El regulador AraC constituye otro ejemplo en donde la represión se logra mediante la formación de un doblamiento en el ADN, que le permite a la proteína unirse simultáneamente a los dos sitios operadores, ubicados río arriba del promotor. (Aki *et al.*, 1996). Adicionalmente, el operón *lac* también está sujeto a regulación positiva, lo que evidencia su complejidad funcional. Este modo o nivel de regulación será analizado con más detalle en el siguiente capítulo.

Finalmente, la proximidad o solapamiento entre promotores controlados por diferentes factores transcripcionales también puede jugar un papel importante en la regulación de la transcripción. En este caso la ARNP puede actuar como represor, ya que tiene que discriminar la unión entre dos promotores. De forma tal que la unión al promotor de mayor afinidad impide la ocupación del segundo por la otra variante de la polimerasa. En este sentido, se ha descrito que el operón *fixRnifA* de *Bradyrhizobium japonicum* (Bj) y el gen *pilE* de *Neisseria gonorrhoeae* son transcritos a partir de promotores solapados. Ambas unidades transcripcionales presentan promotores dependientes de  $\sigma^{54}$  solapados con promotores reconocidos por la ARNP- $\sigma^{70}$ , lo que

indica una clara competencia entre ambas formas de holoenzimas para transcribir dichos genes (Barrios *et al.*, 1995; Fyfe *et al.*, 1995).

#### **4.2 Regulación de la transcripción por activación o regulación positiva**

La regulación positiva resulta en un incremento de la fuerza basal del promotor por uno o varios mecanismos. Entre ellos se encuentra la interacción con proteínas activadoras, el uso de un nuevo factor  $\sigma$  por la ARNP, la alteración de la conformación del ADN o la interacción de moléculas pequeñas con la ARNP, entre otros. En este sentido, las proteínas activadoras tienen la función de garantizar el correcto reconocimiento del promotor por parte de la ARNP (Raibaud & Schwartz, 1984).

Una de las razones principales por las que ciertos promotores necesitan de una proteína activadora es debido a que su secuencia difiere considerablemente del consenso, o que esta no es propiamente reconocida por la ARNP. En la mayoría de los genes bacterianos sujetos a regulación positiva, el sitio de unión de las proteínas activadoras se localizan por arriba o sobrelapando la región  $-35$  de los promotores dependientes de  $\sigma^{70}$  o sus similares. En el caso de los promotores dependientes de  $\sigma^{54}$ , como se ha mencionado anteriormente, la proteína activadora se une a regiones alejadas a más de 100 pb del promotor.

Los activadores pueden agruparse en cuatro categorías de acuerdo a los sitios blancos de interacción. En la categoría I se encuentran los activadores que contactan el dominio  $\alpha$ CTD de la subunidad  $\alpha$  de la ARNP, mientras que los activadores del grupo II contactan la subunidad  $\sigma$ . El grupo III y IV establecen contacto con las subunidades  $\beta$  y  $\beta'$  de la ARNP, respectivamente. Uno de los ejemplos más estudiado de regulación positiva es el mediado por la proteína de unión a monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) o proteína de represión catabólica (CRP) como también se le conoce. Esta proteína regula un gran número de operones (regulón) involucrados en diferentes rutas metabólicas en *E. coli*, y al menos 23 distintos factores transcripcionales, por lo que se le ha considerado un regulador global de la transcripción (Martínez-Antonio & Collado-Vides, 2003). El operón *lac* es uno de los tantos operones regulados positivamente por CRP. En este caso en particular, la disminución de los niveles de glucosa trae consigo el incremento de la concentración intracelular de AMPc, posibilitando que el complejo dimérico CRP-AMPc se una a dos secuencias simétricas conservadas en el ADN ubicadas a  $-61$  pb río arriba del inicio de la transcripción del promotor *lac*. La proteína CRP participa en el reclutamiento de la ARNP hacia la región promotora a través de

interacciones proteína-proteína que involucran la región activadora 1 (AR1) de la proteína CRP con la región carboxilo terminal de la subunidad  $\alpha$  de la ARNP ( $\alpha$ CTD) (Heyduk *et al.*, 1993; Niu *et al.*, 1994; Busby *et al.*, 1998; Busby & Ebright, 1999; Lawson *et al.*, 2004). La proteína CRP induce un doblez en el ADN de aproximadamente 80 grados que facilita la interacción con la ARNP y permite que se establezcan los contactos entre la ARNP y el ADN. Esto deriva finalmente en el incremento de la constante de unión de la ARNP por el promotor *lac P1*. Estudios estructurales del complejo CRP- $\alpha$ CTD-ADN han revelado que no ocurren grandes cambios conformacionales ni en el activador ni en dominio  $\alpha$ CTD de la subunidad  $\alpha$  de la ARNP, lo cual es congruente con el mecanismo de activación propuesto, el cual consiste en un simple paso de reclutamiento para ensamblar o unir la maquinaria transcripcional al promotor (Benoff *et al.*, 2002; Lawson *et al.*, 2004). CRP también regula el promotor *gal P1*, pero en este caso en particular el sitio de unión de CRP se sobrelapa con la región -35 de dicho promotor, de manera que la ARNP interactúa con el ADN ubicado río arriba y río abajo del sitio de unión de CRP (Belyaeva *et al.*, 1996). CRP activa la transcripción del promotor *gal P1* al interactuar tanto con la subunidad  $\alpha$  como con el factor  $\sigma$  de la ARNP, de manera que en este caso CRP puede influenciar la formación del complejo de promotor abierto al reforzar la interacción que se establece entre la subunidad  $\sigma$  y el elemento -35 del promotor.

#### **4.3 Regulación de la transcripción por diferentes factores $\sigma$**

La asociación de la ARNP con cada uno de los diferentes factores  $\sigma$  permite la formación de holoenzimas que reconocen diferentes clases de promotores. Esta modalidad de regulación en donde el reemplazo o sustitución de un factor  $\sigma$  por otro conlleva a alterar la especificidad de reconocimiento de la ARNP, es una de las estrategias más empleadas para controlar la expresión genética. Este tipo de regulación por recambio de factores  $\sigma$  es energéticamente económica para los organismos bacterianos en el sentido que no requieren de la presencia de factores adicionales.

Se ha estimado que en *E. coli* el número de moléculas de ARNP por célula es de 2000 aproximadamente, de estas solamente 1300 participan activamente en la transcripción celular. Tomando en cuenta que el número de moléculas de ARNP es menor que el número de genes identificados en *E. coli* (aproximadamente 4200), se desprende que la ARNP debe “elegir” qué genes transcribir y con qué frecuencia lo hace (Ishihama, 2000; Maeda *et al.*, 2000). El número de moléculas de *core* de la ARNP

siempre es mayor que el número de factores  $\sigma$  disponibles, lo cual es consistente con la idea que la ARNP no siempre está asociada con la subunidad  $\sigma$  durante la fase de elongación de la cadena de ARN. La concentración intracelular de cada subunidad  $\sigma$  varía en dependencia del crecimiento de la célula con respecto al tiempo, mientras que la concentración del *core* tiende a permanecer relativamente constante. Por otra parte, estudios de unión han indicado que, aparte del *core* de la ARNP en estado libre (no participa activamente en la transcripción), el 78% se encuentra como holoenzima  $E\sigma^{70}$ , mientras que un 8% está representado por la variante  $E\sigma^{54}$  y el 14% restante se asocia con otros factores sigma alternativos (Maeda *et al.*, 2000). Estas evidencias sugieren que los distintos factores  $\sigma$  compiten por la unión de un reservorio limitado de moléculas de *core* de la ARNP disponibles en estado libre. Este balance o relación entre los diferentes factores  $\sigma$  y la ARNP puede cambiar o regularse según las condiciones fisiológicas celulares, de manera que los genes apropiados sean transcritos favorablemente respecto a otros bajo los estímulos externos adecuados. Este desplazamiento de subunidades  $\sigma$  dentro del *core* de la ARNP, en respuesta a un estímulo dado, resulta en el cambio de los patrones transcripcionales y en la homeostasis celular finalmente. Uno de los ejemplos más ilustrativos y complejos de este tipo de mecanismo de regulación, lo constituye la cascada de activación secuencial de los diferentes factores  $\sigma$  durante la fase de esporulación de la bacteria *B. subtilis* (Kroos *et al.*, 1999). En sentido general, la expresión correcta en tiempo y espacio de los diferentes factores sigma es garantizada, además de la compartimentalización celular, por una serie de mecanismos regulatorios entre los que se incluyen: la activación por corte proteolítico de algunos de los factores sigma involucrados, la presencia de factores anti-sigma, la presencia de factores transcripcionales accesorios que modulan la actividad de la ARNP, y por último mecanismos de retroalimentación negativa que limitan la producción de los factores sigma, facilitando la correcta transición hacia la expresión de un nueva subunidad sigma requerida en el proceso.

#### **4.4 Regulación de la transcripción por factores Anti-sigma**

Otras de las estrategias empleadas para regular la transcripción es a través de la interacción reversible que se establece entre el factor  $\sigma$  y su inhibidor, conocido como factor anti-sigma  $\sigma$ . La asociación entre el factor anti- $\sigma$  y su blanco permite la regulación negativa de los genes que son transcritos o regulados por dicho factor. Uno de los primeros ejemplos de este tipo de mecanismo proviene de estudios donde se

observó la modificación o alteración de la ARNP durante la infección de la célula por el bacteriófago T4.

En este caso en particular, el factor anti- $\sigma$ , AsiA, se asocia fuertemente con la holoenzima  $E\sigma^{70}$  específicamente con las regiones 4.1 y 4.2 del factor  $\sigma^{70}$  e inhibe la transcripción tanto de los genes de la célula huésped como de los promotores de fase temprana del fago T4 controlados por dicho factor (Hinton *et al.*, 1996; Severinova *et al.*, 1998; Rojo, 2001; 1999; Urbauer *et al.*, 2001). Evidencias recientes han mostrado que el factor AsiA compite de manera directa la unión que se establece entre la región 4 del factor  $\sigma^{70}$  y el dominio  $\beta$  *flap* de la ARNP (Gregory *et al.*, 2004). Esta interacción intersubunidad (región 4 de  $\sigma^{70}$  con el dominio  $\beta$  de la ARNP) en la ARNP es importante para regular el inicio de la transcripción, de ahí que la ruptura de esta interfase de interacción representa un blanco de acción para muchos reguladores, incluidos los factores anti- $\sigma$  (Kuznedelov *et al.*, 2002; Simeonov *et al.*, 2003; Gregory *et al.*, 2004).

Una variante de este mecanismo se ha observado en células de *E. coli* durante la fase estacionaria de crecimiento. Se ha observado que la proteína Rsd se une a la región 4 del factor  $\sigma^{70}$  impidiendo la unión del mismo con el *core* de la ARNP, bloqueando indirectamente su función en la transcripción. El papel fisiológico de la proteína Rsd no es muy obvio aún, ya que la expresión de Rsd es suficiente para unir solamente un 20% del factor  $\sigma^{70}$  libre. Por ende, se ha propuesto que Rsd secuestra el exceso de  $\sigma^{70}$  en su forma libre o inactiva (no unido al *core* de la ARNP) durante la fase estacionaria para posteriormente ser liberado en caso que las condiciones ambientales lo requieran (Helmann *et al.*, 1999; Ishihama *et al.*, 2000). Adicionalmente, se ha mostrado que Rsd no solamente se une al factor  $\sigma^{70}$  sino también al *core* de la ARNP, por lo que se ha propuesto que puede funcionar como un posible efector de esta última (Ilag *et al.*, 2004; Westblade *et al.*, 2004).

Otro de los ejemplos que muestran el mecanismo de acción de los factores anti- $\sigma$  tiene lugar durante la síntesis del aparato flagelar en *Salmonella typhimurium*. La expresión de los genes involucrados en la síntesis del flagelo es controlada por el factor  $\sigma^{28}$  o el factor  $\sigma^F$ , como también se le denomina. Durante la fase inicial de la biogénesis del flagelo la proteína FlgM se une e inhibe la función del factor  $\sigma^F$ . Una vez que se encuentra ensamblado el gancho y el complejo del cuerpo basal del flagelo, FlgM se exporta hacia el exterior por el sistema de secreción flagelar, liberando así la inhibición

ejercida sobre el factor  $\sigma^F$  (Helmann *et al.*, 1999). Se ha propuesto que FlgM en solución se encuentra en una conformación desplegada, lo que facilita su paso por el estrecho canal formado por la estructura cuerpo-gancho del flagelo, mientras que la interacción con  $\sigma^F$  posibilita la reorganización estructural del dominio carboxilo terminal de FlgM (Helmann *et al.*, 1999). Molecularmente, la inhibición del factor  $\sigma^F$  por parte de FlgM implica tanto el secuestro de  $\sigma^F$  como la desestabilización de la interacción entre el factor  $\sigma^F$  y el *core* dentro de la holoenzima  $E\sigma^F$ . Estudios genéticos han mostrado que la región 2, pero principalmente la región 4 del factor  $\sigma^F$ , están implicadas en la interacción o unión con FlgM (Helmann *et al.*, 1999). En este sentido se ha mostrado que FlgM, al igual que el factor AsiA, actúa destruyendo la interacción que se establece entre la región 4 del factor  $\sigma^F$  y el dominio  $\beta$  *flap* de la ARNP (Colland *et al.*, 2001; Dove *et al.*, 2003). Recientemente se determinó la estructura tridimensional del complejo  $\sigma^F$ /FlgM de *S. typhimurium*. La misma reveló que los diferentes dominios estructurales de  $\sigma^F$  se empaquetan o se organizan entre sí formando una unidad sumamente compacta, la cual se encuentra enrollada en su exterior por la conformación extendida que asume FlgM. Finalmente, la conformación compacta de  $\sigma^F$  y las interacciones que establece con elementos estructurales conservados de FlgM, contribuyen a mantener escondidos los dominios ( $\sigma_2$  y  $\sigma_4$ ) que están involucrados en el reconocimiento del promotor (Sorenson *et al.*, 2004).

Para concluir, existen otros mecanismos alternativos utilizados por las bacterias para regular y controlar el proceso de la transcripción como son el proceso de atenuación y la anti-terminación. Cada uno de estos mecanismos provee a la bacteria de un complejo y versátil repertorio regulatorio que garantizan la supervivencia de la célula al permitirle adaptarse a las cambiantes condiciones del medio.

#### **4.5 Activadores a distancia o Familia de las EBPs**

Como se ha descrito en otras secciones, los genes controlados por promotores dependientes de  $\sigma^{54}$  son incapaces de activar la transcripción en ausencia de una proteína activadora que pertenece a la familia de las EBPs. Recientemente los activadores transcripcionales pertenecientes a la familia de las EBPs se han incluido en una gran superfamilia de proteínas reconocidas por sus siglas como AAA<sup>+</sup> (Actividad ATPasa Asociada a diferentes procesos celulares) (Neuwald *et al.*, 1999). A diferencia de las EBPs que solamente se encuentran en bacterias, los miembros de esta familia se encuentran ampliamente distribuidos en los tres grandes dominios (arqueas, bacterias y

eucariontes) y son muy versátiles en cuanto a las actividades celulares que llevan a cabo, donde pueden desempeñar funciones de chaperonas, proteasas, asisten en los procesos de replicación y recombinación del ADN, así como en la regulación transcripcional, entre muchas otras (Neuwald *et al.*, 1999).

Una característica general de los miembros de esta familia es su capacidad de auto-ensamblarse y formar estructuras oligoméricas ordenadas, normalmente arregladas como hexámero en forma de anillo. El mecanismo de acción general de estas proteínas consiste en utilizar la energía de hidrólisis del ATP para remodelar complejos de proteínas o proteína-ADN. El rasgo distintivo o característico de los miembros que integran esta familia lo constituye la presencia de un dominio sumamente conservado que se denomina AAA<sup>+</sup>. El dominio AAA<sup>+</sup> contiene los determinantes necesarios para llevar a cabo la catálisis, de manera que toda esta gama de actividades o funciones celulares basadas en la hidrólisis de ATP tienen como soporte funcional este dominio (Ogura & Wilkinson, 2001; Neuwald *et al.*, 1999).

#### 4.5.1 Organización estructural de las EBPs

En el caso particular de las EBPs diversas evidencias genéticas y filogenéticas han permitido establecer que los activadores están constituidos por tres dominios estructurales y funcionales diferentes, que tienen la capacidad de funcionar independientemente (Drummond *et al.*, 1986; Morett & Segovia, 1993) (Figura 4.1).

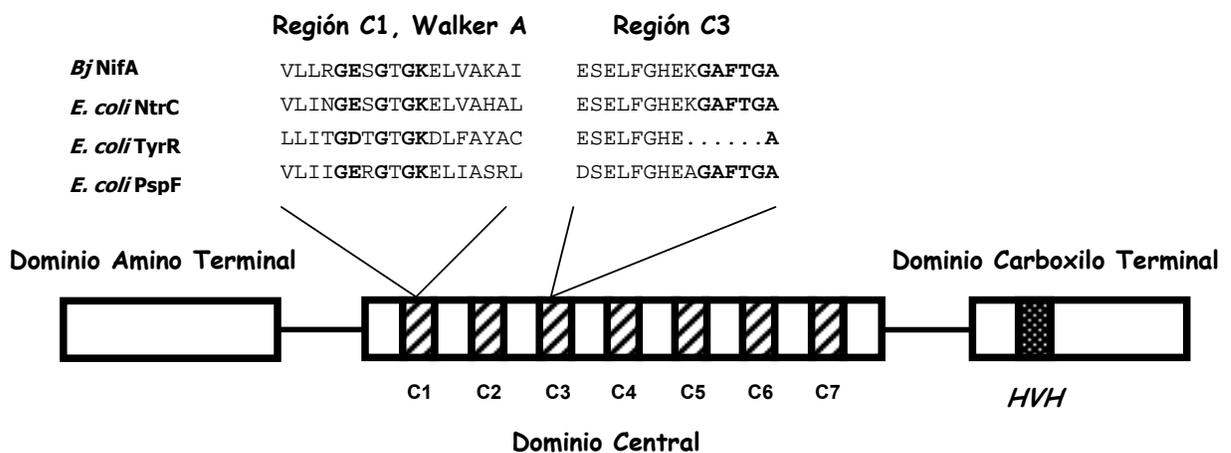


Figura 4.1. Representación esquemática de los diferentes dominios de las EBPs. En la figura se muestra un alineamiento del motivo Walker A y la región C3 de diferentes EBPs y la proteína TyrR de *E. coli*, donde se aprecia la remoción que presenta esta proteína en el extremo carboxilo terminal de la región C3 (GAFTGA). Mutantes de NifA en esta región presentan un fenotipo de activación drásticamente afectado.

#### 4.5.2 Dominio Central

El dominio AAA<sup>+</sup> catalítico o dominio central, según la nomenclatura utilizada para las EBPs, presenta una longitud de aproximadamente 240 a.a y se encuentra sumamente conservado entre los miembros de esta familia. Alineamientos múltiples de secuencias de diferentes EBPs, han permitido identificar siete regiones altamente conservadas dentro de este dominio (C1-C7) (Morett & Segovia, 1993).

Las regiones **C1** y **C4**, conocidos como motivos Walker A y Walker B, contienen los determinantes que participan en la unión e hidrólisis de ATP, respectivamente (Cannon & Buck, 1992; Austin & Dixon, 1992). En la región **C4** se encuentra un residuo de aspártico sumamente conservado, que es el encargado de coordinar el Mg<sup>+2</sup> en la molécula de Mg<sup>+2</sup>-ATP, el cual es necesario para la actividad de hidrólisis (Rombel *et al.*, 1999). Consecuentemente en activadores como PspF y NtrC donde se ha mutado este residuo, las mutantes pierden la capacidad de hidrolizar ATP. Estos dos motivos se encuentran presentes invariablemente en todas las proteínas que conforman la familia AAA<sup>+</sup>.

La región **C3**, es un motivo característico y exclusivo de las EBPs que contiene los determinantes estructurales y funcionales para el reconocimiento y el contacto con la holoenzima-E $\sigma^{54}$ . Las primeras evidencias sobre la posible función de la región C3, provienen del análisis de alineamientos múltiples de secuencia de varios miembros de la familia de las EBPs. En este trabajo, Morett y Segovia observaron que el regulador TyrR de *E. coli* presenta una remoción precisa de la región C3. Interesantemente, este regulador a pesar de pertenecer a la familia de las EBPs y de utilizar la energía de hidrólisis del ATP para su función, no activa la transcripción de genes dependientes del factor  $\sigma^{54}$ , sino de aquellos que son controlados por  $\sigma^{70}$  (Morett & Segovia, 1993) (Ver Figura 4.1). Estos datos sugerían fuertemente que este motivo era importante para la interacción con la E $\sigma^{54}$  y por ende en el proceso de transferencia de la energía de hidrólisis del ATP entre el activador y  $\sigma^{54}$ . Posteriormente diversos estudios genéticos y bioquímicos corroboraron el papel funcional predicho para esta región. En este sentido, se han descrito mutantes de NifA, NtrC y DctD cuyos cambios mapean en la parte carboxilo terminal de la región C3 o motivo GAFTGA, las cuáles están severamente afectadas en su actividad transcripcional *in vivo* sin perturbar otras funciones como son: la hidrólisis de ATP, la unión a ADN y la oligomerización (González *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1997).

A la región **C2** y **C5** no se le había asignado ninguna función en particular, sin embargo con la determinación de la estructura de dos activadores pertenecientes a las EBPs, se comprobó que estos residuos se ubican en la interfase de los protómeros que conforman el hexámero, de manera que las interacciones que se establecen entre ellos confieren estabilidad a esta estructura multimérica (Lee *et al.*, 2003).

En la región **C6** se encuentra un residuo de arginina o *R finger* que se encuentra invariablemente conservado entre los miembros de la familia AAA<sup>+</sup>. Este residuo, excepto en la subfamilia de las EBPs, está involucrado en la hidrólisis del ATP (Zhang *et al.*, 2002). En las EBPs este residuo de arginina catalítico se localiza en la región **C7**, la cual es un motivo exclusivo de esta familia. Basado en la estructura tridimensional del activador PspF de *E. coli* se ha observado que este residuo de arginina R<sub>227</sub> contacta el fosfato  $\gamma$  de la molécula de ATP que se encuentra unida en el sitio activo del protómero adyacente (Rappas *et al.*, 2005; 2006).

#### **4.5.3 Dominio amino terminal**

En las EBPs el dominio amino terminal constituye un dominio accesorio encargado de percibir las diferentes señales regulatorias del medio. Típicamente en ausencia del estímulo externo, el dominio amino terminal regula negativamente la actividad catalítica del dominio central del activador a través de interacciones intermoleculares que se establecen entre ambos, manteniendo así un estricto control sobre la expresión de los genes que son regulados positivamente por el activador. En este sentido, en las EBPs se pueden encontrar varios dominios NH<sub>2</sub> terminal funcionalmente diferentes en dependencia de la señal a la cual responden.

Los activadores de esta familia pueden agruparse acorde a la forma en la que el dominio amino responde a diferentes señales regulatorias. Los casos más estudiados lo constituyen proteínas como NtrC, DctD, HydG, AlgB y HoxA que forman parte del sistema de dos componentes para la transducción de señales en bacterias (Morett & Segovia, 1993). Por ejemplo en *E. coli*, las condiciones limitantes de nitrógeno constituye la señal que es detectada por una proteína histidina quinasa (NtrB) que a su vez fosforila un residuo de aspártico conservado en el dominio amino terminal del activador NtrC. Este evento desencadena una serie de cambios conformacionales en dicho dominio liberando la inhibición ejercida sobre el dominio AAA<sup>+</sup>, estimulando la unión cooperativa del activador a las UAS y su oligomerización (Keener & Kustu,

1988). Finalmente, la forma activa de NtrC interviene directamente en la expresión de los genes que llevan a cabo el proceso de asimilación de nitrógeno.

En otro grupo de activadores dependientes de  $\sigma^{54}$ , como es el caso de XylR y DmpR, el dominio amino terminal interactúa directamente con moléculas efectoras. En este tipo de dominios conocidos como PAS y GAF la unión del ligando también promueve cambios conformacionales que estimulan la actividad de hidrólisis del ATP en el dominio central del activador (Studholme & Dixon, 2003). Por último, este dominio puede llegar a estar ausente en algunas EBPs como es el caso de PspF de *E. coli*, la cual es constitutivamente activa (Morett & Segovia, 1993; Jovanovic *et al.*, 1996).

#### 4.5.4 Dominio carboxilo terminal

Este dominio se encuentra medianamente conservado en la familia de las EBPs y es el más pequeño de los dominios, oscilando entre 65 y 130 a.a (Morett & Segovia, 1993). En este dominio se encuentra un motivo de unión a DNA del tipo HVH que es el encargado de reconocer las UAS (Contreras & Drummond, 1988; Morett *et al.*, 1988). Los a.a más conservados en este motivo se encuentran en la primera hélice y en la vuelta, no así en la hélice que reconoce al ADN, lo cual es consistente con la observación que las diferentes proteínas que conforman la familia de las EBPs reconocen UAS propias. Las secuencias de nucleótidos de las UAS difieren unas de otras (Morett & Segovia, 1993). Este dominio expresado independientemente del resto de la proteína mantiene la capacidad de unirse específicamente a las UAS, lo que demuestra el carácter modular de las EBPs (Morett *et al.*, 1988).

Por otra parte, en un estudio donde se partió de un alineamiento de múltiples secuencias del motivo hélice-vuelta-hélice del activador NifA de diferentes organismos, se observó que un residuo de glicina que se encuentra altamente conservado en la familia no está presente en la proteína NifA de *Sinorhizobium meliloti* (*SmNifA*), la cual en su lugar presenta un residuo de glutámico. Esta sustitución promueve que la proteína *SmNifA* se una con menor afinidad a sus UAS, comparada con la proteína NifA de *Bradyrhizobium japonicum* (*BjNifA*), la cual presenta el residuo consenso de glicina. A pesar de esta deficiencia en la unión al ADN, la proteína *SmNifA* es capaz de activar la transcripción tan eficientemente o ligeramente mejor que la proteína de *BjNifA*. A diferencia de *BjNifA*, el dominio central de *SmNifA* aislado del resto de los dominios es capaz de promover la transcripción actuando *in trans*. Cuando el residuo de

glutámico de *SmNifA* fue sustituido por glicina, la proteína mutante no solo reconoció con mejor afinidad sus UAS sino que aumentó considerablemente su actividad transcripcional con respecto a la proteína silvestre. Estos resultados sugerían que la deficiencia de unión a las UAS en la proteína de *SmNifA* fue compensado de alguna manera por un dominio catalítico muy eficiente. En este sentido, la evolución molecular *in vitro* del dominio central del activador *BjNifA* reveló que las mutaciones que lograron mejorar o incrementar su actividad transcripcional ya existían de manera natural en su contraparte de *SmNifA*. Finalmente, este estudio indicó que los diferentes dominios de una proteína pueden coevolucionar, como es el caso de la proteína *SmNifA*, en donde la deficiencia de unión a sus UAS producto de una mutación en el dominio carboxilo terminal fue compensado evolutivamente por un dominio de activación altamente eficiente (Juárez *et al.*, 2000).

#### 4.5.5 Relación estructura-función de las EBPs

Recientemente se determinó la estructura tridimensional de dos activadores transcripcionales (NtrC1 de *Aquifex aeolicus* y PspF de *E. coli*) pertenecientes a la familia de las EBPs, lo que ha permitido entender desde un punto de vista estructural cómo ocurre el mecanismo de transferencia y acoplamiento de la energía de hidrólisis del ATP requerido para la activación transcripcional de los genes regulados por  $E\sigma^{54}$  (Lee *et al.*, 2003; Rappas *et al.*, 2005).

En el caso de *AeNtrC1* se resolvieron dos estructuras, una correspondiente al dominio regulatorio o amino terminal unido al dominio central, la cual cristalizó como dímero y que constituye la forma inactiva de la proteína, y otra que correspondió exclusivamente al dominio central en unión del nucleótido ADP (Lee *et al.*, 2003). Por su parte, la estructura atómica de PspF fue resuelta para posteriormente ser acomodada en el complejo proteico PspF- $\sigma^{54}$  en presencia de ADP-fluoruro de aluminio (ADPAIFx), el cual fue determinado por microscopía electrónica (Rappas *et al.*, 2005). El ADPAIFx es un análogo del estado de transición del ATP en la hidrólisis, que promueve que el activador interactúe de manera estable con  $\sigma^{54}$  (Chaney *et al.*, 2001).

Una característica estructural en común que comparten el dominio central de ambos activadores es que cristalizaron como oligómeros, específicamente como hexámeros arreglados en estructuras con forma de anillo, tal como se aprecia en la figura 4.2. Esta arquitectura oligomérica, que constituye la forma funcionalmente activa del activador, es típica de otros miembros de la familia AAA<sup>+</sup> con función no

relacionada a las EBPs y cuya estructura ha sido resuelta previamente (Zhang *et al.*, 2002).

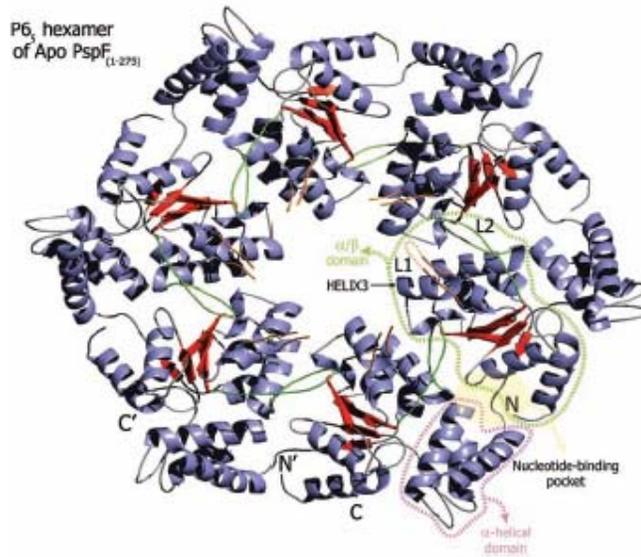


Figura 4.2. La figura muestra la estructura hexámerica adoptada por el dominio central del activador de *Ec* PspF. El asa que contiene el motivo GAFTGA, en color naranja, se ubica en la superficie del hexámero y apuntando hacia el exterior. Este inusual motivo estructural se encuentra estabilizado principalmente por dos residuos de glicinas sumamente conservados que se encuentran al inicio y final del asa, lo que confiere cierta distorsión de la configuración de la cadena principal de la  $\alpha$ -hélice para soportar la inserción del asa (Tomado de Rappas *et al.*, 2005).

En ambos activadores el dominio catalítico  $AAA^+$  o dominio central, según la nomenclatura de las EBPs está compuesto por dos subdominios estructuralmente distintos. El subdominio amino terminal adopta un plegamiento del tipo  $\alpha/\beta$  o Rossmann *Fold* y está conformado por un núcleo central de cinco hojas beta organizadas paralelamente que se encuentran rodeadas por varias  $\alpha$  hélices. El otro subdominio está formado por tres  $\alpha$ - hélices y ambos se encuentran conectados entre sí por un asa que actúa como bisagra y permite el movimiento entre ellos (Rappas *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2003).

El análisis de la estructura en ambos activadores reveló que el motivo GAFTGA de la región C3 del dominio central, el cual está implicado en la interacción con la  $E\sigma^{54}$ , forma parte de un asa flexible L1 que se encuentra insertada en medio de una  $\alpha$ -hélice. Dicha asa se encuentra apuntando hacia la superficie del poro central del hexámero, creando así una superficie extensa para la unión con  $\sigma^{54}$  (coloreado en naranja en la

Figura 4.2). Particularmente el residuo de treonina, involucrado en el contacto directo con  $\sigma^{54}$ , constituye la punta del asa L1.

La estructura de PspF y NtrC1 también mostró que el sitio activo para la unión e hidrólisis de ATP se ubica en la hendidura que se crea entre protómeros adyacentes dentro del hexámero (sombreado en amarillo en la Figura 4.2). En las EBPs uno de los aminoácidos involucrado en la catálisis y encargado de censar el estado del fosfato  $\gamma$  del ATP es un residuo de arginina o *sensor II*, el cual se encuentra altamente conservado dentro de la región C7 del dominio central. En cada subunidad del hexámero este residuo se posiciona estructuralmente muy cercano para hacer contacto con el nucleótido unido al motivo Walker A del monómero adyacente.

La estructura del dominio central del activador NtrC1 se resolvió unido a ADP o en un estado funcional post hidrólisis del ATP, el cual es incompetente para interaccionar con  $\sigma^{54}$  (Zhang *et al.*, 2002). A diferencia de PspF que se resolvió en presencia del análogo del estado de transición ADPAIFx, el cual promueve la interacción con  $\sigma^{54}$ . Esto sugería que existe una estrecha conexión entre los diferentes estados funcionales por los que transita el activador durante el ciclo de hidrólisis del ATP y la conformación que en estos intermediarios adopta el asa GAFTGA. De manera que la comparación de la estructura de ambos activadores arrojó importantes implicaciones sobre el mecanismo de acción de las EBPs.

Como se observa en la figura 4.3 la sobreposición de las estructuras del dominio central de NtrC1 y PspF mostró un buen alineamiento estructural de manera general (r.m.d de 1Å), sin embargo un análisis detallado reveló importantes diferencias en cuanto a las propiedades y el posicionamiento del asa GAFTGA en cada uno de ellos (Rappas *et al.*, 2005). En NtrC1 el asa GAFTGA se encuentra apuntando hacia el interior del poro central del hexámero, estabilizada por una serie de interacciones hidrofóbicas que la mantienen en una conformación escondida y desfavorable para contactar a la holoenzima E $\sigma^{54}$ . A diferencia de NtrC1, en PspF se observa un cambio en la orientación entre los subdominios  $\alpha$  y  $\alpha/\beta$ , que provoca la rotación relativa de la  $\alpha$ -hélice que soporta el asa GAFTGA. La rotación de la  $\alpha$ -hélice promueve que el asa L1 se libere y adopte una conformación extendida ahora disponible para contactar a  $\sigma^{54}$ . En esta nueva conformación el asa se estabiliza por una serie de interacciones que forman parte de una larga red de contactos intramoleculares que posibilitan que se transmitan o se amplifiquen hacia el asa GAFTFA los cambios conformacionales que se

generan en el núcleo central de hojas beta, específicamente en el motivo Walker B, producto de la hidrólisis de ATP.

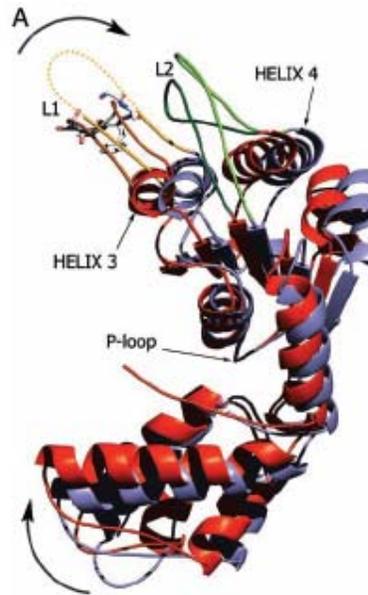


Figura 4.3. Alineamiento estructural del dominio central de las EBP PspF y NtrC1 (coloreado en azul y rojo respectivamente). En PspF la estructura del asa GAFTGA ó L1, en color naranja, se encuentra a diferencia de NtrC1 en una conformación extendida lo que posibilita el contacto directo con  $\sigma^{54}$ . Este reposicionamiento del asa GAFTGA en PspF esta íntimamente asociado a la hidrólisis del ATP (Tomado de Rappas *et al.*, 2005).

La microscopía electrónica del complejo PspF- $\sigma^{54}$  en presencia de ADPAIFx confirmó que al menos dos monómeros adyacentes de PspF establecen un claro contacto con  $\sigma^{54}$  a través del asa GAFTGA. Congruentemente, el acomodamiento de la estructura de NtrC1 en el hexámero de PspF muestra que el asa GAFTGA no puede establecer contactos con  $\sigma^{54}$ .

Las recientes evidencias estructurales mostraron que en las EBP el evento de hidrólisis de ATP está asociado a la unión con  $\sigma^{54}$ . De manera análoga en otros miembros de la familia AAA<sup>+</sup>, como es el caso de las proteínas RuvB de *E. coli* y p97 de ratón, la actividad ATPasa actúa de manera concertada en la relocalización o el cambio conformacional del asa que une a sus respectivos sustratos (Han *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2002).

Aunque aún no se comprende del todo el mecanismo por el cual las EBP logran acoplar la energía de hidrólisis de ATP a la restructuración del complejo de promotor

cerrado, varios estudios con miembros de las AAA<sup>+</sup> han revelado importantes indicios al respecto. Recientemente, se demostró mediante microscopía electrónica que el poro central del hexámero formado por la proteína p97 sufre cambios dramáticos durante la hidrólisis de ATP, lo que ha llevado a proponer que la estructura oligomérica formada por las proteínas AAA<sup>+</sup> pueden alternar entre diferentes estados de tensión y relajamiento dependiendo del nucleótido que se encuentre unido (Rouiller *et al.*, 2002). Esta fuerza o tensión puede ser aplicada a las proteínas sustrato, en el caso particular de las EBPs al complejo de promotor cerrado E $\sigma$ <sup>54</sup> para producir los cambios conformacionales requeridos para remodelar el complejo inactivo en uno transcripcionalmente activo.

Se ha propuesto en el caso de las EBPs, que el activador transita entre diferentes estados conformacionales según el nucleótido que se encuentre unido. Cada uno de estos estados conformacionales tienen diferente repercusión funcional en la transición del complejo de E $\sigma$ <sup>54</sup>-promotor cerrado a abierto. En este sentido la comparación de las estructuras del activador PspF en presencia de diferentes nucleótidos (AMPPNP, ADP y ADPAIFx) reveló importantes pistas al respecto (Rappas *et al.*, 2006). La sobreposición de las diferentes estructuras de PspF mostró que los cambios conformacionales más dramáticos ocurren después de la liberación de ADP y P<sub>i</sub>, es decir en el paso de hidrólisis de ATP. Las regiones más afectadas corresponden a la hoja  $\beta_3$  (ubicada en el núcleo del Rossmann *fold*) donde se ubica el residuo de aspártico catalítico, y dos asas de unión (*linkers*) que conectan los elementos de estructura secundaria con las asas L1 (motivo GAFTGA) y L2, respectivamente (Rappas *et al.*, 2006). Congruentemente también se observó movimientos relativos entre los subdominios  $\alpha/\beta$  y  $\beta$ . Basados en la alta resolución de estructuras estos autores proponen un modelo molecular en donde la energía de hidrólisis del ATP se acopla a los movimientos de la región efectora o asa GAFTGA, para dar lugar finalmente al remodelamiento del complejo cerrado E $\sigma$ <sup>54</sup>. En este sentido, la unión del ATP promueve la interacción entre un residuo de asparagina altamente conservado y ubicado en la hoja  $\beta_2$  con un residuo de glutámico de la hoja  $\beta_3$  (adyacente al residuo de aspártico catalítico). Ambos residuos a su vez interaccionan con una molécula de agua implicada en la hidrólisis del ATP, funcionando de esta manera como un interruptor molecular. Finalmente, esta interacción promueve la rotación de las hélices que soportan las asas L1 y L2, respectivamente. Esto deriva en la exposición del asa GAFTGA que se encontraba en una conformación desfavorable para contactar a

$E\sigma^{54}$ . En el punto de la hidrólisis del ATP, el asa GAFTGA se estabiliza a través de una serie de interacciones que le permite finalmente interactuar con  $E\sigma^{54}$ . Después de la hidrólisis del ATP, este interruptor molecular se destruye posibilitando que el asa GAFTGA colapse estructuralmente, retornando a la conformación escondida observada en la presencia de ADP (Rappas *et al.*, 2006).

Por simplicidad este mecanismo ha sido propuesto para un monómero del hexámero, sin embargo se piensa que de acuerdo al ciclo de hidrólisis que lleve a cabo el activador (concertada, secuencial o estocástica) múltiples asas GAFTGA pueden exponerse para contactar a  $E\sigma^{54}$ . Se piensa que múltiples ciclos de hidrólisis de ATP por parte del activador promueven que se generen los diferentes estados intermedios requeridos para la transición del complejo de promotor cerrado a abierto. Estudios recientes han mostrado que las EBPs hidrolizan el ATP mediante ciclos secuenciales o rotacionales pero no de manera concertada (Joly *et al.*, 2006). Los resultados mostraron que a concentraciones saturantes de ATP (donde todos los sitios del hexámero permanecen ocupados por ATP) la actividad ATPásica del activador se inhibe completamente. Sin embargo en presencia de ADP y ATP se alcanzan los niveles máximos de actividad ATPásica. Conjuntamente con otras evidencias estos resultados apuntan a que el hexámero de las EBPs está ocupado de manera heterogénea por ADP y ATP. En base a esto se ha sugerido que las múltiples asas GAFTGA del activador pueden exponerse de manera asimétrica para contactar a  $E\sigma^{54}$ , dado que las diferentes subunidades del activador tienen la misma probabilidad de unir e hidrolizar ATP (Joly *et al.*, 2006).

## ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Con anterioridad se había demostrado que el dominio central de proteínas como NifA y DctD pueden activar la transcripción actuando en *trans*, lo que indicaba que los determinantes para la activación transcripcional radicaban en este dominio (Huala & Ausubel, 1989; 1992).

Posteriormente, Morett y Segovia basados en estudios de alineamientos múltiples de secuencia de diferentes EBPs, establecieron que los aminoácidos conservados dentro del dominio central pueden agruparse en siete regiones diferentes (Morett & Segovia, 1993). De manera interesante, el análisis de comparación de secuencias reveló que el regulador TyrR de *E. coli*, a pesar de presentar una gran similitud con el dominio central de las EBPs, contiene una remoción precisa en el extremo carboxilo terminal de la región C3 (motivo GAFTGA), presentando el extremo amino terminal solamente (ESELF GH). Este regulador transcripcional, al igual que las EBPs, requiere de la hidrólisis de ATP para llevar a cabo su función, sin embargo esta proteína regula la expresión de genes que son dependientes del factor  $\sigma^{70}$  y no de  $\sigma^{54}$ . Este análisis, conjuntamente con evidencias genéticas donde mutantes en la región C3 de NifA y DctD presentaron un fenotipo de activación drásticamente afectado, sin involucrar otras funciones de estas proteínas como son: hidrólisis de ATP, capacidad de oligomerización y unión a las UAS; han llevado a proponer que el motivo GAFTGA dentro de la región C3 de las EBPs, constituye un elemento de reconocimiento y es el encargado de establecer contacto directo con el factor  $\sigma^{54}$  asociado a la ARNP (González *et al.*, 1998; Lee & Hoover, 1997; Morett & Segovia, 1993).

En este sentido, en un estudio reciente donde se emplearon diferentes fragmentos de péptidos sobrelapados que abarcaban todo el dominio central del activador transcripcional PspF (homólogo a NifA) demostró que solamente aquellos fragmentos que contenían el motivo GAFTGA interaccionaban de manera estable con la holoenzima  $E\sigma^{54}$  en presencia del análogo del estado de transición del ATP en la hidrólisis (ADPAIFx). Mutaciones puntuales en el residuo de treonina del motivo GAFTGA impedían la formación *in vitro* del complejo entre el péptido que portaba la mutación y  $\sigma^{54}$ . Esto sugería que la treonina dentro del motivo GAFTGA constituye un residuo crítico para establecer contacto con la holoenzima (Bordes *et al.*, 2003).

Recientemente se determinó la estructura tridimensional del activador PspF de *E. coli*. La misma reveló que el motivo GAFTGA constituye un asa flexible que se

encuentra en una conformación extendida y expuesta en la superficie exterior de la estructura oligomérica en forma de anillo que adopta esta proteína. El posicionamiento de la estructura hexamérica del activador PspF en el mapa de densidad electrónica del complejo  $E\sigma^{54}$ -PspF, reveló que al menos dos monómeros adyacentes dentro del hexámero establecen contacto con  $E\sigma^{54}$ , principalmente a través del asa GAFTGA. Interesantemente, el residuo de treonina del motivo GAFTGA constituye la punta del asa (Rappas *et al.*, 2005). En base a estas evidencias se ha propuesto que el residuo de treonina del motivo GAFTGA del activador constituye el principal determinante que participa en la interacción con  $E\sigma^{54}$ , posibilitando que la energía de hidrólisis del ATP se acople a los cambios conformacionales inducidos en  $E\sigma^{54}$  por el activador, requeridos para la formación del complejo de promotor abierto. Basado en recientes evidencias estructurales se ha propuesto que durante el ciclo de hidrólisis del ATP el activador transita por diferentes estados conformacionales y funcionales, que están asociados con los distintos eventos que se requieren para la apertura del ADN y formación del complejo abierto (Rappas *et al.*, 2006). En este sentido, se ha demostrado que una de las consecuencias funcionales de la hidrólisis del ATP por el activador consiste en repositionar el asa GAFTGA en una conformación favorable para la interacción con  $E\sigma^{54}$  (Rappas *et al.*, 2006). En general, las evidencias estructurales como genéticas han permitido entender el mecanismo molecular por el cual el activador, principalmente a través del residuo de treonina del asa GAFTGA, acopla o transfiere la energía de hidrólisis del ATP a la  $E\sigma^{54}$ .

Por otra parte, basados en estudios donde se observó que mutantes en la región I de  $\sigma^{54}$  le confieren a la holoenzima un fenotipo de activación transcripcional independiente del activador, se propuso que la región I además de intervenir en el control de la isomerización del promotor, constituye el principal blanco de interacción con el activador (Wang *et al.*, 1995; 1997). Sin embargo, la identificación y caracterización de los determinantes de la región I de  $\sigma^{54}$  involucrados en la interacción con el activador, así como el papel funcional de dicha región en el proceso de acoplamiento de la energía de hidrólisis del ATP asociado a la formación del complejo abierto, aún restaba por entenderse. En este sentido el objetivo principal de nuestro trabajo consistió en estudiar e identificar que residuos dentro de la región I de  $\sigma^{54}$  son relevantes para la interacción con el activador y cómo estos cooperan durante el proceso de transferencia de la energía de hidrólisis del ATP para generar los diferentes estados

conformacionales por los que debe transitar  $\sigma^{54}$ , principalmente la región I, necesarios para formar el complejo abierto

Para abordar nuestro objetivo, empleamos una estrategia de supresión genética *in vivo* con la finalidad de encontrar mutantes de  $\sigma^{54}$  que sean capaces de recuperar o restaurar la capacidad de activar la transcripción en mutantes del activador cuya función se encuentra severamente afectada. Esta estrategia se basa en la premisa de que en un ensamblaje macromolecular, una pérdida de función o de actividad causada por una mutación en uno de los miembros puede suprimirse o compensarse a través de una mutación en el otro miembro o pareja de interacción. En este sentido, tomamos ventajas de una serie de mutantes del activador *BjNifA* generadas en nuestro laboratorio, donde las substituciones mapeaban en el motivo GAFTGA exclusivamente. En su mayoría, las mutantes eran incapaces de activar la transcripción de una fusión *nifH-lacZ in vivo*. Una de las mutantes (NifA T308S), cuyo cambio conservativo de a.a mapea en el residuo de treonina del motivo GAFTGA, presentó una actividad  $\beta$  galactosidasa 200 veces menor comparado con la proteína silvestre, pero ocho veces mayor que el resto de las mutantes obtenidas en la misma posición (González *et al.*, 1998). La actividad transcripcional residual que exhibe la mutante de NifA T308S la convirtió en un excelente candidato para hallar mutantes de  $\sigma^{54}$  que sean capaces de rescatar el fenotipo de no activación de la mutante del activador, como evidencia genética indirecta del restablecimiento del contacto entre estas dos proteínas.

Anteriormente en nuestro grupo, mediante el uso de esta estrategia, se encontraron dos mutantes de  $\sigma^{54}$  de *K. pneumoniae* que suprimieron parcialmente el fenotipo de no activación de la mutante de NifA T308S. Una de ellas presentó una mutación de guanina por adenina en la región promotora *rpoNp1y* reveló la existencia de dos promotores sobrelapados dependientes de  $\sigma^{70}$  (*rpoNp1* y *rpoNp2*) para dirigir la expresión de  $\sigma^{54}$  de *K. pneumoniae*. La mutación acercaba al elemento -10 del promotor *rpoNp1* a la secuencia consenso, provocando que aumentara la expresión de  $\sigma^{54}$ , siendo esto la causa del fenotipo de supresión. Interesantemente, la otra mutante supresora de  $\sigma^{54}$  (Q<sub>20</sub>L-H<sub>53</sub>N) presentó dos cambios que mapearon en la región I (Grande *et al.*, 1999).

Previos estudios *in vitro* habían sugerido que los residuos del 6 al 14 de la proteína *Kp* $\sigma^{54}$  eran relevantes para la interacción con el activador PspF (Bordes *et al.*, 2004). Tomando en cuenta estos resultados, nos enfocamos específicamente en explorar

y sustituir mediante mutagénesis aleatoria esta región de  $Kp\sigma^{54}$  para encontrar nuevas mutantes de  $\sigma^{54}$  que suprimieran de manera más robusta el fenotipo de no activación de la mutante de NifA T308S. La posterior caracterización bioquímica de las mutantes supresora de  $\sigma^{54}$  no solo nos permitiría entender las bases moleculares del fenotipo de supresión, sino que además nos aportaría evidencias acerca de la interrelación funcional que se establece entre la región I de  $\sigma^{54}$  y el motivo GAFTGA del activador durante el mecanismo de activación transcripcional, específicamente en el proceso de acoplamiento de la energía de hidrólisis del ATP.

Finalmente, los estudios de supresión genética constituyen una herramienta valiosa para estudiar interacciones proteína-proteína, tal como lo demuestran los experimentos de Li y colaboradores en donde un cambio de R596H en el factor  $\sigma^{70}$  de *E. coli* suprimió a la mutante D38N de la proteína activadora cI del fago lambda, restableciendo la capacidad de activación a niveles semejantes a los de la proteína silvestre (Li *et al.*, 1994).

## **OBJETIVO GENERAL**

El objetivo general de este proyecto consistió en identificar y caracterizar los determinantes de la región I de  $\sigma^{54}$  que participan en la interacción con el activador durante el inicio de la transcripción. Asimismo entender el papel funcional que juega la región I y cómo coopera con el activador durante el proceso de transferencia de la energía de hidrólisis del ATP, para promover que el complejo cerrado-E $\sigma^{54}$  progrese por los diferentes estados intermediarios en vistas a formar el complejo de promotor abierto.

Como se mencionó anteriormente, los aminoácidos del 6 al 14 de  $\sigma^{54}$  parecen ser relevantes para la interacción con el activador (Bordes *et al.*, 2004). A continuación se describen los objetivos particulares:

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Sustituir mediante mutagénesis las posiciones aminoacídicas desde la 2 a la 14 de la región I de  $\sigma^{54}$  para seleccionar *in vivo* mutantes supresoras de  $\sigma^{54}$  que permitan recuperar la capacidad de activación de mutantes del activador afectadas en el motivo GAFTGA. Analizar los cambios de aminoácidos que le confieren a  $\sigma^{54}$  la habilidad de suprimir el fenotipo de no activación del activador.
- Realizar ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa *in vivo* con el objetivo de establecer cuantitativamente el incremento en la actividad transcripcional de las mutantes del activador por parte de las mutantes supresoras de  $\sigma^{54}$ .
- Expresar y purificar las proteínas mutantes de  $\sigma^{54}$  para su posterior caracterización bioquímica.
- Estudiar y entender las bases moleculares por la cual las mutantes supresoras de  $\sigma^{54}$  rescatan la actividad de la mutante del activador, a través del empleo de una batería de ensayos *in vitro* que reflejan los diferentes eventos moleculares que el activador promueve dependiente de la hidrólisis del ATP en el complejo cerrado E $\sigma^{54}$  en vistas a formar el complejo abierto.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En esta sección plasmamos las principales contribuciones y resultados experimentales de mi trabajo de tesis doctoral. Los resultados son presentados y organizados en diferentes capítulos en los que se anexaron, según el caso, los artículos que fueron publicados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis. Cada capítulo consta de un resumen que sintetiza los principales hallazgos y la discusión de los resultados obtenidos en cada trabajo publicado.

En los capítulos 6 y 7 se muestran dos artículos que fueron publicados en colaboración con el grupo del Dr. Martin Buck en el Imperial College, y en los cuales contribuí con algunos datos y resultados experimentales que permitieron conformar estas dos publicaciones. En el capítulo 8, se muestra la parte principal o medular de mi trabajo de tesis y que derivó en una publicación como primer autor. En el último capítulo se describen y se analizan de manera más detallada resultados que por el momento no han sido publicados, pero que también constituyeron un volumen importante de trabajo y en donde fueron abordados objetivos también de gran interés por nuestro grupo.

## CAPÍTULO 6

### Apéndice I

#### ARTÍCULO EN COLABORACIÓN

Chaney, M., Grande, R., Wigneshweraraj, SR., Cannon, W., Casaz, P., Gallegos, MT., Schumacher, J., Jones, S., Elderkin, S., **Dago, AE.**, Morett, E. and Buck, M. (2001). Binding of transcriptional activators to sigma 54 in the presence of the transition state analog ADP-aluminum fluoride: insights into activator mechanochemical action. *Genes & Development*. Vol. **15**: 2282-2294.

## 6.1 Resultados y Discusión (Apéndice I)

### Mutantes en la Región I de $\sigma^{54}$ restablecen parcialmente la función de la mutante NifA T308S *in vivo*

En este trabajo se caracterizó por vez primera, mediante experimentos *in vivo* como *in vitro*, la interacción molecular entre el activador y el factor transcripcional  $\sigma^{54}$ . Los experimentos *in vivo* fueron abordados a través de una estrategia de supresión genética. Para esto partimos del análisis de una mutante supresora de  $\sigma^{54}$  Q<sub>20</sub>L-H<sub>53</sub>N, previamente aislada en nuestro laboratorio, la cual suprime parcialmente el fenotipo de no activación de una mutante del activador *Bj*NifA T308S que presenta una substitución de treonina por serina en el motivo GAFTGA (Grande *et al.*, 1999). Interesantemente, ambos cambios mapearon en la región I de la proteína, la cual se ha propuesto que participa en la respuesta al activador.

Para averiguar qué otros cambios de a.a contribuyen a mejorar o mantener el fenotipo de supresión, decidimos mutagenizar simultáneamente a saturación las posiciones 20 y 53 de la proteína *Kp* $\sigma^{54}$ . De la nueva librería se seleccionaron 10 mutantes de  $\sigma^{54}$  que mantenían el fenotipo de supresión. El análisis de secuencia de las clonas mostró que 9 de ellas presentaron leucina en la posición 20, al igual que la mutante supresora original Q<sub>20</sub>L-H<sub>53</sub>N, mientras la otra presentó un cambio por valina. Esto indicaba que se requería un a.a hidrofóbico, preferentemente leucina, para lograr obtener los niveles de supresión con la mutante de NifA T308S. Por otra parte la posición 53 resultó ser más flexible ya que aceptó una mayor diversidad de a.a con propiedades físico-químicas diferentes (Tabla 1, apéndice I). Este resultado constituía una evidencia a favor de la interacción funcional que ocurre entre el motivo GAFTGA del activador y la región I de  $\sigma^{54}$  para estimular el inicio de la transcripción. Los experimentos de supresión genética *in vivo* constituyeron mi principal contribución en este artículo. A continuación se describen otros resultados relevantes del artículo.

### El análogo del estado de transición del ATP en la hidrólisis (ADP-AIFx) promueve la formación de un complejo estable entre el activador y $\sigma^{54}$

Sin embargo, la contribución más relevante y original de este trabajo consistió en aislar y caracterizar por vez primera la formación de un complejo estable *in vitro* entre el activador y  $\sigma^{54}$ . Se ha propuesto que la interacción entre el activador y  $\sigma^{54}$  ocurre de manera transitoria durante la activación transcripcional, de manera que capturar este complejo era muy difícil sobre todo por la rápida hidrólisis del ATP. Para

abordar esto, se utilizó un análogo del estado de transición del ATP en la hidrólisis ADP-AlFx (ADP fluoruro de aluminio), el cual mimetiza el arreglo atómico del fosfato  $\gamma$  del ATP en el estado de transición (Wittinghofer *et al.*, 1997). El ADP-AlFx promueve que el activador quede atrapado en nuevo estado conformacional que tiene dos grandes consecuencias funcionales que son, promover la oligomerización del activador y la interacción con  $\sigma^{54}$ .

Para los ensayos de unión mediante geles nativos de proteínas, se empleó una variante del activador *Ec* PspF $_{\Delta HVH}$ , que consiste en el dominio central o catalítico del activador. Al incubarse PspF $_{\Delta HVH}$  en presencia de ADPAIFx y P<sup>32</sup>- $\sigma^{54}$  marcada radiactivamente se observó la formación de un nuevo complejo que migró más lentamente comparado con la movilidad de la proteína  $\sigma^{54}$  silvestre (Figura 1B, apéndice I). Para asegurarnos que el activador formaba parte de dicho complejo se marcó entonces P<sup>32</sup>-PspF $_{\Delta HVH}$  y se incubó en presencia de  $\sigma^{54}$  y ADP-AlFx. Bajo estas condiciones se observó la formación de dos complejos que se retardaban con respecto al activador, uno de ellos correspondió a un nuevo estado funcional y conformacional del activador (oligómero) y otro que migró a la misma altura que el complejo binario P<sup>32</sup>- $\sigma^{54}$ /PspF $_{\Delta HVH}$  (Figura 1B, apéndice I). En general el resultado mostró que  $\sigma^{54}$  y el activador PspF $_{\Delta HVH}$  se asocian formando un nuevo complejo estable, dependiente de ADP-AlFx.

Por otra parte, el complejo PspF $_{\Delta HVH}$ -ADPAIFx/ $\sigma^{54}$  no se destruye o disminuye en presencia de fosfato o ATP, lo que indica que el ADP-AlFx se encuentra unido de manera estable. El uso de análogos no hidrolizables del ATP como ATP $\gamma$ S y (o) análogos alternativos del estado de transición como ADPVi no resultan en la formación del complejo entre el activador y  $\sigma^{54}$ . Otros factores transcripcionales, como  $\sigma^{70}$  y  $\sigma^{32}$ , tampoco se unen al activador en presencia de ADP-AlFx. En conjunto, estos datos demuestran que el análogo ADP-AlFx actúa específicamente incrementando la unión del activador a  $\sigma^{54}$  o la holoenzima E $\sigma^{54}$ .

### **El ADPAIFx promueve la oligomerización del activador**

El cambio de movilidad observado cuando el activador PspF $_{\Delta HVH}$  se incubaba en presencia de ADP-AlFx, sugería que la unión del nucleótido altera la estructura cuaternaria del activador. En este sentido, se ha demostrado que activadores como NtrC de *E.coli* forman oligómeros ordenados para activar la transcripción (Wyman *et al.*, 1997). Paralelamente, en experimentos donde se usaron concentraciones elevadas del

activador PspF<sub>ΔHVH</sub>, que promueven la formación de oligómero independiente de ADP-AIFx, se observó que el activador en estas condiciones es incapaz de interactuar con  $\sigma^{54}$ , lo que sugiere que la oligomerización del activador por sí solo no constituye un requisito para interactuar con  $\sigma^{54}$ . Basado en estos resultados propusimos que un posible papel del análogo del estado de transición es el de promover la formación de un nuevo estado funcional en el activador que le permite unirse fuertemente a  $\sigma^{54}$ .

### **La Región I de $\sigma^{54}$ es esencial para la unión con el activador**

Previas evidencias genéticas habían sugerido que la región I de  $\sigma^{54}$  participaba en la respuesta e interacción con el activador (Wang *et al.*, 1995; 1997). Para comprobar esto empleamos dos proteínas mutantes de  $\sigma^{54}$ , una que presentó una remoción de la región I ( $\Delta I\sigma^{54}$ ) y otra donde se removió el dominio de unión a ADN manteniendo intacta la región I. A las mutantes se les evaluó en su capacidad de interactuar y formar un complejo binario con el activador PspF<sub>ΔHVH</sub> en presencia de ADP-AIFx. El experimento reveló que las variantes de  $\sigma^{54}$  que presentaron una remoción de la región I fueron incapaces de formar el complejo con el activador, comparado con la proteína silvestre, (Figura 2A, apéndice I). Particularmente se comprobó que solamente la región I de  $\sigma^{54}$  es capaz de interactuar con el activador para formar el complejo correspondiente (Figura 2B, apéndice I). Finalmente, estos resultados demostraron de manera directa que la región I de  $\sigma^{54}$  constituye el principal blanco de interacción del activador dentro de la holoenzima E $\sigma^{54}$ .

### **El motivo GAFTGA de las EBPs constituye un determinante para la unión con $\sigma^{54}$**

Previas evidencias genéticas habían sugerido que el motivo GAFTGA del activador, específicamente el residuo de treonina, estaba involucrado en el contacto con  $\sigma^{54}$ . Para evaluar esto, se construyeron una serie de mutantes del activador PspF<sub>ΔHVH</sub> en donde el residuo de treonina del motivo GAFTGA fue sustituido por valina, alanina y serina (T86V, T86A, T86S). Las mismas mutaciones en el contexto de *Bj* NifA resultaban deletéreas para la actividad *in vivo* (González *et al.*, 1998).

Las mutantes de PspF<sub>ΔHVH</sub> fueron ensayadas en su capacidad de unirse a  $\sigma^{54}$  en presencia de ADP-AIFx. El resultado mostró que excepto la mutante T86S, el resto resultó incapaz de formar el complejo binario con  $\sigma^{54}$ . No obstante, en ausencia de  $\sigma^{54}$  la mutante PspF<sub>ΔHVH</sub> T86S resultó ser deficiente en su capacidad de oligomerizar, lo que sugiere que la unión de  $\sigma^{54}$  ayuda a rescatar o estabilizar el oligómero en presencia del

análogo ADP-AIFx (Figura 3, apéndice I). En general los experimentos nos permitieron concluir que el motivo GAFTGA de las EBPs, específicamente el residuo de treonina, está críticamente involucrado en el contacto y la interacción con  $\sigma^{54}$ .

### **El ADP-AIFx no es suficiente para promover la formación del complejo abierto**

Como ya habíamos demostrado, el ADP-AIFx promueve la interacción entre el activador y  $\sigma^{54}$ . Lo siguiente que se investigó fue si el activador atrapado con ADP-AIFx promueve o altera la interacción que  $\sigma^{54}$  establece con el promotor, como evidencia de un evento de isomerización del promotor rumbo a la formación del complejo de promotor abierto. En este sentido se comprobó que el activador en presencia de ADP-AIFx puede interaccionar y formar un nuevo complejo ternario con  $\sigma^{54}$  (PspF-ADP-AIFx/ $\sigma^{54}$ /ADN) unida al ADN (Figura 4A, apéndice I). Ensayos de *footprinting* demostraron que en presencia del activador y ADP-AIFx,  $\sigma^{54}$  protege la región de ADN que comprende el sitio de inicio de la transcripción (Figura 5A, apéndice I). Este patrón de *footprinting* extendido de  $\sigma^{54}$  no se observa en ausencia del activador y el análogo del estado de transición, por lo que concluimos que el activador al interaccionar con la región I de  $\sigma^{54}$  en el punto de hidrólisis del ATP, promueve o altera la interacción entre  $\sigma^{54}$  y el ADN dentro del complejo cerrado. Otra posibilidad es que el propio activador proteja esa región del promotor.

Por otra parte, al utilizarse una prueba de promotor que mimetiza el complejo abierto, se demostró que  $E\sigma^{54}$  es incapaz de formar complejos de promotor abierto estables en presencia del activador y ADP-AIFx. Sin embargo,  $E\sigma^{54}$  sí puede formar complejos abiertos estables dependiente de la hidrólisis de ATP por parte del activador. En conjunto, estos resultados sugieren que la interacción que el activador establece con  $\sigma^{54}$  en el punto de hidrólisis del ATP, no es suficiente para generar los cambios conformacionales requeridos en  $E\sigma^{54}$  para el reconocimiento y la unión a la cadena no templado del promotor en estado desnaturalizado. Congruentemente, el activador atrapado con ADP-AIFx fue incapaz de iniciar la transcripción en esta prueba de promotor, aún en presencia del nucleótido de inicio.

## CAPÍTULO 7

### Apéndice II

#### ARTÍCULO EN COLABORACIÓN

Bordes, P., Wigneshweraraj, SR., Chaney, M., **Dago, AE.**, Morett, E., and Buck, M. (2004). Communication between  $E\sigma^{54}$ , promoter DNA and the conserved threonine residue in the GAFTGA motif of the PspF  $\sigma^{54}$ -dependent activator during transcription activation. *Mol. Microbiology*. Vol. **54**: 489-506.

## 7.1 Resultados y Discusión (Apéndice II)

El objetivo de este trabajo consistió en entender y estudiar, mediante una serie de experimentos *in vitro*, las bases moleculares por la cual la mutante de  $\sigma^{54}$  Q<sub>20</sub>L-H<sub>53</sub>N suprime o rescata la actividad transcripcional de la mutante del activador NifA T308S *in vivo*. Previamente se había demostrado mediante ensayos de actividad transcripcional *in vivo* que las mutaciones Q<sub>20</sub>L y H<sub>53</sub>N actuaban de manera sinérgica para lograr los niveles de supresión, de manera que en el estudio se incluyeron las mutantes sencillas para evaluar su efecto en el rescate de la actividad. Para los estudios *in vitro* se empleó el activador PspF $_{\Delta$ HVH, ya que a diferencia de NifA su expresión y purificación no constituye una limitante. Por otra parte, existen una gran cantidad de ensayos ya estandarizados para estudiar el mecanismo de activación transcripcional de E $\sigma^{54}$  dependiente de PspF.

Inicialmente se evaluó si las mutaciones en la región I no afectan la funcionalidad de la holoenzima. Para esto, se midió la capacidad de las proteínas mutantes de  $\sigma^{54}$  (Q<sub>20</sub>L, H<sub>53</sub>N y Q<sub>20</sub>L-H<sub>53</sub>N) de unirse al core del ARNP para formar la holoenzima y también en su capacidad de formar el complejo de promotor cerrado. En general, ninguna de las mutaciones altera la funcionalidad de la holoenzima, al menos en el contexto de estos ensayos (Figura 2A, 2B y 2C, apéndice II). Consistentemente, las holoenzimas mutantes de  $\sigma^{54}$  fueron capaces de activar la transcripción *in vitro* a niveles similares que la silvestre en presencia del activador PspF $_{\Delta$ HVH. Por otro lado haciendo uso de una prueba de promotor de *SmnifH* que mimetiza la conformación que adopta el promotor en el estado abierto, se observó que la mutación Q<sub>20</sub>L, a diferencia de la proteína silvestre, le confiere a la holoenzima la capacidad de formar complejos de promotor abiertos estables en ausencia del activador. La E $\sigma^{54}$  silvestre requiere de la hidrólisis del ATP por parte del activador para formar complejos abiertos estables, lo que sugiere que el activador induce cambios conformacionales en E $\sigma^{54}$  que le permiten establecer contacto con las cadenas sencillas del ADN en el promotor en estado abierto. Este resultado sugiere que la mutación Q<sub>20</sub>L favorece que la holoenzima contacte de manera más estable el promotor desnaturalizado comparado con la proteína silvestre.

### **La mutación Q<sub>20</sub>L forma parte del centro regulador**

La región I se ha implicado en el control de la isomerización del promotor a través una interacción inhibitoria que establece con la estructura de horquilla en la región -12 del promotor. Esta interfase ADN-proteína formada por la región I y la

región -12 del promotor se conoce como centro regulador y se piensa que constituye el principal blanco de interacción del activador. Para averiguar si las mutaciones Q<sub>20</sub>L y H<sub>53</sub>N de la región I de  $\sigma^{54}$  forman parte del centro de regulación se construyeron las variantes de  $\sigma^{54}$  Q<sub>20</sub>C y H<sub>53</sub>C. El grupo sulfidrilo de la cisteína al conjugarse con el reactivo FeBABE le permite a  $\sigma^{54}$  realizar cortes en el ADN que se encuentre próximo. En este sentido, se demostró que únicamente la variante que porta la sustitución E $\sigma^{54}$ <sub>Q20C</sub> cortó el ADN alrededor de la posición -15 (Figura 3, apéndice II). En conjunto, este resultado indicó que a diferencia de la posición 53, el residuo de la posición 20 dentro de la región I de  $\sigma^{54}$  se encuentra próximo al centro de regulación y por ende formando parte del mismo.

Por otra parte, estudios anteriores habían mostrado que la mutante del activador PspF $_{\Delta$ HVH T86S, a diferencia del activador silvestre, era incapaz de formar oligómeros en presencia de ADP-AIFx a menos que  $\sigma^{54}$  estuviera presente. Para investigar si las mutantes de  $\sigma^{54}$  Q<sub>20</sub>L, H<sub>53</sub>N y Q<sub>20</sub>L-H<sub>53</sub>N contribuían a mejorar la capacidad de oligomerización de la mutante PspF $_{\Delta$ HVH T86S, se incubaron en presencia del activador y ADP-AIFx. El resultado reveló que ninguna de las mutantes de  $\sigma^{54}$  mejora la actividad de oligomerización de PspF $_{\Delta$ HVH T86S comparado con la proteína silvestre (Figura 4B, apéndice II). Este resultado sugería que la recuperación en la capacidad de activar la transcripción de NifA T308S por parte de la mutante supresora de  $\sigma^{54}$  es independiente de mejorar esta propiedad en el activador.

### **Las mutantes supresoras de $\sigma^{54}$ mejoran la función de PspF $_{\Delta$ HVH T86S en ensayos de isomerización**

En el siguiente experimento hicimos uso de un ensayo *in vitro* que mide la capacidad del activador de inducir cambios conformacionales en el centro de regulación. En este ensayo el activador mediante el uso de la hidrólisis de ATP promueve la formación de un nuevo complejo binario entre  $\sigma^{54}$  y el ADN, que refleja las transiciones conformacionales que ocurren en  $\sigma^{54}$  durante el evento de isomerización del promotor en vías de formar el complejo abierto. Primeramente, se demostró que a diferencia del activador silvestre, la mutante PspF $_{\Delta$ HVH T86S es deficiente en remodelar el complejo inicial  $\sigma^{54}$ /ADN. En este sentido investigamos si las mutantes supresoras de  $\sigma^{54}$  mejoraban la capacidad del activador PspF $_{\Delta$ HVH T86S de remodelar o alterar el centro de regulación. El resultado mostró que las supresoras de  $\sigma^{54}$ , a diferencia de  $\sigma^{54}$ ,

mejoran ligeramente la actividad de isomerización no solo de la mutante PspF $_{\Delta HVH}$  T86S sino también del activador silvestre (Figura 6, apéndice II). Por otro lado, los ensayos de unión mostraron que las mutantes supresoras de  $\sigma^{54}$  no logran rescatar la interacción con la mutante del activador PspF $_{\Delta HVH}$  T86S en presencia de ADP-AIFx. Esto sugería que el incremento de la actividad lograda en la mutante del activador NifA T308S *in vivo*, no es consecuencia del restablecimiento de la interacción funcional entre el activador y la mutante supresora de  $\sigma^{54}$  (Figura 7A, apéndice II). En conjunto, proponemos que las mutaciones Q<sub>20</sub>L y H<sub>53</sub>N de  $\sigma^{54}$  de alguna manera debilitan la interacción inhibitoria que la región I establece con el promotor para el control de la desnaturalización antes de la activación. Por ende, en condiciones de activación, el evento de isomerización del promotor para la formación del complejo abierto resulta energéticamente más favorable para la mutante del activador PspF $_{\Delta HVH}$  T86S en presencia de las mutantes supresoras de  $\sigma^{54}$ . Esta propiedad intrínseca de las mutantes supresoras de  $\sigma^{54}$ , de facilitar la isomerización del promotor, parece ser las bases moleculares que operan en el rescate de la actividad transcripcional observada *in vivo* con la mutante de NifA T308S.

### **La mutación T86S impide al activador responder a los cambios conformacionales del centro de regulación**

Finalmente, evaluamos la capacidad del activador PspF $_{\Delta HVH}$  y de la mutante PspF $_{\Delta HVH}$  T86S de interaccionar con el centro regulador ( $\sigma^{54}$  unida previamente al promotor) en presencia de ADP-AIFx. Para esto empleamos diferentes pruebas de promotor de *SmnifH* que representan las diferentes estados conformacionales que adopta el promotor durante la formación del complejo abierto (Figura 1A, apéndice II). Interesantemente, el resultado mostró que la mutante de PspF $_{\Delta HVH}$  T86S, a diferencia de la proteína silvestre, es incapaz de interaccionar y formar complejos ternarios (PspF/ADP-AIFx/ $E\sigma^{54}$ -ADN) con  $E\sigma^{54}$  en presencia de las diferentes pruebas de promotor (Tabla I, apéndice II). Ninguna de las mutantes supresoras de  $\sigma^{54}$  fue capaz de restablecer la interacción con el activador PspF $_{\Delta HVH}$  T86S en este ensayo. La región I de  $\sigma^{54}$  forma parte del centro regulador y además constituye el principal blanco de interacción del activador (Chaney *et al.*, 2001). En este sentido, pensamos que la conformación que adopta la región I en cada una de las pruebas de promotor es diferente, de manera que cambios en su estructura o accesibilidad dentro del centro regulador constituye las bases moleculares que impiden a la mutante de PspF $_{\Delta HVH}$  T86S

interaccionar y reconocer a  $E\sigma^{54}$  unida al ADN. Finalmente, este resultado sugiere fuertemente que el motivo GAFTGA del activador está involucrado en censar la interacción que  $\sigma^{54}$  establece con las diferentes estructuras que adopta el promotor durante la formación del complejo abierto. Particularmente, el residuo de treonina dentro del motivo GAFTGA, parece ser el principal determinante que le permite al activador acomodar y dirigir los cambios conformacionales en el centro de regulación.

Basado en estos resultados propusimos que el residuo de treonina dentro del motivo GAFTGA constituye una vía de señalización interna que permite controlar la funcionalidad de la  $E\sigma^{54}$ . Una hipótesis atractiva es que el activador acople la energía de hidrólisis del ATP para producir cambios conformacionales en la ARNP a través de la comunicación o interfase que se establece entre el residuo de treonina del motivo GAFTGA y el centro regulador (T86- $\sigma^{54}$ -promotor).

## **CAPÍTULO 8**

### **Apéndice III**

#### **CONTRIBUCIÓN ORIGINAL**

**Dago, AE.**, Wigneshweraraj, SR., Buck, M., and Morett, E. (2006). A Role for the conserved GAFTGA Motif of AAA<sup>+</sup> Transcriptional Activators in Sensing Promoter DNA Conformation. (*J.Biol.Chem.*Vol.**282**:1087-1097).

## 8.1 Resultados y Discusión (Apéndice III)

### Aislamiento y caracterización *in vivo* de mutantes de $\sigma^{54}$ que restablecen la actividad transcripcional de la mutante del activador NifA T308S

Previas evidencias bioquímicas indicaban que las posiciones de aminoácidos de la 6 a la 14 dentro de la región I de  $\sigma^{54}$  participaban en la interacción con el activador (Bordes., P. *et al.* 2004). Teniendo en cuenta estos antecedentes, en este trabajo exploramos exhaustivamente los residuos que abarcan la posición 2 a la 14 de la región I de  $\sigma^{54}$  para investigar específicamente qué determinantes son capaces de restablecer la función de la mutante del activador NifA T308S *in vivo*.

Para esto, empleamos una estrategia de mutagénesis que permite controlar la tasa de sustitución con el objetivo de obtener preferentemente mutantes sencillas y dobles de  $\sigma^{54}$  sobre aquellas que presentan múltiples substituciones (Gaytán *et al.*, 2002). La librería generada de  $\sigma^{54}$  (72 000 variantes) se transformó en la cepa TH1 de *E.coli*, la cual presenta una remoción del gen que codifica para el factor  $\sigma^{54}$  (*rpoN*) y además contiene los plásmidos pRT22 y pWKS130. El plásmido pRT22 contiene el promotor dependiente de  $\sigma^{54}$  *nifH* de *K.pneumoniae* fusionado al gen *lacZ*, mientras que el plásmido pWKS130 presenta los diferentes alelos de NifA (T308S y T308V) ensayados en este estudio. En este sistema experimental aquellas mutantes de  $\sigma^{54}$  que sean capaces de restaurar o de suprimir la deficiencia en activación de la mutante del activador NifA T308S producirán colonias que exhiben un fenotipo de color azul oscuro (en cajas suplementadas con *Xgal*), a diferencia de la proteína silvestre que muestra un fenotipo azul pálido. El muestreo de la librería nos permitió seleccionar seis clonas de  $\sigma^{54}$  con el fenotipo de supresión deseado. Posteriormente, se realizó un ensayo de actividad transcripcional *in vivo* para evaluar cuantitativamente la habilidad de las mutantes de  $\sigma^{54}$  de mejorar la actividad de la mutante de NifA T308S. El resultado mostró que las mutantes de  $\sigma^{54}$ , a diferencia de la proteína silvestre, presentaron entre seis y veinte veces más actividad con la mutante del activador NifA T308S (Tabla 1, apéndice III). Estos valores representan entre el 10% y el 20% de la actividad silvestre. Por otro lado, ninguna de las mutantes de  $\sigma^{54}$  se vio afectada en su capacidad de activar una fusión *nifH-lacZ* en presencia del activador NifA silvestre.

Una característica en común entre las mutantes supresoras de  $\sigma^{54}$  fue la presencia de aminoácidos hidrofóbicos y voluminosos independientemente de la posición que fue sustituida. Interesantemente, el residuo de glicina no conservado de la

posición 4 fue reemplazado en todas las mutantes, y en tres de las clonas (*rpoN-sup2* y *rpoN-sup4-6*) por residuos hidrofóbicos (Tabla 1, apéndice III). Esto sugería que la sustitución de un residuo estructuralmente flexible, constituía un requisito para rescatar la actividad de la mutante de NifA T308S.

Dado que la clona *rpoN-sup4* de  $\sigma^{54}$  presentó solamente dos cambios de aminoácidos y mostró la segunda mejor actividad en ensayos de actividad  $\beta$  galactosidasa *in vivo*, decidimos segregar y analizar la contribución individual de cada mutación al fenotipo de supresión. Los resultados mostraron que la mutación Q11F afectó la capacidad de  $\sigma^{54}$  de expresar una fusión *nifH-lacZ* en presencia del activador NifA, mientras que la mutante  $\sigma^{54}_{G4L}$  incrementó ligeramente los niveles de actividad con respecto a la proteína silvestre. Interesantemente, los ensayos de actividad transcripcional en presencia de la mutante del activador NifA T308S mostraron que la mutante sencilla de  $\sigma^{54}_{G4L}$  es la principal responsable para rescatar la función *in vivo* de la mutante de NifA T308S. Adicionalmente, el estudio sugirió que en el contexto de la doble mutante de  $\sigma^{54}_{G4L/Q11F}$  la mutación Q11F facilita la interacción entre la región I de  $\sigma^{54}$  y el motivo GAFSGA del activador NifA (Tabla 2, apéndice III). Por otra parte, el uso de una mutante del activador NifA (T308V) afectada igualmente en su capacidad para activar la transcripción y que contiene una sustitución de aminoácido diferente en la misma posición del motivo GAFT(V)GA, nos permitió concluir que las mutantes de  $\sigma^{54}_{G4L}$  y  $\sigma^{54}_{G4L-Q11F}$  suprimen de manera alelo-específica a la mutante del activador NifA T308S (Tabla 2, apéndice III).

#### **La mutante E $\sigma^{54}_{G4L}$ rescata la función de la mutante del activador PspF<sub>1-275</sub> T86S en ensayos de actividad transcripcional *in vitro***

Los estudios *in vivo* mostraron que la mutación G4L en la región I de  $\sigma^{54}$  es suficiente para recuperar específicamente la actividad de la mutante NifA T308S. Para entender las bases moleculares que le confieren a la mutante E $\sigma^{54}_{G4L}$  la capacidad de restablecer la función del activador NifA T308S realizamos una serie de ensayos *in vitro* que reflejan los cambios conformacionales inducidos en E $\sigma^{54}$  por el activador durante los diferentes eventos que conllevan a la formación del complejo abierto.

Para los ensayos *in vitro* utilizamos el dominio central o catalítico del activador PspF de *E.coli* (PspF<sub>1-275</sub>) que contiene la sustitución de treonina por serina en el motivo GAFTGA (equivalente a NifA T308S). Primeramente, para recapitular *in vitro* con el activador PspF<sub>1-275</sub> los cambios en la actividad transcripcional medidos *in vivo*

con NifA, realizamos un ensayo de transcripción de iniciación abortiva (se mide la formación de un producto de ARN de cuatro nucleótidos de longitud) usando como templado una prueba de ADN que mimetiza la conformación del promotor en el complejo cerrado. Interesantemente y acorde con los resultados *in vivo*, se observó que la mutante PspF<sub>1-275</sub> T86S está drásticamente afectada en su capacidad de activar la transcripción en presencia de la E $\sigma^{54}$  silvestre, sin embargo y al menos en el contexto de este ensayo, la mutante E $\sigma^{54}$ <sub>G4L</sub> rescató la función del activador PspF<sub>1-275</sub> T86S incluso a niveles comparables con los del activador silvestre (Figura 2, apéndice III). Resultados similares se obtuvieron en ensayos de transcripción *in vitro* en donde se midió la síntesis total de un transcrito determinado. En general, concluimos que la mutación de G4L en la región I de  $\sigma^{54}$  permite recuperar tanto *in vivo* como *in vitro* la capacidad de activación de una mutante del activador que presenta una sustitución de treonina por serina en el motivo GAFTGA.

**La mutante E $\sigma^{54}$ <sub>G4L</sub> restablece la capacidad del activador PspF<sub>1-275</sub> T86S de interactuar con el complejo de promotor cerrado.**

En resultados anteriores (Ver apéndice II) se demostró que el activador PspF<sub>1-275</sub> unido a ADP-AIFx es capaz de interactuar y formar un complejo ternario (PspF<sub>1-275</sub>-ADP-AIFx:E $\sigma^{54}$ :ADN) con E $\sigma^{54}$  unida al promotor. Este complejo ternario es considerado como un estado intermediario que se genera rumbo a la formación del complejo abierto. La mutación de T86S en el motivo de GAFTGA de PspF<sub>1-275</sub> impide que el activador interactúe y forme un complejo ternario con E $\sigma^{54}$  en el complejo de promotor cerrado (Bordes *et al.*, 2004). En este sentido, investigamos si el complejo de promotor cerrado reconstituido con la mutante E $\sigma^{54}$ <sub>G4L</sub> es capaz de restablecer la capacidad de interacción de la mutante PspF<sub>1-275</sub> T86S. El resultado mostró que la mutante E $\sigma^{54}$ <sub>G4L</sub>, a diferencia de la holoenzima silvestre, restablece la capacidad de la mutante PspF<sub>1-275</sub> T86S de reconocer e interactuar específicamente con el complejo de promotor cerrado (Figura 3A, 3B y 3C apéndice III).

Posteriormente, hicimos uso de un ensayo que mide la capacidad del activador en unión del análogo ADP-AIFx de remodelar o de inducir cambios conformacionales en un complejo inicial  $\sigma^{54}$ -ADN, promoviendo de esta manera la formación de un nuevo complejo ternario. Previamente se había demostrado que la mutante del activador PspF<sub>1-275</sub> T86S es deficiente en remodelar a la proteína  $\sigma^{54}$  silvestre y por ende en la formación de dicho complejo ternario. El objetivo de este ensayo consistió en evaluar la

habilidad de la mutante  $E\sigma^{54}_{G4L}$  de mejorar la actividad de la mutante PspF<sub>1-275</sub> T86S para remodelar a  $\sigma^{54}$ , como un paso intermedio previo a la formación del complejo abierto. El ensayo reveló que la mutante de  $E\sigma^{54}_{G4L}$ , a diferencia de la silvestre, restaura la capacidad de formar el complejo ternario con PspF<sub>1-275</sub> T86S (Figura 3D, apéndice III). Este experimento nos permitió concluir que la mutación G4L no solamente contribuye a mejorar o facilita la interacción entre  $E\sigma^{54}$  y la mutante PspF<sub>1-275</sub> T86S, sino que además permite a este último inducir cambios conformacionales en  $E\sigma^{54}$  dependiente de ADP-AIFx.

Por último, basado en previas evidencias bioquímicas habíamos propuesto que el motivo GAFTGA del activador, específicamente el residuo de treonina constituye una vía de señalización interna que le permite al activador censar los diferentes cambios conformacionales que ocurren en el centro regulador (complejo nucleoproteico formado por la interacción de  $\sigma^{54}$  con la región -12 del promotor) rumbo a la formación del complejo abierto (Bordes *et al.*, 2004). En este sentido, una de las principales contribuciones de este trabajo es el hecho de encontrar que una mutación de glicina por leucina en la región I de  $\sigma^{54}$  (posición 4 en *K.pneumoniae*) permite que el activador PspF<sub>1-275</sub> T86S interaccione con  $E\sigma^{54}$  dentro del complejo cerrado de promotor. En general, nuestros resultados sugieren fuertemente que la región I de  $\sigma^{54}$  está involucrada en reconocer las variaciones conformacionales y estructurales que ocurren en el centro regulador y de transmitir o comunicar esta información al motivo GAFTGA del activador. En este sentido también se ha propuesto que en respuesta al activador, la región I coopera y se comunica funcionalmente con ciertos dominios conservados de la ARNP (subunidad  $\beta$  y  $\beta'$ ) que contribuyen a estabilizar el ADN en estado abierto cerca del sitio de inicio de la transcripción (Wigneshweraraj *et al.*, 2004; 2005; 2006).

#### **La recuperación de la actividad transcripcional del activador PspF<sub>1-275</sub> T86S por $E\sigma^{54}_{G4L}$ es dependiente de la estructura del promotor**

Posteriormente, evaluamos si la apertura del promotor compensa la deficiencia en activación exhibida por el activador PspF<sub>1-275</sub> T86S. Para esto realizamos un ensayo de transcripción abortiva *in vitro* en presencia de una prueba de ADN que mimetiza la conformación que adopta el promotor en el complejo abierto. El resultado mostró que la mutante PspF<sub>1-275</sub> T86S aún es deficiente en estimular el inicio de la transcripción con la  $E\sigma^{54}$ , lo que indicaba que la deficiencia en la activación *per se* de la mutante PspF<sub>1-275</sub> T86S se manifiesta en pasos previos a la formación del complejo abierto.

Interesantemente, la mutante  $E\sigma^{54}_{G4L}$  tampoco rescató la función del activador PspF<sub>1-275</sub> T86S en esta prueba de promotor (Figura 4, apéndice III). En general estos resultados sugieren que la apertura del ADN no logra contrarrestar la deficiencia del activador PspF<sub>1-275</sub> T86S y además que la conformación que adopta el ADN en el complejo de promotor abierto juega un papel importante en la recuperación de la actividad del activador PspF<sub>1-275</sub> T86S por parte de la mutante  $E\sigma^{54}_{G4L}$ , al menos en el contexto de este ensayo.

Para investigar el papel del ADN en la recuperación de la actividad de PspF<sub>1-275</sub> T86S por la mutante  $E\sigma^{54}_{G4L}$ , realizamos ensayos de unión entre el activador y  $\sigma^{54}$  pero en ausencia de ADN. Interesantemente, y a diferencia de los ensayos realizados en presencia de ADN, el resultado mostró que la mutante PspF<sub>1-275</sub> T86S es capaz de interaccionar al igual que el activador silvestre tanto con  $E\sigma^{54}$  como con la mutante supresora  $E\sigma^{54}_{G4L}$  (Figura 5, apéndice III). Dado que la región I de  $\sigma^{54}$  adopta diferente conformación en ausencia o presencia del promotor, es posible que la estructura que adopta la región I en ciertas conformaciones del promotor resulta desfavorable para interaccionar con PspF<sub>1-275</sub> T86S. Claramente, la mutación G4L en la región I de  $\sigma^{54}$  compensa este defecto.

### **La secuencia de ADN ubicada río abajo de la región -12 del promotor impide que el activador PspF<sub>1-275</sub> T86S interaccione con el complejo cerrado**

Previas evidencias habían sugerido que el activador se ubica muy próximo al ADN que se localiza corriente abajo de la región consenso -12 del promotor durante la formación del complejo abierto (Burrows *et al.*, 2004; Cannon *et al.*, 2004). Sin embargo, el papel que juega este segmento de ADN, así como la interacción que establece el activador con dicha región del promotor durante la activación transcripcional aún restaba por entenderse. En este sentido, nuestros resultados mostraban que la mutante PspF<sub>1-275</sub> T86S es deficiente en la interacción con el complejo cerrado de  $E\sigma^{54}$  pero no con  $E\sigma^{54}$  *per se*. Esto nos condujo a investigar si esta región de ADN previene que el activador PspF<sub>1-275</sub> T86S interaccione establemente con el complejo de promotor cerrado. Para evaluar esto se construyeron una serie de pruebas de ADN en donde un único extremo del promotor fue acortado sistemáticamente hasta la región -10 del mismo (Ver Figura 6A, apéndice III). En resumen, el resultado mostró que la región del promotor (localizada corriente abajo de la región -12) que se desnaturaliza para dar lugar al complejo abierto afecta negativamente la interacción

entre la mutante PspF<sub>1-275</sub> T86S y E $\sigma^{54}$ . Acorde con los resultados anteriores la mutante E $\sigma^{54}$ <sub>G4L</sub> rescató la interacción con la variante de PspF<sub>1-275</sub> T86S en el contexto de este ensayo (Figura 6C, apéndice III). En general, nuestros resultados sugieren que esta secuencia de ADN interfiere con la habilidad de las EBPs de interactuar con el complejo de promotor cerrado cuando el motivo GAFTGA resulta comprometido por la mutación de treonina por serina. Basados en nuestras evidencias, propusimos que la mutación G4L en la región de  $\sigma^{54}$  probablemente altera la conformación del centro regulador, lo que permite a la mutante PspF<sub>1-275</sub> T86S interactuar y comunicarse con el complejo cerrado independiente de la presencia de esta secuencia de ADN

El control de la desnaturalización de los promotores dependientes de  $\sigma^{54}$  radica estrictamente en la interacción que establece la región I de  $\sigma^{54}$  con la estructura de horquilla de unión que se crea en la región -12 del promotor dentro del centro regulador. Esta interacción inhibitoria impide que se expongan los determinantes en  $\sigma^{54}$  necesarios para contactar el ADN de cadena sencilla entre las posiciones -10 y -7 del promotor, en un evento que antecede la formación del complejo abierto (Guo *et al.*, 1999). La activación del E $\sigma^{54}$ -complejo cerrado dependiente de la hidrólisis de ATP por parte del activador promueve que se desenmascaren los determinantes de unión a ADN de cadena sencilla en  $\sigma^{54}$  para dar lugar a la formación del complejo abierto. Basados en nuestros resultados, proponemos que durante la activación transcripcional el activador reconoce la configuración que adopta el ADN ubicado corriente abajo de la posición -10 del promotor y acopla la estructura del ADN *per se* a la región I de  $\sigma^{54}$ , o trasmite esta información conformacional a la región I, promoviendo que los determinantes en  $\sigma^{54}$  interactúen con el ADN de cadena sencilla para formar el complejo abierto. En este sentido, aportamos evidencia acerca de un nuevo papel que juega el motivo GAFTGA del activador durante la activación transcripcional, específicamente en reconocer la conformación del promotor.

Para concluir, este trabajo aporta información relevante que permite entender de manera general la complejidad y precisión del mecanismo por el cual la familia de estos activadores estimula el inicio de la transcripción.

**CAPÍTULO 9**  
**Apéndice IV**  
**CONTRIBUCIÓN ORIGINAL**  
**(Resultados No Publicados)**

## 9.1 Resultados y Discusión (Apéndice IV)

### Aislamiento y caracterización *in vivo* de mutantes de $\sigma^{54}$ con fenotipo de activación *bypass*

Las mutantes de  $\sigma^{54}$  que son capaces de activar la transcripción en ausencia del activador son referidas como mutantes *bypass*. Diversos estudios se han enfocado en el aislamiento y caracterización de este tipo de mutantes por la información que pueden aportar acerca del mecanismo de activación de los promotores dependientes de  $\sigma^{54}$ . En este sentido se ha demostrado que la remoción completa de la región I de  $\sigma^{54}$  ( $\Delta\text{RI}\sigma^{54}$ ), así como mutaciones puntuales en este dominio o en la región carboxilo terminal, le confieren a  $\sigma^{54}$  la propiedad de transcribir independientemente de la presencia del activador (Wang *et al.*, 1995; 1997; Syed & Gralla, 1998; Wigneshweraraj *et al.*, 2002). Sin embargo, la actividad *bypass* de estas mutantes ha sido solamente reproducible o medida en ensayos transcripcionales *in vitro*, ya que todas fallan en mostrar dicho fenotipo *in vivo*. El interés de este trabajo consistió en aislar y analizar las propiedades bioquímicas de mutantes de  $\sigma^{54}$  que muestran este fenotipo *in vivo*.

Para la selección de estas mutantes empleamos la librería de la región I de  $\sigma^{54}$  aleatorizada desde la posición 2 a la 14 (Ver apéndice III). De la misma se seleccionaron tres clonas de  $\sigma^{54}$  que, a diferencia de la proteína silvestre, son capaces de activar la expresión de una fusión *SmnifH-lacZ in vivo* en ausencia del plásmido que codifica para el activador *BjNifA* (fenotipo azul en cajas suplementadas con X-gal). El

Mutantes de $\sigma^{54}$	Act. $\beta$ -galactosidasa (U.Miller)														-NifA wt <i>SmnifH-lacZ</i>	+ NifA wt <i>SmnifH-lacZ</i>
	M	K	Q	G	L	Q	L	R	L	S	Q	Q	L	A		
$\sigma^{54}$ silvestre	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	372 +/- 34	24 537 +/- 1500
<i>rpoN-bp 1</i>				F	K		I			Y	V	K		E	912 +/- 80	1580 +/- 53
<i>rpoN-bp 5</i>			F	N	F	A	N	Y	V	K	P	A	C	P	616 +/- 17	660 +/- 20
<i>rpoN-bp 8</i>					Y	H	V		C	P				D	662 +/- 50	844 +/- 48

Tabla I. Medición de la actividad transcripcional *in vivo* de las mutantes de  $\sigma^{54}$  en presencia y ausencia del activador NifA. Los valores reportados de actividad  $\beta$ -galactosidasa constituyen el promedio de al menos dos ensayos realizados de manera independiente y por triplicado. Adicionalmente se muestran los cambios de aminoácidos de cada una de las mutantes de  $\sigma^{54}$ .

ensayo de actividad transcripcional *in vivo* en ausencia del activador NifA mostró que las mutantes de  $\sigma^{54}$  incrementan muy ligeramente (entre dos y tres veces) los niveles de expresión de la fusión *SmnifH-lacZ* comparado con la proteína silvestre (Tabla I). El análisis de secuencia de las clonas de  $\sigma^{54}$  mostró la presencia de múltiples sustituciones de aminoácidos, preferentemente por residuos polares cargados. Interesantemente, la clona *rpoN-bp5* presentó un corrimiento en el marco de lectura en la ventana que comprende los residuos del 2 al 14 de la región I de  $\sigma^{54}$ .

Posteriormente, realizamos un ensayo de actividad transcripcional *in vivo* en presencia del activador *BjNifA* silvestre para discernir si el incremento en la actividad de las mutantes de  $\sigma^{54}$  se debe a un efecto de activación cruzada con algunas de las 12 EBPs endógenas de *E.coli* o aun verdadero fenotipo *bypass* de las mutantes. En este ensayo el activador NifA actúa *in cis* (unido a las UAS en el ADN) garantizando la activación específica de la fusión *SmnifH-lacZ*. Interesantemente, el resultado mostró que las mutantes de  $\sigma^{54}$ , a diferencia de la proteína silvestre, son incapaces de activar una fusión *SmnifH-lacZ* en respuesta al activador. Sin embargo, los niveles de actividad mostrados por las mutantes en este ensayo resultan comparables con los obtenidos en ausencia del activador (Tabla I). En general, este es el primer estudio *in vivo* donde se muestra la habilidad de mutantes de  $\sigma^{54}$  de estimular la formación del complejo abierto, aunque de manera muy ineficiente, sin requerir del activador. Por otra parte, la actividad de estas mutantes de  $\sigma^{54}$ , a diferencia de otras *bypass* caracterizadas con anterioridad, no resulta estimulada o incrementada por el activador, lo que sugiere muy probablemente la ruptura de la interacción funcional entre el activador y  $\sigma^{54}$  al comprometerse o alterarse el segmento de aminoácidos de la región I (2-14) de  $\sigma^{54}$ .

### **Las mutantes de $\sigma^{54}$ resultan deficientes en la formación del complejo de promotor abierto**

Posteriormente, realizamos una serie de experimentos *in vitro* para tratar de entender a nivel molecular las propiedades exhibidas por las mutantes de  $\sigma^{54}$  *in vivo*. Inicialmente, se evaluó la capacidad de las proteínas mutantes de  $\sigma^{54}$  de unirse al core de la ARNP para formar la holoenzima, así como su habilidad para formar el complejo de promotor cerrado. En resumen, ninguna de las mutantes resultó afectada en estos dos ensayos comparada con la proteína silvestre (datos no mostrados). Esto sugiere que la alteración de este segmento de aminoácidos dentro de la región I de  $\sigma^{54}$  no compromete la formación de la holoenzima ni su capacidad de interactuar con el promotor. Una de

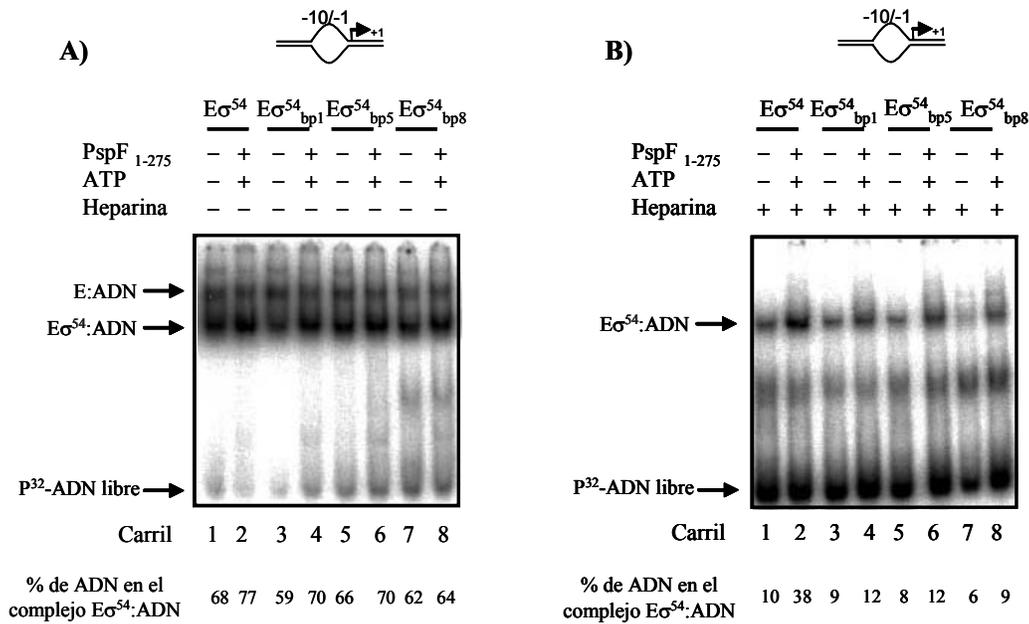


Figura 1. Autorradiografía de geles nativos que muestran la capacidad de  $E\sigma^{54}$  y de las holoenzimas mutantes de reconocer e interactuar con una prueba de ADN (-10/-1) que mimetiza la conformación que adopta el promotor en el complejo abierto en presencia y ausencia del activador PspF<sub>1-275</sub>. A) Reacciones llevadas a cabo en ausencia de heparina. B) Lo mismo que en A, pero en presencia de heparina. La migración de los complejos  $E\sigma^{54}$ :ADN, E:ADN y el ADN libre están indicados con flechas. Los componentes de la reacción en cada una de las líneas se muestran en la parte superior del gel, mientras que el porcentaje del ADN en el complejo binario  $E\sigma^{54}$ :ADN se muestra en la parte de abajo.

las propiedades en común que muestran las mutantes *bypass* de  $\sigma^{54}$  es que se encuentran desreguladas en su capacidad de controlar el inicio de la transcripción. Esto se traduce a nivel molecular en la pérdida de la interacción inhibitoria con la región -12 del promotor, lo cual ayuda a mantener en estricto control la desnaturalización del promotor en condiciones de no activación. Sin embargo, en un ensayo *in vitro* donde se usó una prueba de ADN que mimetiza la conformación del promotor en el estado abierto se demostró que las mutantes *bypass* de  $\sigma^{54}$ , a diferencia de la proteína silvestre, tienen la capacidad de formar complejos de promotor abiertos estables sin requerir del activador. Este ensayo refleja a su vez de manera indirecta los cambios conformacionales que induce el activador en  $E\sigma^{54}$  dependiente de la hidrólisis de ATP para promover la unión estable al ADN de cadena sencilla dentro del complejo abierto. En este sentido queríamos investigar si nuestras mutantes, al igual que otras *bypass* de  $\sigma^{54}$ , tienen la habilidad de formar complejos estables abiertos en ausencia del activador PspF<sub>1-275</sub>. El resultado mostró, como era de esperar, que el complejo abierto formado por la proteína

silvestre ( $E\sigma^{54}$ :ADN) sobrevivió al reto con heparina en presencia del activador no así en su ausencia (Figura 1B comparar carril 1 y 2 ). Sin embargo, e interesadamente las mutantes de  $\sigma^{54}$  ( $E\sigma^{54}_{bp1}$ ,  $E\sigma^{54}_{bp5}$  y  $E\sigma^{54}_{bp8}$ ) fallaron en su capacidad de formar un complejo de promotor abierto estable, aún en presencia del activador y ATP (Figura 1B comparar carriles 2, 4 y 6). En general, este resultado reveló que las mutantes de  $E\sigma^{54}$  carecen de la habilidad de formar complejos abiertos estables y además sugería de manera indirecta que están afectadas para responder positivamente al activador, lo que corrobora los datos *in vivo* con NifA.

### **Las mutantes de $E\sigma^{54}$ son deficientes en interactuar con el activador en presencia de ADP-AIFx**

Posteriormente, y para averiguar si la falla en la capacidad de activar la transcripción *in vivo* por las mutantes de  $E\sigma^{54}$  en respuesta al activador NifA obedece a una pérdida de la interacción funcional entre el activador y las mutantes de  $E\sigma^{54}$ , realizamos un ensayo en presencia del activador PspF<sub>1-275</sub> para medir la unión y formación de un complejo entre ambas proteínas en presencia de ADP-AIFx. El resultado mostró que la mutante  $E\sigma^{54}_{bp1}$ , en contraste con la proteína silvestre, formó el complejo con el activador PspF<sub>1-275</sub> de manera muy ineficiente mientras que las otras dos mutantes ( $E\sigma^{54}_{bp5}$  y  $E\sigma^{54}_{bp8}$ ) son incapaces de formar dicho complejo (Figura 2A, comparar carriles 4, 7 y 10). Resultados idénticos se obtuvieron en presencia del ADN, lo que sugiere que la unión de las mutantes de  $E\sigma^{54}$  con su promotor no compensa este defecto (datos no mostrados). De igual manera, las mutantes se vieron severamente afectadas en ensayos que miden la capacidad del activador de promover cambios conformacionales dentro del complejo cerrado de  $E\sigma^{54}$  necesarios para formar distintos estados intermediarios rumbo a la formación del complejo abierto (datos no mostrados).

Hasta el momento, nuestros resultados sugieren que la modificación de este segmento de aminoácidos (2-14) dentro de la región I de  $\sigma^{54}$  no solamente afecta directa o indirectamente la comunicación o interacción funcional entre  $\sigma^{54}$  y el motivo GAFTGA del activador, sino que además desacopla el proceso de transferencia de la energía de hidrólisis del ATP necesario para promover los cambios conformacionales que conllevan a la formación del complejo abierto.

### **Fenotipo de las mutantes de $E\sigma^{54}$ en ensayos transcripcionales *in vitro* en ausencia del activador**

Finalmente, realizamos un ensayo de actividad transcripcional *in vitro* en ausen-

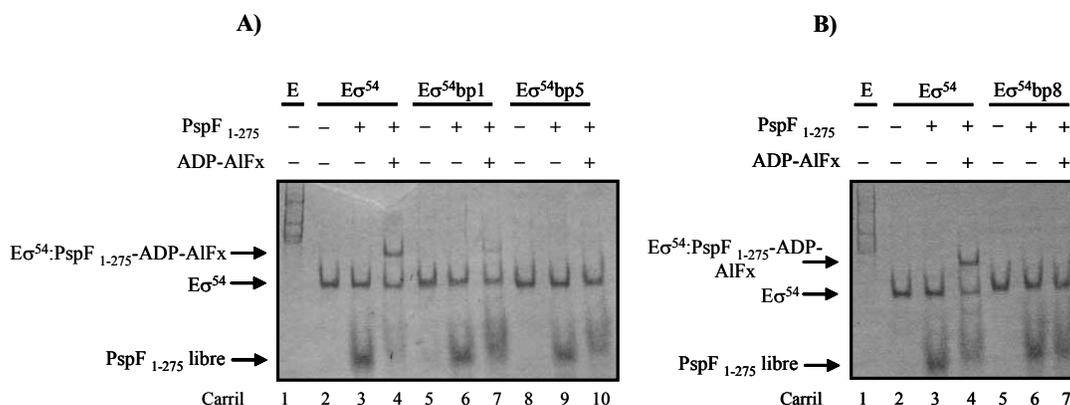


Figura 2 A y B. Geles nativos de proteínas (teñidos con azul brillante de Coomassie) donde se muestra la habilidad de las mutantes de E $\sigma^{54}$  de interactuar y formar un complejo con el activador PspF<sub>1-275</sub> dependiente de ADP-AIFx. Los componentes de la reacción en cada caso se muestran en la parte superior del gel. La posición donde migran los complejos E $\sigma^{54}$  y E $\sigma^{54}$ :PspF<sub>1-275</sub>-ADP-AIFx se encuentran indicados por flechas.

cia del activador PspF<sub>1-275</sub> para recapitular los resultados observados con las mutantes de E $\sigma^{54}$  *in vivo*. El resultado mostró que las mutantes de E $\sigma^{54}$ , a diferencia de la proteína silvestre cuya actividad o señal es indetectable, son capaces de estimular el inicio de la transcripción en ausencia del activador aunque muy ineficiente si se compara con la actividad tan robusta que muestra la mutante *bypass*  $\Delta$ RI $\sigma^{54}$  (Figura 3, comparar carril 2 con carril 3, 4 y 5). Sin embargo, vale la pena recordar que esta última no muestra este fenotipo *in vivo* y curiosamente presenta niveles de actividad comparables con los de la proteína silvestre en presencia del activador y ATP (Figura 3 comparar carriles 6 y 7). En nuestro caso el fenotipo de las mutantes es congruente y correlaciona tanto en los ensayos *in vivo* como *in vitro*, aún cuando la actividad *bypass* representa cerca de un 8% de la actividad total de la proteína silvestre en condiciones de activación.

Experimentos controles descartaron la contaminación con el activador en nuestras preparaciones de proteínas, lo que demuestra que la actividad *bypass* observada es una propiedad intrínseca de las mutantes de E $\sigma^{54}$ . Acorde con esto se han caracterizado mutantes *bypass* de E $\sigma^{54}$  cuyos niveles de actividad *in vitro* representan el 10% de la actividad silvestre, sin embargo, esta actividad se abate por completo cuando las mutantes son ensayadas en presencia de heparina, lo que evidencia la formación de un complejo abierto inestable por estas mutantes (Wang *et al.*, 1995; 1997). Sin embargo, en nuestro caso el ensayo fue realizado en presencia de heparina lo que

refuerza el fenotipo *bypass* de nuestras mutantes de  $E\sigma^{54}$ . En este sentido no sabemos el efecto que cause la ausencia de heparina, pero apostamos por un incremento marcado de la actividad *bypass*.

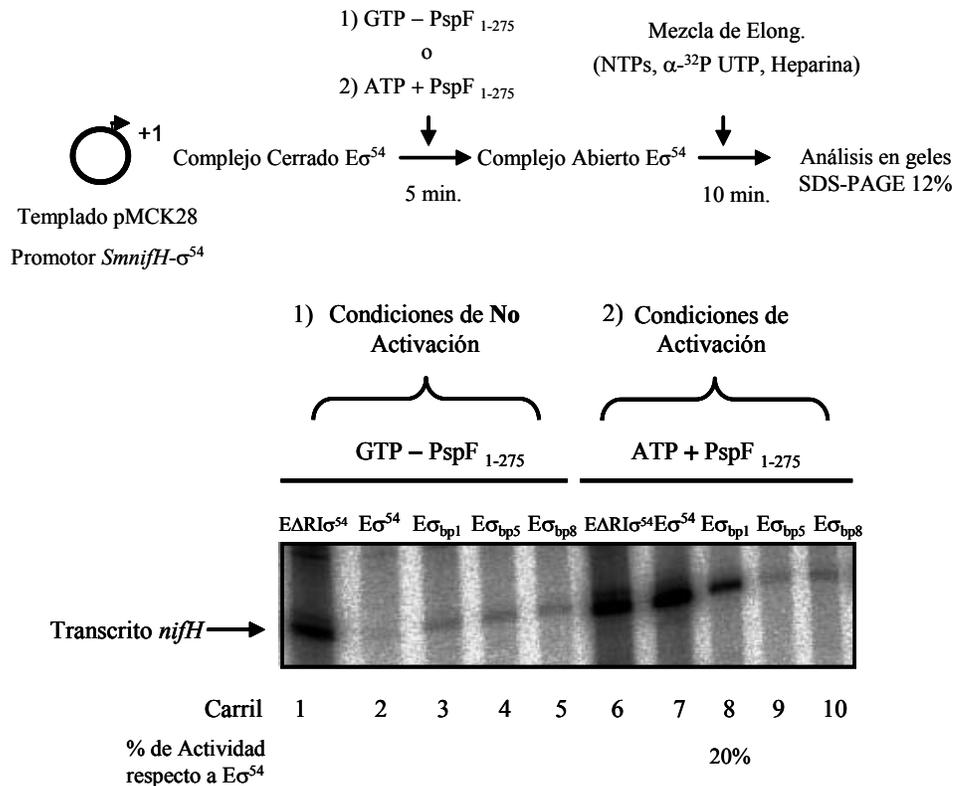


Figura 3. Autoradiografía que muestra la formación del transcrito *nifH* proveniente de las mutantes de  $E\sigma^{54}$  en presencia y ausencia del estímulo del activador. Las mutantes *bypass* de  $\sigma^{54}$  tienen la característica, a diferencia de la proteína silvestre, de formar complejos de promotor abierto estable una vez que hayan adicionado nucleótidos. Por esta razón y para medir la actividad *bypass* se adicionó GTP al inicio de la reacción teniendo en cuenta que los primeros cuatro nucleótidos después del inicio de la transcripción (+1) del promotor *SmnifH* son guaninas. El esquema seguido para la reacción se muestra en el parte superior de la figura.

Por otro lado, el ensayo mostró que, a diferencia de la proteína silvestre, las mutantes  $E\sigma_{bp5}^{54}$  y  $E\sigma_{bp8}^{54}$  no incrementan la producción o síntesis del transcrito cuando son activadas por PspF<sub>1-275</sub>. Interesantemente, y a diferencia de los ensayos *in vivo* con NifA, la mutante  $E\sigma_{bp1}^{54}$  presentó un 20 % de la actividad silvestre cuando resultó estimulada por PspF<sub>1-275</sub> (Figura 3, comparar carril 7 y 8). Estas diferencias pueden deberse a las condiciones inherentes empleadas para cada ensayo. En los ensayos *in vivo* el activador NifA activa la transcripción unido al ADN, mientras que PspF<sub>1-275</sub> activa en solución o *in trans* en los ensayos *in vitro* y usando concentraciones saturantes. En

general, estos resultados están de acuerdo con la deficiencia ( $E\sigma^{54}_{bp1}$ ) o incapacidad ( $E\sigma^{54}_{bp5}$  y  $E\sigma^{54}_{bp8}$ ) que muestran las mutantes de  $E\sigma^{54}$  para interactuar de manera estable con el activador PspF<sub>1-275</sub> en presencia de ADP-AIFx.

Para concluir, basados en nuestros resultados proponemos que la ruptura drástica de este motivo de aminoácidos (2-14) dentro de la región I muy probablemente altera la conformación que adopta  $\sigma^{54}$  dentro del centro regulador promoviendo dos consecuencias importantes. Una es la pérdida de la interacción funcional con el activador y la otra es la capacidad adquirida por las mutantes de  $E\sigma^{54}$  para promover la desnaturalización local del promotor necesaria para la formación del complejo de promotor abierto, que aunque inestable, no requiere de la hidrólisis del ATP por parte del activador. En este sentido, se ha documentado que el complejo abierto formado por otras mutantes *bypass* de  $\sigma^{54}$  es igualmente inestable. Interesantemente, y a diferencia de otras mutantes *bypass* de  $\sigma^{54}$  previamente caracterizadas, nuestras mutantes al igual que la proteína silvestre forman un complejo de promotor cerrado estable sin alterar aparentemente la interacción con la región -12 del promotor. En este sentido, se requieren de futuros experimentos de *footprinting* con permanganato de potasio ( $KMnO_4$ ) para comprobar si en el caso particular de las *bypass* estas ocasionan la desnaturalización local del promotor dentro del complejo cerrado, lo que reforzaría nuestra hipótesis. Finalmente, y como perspectivas futuras en vistas a redondear este trabajo se requeriría de investigar *in vitro* la capacidad de las mutantes *bypass* de  $E\sigma^{54}$  para interactuar y de activar la transcripción en pruebas de ADN (-10/-7, -10/-5, y -10/-3) que mimetizan la estructura de desnaturalización local que sufre el promotor rumbo a la formación del complejo abierto.

## CONCLUSIONES GENERALES

Este trabajo, abordado desde una perspectiva de estudio genético y bioquímico, ha contribuido a entender de manera general el mecanismo de activación transcripcional de los genes regulados por el factor transcripcional  $\sigma^{54}$ .

Primeramente, demostramos que uno de los papeles funcionales de la hidrólisis del ATP durante la activación transcripcional es el de generar un estado funcional en el activador (mimetizado por el ADP-AIFx) que le permite interactuar de manera estable con  $\sigma^{54}$  (apéndice I). Esta interacción, mediada principalmente a través del motivo GAFTGA del activador y la región I de  $\sigma^{54}$ , posibilita la transferencia o acoplamiento de la energía de hidrólisis del ATP requerida para remodelar la conformación inactiva del complejo cerrado y proceder a la formación del complejo abierto. En este sentido, la estructura del activador PspF<sub>1-275</sub> resuelta en presencia de diferentes nucleótidos demostró elegantemente que la unión de ADP-AIFx, a diferencia del ADP, promueve el reposicionamiento del asa que sostiene el motivo GAFTGA en una conformación extendida y favorable para contactar a  $\sigma^{54}$  (Rappas *et al.*, 2005; 2006).

Por otra parte, demostramos que el motivo GAFTGA del activador a través de la interacción que se establece con la región I de  $\sigma^{54}$  le permite al activador reconocer los diferentes cambios conformacionales que ocurren en  $\sigma^{54}$  y en el promotor (centro regulador) durante la transición de complejo de promotor cerrado a abierto (Apéndices II y III). La forma funcional del activador para activar la transcripción es mediante la formación de una estructura hexamérica, y en este sentido no sabemos cuántos motivos GAFTGA participan en la interacción con el centro regulador. Sin embargo, proponemos que más de un motivo GAFTGA del activador está involucrado, a través de múltiples ciclos sucesivos de hidrólisis del ATP, en interactuar y en promover que el centro regulador proceda a través de los diferentes cambios conformacionales que se requieren para formar el complejo abierto.

Por último, y en base a nuestras evidencias proponemos que durante el proceso de activación transcripcional el motivo GAFTGA del activador interactúa y reconoce la conformación del ADN ubicada corriente abajo de la región -12 del promotor, y que comunica esta información o acopla el ADN *per se* a la región I de  $\sigma^{54}$  y muy probablemente a otros determinantes en la ARNP en vistas a promover que  $\sigma^{54}$  interactúe con el ADN de cadena sencilla, evento necesario para la transición de complejo cerrado a abierto. Esta secuencia de ADN se encuentra poco conservada en los

promotores dependientes de  $\sigma^{54}$  pero al parecer determina la funcionalidad de la holoenzima  $E\sigma^{54}$ . Por otro lado, la severa deficiencia de la actividad transcripcional observada *in vivo* e *in vitro* por mutantes del activador que contiene una sustitución de treonina por serina en el motivo GAFTGA, puede deberse a la incapacidad de estas variantes de interaccionar y censar la conformación del ADN. En general, el motivo GAFTGA del activador participa en varias funciones interrelacionadas durante la activación transcripcional, lo que pone de manifiesto el nivel de complejidad que opera en el mecanismo de activación transcripcional de los promotores dependientes de  $\sigma^{54}$ .

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Arthur TM, and Burgess RR. (1998). Localisation of a  $\sigma^{70}$  binding site on the N-terminus of the Escherichia coli RNA polymerase  $\beta'$  subunit. *J Biol Chem*: **273**, 31381-3138.
- Arthur TM, Anthony LC, and Burgess RR. (2000). Mutational analysis of  $\beta'$ 260-309, a  $\sigma^{70}$  binding site located on Escherichia coli core RNA polymerase. *J Biol Chem*: **275**, 23113-23119.
- Austin, S. and Dixon, R. (1992). The prokaryotic enhancer binding protein NTRC has an ATPase activity which is phosphorylation and DNA dependent. *EMBO J*:**11**, 2219-2228.
- Baldwin NE, and Dombroski AJ. (2001). Isolation and characterisation of mutations in region 1.2 of E. coli sigma-70. *Mol Microbiol*: **42**, 427-437.
- Barne KA, Bown JA, Busby SJ, and Minchin SD. (1997). Region 2.5 of the Escherichia coli RNA polymerase  $\sigma^{70}$  subunit is responsible for the recognition of the 'extended-10' motif at promoters. *EMBO J*: **16**, 4034-4040.
- Barrios H, Fischer HM, Hennecke H, and Morett E. (1995). Overlapping promoters for two different RNA Polymerase holoenzymes control Bradyrhizobium japonicum nifA expression. *J Bacteriol*: **177**, 1760-1765.
- Barrios H, Valderrama B, and Morett E. (1999). Compilation and analysis of sigma(54)-dependent promoter sequences. *Nucleic Acids Res*: **27**, 4305-4313.
- Belyaeva TA, Bown JA, Fujita N, Ishihama A, and Busby SJ. (1996). Location of the C-terminal domain of the RNA polymerase alpha subunit in different open complexes at the Escherichia coli galactose operon regulatory region. *Nucleic Acids Res*: **24**, 2242-2251.
- Benoff B, Yang H, Lawson CL, Parkinson G, Liu J, Blatter E, Ebright YW, Berman HM, and Ebright RH. (2002). Structural basis of transcription activation: the CAP-alpha CTD-DNA complex. *Science*: **297**, 1562-1566.
- Bentley SD, Chater KF, Cerdeno-Tarraga AM, Challis GL, Thomson NR, James KD, Harris DE, Quail MA, Kieser H, Harper D, Bateman A, Brown S, Chandra G, Chen CW, Collins M, Cronin A, Fraser A, Goble A, Hidalgo J, Hornsby T, Howarth S, Huang CH, Kieser T, Larke L, Murphy L, Oliver K, O'Neil S, Rabinowitsch E, Rajandream MA, Rutherford K, Rutter S, Seeger K, Saunders D, Sharp S, Squares R, Squares S, Taylor K, Warren T, Wietzorrek A, Woodward J, Barrell BG, Parkhill J, and Hopwood DA. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete Streptomyces coelicolor A3(2). *Nature*: **417**, 141-147.
- Blatter EE, Ross W, Tang H, Gourse RL, and Ebright RH. (1994). Domain organisation of the RNA polymerase  $\alpha$  subunit: C-terminal 85 amino acids constitute a domain capable of dimerisation and DNA binding. *Cell*: **78**, 889-896.
- Bordes, P., Wigneshweraraj, SR., Chaney, M., Dago, AE., Morett, E. and Buck, M. (2004). Communication between E $\sigma^{54}$ , promoter DNA and the conserved threonine residue in the GAFTGA motif of the PspF- $\sigma^{54}$  dependent activator during transcription activation. *Mol. Microbiol*: **54**, 489-506.
- Bordes, P., Wigneshweraraj, SR., Schumacher, J., Zhang, X., Chaney, M. and Buck, M. (2003). The ATP hydrolyzing transcription activator phage shock protein F of Escherichia coli: Identifying a surface that binds  $\sigma^{54}$ . *Proc. Natl. Acad. Sci*: **100**, 2278-2283.
- Borowiec JA, Zhang L, Sasse-Dwight S, and Gralla JD. (1987). DNA supercoiling promotes formation of a bent repression loop in *lac* DNA. *J Mol Biol*: **196**, 101-111.

- Borukhov S, and Nudler E. (2003). RNA polymerase holoenzyme: structure, function and biological implications. *Curr Opin Microbiol*: **6**, 93-100.
- Borukhov S., Lee J., and Goldfarb A. (1991). Mapping of a contact for the RNA 3' terminus in the largest subunit of RNA polymerase. *J Biol Chem*: **266**, 23932-23935.
- Brun YV, and Shapiro L. (1992). A temporally controlled sigma-factor is required for polar morphogenesis and normal cell division in *Caulobacter*. *Genes & Development*: **6**, 2395-2408.
- Buck M, and Cannon W. (1989). Mutations in the RNA polymerase recognition sequence of the *Klebsiella pneumoniae* *nifH* promoter permitting transcriptional activation in the absence of NifA binding to upstream activator sequences. *Nucleic Acids Res*: **17**, 2597-2612.
- Buck M, Gallegos MT, Studholme DJ, Guo Y, and Gralla JD. (2000). The bacterial enhancer-dependent  $\sigma^{54}$  ( $\sigma^N$ ) transcription factor. *J Bacteriol*: **182**, 4129-4136.
- Buck, M., Gallegos, M. T., Studholme, D. J., Guo, Y. and Gralla, J. D. (2000). The bacterial enhancer-dependent  $\sigma^{54}$  transcription factor. *J. Bacteriol*: **182**, 4129-4136.
- Burgess RR, and Anthony L. (2001). How sigma docks to RNA polymerase and what sigma does. *Curr Opin Microbiol*: **4**, 126-131.
- Burgess RR, Travers AA, Dunn JJ, and Bautz EK. (1969). Factor stimulating transcription by RNA polymerase. *Nature*: **221**, 43-46.
- Burrows PC, Severinov K, Ishihama A, Buck M, and Wigneshweraraj SR. (2003). Mapping sigma 54-RNA polymerase interactions at the -24 consensus promoter element. *J Biol Chem*: **278**, 29728-29743.
- Burrows PC, Severinov K, Buck M, and Wigneshweraraj SR. (2004). Reorganisation of an RNA polymerase promoter DNA complex for DNA melting. *EMBO J*: **23**, 4253-4263.
- Busby S, and Ebright RH. (1994). Promoter structure, promoter recognition, and transcription activation in prokaryotes. *Cell*: **79**, 743-746.
- Busby S, and Ebright RH. (1999). Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J Mol Biol*: **293**, 199-213.
- Busby S, Lloyd G, Belyaeva T, Rhodius V, and Savery N. (1998). Bacterial gene regulatory proteins: Organisation and mechanism of action. *Mol Microbiol*: **H103**, 125-139.
- Campbell EA, Korzhova N, Mustaev A, Murakami K, Nair S, Goldfarb A, and Darst SA. (2001). Structural mechanism for Rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell*: **104**, 901-912.
- Campbell EA, Muzzin O, Chlenov M, Sun JL, Olson CA, Weinman O, Trester-Zedlitz ML, Darst SA. (2002). Structure of the bacterial RNA polymerase promoter specificity sigma subunit. *Mol Cell*: **9**, 527-539.
- Cannon W, Austin S, Moore M, and Buck M. (1995). Identification of close contacts between the sigma N (sigma 54) protein and promoter DNA in closed promoter complexes. *Nucleic Acids Res*: **23**, 351-356.
- Cannon W, Bordes P, Wigneshweraraj SR, and Buck M. (2003). Nucleotide-dependent triggering of RNA polymerase-DNA interactions by an AAA regulator of transcription. *J Biol Chem*: **278**, 19815-19825.
- Cannon W, Claverie-Martin F, Austin S, and Buck M. (1993). Core RNA polymerase assists binding of the transcription factor  $\sigma^{54}$  to promoter DNA. *Mol Microbiol*: **8**, 287-298.
- Cannon W, Gallegos MT, Casaz P, and Buck M. (1999). Amino-terminal sequences of sigmaN (sigma54) inhibit RNA polymerase isomerisation. *Genes & Development*: **13**, 357-370.

- Cannon W, Missailidis S, Smith C, Cottier A, Austin S, Moore M, and Buck M. (1995). Core RNA polymerase and promoter DNA interactions of purified domains of sigma N: bipartite functions. *J Mol Biol*: **248**, 781-803.
- Cannon WV, Gallegos MT, and Buck M. (2000). Isomerisation of a binary sigma-promoter DNA complex by enhancer binding transcription activators. *Nat Struct Biol*: **7**, 594-601.
- Cannon, W. and Buck, M. (1992). Central domain of the positive control protein NifA and its role in transcription activation. *J.Mol.Biol.*: **225**, 271-286.
- Cannon, W., Chaney, M. and Buck, M. (1999). Characterization of holoenzyme lacking  $\sigma^N$  Regions I and II. *Nucleic. Acids. Res*: **27**, 2478-2486.
- Cannon, WV., Kreutzer, R., Kent, HM., Morett, E. and Buck, M. (1990). Activation of the *Klebsiella pneumoniae nifU* promoter: identification of multiple and overlapping upstream NifA binding sites. *Nucleic Acids Res*: **18**, 1693-1701.
- Cannon W, Schumacher J, and Buck M. (2004). Nucleotide-dependent interactions between fork-junction RNA polymerase complex and an AAA+ transcriptional activator. *Nucleic Acid Res*: **32**, 4596-4608.
- Casaz P, and Buck M. (1997). Probing the assembly of transcription initiation complexes through changes in sigmaN protease sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*: **94**, 12145-12150.
- Casaz P, and Buck M. (1999). Region I modifies DNA-binding domain conformation of sigma-54 within the holoenzyme. *J Mol Biol*: **285**, 507-514.
- Casaz P, Gallegos MT, and Buck M. (1999). Systematic analysis of  $\sigma_{54}$  N-terminal sequences identifies regions involved in positive and negative regulation of transcription. *J Mol Biol*: **292**, 229-239.
- Cashel M, Hsu LM, and Hernandez VJ. (2003). Changes in conserved region 3 of Escherichia coli sigma 70 reduce abortive transcription and enhance promoter escape. *J Biol Chem*: **278**, 5539-5547.
- Chan CL, Lonetto MA, and Gross CA. (1996). Sigma domains structure: one down, one to go. *Structure*: **4**, 1235-1238.
- Chaney M, and Buck M. (1999). The sigma 54 DNA-binding domain includes a determinant of enhancer responsiveness. *Mol Microbiol*: **33**, 1200-1209.
- Chaney M, Grande R, Wigneshweraraj SR, Cannon W, Casaz P, Gallegos MT, Schumacher J, Jones S, Elderkin S, Dago AE, Morett E, and Buck M. (2001). Binding of transcriptional activators to sigma 54 in the presence of the transition state analog ADP-aluminum fluoride: insights into activator mechanochemical action. *Genes Dev*: **15**, 2282-2294.
- Chaney M, Pitt M, and Buck M. (2000). Sequences within the DNA-crosslinking patch of sigma54 involved in promoter recognition, sigma isomerisation and open complex formation. *J Biol Chem*: **275**, 22104-22113.
- Cheetham G.M., and Steitz T.A. (2000). Insights into transcription: Structure and function of single-subunit DNA-dependent RNA polymerases. *Curr Opin Struct Biol*: **10**, 117-123.
- Chen H, Tang H, and Ebright RH. (2003). Functional interaction between RNA polymerase alpha subunit C-terminal domain and sigma70 in UP-element- and activator-dependent transcription. *Mol Cell*: **11**, 1621-1633.
- Colland F, Rain JC, Gounon P, Labigne A, Legrain P, and De Reuse H. (2001). Identification of the *Helicobacter pylori* anti-sigma28 factor. *Mol Microbiol*: **41**, 477-487.

- Contreras, A., and Drummond M. (1988). The effect on the function of the transcriptional activator NtrC from *Klebsiella pneumoniae* of mutations in the DNA-recognition helix. *Nucleic Acids Res*: **16**, 4025-4039.
- Coppard JR, and Merrick M. (1991). Cassette mutagenesis implicates a helix-turn-helix in promoter recognition by the novel RNA polymerase sigma 54 factor. *Mol Microbiol*: **5**, 1309-1317.
- Cramer P. (2002). Multisubunit RNA polymerases. *Curr Opin Struct Biol*: **12**, 89-97.
- Cramer P, Bushnell DA, and Kornberg RD. (2001). Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8Å resolution. *Science*: **292**, 1863-1876.
- Cramer P, Bushnell DA, Fu J, Gnatt AL, Maier-Davis B, Thompson NE, Burgess RR, Edwards AM, David PR, and Kornberg RD. (2000). Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism. *Science*: **288**, 640-649.
- Darst SA. (2001). Bacterial RNA polymerase. *Curr Opin Struct Biol*: **11**, 155-162.
- Darst SA. (2004). New inhibitors targeting bacterial RNA polymerase. *Trends Biochem Sci*: **29**, 159-160.
- deHaseth PL, and Helmann JD. (1995). Open complex formation by Escherichia coli RNA polymerase: The mechanism of polymerase-induced strand separation of double helical DNA. *Mol Microbiol*: **16**, 817-824.
- Dombroski AJ, Walter WA, and Gross CA. (1993). Amino-terminal amino acids modulate sigma-factor DNA-binding activity. *Genes & Development*: **7**, 2446-2455.
- Dombroski AJ, Walter WA, Record MT Jr, Siegele DA, and Gross CA. (1992). Polypeptides containing highly conserved regions of transcription initiation factor sigma 70 exhibit specificity of binding to promoter DNA. *Cell*: **70**, 501-512.
- Dove SL, Darst SA, and Hochschild A. (2003). Region 4 of sigma as a target for transcription regulation. *Mol Microbiol*: **48**, 863-874.
- Doucleff M, Malak LT, Pelton JG, and Wemmer DE. (2005). The C-terminal RpoN Domain of  $\sigma^{54}$  Forms an unpredicted Helix-Turn-Helix Motif Similar to Domains of  $\sigma^{70}$ . *J Biol Chem*: **280**, 41530-41536.
- Drummond, M., Whitty, P. and Wootton, J. (1986). Sequence and domain relationships of *ntrC* and *nifA* from *Klebsiella pneumoniae*: homologies to other regulatory proteins. *EMBO J*: **5**, 441-447.
- Ebright RH, and Busby S. (1995). The Escherichia coli RNA polymerase  $\alpha$  subunit: Structure and function. *Curr Opin Gen Dev*: **5**, 197-203.
- Ebright RH. (2000). RNA polymerase: Structural similarities between bacterial RNA polymerase and eukaryotic RNA polymerase II. *J Mol Biol*: **304**, 687-698.
- Fenton MS, Lee SJ, and Gralla JD. (2000). Escherichia coli promoter opening and -10 recognition: mutational analysis of sigma-70. *EMBO J*: **19**, 1130-1137.
- Fyfe JA, Carrick CS, and Daures JK. (1995). The *pilE* gene of *Neisseria gonorrhoeae* MS11 is transcribed from a  $\sigma^{70}$  promoter during growth *in vitro*. *J Bacteriol*: **177**, 3781-3787.
- Finn RD, Orlova EV, Gowen B, Buck M, and van Heel M. (2000). Escherichia coli RNA polymerase core and holoenzyme structures. *EMBO J*: **19**, 6833-6844.
- Finn RD, Orlova EV, van Heel M, and Buck M. (2002). Structures of multisubunit DNA-dependent RNA polymerases. *Society General Microbiol*: **61**, 73-104.
- Fujita M. (2000). Temporal and selective association of multiple sigma factors with RNA polymerase during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Genes Cells*: **5**, 79-88.

- Fujita N, Endo S, and Ishihama A. (2000). Structural requirements for the interdomain linker of  $\alpha$  subunit of Escherichia coli RNA polymerase. *Biochemistry*: **39**, 6243-6249.
- Gallegos MT, and Buck M. (2000). Sequences in sigma(54) region I required for binding to early melted DNA and their involvement in sigma-DNA isomerisation. *J Mol Biol*: **297**, 849-859.
- Gallegos MT, and Buck M. (1999). Sequences in sigmaN determining holoenzyme formation and properties. *J Mol Biol*: **288**, 539-553.
- Gallegos MT, Cannon WV, and Buck M. (1999) Functions of the sigma-54 region I in trans and implications for transcription activation. *J Biol Chem*: **274**, 25285-25290.
- Gaytán, P., Osuna, J. and Soberón, X. (2002). Novel ceftazidime resistance  $\beta$  lactamases generated by a codon based mutagenesis method and selection. *Nucleic. Acids. Research*: **30**.
- Gentry D, Xiao H, Burgess R, and Cashel M. (1991). The omega subunit of Escherichia coli K-12 RNA polymerase is not required for stringent RNA control in vivo. *J Bacteriol*: **173**, 3901-3903.
- Ghosh P, Ishihama A, Chatterji D. (2001). Escherichia coli RNA polymerase subunit  $\omega$  and its N-terminal domain bind full-length  $\beta'$  to facilitate incorporation into the  $\alpha\beta$  subassembly. *Euro J Biochem*: **268**, 4621-4627.
- Gilbert W, Gralla JD, Mayors J, and Maxam A. (1975). Lactose operator sequences and the action of the lac repressor. *Proteins-ligand*. 193-210.
- González V, Olvera L, Soberon X. and Morett E. (1998). *In vivo* studies on the positive control function of NifA: a conserved hydrophobic amino acid patch at the central domain involved in transcriptional activation. *Mol.Microbiol*: **28**, 55-67.
- Gourse RL, Ross W, and Gaal T. (2000). Ups and downs in bacterial transcription initiation: the role of the alpha subunit of RNA polymerase in promoter recognition. *Mol Microbiol*: **37**, 687-695.
- Gnatt AL, Cramer P, Fu J, Bushnell DA, Kornberg RD. (2001). Structural basis of transcription: an RNA polymerase II elongation complex at 3.3 Å resolution. *Science*: **292**, 1844-1846.
- Grande RA, Valderrama B, and Morett E. (1999). Suppression analysis of positive control mutants of NifA reveals two overlapping promoters for Klebsiella pneumoniae rpoN. *J Mol Biol*: **294**, 291-298.
- Gregory BD, Nickels BE, Garrity SJ, Severinova E, Minakhin L, Urbauer RJ, Urbauer JL, Heyduk T, Severinov K, and Hochschild A. (2004). A regulator that inhibits transcription by targeting an intersubunit interaction of the RNA polymerase holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*: **101**, 4554-4559.
- Greiner DP, Hughes KA, Gunasekera AH, and Meares CF. (1996). Binding of the sigma 70 protein to the core subunits of Escherichia coli RNA polymerase, studied by iron-EDTA protein footprinting. *Proc Natl Acad Sci U S A*: **93**, 71-75.
- Gross CA, Chan C, Dombroski A, Gruber T, Sharp M, Tupy J, and Young B. (1998). The functional and regulatory roles of sigma factors in transcription. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*: **63**, 141-155.
- Gruber TM, and Gross CA. (2003). Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu Rev Microbiol*: **57**, 441-466.
- Guo Y, and Gralla JD. (1998). Promoter opening via a DNA fork junction binding activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*: **95**, 11655-11660.
- Guo Y, Lew CM, and Gralla JD. (2000). Promoter opening by sigma(54) and sigma(70) RNA polymerases: sigma factor-directed alterations in the mechanism and tightness of control. *Genes & Development*: **14**, 2242-2255.

- Guo Y, Wang L, and Gralla JD. (1999). A fork junction DNA-protein switch that controls promoter melting by the bacterial enhancer-dependent sigma factor. *EMBO J*: **18**, 3736-3745.
- Han YW, Iwasaki H, Miyata T, Mayanagi K, Yamada K, Morikama, K. and Shinagawa H. (2001). A unique beta-hairpin protruding from AAA+ ATPase domain RuvB motor protein is involved in the interaction with RuvA DNA recognition protein for branch migration of Holliday junctions. *J.Biol.Chem*: **276**, 35024-35028.
- Helmann JD, and Chamberlin MJ. (1988). Structure and function of bacterial sigma factors. *Ann Rev Biochem*: **57**, 839-872.
- Helmann JD. (1999). Anti-sigma factors. *Curr Opin. Micro*: **2**, 135-141.
- Heyduk T, Heyduk E, Severinov K, Tang H, and Ebright RH. (1996). Determinants of RNA polymerase alpha subunit for interaction with beta, beta prime and sigma subunits: hydroxyl-radical protein footprinting. *Proc Natl Acad Sci U S A*: **93**, 10162-10166.
- Heyduk T, Lee JC, Ebright YW, Blatter EE, Zhou Y, and Ebright RH. (1993). CAP interacts with RNA polymerase in solution in the absence of promoter DNA. *Nature*: **364**, 548-549.
- Hillel Z, and Wu C. (1978). Photochemical cross-linking studies on the interaction of *Escherichia coli* RNA polymerase with T7 DNA. *Biochemistry*: **17**, 2954-2960.
- Hilton MD, and Whiteley HR. (1985). UV-crosslinking of *Bacillus subtilis* RNA polymerase to DNA in promoter and non-promoter complexes. *J Biol Chem*: **260**, 8121-8127.
- Hinton DM, March-Amegadzie R, Gerber JS, and Sharma M. (1996) Characterisation of pre-transcription complexes made at a bacteriophage T4 middle promoter: Involvement of the T4 MotA activator and the T4 AsiA protein, a sigma 70 binding protein, in the formation of an open complex. *J Mol Biol*: **256**, 235-246.
- Hook-Barnard I, Johnson XB, and Hinton DM. (2006). *Escherichia coli* RNA Polymerase Recognition of a  $\sigma$ 70 Dependent Promoter Requiring a -35 DNA Element and an Extended -10 TGn Motif. *J Bacteriol*: **188**, 8352-8359.
- Hoover TR, Santero E, Porter S, and Kustu S. (1990). The integration host factor stimulates interaction of RNA polymerase with NIFA, the transcriptional activator for nitrogen fixation operons. *Cell*: **63**, 11-22.
- Hsieh M. and Gralla JD. (1994). Analysis of the N-terminal leucine heptad and hexad repeats of  $\sigma^{54}$ . *J.Mol.Biol*: **293**, 15-24.
- Huala E, and Ausubel FM. (1989). The central domain of *Rhizobium meliloti* NifA is sufficient to active transcription from the *R.meliloti nifH* promoter. *J. Bacteriol*: **171**, 3354-3365.
- Huala E, Stigter J, and Ausubel FM. (1992). The central domain of *Rhizobium leguminosarum* DctD functions independently to active transcription. *J. Bacteriol*: **174**, 1428-1431.
- Hutcheson SW, Bretz J, Sussan T, Jin S and Park K. (2001). Enhancer-binding proteins HrpR and HrpS interact to regulate hrp-encoded type III protein secretion in *Pseudomonas syringae* strains. *J Bacteriol*: **183**, 5589-5598.
- Ignarashi K., and Ishihama A. (1991). Bipartite functional map of *E. coli* RNA polymerase  $\alpha$  subunit: involvement of the C-terminal region in transcription activation by cAMP-CRP. *Cell*: **65**, 1015-1022.
- Ilag LL, Westblade LF, Deshayes C, Kolb A, Busby SJ, and Robinson CV. (2004). Mass spectrometry of *Escherichia coli* RNA polymerase: interactions of the core enzyme with sigma70 and Rsd protein. *Structure*: **12**, 269-275.
- Ishihama A. (1981). Subunit of assembly of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Adv Biophys*: **14**, 1-35.

- Ishihama A. (1993). Protein-protein communication within transcription apparatus. *J Bacteriol*: **175**, 2483-2489.
- Ishihama A. (2000). Functional modulation of *E. coli* RNA polymerase. *Annu Rev Microbiol*: **54**, 499-518.
- Ishihama A. (2000). Molecular anatomy of RNA polymerase using protein-conjugated metal probes with nuclease and protease activities. *Chem Commun*: **13**, 1091-1094.
- Jin DJ, and Gross CA. (1988). Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli* *rpoB* gene that lead to rifampicin resistance. *J Mol Biol*: **202**, 45-58.
- Jovanovic G, Weiner L, and Model P. (1996). Identification, nucleotide sequence, and characterization of PspF, the transcriptional activator of the *Escherichia coli* stress-induced *psp* operon. *J Bacteriol*: **178**, 1936-1945.
- Joly N, Schumacher j, and Buck M. (2006). Heterogeneous nucleotide occupancy stimulates functionality of the Phage Shock Protein F, an AAA+ transcriptional activator. *J Biol Chem*: **281**, 34997-35007.
- Juaréz K, Flores H, Davila S, Olvera L, González V, and Morett E. (2000). Reciprocal domain evolution within a transactivator in a restricted sequence space. *Proc Natl Acad Sci USA*: **97**, 3314-3318.
- Katayama A, Fujita N, and Ishihama A. (2000). Mapping of subunit-subunit contact surfaces on the beta' subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J Biol Chem*: **275**, 3583-3592.
- Keener J, and Kustu S. (1988). Protein kinase and phosphoprotein phosphatase activities of nitrogen regulatory proteins NTRB and NTRC of enteric bacteria: roles of the conserved amino-terminal domain of NTRC. *Proc Natl Acad Sci U S A*: **85**, 4976-4980.
- Keseler IM, and Kaiser, D. (1997).  $\sigma^{54}$ , a vital protein for *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: **94**, 1979-1984.
- Korzheva N, and Mustaev A. (2001). Transcription elongation complex: structure and function. *Curr Opin Microbiol*: **4**, 119-125.
- Kramer H, Niemoller M, Amouyal M, Revet B, Wilchen-Bergmann BV, Muller-Hill B. (1987). Lac repressor forms loops with linear DNA carrying two suitably spaced *lac* operators. *EMBO J*: **6**, 1481-1491.
- Kroos L, Zhang B, Ichikawa H, and Yu YT. (1999). Control of sigma activity during *Bacillus subtilis* sporulation. *Mol Microbiol*: **31**, 1285-1294.
- Kulbachinskiy A, Mustaev A, Goldfarb A, and Nikiforov V. (1999). Interaction with free  $\beta'$  subunit unmasks DNA-binding domain of RNA polymerase  $\sigma$  subunit. *FEBS lett*: **454**, 71-74.
- Kullik I, Fritsche S, Knobel H, Sanjuan J, Hennecke H, and Fischer HM. (1991). *Bradyrhizobium japonicum* has two differentially regulated, functional homologs of the sigma 54 gene (*rpoN*). *J Bacteriol*: **173**, 1125-1138.
- Kuznedelov K, Minakhin L, Niedziela-Majka A, Dove SL, Rogulja D, Nickels BE, Hochschild A, Heyduk T, and Severinov K. (2002). A role for interaction of the RNA polymerase flap domain with the sigma subunit in promoter recognition. *Science*: **295**, 855-857.
- Lawson CL, Swigon D, Murakami KS, Darst SA, Berman HM, and Ebright RH. (2004). Catabolite activator protein: DNA binding and transcription activation. *Curr Opin Struct Biol*: **14**, 10-20.
- Lee JH, and Hoover TR. (1995). Protein crosslinks studies suggest that *Rhizobium meliloti* C4-dicarboxylic acid transport protein D, a  $\sigma^{54}$  dependent transcriptional activator, interact with  $\sigma^{54}$  and the  $\beta$  subunit of RNA polymerase. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*: **92**, 9702-9706.

- Lee SY, De La Torre A, Yan D, Kustu S, Nixon BT, and Wemmer DE. (2003). Regulation of the transcriptional activator NtrC1: structural studies of the regulatory and AAA+ ATPase domains. *Genes Dev*: **17**, 2552-2563.
- Li, M., Moyle, H. and Susskind, MM. (1994). Target of the transcriptional activation function of phage lambda cI protein. *Science*: **263**, 75-77.
- Lloyd GS, Niu W, Tebbutt J, Ebright RH, and Busby SJ. (2002). Requirement for two copies of RNA polymerase alpha subunit C-terminal domain for synergistic transcription activation at complex bacterial promoters. *Genes & Development*: **16**, 2557-2565.
- Lonetto M, Gribskov M, and Gross CA. (1992). The sigma-70 family: sequence conservation and evolutionary relationships. *J Bacteriol*: **174**, 3834-3849.
- Lonetto MA, Rhodius V, Lamberg K, Kiley P, Busby S, and Gross C. (1998). Identification of a contact site for different transcription activators in region 4 of the Escherichia coli RNA polymerase sigma-70 subunit. *J Mol Biol*: **284**, 1353-1356.
- Maeda H, Fujita N, and Ishihama A. (2000). Competition among seven Escherichia coli sigma subunits: relative binding affinities to the core RNA polymerase. *Nucleic Acids Res*: **28**, 3497-3503.
- Malhotra A, Severinova E, and Darst SA. (1996). Crystal structure of a sigma-70 fragment from E. coli RNA polymerase. *Cell*: **87**, 127-136.
- Martínez-Antonio A, and Collado-Vides J. (2003). Identifying global regulators in transcriptional regulatory networks in bacteria. *Curr Opin Microbiol*: **6**, 482-489.
- Mekler V, Kortkhonja E, Mukhopadhyay J, Knight J, Revyakin A, Kapanidis AN, Niu W, Ebright YW, Levy R, and Ebright RH. (2002). Structural organization of bacterial RNA polymerase holoenzyme and the RNA polymerase-promoter open complex. *Cell*: **108**, 599-614.
- Merrick M., and Chambers S. (1992). The helix-turn-helix motif of sigma-54 is involved in recognition of the -13 promoter region. *J Bacteriol*: **174**, 7221-7226.
- Merrick M. (1993). In a class of its own - the RNA polymerase sigma factor  $\sigma^{54}$  ( $\sigma^N$ ). *Mol. Microbiol*: **10**, 903-909.
- Miller JH. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Michiels J, Moris M, Dombrecht B, Verreth C, and Vanderleyden J. (1998). Differential Regulation of Rhizobium etli rpoN2 Gene Expression during Symbiosis and Free-Living Growth. *J Bacteriol*: **180**: 3620-3628.
- Minakhin L, Bhagat S, Brunning A, Campbell EA, Darst SA, Ebright RH, and Severinov K. (2001). Bacterial RNA polymerase subunit  $\omega$  and eukaryotic RNA polymerase subunit RPB6 are sequence, structural, and functional homologs and promote RNA polymerase assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*: **98**, 892-897.
- Mittenhuber G. (2002). An inventory of genes encoding RNA polymerase sigma factors in 31 completely sequenced eubacterial genomes. *J Mol Microbiol Biotech*: **4**, 77-91.
- Morett E, and Segovia L. (1993). The sigma-54 bacterial enhancer-binding protein family: mechanism of action and phylogenetic relationship of their functional domains. *J Bacteriol*: **175**, 6067-6074.
- Morett E, Cannon W, and Buck M. (1988). The DNA-binding domain of the transcriptional activator protein NifA resides in its carboxy terminus, recognizes the upstream activator sequences of *nif* promoters and can be separated from the positive control function of NifA. *Nucleic Acids Res*: **6**, 11469-11488.

- Morris L, Cannon W, Claverie-Martin F, Austin S, and Buck M. (1994). DNA distortion and nucleation of local DNA unwinding within sigma-54 (sigma N) holoenzyme closed promoter complexes. *J Biol Chem*: **269**, 11563-11571.
- Mossing MC, and Record MTJr. (1986). Upstream operators enhance repression of the *lac* promoter. *Science*: **233**, 889-892.
- Mukhopadhyay J, Kapanidis AN, Mekler V, Kortkhonjia E, Ebright YW, and Ebright RH. (2001). Translocation of  $\sigma 70$  with RNA polymerase during transcription: Fluorescence Resonance Energy Transfer assay for movement relative to DNA. *Cell*: **106**, 453-463.
- Muller-Hill B. (1998). Some repressors of bacterial transcription. *Curr Opin Microbiol*: **1**, 145-151.
- Murakami K, Kimura M, Owens JT, Meares CF, and Ishihama A. (1997). The two alpha subunits of Escherichia coli RNA polymerase are asymmetrically arranged and contact different halves of the DNA upstream element. *Proc Natl Acad Sci U S A*: **94**, 1709-1714.
- Murakami KS, and Darst SA. (2003). Bacterial RNA polymerases: The Whole story. *Curr Opin Struct Biol*: **13**, 31-39.
- Murakami KS, Masuda S, Campbell EA, Muzzin O, and Darst SA. (2002). Structural basis of transcription initiation: an RNA polymerase holoenzyme-DNA complex. *Science*: **296**, 1285-1290.
- Naryshkina T, Mustaev A, Darst SA, and Severinov K. (2001). The  $\beta'$  subunit of E. coli RNA polymerase is not required for interaction with initiating nucleotide but is necessary for interaction with rifampicin. *J Biol Chem*: **276**, 13308-13318.
- Neuwald AF, Aravind L, Spouge JL, and Koonin EV. (1999). AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res*: **9**, 27-43.
- Niu W, Zhou Y, Dong Q, Ebright YW, and Ebright RH. (1994). Characterization of the activating region of Escherichia coli catabolite gene activator protein (CAP). I. Saturation and alanine-scanning mutagenesis. *J Mol Biol*: **243**, 595-602.
- Oehler S, Eismann ER, Kramer H, and Muller-Hill B. (1990). The three operators of the *lac* operon cooperate in repression. *EMBO J*: **9**, 973-979.
- Ogura T, and Wilkinson AJ. (2001). AAA+ superfamily ATPases: common structure--diverse function. *Genes Cells*: **6**, 575-97.
- Owens JT, Miyake R, Murakami K, Chmura AJ, Fujita N, Ishihama A, and Meares CF. (1998). Mapping the sigma70 subunit contact sites on Escherichia coli RNA polymerase with a sigma70-conjugated chemical protease. *Proc Natl Acad Sci U S A*: **95**, 6021-6026.
- Pallen M. (1999). RpoN-dependent transcription of rpoH? *Mol Microbiol*: **31**, 393.
- Poggio S, Osorio A, Dreyfus G and Camarena L. (2004). The four different sigma (54) factors of *Rhodobacter sphaeroides* are not functional interchangeable. *Mol Microbiol*: **46**, 75-85.
- Poggio S, Osorio A, Dreyfus G and Camarena L. (2005). The flagellar hierarchy of *Rhodobacter sphaeroides* is controlled by the concerted action of two enhancer-binding proteins. *Mol Microbiol*: **58**, 969-983.
- Poggio S, Osorio A, Dreyfus G and Camarena L. (2006). Transcriptional Specificity of RpoN1 and RpoN2 Involves Differential Recognition of the Promoter Sequences and Specific Interaction with the Cognate Activator Proteins. *J Biol Chem*: **281**, 27205-27215.
- Popham DL, Szeto D, Keener J, and Kustu S. (1989). Function of a bacterial activator protein that binds to transcriptional enhancers. *Science*: **243**, 629-635.

- Powell BS, Court DL, Inada T, Nakamura Y, Michotey V, Cui X, Reizer A, Saier MH Jr, and Reizer J. (1995). Novel proteins of the phosphotransferase system encoded within the *rpoN* operon of *Escherichia coli*. Enzyme IIANtr affects growth on organic nitrogen and the conditional lethality of an *erats* mutant. *J Biol Chem*: **270**, 4822-4839.
- Ptashne M, and Gann A. (1997). Transcriptional activation by recruitment. *Nature*: **386**, 569-577.
- Raibaud O, and Schwartz M. (1984). Positive control of transcription initiation in bacteria. *Ann Rev Gen*: **18**, 173-206.
- Rappas M, Schumacher J, Beuron F, Niwa H, Bordes P, Wigneshweraraj SR, Keetch CA, Robinson CV, Buck M, and Zhang X. (2005). Structural Insights into the Activity of Enhancer-Binding Proteins. *Science*: **307**, 1972-1975.
- Rappas M, Schumacher J, Niwa H, Buck M, and Zhang X. (2006). Structural basis of the Nucleotide driven conformational changes in the AAA+ domain of transcription activator PspF. *J Mol Biol*: **357**, 481-492.
- Reitzer L, and Schneider BL. (2001). Metabolic context and possible physiological themes of sigma(54)-dependent genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev*: **65**, 422-444.
- Reznihoff WS, Winter RB, and Hurley CK. (1974). The location of the repressor binding sites in the *lac* operon. *Proc Natl Acad Sci USA*: **71**, 2314-2318.
- Rhodium VA, and Busby SJ. (1998). Positive activation of gene expression. *Curr Opin Microbiol*: **1**, 152-159.
- Rippe K, Guthold M, von Hippel PH, and Bustamante C. (1997). Transcriptional activation via DNA-looping: visualization of intermediates in the activation pathway of *E. coli* RNA polymerase  $\times$  sigma 54 holoenzyme by scanning force microscopy. *J Mol Biol*: **270**, 125-138.
- Rojo F. (1999). Repression of transcription initiation in bacteria. *J Bacteriol*: **181**, 2987-2991.
- Rojo F. (2001). Mechanisms of transcriptional repression. *Curr Opin Microbiol*: **4**, 145-151.
- Rombel I, Peters-Wendisch P, Mesecar A, Thorgeirsson, T, Shin YK, and Kustu S. (1999). MgATP binding and hydrolysis determinants of NtrC, a bacterial enhancer-binding protein. *J Bacteriol*: **181**, 4628-38.
- Ronson CW, Nixon BT, Albright LM, and Ausubel FM. (1987). *Rhizobium meliloti* *ntrA* (*rpoN*) gene is required for diverse metabolic functions. *J Bacteriol*: **169**, 2424-2431.
- Ross W, Gosink KK, Salomon J, Igarashi K, Zou C, Ishihama A, Severinov K, and Gourse RL. (1993). A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the  $\alpha$  subunit of RNA polymerase. *Science*: **262**, 1407-1413.
- Rouiller I, DeLaBarre B, May AP, Weis WI, Brunger AT, Milligan RA, and Wilson-Kubalek. (2002). Conformational changes of the multifunction p97 AAA ATPase during its ATPase cycle. *Nat.Struct.Biol*: **9**, 950-957.
- Sanderson A, Mitchell JE, Minchin SD, and Busby SJ. (2003). Substitutions in the *Escherichia coli* RNA polymerase sigma70 factor that affect recognition of extended -10 elements at promoters. *FEBS Lett*: **544**, 199-205.
- Sasse-Dwight S, and Gralla JD. (1990). Role of eukaryotic-type functional domains found in prokaryotic enhancer receptor factor sigma-54. *Cell*: **62**, 945-954.
- Severinov K, Kashlev M, Severinova E, Bass I, McWilliams K, Kutter E, Nikiforov V, Snyder L, and Goldfarb A. (1994). A non-essential domain of *E. coli* RNA polymerase required for the action of the termination factor Alc. *J Biol Chem*: **269**, 14254-14259.

- Severinov K, Mustaev A, Kukarin A, Muzzin O, Bass I, Darst SA, and Goldfarb A. (1996). Structural modules of the large subunits of RNA polymerase. Introducing archaebacterial and chloroplast split sites in the beta and beta' subunits of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J Biol Chem*: **271**, 27969-27974.
- Severinov K. (2000). RNA polymerase structure-function: insights into points of transcriptional regulation. *Curr Opin Microbiol*: **3**, 118-125.
- Severinova E, Severinov K, and Darst SA. (1998). Inhibition of *Escherichia coli* RNA polymerase by bacteriophage T4 AsiA. *J Mol Biol*: **279**, 9-18.
- Sharp MM, Chan CL, Lu CZ, Marr MT, Nechaev S, Merritt EW, Severinov K, Roberts JW, and Gross CA. (1999). The interface of sigma with core RNA polymerase is extensive, conserved and functionally specialised. *Genes & Development*: **13**, 3015-3026.
- Shatters RG, Somerville JE, and Kahn ML. (1989). Regulation of glutamine synthetase II activity in *Rhizobium meliloti* 104A14. *J Bacteriol*: **171**, 5087-5094.
- Siegele DA, Hu JC, Walter WA, and Gross CA. (1989). Altered promoter recognition by mutant form of the  $\sigma^{70}$  subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J Mol Biol*: **206**, 591-603.
- Simeonov MF, Bieber Urbauer RJ, Gilmore JM, Adelman K, Brody EN, Niedziela-Majka A, Minakhin L, Heyduk T, and Urbauer JL. (2003). Characterization of the interactions between the bacteriophage T4 AsiA protein and RNA polymerase. *Biochemistry*: **42**, 7717-7726.
- Smith AH, Blevins JS, Bachlani GN, Yang XF and Norgard MV. (2006). Evidence that RpoS ( $\sigma^S$ ) in *Borrelia burgdorferi* is controlled directly by rpoN ( $\sigma^{54}/\sigma^N$ ). accepted in *J Bacteriol*.
- Sorenson MK, Ray SS, and Darst S. (2004). Crystal Structure of the Flagellar  $\sigma$ /Anti- $\sigma$  Complex  $\sigma^{28}$ /FlgM Reveals an Intact  $\sigma$  factor in an Inactive Conformation. *Mol Cell*: **14**, 127-138.
- Southern E, and Merrick M. (2000). The role of region II in the RNA polymerase sigma factor sigma(N) (sigma(54)). *Nucleic Acids Res*: **28**, 2563-2570.
- Studholme DJ, and Buck M. (2000). The biology of enhancer-dependent transcriptional regulation in bacteria: Insights from genome sequences. *FEMS Microbiol Lett*: **186**, 1-9.
- Studholme DJ, and Dixon R. (2003). Domain Architectures of  $\sigma^{54}$ -Dependent Transcriptional Activators. *J.Bacteriol*: **185**, 1757-1767.
- Su W, Porter S, Kustu S, and Echols H. (1990). DNA P-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.
- Svergun DI, Malfois M, Koch MH, Wigneshweraraj SR, and Buck M. (2000). Low resolution structure of the sigma54 transcription factor revealed by X-ray solution scattering. *J Biol Chem*: **275**, 4210-4214.
- Syed A, and Gralla JD. (1998). Identification of an N-terminal region of sigma-54 required for enhancer responsiveness. *J Bacteriol*: **180**, 5619-5625.
- Tang H, Severinov K, Goldfarb A, and Ebricht RH. (1995). Rapid RNA polymerase genetics: one-day, no-column preparation of reconstituted recombinant *Escherichia coli* RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: **92**, 4902-4906.
- Taylor M, Butler R, Chambers S, Casimiro M, Badii F, and Merrick M. (1996). The RpoN-box motif of the RNA polymerase sigma factor  $\sigma_N$  plays a role in promoter recognition. *Mol Microbiol*: **22**, 1045-1054.

- Tintut Y, and Gralla JD. (1995). PCR mutagenesis identifies a polymerase-binding sequence of sigma 54 that includes a sigma 70 homology region. *J Bacteriol*: **177**, 5818-25
- Tomsic M, Tsujikawa L, Panaghie G, Wang Y, Azok J, and deHaseth PL. (2001). Different roles for basic and aromatic amino acids in conserved region 2 of E. coli  $\sigma$ 70 in the nucleation and maintenance of the single-stranded DNA bubble in open RNA polymerase-promoter complexes. *J Biol Chem*: **276**, 31891-31896.
- Travaglia SL, Datwyler SA, and Meares CF. (1999) a. Mapping protein-protein interactions with a library of tethered cutting reagents: the binding site of sigma 70 on Escherichia coli RNA polymerase. *Biochemistry*: **38**, 4259-4265.
- Travaglia SL, Datwyler SA, Yan D, Ishihama A, and Meares CF. (1999) b. Targeted protein footprinting: where different transcription factors bind to RNA polymerase. *Biochemistry*: **38**, 15774-15778.
- Urbauer JL, Adelman K, Urbauer RJ, Simeonov MF, Gilmore JM, Zolkiewski M, and Brody EN. (2001). Conserved regions 4.1 and 4.2 of  $\sigma$ 70 constitute the recognition sites for the anti- $\sigma$  factor AsiA, and AsiA is a dimer free in solution. *J Biol Chem*: **276**, 41128-41132.
- Vassilyev DG, Sekine S, Laptenko O, Lee J, Vassilyeva MN, Borukhov S, and Yokoyama S. (2002). Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 Å resolution. *Nature*: **417**, 712-719.
- Wang JT, and Gralla JD. (1998). Multiple in vitro roles for the -12 region elements of sigma-54 promoters. *J Bacteriol*: **180**, 5626-5631.
- Wang JT, and Gralla JD. (2001). Roles of the C-terminal region of sigma 54 in transcriptional silencing and DNA-binding. *J Biol Chem*: **276**, 8979-8986.
- Wang JT, Syed A, and Gralla JD. (1997). Multiple pathways to bypass the enhancer requirement of sigma 54 RNA polymerase: roles for DNA and protein determinants. *Proc Natl Acad Sci U S A*: **94**, 9538-9543.
- Wang JT, Syed A, Hsieh M, and Gralla JD. (1995). Converting Escherichia coli RNA polymerase into an enhancer-responsive enzyme: role of an NH<sub>2</sub>-terminal leucine patch in sigma 54. *Science*: **270**, 992-994.
- Wang L, Guo Y, and Gralla JD. (1999). Regulation of sigma 54-dependent transcription by core promoter sequences: role of -12 region nucleotides. *J Bacteriol*: **181**, 7558-7565.
- Wang YK, Lee JH, Brewer JM, and Hoover TR. (1997). A conserved region in the sigma54-dependent activator DctD is involved in both binding to RNA polymerase and coupling ATP hydrolysis to activation. *Mol Microbiol*: **26**, 373-386.
- Wedel A, and Kustu S. (1995). The bacterial enhancer-binding protein NTRC is a molecular machine: ATP hydrolysis is coupled to transcriptional activation. *Genes & Development*: **9**, 2042-2052.
- Weiss, DS., Batut, J., Klose, KE., Keener, J. and Kustu, S. (1991). The phosphorylated form of the enhancer binding protein NtrC has an ATPase activity that is essential for activation of transcription. *Cell*. **67**:155-167
- Westblade LF, Ilag LL, Powell AK, Kolb A, Robinson CV, and Busby SJ. (2004). Studies of the Escherichia coli Rsd-sigma70 complex. *J Mol Biol*: **335**, 685-692.
- Wigneshweraraj SR, Burrows PC, Nechaev S, Zenkin N, Severinov K, and Buck M. (2004). Regulated communication between the upstream face of RNA polymerase and the beta' subunit jaw domain. *EMBO J*: **23**, 4264-4274.
- Wigneshweraraj SR, Burrows PC, Severinov K, and Buck M. (2005). Stable DNA opening within open promoter complexes is mediated by the RNA polymerase beta' jaw domain. *J Biol Chem*: **280**, 36176-36184.
- Wigneshweraraj SR, Casaz P, and Buck M. (2002). Correlating protein footprinting with mutational analysis in the bacterial transcription factor sigma54 (sigmaN). *Nucleic Acids Res*: **30**, 1016-1028.

- Wigneshweraraj SR, Fujita N, Ishihama A, and Buck M. (2000). Conservation of sigma-core RNA polymerase proximity relationships between the enhancer independent and enhancer dependent sigma classes. *EMBO J*: **19**, 3038-3048.
- Wigneshweraraj SR, Ishihama A, and Buck M. (2001). In vitro roles of invariant helix-turn-helix motif residue R383 in sigma(54)(sigma(N)). *Nucleic Acids Res*: **29**, 1163-1174.
- Wigneshweraraj SR, Nechaev S, Severinov K, and Buck M. (2002). Beta subunit residues 186-433 and 436-445 are commonly used by Esigma54 and Esigma70 RNA polymerase for open promoter complex formation. *J Mol Biol*: **319**, 1067-1083.
- Wigneshweraraj SR, Savalia D, Severinov K, Buck M. (2006). Interplay between the beta' clamp and the beta' jaw domain during DNA opening by the bacterial RNA polymerase at sigma 54-dependent promoters. *J Mol Biol*: **359**, 1182-1195.
- Wilson C, and Dombroski AJ. (1997). Region I of sigma-70 is required for efficient isomerisation and initiation of transcription by E. coli RNA polymerase. *J Mol Biol*: **267**, 60-74.
- Wittinghofer A. (1997). Signaling mechanistic: Aluminum fluoride for molecule of the year. *Curr.Biol*: **7**, R682-R685
- Wong C, Tintut Y, and Gralla JD. (1994). The domain structure of sigma 54 as determined by analysis of a set of deletion mutants. *J Mol Biol*: **236**, 81-90.
- Wong C, and Gralla JD. (1992). A role for the acidic trimer repeat region of transcription factor  $\sigma^{54}$  in setting the rate and temperature dependence of promoter melting in vivo. *J.Biol.Chem*: **267**, 24762-24768
- Wyman C, Rombel I, North AK, Bustamante C, and Kustu S. (1997). Unusual oligomerisation required for activity of NtrC, a bacterial enhancer-binding protein. *Science*: **275**, 1658-1661.
- Yasuno K, Yamazaki T, Tanaka Y, Kodama TS, Matsugami A, Katahira M, Ishihama A, and Kyogoku Y. (2001). Interaction of the C-terminal domain of the E. coli RNA polymerase  $\alpha$  subunit with the UP element: Recognising the backbone structure in the minor groove surface. *J Mol Biol*: **306**, 213-225.
- Young BA, Anthony LC, Gruber TM, Arthur TM, Heyduk E, Lu CZ, Sharp MM, Heyduk T, Burgess RR, and Gross CA. (2001). A coiled-coil from the RNA polymerase  $\beta'$  subunit allosterically induces selective non-template strand binding by  $\sigma^{70}$ . *Cell*: **105**, 935-944.
- Zakharova N, Bass I, Arsenieva E, Nikiforov V, and Severinov K. (1998). Mutations in and monoclonal antibody binding to evolutionary hypervariable region of E. coli RNA polymerase  $\beta'$  subunit inhibit transcript cleavage and transcript elongation. *J Biol Chem*: **273**, 24912-24920.
- Zalenskaya K, Lee J, Gujuluva CN, Shin YK, Slutsky M, and Goldfarb A. (1990). Recombinant RNA polymerase: inducible overexpression, purification and assembly of Escherichia coli rpo gene products. *Gene*: **89**, 7-12.
- Zhang G, and Darst SA. (1998). Structure of the Escherichia coli RNA polymerase alpha subunit amino-terminal domain. *Science*: **281**, 262-266.
- Zhang G, Campbell EA, Minakhin L, Richter C, Severinov K, and Darst SA. (1999). Crystal structure of Thermus aquaticus core RNA polymerase at 3.3Å resolution. *Cell*: **98**, 811-824.
- Zhang X, Chaney M, Wigneshweraraj SR, Schumacher J, Bordes P, Cannon W, and Buck M. (2002). Mechanochemical ATPases and transcriptional activation. *Mol Microbiol*: **45**, 895-903.
- Zhang, X., Shaw, A., Bates, PA., Newman, RH., Gowen, B., Orlova, E., Gorman, MA., Kondo, H., Dokurno, P. and Lally, J. (2000). Structure of the AAA ATPase p97. *Mol.Cell*: **6**:1473-1484.

Zhou Y, Zhang X, and Ebright RH. (1993). Identification of the activating region of catabolite gene activator protein (CAP): isolation and characterization of mutants of CAP specifically defective in transcription activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*: **90**, 6081-6085.

Zuber P, Healy J, Luke Carter H, Cutting S, Moran CPJr, Losick R. (1989). Mutations changing the specificity of an RNA polymerase sigma factor. *J Mol Biol*: **206**, 605-614.