

ÍNDICE DE MATERIAS

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1.- CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS MIXOBACTERIAS	2
I.2.- RESPUESTA A LA LUZ EN MIXOBACTERIAS	6
I.2.1. Carotenoides	6
I.2.2. Biosíntesis de carotenoides en <i>M. xanthus</i>	8
I.2.3. Genética molecular de la carotenogénesis en <i>M. xanthus</i>	12
I.2.3.1. Genes reguladores	13
I.2.3.2. Genes estructurales	19
I.2.3.3. Modelo de regulación	22
I.3.- FACTORES SIGMA Y FACTORES ANTI-SIGMA EN BACTERIAS	24
I.3.1. Factores sigma en bacterias	24
I.3.1.1. La subfamilia ECF	27
I.3.2. Factores anti-sigma	32
I.3.3. Factores anti-anti-sigma	35
I.4.- OBJETIVOS	38
II. MATERIALES Y MÉTODOS	39
II.1.- ESTIRPES, BACTERIÓFAGOS Y PLÁSMIDOS	40
II.1.1. Estirpes de <i>M. xanthus</i>	40
II.1.2. Estirpes de <i>E. coli</i>	43
II.1.3. Estirpes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	44
II.1.4. Bacteriófagos	44
II.1.5. Plásmidos	45
II.2.- MEDIOS DE CRECIMIENTO Y TAMPONES	52
II.2.1. Medio rico para <i>M. xanthus</i>	52
II.2.2. Medios de fructificación para <i>M. xanthus</i>	52
II.2.3. Medios ricos para <i>E. coli</i>	53
II.2.4. Medios para <i>S. cerevisiae</i>	54

II.2.5. Tampones y reactivos	56
II.3.- CONDICIONES DE CULTIVO	58
II.4.- INDUCCIÓN DEL DESARROLLO MULTICELULAR DE <i>M. xanthus</i>	58
II.5.- MANIPULACIÓN DE DNA	59
II.5.1. Aislamiento de DNA	59
II.5.2. Tratamiento enzimático del DNA	59
II.5.3. Amplificación de DNA por PCR	60
II.5.4. Electroforesis en gel de agarosa	64
II.5.5. Secuenciación automática de DNA	64
II.5.6. Tratamiento informático de secuencias	65
II.6.- TRANSFERENCIA DE DNA	66
II.6.1. Transferencia de DNA a <i>M. xanthus</i>	66
II.6.1.1. Obtención de lisados del mixofago Mx4LA27	66
II.6.1.2. Transducción generalizada con Mx4LA27	66
II.6.1.3. Electroporación	67
II.6.2. Transferencia de DNA a <i>E. coli</i>	67
II.6.3. Transferencia de DNA a <i>S. cerevisiae</i>	68
II.7.- PROCEDIMIENTOS DE MUTAGÉNESIS	68
II.7.1. Por inserción del transposón Tn5- <i>lac</i>	68
II.7.2. Mutagénesis dirigida	68
II.7.3. Construcción de estirpes de <i>M. xanthus</i> portadoras de una delección	69
II.8.- EXPRESIÓN DE β -GALACTOSIDASA	72
II.8.1. Expresión de β -galactosidasa en <i>M. xanthus</i>	72
II.8.2. Expresión de β -galactosidasa en <i>E. coli</i>	73
II.8.3. Expresión de β -galactosidasa en <i>S. cerevisiae</i>	73
II.9.- ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA Y SDS	74
II.10.- EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA CarF	75
II.10.1. Purificación de CarF en condiciones desnaturalizantes	76
II.10.2. Purificación de CarF en condiciones nativas	76

II.11.- AISLAMIENTO DE MEMBRANAS	77
II.11.1. De extractos celulares de <i>E. coli</i>	77
II.11.2. De extractos celulares de <i>M. xanthus</i>	79
II.12.- OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES CONTRA LA PROTEÍNA CarF	81
II.12.1. Inmunización del conejo	81
II.12.2. Extracción de muestras	81
II.13.- DETECCIÓN DE PROTEÍNAS CON ANTICUERPOS ESPECÍFICOS	82
II.13.1. Transferencia de proteínas a membranas	82
II.13.2. Revelado de la membrana por inmunodetección	82
II.14.- LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE PROTEÍNAS	83
 III. RESULTADOS	 84
III.1.- OBTENCIÓN DE UN NUEVO MUTANTE Car ⁻	85
III.1.1. Análisis de ligamiento del locus Ω MR950	86
III.1.2. Efecto de <i>carF1</i> en el crecimiento celular y el desarrollo de <i>M. xanthus</i>	86
III.1.3. Interacciones epistáticas de <i>carF1</i> con otras mutaciones <i>car</i>	87
III.2.- CLONACIÓN Y ANÁLISIS DEL GEN <i>carF</i>	89
III.2.1. Clonación del gen <i>carF</i>	89
III.2.2. Obtención y análisis de la secuencia de nucleótidos de <i>carF</i> ..	94
III.2.3. Deleción en fase del gen <i>carF</i>	103
III.2.3.1. Efecto de la mutación <i>carF2</i> en la expresión de otros genes <i>car</i>	109
III.3.- EXPRESIÓN DEL GEN <i>carF</i>	111
III.3.1. Análisis de la expresión del gen <i>carF</i>	111
III.3.2. Regiones promotoras y terminadoras de la transcripción del gen <i>carF</i>	113
III.4.- RELACIÓN ESTRUCTURA-FUNCIÓN EN LA PROTEÍNA CarF	120

III.4.1. Generación de distintas versiones truncadas de CarF120
III.4.2. Mutagénesis dirigida de varios residuos His de la proteína CarF124
III.4.3. Ensayos de complementación de la mutación <i>carF2</i> con genes <i>Kua</i> de otros organismos127
III.4.3.1. Genes <i>Kua</i> de <i>Homo sapiens</i> , <i>Drosophila melanogaster</i> y <i>Arabidopsis thaliana</i>127
III.4.3.2. Ensayos de complementación con algunas variantes de las proteínas <i>Kua</i>130
III.4.3.3. Ensayos de complementación con la proteína híbrida DmKua-Ftail bajo el control de un promotor de expresión fuerte.	134
III.5.- OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES CONTRA CarF134
III.5.1. Expresión y purificación de la proteína CarF136
III.5.1.1. Clonación de <i>carF</i> en el vector de expresión pET15b	..136
III.5.1.2. Clonación en el vector de expresión pET11b139
III.5.2. Detección de CarF con anticuerpos policlonaes140
III.6.- INTERACCIÓN DE CarF CON OTRAS PROTEÍNAS REGULADORAS DE LA CAROTENOGENÉISIS144
III.6.1. Ensayos de interacción mediante sistemas del doble híbrido	144
III.6.1.1. Sistema del doble híbrido de levadura basado en hSos	144
III.6.1.2. Sistema del doble híbrido de levadura basado en LexA	150
III.6.1.3. Sistema del doble híbrido de <i>E. coli</i> (BACTH)152
III.6.2. Efecto de CarQ en la interacción entre las proteínas CarF y CarR159
III.6.3. Mutagénesis dirigida del residuo Tyr219 de CarR165
III.7.- LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA PROTEÍNA CarF	...170
III.7.1. Detección de CarF por fraccionamiento celular170
III.7.1.1. Extractos celulares de <i>M. xanthus</i>170
III.7.1.2. Extractos celulares de <i>E. coli</i> BL21171
III.7.2. Estudio topológico de la proteína CarF173

III.7.3. Uso de fusiones de <i>carF</i> o <i>carR</i> al gen de la Proteína Verde Fluorescente	177
III.7.3.1. Fusión al extremo C-terminal de EGFP	177
III.7.3.2. Fusión al extremo N-terminal de EGFP	182
IV. DISCUSIÓN	183
IV.1.- UN NUEVO GEN (<i>carF</i>) IMPLICADO EN LA RESPUESTA CAROTENOGÉNICA DE <i>M. xanthus</i> A LA LUZ AZUL	184
IV.2.- EL GEN <i>carF</i>	186
IV.3.- LA PROTEÍNA CarF	188
IV.4.- MODELO DE ACCIÓN DE CarF	197
V. CONCLUSIONES	202
VI. BIBLIOGRAFÍA	205

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1.1.	3
Figura 1.2.	5
Figura 1.3.a	10
Figura 1.3.b	11
Figura 1.4.	12
Figura 1.5.	17
Figura 1.6.	23
Figura 1.7.	26
Figura 1.8.	29
Figura 1.9.a	31
Figura 1.9.b	31
Figura 1.10.	36
Figura 1.11.	37
Figura 1.12.	37
Figura 2.1.	70
Figura 2.2.	71
Figura 2.3.	78
Figura 2.4.	80
Figura 3.1.	90
Figura 3.2.	92
Figura 3.3.	93
Figura 3.4.	95
Figura 3.5.	96
Figura 3.6.	98
Figura 3.7.	100
Figura 3.8.	102
Figura 3.9.	104
Figura 3.10.	105

Figura 3.11.	106
Figura 3.12.	108
Figura 3.13.	112
Figura 3.14.	114
Figura 3.15.	118
Figura 3.16.	119
Figura 3.17.	123
Figura 3.18.	125
Figura 3.19.	128
Figura 3.20.	130
Figura 3.21.	132
Figura 3.22.	133
Figura 3.23.	135
Figura 3.24.	138
Figura 3.25.	141
Figura 3.26.	143
Figura 3.27.	145
Figura 3.28.	149
Figura 3.29.	151
Figura 3.30.	153
Figura 3.31.	156
Figura 3.32.	158
Figura 3.33.	161
Figura 3.34.	162
Figura 3.35.	164
Figura 3.36.	168
Figura 3.37.	169
Figura 3.38.	172
Figura 3.39.	174
Figura 3.40.	176
Figura 3.41.	178
Figura 3.42.	180

Figura 4.1.	191
Figura 4.2.	194
Figura 4.3.	195
Figura 4.4.	196
Figura 4.5.	201
Tabla 1.1.	33
Tabla 2.1.	41
Tabla 2.2.	44
Tabla 2.3.	45
Tabla 2.4.	61
Tabla 3.1.	86
Tabla 3.2.	88
Tabla 3.3.	99
Tabla 3.4.	110
Tabla 3.5.	116
Tabla 3.6.	122
Tabla 3.7.	126
Tabla 3.8.	129
Tabla 3.9.	148
Tabla 3.10.	154
Tabla 3.11.	175

I.4. OBJETIVOS

Como se describe en el primer apartado de Resultados, tras una mutagénesis al azar con el transposón Tn5-*lac*, se identificó un mutante de *M. xanthus* que mostraba fenotipo Car⁻. El análisis genético de este mutante, realizado también como parte de este trabajo, demostraba que la mutación correspondiente implicaba a un nuevo gen, que hemos denominado *carF*. Otros objetivos de este trabajo se centraron, pues, en los siguientes aspectos:

- 1- Estudio de las relaciones epistáticas entre *carF* y otros genes *car*, para localizar el punto de acción del producto de *carF* en la cascada carotenogénica de *M. xanthus*.
- 2- Análisis del posible efecto de la mutación *carF* en otros procesos celulares de *M. xanthus*, tales como el crecimiento y el desarrollo, así como en la expresión de otros genes *car* conocidos.
- 3- Clonación del locus *carF*. Obtención y análisis de su secuencia de nucleótidos, así como la de las regiones génicas colindantes. Predicción de la secuencia de aminoácidos del producto de *carF*.
- 4- Obtención de un mutante de *M. xanthus* con una delección limpia en el gen *carF*.
- 5- Análisis de la expresión de *carF* en distintas condiciones de cultivo y fases de crecimiento, así como en presencia de otras mutaciones *car*. Localización del promotor y de posibles regiones reguladoras de la transcripción en el gen *carF*.
- 6- Análisis funcional de la proteína CarF mediante la búsqueda de posibles homólogos, el estudio de interacción de CarF con otras proteínas implicadas en la carotenogénesis y la determinación de dominios y residuos imprescindibles para su correcta actividad.
- 7- Localización subcelular de la proteína CarF en células de *M. xanthus*.

I-Introducción

I.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS MIXOBACTERIAS

Las mixobacterias constituyen un grupo de bacterias Gram-negativas, deslizantes, no fotosintéticas, ampliamente distribuidas en la naturaleza. Su hábitat natural es el suelo, aunque también pueden encontrarse sobre material vegetal en descomposición o excrementos de herbívoros (Dawid, 2000). Aunque se ha descrito una especie anaeróbica, la mayoría de las mixobacterias son organismos quimioorganotrofos estrictamente aerobios, capaces de degradar macromoléculas extracelularmente (McCurdy, 1974; Sanford *et al.*, 2002). Normalmente se alimentan depredando otros microorganismos mediante la liberación de una amplia variedad de antibióticos y enzimas hidrolíticas, y suelen utilizar el componente proteico como fuente de nitrógeno, carbono y energía. La especie *Myxococcus xanthus*, objeto de este trabajo, puede cultivarse en el laboratorio sobre caseína purificada, sobre hidrolizados parciales de la misma o sobre una mezcla apropiada de aminoácidos (Dworkin, 1963; Dawid, 2000). Entre otras revisiones sobre *M. xanthus* y otras mixobacterias se encuentran las de Dworkin y Kaiser (1993), Dworkin (1996), Dawid (2000) y Kaiser (2004).

Las mixobacterias fueron descritas y clasificadas taxonómicamente por Roland Thaxter (1892). Forman el Orden *Myxococcales*, que engloba a 12 géneros y aproximadamente 40 especies. Este Orden se divide según sus características morfológicas y fisiológicas en tres grupos. Al Suborden *Sorangineae* pertenecen las bacterias cuyas células vegetativas son cortas, de extremos redondeados y cuya forma cambia muy poco cuando se convierten en mixosporas. Son bacteriolíticas y degradadoras de celulosa. Al Suborden *Cystobacterineae*, más numeroso, pertenecen las bacterias no degradadoras de celulosa cuyas células vegetativas son alargadas y su forma cambia considerablemente al convertirse en mixosporas (Reichenbach y Hofle, 1993). Este segundo grupo incluye a la bacteria *M. xanthus*, la especie más estudiada. La especie *Nannocystis exedens* sería la única representante de un tercer grupo que ha evolucionado independientemente. Las mixobacterias pertenecen a la división δ de las Proteobacterias, que incluye otros grupos de bacterias: bacterias reductoras de azufre, como *Desulfovibrio*, y los bdellovibrios (Oyaizu y Woese,

1985; Shimkets y Woese, 1992; Spröer *et al.*, 1999). En la Figura 1.1 se muestra el árbol filogenético de las mixobacterias y su relación con otros grupos bacterianos.

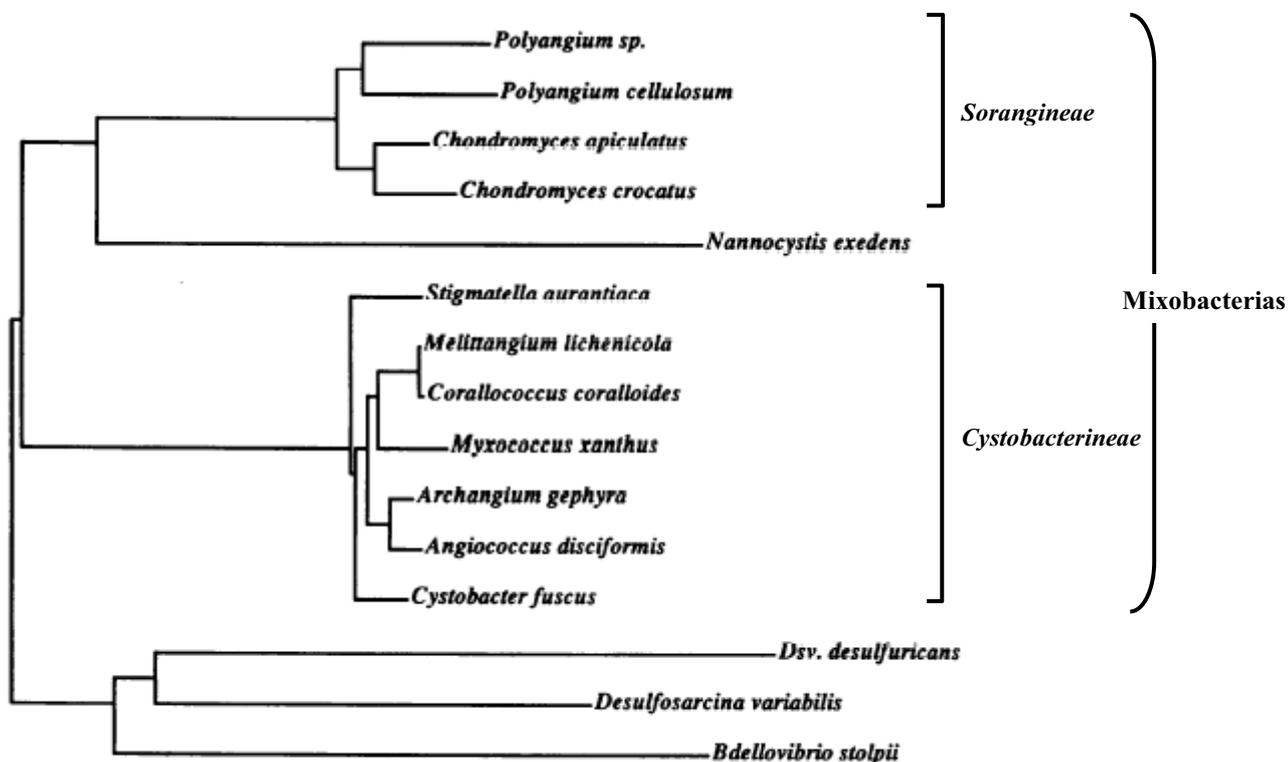


Figura 1.1. Árbol filogenético de las mixobacterias basado en el RNA ribosómico 16S (tomado de Shimkets y Woese, 1992). *Dsv.*=*Desulfovibrio*.

Los tamaños de algunos genomas de mixobacterias han sido analizados y han resultado ser de los más grandes conocidos entre los procariotas. Así, el tamaño del genoma de *M. xanthus* se ha estimado en 9450 kb. Un genoma tan grande no es común en la subdivisión δ de las proteobacterias, puesto que el tamaño del género *Bdellovibrio* varía de 1950 a 2550 kb (Seidler *et al.*, 1972; Torrella *et al.*, 1978) y el del género *Desulfovibrio* varía de 1630 a 1720 kb (Postgate *et al.*, 1984). El contenido medio en G + C del DNA de mixobacterias es cercano al 70%. En los genes de *M. xanthus*, alrededor de un 90% de los codones contienen G o C en la tercera posición. Esta desviación de la frecuencia de G o C en la tercera posición del

codón permite identificar con cierta facilidad la fase de lectura correcta de una secuencia de DNA (Shimkets, 1993). El genoma de *M. xanthus* ha sido secuenciado casi en su totalidad (92-95%) por Cereon Genomics y Monsanto (Goldman *et al.*, 2001). Actualmente, el proceso de secuenciación y anotación, en el que está participando TIGR y varios grupos de investigación, se encuentra en su fase final (véase banco de datos de T.I.G.R. <http://www.tigr.org/tdb/mdb/mdbinprogress.html>).

Las mixobacterias han atraído la atención de numerosos investigadores debido a algunas características poco usuales entre los procariotas, como son su organización social (que implica mecanismos de comunicación intercelular), su capacidad de desplazarse por deslizamiento sobre una superficie sólida, y su complejo ciclo de vida. Éste consta de una fase vegetativa, cuando en el medio hay abundancia de nutrientes, y otra de desarrollo multicelular, cuando las condiciones ambientales no son favorables (Kaiser y Kroos, 1993).

Incluso durante el crecimiento vegetativo, las mixobacterias presentan comportamiento social y se desplazan coordinadamente formando unas agrupaciones denominadas «enjambres». Estos enjambres pueden englobar a miles de células, las cuales se alimentan cooperativamente de otros microorganismos. Cuando los nutrientes del medio se agotan, las mixobacterias inician un ciclo de desarrollo multicelular, único entre los procariotas. Para que éste se lleve a cabo es necesario, además, que las mixobacterias se encuentren sobre una superficie sólida, para poder desplazarse por deslizamiento, y a una elevada densidad celular, para que se produzca de una forma efectiva la transmisión de señales entre las células. Cuando se cumplen estas condiciones, las bacterias comienzan a moverse hacia centros de agregación donde se acumulan y originan unos agregados multicelulares denominados «cuerpos fructíferos», cuyo diámetro oscila entre 100 μm y 500 μm . En el interior de estos, las células vegetativas sufren un proceso de diferenciación que las lleva a convertirse en células metabólicamente quiescentes y resistentes a determinados factores ambientales. Estas formas de resistencia se denominan «mixosporas» y soportan desecación, elevadas temperaturas, sonicación, etc. Las mixosporas se mantienen en el interior de los cuerpos fructíferos hasta que vuelve a

haber nutrientes en el medio. En estas condiciones germinan e inician un nuevo ciclo vegetativo (Figura 1.2).

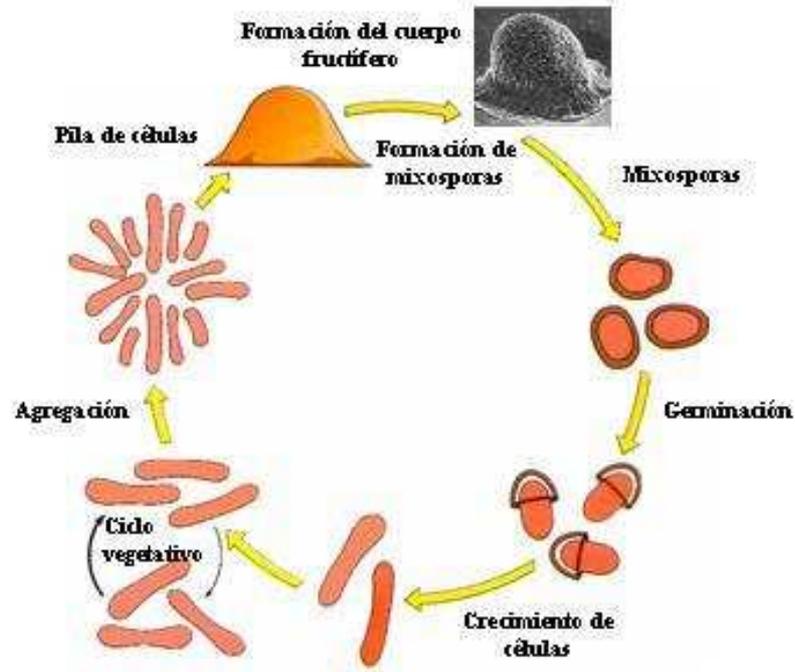


Figura 1.2. Ciclo de desarrollo de *M. xanthus*.

Las mixobacterias se desplazan sobre una superficie sólida por deslizamiento. En el mecanismo responsable de este tipo de movimiento no participan flagelos ni estructuras similares. El análisis genético de *M. xanthus* ha revelado que posee dos sistemas de movilidad: A o «aventurero» y S o «social» (Hodgkin y Kaiser, 1979). El sistema A es responsable del movimiento de las células individuales y su mecanismo depende de la secreción de mucílago a través de unas estructuras semejantes a válvulas presentes en ambos polos de la célula (Wolgemuth *et al.*, 2002). El sistema S gobierna el movimiento de grupos de células, requiere contacto entre ellas y depende de la retracción de pili (tipo IV) también presentes en los polos celulares (Li *et al.*, 2003). Los sistemas de movilidad A y S de las mixobacterias parecen ser genéticamente independientes.

El comportamiento social de las mixobacterias implica una cooperación celular que reporta beneficios al conjunto. En la fase vegetativa del ciclo, el movimiento coordinado les permite alimentarse como un enjambre de células, asegurando una concentración alta de las enzimas hidrolíticas que las células excretan al medio. En la fase de desarrollo multicelular, la asociación de miles de células en los cuerpos fructíferos asegura que, una vez recuperadas las condiciones favorables, el nuevo ciclo vegetativo se inicie con un número de individuos suficiente para garantizar la supervivencia del grupo.

I.2. RESPUESTA A LA LUZ EN MIXOBACTERIAS

I.2.1. Carotenoides

Los carotenoides constituyen uno de los grupos de pigmentos más extendidos en la naturaleza. Están presentes en todos los organismos fotosintéticos, donde actúan como pigmentos accesorios de la fotosíntesis. Son responsables de la mayoría de los colores, del amarillo claro al rojo oscuro, de flores y frutos. También son producidos por ciertos hongos y bacterias no fotosintéticas (entre las que se incluye *M. xanthus*), acumulándose directamente en la membrana o asociándose a proteínas de membrana. Asimismo, pueden encontrarse en distintos grupos de animales que, aunque no los sintetizan, acumulan y transforman los que incorporan en la dieta (Goodwin, 1980; Britton, 1983; Deruère *et al.*, 1994).

Tanto en organismos fotosintéticos como no fotosintéticos, los carotenoides actúan como agentes protectores contra los efectos nocivos de la radiación luminosa. Cuando la luz incide sobre ciertos compuestos fotoactivables, como son las porfirinas, pasan a un estado excitado en el que pueden causar daños a componentes celulares, bien por oxidación directa, bien por reacción con el oxígeno, originándose especies moleculares de alta energía y gran poder oxidante (como el oxígeno singlete). Los carotenoides evitan el daño celular neutralizando al oxígeno singlete (Di Mascio *et al.*, 1989) o directamente a la molécula excitada (Dirks *et al.*, 1980; Cogdell, 1988).

La estructura básica de los carotenoides está constituida por un esqueleto hidrocarbonado de 40 átomos de carbono, cuya estructura está a menudo modificada por deshidrogenaciones, ciclaciones y adición de diversos grupos funcionales. El estado de isomerización y el número de dobles enlaces conjugados de la estructura básica determinan las propiedades de absorción de cada carotenoide. Los compuestos que contienen al menos siete dobles enlaces conjugados absorben la luz visible. Los resultados de las investigaciones sobre estructura, propiedades, aplicaciones, regulación y biosíntesis de carotenoides son objeto de revisiones frecuentes (Britton, 1991; Armstrong, 1994; Sandmann, 1994; Armstrong y Hearst, 1996; Armstrong, 1997; Sieiro *et al.*, 2003; El-Agamey *et al.*, 2004).

En el hábitat natural de las mixobacterias las células quedan fácilmente expuestas a la luz y la presencia de agentes fotoprotectores puede ser importante para su supervivencia. En *M. xanthus* los carotenoides actúan como pigmentos protectores, evitando la lisis celular inducida por la luz. Cuando se iluminan cultivos incubados en la oscuridad se observa lisis de los mismos, mientras que si son incubados en condiciones constantes de iluminación, la cantidad de carotenoides sintetizados es suficiente para prevenir la fotólisis. Algunas pruebas indirectas han llevado a proponer que la protoporfirina IX actúa como molécula fotosensibilizadora en ambos procesos, fotólisis y fotoinducción de carotenoides (Burchard y Dworkin, 1966; Burchard y Hendricks, 1969).

La coloración de las colonias y los cuerpos fructíferos de las mixobacterias se debe en gran parte a la presencia de pigmentos carotenoides (Burchard y Dworkin, 1966). Los carotenoides de distintas especies de mixobacterias se han purificado y caracterizado química y físicamente, demostrándose que estos organismos contienen mezclas de diferentes carotenoides, aunque la mayoría de ellos se encuentra en cantidades mínimas (Kleinig y Reichenbach, 1969; Kleinig *et al.*, 1970; Reichenbach y Kleinig, 1971 y 1972; Takaichi *et al.*, 1995). Las especies del género *Myxococcus* acumulan carotenoides monocíclicos, a menudo glicosilados y esterificados, y en general con un alto grado de desaturación. *M. xanthus* acumula mayoritariamente un éster glicosilado de mixobacton, grandes cantidades de fitoeno y cantidades menores de fitoflueno y otros (Martínez-Laborda *et al.*, 1990). Sin embargo, las mixobacterias

acumulan también otro tipo de pigmentos. *M. xanthus* sintetiza un pigmento hidrosoluble no carotenoide (P₃₇₉) responsable del color amarillo de las colonias o cultivos incubados en la oscuridad (Burchard y Dworkin, 1966; Burchard *et al.*, 1977).

I.2.2. Biosíntesis de carotenoides en *M. xanthus*

Los primeros pasos de la ruta de síntesis de carotenoides en *M. xanthus* son similares a los de otros organismos carotenogénicos. El precursor común es una molécula de cinco átomos de carbono, el isopentenil pirofosfato (IPP). La condensación de éste con un isómero suyo, el dimetil alil pirofosfato (DMAPP) da lugar al geranyl pirofosfato (GPP), de 10 átomos de carbono. La condensación sucesiva de GPP con dos moléculas de IPP origina, en primer lugar, farnesil pirofosfato (FPP) y, finalmente, geranyl geranyl pirofosfato (GGPP), de 20 átomos de carbono. La condensación de dos moléculas de GGPP da lugar al fitoeno, de 40 átomos de carbono, que es el primer caroteno no coloreado de la ruta (Hodgson y Murillo, 1993).

Se han propuesto dos rutas para la síntesis de carotenoides en *Myxococcus*. Ambas están basadas en la identificación de intermediarios, el uso de inhibidores específicos y la incorporación de precursores radioactivos. Kleinig (1975) propuso una ruta de síntesis para *M. fulvus* (véase Figura 1.3a) en la que los dos carotenoides mayoritarios acumulados por esta especie se originan a partir de neurosporeno. Según la naturaleza de la reacción siguiente (hidratación o deshidrogenación), una rama de la ruta conduce al éster de mixobacton (hidratación, deshidrogenación, ciclación) y la otra al 4-ceto-toruleno (deshidrogenación y ciclación).

La ruta de síntesis propuesta para otra especie de *Myxococcus* (MY-18) que acumula éster de mixobacton aparece en la Figura 1.3b (Takaichi *et al.*, 1995). En ella no existe bifurcación a partir de neurosporeno, sino que los compuestos finales se producen mediante una secuencia lineal en la que el fitoeno sufre la serie de deshidrogenaciones Porter-Lincoln hasta convertirse en licopeno. Éste sufre la

ciclación de uno de sus extremos antes de ser hidratado, deshidrogenado y glicosilado.

Se conocen distintos mutantes en *M. xanthus* afectados en la síntesis de carotenoides (Martínez-Laborda *et al.*, 1986; Ruiz-Vázquez *et al.*, 1993). Los precursores acumulados por estos mutantes podrían explicarse por cualquiera de las dos rutas mencionadas. No obstante, teniendo en cuenta la ausencia de 4-ceto-toruleno en *M. xanthus* y la simplicidad de la ruta propuesta para MY-18, en adelante haremos referencia sólo a esta última.

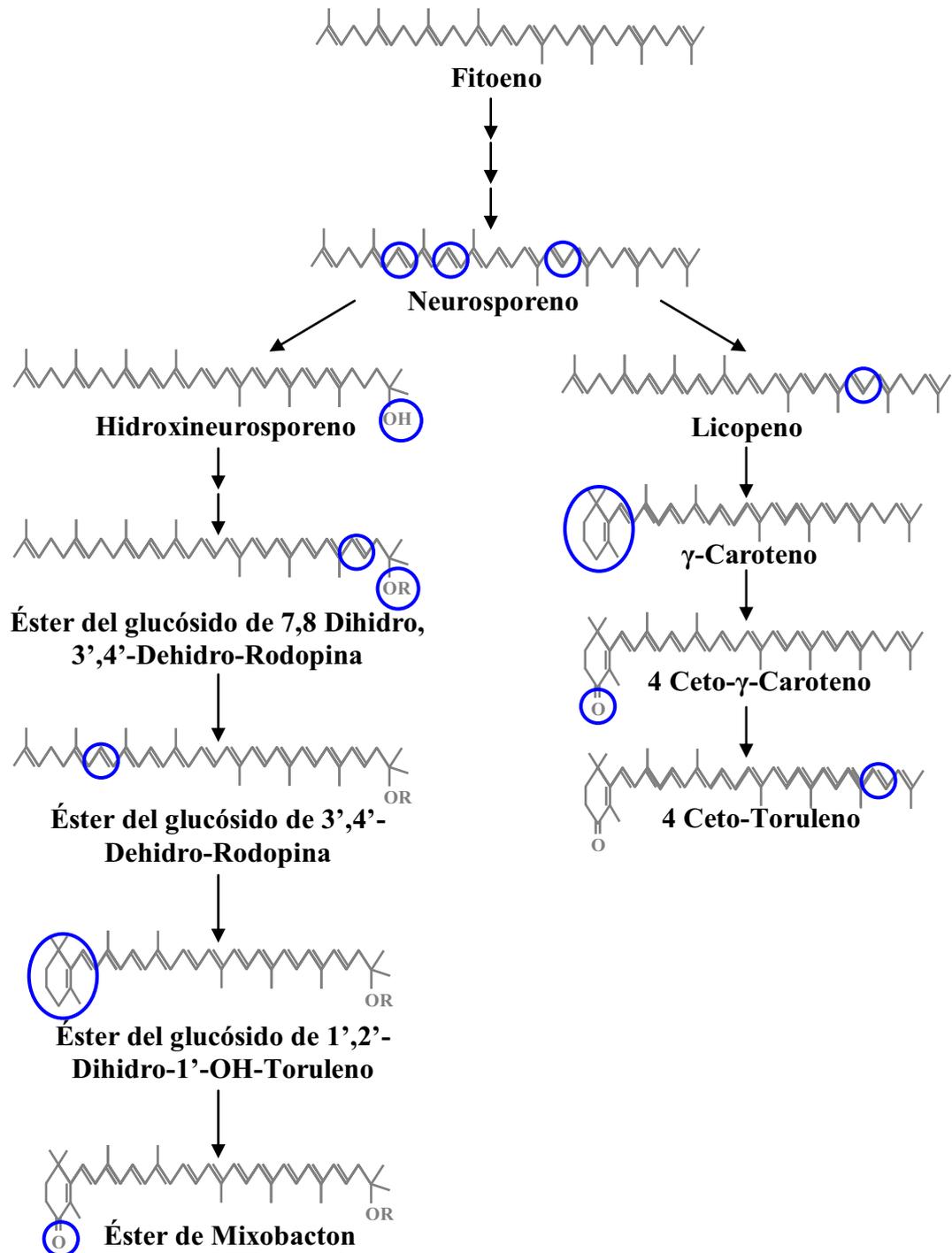


Figura 1.3a. Ruta de síntesis de carotenoides en *Myxococcus fulvus*. Los círculos azules indican las sucesivas reacciones generadas a partir de fitoeno. “R” representa una molécula de azúcar esterificada a un ácido graso.

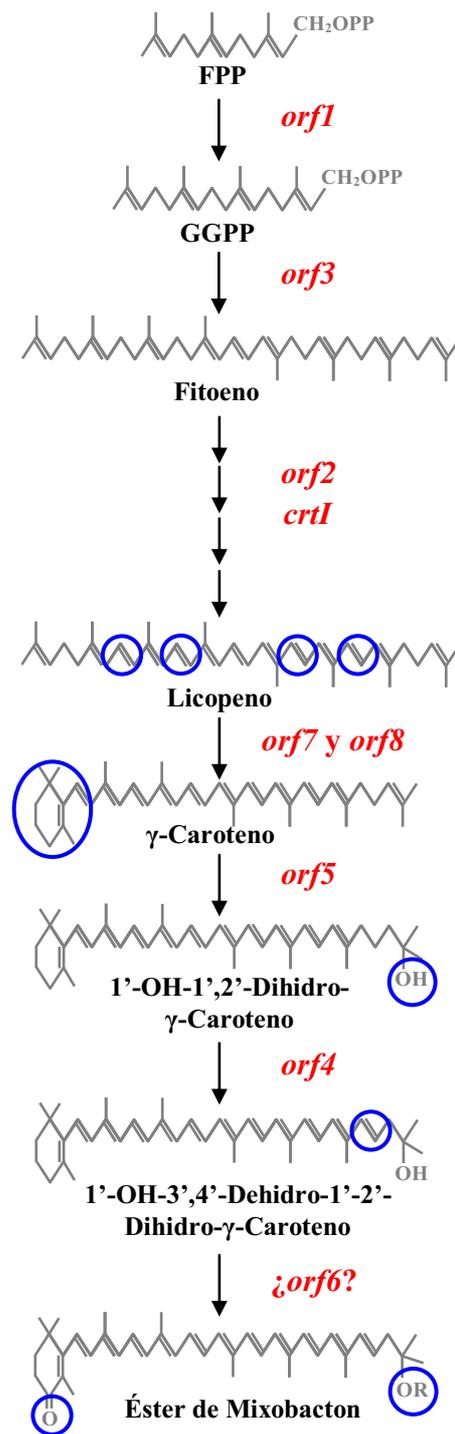


Figura 1.3b. Ruta de síntesis de carotenoides en *Myxococcus xanthus* MY-18 y asignación de funciones a los genes *car* estructurales de *M. xanthus* (*crtI* y *orfs* del operón *carB-carA*, que se discutirán más adelante). Los círculos azules indican las sucesivas reacciones generadas a partir de fitoeno. “R” representa una molécula de azúcar esterificada.

I.2.3. Genética molecular de la carotenogénesis en *M. xanthus*

La producción de carotenoides en *M. xanthus* es absolutamente dependiente de estimulación externa. Hasta muy recientemente, el único estímulo conocido era la luz azul, cuyo efecto se incrementa notablemente si las células alcanzan la fase estacionaria (Burchard y Dworkin, 1966). Muy recientemente se ha descubierto que la presencia de cobre estimula también la síntesis de carotenoides en *M. xanthus* (Moraleda-Muñoz *et al.*, 2005). Si se incuban en oscuridad, en ausencia de otro estímulo, las colonias de esta bacteria presentan color amarillo, que se torna rojo cuando son iluminadas debido a la acumulación de carotenoides. Por tanto, es relativamente sencillo identificar mutantes en genes implicados en el proceso de carotenogénesis (genes *car*) mediante la observación del color de las colonias incubadas en condiciones de luz u oscuridad. De esta manera se han identificado mutantes, tanto espontáneos como inducidos, que no producen carotenoides finales o sus precursores coloreados en la luz (fenotipo negativo o Car^-) y otros que los producen sin ser iluminados (fenotipo constitutivo o Car^C) (Figura 1.4). Estos mutantes han servido para identificar y analizar los genes implicados en la respuesta a la luz azul. Estos se encuentran situados en cinco loci independientes del genoma de *M. xanthus*: el operón regulador *carQRS*, el superoperón *carB-carA* (que agrupa genes estructurales y reguladores), el gen estructural *crtI* (antes *carC*), y los genes reguladores *carD* e *ihfA*.



Figura 1.4. Estirpes de *M. xanthus* Car^C (roja) y Car^- (amarilla).

I.2.3.1. Genes reguladores

Se han identificado cuatro loci distintos implicados en la regulación por la luz de la expresión de los genes estructurales: el operón *carQRS*, el operón *carA* y los genes *carD* e *ihfA*.

- **Operón *carQRS***

El operón *carQRS* consta de tres genes acoplados traduccionalmente, *carQ*, *carR* y *carS*, cuya transcripción depende de un único promotor regulado por la luz a través de los propios productos génicos CarQ y CarR.

Gen *carQ*: Mutaciones de falta de función en este gen producen fenotipo Car⁻ e impiden la activación por la luz de su propio promotor (en adelante P_{QRS}) y de los promotores del operón *carB* y del gen *crtI* (P_B y P_I, respectivamente). El producto del gen *carQ* actúa, por lo tanto, como un regulador positivo del sistema (Martínez-Laborda y Murillo, 1989; Fontes *et al.*, 1993; Hodgson, 1993). La secuencia de aminoácidos de CarQ es similar a la de los miembros de una subfamilia de la familia de factores σ^{70} . Estos factores están implicados en la transcripción de genes cuyos productos, en general, tienen función extracitoplasmática (Gorham *et al.*, 1996; Lonetto *et al.*, 1994). Por ello, esta subfamilia se ha denominado ECF (del inglés, *Extracytoplasmic Function*), que incluye al menos veinte miembros, tanto de bacterias Gram-positivas como Gram-negativas y arqueas (Hughes y Mathee, 1998). En algunos casos (entre ellos CarQ), se ha demostrado que poseen actividad sigma *in vitro* (Wei y Beer, 1995; Browning *et al.*, 2003). La subfamilia de factores ECF se discutirá con mayor detalle posteriormente.

Gen *carR*: El gen *carR* fue definido originalmente por varias mutaciones ligadas que producían fenotipo Car^C (Martínez-Laborda *et al.*, 1986). Dichas mutaciones provocaban la expresión constitutiva del gen *crtI* y de los operones *carQRS* y *carB* (Balsalobre *et al.*, 1987; Fontes *et al.*, 1993; Hodgson, 1993). La proteína CarR contiene un gran número de residuos hidrofóbicos y se localiza en la membrana celular (McGowan *et al.*, 1993; Hodgson, 1993; Gorham *et al.*, 1996; Browning *et al.*, 2003).

En algunas bacterias se han identificado unos elementos reguladores, denominados factores anti-sigma, cuya función es inactivar a un factor sigma específico (Brown y Hughes, 1995). Se ha propuesto un modelo de acción génica según el cual CarR actuaría como un factor anti-sigma que, en la oscuridad, secuestraría en la membrana al factor sigma CarQ. Éste sería así incapaz de activar su propio promotor y el operón *carQRS* se expresaría a niveles muy bajos. De alguna forma, la iluminación con luz azul suprimiría la acción de CarR como factor anti-sigma, liberándose CarQ y activándose la transcripción de los promotores regulados por éste (Gorham *et al.*, 1996). En ausencia de la proteína CarR (mutaciones *carR*) el operón *carQRS* se expresaría constitutivamente, así como los genes del operón *carB* y el gen *crtI*, al acumularse los reguladores positivos CarQ (regulador de P_I) y CarS (regulador de P_B; véase apartado siguiente).

Gen *carS*: CarS es una pequeña proteína ácida, que actúa como antirrepresor de la transcripción del promotor P_B en condiciones de iluminación, contrarrestando la acción represora sobre dicho promotor de la proteína CarA (véase más adelante). Tal efecto de CarS está mediado por su interacción física con CarA (López-Rubio *et al.*, 2002). Las mutaciones *carS* afectan sólo al promotor P_B y no afectan a la expresión de *carQRS* y *crtI*. El efecto de las mutaciones *carQ* o *carR* sobre la actividad de P_B es, pues, una consecuencia indirecta de su efecto sobre P_{QRS} y, en particular, sobre la producción de CarS, necesaria para la activación de P_B (McGowan *et al.*, 1993).

- **Gen *ihfA***

El gen *ihfA* fue identificado a partir de una mutación supresora de una mutación *carR*. La mutación *ihfA* provoca una disminución drástica en la producción de carotenoides, bloqueando la activación de la expresión de *carQRS* por la luz, y por tanto e indirectamente, la expresión de *crtI* (Moreno *et al.*, 2001). El gen *ihfA* tiene efecto sobre otros procesos distintos a los de la carotenogénesis, como el movimiento por deslizamiento, el crecimiento celular, el desarrollo multicelular o la recombinación. La expresión de este gen no se ve afectada por la luz. La proteína

IhfA es homóloga a la cadena α del regulador global de la transcripción IHF (*Integration Host Factor*) de *Escherichia coli* y otras bacterias (Moreno *et al.*, 2001).

- **Gen *carD***

El gen *carD* fue identificado a partir de una mutación por inserción de Tn5 (*carDI*) no ligada a otros loci *car* y que provoca fenotipo Car⁻. Además, la mutación *carDI* impide el desarrollo de cuerpos fructíferos y la diferenciación en esporas que se producen normalmente en respuesta al ayuno (Nicolás *et al.*, 1994).

Como CarQ, el producto de *carD* es directamente necesario para la activación por la luz de P_{QRS} y P_I, afectando sólo indirectamente a la activación de P_B (Nicolás *et al.*, 1994; Nicolás, 1995). Al igual que *ihfA*, la transcripción de *carD* es independiente de la iluminación con luz azul. Tampoco se ve afectada por la presencia de mutaciones en otros genes *car* reguladores (Nicolás *et al.*, 1994). CarD afecta de forma significativa, positiva o negativamente, a la actividad del 1%, aproximadamente, de los promotores activos durante el crecimiento vegetativo normal de *M. xanthus*. Ello demuestra, junto con datos previos sobre su papel en la activación de promotores inducibles por la luz o específicos del desarrollo multicelular, que CarD es un regulador global de la transcripción (Galbis-Martínez *et al.*, 2004).

CarD, que se encuentra en forma de dímeros, posee dos dominios distintos y estables. El dominio C-terminal está formado por un segmento ácido y cuatro copias del llamado “gancho-AT”. Este es un dominio de unión a DNA característico de las proteínas eucarióticas conocidas como *High Mobility Group A* (HMGA), proteínas no histónicas asociadas a la cromatina. El dominio C-terminal carece de estructura definida y su estabilidad parece debida a la interacción entre el tramo ácido y el dominio de unión a DNA. El dominio N-terminal, que sí posee estructura secundaria y terciaria, está ausente de las proteínas HMGA eucarióticas (Nicolás *et al.*, 1996; Padmanabhan *et al.*, 2001). Como las proteínas HMGA, CarD se une al surco menor del DNA en una región específica rica en pares AT, situada aguas arriba de la región

-35 del promotor de P_{QRS} y que resulta esencial para que dicho promotor sea activado por la luz (Nicolás *et al.*, 1996; Padmanabhan *et al.*, 2001).

El gen *carD* parece formar parte de un operón identificado recientemente que incluye al menos tres tramos de lectura abierta adicionales. Mediante la delección en fase del tramo situado inmediatamente aguas abajo del gen *carD* se ha identificado un nuevo gen, denominado *carG* que, al igual que *carD*, participa en la regulación tanto de la carotenogénesis como del ciclo de desarrollo multicelular (Peñalver-Mellado, 2005). Un rasgo destacado de la proteína CarG es la presencia en ella de un motivo rico en histidinas, característico de las metaloproteasas eucarióticas dependientes de zinc. En la actualidad, se están realizando experimentos para desentrañar el papel de CarG en los dos procesos citados anteriormente.

- **Operón *carA***

Once genes implicados en la carotenogénesis y su regulación por luz se encuentran agrupados en el locus conocido como *carB-carA*. Este locus fue identificado a partir de varias mutaciones por inserción de transposón estrechamente ligadas y que producían fenotipo Car⁻ (locus *carB*) y de otra mutación por luz ultravioleta, *carA1*, situada a unas 8 kb de *carB* y que provocaba fenotipo Car^C (Martínez-Laborda *et al.*, 1986; Martínez-Laborda y Murillo, 1989; Botella *et al.*, 1995).

El análisis de la secuencia de nucleótidos de un fragmento de DNA de 12 Kb que contiene el locus *carB-carA* completo, datos de expresión del mismo mediante inserción dirigida de una sonda transcripcional *lacZ*, y otros datos, han permitido establecer ciertas conclusiones sobre este locus. Todos los genes se transcriben en la misma dirección, pero se agrupan en dos operones distintos (Figura 1.5). Los cinco genes situados en el extremo 3' de la región *carB-carA* (*orf7-11*) constituyen un operón independiente, el operón *carA*, cuyo promotor (P_A), situado dentro del *orf6*, se expresa independientemente de la luz (Botella *et al.*, 1995; Botella, 1996; Cervantes y Murillo, 2002). Sin embargo, la expresión del operón *carA* sufre un

incremento en condiciones de iluminación, debido probablemente a la transcripción procedente del promotor fotoinducible de *carB* (Ruiz-Vázquez *et al.*, 1993; Botella *et al.*, 1995 y Botella, 1996). A excepción de *orf11*, los genes del operón *carA* están acoplados traduccionalmente entre sí, y el primero de ellos, *orf7*, lo está al último gen del operón *carB*.

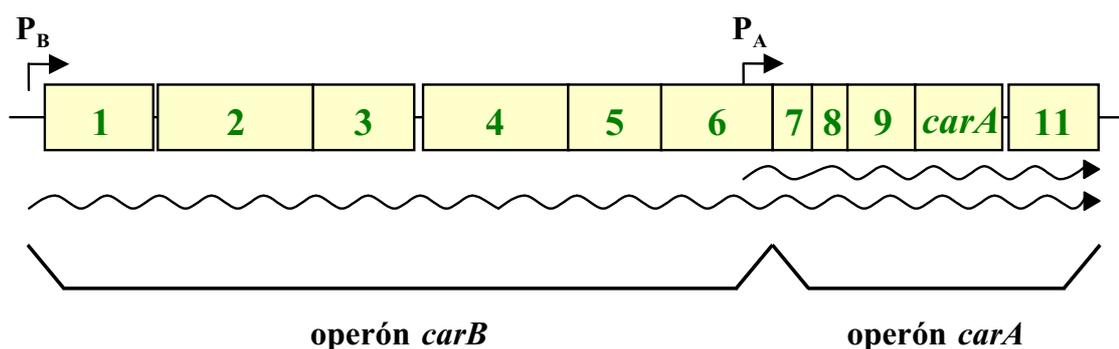


Figura 1.5. El superoperón *carB-carA* de *M. xanthus*. Se representan los *orfs* (1-11) deducidos del análisis de la secuencia, la posición (demostrada experimentalmente) de los promotores P_B y P_A y los mensajeros que desde ellos se producen.

El análisis de secuencia del operón *carA*, el estudio del efecto que producen distintas mutaciones puntuales, estudios de interacción proteína-proteína y proteína-DNA y otros datos, han permitido asignar funciones concretas a algunos de los *orfs* del citado operón (Balsalobre *et al.*, 1987; Botella *et al.*, 1995; Botella, 1996; Cervantes, 2000; Cervantes y Murillo, 2002; López-Rubio *et al.*, 2002; Pérez-Marín *et al.*, 2004).

La secuencia de aminoácidos deducida de *orf9* muestra similitud, en ciertos tramos, con la ferroquelatasa de *E. coli*. Esta enzima cataliza la introducción del hierro en el anillo tetrapirrólico de la protoporfirina IX. Una delección de *orf9* reduce la activación por luz de P_{QRS} , P_B y P_I , y las estirpes con dicha mutación presentan una reducción en la cantidad de carotenoides acumulados en la luz. Estos datos, unidos al hecho de que las mutaciones en *carR* son epistáticas sobre la delección de *orf9*, han

llevado a suponer que el producto de *orf9* participe en la recepción de la señal luminosa o en uno de los primeros pasos del mecanismo de transducción de dicha señal (Botella *et al.*, 1995; Botella, 1996; Cervantes, 2000).

Los genes *orf10* y *orf11* determinan proteínas muy parecidas entre sí (35% de identidad). La delección de *orf10* provoca la expresión constitutiva del promotor P_B, normalmente activado por la luz, demostrando así que su producto génico, denominado CarA, es un represor de P_B en la oscuridad, sin que participe en el control de los otros promotores implicados en la síntesis y regulación de carotenos. CarA contiene un dominio N-terminal de unión a DNA del tipo hélice-giro-hélice muy similar al de las proteínas reguladoras de la familia MerR, y un dominio C-terminal de unión a vitamina B₁₂, característico de la sintetasa de metionina y otras enzimas que utilizan este compuesto como cofactor (Cervantes y Murillo, 2002). Al menos otra especie bacteriana con carotenogénesis fotoinducible, *Streptomyces coelicolor*, contiene una proteína con una combinación de dominios similar a CarA (Takano *et al.*, 2005). Análisis *in vivo* e *in vitro* han demostrado que CarA se une a dos secuencias palindrómicas de su región operadora, una de las cuales solapa con el promotor P_B, impidiendo la unión de la polimerasa de RNA. Los análisis citados demuestran que CarS interacciona físicamente con la región N-terminal de CarA (la misma de unión a DNA), desestabilizando los complejos CarA-DNA y permitiendo así el acceso de la polimerasa de RNA y la transcripción del operón *carB* (López-Rubio *et al.*, 2002 y 2004). Al igual que CarA, Orf11 posee un dominio hélice-giro-hélice y otro de unión a vitamina B₁₂. Estirpes que portan una delección de *orf11* muestran un fenotipo normal Car⁺. La función del producto génico de *orf11* está siendo objeto de estudio en nuestro laboratorio.

I.2.3.2. Genes estructurales

- **El operón *carA***

Los genes *orf7* y *orf8* determinan proteínas pequeñas, hidrofóbicas y con posibles dominios transmembranales (Botella *et al.*, 1995; Botella, 1996). Orf7 y

Orf7 y Orf8 constituyen las dos únicas proteínas con función estructural cifradas por el operón *carA* y catalizan conjuntamente la ciclación de uno solo de los extremos de la molécula de licopeno (Cervantes, 2000; Iniesta, 2003), convirtiéndolo en γ -caroteno. Orf7 y Orf8, parecidas entre sí, muestran similitud con el dominio N-terminal de las proteínas bifuncionales de hongos responsables de la ciclación de ambos extremos de la molécula de licopeno y de la síntesis de fitoeno. Orf7 y Orf8 también muestran similitud con el tipo de ciclasas de licopeno descritas recientemente en algunas bacterias Gram-positivas del Orden *Actinomycetales*, conocidas como ciclasas de licopeno heterodiméricas (Armstrong, 1997; Iniesta, 2003).

- **El operón *carB***

El operón *carB* está formado por los seis primeros genes (extremo 5') del superoperón *carB-carA*. Todos ellos se transcriben a partir del promotor P_B, cuya regulación dependiente del par CarA-CarS se discutió en el apartado anterior.

El análisis de los carotenos acumulados por varios mutantes y la similitud de secuencia de los genes del operón *carB* con genes conocidos de otros organismos, así como su expresión heteróloga, han permitido asignar funciones enzimáticas concretas a algunos de los seis productos génicos de dicho operón, que se esquematizan en la Figura 1.3b (Botella *et al.*, 1995; Botella, 1996; Cervantes, 2000; Iniesta, 2003).

El producto de *orf1* presenta una gran similitud con los productos de los genes *crtE* de bacterias carotenogénicas, *al-3* de *Neurospora crassa*, y *ggpp* de plantas, que determinan la sintetasa del geranylgeranyl pirofosfato (GGPP). Como ocurre en otras bacterias carotenogénicas analizadas, el gen que determina la sintetasa de GGPP, se encuentra situado en *M. xanthus* junto a los otros genes de la ruta de síntesis de carotenoides.

El producto de *orf2* muestra homología con deshidrogenasas de carotenoides de varios organismos, aunque muestra mayor similitud con deshidrogenasas de fitoeno, especialmente con las de hongos, y algo menos con otra deshidrogenasa,

CrtI, del propio *M. xanthus* (véase más adelante). La delección (no polar) del gen *orf2* bloquea la deshidrogenación del fitoeno, acumulándose en las estirpes correspondientes de *M. xanthus*, como caroteno casi exclusivo, el *cis*-fitoeno. La expresión heteróloga de *orf2* en una estirpe de *Escherichia coli* productora de *cis*-fitoeno, convierte a este último en *trans*-fitoeno, fitoflueno y ζ -caroteno (en orden decreciente de acumulación). Orf2 es la única responsable de la isomerización del fitoeno y, al menos, de la primera de sus deshidrogenaciones, hasta fitoflueno (Cervantes, 2000).

El producto de *orf3* es homólogo a la enzima sintetasa de fitoeno (CrtB), mostrando mayor similitud con las enzimas de organismos con fotosíntesis oxigénica.

El producto de *orf4* es similar a la deshidrogenasa CrtD de *R. sphaeroides* y *R. capsulatus*. Uno de los pasos finales de la ruta de síntesis propuesta por Takaichi *et al.* (1995) en *M. xanthus* es la deshidrogenación 3'-4' del hidroxí- γ -caroteno (véase Figura 1.3b). La similitud entre esa reacción y la llevada a cabo por la deshidrogenasa CrtD de *Rhodobacter*, así como la similitud estructural entre CrtD y el producto de *orf4* llevó a proponer que éste cataliza la deshidrogenación del hidroxí- γ -caroteno en *M. xanthus* (Botella *et al.*, 1995).

El producto de *orf5* es similar al producto del gen *crtC* de *Rhodobacter*, la hidroxilasa de neurosporeno (Armstrong *et al.*, 1989; Lang *et al.*, 1995). El producto de *orf5* podría ser el responsable de una reacción similar, la hidroxilación del γ -caroteno.

En cuanto al producto de *orf6*, su secuencia presenta ciertas similitudes con la de enzimas transferasas de glúcidos, cabiendo pues la posibilidad de que sea responsable del paso de glucosilación conocido en la ruta carotenogénica de *M. xanthus* (véase Figura 1.3b).

- **El gen *crtI***

El gen *crtI*, antes denominado *carC*, fue identificado por una inserción del transposón Tn5-*lac* que producía fenotipo Car⁻ (Balsalobre *et al.*, 1987). Como *carB*, la expresión de *crtI* es estimulada fuertemente por la luz, pero, a diferencia de aquél, ello se produce sólo si las células han alcanzado la fase estacionaria o carecen de una fuente de carbono (Fontes *et al.*, 1993). El efecto de la fase de crecimiento sobre la expresión de *crtI* explica la observación original de Burchard y Dworkin (1966) sobre el incremento en la producción de carotenoides cuando los cultivos iluminados alcanzan la fase estacionaria. Todo ello hace muy atractiva la región promotora de *crtI* (P_I). El trabajo de Martínez-Argudo *et al.* (1998) ha demostrado que la correcta expresión del gen *crtI* requiere un tramo de DNA comprendido entre las posiciones -54 y +120, incluyendo, por tanto, parte del DNA transcrito. Esta región de DNA transcrito contiene probablemente un elemento regulador de tipo intensificador («enhancer»). Cuando se une a un promotor heterólogo, el fragmento de DNA comprendido entre +30 y +180 estimula la expresión de dicho promotor en condiciones de ayuno, siendo dicha acción independiente de la orientación del fragmento de DNA de *crtI* (Martínez-Argudo, 1997).

Una mutación por inserción de transposón en *crtI* provoca un bloqueo importante de la deshidrogenación del fitoeno, acumulándose *trans*-fitoeno (93% del total) y fitoflueno (7%). Ello sugiere que este gen participa en la deshidrogenación del fitoeno (Martínez-Laborda *et al.*, 1990). El análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína CrtI apoya esta sugerencia (Fontes *et al.*, 1993). CrtI muestra mayor similitud con la deshidrogenasa del ζ-caroteno de cianobacterias que con las CrtI conocidas. La deshidrogenasa del ζ-caroteno cataliza los dos pasos de deshidrogenación que convierten el ζ-caroteno en licopeno. Esta enzima ha sido identificada sólo en organismos con fotosíntesis oxigénica (cianobacterias y plantas), en los que la deshidrogenasa de fitoeno, no relacionada estructuralmente con otras deshidrogenasas de carotenoides, convierte a éste en ζ-caroteno. En el resto de bacterias y hongos, una única deshidrogenasa, la proteína CrtI, cataliza la conversión del fitoeno en neurosporeno o licopeno. La expresión heteróloga de *crtI* de *M. xanthus* en *E. coli* productora de *cis*-fitoeno revela que CrtI no tiene efecto alguno

sobre dicho precursor (Cervantes, 2000). Estas y otras pruebas experimentales apoyan la idea de que CrtI y Orf2 se requieren conjuntamente para la deshidrogenación completa del fitoeno, algo inusual en bacterias (Cervantes, 2000; Iniesta, 2003).

I.2.3.3. Modelo de regulación

De acuerdo con los datos descritos anteriormente, y otros datos, puede proponerse el modelo de acción génica en la inducción por la luz de la síntesis de carotenoides que se refleja en la Figura 1.6. En la oscuridad habría una expresión basal de los genes del operón *carQRS*. La proteína CarR actuaría como factor anti-sigma de la proteína CarQ, «secuestrándola» físicamente en la membrana. Ello impediría la activación de *carQRS* y *crtI*. Por su parte, el operón *carB* estaría reprimido por CarA. En la luz, se produciría la inactivación de CarR. CarQ quedaría entonces libre para activar, con ayuda de CarD, a los promotores P_{QRS} y P_I. La activación de P_{QRS} requeriría también la participación de la proteína IhfA. La presencia de grandes cantidades de proteína CarS haría posible la inactivación del represor CarA, desligándolo del DNA próximo al promotor P_B, y permitiendo así la activación de dicho promotor. La expresión de los genes estructurales del operón *carB* y del gen *crtI* llevaría a la síntesis de carotenoides.

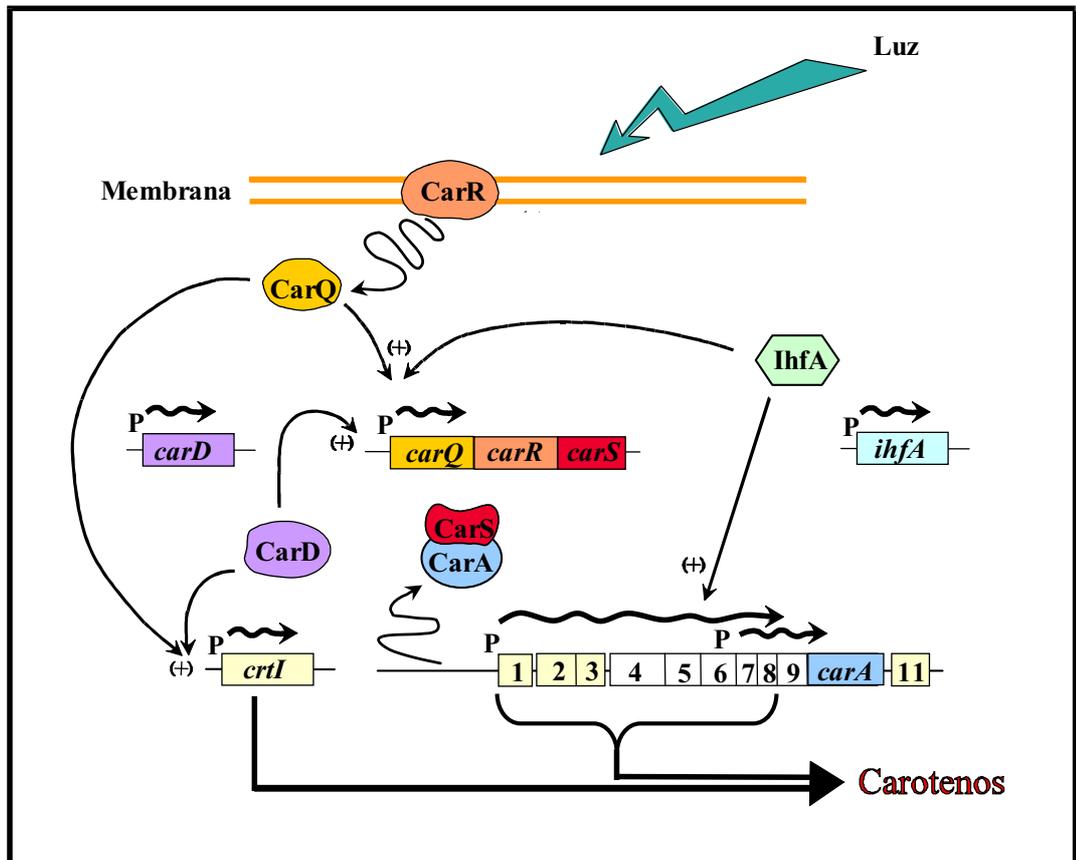
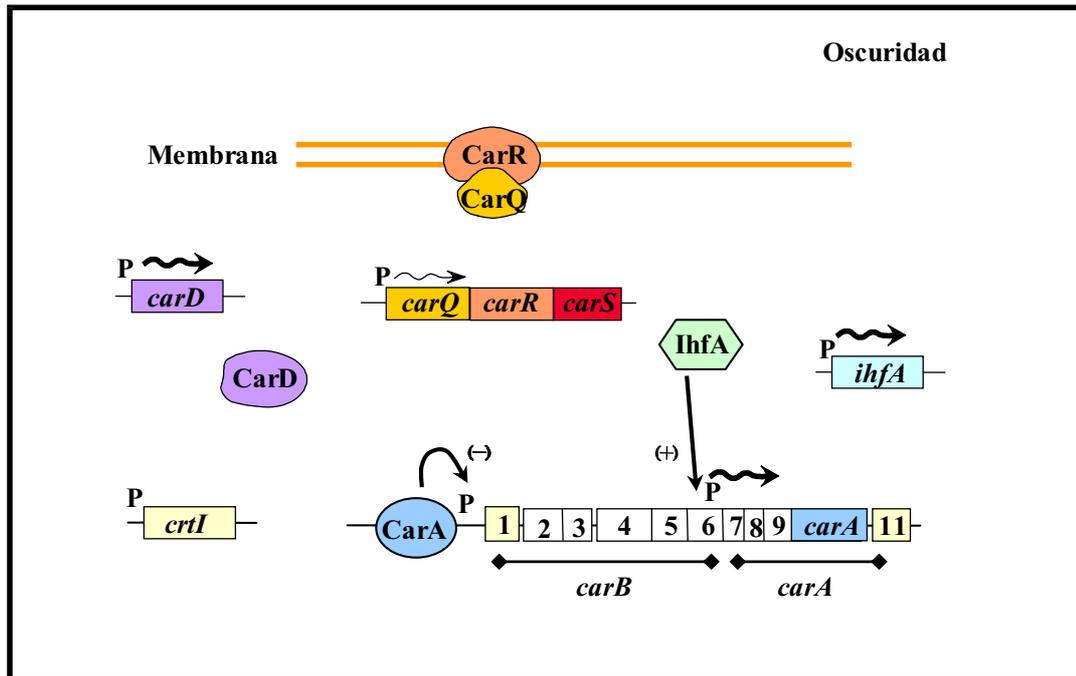


Figura 1.6. Modelo de la organización y acción de los genes *car* de *M. xanthus*.

I.3. FACTORES SIGMA Y FACTORES ANTI-SIGMA EN BACTERIAS

I.3.1. Factores sigma en bacterias

La adaptación de un organismo a cambios en el medio depende principalmente de su capacidad para regular los niveles de expresión de determinados genes. La regulación génica en bacterias se realiza a diferentes niveles, siendo el más importante el que corresponde al inicio de la transcripción. La tasa de transcripción está determinada por la actividad intrínseca del propio promotor y por la interacción de proteínas de unión a DNA, activadores o represores, con la región promotora. Otra forma de regulación es la llevada a cabo mediante determinados factores denominados «sigma» (σ).

En procariotas, la polimerasa de RNA está formada por un complejo heteromultimérico que incluye cinco subunidades. Cuatro de ellas ($\alpha_2\beta\beta'$) se encuentran fuertemente asociadas y forman el denominado «núcleo» de la polimerasa de RNA. La asociación de este núcleo a la subunidad σ forma la holoenzima. Es la subunidad sigma la que determina la unión de la polimerasa de RNA a un promotor específico y la iniciación de la transcripción. Así pues, la presencia de múltiples factores σ provee un mecanismo para la regulación génica a nivel transcripcional.

Los factores sigma se engloban en dos familias principales no relacionadas filogenéticamente: la familia σ^{70} y la familia σ^{54} . No existe similitud entre las secuencias aminoacídicas de miembros pertenecientes a distintas familias (Lonetto *et al.*, 1992). En *E. coli*, el factor sigma principal es el σ^{70} , responsable de la transcripción de los genes implicados en las rutas esenciales de biosíntesis y de los genes requeridos para la utilización de fuentes de carbono (Gross *et al.*, 1992; Helmann y Chamberlin, 1988). El resto de factores de la familia σ^{70} , denominados «factores sigma alternativos», reconocen diferentes regiones -10 y -35 en la secuencia promotora, lo que confiere a la polimerasa de RNA especificidad diferencial a distintos promotores, permitiendo la regulación coordinada de varios genes en respuesta a condiciones ambientales específicas.

En *M. xanthus* se han descrito hasta el momento siete factores sigma:

- SigA: es el principal responsable de la transcripción durante el ciclo de vida vegetativo en condiciones normales de crecimiento y presenta gran homología con los factores primarios σ^{70} de *E. coli* y σ^{43} de *Bacillus subtilis* (Inouye, 1990).

- SigB, SigC y SigE: son factores sigmas alternativos implicados en la diferenciación multicelular de *M. xanthus*. Aunque se asemejan más a los factores sigma específicos de choque térmico, no parecen intervenir en este tipo de regulación. SigB interviene en la fase media y tardía del desarrollo, mientras que SigC lo hace en la fase temprana del mismo. SigE interviene tanto durante la fase vegetativa como durante el desarrollo (Ueki e Inouye, 2001).

- SigD: relacionado evolutivamente con factores sigma primarios y factores sigma específicos de fase estacionaria, sobre todo con homólogos de *rpoS* de *E. coli* (el segundo factor más importante de fase estacionaria). En *M. xanthus*, SigD regula la expresión de genes tanto en la fase estacionaria del crecimiento vegetativo como en el inicio del desarrollo (Ueki e Inouye, 1998).

- RpoN: es el único miembro de la familia de los factores σ^{54} descrito en *M. xanthus*. A diferencia de otras bacterias en las que se han descrito homólogos, *rpoN* parece ser esencial para el crecimiento en *M. xanthus* (Keseler y Kaiser, 1997).

- CarQ: pertenece a la subfamilia de los factores sigma ECF (de la que se hablará a continuación) y está implicado en la regulación de la carotenogénesis activada por la luz.

Dentro de la familia σ^{70} , tanto los factores sigma principales como los alternativos comparten homología a lo largo de ciertos dominios conservados que presentan determinadas funciones generales. Estos se esquematizan en la Figura 1.7:

- Región 1: está presente sólo en los factores sigma primarios y, dentro de éstos, no se encuentra muy conservada. Los factores sigma alternativos carecen totalmente de esta región o conservan solamente unos pocos residuos

de la misma. Este dominio impide la unión del factor sigma directamente al DNA en ausencia de la polimerasa de RNA (Dombroski *et al.*, 1992 y 1993).

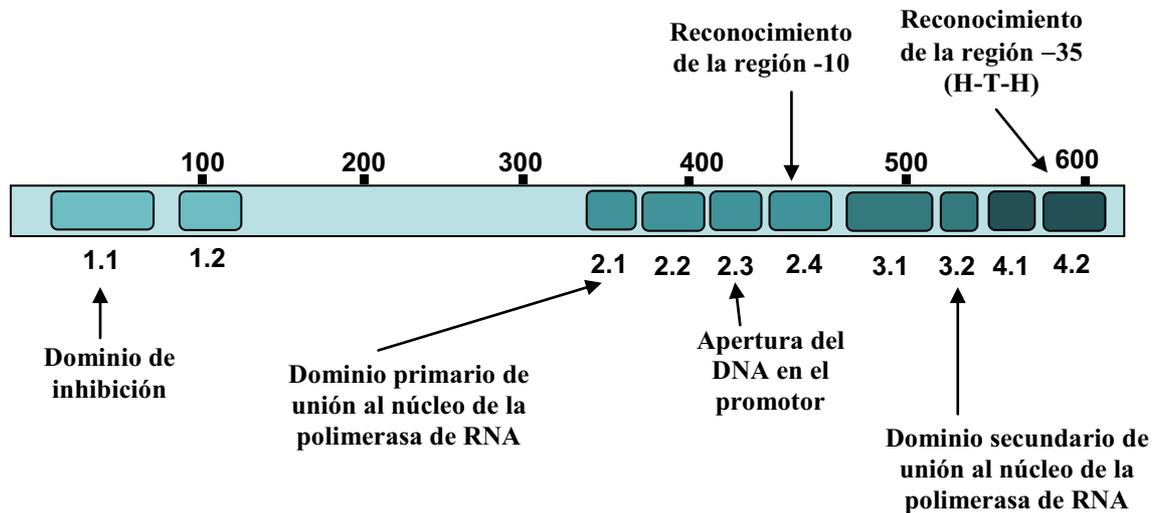


Figura 1.7. Representación esquemática de las regiones conservadas y sus correspondientes funciones en los factores de la familia σ^{70} (H-T-H: hélice-giro-hélice).

- Región 2: es la más conservada en los factores sigma y en ella se distinguen varias subregiones con funciones concretas. El dominio 2.1 está implicado en la unión al núcleo de la polimerasa de RNA (Lesley y Burgess, 1989). El dominio 2.3 parece estar implicado en la apertura de la hélice de DNA, dada su homología con proteínas de unión a DNA de cadena simple (Helmann y Chamberlin, 1988; Jones y Moran, 1992). La región 2.4 está implicada en el reconocimiento del hexámero situado en la posición -10 del promotor (Daniels *et al.*, 1990; Kahn y Ditta, 1991; Siegele *et al.*, 1989; Tatii *et al.*, 1991; Waldburger *et al.*, 1990; Zuber *et al.*, 1989). Por ello, esta región se encuentra muy conservada entre los factores sigma primarios, mientras que lo está menos en los factores sigma alternativos, ya que estos deben reconocer motivos -10 distintos. Se ha encontrado cierta similitud entre la región 2 de los factores sigma y algunos factores transcripcionales eucarióticos, como el

TFIID (Horikoshi *et al.*, 1989), el TFIIE (Ohkuma *et al.*, 1991; Sumimoto *et al.*, 1991) y el TFIIF (Jaehning, 1991).

- Región 3: se encuentra muy conservada entre los factores sigma primarios, mientras que en los alternativos está prácticamente ausente o no presenta similitud con la presente en los primarios. El motivo 3.1, más conservado, presenta similitud con estructuras de unión a DNA tipo hélice-giro-hélice, mientras que los residuos conservados en 3.2 son mayoritariamente ácidos. La región 3.2 podría estar también implicada en la unión al núcleo de la enzima, ya que una deleción en este dominio del factor σ^{32} de *E. coli* reduce su afinidad por la polimerasa de RNA (Zhou *et al.*, 1992).
- Región 4: participa en el reconocimiento de la secuencia situada en la posición -35 del promotor y contiene dos subregiones: el dominio 4.1, que forma una hélice α anfipática conservada en todos los factores sigma, y el dominio 4.2, cuya secuencia muestra similitud con motivos de unión a DNA tipo hélice-giro-hélice, y que resulta más conservado entre los factores sigma primarios que entre los alternativos (Brennan y Matthews, 1989; Gribskov y Burgess, 1986; Helmann y Chamberlin, 1988; Stragier *et al.*, 1985).

I.3.1.1. La subfamilia ECF.

Cuando las bacterias se someten a altas temperaturas u otra clase de estrés que produce alteraciones en sus componentes celulares, inducen la expresión de genes cuyos productos son capaces de reparar el daño celular. Numerosos estudios han tratado de elucidar el mecanismo molecular mediante el cual es detectado el daño celular, provocando la activación de factores transcripcionales que determinan la respuesta al estrés.

Las bacterias Gram-negativas presentan dos compartimentos, el citoplasma y la envoltura celular, que incluye la membrana interna, el periplasma y la membrana externa. Mientras que las condiciones en el citoplasma son predominantemente reductoras, el periplasma es esencialmente oxidante, más viscoso y denso en

proteínas y está expuesto directamente al medio externo, debido a la naturaleza porosa de la membrana externa. Existen diferentes sistemas de respuesta al estrés ocasionado en cada uno de estos compartimentos debido a su distinta naturaleza.

La respuesta a estrés citoplasmático mejor estudiada es la ocasionada por choque térmico en *E. coli*. Cuando las células se someten a altas temperaturas, se produce la desnaturalización de proteínas citosólicas y las chaperonas libres en el citoplasma y que en condiciones normales interaccionan con el factor sigma alternativo σ^{32} , se unen ahora de forma preferente a las proteínas desnaturalizadas, aumentando así la estabilidad y actividad de σ^{32} . Ello determina a su vez la activación de la expresión de chaperonas y proteasas implicadas en la respuesta al choque térmico (Yura y Nakahigashi, 1999).

La regulación del estrés originado en la cubierta bacteriana, denominado también respuesta al estrés extracitoplasmático, se lleva a cabo de distinta manera, ya que aunque las señales son generadas en la pared, los factores transcripcionales que dirigen la respuesta residen en el citoplasma, requiriéndose así la transducción de señales entre compartimentos. Uno de los mecanismos utilizados por algunos procariotas para este tipo de regulación es el llevado a cabo mediante los factores sigma alternativos tipo ECF. Esta familia de factores sigma fue identificada por primera vez por Lonetto *et al.* (1994), durante sus estudios con el factor σ^E de *Streptomyces coelicolor*. La secuenciación del gen *sigE* (que determina el factor σ^E) reveló una gran similitud de su producto génico con otras siete proteínas descritas como reguladores positivos en diversos procesos celulares: AlgU de *Pseudomonas aeruginosa*, HrpL de *Pseudomonas syringae*, σ^E y FecI de *E. coli*, CnrH de *Alcaligenes eutrophus*, SigX de *Bacillus subtilis* y CarQ de *M. xanthus*. Debido a las características distintivas de este tipo de factores σ^{70} , se agruparon en una nueva subfamilia, que actualmente engloba a más de 20 miembros, algunos de ellos incluso dentro de una misma especie (Missiakas y Raina, 1998). Dentro de los factores σ^{70} , la subfamilia ECF se agrupa en un grupo monofilético que se encuentra dividido en dos ramas principales; el grupo formado por AlgU, HrpL, CnrH y σ^E de *E. coli*, y el grupo que incluye σ^E de *S. coelicolor*, SigX y FecI. CarQ estaría situado cerca de

esta bifurcación, pero su localización exacta no está muy clara (Lonetto *et al.*, 1994) (véase Figura 1.8).

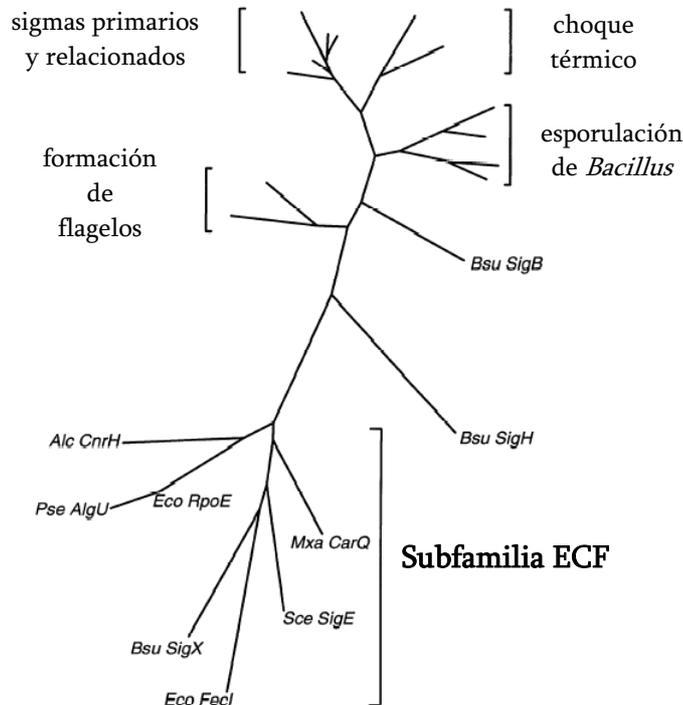


Figura 1.8. Relaciones filogenéticas entre la subfamilia ECF y otros factores sigma.

Los factores sigma ECF carecen prácticamente de la región 1 y poseen una región 3 muy corta. Aunque entre ellos presentan cierta similitud en la región 4.2 (implicada en el reconocimiento del elemento -35 del promotor), no ocurre lo mismo en el dominio 2.4 (implicado en el reconocimiento de la región -10) (Figura 1.9a). Este hecho explica que las secuencias promotoras reconocidas por distintos factores sigma ECF muestren un grado de conservación en la región -35 , así como en la distancia entre la región -35 y -10 , que no se produce en la región -10 (Lonetto *et al.*, 1994) (véase Figura 1.9b). No obstante, en el caso de CarQ, datos de mutagénesis dirigida de la región -10 de P_1 demuestran que esta región, de secuencia similar a la región -10 de P_{QRS} , es crítica para la actividad de dicho promotor (Martínez-Argudo

et al., 1998). Teniendo en cuenta la conservación observada en el motivo 4.2, distintos miembros de la subfamilia ECF podrían ser capaces de reconocer el mismo promotor; tal es el caso de AlgT (AlgU) de *P. aeruginosa*, capaz de reconocer también *in vitro* el promotor *rpoHP3* de *E. coli*. Sin embargo, experimentos llevados a cabo con la proteína CarQ purificada y σ^E de *S. coelicolor* demuestran que estos dos factores no son intercambiables *in vitro*, a pesar de la similitud observada entre los elementos -35 de los promotores que reconocen (Browning *et al.*, 2003).

Algunos de estos factores sigma ECF, aunque inducen la expresión de determinados genes *in vitro*, son dispensables para su transcripción *in vivo* (Jones *et al.*, 1997). Esto indica que deben existir al menos dos factores ECF relacionados en la misma especie con especificidad «relajada» (poco restrictiva). Este hecho ya ha sido observado en el caso de σ^{70} y σ^S en *E. coli* (Tanaka *et al.*, 1993), donde algunos promotores pueden ser reconocidos *in vivo* con la misma eficacia por ambos factores, dependiendo de las condiciones fisiológicas (Loewen y Hengge-Aronis, 1994). Por lo tanto, la especificidad de los factores ECF puede ser modulada *in vivo* a varios niveles, como es el grado de constricción del promotor, la disponibilidad del factor sigma ECF, el estado fisiológico celular y las condiciones ambientales.

Además de la regulación de funciones extracitoplasmáticas, otras características comunes a los factores ECF son su pequeño tamaño (alrededor de 20 kDa), que algunos controlan solamente un pequeño regulón, y la conservación de su organización génica (Lonetto *et al.*, 1994). Muchos de ellos suelen formar parte de pequeños operones que incluyen también a genes con una función importante en la transducción de la señal extracitoplasmática que determina la expresión y activación del factor ECF específico, así como sus propios reguladores negativos (factores anti-sigma, véase más adelante). Éste es el caso de CarQ, responsable de la regulación de *crtI* y del propio operón *carQRS*, donde *carQ* se encuentra acoplado traduccionalmente a su regulador negativo *carR*.

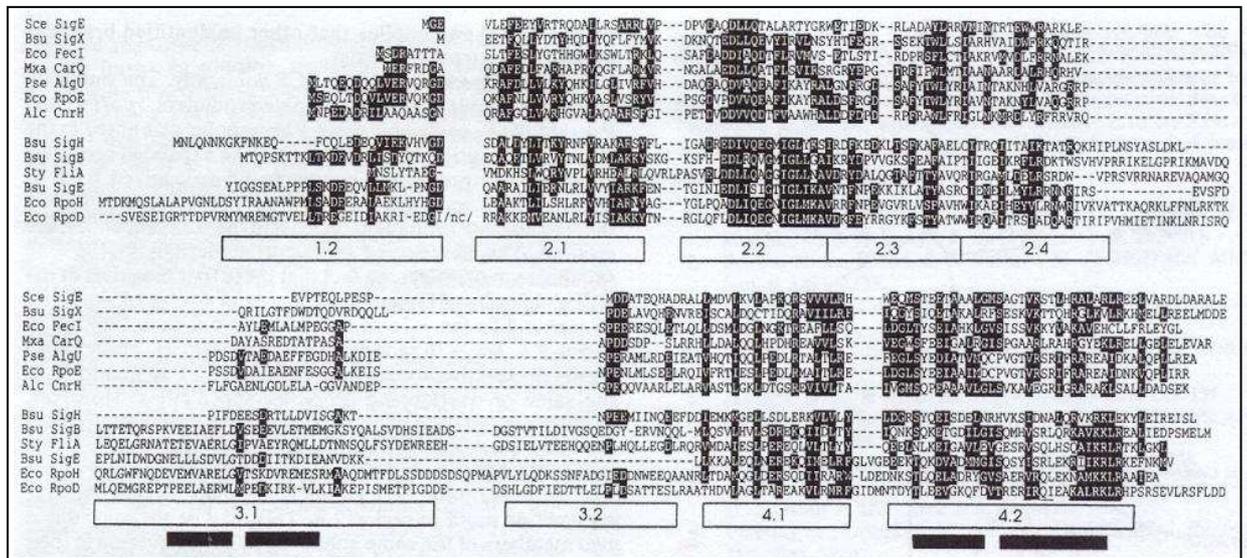


Figura 1.9a. Alineamiento de la subfamilia ECF con otros factores σ . Las regiones conservadas se muestran debajo de los alineamientos (rectángulos blancos); así como los posibles motivos hélice-giro-hélice (rectángulos oscuros).



Figura 1.9b. Comparación de las secuencias promotoras *rpoHP3*, *dagAP2*, *algD*, *carQRS* y *crtI*, dependientes de factores sigma de la subfamilia ECF σ^E de *E. coli*, σ^E de *S. coelicolor*, AlgU de *P. aeruginosa* y CarQ de *M. xanthus*, respectivamente. Las regiones sombreadas representan bases conservadas en la región -35 de los distintos promotores. El sitio de inicio de la transcripción se muestra enmarcado. Los asteriscos indican los nucleótidos que, de acuerdo con datos experimentales, resultan críticos para la actividad del promotor de *crtI* (Martínez-Argudo *et al.*, 1998)

I.3.2. Factores anti-sigma

En muchos casos, la activación del promotor de un operón es consecuencia de la síntesis de un factor sigma alternativo específico. Sin embargo, el mecanismo que controla cuándo y bajo qué condiciones el factor sigma alternativo debe aparecer es muy complejo y variado. Aunque por ahora es difícil proponer un mecanismo general para la regulación de los factores sigma ECF, sí que parece existir un mecanismo conservado basado en la presencia de proteínas con actividad anti-sigma, conocidas también para otros factores sigma. Estas proteínas se localizan en la membrana interna y muchas de ellas contienen un dominio N-terminal citoplasmático conservado, separado del dominio C-terminal periplasmático por, al menos, un fragmento transmembranal. En ausencia del estímulo inductor, inhiben la acción de su factor sigma específico, impidiendo la unión de éste al núcleo de la polimerasa de RNA, bien mediante su reclutamiento en la membrana interna o mediante proteólisis. Las señales activadoras serían percibidas a través del dominio periplasmático del factor anti-sigma mediante un mecanismo desconocido en muchos casos y que podría implicar la acción de otras proteínas reguladoras. En cualquier caso, las señales activadoras producirían la inactivación del factor anti-sigma y la liberación del factor sigma al citoplasma, pudiendo entonces asociarse a la polimerasa de RNA y activar así la transcripción de genes específicos (Raivio y Silhavy, 2001). La conservación existente en el extremo amino de algunos factores anti-sigma ECF podría ser indicativo de que es este dominio el que interacciona directamente con el factor sigma correspondiente, mientras que el poco grado de conservación observado en el extremo carboxilo estaría relacionado con la necesidad de responder a estímulos específicos (Hughes y Mathee, 1998). En la Tabla 1.1 se muestran algunos de los factores sigma identificados en procariotas con sus correspondientes reguladores anti-sigma y el tipo de funciones que regulan.

Organismo	Factor σ	Factor anti- σ	Función
Bacteriófago T4	<i>E. coli</i> σ^{70}	Asi A	General
<i>Bacillus subtilis</i>	σ^F σ^G σ^B σ^D	SpoIIAB SpoIIAB RsbW FlgM	Esporulación Esporulación Respuesta a estrés Síntesis de flagelo
<i>Salmonella typhimurium</i>	σ^{28}	FlgM	Síntesis de flagelo
Eubacteria	σ^{32}	DnaK	Estrés térmico
<i>Streptomyces coelicolor</i>	σ^{WhiG}	¿?	Esporulación
Subfamilia ECF			
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	σ^{CnrH}	Orf1	Resistencia a Co/Ni
<i>Azotobacter vinelandii</i>	σ^{AlgU}	MucA	Síntesis de alginato
<i>Bacillus subtilis</i>	σ^{SigX} σ^{SigV} σ^{SigZ}	¿? Anti-SigV ¿?	¿?
<i>Erwinia amylovora</i>	σ^{22}	¿?	Factores de virulencia /Hipersensibilidad
<i>Escherichia coli</i>	σ^E σ^{FecI}	RseA/MclA FecR	Resistencia a temperaturas extremas Transporte de FeIII-citrato
<i>Haemophilus influenzae</i>	σ^E	RseA/MclA	¿?
<i>Myxococcus xanthus</i>	σ^{CarQ}	CarR	Síntesis de carotenoides
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	σ^E	¿?	¿?
<i>Mycobacterium leprae</i>	σ^E	¿?	¿?
<i>Salmonella typhimurium</i>	σ^E	¿?	¿?
<i>Streptomyces coelicolor</i>	σ^E	¿?	Síntesis de agarasa
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	σ^E	¿?	¿?
<i>Synechocystis sp.</i>	σ^E	¿?	¿?
<i>Photobacterium SS9</i>	σ^E	Orf2	Resistencia a altas presiones
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$\sigma^{22(\text{AlgT/AlgU})}$ σ^{PvdS}	MucA ¿?	Síntesis de alginato Síntesis de pioverdina
<i>Pseudomonas putida</i>	σ^{PupI}	PupR	Transporte de pseudobactina
<i>Pseudomonas syringae</i>	σ^{HprL}	¿?	Factores de virulencia/ Hipersensibilidad
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	σ^E	ChrR	Expresión de citocromo c_2

Tabla 1.1. Relación de los factores sigma y sus correspondientes factores anti-sigma conocidos.

En general, los factores anti-sigma son cotranscritos junto a su factor sigma específico en un mismo operón. En *E. coli*, *rpoE* es el primer gen de un operón formado por cuatro genes denominados *rpoE*, *rseA*, *rseB*, y *rseC*, situados en ese orden (De las Peñas *et al.*, 1997; Missiakas *et al.*, 1997). Esta estructura se conserva en el operón responsable del factor AlgU (también llamado AlgT o σ^{22}) de

P. aeruginosa, formado por los genes *algU*, *mucA*, *mucB*, *mucC* y *mucD*, así como en otros operones menos caracterizados de *Azotobacter vinelandii*, *Haemophilus influenzae*, *Photobacterium SS9* y *Mycobacterium leprae* (Hughes y Mathee, 1998).

En *E. coli*, *rseA* (del inglés, *regulator of sigma E*), el segundo gen del operón, determina el principal regulador negativo de σ^E (es decir, el factor anti- σ^E). Su homólogo en *P. aeruginosa*, *mucA*, es también el segundo gen del operón de *algU* y su producto funciona como un regulador negativo de AlgU, factor sigma ECF que dirige la biosíntesis de alginato. Tanto RseB como MucB, que constituyen el tercer gen en sus correspondientes operones, funcionan también como reguladores negativos de σ^E y AlgU, respectivamente. RseB es una proteína soluble del periplasma que interacciona con el dominio C-terminal de RseA (Raina *et al.*, 1995; De las Peñas *et al.*, 1997), estabilizando a RseA en ausencia de estímulo. El producto de *rseC*, el cuarto gen del operón de *E. coli* (*mucC* en *P. aeruginosa*), es una proteína de membrana interna que parece regular positivamente a σ^E (Missiakas *et al.*, 1997).

De forma análoga, el operón *carQRS* de *M. xanthus* determina al factor sigma CarQ y a su factor anti-sigma específico, CarR. La secuencia aminoacídica de CarR muestra que esta proteína consta de una región N-terminal (Met1-Ala46) de carácter hidrofílico y una región central y C-terminal hidrofóbica (Gorham *et al.*, 1996). Experimentos de fraccionamiento de membranas de *M. xanthus* han demostrado que CarR se localiza en la membrana interna. CarR, además, es capaz de formar homomultímeros, tal y como ocurre con otros factores anti-sigma (Browning *et al.*, 2003). Diversos datos apoyan la existencia de una interacción directa entre las proteínas CarQ y CarR (Browning *et al.*, 2003). La traducción acoplada de los genes *carQ* y *carR* asegura la producción equimolecular de ambas proteínas, siendo ésta esencial para la correcta regulación del promotor P_{QRS}, ya que en estirpes con dos copias del gen *carQ* y una de *carR* se observa expresión constitutiva del operón *carQRS* (Gorham *et al.*, 1996).

En la oscuridad, CarR actuaría como un factor anti-sigma, secuestrando a CarQ en la membrana e impidiendo la transcripción de su propio promotor. La iluminación

con luz azul suprimiría la acción de CarR, liberándose CarQ. El mecanismo de inactivación de CarR por la luz se desconoce, pero en él está implicada una proteína denominada CarF, que es el objeto principal de estudio en este trabajo.

I.3.3. Factores anti-anti-sigma

Se han descrito varios sistemas bacterianos en los cuales un factor anti- σ es regulado a su vez por un factor específico denominado anti-anti- σ , mediante modificación enzimática o degradación proteolítica, o mediante exportación al exterior de la célula. Algunos de estos factores son proteínas muy hidrofóbicas y probablemente se localicen en la membrana.

Un ejemplo de regulación mediante proteólisis por factores anti-anti- σ es el llevado a cabo en *E. coli*, en el sistema de respuesta a estrés térmico. En condiciones normales, σ^E es secuestrado e inactivado por el factor anti-sigma RseA. Cuando la temperatura aumenta (42°C), se acumulan en el espacio periplasmático proteínas mal plegadas que activan una cascada proteolítica que degrada a RseA. Los dominios C-terminales expuestos por las proteínas desnaturalizadas, activan a las proteasas de membrana DegS y YaeL, que producen un corte en el dominio periplasmático y en el dominio transmembranal de RseA, respectivamente, liberándose así σ^E (Ades *et al.*, 1999; Alba *et al.*, 2002; Kanehara *et al.*, 2002 y Alba y Gross, 2004) (véase Figura 1.10). Estas proteasas actuarían como factores anti-anti-sigma, al inactivar al factor anti-sigma RseA en respuesta al estímulo térmico.

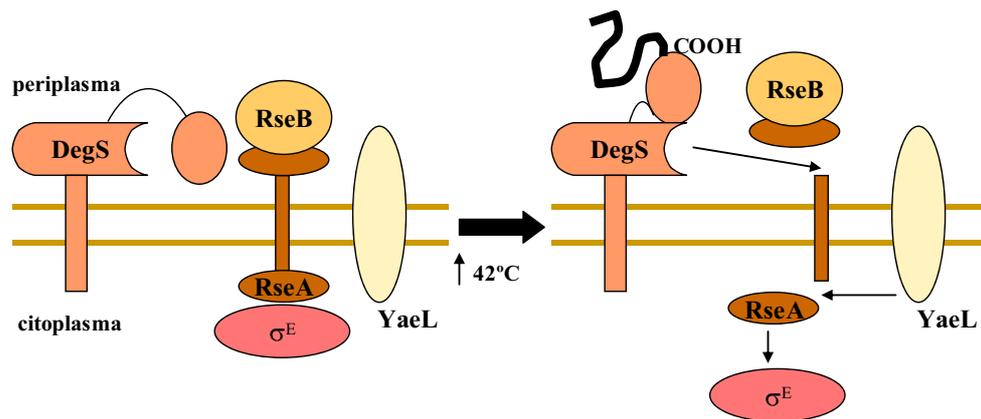


Figura 1.10. Regulación del factor ECF σ^E por el factor anti- σ RseA, mediada por las proteasas anti-anti- σ de membrana (DegS y YaeL) en condiciones de estrés térmico.

Otro ejemplo de acción anti-anti- σ se ha estudiado en *B. subtilis*. En esta bacteria, los factores σ^F y σ^B , implicados en la transcripción durante la esporulación y en la regulación del estrés ambiental y energético, respectivamente, están regulados por los factores anti- σ SpoIIAB y RsbW, ambos con actividad quinasa (Brown y Hughes, 1995; Voelker *et al.*, 1995). En condiciones inductoras, SpoIIAB y RsbW se unen a sus factores anti-anti-sigma específicos (SpoIIAA y RsbV, respectivamente) y los fosforilan. Ello provoca la inactivación de los factores anti-anti- σ , pero conduce también a la liberación del factor sigma que se encontraba unido a SpoIIAB y RsbW en condiciones basales. La actividad de los factores anti-anti- σ se restaura por la acción de una fosfatasa (Lee *et al.*, 2001; Brody *et al.*, 2001) (véanse Figuras 1.11 y 1.12).

En el complejo sistema de transducción de señales detectadas en la envoltura bacteriana, los factores anti-anti-sigma pueden ser regulados a su vez por otras proteínas. Este es el caso del factor anti-anti-sigma RsbV, cuya actividad se encuentra regulada positivamente por las proteínas fosfatasas RsbU y RsbP, que a su vez interaccionan con otras proteínas implicadas en la transmisión de señales (RsbT y RsbQ) (Figura 1.12) (Brody *et al.*, 2001).

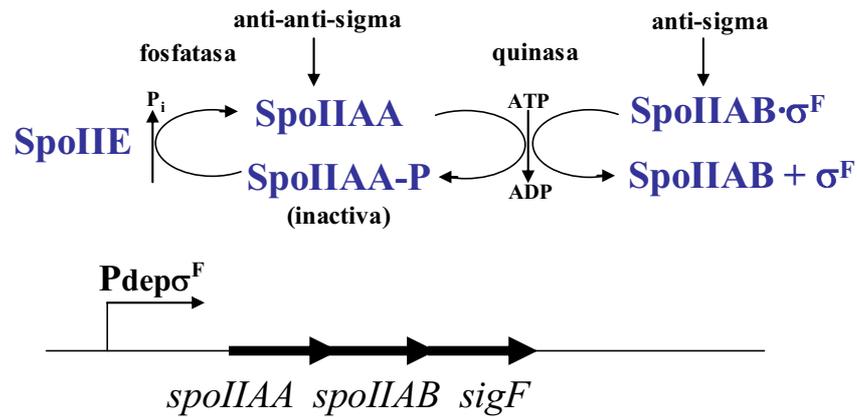


Figura 1.11. Modelo de regulación del factor σ^F de *B. subtilis*. Abajo se muestra la ordenación de los genes en el operón y el promotor dependiente del factor σ^F ($P_{dep\sigma^F}$).

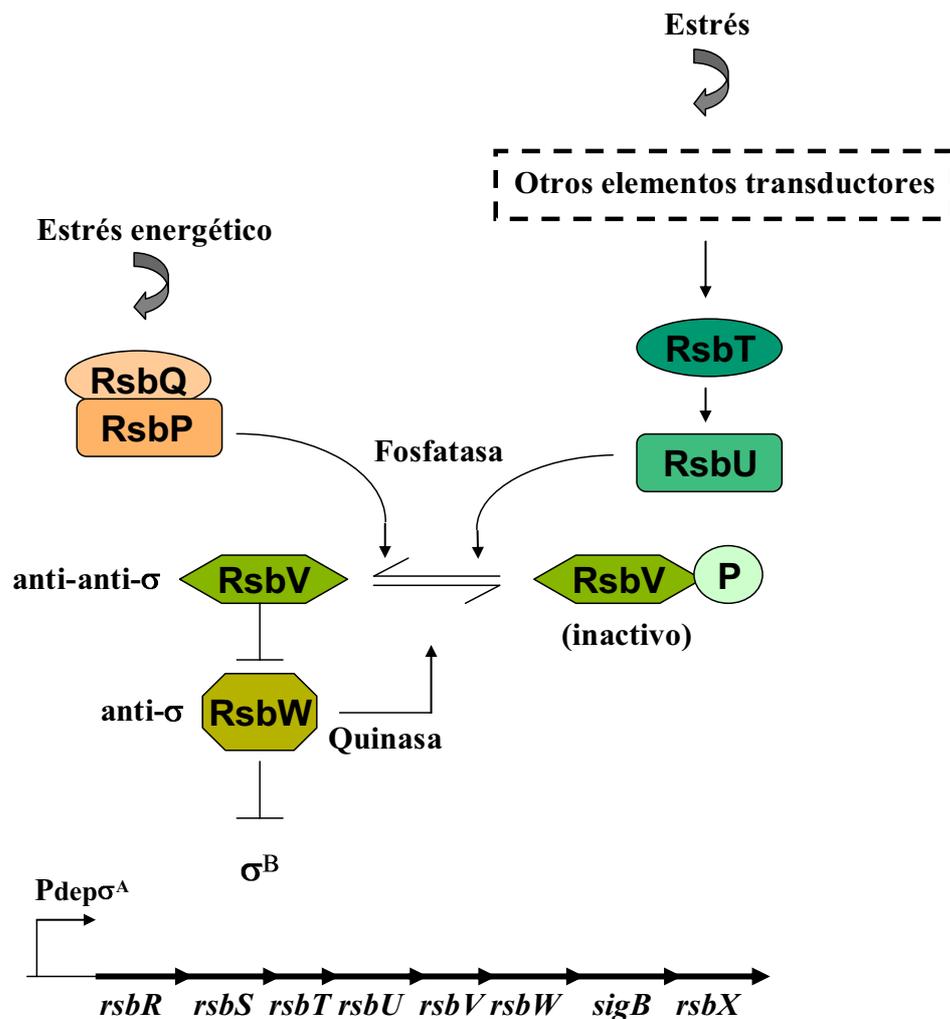


Figura 1.12. Modelo de regulación del factor σ^B en *B. subtilis*. Abajo se muestra la ordenación de los genes en el operón, transcrito a partir de un promotor dependiente del factor σ primario σ^A ($P_{dep\sigma^A}$).