

ÍNDICE DE MATERIAS

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 FACTORES ARQUITECTÓNICOS DEL DNA	2
I.1.1 El factor IHF	3
I.1.1.1 Estructura y unión específica al DNA	5
I.1.1.2 IHF como factor arquitectónico en el control de la transcripción	6
I.1.2 Otros factores arquitectónicos procarióticos	8
I.1.3 Las proteínas HMG	9
I.1.3.1 Características generales	9
I.1.3.2 Estructura del grupo HMGA e interacción con el DNA	11
I.1.3.3 Las proteínas HMGA como factores arquitectónicos en el control de la transcripción	13
I.1.3.4 Otras funciones celulares de HMGA	15
I.2 EL GEN <i>carD</i> DE <i>M. xanthus</i>	16
I.2.1 Características generales de la bacteria <i>M. xanthus</i>	16
I.2.1.1 El proceso de desarrollo multicelular	18
I.2.1.2 La carotenogénesis en <i>M. xanthus</i>	23
I.2.2 Identificación de <i>carD</i> y análisis genético	28
I.2.2.1 Acción del gen <i>carD</i> en la respuesta a la luz	28
I.2.2.2 Acción del gen <i>carD</i> en el desarrollo multicelular ..	30
I.2.2.3 Regulación de <i>carD</i>	31
I.2.3 Caracterización molecular de la proteína CarD	31
I.2.3.1 Organización estructural de la proteína CarD	32
I.2.3.2 Unión de la proteína CarD al DNA	34
I.3 ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	35
II. MATERIALES Y MÉTODOS	37

II.1 ESTIRPES BACTERIANAS Y BACTERIÓFAGOS	38
II.1.1 Estirpes bacterianas	38
II.1.2 Bacteriófagos	43
II.2 MEDIOS DE CRECIMIENTO Y TAMPONES	43
II.2.1 Medios ricos para <i>M. xanthus</i>	43
II.2.2 Medios de fructificación para <i>M. xanthus</i>	44
II.2.3 Medios ricos para <i>E. coli</i>	45
II.2.4 Tampones y reactivos	46
II.3 CONDICIONES DE CULTIVO PARA LA FASE VEGETATIVA	48
II.4 CONDICIONES DE CULTIVO PARA LA FASE DE DESA- RROLLO	48
II.5 PÉRDIDA DE UN FRAGMENTO DE DNA POR RECOMBI- NACIÓN HOMÓLOGA	49
II.6 OBTENCIÓN DE COLECCIONES DE INSERCIONES DE <i>Tn5-lac</i>	49
II.7 TRANSFERENCIA DE DNA A <i>M. xanthus</i>	50
II.7.1 Obtención de lisados del mixofago Mx4LA27	50
II.8.2 Transducción generalizada con Mx4LA27	51
II.8.3 Obtención de lisados de P1	52
II.8.4 Empaquetamiento de plásmidos en P1	52
II.8.5 Transducción especializada con P1	52
II.8.6 Electroporación	53
II.9 PROCEDIMIENTOS DE MUTAGÉNESIS	53
II.9.1 Por inserción del transposón <i>Tn5-lac</i>	53
II.9.2 Con luz ultravioleta	54
II.10 MANIPULACIÓN DE DNA	54
II.10.1 Aislamiento de DNA	54
II.10.2 Tratamiento enzimático del DNA	54
II.10.3 Electroforesis en gel de agarosa	55
II.10.4 Transferencia de DNA a <i>E. coli</i>	56
II.10.5 Amplificación de DNA por PCR	56
II.10.6 Marcado radiactivo de sondas de DNA	57

II.10.7 Hibridación de DNA fijado a un soporte	58
II.10.8 Secuenciación automática de DNA y tratamiento informático de las secuencias	58
II.11 EXPRESION DE β-GALACTOSIDASA EN <i>M. xanthus</i>	60
III. RESULTADOS	62
III.1 BÚSQUEDA DE NUEVOS PROMOTORES DEPENDIENTES DEL LOCUS <i>carD</i>	63
III.1.1 Obtención de una colección de promotores regulados por CarD	63
III.1.2 Análisis del fenotipo para la carotenogénesis y el desarrollo multicelular	69
III.1.3 Análisis de expresión en distintos fondos mutantes <i>carD</i> ⁻ ..	70
III.1.4 Caracterización de las inserciones de Tn5- <i>lac</i>	74
III.2 CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE LOS LOCI ΩMR900, ΩMR915, ΩMR1100 Y ΩMR1104	76
III.2.1 Clonación y secuenciación del locus Ω MR900 (promotor MF1-)	76
III.2.2 Clonación y secuenciación del locus Ω MR1104 (promotor M8+)	81
III.2.3 Clonación y secuenciación del locus Ω MR1100 (promotor M4+)	85
III.2.4 Clonación y secuenciación del locus Ω MR915 (promotor M5-)	89
III.3 RELACIÓN ENTRE LA FUNCIÓN DE CarD Y LA DE LAS PROTEÍNAS CarQ e IhfA	94
III.3.1 Efecto de la mutación <i>carQ1</i>	95
III.3.2 Efecto de <i>ihfA2</i> sobre la expresión de los promotores MF1- y M5-	95
III.3.3 Efecto de <i>ihfA2</i> en MR1100 y MR1104	97

III.4 SUPRESORES DE MUTACIONES <i>carD</i>⁻	101
III.4.1 Obtención de mutaciones supresoras de <i>carD</i> ⁻	101
III.4.2 Estudio del fenotipo Car y del fenotipo Fru de estirpes <i>sod</i>	104
III.4.3 Pérdida de la fusión transcripcional P _{MF} :: <i>lacZ</i>	108
III.4.4 Supresión del efecto de mutaciones <i>carD</i> ⁻ sobre otros pro- motores	110
III.4.5 Efecto de <i>sodA1</i> sobre la expresión de los promotores P _{crit} y P _{carQ}	114
III.4.6 Análisis de ligamiento entre las mutaciones <i>carD1</i> y <i>sodA1</i>	115
III.4.7 Efecto de las mutaciones <i>sodB1</i> y <i>sodC1</i> sobre la mutación <i>carD1</i>	117
IV. DISCUSIÓN	119
IV.1 NUEVOS PROMOTORES REGULADOS POR CarD	120
IV.2 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE LOS LOCI DE- PENDIENTES DE CarD	123
IV.2.1 Análisis del locus ΩMR900	123
IV.2.2 Análisis del locus ΩMR1104	124
IV.2.3 Análisis del locus ΩMR1100	127
IV.2.4 Análisis del locus ΩMR915	130
IV.2.5 Análisis preliminar de las secuencias promotoras	134
IV.3 RELACIÓN FUNCIONAL ENTRE LAS PROTEÍNAS CarD E IhfA	136
IV.4 SUPRESORES DE MUTACIONES <i>carD</i>⁻	138
V. CONCLUSIONES	142
VI. BIBLIOGRAFÍA	145

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1.1	Estructuras tridimensionales del factor IHF y del <i>gancho AT</i> de la proteína HMGA humana unidos al DNA	4
Figura 1.2	Ciclo de vida de <i>M. xanthus</i>	18
Figura 1.3	Ejemplos de mutantes Car ^C y Car ⁻	24
Figura 1.4	Modelo actual de la regulación genética de la carotenogénesis en <i>M. xanthus</i>	25
Figura 1.5	Acción de la proteína CarD en la carotenogénesis	29
Figura 1.6	Organización estructural de la proteína CarD	32
Figura 3.1	Estrategia de identificación de promotores regulados por <i>carD</i>	64
Figura 3.2	Promotores dependientes del gen <i>carD</i>	68
Figura 3.3	Formación de cuerpos fructíferos en estirpes con inserciones de Tn5- <i>lac</i> dependientes de CarD	71
Figura 3.4	Efecto de las mutaciones <i>carD2</i> y <i>carD3</i> sobre la actividad de los promotores MF1-, M5-, M8+ y M4+	73
Figura 3.5	Análisis Southern de distintas inserciones de Tn5- <i>lac</i>	75
Figura 3.6	Clonación <i>in situ</i> de un fragmento de DNA adyacente al locus de inserción ΩMR900	78
Figura 3.7	Clonación del fragmento de DNA a la izquierda de ΩMR900	79
Figura 3.8	Fragmento clonado del locus ΩMR900	81
Figura 3.9	Clonación del locus de inserción ΩMR1104	83
Figura 3.10	Subclonación de tres fragmentos del locus ΩMR1104	84
Figura 3.11	Fragmento clonado del locus ΩMR1104	85
Figura 3.12	Clonación del locus de inserción ΩMR1100	87
Figura 3.13	Subclonación de dos fragmentos del locus ΩMR1100	88

Figura 3.14	Fragmento clonado del locus Ω MR1100	89
Figura 3.15	Clonación del locus de inserción Ω MR915 y subclonación de un fragmento interno	91
Figura 3.16	Clonación <i>in situ</i> del DNA a la derecha del locus Ω MR915	92
Figura 3.17	Fragmento clonado del locus Ω MR915	93
Figura 3.18	Efecto de la mutación <i>carQ1</i> sobre los promotores regulados por CarD	96
Figura 3.19	Efecto de la mutación <i>ihfA2</i> sobre la expresión de los promotores MF1- y M5-	98
Figura 3.20	Efecto de la mutación <i>ihfA2</i> sobre el crecimiento de las estirpes MR1100 y MR1104	100
Figura 3.21	Representación de la fusión transcripcional $P_{MF}::lacZ$ en el plásmido pMAR932 y experimento de búsqueda de supresores de mutaciones <i>carD</i>	103
Figura 3.22	Efecto de las mutaciones <i>sod</i> sobre la actividad del fragmento $P_{MF}::lacZ$	105
Figura 3.23	Desarrollo multicelular de estirpes <i>sod</i>	107
Figura 3.24	Procedimiento de eliminación del plásmido pMAR932	109
Figura 3.25	Análisis Southern de estirpes <i>sod</i>	111
Figura 3.26	Efecto de mutaciones <i>sod</i> sobre las inserciones de Tn5- <i>lac</i> dependientes de CarD	113
Figura 3.27	Efecto de <i>sodA1</i> sobre la actividad de los promotres P_{QRS} y P_{crl} en presencia de la mutación <i>carD1</i>	116
Figura 3.28	Efecto supresor de <i>sodB1</i> y <i>sodC1</i> sobre la actividad del fragmento $P_{MF}::lacZ$ en presencia de la mutación <i>carD1</i>	118
Figura 4.1	Alineación de la secuencia de aminoácidos deducida del locus Ω MR1104 de <i>M. xanthus</i> con la secuencia representativa del dominio OEP	125
Figura 4.2	Secuencia de aminoácidos de parte de la proteína deducida del locus Ω MR1100	129

Figura 4.3	Comparación de la secuencia de aminoácidos deducida del locus Ω MR915 de <i>M. xanthus</i> con la de las proteínas Lrp de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> , <i>Caulobacter crescentus</i> , <i>Vibrio cholerae</i> y <i>Escherichia coli</i>	131
Figura 4.4	Secuencia de nucleótidos de la región 5' del locus Ω MR915	135
Tabla 2.1	Estirpes utilizadas en este trabajo	39
Tabla 2.2	Estirpes obtenidas en este trabajo	40
Tabla 2.3	Plásmidos utilizados en este trabajo	42
Tabla 2.4	Cebadores utilizados en las reacciones de secuenciación	59
Tabla 3.1	Resultados de los tres experimentos independientes de mutagénesis	66
Tabla 3.2	Estirpes <i>sod</i> utilizadas en el ensayo de actividad específica β -galactosidasa	112

I. Introducción

I.1 FACTORES ARQUITECTÓNICOS DEL DNA

La mayor parte de los procesos celulares relacionados con el DNA, tales como el control de la transcripción, la replicación, la recombinación o la reparación de daños lleva asociada la formación de complejos nucleoproteicos de orden mayor. En ellos no sólo son importantes las interacciones específicas del DNA con las proteínas, sino también las que se producen entre proteínas cuyos sitios de unión en el DNA están relativamente distantes unos de otros, de modo que para la formación de estas estructuras es necesario un cambio en la conformación del DNA que haga posible la aproximación de estos factores. Esta función la desempeñan las proteínas arquitectónicas, las cuales no son capaces de realizar por sí solas esas actividades específicas, sino que inducen en el DNA cambios conformacionales que facilitan el ensamblaje, la estabilidad y la actividad de complejos macromoleculares.

Las proteínas arquitectónicas participan en procesos biológicos muy diversos, no se encuentran relacionadas estructuralmente, exhiben plegamientos globales diferentes y emplean distintos motivos de unión para el reconocimiento de su sitio diana en el DNA (véase revisión de Bewley *et al.*, 1998). No obstante, presentan algunas propiedades físicas comunes, como son su abundancia relativa y su pequeño tamaño. La característica más importante que comparten es su capacidad de unirse al DNA a través del surco menor, produciendo una modificación local de su estructura (Werner *et al.*, 1996). Dada la escasa especificidad química del surco menor, el hecho de que todas estas proteínas tengan preferencia por unirse a estructuras precurvadas y cruciformes de DNA (Zlatanova y Van Holde, 1998) sugiere que la conformación intrínseca del DNA

es un elemento guía para el reconocimiento de sus sitios de unión (Pérez-Martín y de Lorenzo, 1997).

En este trabajo se estudia la función reguladora de la proteína CarD de *Myxococcus xanthus*, así como sus relaciones funcionales con la proteína IhfA. Ambas proteínas contienen dominios de unión que muestran homología con proteínas arquitectónicas para las que ya se han resuelto las estructuras tridimensionales unidas a su DNA diana (Figura 1.1). Éstas son el factor de integración del hospedador (IHF) (Rice *et al.*, 1996) y las proteínas HMGA (Huth *et al.*, 1997), que se describen a continuación.

I.1.1 El factor IHF

El factor IHF (del inglés, *Integration Host Factor*) fue identificado como un elemento necesario para la recombinación específica de sitio del colifago λ con el cromosoma de *Escherichia coli* (Miller y Friedman, 1980; Nash, 1981). Esta proteína arquitectónica forma parte de la familia de proteínas denominadas *histone-like*, debido a que se encuentran asociadas al nucleóide bacteriano y parecen ser las responsables de la condensación del DNA en organismos procarióticos (Drlica y Rouvière-Yaniv, 1987; White *et al.*, 1989; Oberto *et al.*, 1994; Sandman *et al.*, 1998).

En *E. coli* se encuentra en forma de heterodímeros compuestos por una subunidad α y una β , cifradas en los genes *ihfA* e *ihfB*, respectivamente (Weisberg *et al.*, 1996). Las dos subunidades muestran una similitud de secuencia del 30 % aproximadamente (Nash *et al.*, 1987). IHF participa en una amplia gama de procesos que incluyen la recombinación específica de sitio (Yu y Haggard-Ljungquist, 1993; Blomfield *et al.*, 1997; Goodman y Kay, 1999), la replicación

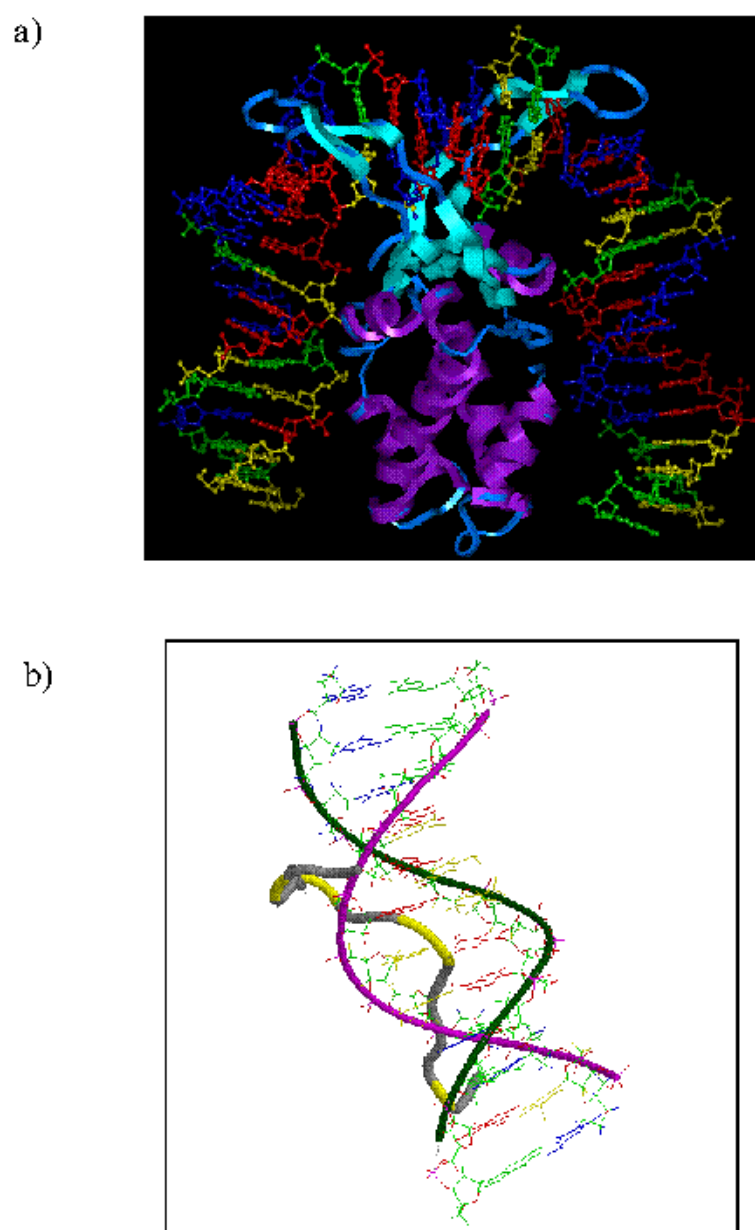


Figura 1.1 Estructura tridimensional del factor IHF de *E. coli* unido al DNA (a) y del motivo *gancho AT* de la proteína HMGA humana intercalado en el surco menor del DNA (b).

del DNA (Schmid, 1990; Hwang y Kornberg, 1992; Nash, 1996; Grimwade *et al.*, 2000), la transposición (Chalmers *et al.*, 1998; Korak y Kivisaar, 1998; Sakai *et al.*, 2000) y el control de la transcripción (revisado en Goosen y van de Putte, 1995). En todos estos procesos, IHF parece actuar como un elemento estructural que ayuda a la formación de complejos nucleoproteicos, curvando el DNA en sitios concretos.

I.1.1.1 Estructura y unión específica al DNA

IHF protege una región de DNA de unos 40 pb de la digestión con DNaseI. Una secuencia consenso (sitio *ihf*) de 13 pb, (A,T)ATCAANNNTT(G,A) (Craig y Nash, 1984; Goodrich *et al.*, 1990), está situada asimétricamente en la mitad 3' de la región de 40 pb. El resto de la secuencia parece ser también importante para la formación de complejos estables entre IHF y el DNA (van Rijn *et al.*, 1991). En la mitad 5' del consenso se encuentran habitualmente segmentos ricos en pares A-T, y se sabe que estas secuencias confieren una estabilidad importante en la unión de IHF (Hales *et al.*, 1994). En la determinación de la afinidad de IHF por sitios específicos parece ser más importante la conformación adoptada por el DNA que los contactos específicos con las bases, ya que IHF parece seleccionar su sitio de unión basándose principalmente en las restricciones estructurales impuestas por el DNA. En los tramos de DNA ricos en bases A y T el surco menor tiende a ser más estrecho de lo habitual, pudiendo alojar más cómodamente a la proteína (Nelson *et al.*, 1987; Rice *et al.*, 1996).

Rice *et al.* (1996) resolvieron la estructura cristalina de un complejo del IHF unido a un fragmento de DNA correspondiente al sitio de integración del fago λ . Observaron que la unión de IHF al surco menor provoca una curvatura en

el DNA mayor de 160°, de modo que el DNA que se encuentra rodeando a la proteína, invierte la dirección del eje de la hélice en una distancia pequeña. Las dos subunidades de IHF se “enroscan” formando un cuerpo central compacto, del que se extienden dos lazos β en forma de brazos que envuelven al DNA a lo largo del surco menor. Al final de cada brazo, un residuo de prolina intercala su cadena lateral entre las bases produciendo el desapilamiento de éstas. Otros aminoácidos estabilizan el complejo mediante puentes de hidrógeno con pares AT del sitio *ihf* o mediante interacciones electrostáticas entre el cuerpo de la proteína cargado positivamente y el esqueleto de fosfatos del DNA.

I.1.1.2 IHF como factor arquitectónico en el control de la transcripción

Como se indicó anteriormente, IHF fue identificado como un factor necesario para la recombinación específica de sitio del fago λ con el cromosoma hospedador (Miller y Friedman, 1980; Nash, 1981). El hecho de que DNA intrínsecamente doblado careciera de ese requerimiento de IHF (Goodman *et al.*, 1992) sugirió que su función era simplemente la de curvar el DNA. Posteriormente se demostró que IHF afecta a los niveles de expresión de un gran número de genes (Arfin *et al.*, 2000) y parece que un mecanismo similar opera en la función de IHF como activador transcripcional.

Para el funcionamiento de algunos promotores dependientes de σ^{54} en distintas especies de bacterias es necesaria una proteína activadora que se une normalmente 100 pb o más aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción (Kustu *et al.*, 1989). En muchos casos se ha encontrado un sitio *ihf* entre el sitio de unión al activador y el promotor. En estos promotores, IHF facilita la formación de un lazo que pone en contacto la proteína activadora con la

polimerasa de RNA (Hoover *et al.*, 1990; Claverie-Martin y Magasanik, 1991). Este tipo de acción reguladora no queda restringida a promotores dependientes de σ^{54} , sino que parece ocurrir también en promotores de *E. coli* dependientes de σ^{70} (Schröder *et al.*, 1993; Colland *et al.*, 2000).

Además, se ha demostrado que el bucle formado por IHF reduce interacciones inespecíficas entre la polimerasa de RNA y otras proteínas activadoras que pueden unirse a las regiones intensificadoras cuando éstas no se sitúan en la posición correcta con respecto a la curvatura, actuando de este modo como un agente restrictivo en la especificidad de los promotores (Pérez-Martín y de Lorenzo, 1995; Dworkin *et al.*, 1998).

El papel estructural de IHF ha sido confirmado mediante la sustitución funcional del sitio *ihf* por DNA curvado intrínsecamente (Molina-López *et al.*, 1994; Pérez-Martín *et al.*, 1994). Además, se han identificado versiones mutantes de la proteína capaces de activar la transcripción en mayor o menor grado que IHF silvestre (Engelhorn y Geiselmann, 1998; Giladi *et al.*, 1998). Se ha comprobado que todos estos alelos mutantes poseen menor afinidad por el DNA y que la curvatura producida tras la unión es menos pronunciada. Parece claro, por tanto, que el mecanismo de activación transcripcional por IHF depende en gran medida de la modulación de la geometría del DNA y que la optimización (y no maximización) del ángulo de curvatura es un factor importante en la activación de la transcripción por IHF en los promotores citados (Engelhorn y Geiselmann, 1998).

Se ha comprobado que IHF es capaz de inhibir la transcripción de varios promotores de *E. coli*, tanto *in vivo* como *in vitro*. IHF parece actuar en algunos casos como un represor clásico, al encontrarse uno o más sitios de unión a dicho factor en las propias regiones promotoras -10 y/o -35 (Griffo *et al.*, 1989; Kur *et*

al., 1989; Tsui *et al.*, 1991; Pagel *et al.*, 1992; Ditto *et al.*, 1994; Browning *et al.*, 2000). Otras veces, IHF inhibe la transcripción indirectamente, modulando la función de una proteína reguladora (Slauch y Silhavy, 1991; Ramani *et al.*, 1992).

Por otro lado, se ha comprobado que en tres promotores diferentes IHF estimula la transcripción directamente, sin la participación de ningún otro factor transcripcional. En este tipo de regulación positiva, IHF se une inmediatamente aguas arriba del promotor, estabilizando, de alguna manera, el anclaje de la polimerasa de RNA (Krause y Higgins, 1986). Se ha propuesto que el extremo carboxilo de la subunidad α de la polimerasa de RNA sería el responsable de esta activación, bien por interacción con el DNA de la zona 5' (Parekh y Hatfield, 1996; Engelhorn y Geiselmann, 1998) o bien por interacción directa con el propio IHF (Giladi *et al.*, 1998).

I.1.2 Otros factores arquitectónicos procarióticos

En el nucleóide de *E. coli* se encuentran además otras proteínas de la familia *histone-like*, encargadas de la organización del material genético y de mantener la arquitectura del cromosoma. La más abundante de ellas y la primera en caracterizarse fue HU (Rouvière-Yaniv y Gros, 1975; Murphy y Zimmerman, 1997), una proteína muy relacionada estructuralmente con IHF, cuya diferencia fundamental es la inespecificidad de su unión al DNA. Posteriormente se encontraron otras proteínas pequeñas, tales como IHF, H-NS, FIS y Lrp, también asociadas al nucleóide (Drlica y Rouvière-Yaniv, 1987; White *et al.*, 1989; Oberto *et al.*, 1994; Sandman *et al.*, 1998). Para cada una de estas proteínas se han podido aislar mutantes nulos de *E. coli* que tan sólo presentan un defecto débil en su crecimiento, indicando que cada proteína individual no es esencial para la célula.

Este hecho se debería a un solapamiento parcial de sus funciones, ya que la ausencia de varias de estas proteínas causa fenotipos más severos. Las células que no producen HU ni IHF tienen forma filamentosa y crecen muy lentamente; la anulación adicional de H-NS es letal para la célula (Yasuzawa *et al.*, 1992).

La estructura del nucleóide bacteriano depende de la presencia o ausencia de proteínas arquitectónicas específicas en un momento determinado. Se ha comprobado que la expresión de las proteínas *histone-like* varía a lo largo de la curva de crecimiento. IHF, HU y H-NS aumentan su expresión cuando las células alcanzan la fase estacionaria, mientras que FIS disminuye (Sandman *et al.*, 1998). Este hecho es consistente con la distinta estructura cromosómica que se observa en células en crecimiento exponencial cuando se compara con las células que han entrado en la fase estacionaria.

I.1.3 Las proteínas HMG

I.1.3.1 Características generales

La familia de proteínas HMG (del inglés, *High Mobility Group*) fue descubierta hace más de 30 años en células de mamíferos como un grupo de proteínas no histónicas asociadas a la cromatina. Se nombraron así de acuerdo a sus propiedades de movilidad electroforética en geles de poliacrilamida. Aunque tienen en común su distribución ubicua, bajo peso molecular, solubilidad en ácido y riqueza de aminoácidos cargados tanto positiva como negativamente, se trata en realidad de un grupo muy heterogéneo que abarca tres familias estructuralmente distintas: la correspondiente a las proteínas HMG1/2, las proteínas HMG14/17 y el grupo de HMGI(Y). La nomenclatura de estas tres familias se ha revisado

recientemente con objeto de establecer unas normas sistemáticas para su clasificación, por lo que en adelante se denominarán HMGB, HMGN y HMGA, respectivamente (Bustin, 2001). Cada familia es un conjunto de proteínas distinto, con características estructurales particulares y un tipo específico de sitio de unión en el DNA, donde inducen cambios de conformación característicos (Bustin, 1999). Comparten su acción como elementos arquitectónicos, influyendo en actividades relacionadas con el DNA.

La proteína CarD de *M. xanthus* contiene un dominio de unión similar al de las proteínas pertenecientes a la familia HMGA. De ahí que únicamente se haga una breve revisión sobre este grupo de proteínas. Para otras familias, pueden consultarse las revisiones de Bustin y Reeves (1996), Bewley y colaboradores (1998), Bustin (1999) y Thomas y Travers (2001).

En mamíferos, la familia HMGA está constituida por tres miembros: las proteínas isomórficas HMGA1a y HMGA1b (antes denominadas HMGI y HMGY, respectivamente) y la proteína HMGA2 (anteriormente HMGC), que está muy relacionada con las anteriores. Las proteínas HMGA1a y HMGA1b humanas son idénticas en su secuencia de aminoácidos, a excepción de una delección interna de 11 aminoácidos en HMGA1b, generada por un procesamiento distinto de un mRNA común (Van de Wetering y Clevers, 1992). HMGA2 está determinada por un gen distinto (Bianchi *et al.*, 1989). Aunque parece que cada una de estas proteínas está especializada en funciones diferentes y no son sustituibles funcionalmente (Zhou *et al.*, 1998; Franck *et al.*, 1998), en adelante, se tratará de modo general del grupo HMGA, no haciéndose distinción entre ellas.

I.1.3.2 Estructura del grupo HMGA e interacción con el DNA

La característica fundamental de las proteínas HMGA es la presencia de un dominio de unión a DNA que consta de un núcleo central invariable, constituido por la secuencia palindrómica PRGRP, embebido en otros residuos básicos y de prolina (Reeves y Nissen, 1990). Este motivo, repetido tres veces en HMGA1, se denomina *gancho AT*. En éste, los residuos de prolina (P) inducen una curvatura en el esqueleto peptídico, el cual adopta una conformación de media luna que le permite ajustarse al surco menor de la doble hélice. Los residuos básicos de arginina (R) y lisina (K) estabilizan la unión neutralizando las cargas negativas de los grupos fosfatos del DNA (Reeves y Nissen, 1990). Este modelo de interacción con el DNA fue posteriormente confirmado por estudios de resonancia magnética nuclear (Huth *et al.*, 1997). Análisis detallados de la unión de HMGA1 al intensificador del interferón β muestran que cuando ésta se une al DNA, aunque altera su conformación, lo hace en menor grado que los factores arquitectónicos descritos anteriormente y, en realidad, parece que previene o incluso revierte distorsiones intrínsecas de la doble hélice (Falvo *et al.*, 1995; Huth *et al.*, 1997). Los cambios estructurales producidos tras la unión de HMGA al DNA facilitan la asociación de factores transcripcionales adicionales a la región intensificadora, interviniendo también las interacciones directas entre proteínas (Yie *et al.*, 1997).

Las regiones adyacentes a los *ganchos AT* también contribuyen a la unión con el DNA. Los miembros de la familia HMGA contienen una región rica en aminoácidos ácidos (Bustin *et al.*, 1990) cuya disposición con respecto a los dominios de unión a DNA es diferente en distintas HMGA, careciendo algunas incluso de él (Laux *et al.*, 1991; Nieto-Sotelo *et al.*, 1994a y b). Yie y colaboradores (1997) demostraron que este dominio ácido confiere especificidad a la unión al DNA, ya que una proteína carente de dicho dominio tiene mayor

afinidad por el DNA pero sin especificidad de secuencia. En este dominio ácido se encuentran secuencias consenso susceptibles de ser fosforiladas por la quinasa II de la caseína (CK2) y por la quinasa II dependiente de ciclina (Cdc2). En numerosos experimentos *in vitro*, se ha demostrado que estas quinasas fosforilan residuos de serina y treonina presentes en el dominio ácido (Palvino y Linnala-Kankkunen, 1989; Nissen *et al.*, 1991). Además, estudios con células sincronizadas en presencia de fósforo radiactivo demostraron que las HMGA son fosforiladas *in vivo* de manera dependiente del ciclo celular, y que esta fosforilación se produce en los mismos residuos de treonina que Cdc2 fosforila *in vitro* (Meijer *et al.*, 1991; Reeves y Nissen, 1995). Una combinación de experimentos de huella (*footprinting*) y otras aproximaciones bioquímicas han demostrado que las modificaciones postraduccionales de las proteínas HMGA por parte de las quinasas citadas debilitan distintos contactos entre los dominios de unión y elementos reguladores del promotor INF- β . Estos estudios también muestran que dicha fosforilación atenúa la actividad de HMGA1 como remodeladora de la curvatura intrínseca de dicho promotor (Schwanbeck *et al.*, 2000; Piekielko *et al.*, 2001).

Aunque las proteínas HMGA contienen tres repeticiones del *gancho AT*, proteínas nucleares procedentes de una gran variedad de organismos distintos poseen este motivo en una sola o múltiples copias (Aravind y Landsman, 1998), siendo este último el caso de la proteína CarD de *M. xanthus* (Nicolás *et al.*, 1996). Estas proteínas presentan con frecuencia otros motivos funcionales conocidos, tales como dominios histónicos, dedos de zinc u homeodominios. Estas regiones, así como el número y la distancia entre *ganchos AT* adyacentes parecen determinar la especificidad de la unión a la secuencia diana del DNA (Yie *et al.*, 1997; Frank *et al.*, 1998).

Las bases moleculares de la unión de HMGA1 al intensificador del gen $\text{TNF-}\beta$ se han estudiado mediante el análisis de una variedad de mutaciones en la proteína HMGA1 y en sus secuencias diana. Estos estudios indican que en el proceso de unión de HMGA1 al DNA existen tanto cooperaciones intramoleculares entre los *ganchos AT* de una misma proteína como cooperaciones intermoleculares entre distintas HMGA1 (Yie *et al.*, 1997).

En definitiva, los *ganchos AT* parecen servir para conducir y anclar a las proteínas en el surco menor de sus sitios de unión e inducir los cambios conformacionales que promueven la asociación de otros factores. Se considera que la especificidad y afinidad final de estos complejos reguladores sería el resultado de múltiples interacciones tanto entre las proteínas y el DNA como entre las propias proteínas, cada una de las cuales tendría una afinidad y especificidad relativamente bajas (Yie *et al.*, 1997; Bustin, 1999).

I.1.3.3 Las proteínas HMGA como factores arquitectónicos en el control de la transcripción

Numerosas pruebas involucran directamente a las proteínas HMGA en la regulación transcripcional, positiva o negativa, de un gran número de genes que se encuentran próximos a secuencias promotoras (o intensificadoras) ricas en pares AT. Los cambios conformacionales inducidos por HMGA en estas secuencias específicas, así como las interacciones entre proteínas, promueven el ensamblaje de activadores o represores de la expresión génica, facilitando y estabilizando su unión al DNA por el surco mayor (Huth *et al.*, 1997).

Como ejemplos importantes de control positivo por proteínas HMGA se han descrito la expresión del factor de necrosis tumoral β (TNF- β) (Fashena *et al.*,

1992), del interferón β (INF- β) (Thanos y Maniatis, 1992), de la subunidad α del receptor de interleuquina 2 (IL-2R α) (John *et al.*, 1995), de la selectina-E (Lewis *et al.*, 1994; Whitley *et al.*, 1994), del factor estimulador de colonias de macrófagos, (Himes *et al.*, 1996; Shang *et al.*, 1999), del gen EBNA1 del virus Epstein-Barr (French *et al.*, 1996) y, más recientemente, del receptor de insulina (Brunetti *et al.*, 2001).

HMGA1 ejerce una regulación negativa sobre la expresión, entre otros, del gen de la interleuquina 4 (IL-4) (Chuvpilo *et al.*, 1993), de GP91-PHOX (Skalnik y Neufeld, 1992), de la cadena pesada de la inmunoglobulina G embrionaria de ratón (ν -IgG) (Wang *et al.*, 1995) y del receptor α de células T (Bagga y Emmerson, 1997).

El ejemplo mejor caracterizado de la acción reguladora de HMGA1 se encuentra en el intensificador inducible por virus del INF- β humano. La unión específica de HMGA1 a cuatro elementos reguladores presentes en el promotor (PRDII, PRDIV, PRDIII-I y NRDI), dispuestos en la misma cara de la hélice, es el paso inicial para el reclutamiento de los factores de transcripción NF- κ B, ATF2/c-Jun e IRF-1, un proceso que culmina en el ensamblaje de un complejo nucleoproteico en el intensificador del gen INF- β (Du *et al.*, 1993; Thanos y Maniatis, 1992 y 1995). La formación de esta estructura es dependiente tanto de la modificación de la conformación del DNA por parte de HMGA1 como de contactos específicos entre HMGA1 y los factores de transcripción anteriores.

En el caso del promotor INF- β de ratón, experimentos *in vitro* y de transfección transitoria o permanente de promotores portadores de mutaciones en el sitio diana de HMGA1a han demostrado que la histona H1 contribuye a la represión basal del gen, a través de su unión a tramos AT situados aguas arriba del promotor (Bonnefoi *et al.*, 1999). La proteína HMGA1a se comportaría como un

antirrepresor del promotor INF- β , desplazando a la histona de su sitio de unión y promoviendo la conversión de un estado reprimido a otro activo. Este papel antirrepresor en el control transcripcional ya se había atribuido a las proteínas HMGA anteriormente (Reeves, 1992; Kas *et al.*, 1993; Zhao *et al.*, 1993; Strick *et al.*, 1995).

I.1.3.4 Otras funciones celulares de HMGA

Las proteínas HMGA participan en funciones nucleares adicionales. Parecen ser elementos importantes en la estructura de los cromosomas metafásicos, interviniendo en el patrón clásico observado de bandas cromosómicas (Saitoh y Laemmli, 1994). Además, se ha comprobado que son factores del hospedador necesarios para la formación de los complejos de preintegración de los virus de inmunodeficiencia humana I (Farnet y Bushman, 1997) y de la leucemia murina Moloney (Li *et al.*, 1998).

Pero la observación que ha despertado más interés en estos últimos años es la sorprendente correlación entre los altos niveles de expresión del gen HMGA1 y la capacidad de transformación neoplásica de células normales o el aumento del potencial metastásico de células tumorales. Las proteínas HMGA se expresan preferentemente durante el desarrollo embrionario temprano, siendo prácticamente indetectables en las células diferenciadas. Su desregulación se asocia con la alteración del crecimiento celular y la diferenciación, ya que se ha observado un nivel alto de su expresión en diversos tipos de tumores malignos (Chiappetta *et al.*, 1998; Zhou y Chada, 1998), lo cual condujo a proponer la alta expresión de estas proteínas como indicador diagnóstico de células transformadas (Chiappetta *et al.*, 1998). Su potencial oncogénico se ha confirmado mediante

técnicas que incluyen la eliminación del gen (*knock out*) o la transfección de construcciones antimensajero (Berlingieri *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1995). Además, se ha comprobado la existencia de numerosas reorganizaciones que implican a las regiones cromosómicas de los genes HMGA1 y HMGA2 en varios tumores benignos comunes, tales como lipomas, liomas uterinos y pólipos endometriales (Ashar *et al.*, 1995; Kazmierczak *et al.*, 1996; Tkachenko *et al.*, 1997). En la mayor parte de los casos, estas translocaciones fusionan el motivo de unión a DNA a otros dominios activadores de la transcripción, lo cual conduce a uniones inespecíficas que alteran el programa celular de expresión génica. La extendida implicación de las proteínas HMGA en numerosos tipos de cáncer ha hecho de éstas y de sus sitios de unión en el DNA una diana potencial para terapias antitumorales (Goodwin, 1998; Jayaraman *et al.*, 1998; Scala *et al.*, 2000).

I.2 EL GEN *carD* DE *M. xanthus*

I.2.1 Características generales de la bacteria *M. xanthus*

M. xanthus pertenece a las mixobacterias, un grupo de bacterias Gram-negativas, deslizantes, no fotosintéticas y con capacidad de comunicación celular. Fueron descritas y clasificadas taxonómicamente por Roland Thaxter (1982), y se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, habitando en el suelo, sobre material en descomposición o sobre excrementos de herbívoros. Son organismos quimioorganotrofos estrictamente aerobios, con capacidad de degradar moléculas extracelularmente (McCurdy, 1974). *M. xanthus* pertenece al suborden *Cystobacterineae* y se alimenta depredando otros microorganismos, de los cuales

utiliza el componente proteico como fuente de carbono, nitrógeno y energía mediante la liberación de una amplia gama de antibióticos y enzimas hidrolíticas (Dworkin, 1962).

Las mixobacterias han atraído la atención de numerosos investigadores debido a algunas características poco usuales entre los organismos procariotas, como son su organización social, su capacidad de desplazarse por deslizamiento sobre una superficie sólida y su complejo ciclo de vida. Éste se compone de dos fases: una vegetativa y otra de desarrollo multicelular. La fase vegetativa se produce cuando el medio externo es rico en nutrientes y en ella las células se multiplican por división binaria. Sin embargo, cuando las condiciones ambientales no son favorables, se inicia el proceso de desarrollo multicelular, que da lugar a la formación de cuerpos fructíferos y mixosporas (véase el texto de Dworkin y Kaiser, 1993 o la revisión de Dworkin, 1996).

El tamaño del genoma de *M. xanthus* se ha estimado en 9.454 Kb (Chen *et al.*, 1990), siendo uno de los mayores conocido en las bacterias. Su contenido en G+C es cercano al 70%. En los genes de *M. xanthus* que han sido secuenciados, alrededor de un 90% de los codones contienen una G o una 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).

I.2.1.1 El proceso de desarrollo multicelular

El comportamiento social de las mixobacterias se pone claramente de manifiesto durante la fase de desarrollo. En ésta se observan algunas características propias de organismos multicelulares, tales como el reconocimiento y la señalización intercelular, y la morfogénesis espacial combinada con la aparición de tipos celulares especializados. Cuando se priva a *M. xanthus* de nutrientes, alrededor de 100.000 células comienzan un proceso de migración hacia un centro de agregación que culmina en la formación de una estructura denominada cuerpo fructífero (Shimkets y Kaiser, 1982; Kaiser y Kroos, 1993; Dworkin, 1996). Los cuerpos fructíferos de *M. xanthus* tienen forma esférica y el tamaño de su diámetro es de 0,1-0,5 mm. Dentro de ellos, las células vegetativas se diferencian en formas de resistencia denominadas mixosporas. La esporulación se completa unas 48 horas después del inicio del proceso. Cuando las condiciones del medio dejan de ser adversas, las mixosporas germinan, dando lugar nuevamente a células vegetativas (Kaiser y Kroos, 1993) (Figura 1.2).

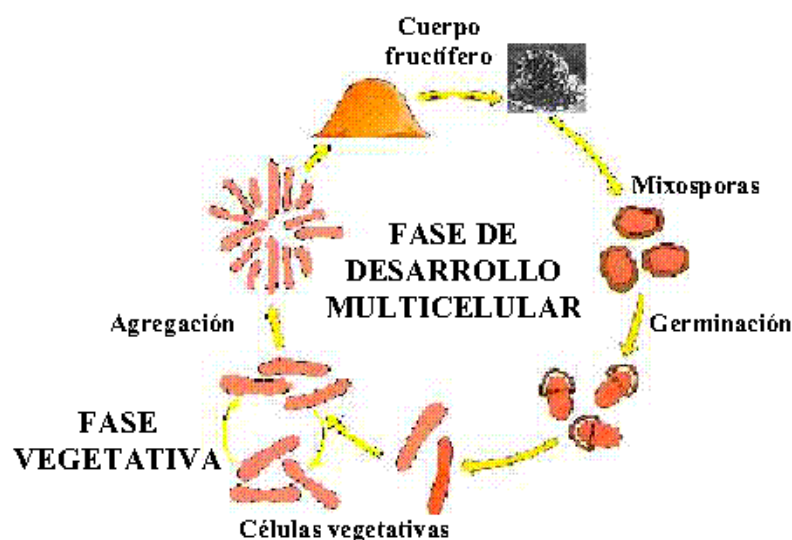


Figura 1.2 Ciclo de vida de *M. xanthus*.

El desarrollo multicelular coordinado requiere la existencia de mecanismos de comunicación entre las células. La primera aproximación que se empleó para el

estudio de la comunicación intercelular fue el aislamiento de mutantes de *M. xanthus* que no fueran capaces de formar cuerpos fructíferos maduros de modo autónomo, pero que sí lo fueran cuando se mezclaban con mutantes de distinto tipo (Hagen *et al.*, 1978). El análisis de mutantes permitió clasificarlos en cinco clases fenotípicas, conocidas como A_{sg}, B_{sg}, C_{sg}, D_{sg} y E_{sg} (los genes afectados respectivos se denominan *asg*, *bsg*, *csg*, *dsg* y *esg*). Estas clases se establecieron sobre la base de que los mutantes de cada una de ellas eran complementados fenotípicamente sólo por mutantes de cualquiera de las otras clases y por el tipo silvestre. Por tanto, estas estirpes mutantes son defectuosas en la producción, pero no en la recepción o procesamiento, de sustancias solubles o mediadoras de contactos celulares que actúan como señales intercelulares durante el proceso de desarrollo. Se habla así de los cinco factores o señales intercelulares A, B, C, D y E (Kaiser y Kroos, 1993).

Los mutantes de cada grupo de complementación están bloqueados en una etapa temprana del desarrollo y, por tanto, es difícil determinar a través de la observación de su morfología el momento preciso en el cual actúan los genes afectados. Con el objeto de identificar unidades transcripcionales específicas del desarrollo, Kroos y Kaiser diseñaron el transposón Tn5-*lac* (1984) y lo emplearon para la búsqueda de inserciones cuya expresión de actividad β -galactosidasa aumentaba en condiciones de fructificación. De este modo, identificaron alrededor de 30 promotores distintos que se activaban única o preferentemente durante el desarrollo (Kroos *et al.*, 1986). La función de los genes correspondientes debe ser meramente accesoria para los procesos de agregación o diferenciación, ya que las estirpes presentan un fenotipo Fru⁺. Sin embargo, la utilización de estas inserciones de Tn5-*lac* como marcadores de desarrollo ha permitido establecer relaciones de dependencia total o parcial de los promotores

con las distintas señales intercelulares, así como un orden general de participación de dichas señales (Kroos y Kaiser, 1984 y 1987; Kroos *et al.*, 1986; Kuspa *et al.*, 1986). Una mutación de un grupo de complementación que inactiva la expresión de un marcador determinado interrumpirá la ruta de desarrollo en una etapa anterior a la inducción del promotor correspondiente. Dado que cada grupo de complementación muestra un patrón de expresión de marcadores particular, puede deducirse que cada grupo está afectado en una etapa diferente del desarrollo (Shimkets, 1999). En general, se ha establecido que los factores A y B se requieren inmediatamente después de la detección de las condiciones de ayuno (afectan a los marcadores de expresión más temprana), mientras que D y C intervienen, respectivamente, 4 y 6 horas más tarde. La señal E participa en el desarrollo en una etapa intermedia entre los grupos A, B y D, C. Sin embargo, contrariamente a lo que ocurre durante el proceso de esporulación en *Bacillus subtilis* (Losick y Kroos, 1989), en *M. xanthus* no existe una secuencia lineal de hechos dependientes unos de otros. Marcadores del desarrollo controlados por diferentes señales pueden expresarse al mismo tiempo, y marcadores dependientes de una misma señal se expresan en momentos muy distintos (Kaiser y Kroos, 1993).

Análisis genéticos y bioquímicos han permitido identificar la mayoría de los genes responsables de las distintas señales intercelulares y establecer muchas de sus funciones durante el desarrollo. En particular, han sido bien caracterizadas las clases Asg y Csg.

Clase Asg

Los defectos observados en el grupo de complementación A son debidos a mutaciones en cinco loci genéticos: *asgA*, *asgB*, *asgC* (Kuspa y Kaiser, 1989; Plamann *et al.*, 1994; Plamann *et al.*, 1995; Davis *et al.*, 1995), *asgD* (Cho y Zusman, 1999) y *asgE* (Garza *et al.*, 2000). Los mutantes correspondientes están afectados en una fase muy temprana del desarrollo, indicando que la señal A se requiere en los primeros estadios del mismo (Kuspa *et al.*, 1986). El factor A obtenido de células silvestres rescata la agregación y la esporulación de distintos mutantes *asg* (Kuspa *et al.*, 1986, 1992a y 1992b). La señal A tiene dos componentes, uno de ellos no dializable y sensible al calor y otro que atraviesa una membrana de diálisis y resulta estable al calor. El primero consiste en una mezcla de proteasas activas sobre diferentes sustratos. La fracción dializable ha sido purificada y contiene un conjunto de determinados aminoácidos (Kuspa *et al.*, 1992b; Plamann *et al.*, 1992). Observaciones genéticas y bioquímicas han llevado a proponer que la señal A es realmente una mezcla de determinados aminoácidos, de modo que la liberación extracelular de proteasas y proteínas por las células silvestres generaría primero péptidos y luego dichos aminoácidos. Éstos deben alcanzar una concentración mínima en el medio para actuar como señal A. De esta manera, la señal A sirve como indicador de la densidad celular, determinando si es adecuada para iniciar el proceso de desarrollo (Kaiser y Kroos, 1993; Shimkets, 1999). El análisis de las secuencias de DNA de los genes *asg* sugiere que éstos determinan componentes de una ruta de transducción que regula la expresión de genes necesarios para la producción de la señal A (Plamann *et al.*, 1994 y 1995; Davis *et al.*, 1995)

Clase Csg

Todas las mutaciones *csg* afectan al mismo locus, denominado *csgA* (Shimkets y Asher, 1988). Dichas mutaciones interrumpen el proceso de desarrollo en una fase posterior a la de los mutantes *asg*, bloqueando total o parcialmente todos los marcadores moleculares que se expresan a partir de las seis horas (Kroos *et al.*, 1986; Kroos y Kaiser, 1987). A diferencia del factor A, el factor C no se excreta al medio, sino que se encuentra expuesto en la matriz extracelular (Shimkets y Rafiee, 1990). La señal C requiere contactos íntimos entre las células para ejercer su papel morfogénico (Kim y Kaiser, 1990a; Sager y Kaiser, 1993a). Además, es imprescindible que el mecanismo de motilidad sea operativo y requiere una orientación espacial crítica de las células (Kim y Kaiser, 1990b y 1990c). Ello sugiere que las células han de desplazarse hasta alcanzar un cierto grado de empaquetamiento para que se produzca el intercambio de la señal C. Kim y Kaiser (1991) demostraron que conforme avanza el proceso de desarrollo se necesitan concentraciones crecientes del factor C, requiriéndose la máxima cantidad de proteína CsgA en el momento de la esporulación (Li *et al.*, 1992; Hagen y Shimkets, 1990). Esta observación ha llevado a proponer que los niveles del factor C controlan dos acontecimientos morfológicos distintos, la agregación y la esporulación, garantizando que se produzcan en la secuencia adecuada.

En resumen, las señales A y C parecen servir como sensores de *quórum* celular en momentos diferentes del desarrollo. La señal A controla, en condiciones de escasez de nutrientes, que exista una densidad de células adecuada para comenzar el proceso de desarrollo, mientras que la señal C controla que las células estén suficientemente empaquetadas para avanzar hasta las fases de agregación y esporulación.

I.2.1.2 La carotenogénesis en *M. xanthus*

En el hábitat natural de *M. xanthus* las células quedan fácilmente expuestas a la luz. La radiación luminosa genera agentes oxidantes que pueden reaccionar con lípidos de membrana, proteínas o ácidos nucleicos, dañando los componentes celulares. Por tanto, para su supervivencia es necesaria la existencia de moléculas fotoprotectoras que eviten la lisis celular. *M. xanthus* responde a la luz con la producción de compuestos carotenoides (Burchard y Dworkin, 1966), cuya función es la de neutralizar estas especies moleculares oxidantes generadas por efecto de la luz (Rau, 1988; Bensansson *et al.*, 1993).

La síntesis de carotenoides es absolutamente dependiente de luz azul y aumenta sensiblemente cuando las células alcanzan la fase estacionaria. Es la responsable del cambio de color que se observa en las colonias, que pasan de ser amarillas en la oscuridad a rojas tras la iluminación. Este cambio de color, fácilmente observable, ha facilitado el aislamiento de mutantes. Éstos se agrupan en dos clases fenotípicas: la clase de fenotipo negativo o Car⁻, que incluye a los mutantes incapaces de sintetizar carotenoides o sus precursores coloreados en presencia de luz, y la clase de fenotipo constitutivo o Car^C, que corresponde a las estirpes que sintetizan carotenos de forma independiente de la luz, presentando siempre un color rojo (Figura 1.3).



Figura 1.3 Ejemplos de mutantes Car^C y Car^- . Foto cedida por M. Fontes.

El análisis de mutantes Car^- y Car^C ha sido un método básico en la caracterización genética de la carotenogénesis. Estos mutantes han sido obtenidos de manera espontánea o mediante diversas técnicas de mutagénesis, que incluyen el tratamiento con luz ultravioleta, la nitrosoguanidina, el transposón Tn5 o su derivado Tn5-*lac*. El estudio de dichos mutantes ha permitido identificar tanto genes estructurales, que determinan enzimas que participan en la ruta de síntesis de carotenoides, como genes reguladores, que median la respuesta a la luz azul (Hodgson y Murillo, 1993).

Control genético de la carotenogénesis

El estímulo de la luz pone en marcha una red de acciones reguladoras que conduce a la activación transcripcional de los genes de la carotenogénesis. El modelo actual de esta red de acciones reguladoras se ilustra en la Figura 1.4. Los genes estructurales se encuentran en dos sitios cromosómicos no ligados: el operón *carB* y el locus *crtI*. El operón *carB*, cuya expresión es dependiente de iluminación con luz azul, incluye los genes necesarios para la síntesis de fitoeno (el primer precursor carotenóide de 40 átomos de carbono) y otros genes que

actúan posteriormente en la ruta carotenogénica (Ruiz-Vázquez *et al.*, 1993; Botella *et al.*, 1995). El producto del gen *crtI* interviene en la deshidrogenación del fitoeno. Su expresión es también inducida por la luz, pero requiere además que las células hayan alcanzado la fase estacionaria (Fontes *et al.*, 1993).

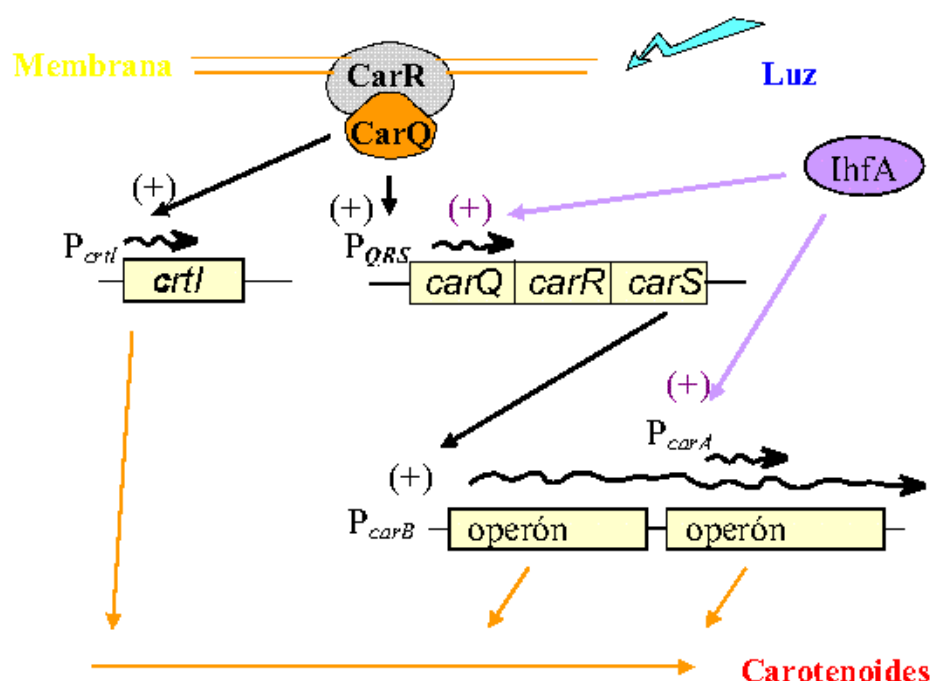


Figura 1.4 Modelo actual de la regulación genética de la carotenogénesis en *M. xanthus*.

El efecto de la luz sobre la expresión de los genes estructurales está mediado por varios genes reguladores. Tres de ellos, *carQ*, *carR* y *carS* se agrupan en el operón *carQRS*, también bajo el control de un promotor inducible por luz (en adelante, P_{QRS}) (McGowan *et al.*, 1993). La proteína CarQ es un tipo de factor σ^{70} perteneciente a la subfamilia ECF (del inglés, *extracytoplasmic function*), denominada así debido a que sus miembros están implicados en la transcripción de genes cuyos productos, en general, tienen función

extracitoplasmática (Lonetto *et al.*, 1994; Gorham *et al.*, 1996). CarQ es necesario para la activación del promotor P_{QRS} y del promotor del gen *crtI* (en adelante, P_{crtI}) (Martínez-Laborda y Murillo, 1989; Fontes *et al.*, 1993; Hodgson, 1993). El producto del gen *carS* es un péptido pequeño que no presenta homología global con ninguna proteína conocida. Sin embargo, contiene un dominio similar a otro presente en ferroproteínas implicadas en la transferencia de electrones, así como una secuencia consenso que se encuentra en proteínas que participan en la transferencia de protones a través de membrana (Cervantes, 2000). La proteína CarS es necesaria y suficiente para la activación del promotor de *carB* (en adelante, P_{carB}) (McGowan *et al.*, 1993). El mecanismo de acción de CarS es desconocido, pero diversas pruebas genéticas demuestran que la alta expresión de CarS en la luz provoca la inactivación de otra proteína, CarA, que actúa como represor de P_{carB} en la oscuridad (Botella *et al.*, 1995; Cervantes, 2000). El gen *carA* forma parte de un operón situado inmediatamente aguas debajo del operón *carB* y cuya expresión no es dependiente de la luz (Balsalobre *et al.*, 1987; Martínez-Laborda y Murillo, 1989). La proteína CarR es un regulador negativo de todo el sistema. Esta proteína de membrana actúa en la oscuridad como un factor antisigma, reteniendo a la proteína CarQ en la membrana (Gorham *et al.*, 1996). Así pues, en condiciones de oscuridad no hay expresión de los genes estructurales.

La iluminación de las células con luz azul inactiva de alguna manera a la proteína CarR, de modo que CarQ queda libre para ejercer su acción positiva sobre los promotores P_{QRS} y P_{crtI} . Esto tiene como consecuencia la acumulación de proteína CarS, que a su vez desreprime la expresión del operón *carB*. La expresión de los genes estructurales conduce a la síntesis y acumulación de compuestos carotenoides (Figura 1.4).

El gen regulador *ihfA*

Además del factor σ CarQ, la activación del promotor P_{QRS} requiere el producto del gen *ihfA*. Esta proteína es necesaria también para la expresión independiente de luz del operón *carA* (Figura 1.4) (Moreno *et al.*, 2001). El gen *ihfA* fue identificado en el mismo escrutinio de mutaciones por inserción del transposón Tn5 que dio lugar al descubrimiento de *carD* (Nicolás *et al.*, 1994), comentado en el apartado siguiente. Su posterior clonación, secuenciación y análisis de secuencia reveló que se trataba del gen ortólogo del gen *ihfA* de *E. coli*, que determina la subunidad α de IHF (Moreno *et al.*, 2001). Como ocurre en otras bacterias, el gen *ihfA* de *M. xanthus* participa en otros procesos no relacionados con la carotenogénesis. Una delección en fase que elimina parte del supuesto dominio de unión a DNA de la proteína IhfA (proteína IhfA2) provoca una serie de alteraciones que incluyen defectos en la motilidad, aumento del tiempo de generación, incapacidad de desarrollo multicelular y disminución de la tasa de recombinación. La expresión del gen *ihfA* está sometida a autorregulación negativa, es independiente de la luz y va aumentando de forma progresiva durante el crecimiento celular, alcanzando sus valores máximos en la fase estacionaria, tal y como sucede con el gen *ihfA* de *E. coli* (Aviv *et al.*, 1994).

Experimentos *in vitro* han demostrado que la proteína IhfA de *M. xanthus* se une a segmentos de DNA de P_{QRS} y del promotor del operón *carA* (P_{carA}) (Moreno, 1997). En dichos segmentos se encuentran secuencias similares a las reconocidas por la proteína IHF. En el caso del promotor P_{carA} , la supuesta secuencia de reconocimiento está situada más de 100 pb aguas arriba del inicio de la transcripción, en la posición -160 (Botella, 1996). Esto es consistente con la acción de IHF como factor arquitectónico descrita en el apartado I.I.1.2, según la

cual IhfA provocaría una curvatura en el DNA que pondría en contacto a proteínas activadoras de *carA* con la polimerasa de RNA. El promotor P_{QRS} contiene el sitio de unión de IhfA en la posición -35, aguas abajo del sitio de reconocimiento del activador CarD, objeto de estudio en este trabajo.

I.2.2 Identificación de *carD* y análisis genético

El gen *carD* fue identificado en el escrutinio de 11.000 inserciones independientes del transposón Tn5, que pretendía aislar mutaciones en nuevos genes de la carotenogénesis. En la mayoría de las colonias que presentaban un fenotipo Car⁻, el transposón Tn5 se había insertado en genes estructurales previamente caracterizados. Sin embargo, dos de las inserciones correspondían a nuevos loci. Una de ellas resultó afectar al gen *ihfA*, descrito en el apartado anterior, mientras que la segunda afectaba a otro locus no ligado. Éste fue denominado *carD* y su alelo mutante por inserción de Tn5, *carD1* (Nicolás *et al.*, 1994).

I.2.2.1 Acción del gen *carD* en la respuesta a la luz

La transferencia de la mutación *carD1* mediante su transducción a una estirpe que contenía una mutación en el gen *carR* (y presentaba, por tanto, un fenotipo Car^C) dió lugar a una estirpe cuyo fenotipo era Car⁻; es decir, la mutación *carD1* era epistática sobre la mutación *carR*⁻. Cuando se analizó la acumulación de carotenoides o de sus precursores en la estirpe mutante *carD1*, éstos no se detectaron ni en los cultivos incubados en condiciones de luz ni en los incubados en la oscuridad.

El análisis de la expresión de los promotores P_{QRS} , P_{crtI} y P_{carB} en presencia de la mutación *carD1* demostró que esta mutación inhibía la activación por la luz de dichos promotores, incluso en presencia de una mutación *carR*. Sin embargo, posteriormente se comprobó que el efecto sobre el promotor P_{carB} era tan sólo indirecto y se ejercía a través de su acción sobre P_{QRS} , ya que la proteína CarS es necesaria para la activación de P_{carB} . En una cepa en que la expresión del operón *carQRS* es independiente de luz y de *carD*, la activación de P_{carB} es también independiente de ambos factores. En las mismas condiciones, el promotor P_{crtI} continúa siendo dependiente de CarD. Por tanto, al igual que la proteína CarQ, el producto del gen *carD* es necesario para la activación inducible por la luz de los promotores P_{QRS} y P_{crtI} (Nicolás *et al.*, 1994; véase Figura 1.5).

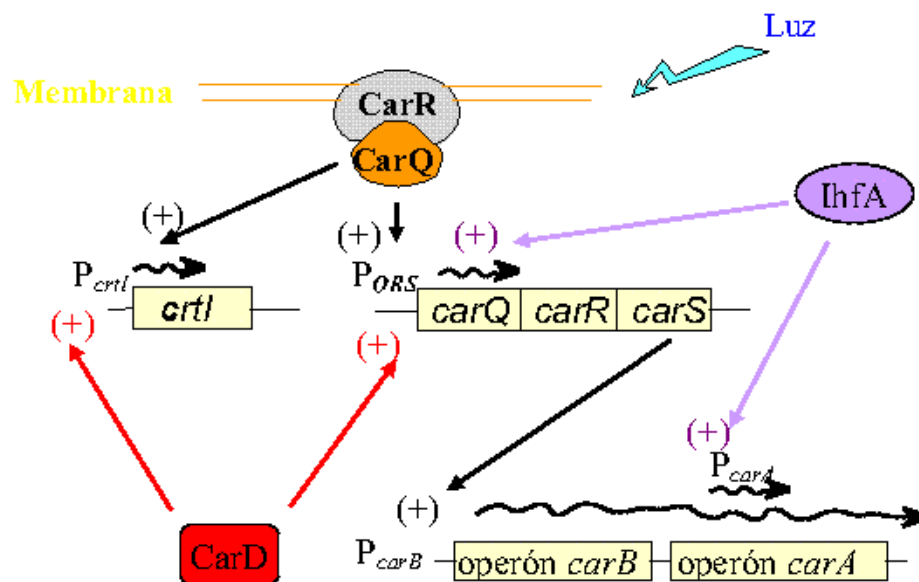


Figura 1.5 Acción de la proteína CarD en la carotenogénesis.

I.2.2.2 Acción del gen *carD* en el desarrollo multicelular

La mutación *carD1* no parece afectar al sistema de motilidad de *M. xanthus* (M. Elías, comunicación personal), pero sí impide el desarrollo de los cuerpos fructíferos y la esporulación en respuesta al ayuno (Nicolás *et al.*, 1994). Al emplear distintos marcadores de desarrollo de los mencionados en el apartado I.2.1.1 para determinar si la mutación *carD1* afectaba a su expresión, se comprobó que la proteína CarD era necesaria para la activación transcripcional de un grupo de genes dependientes parcial o totalmente de las señales A y C. Así pues, bien *carD* resulta necesario para que se produzcan esas señales, o bien participa en los mecanismos de activación génica que dependen de ellas (Nicolás *et al.*, 1994). Cuando se analizó el efecto de la mutación *carD1* sobre la expresión de los genes *asgA*, *asgB* y *csgA*, se comprobó que CarD modula negativamente la expresión de *asgA*, y positivamente la de los genes *asgB* y *csgA* (Cayuela, 1999).

Varios de los marcadores dependientes de la señal C y que se ven afectados por la mutación *carD1* no son dependientes de la señal A, más temprana. Así pues, CarD se requiere de manera independiente en dos momentos distintos del programa de desarrollo de *M. xanthus*, uno bajo el control de la señal A y otro bajo el control de la señal C. Como se ha indicado anteriormente, las señales A y C presentan características funcionales comunes. Ambas se liberan únicamente cuando se ha alcanzado una determinada densidad celular, operando como indicadores de ella en dos momentos diferentes del proceso de desarrollo.

I.2.2.3 Regulación de *carD*

El empleo de una fusión transcripcional del gen *lacZ* al promotor de *carD* ayudó a determinar la expresión de dicho promotor a lo largo de la curva de crecimiento. Los resultados de actividad β -galactosidasa indicaron que *carD* se transcribe activamente durante toda la fase vegetativa de manera independiente de la luz, lo cual es consistente con la ausencia de efecto de mutaciones en los genes reguladores de la carotenogénesis sobre la expresión del gen (Nicolás *et al.*, 1994). En cambio, los mismos ensayos realizados durante la fase de desarrollo revelaron un incremento en la expresión del gen tras el inicio del proceso, seguida de un descenso pronunciado entre cinco y seis horas después.

I.2.3 Caracterización molecular de la proteína CarD

La secuenciación del gen *carD*, contenido en un fragmento de 1,2 Kb que rescataba los fenotipos Car⁻ y Fru⁻ de la estirpe *carD1*, reveló diversos aspectos de interés (Nicolás *et al.*, 1994 y 1996). La secuencia de aminoácidos de la proteína CarD, deducida a partir de su secuencia de nucleótidos, indica que se trata de una proteína de 34 Kd de marcada organización estructural, con dominios bien definidos, entre los cuales destaca un motivo de unión a DNA precedido de una región rica en residuos ácidos. La existencia y disposición de estos dominios confieren a CarD atributos de factor transcripcional eucariótico. A continuación se describen los aspectos más relevantes de los distintos dominios de la proteína, representados en la Figura 1.6.

I.2.3.1 Organización estructural de la proteína CarD

El aspecto más notable de CarD es la presencia de cuatro copias de un dominio de unión a DNA en el extremo carboxilo de la proteína (Nicolás *et al.*, 1996). Dicho dominio es similar al *gancho AT* de las proteínas HMGA, descritas en el apartado I.1.3, y está constituido por cuatro repeticiones de un núcleo invariable de cuatro aminoácidos, Arg-Gly-Arg-Pro (RGRP), careciendo, por tanto, de la primera prolina del pentapéptido consenso (Figura 1.6).

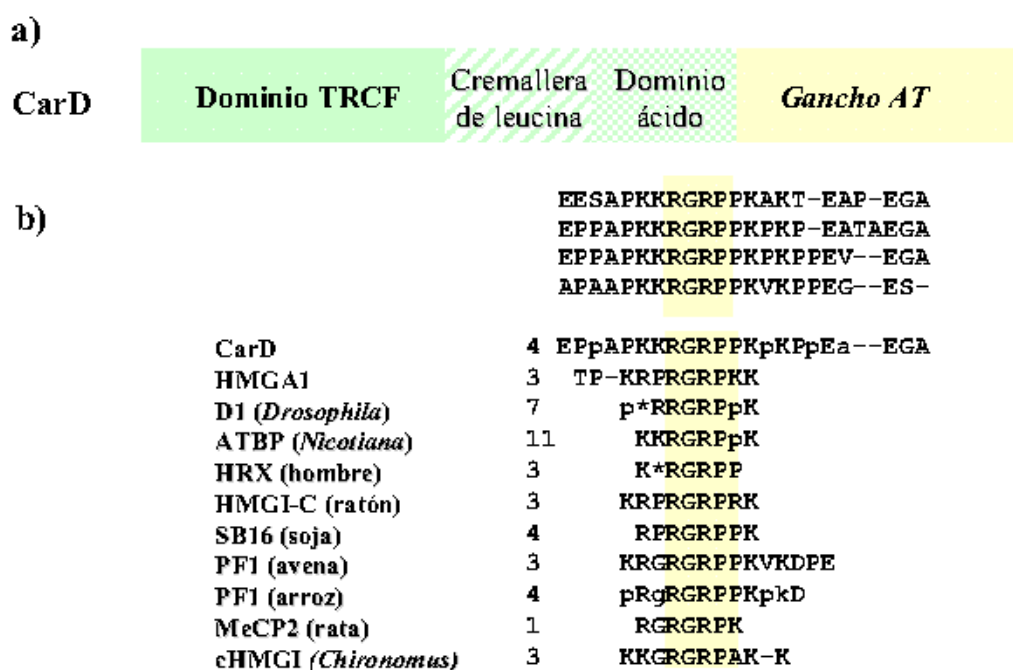


Figura 1.6 a) Organización estructural de CarD. Se representan los distintos dominios deducidos a partir de la secuencia de nucleótidos del gen *carD*. **b) Alineación de dominios *gancho AT* de distintas proteínas nucleares.** En la parte superior se muestra la alineación de los cuatro *ganchos AT* que forman el dominio de unión al DNA de la proteína CarD. En la parte inferior se alinean los aminoácidos que componen el *gancho AT* de la proteína HMGA1 y otras relacionadas de diferentes organismos (se muestran el consenso de cada una y el número de repeticiones del motivo RGRP).

Cada repetición está embebida en una secuencia de unos 20 aminoácidos rica en residuos básicos y de prolina, como ocurre en las proteínas con *ganchos AT*. *M. xanthus* es el primer organismo procariota en el cual se ha identificado este motivo de unión a DNA, descrito previamente sólo en proteínas nucleares de eucariotas. Posteriormente, se ha confirmado su presencia en otras mixobacterias del suborden *Cystobacterineae* (Cayuela, 1999).

A semejanza con los factores transcripcionales eucarióticos, el *gancho AT* de CarD está precedido por un dominio muy ácido, de unos 40 aminoácidos, en el que los residuos de ácido aspártico y ácido glutámico se agrupan en dos subregiones distintas. Entre estos residuos ácidos se encuentran intercaladas cinco serinas en un contexto (S/T-X-X-E/D) que las convierte en posibles dianas de fosforilación de la quinasa II de la caseína (CK2), también característica de eucariotas (Pinna, 1990). Aunque, hasta ahora, no se ha descrito ninguna proteína similar a CK2 en procariotas, en *M. xanthus* se han identificado varias quinasas de serina/treonina distintas y además, mediante experimentos *in vitro*, se ha comprobado que CK2 fosforila a CarD en residuos de serina de la región ácida (S. Padmanabhan, resultados no publicados). Ello sugiere que esta bacteria podría contar con sistemas de transducción de señales basados en cascadas de fosforilación similares a las encontradas en células eucarióticas (Zhang *et al.*, 1992; Jain e Inouye, 1998).

Delante de la región ácida, se encuentra una secuencia estructurada en hélice α que incluye una valina y tres leucinas situadas cada siete residuos, con algunos aminoácidos polares intermedios. Estas características se corresponden con el motivo conocido como *cremallera de leucinas*. Diversos factores transcripcionales eucarióticos contienen este motivo, que favorece la formación de homodímeros y/o heterodímeros, permitiendo así combinar en un solo

complejo proteico distintos dominios activadores o represores de la expresión de genes específicos (Pabo y Sauer, 1992).

Finalmente, el extremo amino de CarD muestra similitud con un dominio de la proteína TRCF (del inglés, *transcription repair coupling factor*) de distintas bacterias Gram⁺ y Gram⁻, incluida la propia *M. xanthus*. Dicho dominio es responsable de la unión de TRCF a la polimerasa de RNA. Como su nombre indica, TRCF acopla los procesos de transcripción y reparación (Selby y Sancar, 1994; Ayora *et al.*, 1996). Para ello, desplaza a la polimerasa de RNA que se encuentra “atascada” en un daño en el DNA y promueve la unión de la proteína de reparación UvrA a la lesión, de manera que aumenta la tasa de reparación de daños en la cadena de DNA que está siendo transcrita.

I.2.3.2 Unión de la proteína CarD al DNA

La secuencia 5' -GG(A/T)_n-3' (siendo *n* igual o mayor que cuatro) se ha establecido como “consenso” de las dianas de las proteínas HMGA (Thanos y Maniatis, 1993; Du *et al.*, 1993). En el promotor *P_{crII}* de *M. xanthus* no se encuentra una secuencia parecida a la citada secuencia consenso. Sin embargo, en el promotor *P_{QRS}*, también dependiente de la proteína CarD, aparecen dos repeticiones con dos copias adyacentes de la secuencia 5' -GGAAA -3', una repetición entre las posiciones -88 y -52 y la otra entre -34 y -22. Las dos copias de la primera repetición son muy parecidas al sitio de unión de la proteína HMGA1 al promotor del gen INF-β humano. Ensayos de retraso de movilidad electroforética (EMSA) demostraron que la proteína de fusión GST-CarD se unía a un oligonucleótido sintético que contenía la secuencia de DNA del primer doblete (Nicolás *et al.*, 1996). Dicha unión está mediada por los pares AT de esta

secuencia diana, ya que un oligonucleótido donde los pares AT se sustituyen por pares GC no es retrasado. Además, una versión truncada de la proteína carente de los últimos 102 residuos, que incluyen los cuatro *ganchos AT*, tampoco es capaz de unirse al oligonucleótido.

Como cabe esperar, la eliminación del sitio de unión de CarD en P_{QRS} tiene un efecto negativo sobre la actividad *in vivo* de este promotor. Esto se comprobó mediante la construcción de una fusión transcripcional del gen *lacZ* con un promotor que carecía de dicho sitio de unión, y su comparación con el promotor silvestre (Nicolás *et al.*, 1996). Tal efecto negativo de la delección del sitio diana sobre la expresión de P_{QRS} parece ser de la misma magnitud que el descrito previamente para una mutación de “falta de función” en el gen *carD* (Nicolás *et al.*, 1994).

I.3 ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Los trabajos previos comentados hasta ahora indican que el producto del gen *carD* es necesario para la activación de genes que participan en dos respuestas diferentes de *M. xanthus*, las respuestas a la luz y al ayuno. Su similitud con la proteína HMGA1, implicada en la regulación de diversos genes a través de la modulación de la geometría de la cromatina, hace pensar que *carD* determina una proteína que actúa sobre un amplio espectro de genes, participando posiblemente en otros procesos diferentes de la carotenogénesis y el desarrollo multicelular. Considerando ambos procesos, las rutas de transducción de dos estímulos ambientales diferentes (la luz o la escasez de nutrientes) convergen en un elemento común, la proteína CarD, para volver luego a separarse, activando dos conjuntos de genes distintos. La especificidad de estas respuestas ha de ser,

pues, el resultado de la interacción diferencial de CarD con otros elementos que conduce a la activación selectiva de unos u otros genes.

Partiendo de estos antecedentes, los objetivos de este trabajo han sido:

1. La identificación de promotores dependientes del gen *carD* que no estén implicados en la carotenogénesis ni en el proceso de desarrollo multicelular.
2. La caracterización de algunos de esos nuevos promotores regulados por *carD*, así como de los genes correspondientes.
3. La detección de posibles interacciones entre CarD y otras proteínas reguladoras de la carotenogénesis en cuanto a su acción sobre los nuevos promotores.
4. La obtención de mutaciones supresoras de mutaciones *carD⁻*, como forma de identificar otros productos génicos relacionados funcionalmente con CarD.

II. Materiales y Métodos

II.1. ESTIRPES BACTERIANAS Y BACTERIÓFAGOS

II.1.1. Estirpes bacterianas

La Tabla 2.1 recoge las estirpes de *M. xanthus* y *E. coli* utilizadas en este trabajo y la Tabla 2.2 muestra las estirpes de *M. xanthus* obtenidas en el transcurso del mismo. En ambas tablas se indica el genotipo, fenotipo y origen de las estirpes correspondientes. Otras cepas se irán introduciendo en el texto. Los plásmidos empleados se indican en la Tabla 2.3.

Las estirpes de *M. xanthus* derivan directa o indirectamente de DK101, cepa silvestre que presenta variación de fase en la pigmentación de las colonias (en la oscuridad pueden ser amarillas o morenas) y activación por la luz de la síntesis de carotenoides. La estirpe DK1050 es una variante espontánea de DK101 que no presenta variación de fase (o varía con frecuencia muy baja). La homogeneidad de coloración de sus colonias (amarillas en oscuridad) la hace especialmente útil para el análisis genético de la carotenogénesis. DK101 contiene además la mutación *pilQ1*, que afecta a la movilidad social. DK1622 se obtuvo a partir de DK101 por transducción de un fragmento que contiene la versión silvestre de *pilQ*, de modo que la estirpe DK1622 es capaz de formar cuerpos fructíferos simétricos. Por este motivo, DK1622 se utiliza habitualmente como estirpe silvestre en experimentos de fructificación (Kaiser, 1979; Wall *et al.*, 1999).

Las estirpes de *M. xanthus* se nombran con letras mayúsculas indicativas del laboratorio en el que fueron obtenidas (MR, Departamento de Genética, Universidad de Murcia; DK, Department of Biochemistry, Stanford University) seguidas de un número de aislamiento. Los *loci* de inserción del transposón Tn5 o alguno de sus derivados (Tn5-132 o Tn5-*lac*) se denominan con la letra Ω

seguida del nombre de la estirpe en la que la inserción fue aislada por primera vez.

Tabla 2.1 Estirpes utilizadas en este trabajo.

Estirpe	Fenotipo ^a	Genotipo	Origen o fuente
<i>M. xanthus</i>			
DK1050	Car ⁺ Fru ⁺		Ruiz-Vázquez y Murillo, 1984
DK1622	Car ⁺ Fru ⁺		Kaiser, 1979
MR132	Car ⁻ Fru ⁺	<i>carR4 carQ1</i>	Martínez-Laborda y Murillo, 1989
MR358	Car ⁻ Fru ⁻	<i>lhfA2</i>	Moreno <i>et al.</i> , 2001
MR397	Lac ⁺ Km ^R	<i>carQ::lacZ</i>	Nicolás <i>et al.</i> , 1994
MR522	Car ⁻ Fru ⁻ Tc ^R	<i>carD1::Tn5-132</i>	DK1050. Nicolás <i>et al.</i> , 1994
MR553	Lac ⁺ Km ^R	<i>crtl::lacZ</i>	Fontes <i>et al.</i> , 1993
MR563	Car ⁻ Fru ⁻ Tc ^R	<i>carD1::Tn5-132</i>	DK1622. Nicolás <i>et al.</i> , 1994
MR565	Lac ⁻ Km ^R	<i>carQ::lacZ carD1::Tn5-132</i>	Nicolás <i>et al.</i> , 1994
MR583	Lac ⁻ Km ^R	<i>crtl::lacZ carD1::Tn5-132</i>	Nicolás <i>et al.</i> , 1994
MR650	Car ⁻ Fru ⁻	<i>carD2</i>	DK1622. Nicolás <i>et al.</i> , 1994
ME1	Car ⁻ Fru ⁻	<i>carD3</i>	DK1050. Elías
<i>E. coli</i>			
DH10B	RecA ⁻		Gibco BRL
MC1061	RecA ⁺		Casadaban y Cohen, 1980
C600			Appleyard, 1954

^a Sólo se indican los fenotipos y genotipos de interés para este trabajo. Car⁺: fenotipo silvestre para la carotenogénesis; Car⁻: fenotipo negativo para la carotenogénesis. Fru⁺, fenotipo silvestre para la fructificación; Fru⁻, fenotipo negativo para la fructificación. Km^R: resistente a kanamicina. Tc^R: resistente a tetraciclina. Lac⁺: expresión de β-galactosidasa inducible por la luz; Lac⁻: expresión de β-galactosidasa reprimida por la mutación en el gen *carD*.

Tabla 2.2 Estirpes obtenidas en este trabajo

Estirpe (<i>M.xanthus</i>)	Fenotipo ^a	Genotipo ^b	Procedencia
MR900	Car ⁺ Fru ⁺ Lac ⁺ Km ^R	ΩMR900	DK1050
MR902	Car ⁻ Fru ⁻ Lac ⁻ Km ^R Tc ^R	ΩMR900 <i>carD1</i>	ΩMR900 x MR522
MR924	Car ⁺ Fru ⁺ Lac ⁺ Km ^R	ΩMR900	ΩMR900 x DK1622.
MR925	Car ⁻ Fru ⁻ Lac ^{+/} Km ^R	ΩMR900 <i>carD2</i>	ΩMR900 x MR650
MR1106	Car ⁻ Fru ⁻ Lac ^{+/} Km ^R	ΩMR900 <i>carD3</i>	ΩMR900 x ME1
MR915	Car ⁺ Fru ⁺ Lac ⁺ Km ^R	ΩMR915	DK1050
MR1156	Car ⁻ Fru ⁻ Lac ^{+/} Km ^R Tc ^R	ΩMR915 <i>carD1</i>	ΩMR915 x MR522
MR1140	Car ⁺ Fru ⁺ Lac ⁺ Km ^R	ΩMR915	ΩMR915 x DK1622
MR1187	Car ⁻ Fru ⁻ Lac ^{+/} Km ^R	ΩMR915 <i>carD2</i>	ΩMR915 x MR650
MR1190	Car ⁻ Fru ⁻ Lac ^{+/} Km ^R	ΩMR915 <i>carD3</i>	ΩMR915 x ME1
MR1100	Car ⁺ Fru ⁺ Lac ⁺ Km ^R	ΩMR1100	DK1050
MR1101	Car ⁻ Fru ⁻ Lac ⁺⁺ Km ^R Tc ^R	ΩMR1100 <i>carD1</i>	ΩMR1100 x MR522
MR1145	Car ⁺ Fru ⁺ Lac ⁺ Km ^R	ΩMR1100	ΩMR1100 x DK1622
MR1188	Car ⁻ Fru ⁻ Lac ^{+/} Km ^R	ΩMR1100 <i>carD2</i>	ΩMR1100 x MR650
MR1191	Car ⁻ Fru ⁻ Lac ^{+/} Km ^R	ΩMR1100 <i>carD3</i>	ΩMR1100 x ME1
MR1104	Car ⁺ Fru ⁺ Lac ⁺ Km ^R	ΩMR1104	DK1050
MR1105	Car ⁻ Fru ⁻ Lac ⁺⁺ Km ^R Tc ^R	ΩMR1104 <i>carD1</i>	ΩMR1104 x MR522
MR1151	Car ⁺ Fru ⁺ Lac ⁺ Km ^R	ΩMR1104	ΩMR1104 x DK1622
MR1189	Car ⁻ Fru ⁻ Lac ⁺⁺ Km ^R	ΩMR1104 <i>carD2</i>	ΩMR1104 x MR650
MR1190	Car ⁻ Fru ⁻ Lac ⁺⁺ Km ^R	ΩMR1104 <i>carD3</i>	ΩMR1104 x ME1
MR905	Car ⁻ Fru ⁺ Lac ⁺ Km ^R	ΩMR905	DK1050
MR1102	Car ⁻ Fru ⁺ Lac ⁺ Km ^R	ΩMR1102	DK1050
MR1137	Car ⁻ Fru ⁺ Lac ⁺ Km ^R	ΩMR900 <i>carQ1</i>	ΩMR900 x MR132
MR1136	Car ⁻ Fru ⁺ Lac ⁺ Km ^R	ΩMR900 <i>thfA2</i>	ΩMR900 x MR358
MR1139	Car ⁻ Fru ⁺ Lac ⁺ Km ^R	ΩMR915 <i>carQ1</i>	ΩMR915 x MR132
MR1138	Car ⁻ Fru ⁺ Lac ^{+/} Km ^R	ΩMR915 <i>thfA2</i>	ΩMR915 x MR358
MR1146	Car ⁻ Fru ⁺ Lac ⁺ Km ^R	ΩMR1100 <i>carQ1</i>	ΩMR1100 x MR132
MR1147	Car ⁻ Fru ⁺ Km ^R	ΩMR1100 <i>thfA2</i>	ΩMR1100 x MR358
MR1152	Car ⁻ Fru ⁺ Lac ⁺ Km ^R	ΩMR1104 <i>carQ1</i>	ΩMR1104 x MR132
MR1153	Car ⁻ Fru ⁺ Km ^R	ΩMR1104 <i>thfA2</i>	ΩMR1104 x MR358

MR1141	Car ⁺ Fru ⁺ Lac ⁺ Km ^R	P _{MF} :: <i>lacZ</i>	pMAR932 ^c x DK1050
--------	--	--------------------------------	-------------------------------

Tabla 2.2 (continuación)

Estirpe	Fenotipo	Genotipo	Procedencia
MR1142	Car ⁻ Fru ⁻ Lac ⁻ Km ^R Tc ^R	P _{MF} :: <i>lacZ carD1</i>	pMAR932 x MR522
MR1143	Car ⁻ Fru ⁻ Lac ^{+/+} Km ^R	P _{MF} :: <i>lacZ carD2</i>	pMAR932 x MR650
MR1158	Car ⁻ Fru ⁺ Lac ⁺ Km ^R Tc ^R	P _{MF} :: <i>lacZ sodA1 carD1</i>	MR522
MR1161	Car ⁻ Fru ⁻ Lac ⁺ Km ^R	P _{MF} :: <i>lacZ sodB1 carD2</i>	MR650
MR1163	Car ⁻ Fru ⁻ Lac ⁺ Km ^R	P _{MF} :: <i>lacZ sodC1 carD2</i>	MR650
MR1165	Car ⁻ Fru ⁺ Lac ⁻ Tc ^R	<i>sodA1 carD1</i>	MR1158
MR1168	Car ⁻ Fru ⁻ Lac ⁻	<i>sodB1 carD2</i>	MR1161
MR1170	Car ⁻ Fru ⁻ Lac ⁻	<i>sodC1 carD2</i>	MR1163
MR1177	Car ⁻ Fru ⁻ Lac ⁺ Km ^R	ΩMR900 <i>sodB1 carD2</i>	ΩMR900 x MR1168
MR1182	Car ⁻ Fru ⁻ Lac ⁺ Km ^R	ΩMR900 <i>sodC1 carD2</i>	ΩMR900 x MR1170
MR1171	Car ⁻ Fru ⁺ Lac ⁺ Km ^R	ΩMR900 <i>sodA1 carD1</i>	ΩMR900 x MR1165
MR1172	Car ⁻ Fru ⁺ Lac ⁺ Km ^R Tc ^R	ΩMR915 <i>sodA1 carD1</i>	MR1165 x MR915
MR1173	Car ⁻ Fru ⁺ Lac ⁺ Km ^R Tc ^R	ΩMR1100 <i>sodA1 carD1</i>	MR1165 x MR1100
MR1175	Car ⁻ Fru ⁺ Lac ⁺ Km ^R Tc ^R	ΩMR1104 <i>sodA1 carD1</i>	MR1165 x MR1104
MR1193	Car ⁻ Fru ⁺ Lac ⁻ Km ^R Tc ^R	<i>crtI::lacZ sodA1 carD1</i>	pMAR206 x MR1165
MR1194	Car ⁻ Fru ⁺ Lac ⁻ Km ^R Tc ^R	<i>carQ::lacZ sodA1 carD1</i>	pDAH217 x MR1165

^a Los fenotipos para la carotenogénesis, para el desarrollo multicelular y para la resistencia a antibióticos se denotan igual que en la Tabla 2.1. En esta tabla, el fenotipo para la expresión de actividad β-galactosidasa se representa como Lac⁺ (expresión normal de una fusión transcripcional con el gen *lacZ* en una cepa silvestre), Lac⁻ (supresión notable de dicha expresión debido a la mutación *carD*), Lac^{+/+} (supresión no tan notable) y Lac⁺⁺ (expresión superior a la normal debido a la mutación *carD*). Estos fenotipos se discutirán más detalladamente a lo largo del texto.

^b En la columna de genotipos, los número precedidos por la letra griega Ω aluden a los loci de inserción del transposón Tn5-*lac*.

^c El plásmido pMAR932 integrado en las estirpes MR1141-MR1143 contiene una fusión transcripcional de un promotor muy activo con el gen *lacZ*.

Tabla 2.3 Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Fuente o referencia
pBGS18	Spratt <i>et al.</i> , 1986
pDAH160	Hogdson, 1993
pDAH217	Hogdson, 1993
pDAH250	Hogdson, 1993
pDAH274	McGowan <i>et al.</i> , 1993
pMAR206	Fontes <i>et al.</i> , 1993
pMAR913	M. Fontes
pMAR932	M. Fontes
pBluescript	Short <i>et al.</i> , 1988

El fenotipo silvestre para la inducción por la luz de la síntesis de carotenoides se denomina Car⁺. Mutaciones en genes que afectan a dicho proceso (mutaciones *car*), provocando ausencia de carotenoides coloreados en cualquier situación producen un fenotipo Car⁻. Con respecto al desarrollo multicelular, el fenotipo silvestre para la formación de cuerpos fructíferos se indica como Fru⁺, mientras que las mutaciones que afectan a la capacidad de formar cuerpos fructíferos provocan un fenotipo Fru⁻. El transposón Tn5-*lac* confiere resistencia al antibiótico kanamicina (Km^R), en tanto que el transposón Tn5-*I32* confiere resistencia al antibiótico oxi-tetraciclina (Tc^R).

La estirpe DH10B de *E. coli* es deficiente en recombinación (RecA⁻), lo cual favorece la estabilidad de los plásmidos y la convierte en un huésped adecuado en experimentos de clonación. Esta estirpe lleva una mutación en el gen *lacZ* que puede ser complementada con plásmidos portadores de dicho gen. Para el empaquetamiento de plásmidos en el colifago P1 *cam clr*-100 se utilizó una estirpe RecA⁺ de *E. coli*, MC1061, ya que en dicho proceso están implicados fenómenos de recombinación. Para la obtención de lisados del fago P1::Tn5-*lac* se utilizó la estirpe C600.

II.1.2. Bacteriófagos

Para la transferencia de material genético entre estirpes de *M. xanthus* se utilizó el bacteriófago específico de esta especie MxLA27, que actúa como transductor generalizado (Avery y Kaiser, 1983). Este fago se multiplica a 26°C, pero no a 33°C.

Para la introducción en *M. xanthus* de DNA clonado en plásmidos de *E. coli* se usó el colifago P1 *cam ctr*-100 (Shimkets *et al*, 1983) que contiene un gen de resistencia a cloranfenicol (*cam*) y una mutación de termosensibilidad para la lisogenia (lisogénico a 30 °C y virulento a 38 °C). En adelante, y con objeto de simplificar, se hará referencia a este fago como P1.

Para la inserción aleatoria del transposón Tn5-*lac* en el genoma de *M. xanthus* se utilizó el colifago P1::Tn5-*lac* (Kuner y Kaiser, 1981).

II.2. MEDIOS DE CRECIMIENTO Y TAMPONES

II.2.1. Medios ricos para *M. xanthus*

CTT (Bretscher y Kaiser, 1978)

Bacto-casitona (Difco)	1%
Tampón Tris-HCl (pH 7,6)	10 mM
MgSO ₄	8 mM
Tampón fosfato (pH 7,6)	1 mM
Antes de la esterilización en autoclave se ajustó el pH a 7,6.	

1/2CTT (Hodgkin y Kaiser, 1977)

A diferencia del CTT, contiene 0,5% de Bacto-casitona.

CTTG

CTT más 10 µg/ml de gentamicina, esterilizada por filtración a través de filtro Millipore de 0,22 µm de diámetro de poro y añadida al medio CTT esterilizado previamente y enfriado hasta 50 °C.

CTTK

CTT más 40 µg/ml de kanamicina, esterilizada por filtración y añadida al medio CTT después de esterilizarlo y dejarlo enfriar hasta 50 °C.

CTTT

CTT más 10 µg/ml de oxitetraciclina, esterilizada por filtración y añadida después de esterilizar el medio CTT y dejarlo enfriar hasta 50 °C. La solución de oxitetraciclina se elaboró según el procedimiento descrito por Avery y Kaiser (1983).

CTTX-Gal

CTT más 40 µg/ml de 5-Br-4-Cl-3-indolil-β-D-galactósido (X-Gal). La disolución de X-Gal se preparó a una concentración de 20 mg/ml en dimetil-formamida, unos minutos antes de añadirla al medio CTT.

II.2.2 Medios de fructificación para *M. xanthus*.

TPM (Bretscher y Kaiser, 1978)

Idéntico a CTT pero sin Bacto-casitona.

CF (Hagen, Bretscher y Kaiser, 1978)

Tampón Tris-ClH (pH 7,6)	10 mM
SO ₄ Mg·7H ₂ O	8 mM
Tampón fosfato (pH 7,6)	1 mM

SO ₄ (NH ₄) ₂	0,02%
Bacto-casitona	0,015%
Piruvato sódico	0,1%
Citrato sódico tribásico	0,2%

Antes de esterilizar en autoclave se ajustó el pH a 7,6.

IL.2.3 Medios ricos para *E. coli*

Luria (L) (preparado según Miller, 1972)

Extracto de levadura	0,5%
Bacto-triptona	1%
NaCl	1%

Antes de esterilizar en autoclave se ajustó el pH a 7,2-7,4.

LK

L más 40 µg/ml de kanamicina esterilizada por filtración y añadida al medio después de esterilizarlo y dejarlo enfriar hasta 50 °C.

LA

L más 100 µg/ml de ampicilina esterilizada por filtración y añadida al medio después de esterilizarlo y dejarlo enfriar hasta 50 °C.

LKA

L más 40 µg/ml de kanamicina y 100 µg/ml de ampicilina.

LGC

L más 0,1% de glucosa y Cl₂Ca 10 mM.

SOB

Extracto de levadura	0,5%
Bacto-triptona	2%
ClNa	10 mM
ClK	2,5 mM

Después de autoclavar, se añadió 10 ml/l de una disolución de Cl_2Mg 1 M / SO_4Mg 1 M, esterilizada por filtración.

SOC

SOB más 10 ml/l de una disolución de glucosa 2 M, esterilizada por filtración.

Para la preparación de medio sólido se utilizó Bacto-agar Difco (1,5%). Para la preparación de agar de cobertera se añadió Bacto-agar Difco al 0,75%; y al 0,5% para el agar muy blando. El agar de cobertera se denomina con el nombre del medio seguido de las letras SA (*Soft Agar*), como CTTSA.

II.2.4 Tampones y reactivos

Tampón Z

NaH_2PO_4	40 mM
Na_2HPO_4	60 mM
KCl	10 mM
MgSO_4	1 mM

Se ajustó el pH a 7,0.

TE

Tampón Tris-ClH (pH 8,0)	10 mM
EDTA (pH 8,0)	1 mM

TAE (50X)

Tris-ClH	2 M
Ácido acético glacial	5,71%
EDTA	0,05 M

SSC (20X)

NaCl	3 M
Na-citrato·2H ₂ O	0,3 M

Tampón de ligación

Tris-ClH (pH 7,6)	200 mM
MgCl ₂	50 mM
Ditiotreitol (DTT)	50 mM

Solución de prehibridación

NaCl	0,9 M
SDS	1%

Solución de hibridación

Se preparó igual que la solución de prehibridación, pero añadiendo además sulfato de dextrano al 5%.

II.3 CONDICIONES DE CULTIVO PARA LA FASE VEGETATIVA

Los cultivos en medio líquido se realizaron mediante inoculación de una colonia en un erlenmeyer de 50 ml que contenía entre 8 y 12 ml de medio nutritivo, según el experimento. La incubación tuvo lugar, salvo indicación en otro sentido, en un agitador orbital, a 300 rpm y a la temperatura de 33 °C en el caso de *M. xanthus*; y a 250 rpm y 37 °C para *E. coli*. En el caso de *M. xanthus*, la inoculación en medio nutritivo sólido se efectuó con ayuda de 2,5 - 4 ml de agar de cobertera. Las cajas de Petri se incubaron a 33 °C (*M. xanthus*) ó 37 °C (*E. coli*).

El crecimiento, salvo que se especifique lo contrario, tuvo lugar en condiciones de oscuridad. Cuando fue necesario, los cultivos se iluminaron disponiéndolos a unos 50 cm de una batería de seis lámparas fluorescentes de 20 W. El flujo total de fotones incidentes, medido con un detector LI-189 y un sensor LI-1000 (ambos de LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA) fue de aproximadamente 41 micromol s⁻¹m⁻². El flujo correspondiente a la banda de luz azul, medido con un filtro de máxima transmitancia entre 400 nm y 460 nm, fue de 12 ± 1 micromol s⁻¹m⁻².

II.4 CONDICIONES DE CULTIVO PARA LA FASE DE DESARROLLO

El medio TPM induce la fructificación de *M. xanthus* pero, al carecer de nutrientes, es necesario cultivar previamente las células hasta que alcancen la densidad celular necesaria. Para ello, se centrifugó un cultivo en crecimiento exponencial (5×10^8 cel/ml) y se concentró cuatro veces en tampón TPM. Tras lavar las células, se hicieron diluciones seriadas (1/2, 1/4, 1/8 y 1/16) del cultivo concentrado y se depositaron en gotas de 15 µl sobre cajas de TPM. Se empleó el mismo procedimiento para las cajas de CF. Una vez que las gotas fueron

absorbidas por el agar, se incubaron las cajas a 33 °C. El fenotipo para la fructificación se observó cada 24 horas hasta los cuatro días siguientes.

II.5 PÉRDIDA DE UN FRAGMENTO DE DNA POR RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA

Para seleccionar las estirpes que habían perdido un fragmento con un marcador de resistencia a kanamicina y el gen *lacZ* se llevó a cabo el siguiente procedimiento. Se inocularon cultivos de cada una de las estirpes de interés en CTTG líquido y en ausencia del antibiótico kanamicina. Se empleó el antibiótico gentamicina con el objeto de evitar la contaminación por otras especies microbianas (*M. xanthus* es resistente de forma natural a este antibiótico). Los cultivos se mantuvieron en fase exponencial a 33 °C y 300 rpm durante 15-20 días, con el objeto de aumentar la población de células donde se había producido la recombinación entre regiones homólogas a ambos lados del fragmento. Se sembraron diferentes diluciones (10^5 , 5×10^5 y 10^6) de los cultivos anteriores en cajas de CTTX-Gal y, tras 3-4 días de incubación a 33 °C, las estirpes de fenotipo Lac⁻ se sembraron por duplicado en cajas de CTT y CTTK, para seleccionar aquellas que eran Lac⁻ Km^S.

II.6 OBTENCIÓN DE COLECCIONES DE INSERCIONES DE Tn5-lac

Para la obtención de cultivos mixtos de *M. xanthus* que contenían varias cepas con inserciones independientes del transposón Tn5-lac, se inocularon estrías de las cepas correspondientes en cajas de CTTKX-Gal. Tras dos días de crecimiento a 33 °C, se añadió 2,5 ml de CTT líquido a las cajas y éstas se mantuvieron en agitación suave (40 rpm) durante 15 minutos, con el objeto de favorecer la difusión de las células al medio líquido. Seguidamente, se recogió la

fase líquida y se congeló una alícuota de ésta. El resto del medio de cultivo se utilizó para la preparación de lisados conjuntos en el mixofago Mx4LA27.

II.7 TRANSFERENCIA DE DNA A *M. xanthus*

El DNA exógeno se introdujo en las células de *M. xanthus* mediante dos procedimientos diferentes: transducción y electroporación. En las técnicas de transducción, los bacteriófagos utilizados fueron distintos según que el DNA procediera de *M. xanthus* (mixofago Mx4LA27) o de *E. coli* (colifago P1).

II.7.1 Obtención de lisados del mixofago Mx4LA27

Para la obtención de preparaciones de mixofagos transductores se mezclaron 0,2 ml de un cultivo en fase de crecimiento exponencial (aproximadamente 3×10^7 células) con 0,1 ml de una suspensión de fagos Mx4LA27 que contenía del orden de 10^4 ufh (unidades formadoras de halo). Después de 30 minutos a temperatura ambiente para permitir la adsorción de los fagos a las bacterias, se sembraron las mezclas en cajas de 1/2CTT con ayuda de 3,5 ml de 1/2CTTSA muy blando. Cuando se observó lisis confluyente, normalmente después de tres días de incubación a 26 °C, se añadieron 4 ml de CTT líquido a cada una de las cajas y se mantuvieron toda la noche a 4 °C para permitir la difusión de los fagos a la fase líquida. A continuación, se recogió en un tubo de centrifuga el líquido superficial con ayuda de una micropipeta Gilson P1000. Se añadió una gota de cloroformo, se agitó vigorosamente y se centrifugó durante 20 minutos a 13.000 rpm y 4 °C (rotor JA-20 de centrifuga Beckman J2-21). El sobrenadante con los fagos se almacenó a 4 °C tras la adición de unas gotas de cloroformo.

II.8.2 Transducción generalizada con Mx4LA27

La transducción de la resistencia a kanamicina (Km^R) o tetraciclina (Tc^R) entre estirpes de *M. xanthus* se realizó mezclando 0,5 ml de un cultivo en fase exponencial de crecimiento de la estirpe recipiente (sensible al antibiótico) y de alícuotas de 0,1 ml, 0,5 ml y 1 ml de una suspensión de fagos transductores Mx4LA27, amplificados en la estirpe donante. Después de 30 minutos a temperatura ambiente, se sembró la mezcla de transducción en cajas de CTTK o CTTT con ayuda de 3 ml de CTTSA. Como control, se sembró en el medio selectivo una alícuota del cultivo de la estirpe recipiente sin infectar y otra de la suspensión de fagos por separado. Las colonias transductantes, observadas tras 5-6 días de incubación a 33 °C, se purificaron en CTT y el antibiótico correspondiente antes de su utilización.

II.8.3 Obtención de lisados de P1

Para la preparación de lisados de P1, un cultivo de la estirpe C600, incubado a 37 °C durante toda la noche, se diluyó cuatro veces en medio L y se añadió Cl_2Ca 10 mM. Se realizaron mezclas de 0,1 ml de cultivo diluido y 0,1 ml de una suspensión de fagos que contenía alrededor de 5×10^5 ufh, y se dejaron a temperatura ambiente durante 20 minutos para permitir la adsorción. La siembra se realizó con agar muy blando en cajas de medio LGC que se incubaron a 37 °C hasta observar lisis confluyente (12-24 horas). Se añadieron entonces 4 ml de medio L a cada caja y, tras una hora a 4 °C, se recogieron los fagos siguiendo un procedimiento idéntico al descrito para Mx4LA27.

II.8.4 Empaquetamiento de plásmidos en P1

La estirpe de *E. coli* portadora del plásmido de interés se cultivó durante toda la noche en LKA a 37 °C con agitación. El cultivo se diluyó 20 veces en el mismo medio y tras dos horas de incubación se mezclaron 500 µl del mismo con 5×10^8 ufh del fago P1. La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 20 minutos, para permitir la infección, y a continuación se añadió medio LKA suplementado con 12,5 µg/ml de cloranfenicol y $MgCl_2$ 10 mM, hasta un volumen final de 5 ml. Este cultivo se incubó a 30 °C durante toda la noche para favorecer la lisogenia. A la mañana siguiente, se diluyó 50 veces en el mismo medio, se incubó a 30 °C durante 4 horas y se procedió a la inducción térmica de los lisógenos. Con este fin, se provocó un aumento brusco de la temperatura, agitando brevemente el cultivo sobre la llama de un mechero, tras lo cual se incubó durante 35 minutos a 42 °C con agitación vigorosa (300 rpm). La lisis tuvo lugar durante las dos horas siguientes de incubación a 38 °C y se completó por adición de 1 ml de cloroformo, seguida de una breve agitación. La fase acuosa se centrifugó 20 minutos a 13.000 rpm y 4 °C (rotor JA-20 de centrífuga Beckman J2-21). El sobrenadante con los fagos se guardó a 4 °C, tras adición de unas gotas de cloroformo.

II.8.5 Transducción especializada con P1

Para transducir los plásmidos de *E. coli* a *M. xanthus*, 1-200 µl del stock correspondiente de P1 se mezclaron con 500 µl de un cultivo en fase de crecimiento exponencial de la estirpe recipiente de *M. xanthus*, en presencia de $CaCl_2$ 5 mM. Transcurridos 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, se sembraron las mezclas en cajas de CTT con el antibiótico correspondiente. Los transductantes obtenidos se purificaron en cajas de CTTK antes de su utilización.

II.8.6 Electroporación

Se cultivó la estirpe de interés en CTT hasta alcanzar unas 5×10^8 células/ml. Las células se lavaron luego tres veces por centrifugación en agua bidestilada y, tras el último lavado, se resuspendieron en 40 μ l. A continuación se mezclaron las células con el DNA libre de sales (de 0,5-1 μ g). Se utilizó el electroporador Bio-Rad Gene Pulser II. La electroporación se realizó en cubetas Bio-Rad de 0,1 cm y las condiciones usadas fueron 0,65 kV, 25 μ F y 400 Ω . Inmediatamente después de electroporar se añadió 1 ml de CTT a la cubeta, se mezcló bien y se vertió la muestra en un erlenmeyer de 50 ml, junto con 4 ml de CTT adicionales. Las células se cultivaron toda la noche y se sembraron luego en cajas de CTTK a distintas diluciones. Las colonias obtenidas se purificaron en cajas del mismo medio antes de su utilización.

II.9 PROCEDIMIENTOS DE MUTAGÉNESIS

II.9.1 Por inserción del transposón Tn5-lac.

Los mutantes por inserción del transposón Tn5-lac se obtuvieron mezclando 0,5 ml de un cultivo exponencial de la estirpe de *M. xanthus* DK1050 y distintas alícuotas de un lisado del bacteriófago P1::Tn5-lac, en presencia de Cl_2Ca 5 mM. Tras 30 minutos a temperatura ambiente, la mezcla se sembró en cajas de CTTK. Después de cinco días de incubación a 33 °C, las colonias Km^R obtenidas se inocularon en cajas de CTTX-Gal y, tras dos días de crecimiento a 33 °C, aquellas colonias que presentaban color azul se seleccionaron para el escrutinio de promotores dependientes del gen *carD*.

II.9.2 Con luz ultravioleta.

Para este procedimiento de mutagénesis fue necesario realizar previamente una curva de supervivencia frente a luz ultravioleta, con el objeto de establecer un tiempo óptimo de mutagénesis, aquél en el cual un 2% de las células sobrevive a la radiación. Para ello se tomó una alícuota de un cultivo en fase exponencial tardía que se irradió con una lámpara de luz ultravioleta durante distintos intervalos de tiempo, hasta un máximo de 7 minutos. Seguidamente se sembraron diferentes diluciones del cultivo y de un cultivo control no irradiado en cajas de CTT. Tras cinco días de incubación a 33 °C, se contó el número de colonias en cada caja y se calculó el porcentaje de supervivientes. A los 2,5 minutos de tratamiento con luz ultravioleta se obtenía un 2% de supervivencia con respecto al control no irradiado. Este tiempo de radiación fue, por tanto, el utilizado en los experimentos de mutagénesis.

II.10 MANIPULACIÓN DE DNA

II.10.1 Aislamiento de DNA.

El aislamiento de DNA cromosómico de *M. xanthus* se llevó a cabo con el *kit* de purificación de DNA genómico de Wizard™ (Innogenetics). Para el aislamiento de plásmidos a pequeña escala se utilizó el procedimiento rápido del hervido (Holmes y Quigley, 1981) o la purificación en columnas Wizard™ Minipreps (Innogenetics).

II.10.2 Tratamiento enzimático del DNA.

Los tratamientos enzimáticos más usuales realizados al DNA fueron:

- **Digestión** con enzimas de restricción (Boehringer), que se realizó siguiendo las indicaciones del suministrador.

- **Defosforilación** de extremos 5' con la enzima fosfatasa alcalina de intestino de ternera (Innogenetics) para evitar la autoligación de los vectores. Todos los tratamientos se realizaron de acuerdo con las especificaciones del suministrador.

- **Reparación del extremo 5' protuberante** para generar extremos romos. El DNA (< 1µg) se incubó en la mezcla de digestión durante 15 minutos a 37 °C con dos unidades del fragmento Klenow de la polimerasa I de *E. coli* y 50 µM de dNTPs (Ausubel *et al.*, 1989)

- **Ligación** de fragmentos de DNA, que se realizó en tampón de ligación más ATP (1 mM), BSA (0,1 mg/ml) y 1 unidad de ligasa T4 (USB). La cantidad de DNA en la mezcla varió según el experimento. Las mezclas de ligación se incubaron a 16 °C durante toda la noche. Cuando se quiso obtener la autoligación de un plásmido la concentración final de DNA en la mezcla fue de 1-5 ng/µl.

Cuando fue necesario, las enzimas se eliminaron mediante tratamiento con fenol-cloroformo y precipitación del DNA con etanol a -20 °C.

II.10.3 Electroforesis en gel de agarosa

La separación por electroforesis de fragmentos de restricción se realizó en geles horizontales de agarosa (Pronadisa) de distintas concentraciones, preparados en tampón TAE. El DNA se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio e iluminación con luz ultravioleta (Sambrook *et al.*, 1989).

La purificación de fragmentos de restricción se realizó tras su separación en geles de agarosa de bajo punto de fusión (Pronadisa). Las porciones de

agarosa con los fragmentos de DNA deseados se separaron del gel con un bisturí, purificándose los fragmentos de pequeño tamaño con columnas WizardTM PCR Preps (Innogenetics), siguiendo las instrucciones del suministrador. Para fragmentos grandes de DNA se utilizó el procedimiento de extracción con fenol, según Ausubel *et al.* (1989).

IL.10.4 Transferencia de DNA a *E. coli*.

Se obtuvieron colonias transformantes de *E. coli* mediante dos procedimientos:

- **Transformación por choque térmico:** La obtención de células competentes de *E. coli* y su transformación se realizaron según Sambrook *et al.* (1989). La cantidad de DNA utilizada en la transformación varió entre 1 ng y 10 ng.

- **Electroporación:** Se utilizó esta técnica cuando fue preciso obtener un alto número de transformantes. La obtención de células electroporantes se efectuó según Sambrook *et al.* (1989). Antes de electroporar, el DNA se dializó durante 20 minutos en un filtro Millipore de 0,025 μ m de diámetro de poro. Los parámetros de electroporación empleados fueron: 1,7 kV, 25 μ F y 400 Ω ; y el recrecimiento de las células se realizó en medio SOC.

IL.10.5 Amplificación de DNA por PCR

Para la construcción de una sonda del gen *lacZ*, contenido en el plásmido pDAH274 (McGowan *et al.*, 1993), se amplificaron 15-30 ng de DNA molde con 20 pmoles de los oligonucleótidos y 2,6 unidades de enzima ExpandTM High Fidelity PCR System (Boehringer), siguiendo las indicaciones del suministrador.

Las muestras se sometieron a 5 minutos de desnaturalización a 95 °C y 25 ciclos de desnaturalización (45 segundos, 95 °C), alineamiento (60 segundos, 51 °C) y polimerización (100 segundos, 72 °C). Tras el último ciclo, se dejaron las muestras en condiciones de polimerización durante 10 minutos. En todas las reacciones se añadió dimetil sulfoxido (concentración final del 5%). El aislamiento de los productos de amplificación se llevó a cabo con el *kit* “Wizard™ PCR preps DNA Purification” (Innogenetics).

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores en la amplificación del gen *lacZ* fueron los siguientes:

Nombre	Secuencia	Tm
prM	5' - CGG TTG CAC TAC GCG TA - 3'	55,2 °C
prH	5' - CGT TAA CTC GGC GTT TC - 3'	52,8 °C

II.10.6 Marcado radiactivo de sondas de DNA.

El DNA utilizado como sonda en los experimentos de hibridación se purificó con columnas Wizard™ PCR preps (Innogenetics). El fragmento de DNA se marcó radiactivamente, introduciendo dCTP marcado con ³²P en el fósforo α . La reacción de marcado se realizó incubando 50 ng de DNA desnaturalizado (10 minutos a 100 °C) durante 2 horas a 37 °C, en un volumen de 20 μ l de tampón Klenow que contenía 30 μ Ci de dCTP (Amersham), dATP 0,2 mM, dGTP 0,2 mM, dTTP 0,2 mM, 2 μ l de solución de hexanucleótidos *random primer* (Boehringer) y dos unidades de enzima Klenow. Para detener la reacción y eliminar los nucleótidos no incorporados, se añadieron 100 μ l de agua bidestilada y se pasó toda la solución por una columna de Sephadex G-50 (Pharmacia), centrifugando durante 5 minutos a 2000 x g.

II.10.7 Hibridación de DNA fijado a un soporte.

El DNA cromosómico (3 µg) fue digerido con las restrictasas adecuadas y sometido a electroforesis en gel de agarosa. El gel se sumergió en una solución de HCl 0,26 M durante 20 minutos, se lavó con agua destilada y luego se trató con NaOH 0,4 M otros 20 minutos. Finalmente, se colocó en un soporte en contacto con una membrana de nylon cargada positivamente (Boehringer), produciéndose la transferencia del DNA en una disolución de NaOH 0,4 M (Sambrook *et al.*, 1989). Para fijar el DNA al filtro se calentó éste a 80 °C durante dos horas. La membrana se incubó en solución de prehibridación durante 4-6 horas a 65 °C y se hibridó a esa misma temperatura toda la noche en solución de hibridación. Tanto la prehibridación como la hibridación de las membranas se produjo en presencia de 5 mg/ml de DNA de espermatozoos de salmón desnaturalizado y sonificado hasta obtener fragmentos de 200-800 pb.

Al día siguiente, se lavaron los filtros: una vez durante 5 minutos a temperatura ambiente en 2 x SSC y 0,1 % SDS y otra vez durante 15 minutos a 65 °C con el mismo tampón. Se realizaron dos lavados más de 20 min cada uno en tampón 0,1 x SSC y 0,1 % SDS a 65 °C. Por último, los filtros se pusieron en contacto con películas Fuji X-Ray durante 12 horas.

II.10.8 Secuenciación automática de DNA y tratamiento informático de las secuencias.

La determinación de secuencias de DNA se llevó a cabo mediante secuenciación automática (secuenciador ABI PRISM™ 310). Para cada reacción se utilizó 1 µg de DNA (*kit* de Miniprep de Abi Prism. Perkin Elmer) junto a 25 pmol de cebador, y se siguieron las instrucciones del suministrador.

Los oligonucleótidos utilizados en la reacción de polimerización se muestran en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4 Cebadores utilizados en las reacciones de secuenciación.

Nombre	Secuencia	T _m
TnU	5' - CGG ATC CGG TGG AAA AC - 3'	64 °C
TnD	5' - AAG TCA GAT CCT GGA AA - 3'	52,3 °C
m4p	5' - TGT TCG CGC AGG ACC AG - 3'	67,8 °C
m4bk	5' - TGG CTC CAC ACG TCG AT - 3'	64,3 °C
m8c	5' - TCT CCT CAA TCG AGC TC -3'	56,2 °C
m5xp	5' - ATC CGC AAA TTG GAG GA - 3'	61,6 °C

Para la comparación de secuencias de nucleótidos y de sus proteínas deducidas con las incluidas en los bancos de datos internacionales se utilizaron los programas Wu-BLASTX+BEAUTY de la sección *Nucleic Acid Sequence Searches* (http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-search/nucleic_acid-search.html) y Wu-BLASTP+ BEAUTY de la sección *General protein sequence/pattern searches* (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-search/protein-search.html>), del *Baylor College of Medicine* (BCM). Para las alineaciones de distintas proteínas o péptidos se utilizó el programa CLUSTALW de la sección *Multiple sequence alignment* del *European Bioinformatics Institute* (EBI) (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>). Para la predicción de dominios transmembranales se utilizó el programa TMpred (transmembrane region and orientation prediction), de la sección *Protein secondary structure prediction* del BCM (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-search/struc-predict.html>) y para la predicción de motivos típicos de

proteínas se utilizó el programa ScanProsite de la sección *Pattern and profile searches* del EBI (<http://www.expasy.ch/tools/scnpsit1.html>).

IL.11 EXPRESION DE β -GALACTOSIDASA EN *M. xanthus*.

La detección rápida de la actividad β -galactosidasa de estirpes que contenían una fusión transcripcional con el gen *lacZ* se realizó mediante transferencia de células a medio sólido CTTX-Gal e incubación en oscuridad a 33 °C durante dos días. Cuando se quiso estudiar la fotoinducción de la síntesis de β -galactosidasa, tras la incubación anterior, se dispusieron las cajas bajo la batería de tubos fluorescentes durante 12 horas. La actividad β -galactosidasa se detectó por el color azul de las colonias debido a la rotura enzimática del sustrato X-Gal.

Para medir la actividad β -galactosidasa específica, se inoculó la estirpe a estudiar en medio líquido con el antibiótico correspondiente. Cuando el cultivo alcanzó la fase de crecimiento deseada, se tomó una alícuota de 1,5 ml (tiempo cero) y alícuotas sucesivas hasta las 24 horas de crecimiento. Cuando quiso estudiarse la expresión de β -galactosidasa dependiente de luz, el cultivo original se incubó en oscuridad y, tras alcanzar la fase de crecimiento deseada, se dividió en dos, incubándose uno de ellos en la luz y el otro en la oscuridad. Durante las 8 horas siguientes, se tomaron alícuotas de 1 ml de ambos cultivos. Después de 5 min de centrifugación a 13.000 rpm (centrífuga Micro Centaur - MSE), las células se resuspendieron en 1 ml de tampón Z y se almacenaron a -20°C.

Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente y se colocaron sobre hielo picado. La rotura de las células se realizó mediante tratamiento con ultrasonidos en un sonicador automático Labsonic U (B. Braun). En cada caso, se aplicó un tiempo de sonicación suficiente para conseguir la rotura de la práctica totalidad de las células, detectada por observación microscópica. El

ensayo de actividad β -galactosidasa se realizó según Miller (1972) empleando 5-75 μ l del extracto celular. La concentración de proteínas se midió según Lowry *et al* (1951). La actividad específica de β -galactosidasa se expresa en nanomoles de o-nitrofenol (generado por la rotura enzimática del sustrato ONPG) producidos por minuto y miligramo de proteína. Los datos ofrecidos corresponden a medias de dos o más experimentos independientes.

III. Resultados

III.1 BÚSQUEDA DE NUEVOS PROMOTORES DEPENDIENTES DEL LOCUS *carD*

El gen *carD* participa en la activación tanto de promotores inducibles por la luz, caso de los promotores P_{chl} y P_{QRS} implicados en el control de la carotenogénesis, como de promotores específicos del proceso de desarrollo (Nicolás *et al.*, 1994; Cayuela, 1999). El extremo carboxilo de la proteína CarD contiene un dominio de unión a DNA similar al de las proteínas HMGA eucarióticas (Nicolás *et al.*, 1996). La unión de estas proteínas a sus sitios específicos en el DNA provoca una modificación en la estructura de la doble hélice, afectando a la expresión de un gran número de genes implicados en procesos biológicos muy variados. Es posible, por tanto, que la proteína CarD esté involucrada en la regulación, tanto positiva como negativa, de otros genes de *M. xanthus*, diferentes a los relacionados con la carotenogénesis o el proceso de fructificación. Para comprobar esta hipótesis, se ha escrutado una colección de promotores vegetativos de *M. xanthus*, analizando la acción activadora o represora de la proteína CarD sobre dichos promotores. La estrategia utilizada se ilustra en la Figura 3.1.

III.1.1 Obtención de una colección de promotores regulados por CarD

Tn5-*lac* es un derivado del transposón Tn5, en el cual se introdujo el gen *lacZ* de *E. coli* sin promotor dentro de la secuencia de inserción izquierda (IS50L), muy cerca de su extremo. El transposón Tn5-*lac* mantiene la resistencia a kanamicina de Tn5. Tn5-*lac* se emplea como sonda de promotores, ya que genera fusiones transcripcionales con el gen *lacZ* (Kroos y Kaiser, 1984). La expresión de β -galactosidasa a partir de una inserción del transposón requiere que

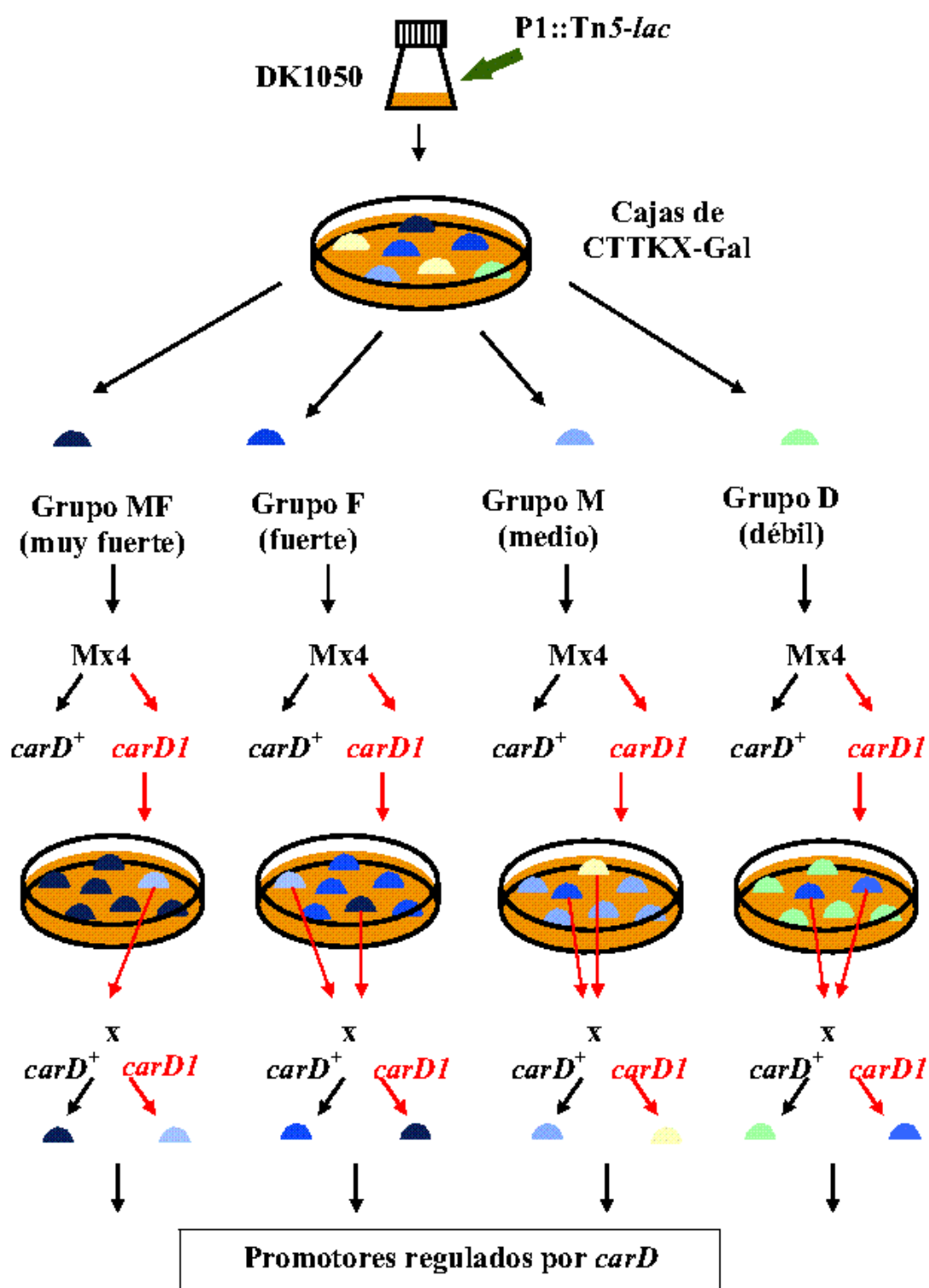


Figura 3.1 Estrategia de identificación de promotores regulados por *carD*.

tal inserción se haya producido aguas abajo de un promotor activo y en la orientación correcta con respecto al gen *lacZ*. Kroos y Kaiser (1984) generaron el bacteriófago P1::Tn5-*lac*, empleándolo para la introducción del transposón en las células de *M. xanthus* (véase apartado II.8.5). P1::Tn5-*lac* es capaz de adsorberse a *M. xanthus* e inyectar su DNA, pero no puede multiplicarse en la bacteria (Kaiser y Dworkin, 1975; Kuner y Kaiser, 1981), de manera que para que aparezcan células resistentes a kanamicina (Km^R) es necesaria la integración del transposón en el cromosoma bacteriano.

Se utilizó el fago P1::Tn5-*lac* para realizar tres experimentos de mutagénesis independientes sobre la estirpe silvestre DK1050 (Materiales y Métodos II.9.1). Esta estrategia permitió obtener una colección de 1643 inserciones independientes de Tn5-*lac*. De ellas, 613 parecían encontrarse junto a promotores activos y en la dirección correcta, de acuerdo con el fenotipo de las colonias correspondientes en cajas de X-Gal (coloración azulada de mayor o menor intensidad). Las 613 estirpes fueron clasificadas visualmente en cuatro grupos, según el nivel de expresión de actividad β -galactosidasa, reflejado por la distinta intensidad del color azul de las colonias en cajas de X-Gal. Los diferentes grupos de expresión fueron denominados MF (expresión muy fuerte, 50 inserciones), F (fuerte, 110 inserciones), M (media, 113 inserciones) y D (débil, 340 inserciones) (Figura 3.1). De cada uno de estos grupos, se realizaron cultivos mixtos de 15-35 estirpes, según se describe en el apartado II.6.

El alelo *carD1* contiene el transposón Tn5-132 (Tc^R) insertado en la primera mitad de la región cifradora del gen, de modo que la función de *carD* se encuentra interrumpida (Nicolás, 1995). A partir de cada uno de los cultivos conjuntos anteriores, se prepararon lisados del mixofago Mx4LA27 (en adelante, Mx4) para la transferencia de las inserciones, por transducción, a una estirpe *carD1*. De forma paralela y como control, se transdujo la estirpe *carD*⁺ con los

mismos lisados de Mx4. En ambos casos, se seleccionó el fenotipo Km^R de las colonias. A continuación, se comprobó visualmente la actividad de los promotores correspondientes en cajas de X-Gal, con el objeto de detectar en cada grupo diferencias de expresión debidas a la mutación *carDI*. Para ello, se analizó un número de transductantes al menos cinco veces mayor al número de inserciones independientes presentes en el cultivo donante, para asegurar que la gran mayoría de las inserciones estuvieran representadas entre dichos transductantes ($P_{(0)} = 0,01$, $m = 4,6$, según la distribución de Poisson). Entre las colonias Km^R Tc^R escrutadas, se encontró un total de 37 colonias cuya coloración en las cajas de X-Gal no se correspondía con la esperada del grupo en el que se incluyeron originalmente. De ellas, 5 pertenecían al grupo MF, 15 al grupo F, 14 al grupo M y 3 al grupo D. Los promotores se denominaron con las siglas del grupo correspondiente seguidas de un número identificativo y el signo – ó +, según que la actividad β -galactosidasa aparente en fondo *carDI* fuera menor o mayor, respectivamente, de la observada en fondo *carD*⁺ (Ej.: MF1-, F2+, etc.). La Tabla 3.1 muestra los resultados de cada uno de los tres experimentos de mutagénesis realizados.

Tabla 3.1 Resultados de los tres experimentos independientes de mutagénesis.

Experimento	Número de inserciones analizadas	Grupo			
		MF	F	M	D
1	230	15 (1)	44 (5)	44 (3)	127 (2)
2	139	22 (2)	23 (4)	24 (7)	70 (0)
3	244	13 (2)	43 (6)	45 (4)	143 (1)

Entre paréntesis se indica el número de colonias de cada grupo cuya actividad β -galactosidasa mostraba dependencia de *carD* de acuerdo con su fenotipo en cajas de X-Gal.

Una vez purificadas, se obtuvo un lisado de Mx4 sobre cada una de las estirpes citadas en el párrafo anterior. Cada uno de estos lisados se utilizó para transducir la inserción correspondiente de Tn5-*lac* de nuevo a las estirpes *carD1* y *carD*⁺ (selección del carácter Km^R). Aquellas estirpes en las que se reprodujo la diferencia visual de expresión entre el fondo genético *carD1* y *carD*⁺ fueron seleccionadas y se emplearon para el análisis cuantitativo de actividad enzimática. Para ello, se tomaron muestras de cultivos de las estirpes correspondientes durante 30 horas de crecimiento, desde la fase exponencial temprana hasta la fase estacionaria tardía. El análisis de actividad β -galactosidasa permitió identificar seis promotores cuya actividad está influida significativamente por la mutación *carD1* (Figura 3.2). Hay que señalar que la actividad de otros siete promotores distintos varió sistemáticamente en experimentos independientes, según que la mutación *carD1* estuviera o no presente. Sin embargo, dada la escasa entidad de esa diferencia, del orden del 10%-15%, se descartaron para futuros experimentos.

El caso más destacable de nuevo promotor dependiente de *carD* es MF1-, que resulta extraordinariamente activo en la estirpe silvestre y es prácticamente anulado por la mutación *carD1* (Figura 3.2a), mostrando así una dependencia absoluta del gen *carD*. La estirpe correspondiente, en fondo *carD*⁺, se denominó MR900. La dependencia de *carD* de los otros cinco promotores fue menos pronunciada, aunque significativa y repetible en los distintos ensayos realizados. Dentro del grupo F, el promotor F2+ (de la estirpe MR905, en fondo *carD*⁺) muestra una expresión más fuerte en presencia de la mutación *carD1* que en la estirpe *carD*⁺, estando, pues, regulado negativamente por *carD* (Figura 3.2b). Otros tres promotores pertenecían a la clase M: M5- (estirpe MR915), M4+ (estirpe MR1100) y M8+ (estirpe MR1104). El promotor M5- muestra dependencia positiva de *carD*, puesto que su actividad β -galactosidasa es mayor

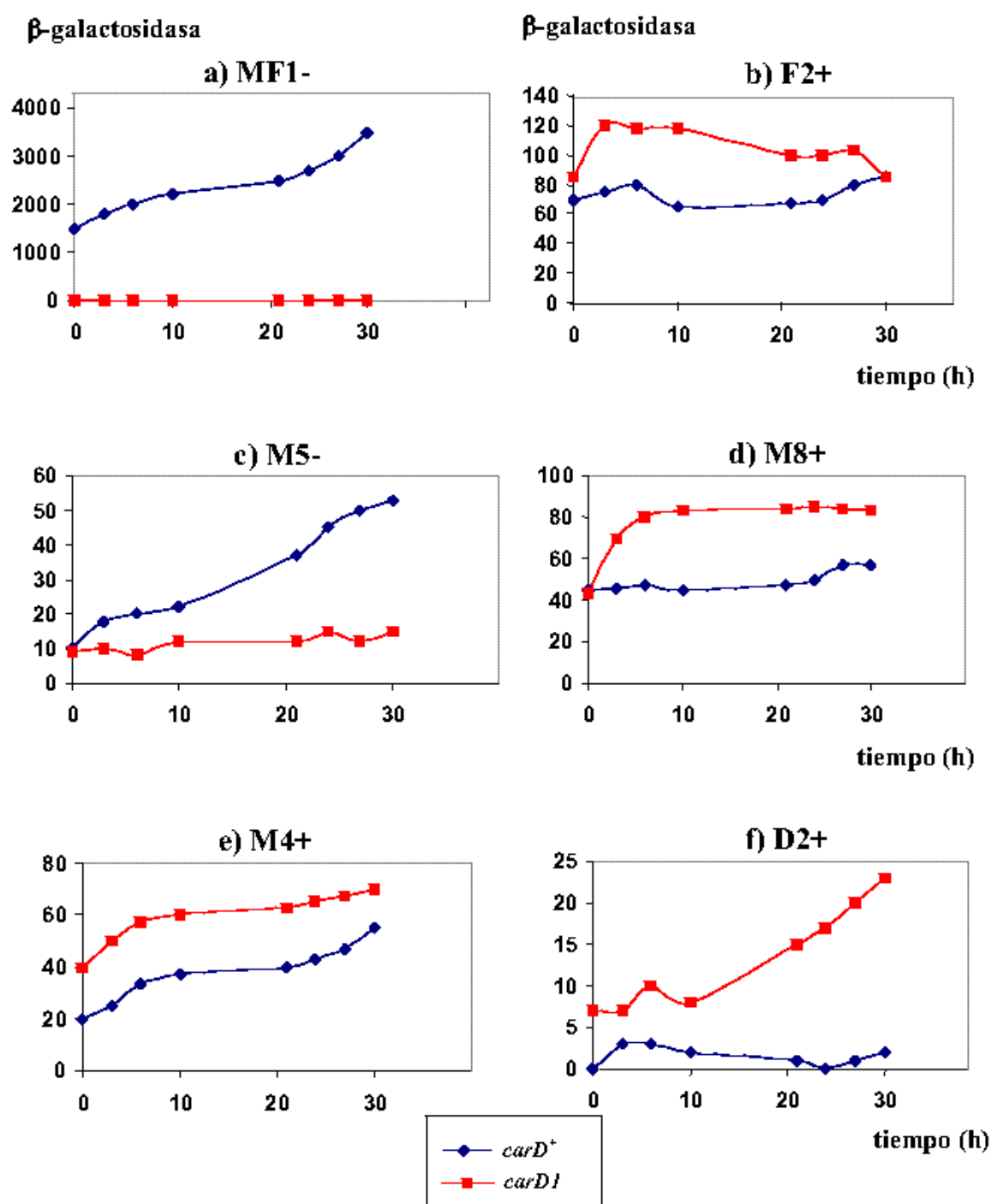


Figura 3.2 Promotores dependientes del gen *carD*. En las gráficas se muestra la actividad β -galactosidasa de cada uno de los promotores en la estirpe *carD*⁺ (línea azul) y en el mutante *carD1* (línea roja). Para cada estirpe y tiempo se indica la media de al menos dos medidas independientes. Las unidades de actividad específica β -galactosidasa se expresan en nanomoles de o-nitrofenol producido por minuto y miligramo de proteína. En el resto de las figuras del trabajo, la actividad β -galactosidasa se expresa en las mismas unidades.

en la estirpe silvestre que en el fondo mutante *carD1* (Figura 3.2c). Por el contrario, la actividad de los promotores M4+ y M8+ fue mayor en fondo *carD1* que en *carD*⁺ (Figuras 3.2d y 3.2e, respectivamente). Un promotor del grupo D, D2+ (estirpe MR1102), cuya expresión es prácticamente indetectable en la estirpe *carD*⁺, mostró una actividad significativa en presencia de la mutación *carD1* (Figura 3.2f).

Por tanto, se ha obtenido un conjunto de inserciones correspondientes a unidades transcripcionales cuya regulación depende, de alguna manera, de la función de la proteína CarD. Para análisis posteriores en este trabajo, se escogieron las estirpes MR900 (promotor MF1-), MR915 (promotor M5-), MR1100 (promotor M4+) y MR1104 (promotor M8+).

III.1.2 Análisis del fenotipo para la carotenogénesis y el desarrollo multicelular

Con el objeto de descartar aquellas inserciones que afectaran a genes implicados en la carotenogénesis, cuya dependencia de *carD* ya es conocida, se observó el fenotipo con respecto a la síntesis de carotenos de las cuatro estirpes escogidas. Se picaron por duplicado diez colonias independientes de cada estirpe en cajas de CTTK. Tras dos días de crecimiento en la oscuridad, una de las réplicas se iluminó y la otra se mantuvo en la oscuridad. Todas las estirpes permanecieron amarillas en la oscuridad y se tornaron rojas en condiciones de iluminación (fenotipo Car⁺). De modo similar, aunque el estudio de la actividad de los promotores seleccionados se había realizado durante la fase vegetativa, se analizó la capacidad de fructificación de las mismas estirpes. Para ello, cada una de las inserciones anteriores se transfirió, mediante transducción, a la estirpe silvestre para la fructificación (Fru⁺) DK1622, muy próxima a DK1050 (véase

Materiales y Métodos II.1). Se depositaron gotas de las estirpes transducentes en dos tipos de medios pobres en nutrientes, TPM y CF. Sólo se muestran los datos correspondientes a los experimentos realizados en TPM, ya que en CF se obtuvieron resultados equivalentes. Como se observa en la Figura 3.3, no se detectaron diferencias significativas con respecto al tipo silvestre DK1622 en la forma o el número de cuerpos fructíferos formados por las distintas estirpes. Cuando se observaron los cuerpos fructíferos al microscopio óptico se comprobó que su morfología era similar a los de la estirpe silvestre y en su interior estaban repletos de esporas brillantes. Por el contrario, la mayoría de los cuerpos fructíferos del mutante *carD2* presentaban un aspecto inmaduro y contenían un número mucho menor de esporas.

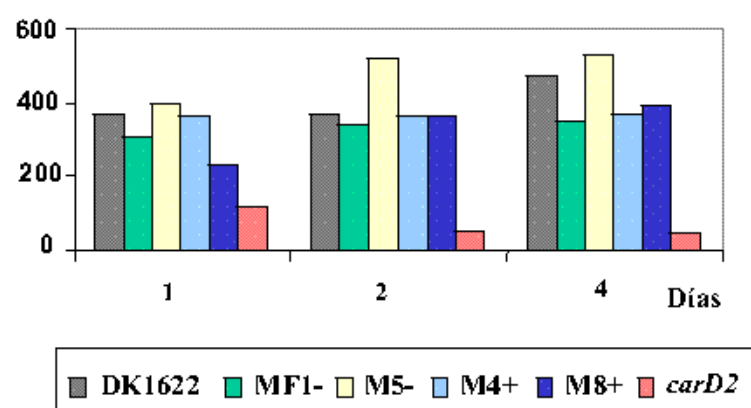
Por tanto, las cuatro inserciones seleccionadas no parecen afectar a genes implicados en la carotenogénesis o esenciales para el desarrollo multicelular.

III.1.3 Análisis de expresión en distintos fondos mutantes *carD*

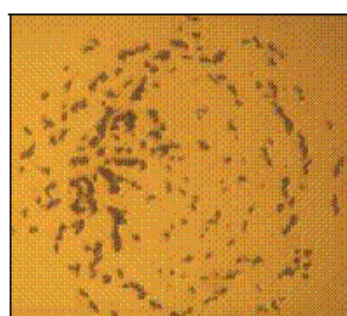
Aunque experimentos de complementación realizados por Nicolás *et al.* (1994) sugieren que la mutación *carD1* (una inserción del transposón Tn5 o su derivado Tn5-132) afecta a un solo producto génico, no puede descartarse un efecto polar causado por la inserción del transposón. Por ello, era importante determinar si mutaciones no polares en el gen afectan a la actividad de los promotores identificados anteriormente. En el laboratorio se disponía de otras dos mutaciones distintas en el gen *carD*. La mutación *carD2* consiste en una delección de cuatro pares de bases en un sitio próximo al sitio de inserción de Tn5-132 que produce un desfase en la lectura de su transcrito. Dicho desfase tiene como consecuencia la adición de ocho aminoácidos distintos a la proteína y la terminación prematura de la traducción del transcrito del gen (Nicolás *et al.*,

a)

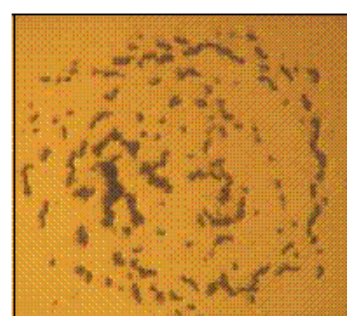
Número de cuerpos
fructíferos



b)



DK1622



MR1145

Figura 3.3 Formación de cuerpos fructíferos en estirpes con inserciones de Tn5-lac dependientes de Card. a) En la gráfica se representa el número de cuerpos fructíferos formados en distintos días del desarrollo en medio TPM. Las estirpes probadas fueron: MR924 (MF1-, barra verde), MR1140 (M5-, barra amarilla), MR1145 (M4+, barra azul claro) y MR1151 (M8+, barra azul oscuro). Los promotores correspondientes se indican en el recuadro inferior. Se incluyeron como controles la estirpe silvestre DK1622 (barra gris) y el mutante *carD2* (barra roja clara). Los resultados son la media de al menos dos experimentos independientes. b) Se muestran las fotografías de dos preparaciones observadas a la lupa de la estirpe silvestre (DK1622) y de la estirpe MR1145 (M4+) en TPM. El resto de estirpes comprobadas presentan un aspecto similar.

1994; Nicolás, 1995; M. Elías, comunicación personal). La mutación *carD3*, obtenida más recientemente, consiste en una delección en fase de toda la región cifradora del gen *carD* (M. Elías, comunicación personal).

Las cuatro inserciones de Tn5-*lac* en estudio se transdujeron a las estirpes *carD2* y *carD3*, de nuevo mediante la selección del carácter Km^R ligado a las mismas. La actividad β -galactosidasa de las estirpes resultantes se comprobó inicialmente de forma cualitativa en cajas de X-Gal. La observación de las colonias sugería que las mutaciones *carD2* y *carD3* afectan a los promotores MF1-, M5- y M8+ de la misma manera que lo hace la mutación *carD1*. Sin embargo, las mutaciones *carD2* y *carD3* parecían afectar negativamente al promotor M4+, efecto contrario al que produce la mutación *carD1*. Para la confirmación cuantitativa de los resultados, se tomaron muestras de los cultivos procedentes de cada estirpe durante 24 horas de crecimiento. Los datos del análisis de actividad específica β -galactosidasa se muestran en la Figura 3.4.

Como se observa en la Figura 3.4a, el efecto de las mutaciones *carD2* y *carD3* sobre la actividad del promotor MF1- fue ligeramente más débil que el efecto de *carD1* (Figura 3.2a), puesto que *carD2* y *carD3* permitieron alcanzar unas 200 unidades de expresión de actividad β -galactosidasa a partir de dicho promotor. No obstante, este resultado confirma la dependencia del promotor MF1- de la función de *carD*. Las mutaciones *carD2* y *carD3* demostraron también un efecto menos marcado que *carD1* sobre la actividad del promotor M5- (Figura 3.4b), aunque muy parecido al producido por esta última mutación (Figura 3.2c). Como se observa en la Figura 3.4c, los dos nuevos alelos mutantes de *carD* provocaron un efecto similar al de *carD1* sobre la expresión del promotor M8+ (Figura 3.2d). Con el promotor M4+ se obtuvo un resultado diferente (compárense las Figuras 3.2e y 3.4d). En contraste con el efecto de *carD1*, tanto el desfase producido en *carD2* como la delección completa en *carD3*

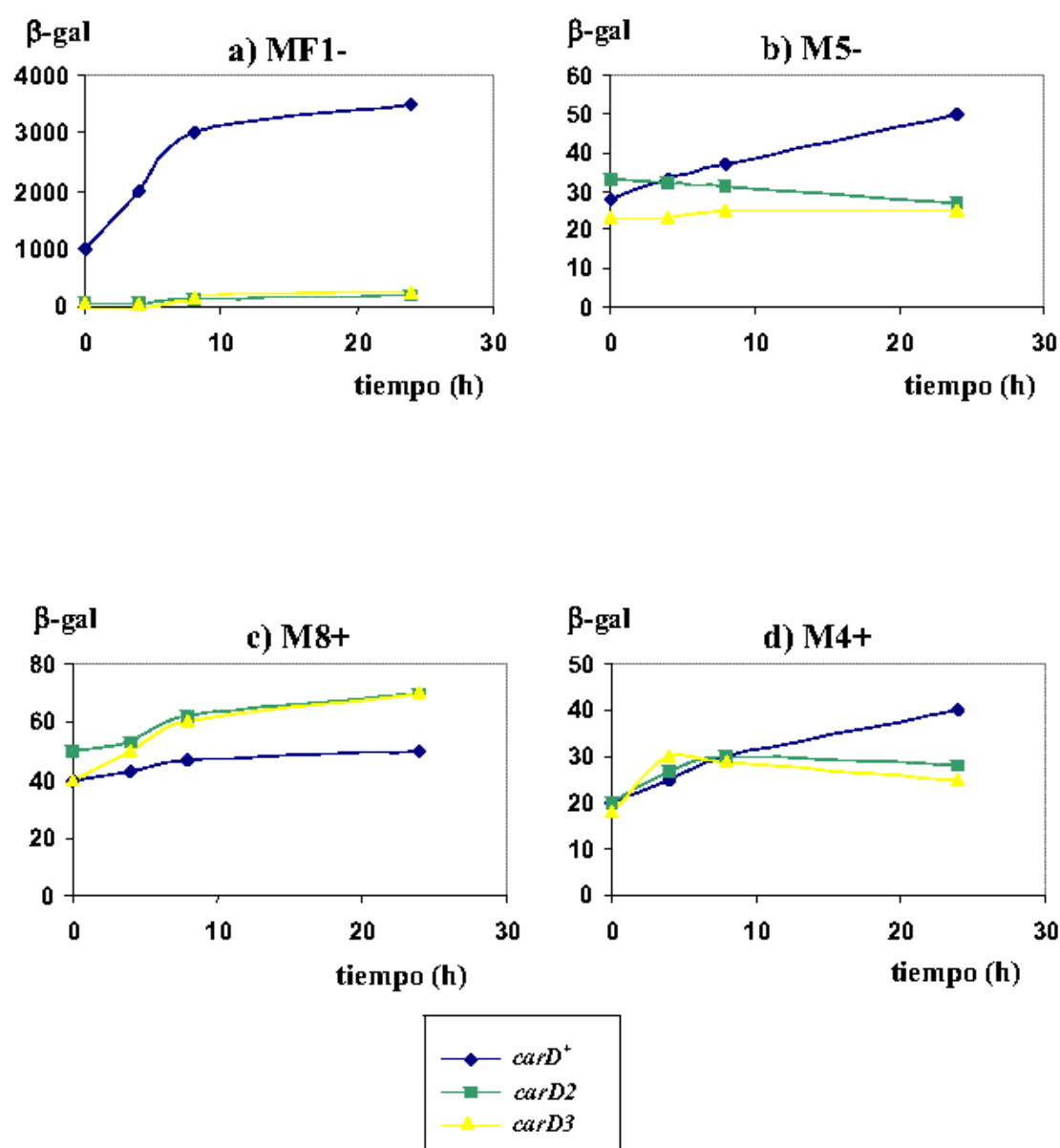


Figura 3.4 Efecto de las mutaciones *carD2* y *carD3* sobre la actividad de los promotores: **a)** MF1- (estirpes MR925 y MR1106, respectivamente), **b)** M5- (estirpes MR1187 y MR1190), **c)** M8+ (MR1189 y MR1190) y **d)** M4+ (MR1188 y MR1191). En las gráficas se muestra la actividad β-galactosidasa procedente de cada una de las inserciones anteriores en los distintos fondos genéticos: *carD*⁺ (línea azul), *carD2* (línea verde) y *carD3* (línea amarilla). Los datos son medias de dos determinaciones de cada uno de dos transductantes independientes de cada tipo.

redujeron, aunque ligeramente, la expresión del promotor correspondiente. Debido a este resultado inesperado, se utilizaron por separado las estirpes portadoras de la inserción Ω MR1100 (M4+) en fondo *carD*⁺, *carD1* y *carD3* como donantes en la transducción de dicha inserción de nuevo a distintos fondos genéticos (*carD*⁺, *carD1* y *carD3*). Se comprobaron 20 transductantes de cada tipo en cajas de X-Gal y en todos los casos los resultados fueron los mismos que se habían obtenido anteriormente.

III.1.4 Caracterización de las inserciones de Tn5-*lac*

Kroos y Kaiser (1984) demostraron que las células de *M. xanthus* resistentes a kanamicina obtenidas a partir de la infección con P1::Tn5-*lac* son el resultado de acontecimientos de transposición aleatorios y mayoritariamente únicos en el cromosoma de la bacteria. No obstante, resultaba importante averiguar si las inserciones de Tn5-*lac* obtenidas en este trabajo afectaban a genes distintos en cada estirpe y si los correspondientes sitios de inserción del transposón en el cromosoma son únicos.

Esto se comprobó mediante un análisis Southern de cada una de las estirpes seleccionadas. Los resultados de la Figura 3.5 demuestran que cada estirpe contiene una sola inserción de Tn5-*lac* y que, además, las inserciones se encuentran en distintos sitios del cromosoma de *M. xanthus*.

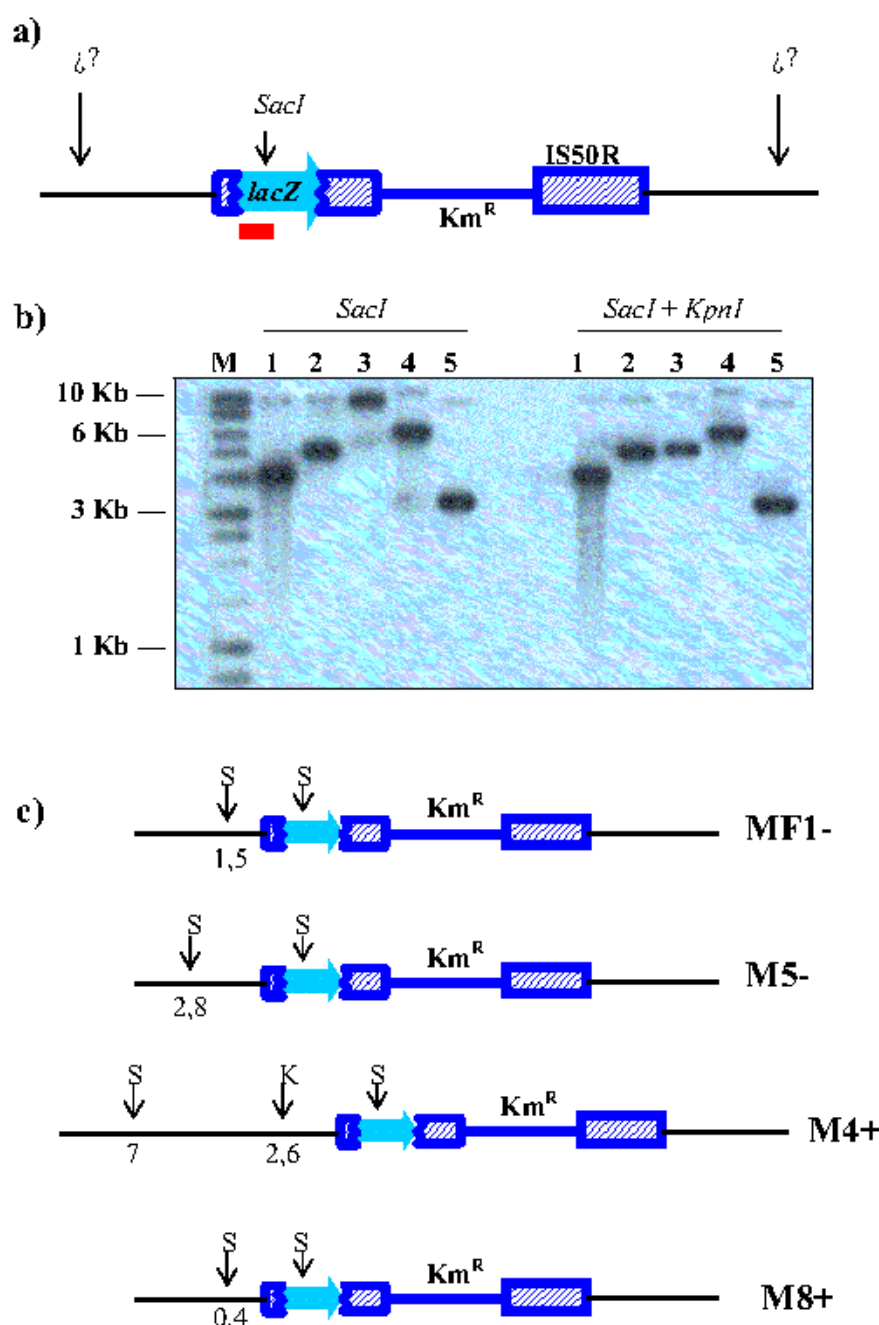


Figura 3.5 Análisis Southern de distintas inserciones de Tn5-lac. a) Esquema de la inserción de Tn5-lac. Se representa el gen *lacZ* incluido en la secuencia de inserción izquierda (IS50L). La sonda utilizada (línea gruesa roja) es un fragmento *HpaI-MluI* de 1,6 Kb, procedente del plásmido pDAH274, que contiene un fragmento del gen *lacZ*. b) Se digirió el DNA cromosómico de las estirpes: 1. MR900 (MF1-), 2. MR915 (M5-), 3. MR1100 (M4+), 4. una estirpe no seleccionada y 5. MR1104 (M8+) con *SacI* o bien con *SacI* y *KpnI* simultáneamente. El DNA digerido se hibridó con una sonda derivada del gen *lacZ*. El marcador de tamaño de 1 Kb (M) se cargó en la primera calle del gel. c) Se indica en cada estirpe la distancia en Kb del punto de inserción del transposón a los puntos de corte a la izquierda para las enzimas *KpnI* (K) y *SacI* (S) en el DNA de *M. xanthus*.

III.2 CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE LOS LOCI Ω MR900, Ω MR915, Ω MR1100 Y Ω MR1104.

En la sección anterior se describió la obtención de inserciones de *Tn5-lac* junto a promotores dependientes de CarD y que no afectaban a los procesos de carotenogénesis y desarrollo multicelular de *M. xanthus*. Con el objeto de averiguar la posible función de los genes afectados por las cuatro inserciones en estudio, se procedió a la clonación y secuenciación de tales genes. Del mismo modo, resultaba interesante caracterizar las secuencias promotoras asociadas a las inserciones. En el caso de que la proteína CarD se uniera directamente a alguno de estos promotores, el análisis de su estructura podría definir elementos reguladores comunes entre secuencias promotoras dependientes de CarD.

La clonación de los loci Ω MR900, Ω MR1104, Ω MR1100 y Ω MR915, asociados a los promotores MF1-, M8+, M4+ y M5-, respectivamente, se realizó mediante procedimientos distintos, utilizando como punto de referencia en todos los casos la inserción de *Tn5-lac* en el cromosoma de *M. xanthus*.

III.2.1 Clonación y secuenciación del locus Ω MR900 (promotor MF1-)

La clonación del locus Ω MR900 se realizó en dos etapas. En la primera, se utilizó la estirpe con la inserción de *Tn5-lac* para obtener un fragmento de DNA de *M. xanthus* adyacente al extremo derecho del transposón. En la segunda etapa, se utilizó la estirpe silvestre DK1050 para aislar un fragmento de DNA correspondiente a la porción izquierda del locus Ω MR900.

La estirpe MR902 deriva de la estirpe MR900 por sustitución *in situ* del determinante Km^R por el determinante Tc^R en el locus Ω MR900 (M. Fontes, comunicación personal). Este hecho permitió la transducción del plásmido

pDAH250 a la estirpe MR902 mediante la selección del carácter Km^R. El plásmido pDAH250 contiene una copia casi completa de la secuencia de inserción IS50 de Tn5 y no puede replicarse autónomamente en *M. xanthus*. De manera que las colonias Km^R obtenidas proceden de la integración de pDAH250 en el cromosoma de la bacteria, mediante recombinación homóloga entre las secuencias IS50 del plásmido y del transposón insertado en el locus Ω MR900 (Figura 3.6a). Se aisló DNA cromosómico de un transductante (Km^R Tc^R) y se digirió con *EcoRI*. Esta enzima corta una sola vez en el plásmido pDAH250 y lo hace con baja frecuencia en el DNA de *M. xanthus*. Los fragmentos obtenidos se trataron con ligasa de T4 en condiciones de baja concentración de DNA, favoreciendo así la ligación intramolecular. Con la mezcla de ligación resultante se transformó *E. coli*, seleccionando el carácter Km^R. Los plásmidos extraídos de 13 transformantes Km^R fueron caracterizados con enzimas de restricción. De este modo, se aisló el plásmido quimérico pMAR900, formado por el vector pDAH250 más un fragmento de 2,4 Kb de DNA de *M. xanthus*. El mapa físico de pMAR900 se muestra en la Figura 3.6b.

Para la clonación del fragmento de DNA situado a la izquierda de la inserción Ω MR900 se utilizó el vector pDAH160, que permite invertir la orientación del DNA clonado en pMAR900 con respecto al marcador de Km^R (Figura 3.7a). El fragmento *HindIII* de 2,8 Kb, contenido en el plásmido pMAR900, se subclonó en el vector pDAH160, que había sido digerido previamente con *HindIII*. Se analizaron, mediante enzimas de restricción, los plásmidos extraídos de algunos de los transformantes obtenidos. El plásmido que contenía el inserto de DNA en la orientación adecuada se denominó pMAR902 (Figura 3.7a). El plásmido pMAR902 se introdujo en la estirpe silvestre DK1050. De nuevo, las colonias Km^R obtenidas debían proceder de la integración del plásmido en el cromosoma de *M. xanthus* por recombinación homóloga, esta vez

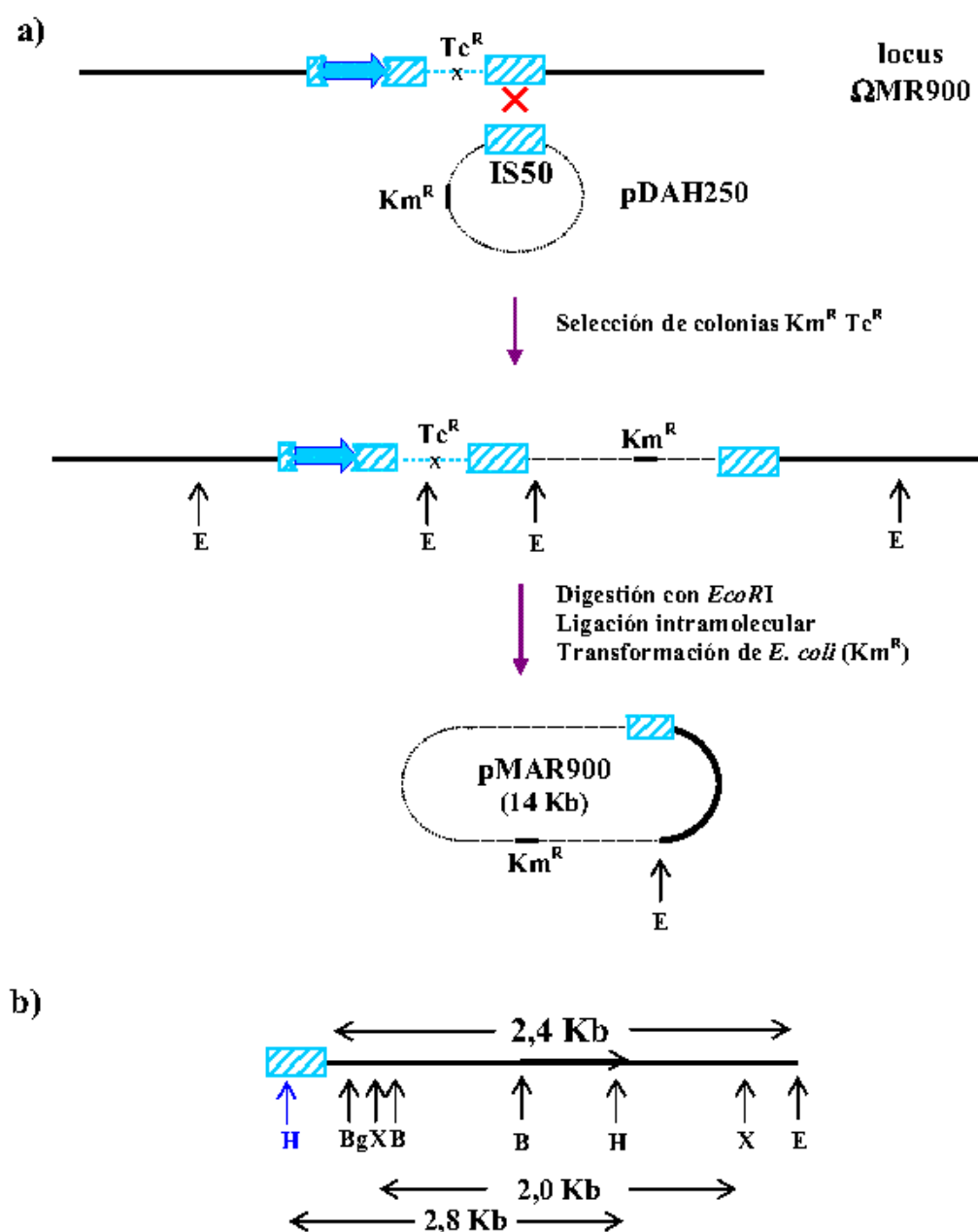


Figura 3.6 a) Clonación *in situ* de un fragmento de DNA adyacente al locus de inserción Ω MR900. Se indican los puntos de corte para la enzima *EcoRI* (E). b) Mapa físico del plásmido pMAR900. El plásmido pMAR900 se representa de forma lineal. Se indican los puntos de corte para las enzimas de restricción: *Bgl*II (Bg), *Xho*I (X), *Bam*HI (B), *Hind*III (H) y *Eco*RI (E).

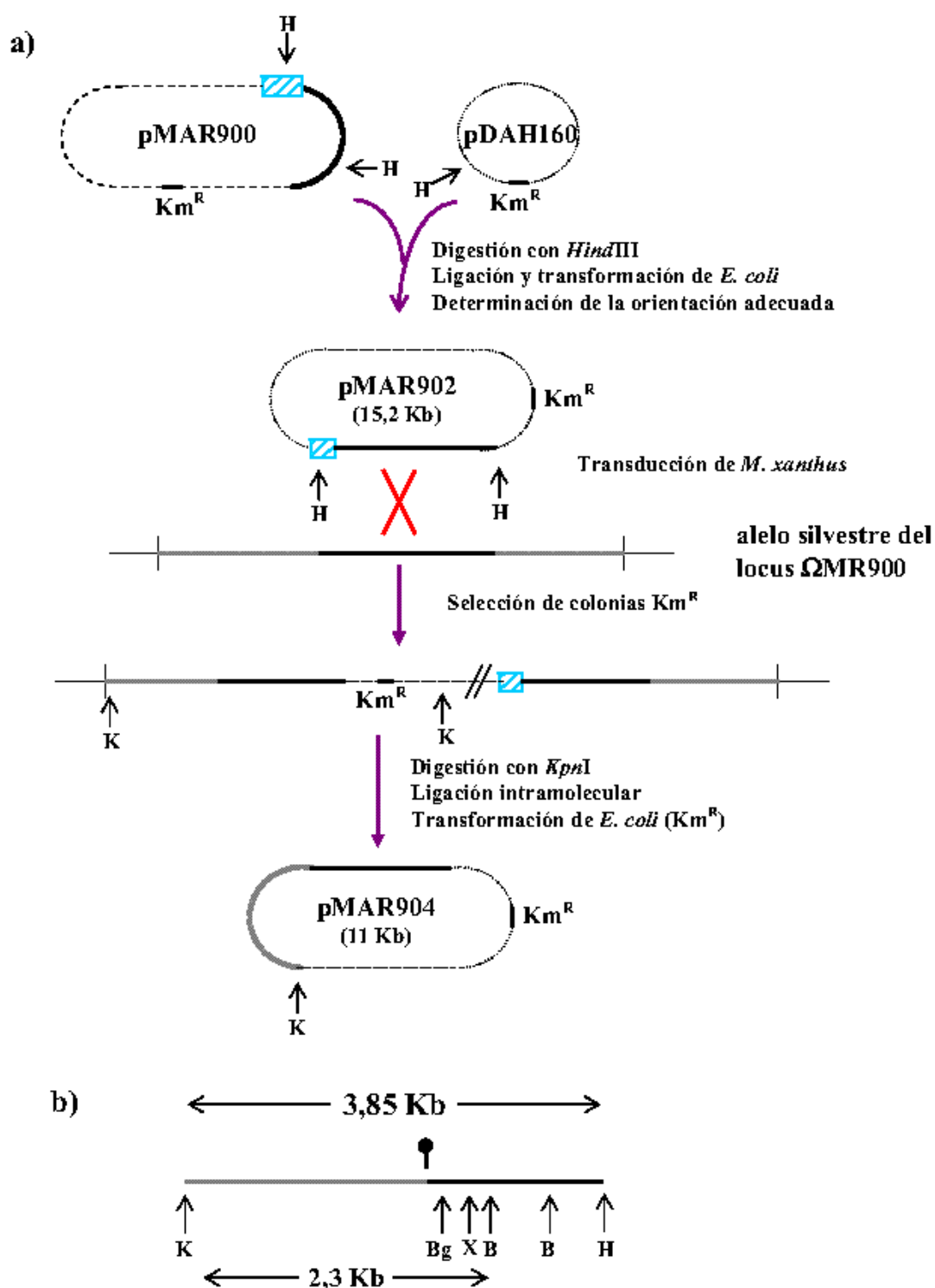


Figura 3.7 a) Clonación del fragmento de DNA a la izquierda de $\Omega MR900$. b) Mapa físico del plásmido pMAR904. Se indica el sitio de inserción del transposón Tn5-*lac* y los puntos de corte para las enzimas: *Kpn*I (K), *Bgl*II (Bg), *Xho*I (X), *Bam*HI (B) y *Hind*III (H).

ocurrida en el fragmento *Hind*III de 2,8 Kb. El DNA cromosómico de uno de los transductantes fue digerido con *Kpn*I y los fragmentos resultantes se incubaron con ligasa de T4 en condiciones favorables para la autoligación. Se transformó *E. coli* con esta mezcla de ligación y se caracterizaron los plásmidos de algunos transformantes Km^R obtenidos. El plásmido que contenía el vector pDAH160 y un fragmento de 3,85 Kb de DNA de *M. xanthus* se denominó pMAR904. El mapa físico de pMAR904 se muestra en la Figura 3.7b.

La secuenciación de la región Ω MR900 se realizó utilizando una colección de plásmidos procedentes de un tratamiento con exonucleasa III durante distintos tiempos (M. Fontes, comunicación personal). Dichos plásmidos contienen el vector pUC19 e insertos de DNA de diferente tamaño derivados del fragmento *Kpn*I-*Bam*HI de 2,3 Kb contenido en pMAR904 (Figura 3.7b) o del fragmento *Xho*I de 2,0 Kb contenido en pMAR900 (Figura 3.6b). Los fragmentos de DNA “exonucleado”, cuyos tamaños varían en unas 200 pb, solapan entre ellos y cubren las regiones citadas de 2,3 Kb y 2,0 Kb del locus Ω MR900. Para la secuenciación de cada uno de ellos se utilizó el denominado cebador universal (M13-f). El solapamiento de la secuencia obtenida a partir de los distintos clones dio como resultado un tramo de secuencia continua de 3.200 bases, con el que se realizó una búsqueda de posibles tramos de lectura abierta (en adelante, ORF's). De este modo, se identificó un ORF de 2.586 pb cuyo porcentaje global de pares G-C era del 65% (Figura 3.8). Cuando se analizó el contenido de G y C en la tercera posición de los tripletes, se comprobó que era considerablemente más bajo (63 %) que el descrito para los genes de *M. xanthus*. En las otras dos fases de lectura posible, dicho porcentaje resultó ser incluso menor. Cuando se comparó la secuencia obtenida, tanto al nivel de nucleótidos como de aminoácidos deducidos, con las secuencias registradas en los bancos de datos, no se encontró similitud con ninguna de ellas.

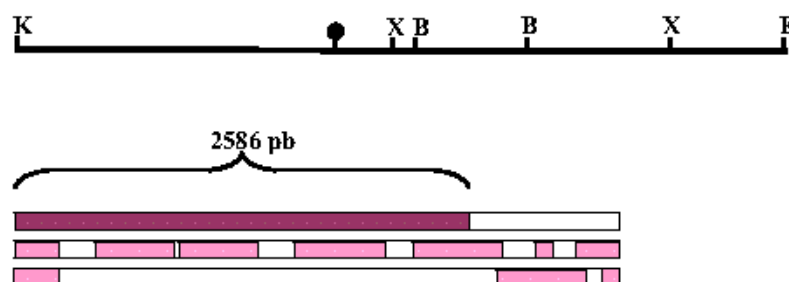
ΩMR900

Figura 3.8 Fragmento clonado del locus ΩMR900. La barra superior muestra el DNA clonado. Se indica el sitio de inserción de Tn5-*lac* y los puntos de corte para las enzimas: *Kpn*I (K), *Xho*I (X), *Bam*HI (B) y *Eco*RI (E). Los rectángulos representan las tres fases de lectura posibles según la dirección de transcripción del gen *lacZ*. En rosa claro se muestran los ORF identificados y en color oscuro el interrumpido por la inserción del transposón.

III.2.2 Clonación y secuenciación del locus ΩMR1104 (promotor M8+)

La clonación del locus ΩMR1104 se realizó mediante un procedimiento diferente al descrito en el apartado anterior. En esta ocasión, se partió directamente de la estirpe con el determinante Km^R (MR1104). DNA cromosómico extraído de dicha estirpe fue digerido con la enzima *Kpn*I. Esta enzima no corta en ningún punto del transposón Tn5-*lac* y lo hace con baja frecuencia en el DNA de *M. xanthus*. Tras someter la mezcla de digestión a electroforesis en gel de agarosa, se purificaron del gel los fragmentos comprendidos entre 10-23 Kb. El plásmido utilizado como vector, pBluescript, también fue digerido con *Kpn*I e incubado junto a los fragmentos de DNA cromosómico con la enzima ligasa de T4, en condiciones favorables para la ligación intermolecular. Con la mezcla de ligación resultante se llevó a cabo la electroporación de *E. coli* (selección del carácter Km^R) con objeto de conseguir un alto número de colonias que portaran plásmido. Se analizaron con enzimas de

restricción los plásmidos procedentes de 40 colonias Km^R Amp^R y se aisló un clon de células que contenía el plásmido de interés (Figura 3.9a). Dicho plásmido se denominó pM8-1 y su mapa físico se muestra en la Figura 3.9b.

Para la secuenciación del DNA del locus Ω MR1104, se subclonaron tres fragmentos adyacentes al sitio de inserción de Tn5-*lac* en el vector pBluescript. Se obtuvieron así los plásmidos pM8-2, pM8-3 y pM8-4 (Figura 3.10). El plásmido pM8-2 contiene el fragmento *Cla*I de 1,1 Kb procedente de pM8-1 insertado en el punto *Cla*I del vector. La secuenciación automática de este fragmento, situado aguas arriba del sitio de inserción del transposón y que incluía unas 250 pb del mismo, se realizó utilizando los cebadores universal (M13-f) e inverso (M13-r), así como el cebador TnU, complementario al extremo izquierdo de Tn5-*lac* (Materiales y Métodos, II.10.8). El plásmido pM8-3 contiene el fragmento *Xho*I de 1,3 Kb de pM8-1 insertado en el punto *Xho*I de pBluescript (Figura 3.10). Este fragmento corresponde al tramo de DNA situada aguas abajo del sitio de inserción del transposón más unas 400 pb incluidas en su extremo. En la secuenciación de dicho fragmento se utilizaron los cebadores universal, inverso y TnD, complementario al extremo derecho de Tn5-*lac* (Materiales y Métodos, II.10.8). Por último, el plásmido pM8-4 se obtuvo mediante la subclonación del fragmento *Xho*I-*Kpn*I de 1,8 Kb. Este tramo de DNA se secuenció con los cebadores universal e inverso. Tras obtener una secuencia de unas 500 pb correspondiente al fragmento *Cla*I de pM8-2, se diseñó un nuevo oligonucleótido (m8c, Materiales y Métodos, II.10.8) para ampliar la zona secuenciada a la izquierda del locus Ω MR1104.

Se obtuvo así una secuencia de nucleótidos continua de unas 2.000 pb. Su análisis posterior reveló que una de las fases de lectura cuya dirección de transcripción coincidía con la del gen *lacZ* incluido en Tn5-*lac*, presentaba la desviación característica en la composición de bases G y C de la tercera posición

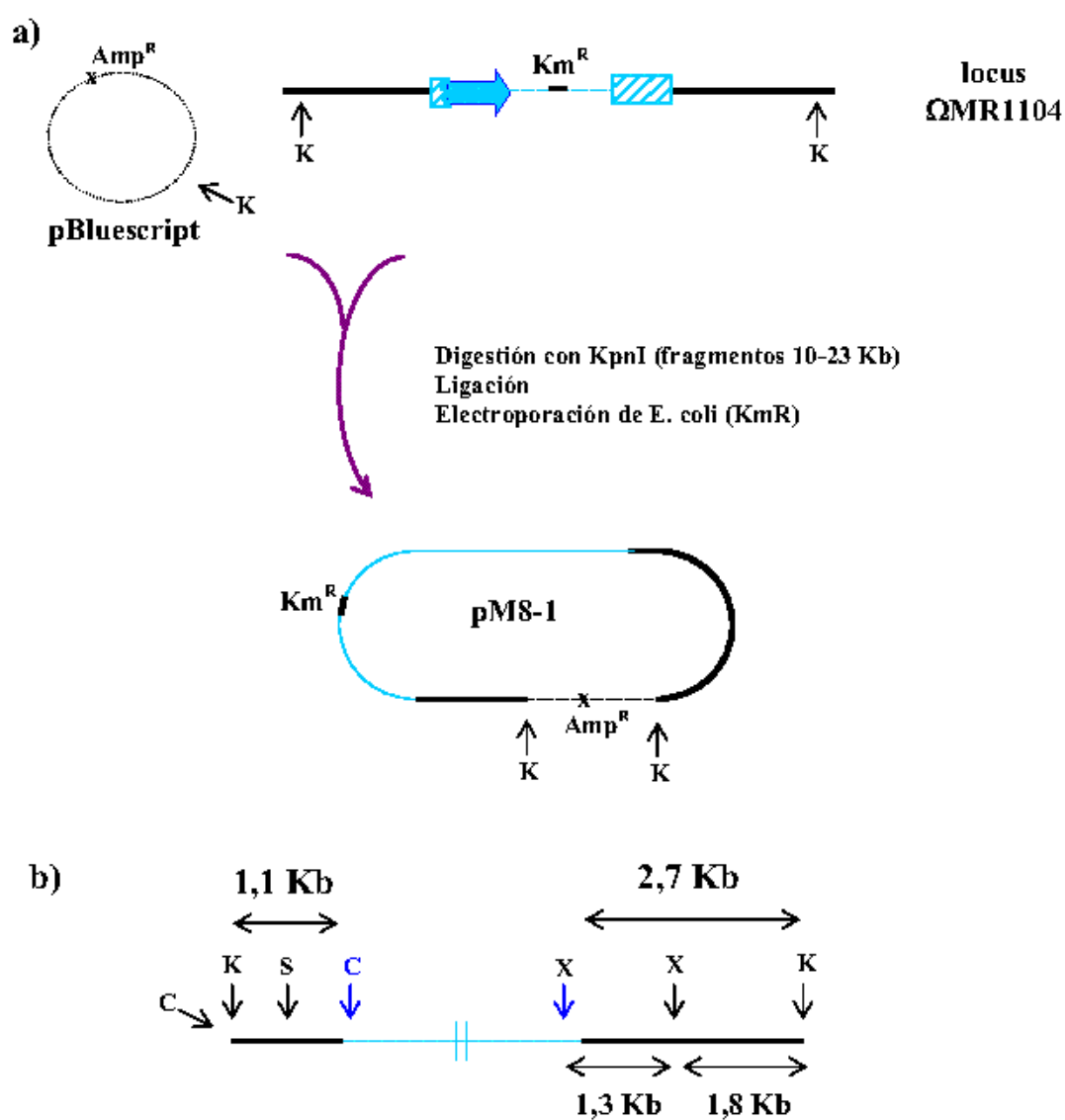


Figura 3.9 a) Clonación del locus de inserción Ω MR1104. b) Mapa físico de pM8-1. Por simplicidad, las secuencias correspondientes al transposón Tn5-*lac* se representan con una línea azul. Se indican los puntos de corte para las enzimas: *Kpn*I (K), *Cla*I (C), *Xho*I (X) y *Sac*I (S).

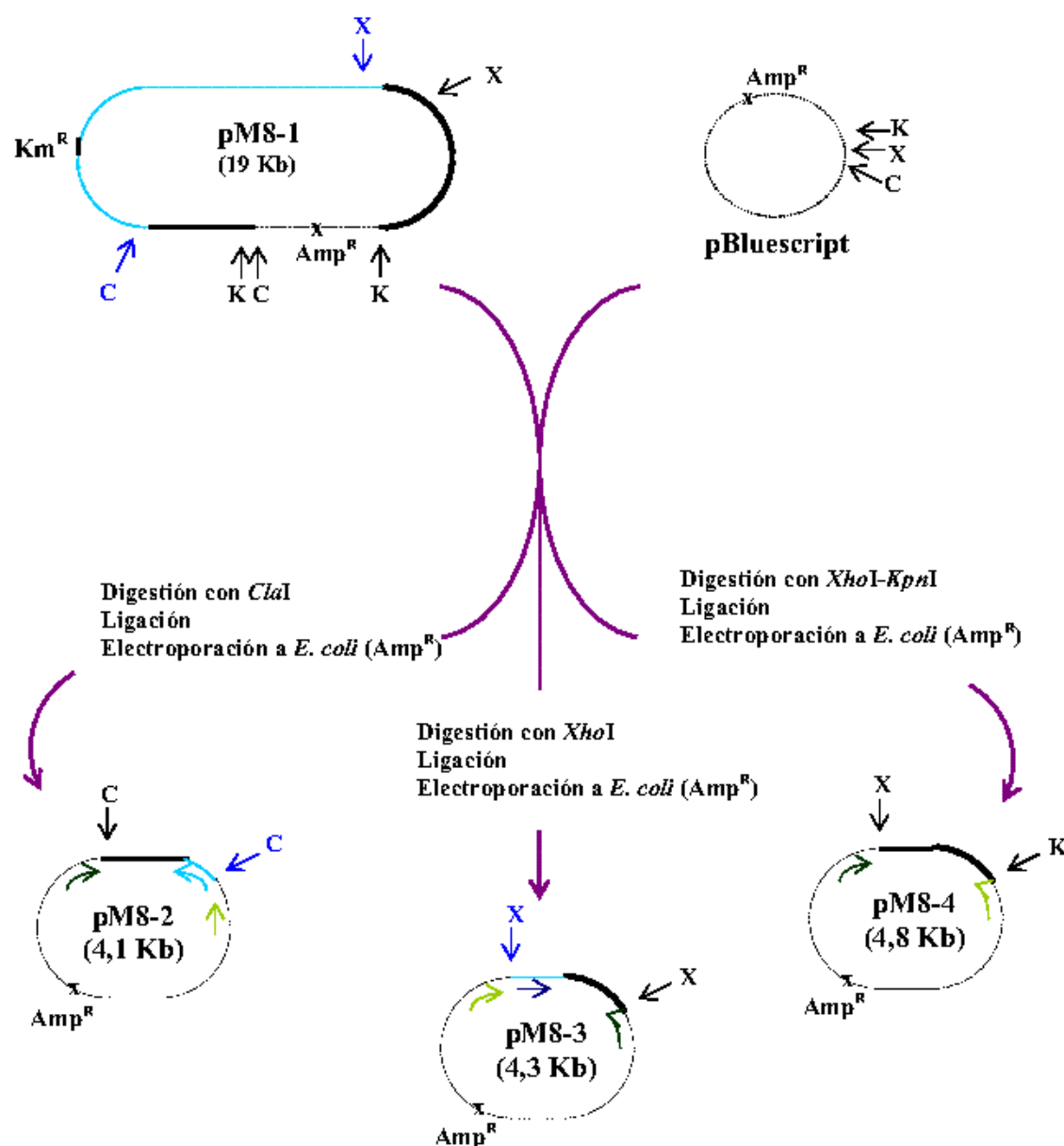


Figura 3.10 Subclonación de tres fragmentos del locus Ω MR1104. El fragmento *ClaI* de 1,1 Kb se subclonó en pBluescript para dar lugar al plásmido pM8-2. El fragmento *XhoI* de 1,3 Kb se subclonó en pBluescript, dando lugar a pM8-3. El fragmento *XhoI-KpnI* de 1,8 Kb se subclonó en el mismo vector, dando lugar a pM8-4. Se indican los puntos de corte para las enzimas: *ClaI* (C), *XhoI* (X) y *KpnI* (K). También se muestra la alineación y orientación de los oligonucleótidos utilizados en la secuenciación: universal (flecha verde claro), inverso (flecha verde oscuro), TnU (flecha azul claro) y TnD (azul oscuro).

de los tripletes (Figura 3.11). Dicha fase de lectura contenía dos ORF's, uno completo y otro incompleto. El primero de los ORF's correspondía al interrumpido por la inserción de *Tn5-lac* y podría determinar una proteína de 595 aminoácidos. Una comparación de secuencias entre la supuesta proteína y las depositadas en los bancos de datos indicó que podría tratarse del precursor de una lipoproteína de la membrana externa ($E = 2 \times 10^{-4}$). Se comprobó además la presencia de dos dominios característicos de bombas de eflujo de toxinas. Estos dominios están presentes en proteínas de resistencia a antibióticos o metales, localizadas en la membrana externa de bacterias Gram-negativas (Johnson y Church, 1999).

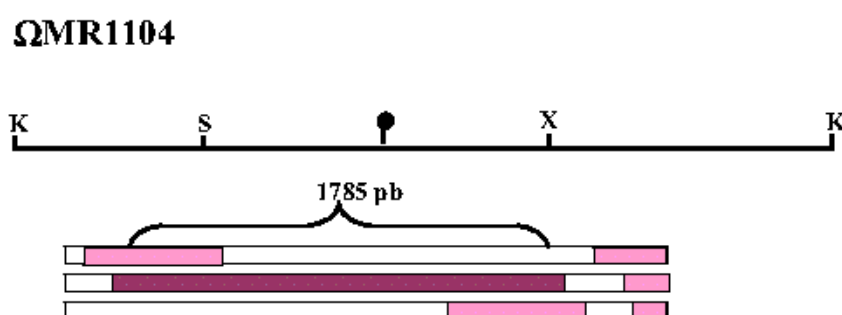


Figura 3.11 Fragmento clonado del locus **ΩMR1104**. Se indica el sitio de inserción de *Tn5-lac* y los puntos de corte para las enzimas: *KpnI* (K), *SacI* (S) y *XhoI* (X).

III.2.3 Clonación y secuenciación del locus **ΩMR1100** (promotor M4+)

La clonación y la secuenciación del DNA asociado al promotor M4+ se realizaron mediante el mismo procedimiento descrito en el apartado anterior. Así pues, el vector pBluescript y DNA cromosómico procedente de la estirpe MR1100 fueron digeridos con *KpnI*. Tras la ligación de los fragmentos resultantes, se electroporaron células de *E. coli* (selección de Km^R) y se

caracterizaron los plásmidos procedentes de 72 colonias Km^R Amp^R. Se aisló así uno de los clones portadores del plásmido de interés, denominado pM4-1 (Figura 3.12a). El análisis preliminar de dicho plásmido con enzimas de restricción indicó que se había clonado un fragmento de DNA de gran tamaño. Por este motivo y para facilitar el análisis del tramo de DNA situado aguas abajo del sitio de inserción, se subclonó en el vector pBluescript un fragmento *Hind*III de 4,6 Kb contenido en pM4-1, dando lugar a la construcción de pM4-2. Los mapas de restricción de pM4-1 y pM4-2 se indican en la Figura 3.12b.

De modo similar a lo descrito para el locus Ω MR1104, se subclonaron dos fragmentos a ambos lados del sitio de inserción de Tn5-*lac* para la secuenciación del DNA del locus Ω MR1100 (Figura 3.13). El plásmido pM4-3 contiene el fragmento *Kpn*I-*Bam*HI de 2,6 Kb procedente de pM4-1 insertado en el vector pBluescript. Dicho fragmento se secuenció con los cebadores universal, inverso y TnU. Por otro lado, el plásmido pM4-4 contiene el fragmento *Pst*I de 1,4 Kb (de pM4-2) subclonado en el mismo vector. La secuenciación de este fragmento se realizó utilizando los cebadores universal, inverso y TnD. Al igual que en el caso anterior, tras la obtención de una secuencia inicial adyacente a cada uno de los dos extremos del transposón, se diseñaron nuevos oligonucleótidos (m4bk y m4p, Materiales y Métodos, II.10.8) para avanzar en la secuenciación hacia ambos lados del sitio de inserción de Tn5-*lac*.

La secuencia continua obtenida comprendía 1.620 nucleótidos. Ésta se tradujo en las seis posibles fases de lectura, comprobándose así la presencia de dos ORFs incompletos en la segunda fase, el segundo de los cuales constaba de 1.335 pb (Figura 3.14). En éste, el porcentaje de bases G o C en la tercera posición de los codones secuenciados era del 89 %, desviándose claramente de la proporción global de pares G-C en dicho ORF (64 %). La secuencia de aminoácidos deducida muestra gran parecido con la de receptores de membrana

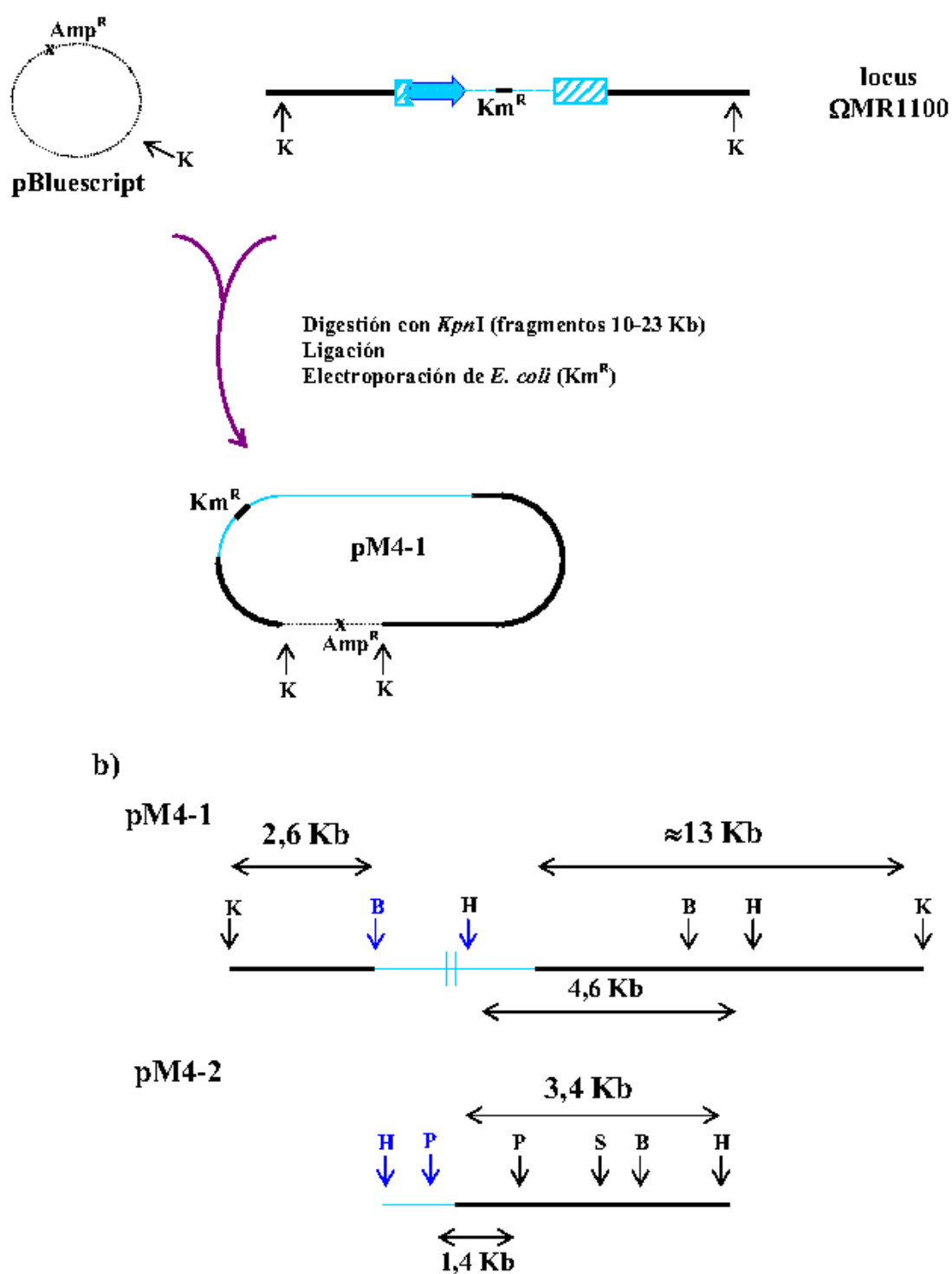


Figura 3.12 a) Clonación del locus de inserción Ω MR1100. b) Mapas físicos de pM4-1 y pM4-2. Se indican los puntos de corte para las enzimas *KpnI* (K), *BamHI* (B), *HindIII* (H), *PstI* (P) y *SacI* (I).

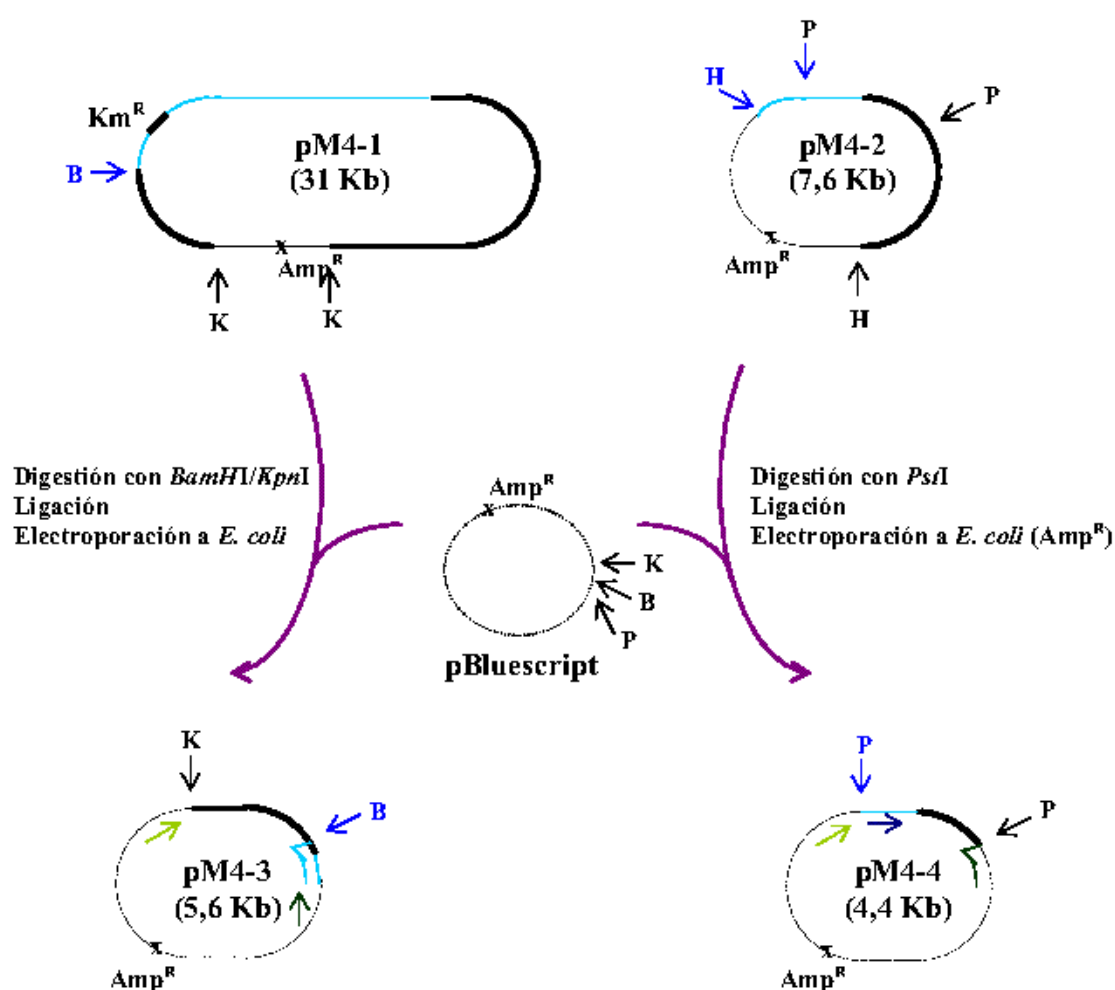


Figura 3.13. Subclonación de dos fragmentos del locus Ω MR1100. El fragmento *Kpn*I-*Bam*HI de 2,6 Kb se subclonó en pBluescript para dar lugar al plásmido pM4-3. El fragmento *Psf*I de 1,4 Kb se subclonó en el mismo vector dando lugar a pM4-4. Se indican los puntos de corte para las enzimas: *Kpn*I (K), *Bam*HI (B), *Hind*III (H) y *Psf*I (P). También se muestra la alineación con los oligonucleótidos: universal (flecha verde claro), inverso (flecha verde oscuro), TnU (flecha azul claro) y TnD (azul oscuro).

dependientes de TonB de *E. coli* y otras bacterias Gram-negativas, implicados normalmente en el transporte de vitamina B12, hierro y colicina I.

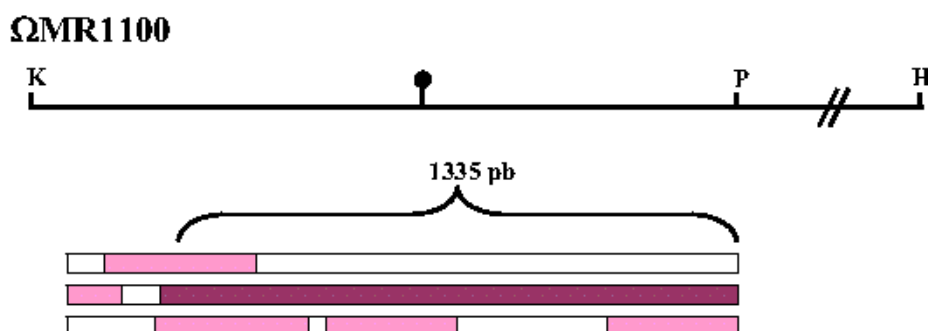


Figura 3.14 Fragmento clonado del locus Ω MR1100. Se indica el sitio de inserción de Tn5-lac y los puntos de corte para las enzimas: *Kpn*I (K), *Pst*I (P) y *Hind*III (H).

III.2.4 Clonación y secuenciación del locus Ω MR915 (promotor M5-)

El locus Ω MR915 se intentó clonar con el método descrito en los dos últimos apartados. Se aislaron varios electroporantes de *E. coli* (Km^R Amp^R) que debían contener plásmidos portadores de las secuencias asociadas al promotor M5-. Sin embargo, cuando dichos plásmidos se examinaron con enzimas de restricción, se comprobó que ningún clon presentaba DNA de *M. xanthus* aguas arriba de la inserción de Tn5-lac. Además, la mayoría de los plásmidos carecían de segmentos de DNA de diferente longitud correspondientes al extremo izquierdo del transposón. El análisis Southern realizado con la estirpe MR915 (véase apartado III.1.4) indica que no existe un sitio de corte para la enzima *Kpn*I en el DNA inmediatamente a la izquierda del transposón. Por tanto, la ausencia de DNA de *M. xanthus* y de las secuencias correspondientes al extremo 5' de Tn5-lac se debería a la presencia de distintas deleciones en esta región del DNA.

En sucesivos intentos de clonación del locus Ω MR915 se obtuvo el mismo resultado. No obstante, a partir del mapa físico correspondiente al tramo de DNA a la derecha del transposón, se llevó a cabo la subclonación de un fragmento contenido en dicha región. Así, se insertó el fragmento *XhoI-PstI* de 1,3 Kb en el vector pBluescript digerido con las mismas enzimas, dando lugar al plásmido pM5-2 (Figura 3.15). La secuenciación del inserto de pM5-2 se realizó utilizando los cebadores universal, TnD y m5xp (Materiales y Métodos, II.10.8).

Era posible que las diferentes delecciones encontradas a la izquierda de la inserción Ω MR915 fueran el resultado de reorganizaciones cromosómicas causadas por la presencia del transposón *Tn5-lac* en esa región. Para solventar este inconveniente, se clonó dicha región mediante el procedimiento de clonación *in situ* empleado para el locus Ω MR900. En este caso, se partió del plásmido pM5-2, que ya contenía DNA de *M. xanthus* adyacente al extremo derecho del transposón. El fragmento *XhoI-PstI* incluido en pM5-2 se subclonó esta vez en el vector de *M. xanthus* pBGS18, que confiere resistencia a kanamicina. De esta manera se obtuvo el plásmido pM5-3, que se empleó para la electroporación de la estirpe silvestre de *M. xanthus* (Figura 3.16). Tras la digestión del DNA cromosómico con *KpnI* y la ligación intramolecular de los fragmentos resultantes, se electroporó *E. coli*. Se caracterizaron los plásmidos extraídos de 24 colonias Km^R y se comprobó que se había clonado un fragmento de DNA de gran tamaño, correspondiente a la región izquierda del locus Ω MR915. El plásmido correspondiente se denominó pM5-4 (Figura 3.16). Coincidente con esta fase del trabajo, se hizo accesible la secuencia del genoma de *M. xanthus*, de modo que no fue necesaria la subclonación de distintos fragmentos de pM5-4 para obtener la secuencia del tramo de DNA situado aguas arriba de *Tn5-lac* (véase Discusión, IV.1).

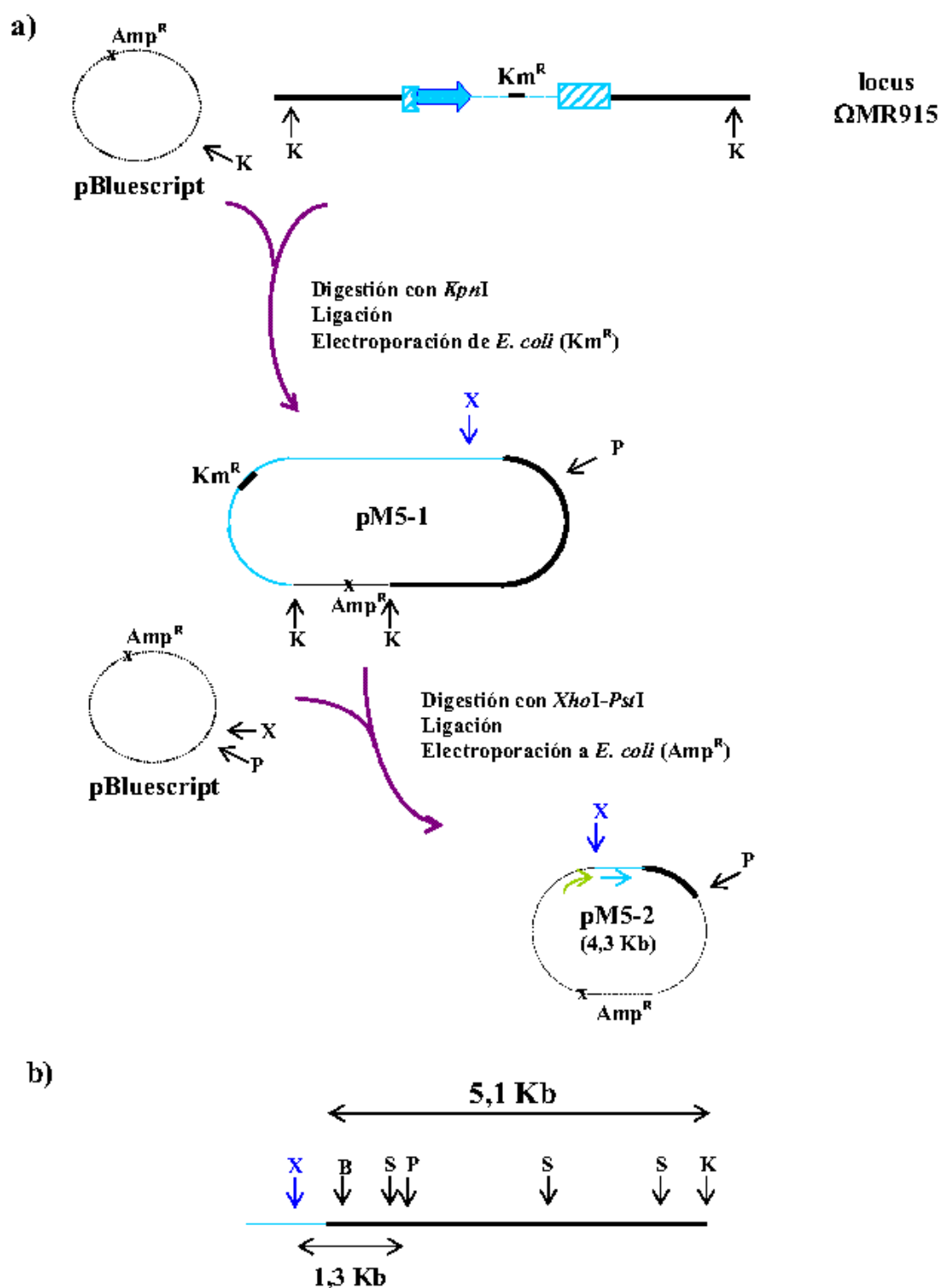


Figura 3.15 a) Clonación del locus de inserción ΩMR915 y subclonación del fragmento $XhoI$ - $PstI$ de 1,3 Kb. b) Mapa físico del plásmido pM5-1. Se indican los puntos de corte para las enzimas $KpnI$ (K), $XhoI$ (X), $PstI$ (P), $BamHI$ (B) y $SacI$ (S).

alelo silvestre del
locus Ω MR915

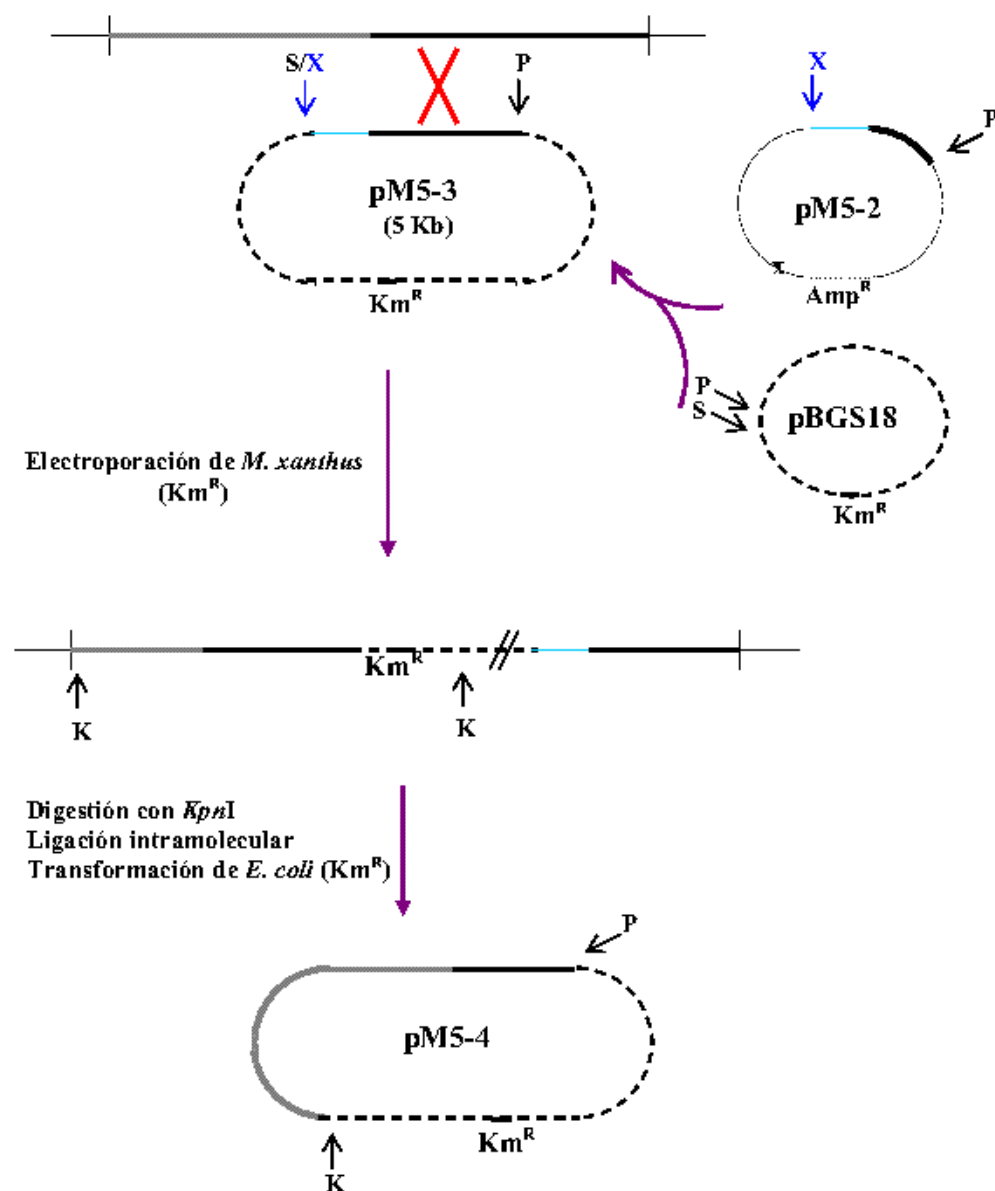


Figura 3.16 Clonación *in situ* del DNA a la derecha del locus Ω MR915. Se indican los puntos de corte para las enzimas: *PstI* (P), *XhoI* (X), *SalI* (S) y *KpnI* (K).

En cualquier caso, se utilizó la secuencia de nucleótidos del fragmento *XhoI-PstI* para realizar una búsqueda de posibles ORF's (Figura 3.17). En la tercera fase de lectura se identificaron dos ORF's, ambos incompletos. El primero de ellos, de 369 pb de longitud, correspondía al interrumpido por la inserción de *Tn5-lac*. La búsqueda de similitudes entre la proteína deducida a partir de dicho ORF y las depositadas en los bancos de datos reveló que se trataba de un regulador transcripcional de la familia Lrp/AsnC, cuyo representante más importante es la proteína Lrp de *E. coli*. La proteína Lrp es un regulador global de la transcripción de carácter arquitectónico y se encuentra asociada al nucleóide bacteriano junto con otras proteínas de tipo histona.

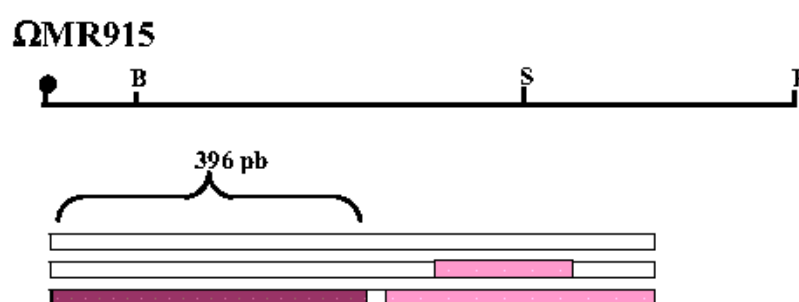


Figura 3.17 Fragmento clonado del locus Ω MR915. Se indica el sitio de inserción de *Tn5-lac* y los puntos de corte para las enzimas: *Bam*HI (B), *Sac*I (S) y *Pst*I (P).

III.3 RELACIÓN ENTRE LA FUNCIÓN DE CarD Y LA DE LAS PROTEÍNAS CarQ e IhfA

Datos previos a este trabajo indican que la acción de CarD está relacionada directa o indirectamente con la de otras proteínas. Como se describió en la Introducción, la activación del promotor P_{QRS} requiere, además de CarD, de las proteínas CarQ e IhfA (Figura 1.5) (Martínez-Laborda y Murillo, 1989; Gorham *et al.*, 1996; Nicolás *et al.*, 1994; Moreno *et al.*, 2001). CarQ es un factor σ de la clase ECF. Consistente con esto, la secuencia de nucleótidos de la región -35 del promotor P_{QRS} es similar a la de promotores bacterianos reconocidos por otros factores ECF- σ (Lonetto *et al.*, 1994; Martínez-Argudo *et al.*, 1998). En la misma posición -35 de P_{QRS} se ha localizado un sitio de unión *in vitro* del factor IhfA (Moreno, 1997). Aguas arriba de esa región se encuentra el sitio de unión de la proteína CarD a dicho promotor (Nicolás *et al.*, 1996). Podría ocurrir, pues, que la activación de P_{QRS} dependiera de la formación de un complejo heteromultimérico de proteínas y DNA, aunque no se han aportado pruebas directas de interacción física entre CarD, CarQ e IhfA.

En cualquier caso, dada la participación de las proteínas CarQ e IhfA en la activación del promotor P_{QRS} , cabía preguntarse si se trata o no de un fenómeno que se reproduce en los nuevos promotores dependientes de CarD, a sabiendas de que, en lo que se refiere a CarQ, ya se ha descartado su participación en la expresión de genes dependientes de CarD implicados en el proceso de desarrollo multicelular (Nicolás *et al.*, 1994).

III.3.1 Efecto de la mutación *carQ1*

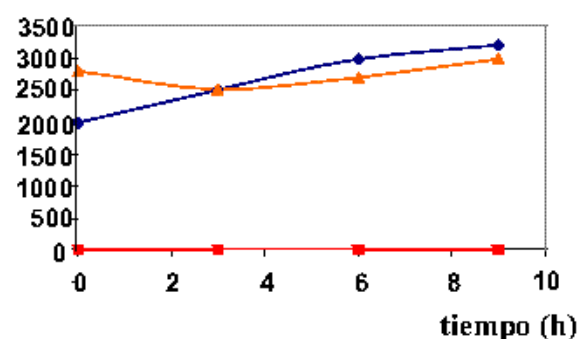
El alelo *carQ1* fue aislado en un escrutinio de mutaciones espontáneas supresoras del fenotipo Car^C de una estirpe *carR*. Las mutaciones encontradas causaban un fenotipo Car⁻, resultando ser, por tanto, no revertientes sino epistáticas sobre la mutación *carR* (Martínez-Laborda y Murillo, 1989). El alelo *carQ1* fue posteriormente secuenciado y consiste en una delección de nueve pares de bases dentro de la región responsable de la proteína CarQ (McGowan *et al.*, 1993; Gorham *et al.*, 1996).

La posible acción de la proteína CarQ sobre los promotores regulados por CarD identificados en este trabajo se comprobó mediante la transducción de las cuatro inserciones de Tn5-*lac* en estudio a la estirpe mutante *carQ1*. Se picaron al menos 20 transductantes de cada inserción en cajas de X-Gal y, tras dos días de crecimiento, se comparó la intensidad del color azul de las colonias con la de los controles en fondo silvestre y en fondo *carD1*. En ningún caso se detectaron diferencias en la coloración de las colonias *carQ1* en relación con las silvestres. El análisis cuantitativo de actividad enzimática confirmó estos resultados (Figura 3.18).

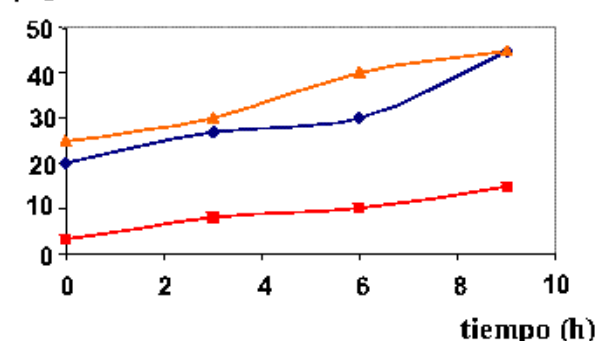
III.3.2 Efecto de *ihfA2* sobre la expresión de los promotores MF1- y M5-

La mutación *ihfA2* consiste en una delección en fase de 81 pb que tiene como consecuencia la eliminación de un péptido interno de la proteína IhfA. Este péptido comprende 27 amino ácidos incluidos en el brazo flexible que contacta con el DNA (Rice *et al.*, 1996; Moreno *et al.*, 2001). El fragmento delecionado resulta crítico para la actividad de IhfA, de manera que la mutación *ihfA2* elimina

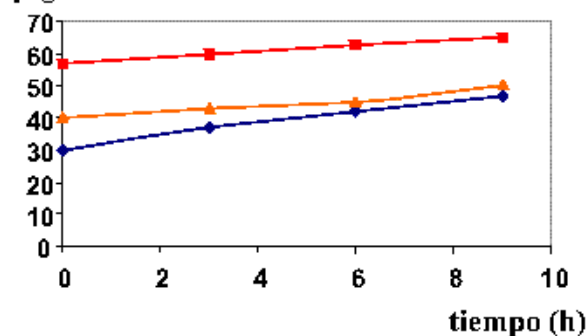
a) MF1-

 β -galactosidasa

b) M5-

 β -galactosidasa

c) M4+

 β -galactosidasa

d) M8+

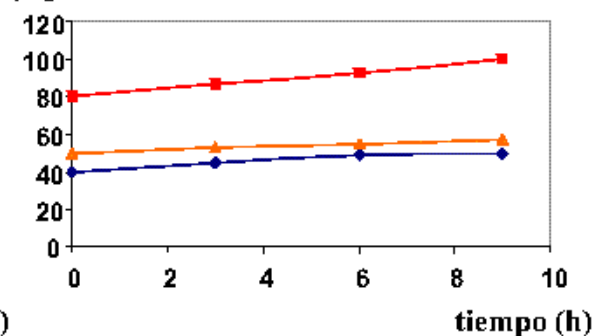
 β -galactosidasa

Figura 3.18 Efecto de la mutación *carQ1* sobre los promotores regulados por CarD. Se realizaron ensayos enzimáticos con, al menos, dos transductantes independientes de cada tipo. Los fondos genéticos analizados son: *carD*⁺ (línea azul), *carD1* (línea roja) y *carQ1* (línea naranja). **a)** Estirpes MR900, MR902 y MR1137, respectivamente. **b)** Estirpes MR915, MR1156 y MR1139. **c)** Estirpes MR1100, MR1101 y MR1146. **d)** Estirpes MR1104, MR1105 y MR1152.

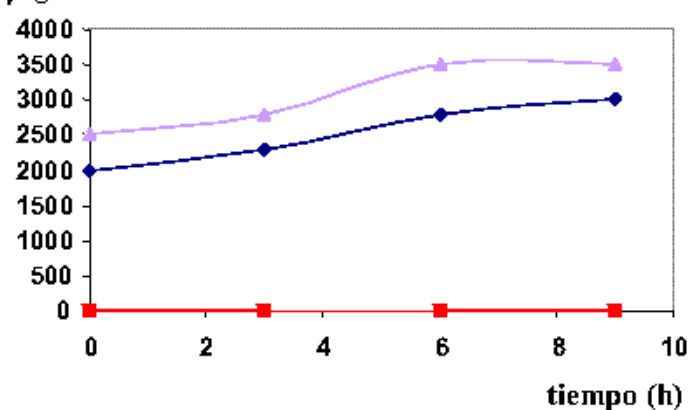
por completo la actividad del promotor P_{QRS} y, parcialmente, la del promotor P_{carA} (Moreno *et al.*, 2001).

Para estudiar el efecto de la mutación *ihfA2* sobre la expresión de los promotores regulados por CarD, se transdujeron las inserciones Ω MR900 (asociada al promotor MF1-) y Ω MR915 (asociada a M5-) a la estirpe mutante *ihfA2*. De cada transducción, se picaron 20 colonias Km^R en X-Gal. Hay que hacer notar que la mutación *ihfA2* provoca *per se* un cambio de coloración de las colonias y, por tanto, resulta difícil comparar la respuesta al X-Gal de las colonias *ihfA2* con la de las colonias *ihfA*⁺. La prueba en cajas de X-Gal se realizó, por tanto, sólo para comprobar el comportamiento homogéneo de los transductantes de un mismo tipo. Tras esa comprobación, se escogieron dos o tres colonias de cada clase para el ensayo de actividad β -galactosidasa. Como se observa en la Figura 3.19, la mutación *ihfA2* no tuvo un efecto significativo sobre la expresión del promotor MF1-, mientras que sí afectó drásticamente al promotor M5-, reduciendo su actividad incluso en mayor grado que la mutación *carD1*.

III.3.3 Efecto de *ihfA2* en MR1100 y MR1104

Al transducir las inserciones Ω MR1100 (correspondiente al promotor M4+) y Ω MR1104 (correspondiente a M8+) a la estirpe mutante *ihfA2* (transductantes MR1147 y MR1153, respectivamente), surgieron ciertas dificultades que impidieron determinar el efecto del alelo *ihfA2* sobre la expresión de dichas inserciones. En principio, el número de colonias transductantes fue mucho menor del obtenido en otras transducciones sobre la estirpe *ihfA2*. Además, el tamaño de dichas colonias era también significativamente menor que el de las colonias parentales *ihfA2*. Posteriormente, se comprobó que las estirpes MR1147 y MR1153 crecían mal en medio líquido y, por tanto, las medidas

a) MF1-

 β -galactosidasa

b) M5-

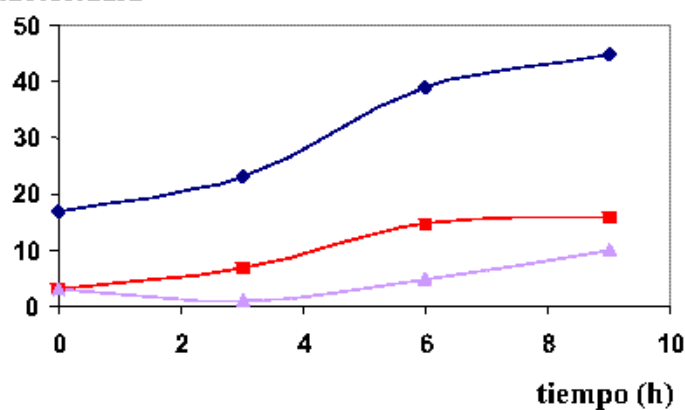
 β -galactosidasa

Figura 3.19 Efecto de la mutación *ihfA2* sobre la expresión de los promotores MF1- y M5-. Se muestran los resultados de las medidas de actividad enzimática a lo largo del tiempo en las estirpes: **a)** MR900 (*carD*⁺, línea azul), MR902 (*carD1*, línea roja) y MR1136 (*ihfA2*, línea malva). **b)** MR915 (*carD*⁺, línea azul), MR1156 (*carD1*, línea roja) y MR1138 (*ihfA2*, línea malva)

enzimáticas no resultaban comparables a las de sus parentales. El efecto de la mutación *ihfA2* sobre la tasa de crecimiento de las estirpes citadas se estudió mediante la comparación de sus curvas de crecimiento con la de cada uno de sus parentales respectivos y el tipo silvestre. Se diluyeron cultivos de cada estirpe en medio fresco, hasta una misma densidad celular y en volúmenes finales idénticos, y se siguió su crecimiento durante 12 horas (medidas de densidad óptica a 550 nm). Los resultados, representados en la Figura 3.20, confirman que la mutación *ihfA2*, en combinación con las inserciones Ω MR1100 ó Ω MR1104, tiene un efecto dramático sobre la tasa de crecimiento de *M. xanthus*.

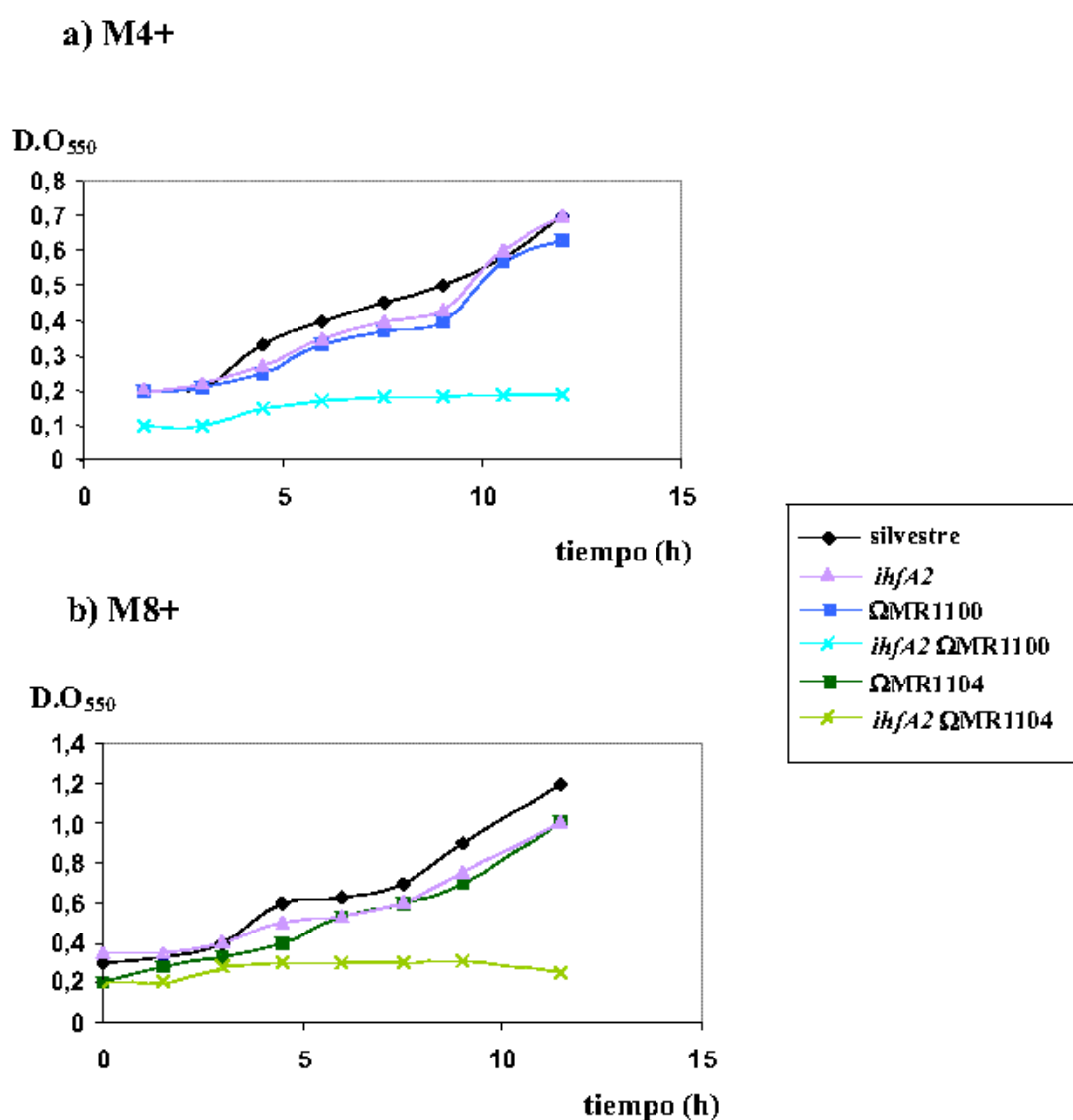


Figura 3.20 Efecto de la mutación *ihfA2* sobre el crecimiento de las estirpes MR1100 (a) y MR1104 (b). Se muestran las curvas de crecimiento de los mutantes dobles: a) MR1147 (Δ MR1100 *ihfA2*, línea azul claro) y b) MR1153 (Δ MR1104 *ihfA2*, línea verde claro) y la de sus parentales respectivos: MR1100 (línea azul oscuro), MR1104 (línea verde oscuro), MR358 (*ihfA2*, línea malva) y la estirpe silvestre DK1050 (línea negra).

III.4 SUPRESORES DE MUTACIONES *carD*⁻

Como se ha comentado anteriormente, la acción de CarD en la activación o represión selectiva de unos u otros genes ha de estar mediada por otras proteínas. Con el objeto de entender el papel global de CarD en diversos aspectos del ciclo de vida de *M. xanthus*, así como su relación con otras proteínas de la bacteria, se inició una búsqueda de mutaciones supresoras de mutaciones *carD*⁻. Como procedimiento de mutagénesis se empleó la radiación con luz ultravioleta. La ventaja del uso de luz ultravioleta como agente mutagénico reside en la posibilidad de aislar una gama de mutaciones distintas, algunas de las cuales no se obtendrían con el uso de transposones. Por ejemplo, la luz ultravioleta puede provocar alteraciones leves en la estructura del gen, no llegando a inactivar completamente su función. La búsqueda de mutaciones supresoras se realizó sobre una estirpe portadora de una fusión transcripcional *lacZ* a un fragmento derivado del promotor MF1-, cuya actividad se ve muy afectada por las mutaciones *carD*⁻. Una vez obtenidas tales mutaciones, se estudió si éstas también suprimían el efecto de las mutaciones *carD*⁻ sobre otros promotores. Esto permitiría posteriormente establecer conexiones moleculares entre diferentes conjuntos de promotores regulados por CarD.

III.4.1 Obtención de mutaciones supresoras de *carD*⁻

El promotor MF1- muestra una alta actividad transcripcional (unas 3000 unidades de actividad β -galactosidasa a partir de una fusión transcripcional con el gen *lacZ*). La mutación *carD1* anula prácticamente su actividad, mientras que la mutación *carD2* la reduce hasta unas 200 unidades. Se dispone de un fragmento de 2,3 Kb derivado del promotor MF1- y fusionado al gen *lacZ* carente de su

propio promotor (M. Fontes, comunicación personal). En esta construcción, el gen *lacZ* queda 160 pb aguas abajo del sitio de inserción Ω MR900 y en la orientación correcta de transcripción (Figura 3.21a). La fusión transcripcional (en adelante, $P_{MF}::lacZ$) conserva hasta 2000 unidades de actividad cuando está integrada en la estirpe silvestre, mientras que no presenta actividad en la estirpe *carD1* (M. Fontes, comunicación personal). $P_{MF}::lacZ$, contenida en el plásmido pMAR932, se introdujo en las estirpes silvestre (DK1050), *carD1* (MR522) y *carD2* (MR650), mediante transducción con el fago P1 y selección del carácter Km^R , dando lugar a las estirpes MR1141, MR1142 y MR1143, respectivamente. La integración de pMAR932 por recombinación homóloga en el cromosoma de *M. xanthus* origina una duplicación de la región P_{MF} , generando así una versión silvestre del locus correspondiente y otra truncada por el gen *lacZ* (Figura 3.21). Las estirpes MR1142 y MR1143 producen escasa o nula actividad β -galactosidasa, ya que contienen las mutaciones *carD1* o *carD2* (Fenotipo Lac^- o $Lac^{+/}$). Estas últimas estirpes, por tanto, fueron empleadas en el experimento de búsqueda de mutaciones que restauraran la actividad β -galactosidasa. El esquema del experimento se muestra en la Figura 3.21.

Cultivos en fase exponencial tardía de las estirpes MR1142 (*carD1* $P_{MF}::lacZ$) y MR1143 (*carD2* $P_{MF}::lacZ$) se sometieron a un tratamiento con luz ultravioleta durante 2,5 minutos (Materiales y Métodos, II.9.2). Se sembraron diluciones de dichos cultivos en placas de X-Gal y éstas se incubaron durante 4-5 días a 33 °C. Simultáneamente, se sembraron controles de las estirpes MR1142 y MR1143 y de la estirpe MR1141 (*carD*⁺) que no habían sido irradiados.

De un total de 7.245 colonias observadas, se aislaron siete en las que se restauraba, al menos parcialmente, el fenotipo Lac^+ , presentando un color azul en presencia de X-Gal más intenso que el de las colonias parentales. De las siete colonias citadas, cuatro procedían de la estirpe MR1142 y, por tanto, parecían

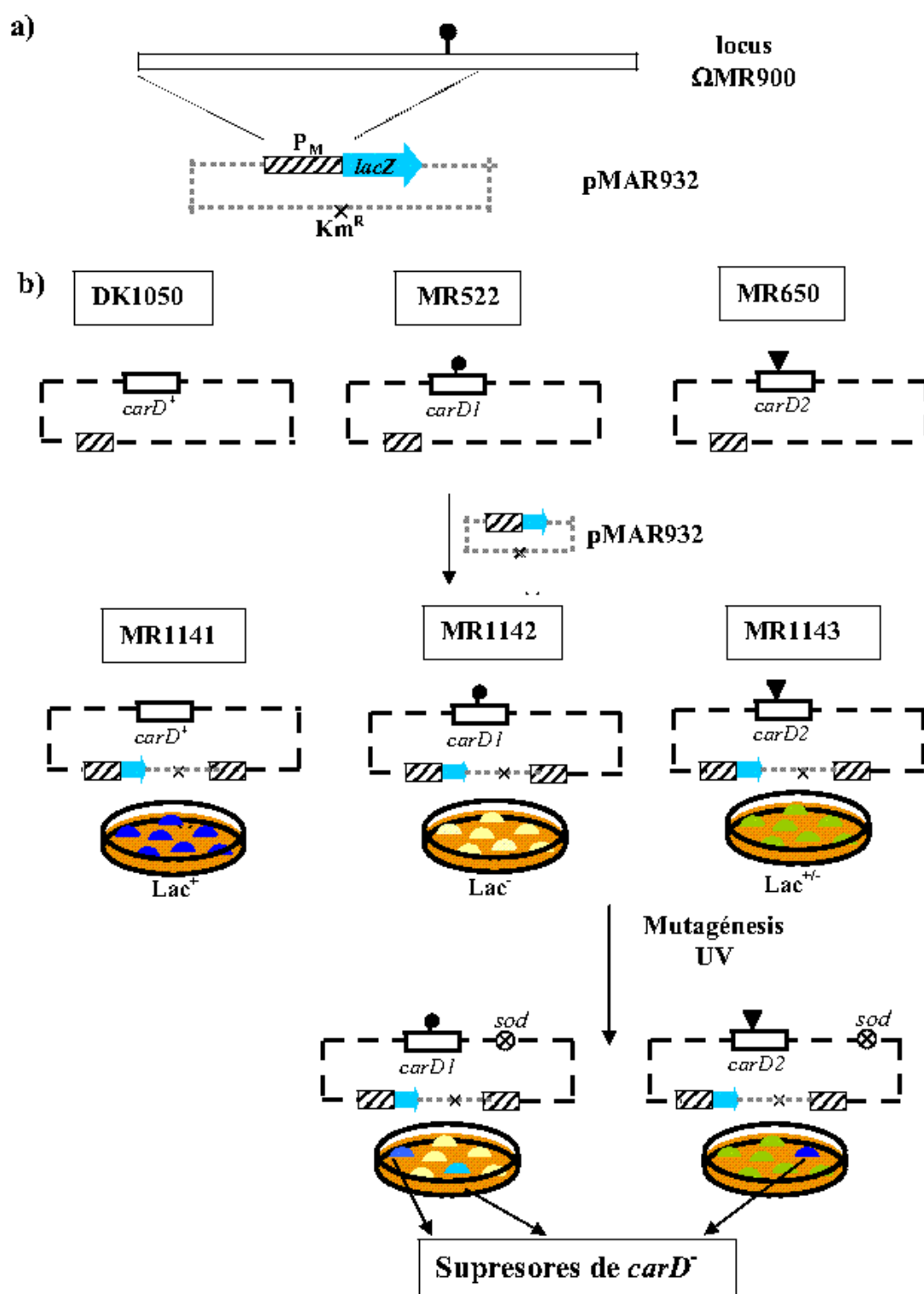


Figura 3.21 a) Representación de la fusión transcripcional $P_{MF}::lacZ$ en el plásmido pMAR932. Se indica la posición del transposón $\Omega MR900$, pero el fragmento P_{MF} carece de dicho transposón. b) Experimento de búsqueda de supresores de mutaciones *carD*⁻. Las líneas gruesas discontinuas representan el cromosoma de *M. xanthus*.

contener mutaciones supresoras de la mutación *carD1*. Las otras tres colonias procedían de la estirpe MR1142 y, por tanto, parecían contener mutaciones supresoras de la mutación *carD2*. Los loci correspondientes se denominaron *sodE*, *sodA*, *sodF*, *sodD* (supresores de *carD1*), *sodB*, *sodG* y *sodC* (supresores de *carD2*), y las estirpes MR1157, MR1158, MR1159, MR1160, MR1161, MR1162 y MR1163, respectivamente. Las diferencias de actividad enzimática con respecto a sus controles en medio líquido se representan en la Figura 3.22.

Las mutaciones *sodA1* y *sodD1* (cepas MR1158 y MR1160, respectivamente) recuperan hasta un 10% de la actividad de $P_{MF}::lacZ$ observada en el tipo silvestre (Figura 3.22a y b), mientras que el efecto supresor de *sodE1* y *sodF1* (MR1157 y MR1159) sobre el alelo *carD1* es menor (Figura 3.22c y d). En el caso del alelo *carD2*, las mutaciones supresoras en los loci *sodB*, *sodC* y *sodG* (estirpes MR1161, MR1163 y MR1162, respectivamente) provocan una recuperación de prácticamente el total de la actividad promotora del fragmento $P_{MF}::lacZ$, llegando a las 2000 unidades de actividad β -galactosidasa (Figura 3.22e, f y g).

III.4.2 Estudio del fenotipo Car y del fenotipo Fru de estirpes *sod*

Las siete mutaciones aisladas en el apartado anterior suprimen el efecto de *carD1* o de *carD2* sobre la actividad de la construcción $P_{MF}::lacZ$. Con el objeto de profundizar en el estudio de dichas mutaciones, se averiguó a continuación si suprimían también el efecto de *carD1* o de *carD2* sobre los procesos de carotenogénesis y desarrollo multicelular de *M. xanthus*. Para el análisis del fenotipo Car, se sembraron por duplicado estrías independientes de cada cepa. Tras dos días de crecimiento a 33 °C, una de las cajas se iluminó, continuando la segunda caja en condiciones de oscuridad. Se observó que todas las estirpes

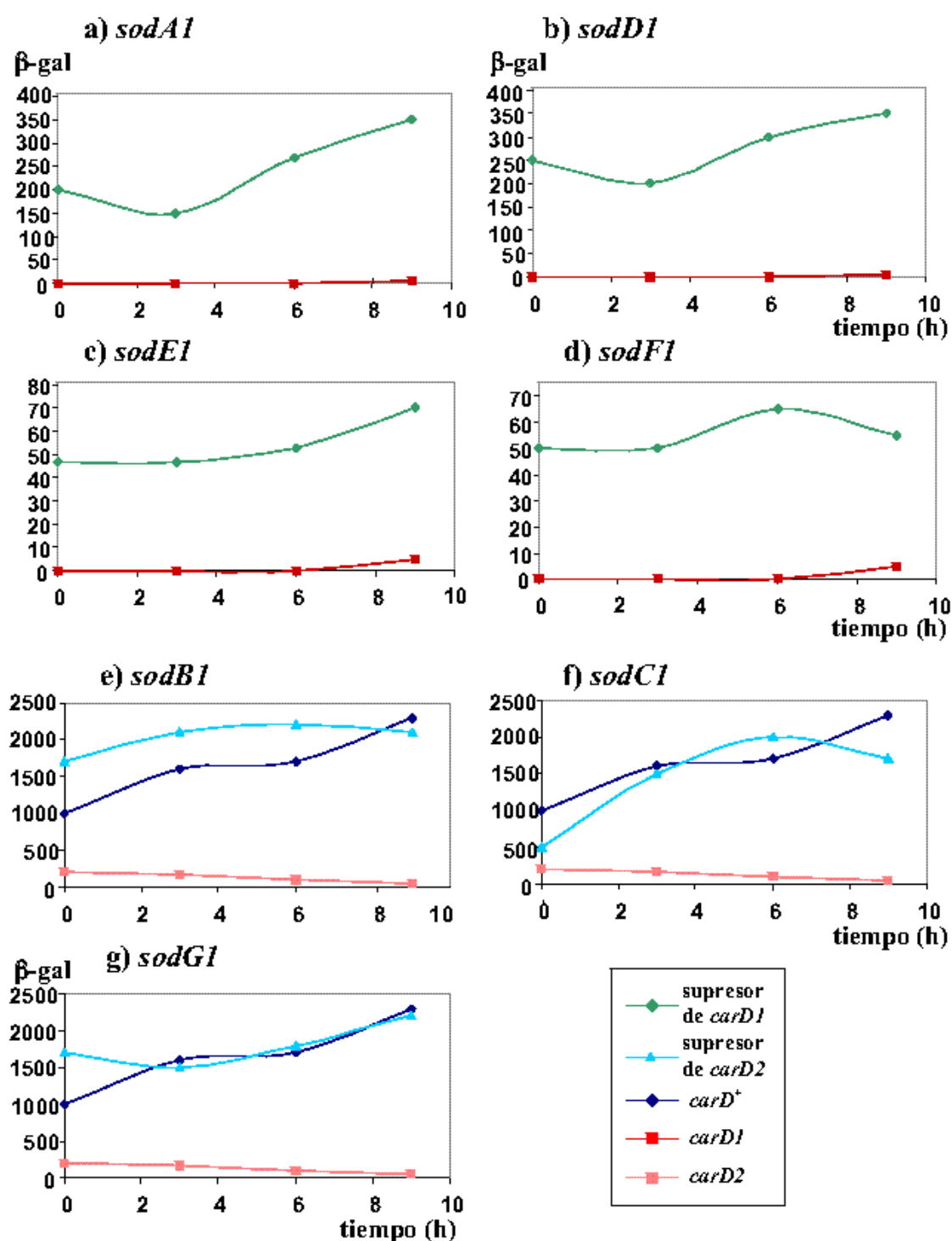
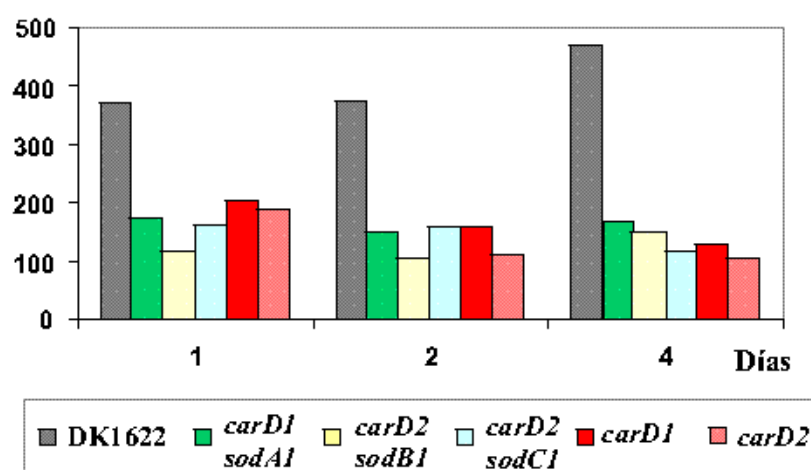


Figura 3.22 Efecto de las mutaciones *sod* sobre la actividad del fragmento $P_{MF}::lacZ$. Se muestra la actividad β -galactosidasa de las estirpes con mutaciones supresoras de alelos *carD*. Las mutaciones *sodA1* (MR1158), *sodD1* (MR1160), *sodE1* (MR1157) y *sodF1* (MR1159) (línea verde) se aislaron a partir de la estirpe *carD1* (MR1142, línea roja oscura). Las mutaciones *sodB1* (MR1161), *sodC1* (MR1163) y *sodG1* (MR1162) (línea azul claro) proceden de *carD2* (MR1143, línea roja clara). La actividad correspondiente al fragmento integrado en la estirpe *carD*⁺ (MR1141) se representa en azul oscuro.

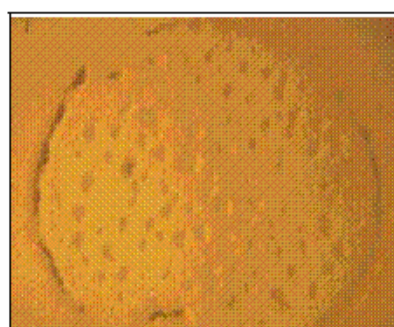
permanecían amarillas en ambas condiciones, presentando así un fenotipo Car^- , indistinguible del de las estirpes parentales *carD1* o *carD2*. Por consiguiente, ninguna de las mutaciones *sod* obtenidas restaura el fenotipo silvestre para la síntesis de carotenos en las estirpes *carD*⁻.

Por otro lado, se estudió la capacidad de fructificación de las estirpes MR1158 (*carD1 sodA1* $P_{\text{MF}}::\text{lacZ}$), MR1161 (*carD2 sodB1* $P_{\text{MF}}::\text{lacZ}$) y MR1163 (*carD2 sodC1* $P_{\text{MF}}::\text{lacZ}$). Se inocularon gotas de dichas estirpes en cajas de TPM y CF, junto con el control Fru^+ DK1622 y los controles negativos *carD1* (MR522) y *carD2* (MR650). El número de agregados y de cuerpos fructíferos se contó durante cuatro días y, el quinto día, se observaron algunos de estos últimos al microscopio óptico. Como muestra la Figura 3.23a, no se encontraron diferencias significativas entre el número de agregados formados por las estirpes con las distintas mutaciones supresoras y los controles negativos *carD1* y *carD2*. En general, sólo un tercio de los agregados de *carD2* llega a formar cuerpos fructíferos y, además, éstos presentan un aspecto inmaduro. La estirpe *carD1* manifiesta un fenotipo más severo con respecto al proceso de fructificación, no pudiendo superar la etapa de agregación (Nicolás, 1995; M. Elías, comunicación personal). Sin embargo, la estirpe MR1158 (*carD1 sodA1* $P_{\text{MF}}::\text{lacZ}$) sí fue capaz de desarrollar algunos cuerpos fructíferos a partir de los agregados (Figura 3.23b). La observación posterior de los cuerpos fructíferos al microscopio óptico reveló que contenían esporas en su interior y que presentaban un aspecto similar a los de la estirpe silvestre DK1622. Así pues, entre las mutaciones supresoras examinadas, sólo *sodA1* parece suprimir también el fenotipo Fru^- de una estirpe mutante *carD*⁻.

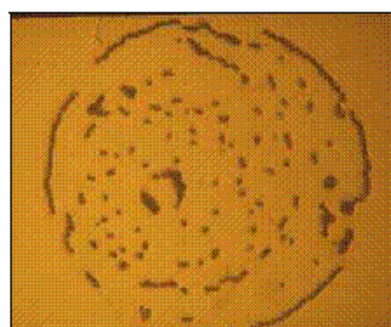
a)

N° de
agregados

b)



MR522



MR1158

Figura 3.23 Desarrollo multicelular de estirpes *sod*. a) Diagrama de barras del número de agregados en TPM de las estirpes: DK1622 (barra gris), MR1158 (*carD1 sodA1*, barra verde), MR1161 (*carD2 sodB1*, barra amarilla), MR1163 (*carD2 sodC1*, barra azul claro), MR522 (*carD1*, barra roja) y MR650 (*carD2*, barra rosa). Todas ellas se indican en el recuadro inferior. b) Fotografías de dos preparaciones observadas a la lupa de las estirpes MR522 (*carD1*) y MR1158 (*carD1 sodA1*), donde se observa el efecto supresor de *sodA* sobre *carD1* en la formación de cuerpos fructíferos.

III.4.3 Pérdida de la fusión transcripcional $P_{MF}::lacZ$

La búsqueda de mutaciones supresoras se realizó partiendo de estirpes en las que se había introducido el plásmido pMAR932 con la construcción $P_{MF}::lacZ$ (III.4.1). Una vez identificadas dichas mutaciones, era conveniente eliminar el plásmido integrado para poder así estudiar la influencia de algunas de las mutaciones aisladas sobre la expresión de otros promotores regulados por *CarD*, dado que éstos ya presentan una fusión transcripcional con el gen *lacZ*. Los promotores dependientes de *carD* que se pretendía estudiar incluyen los identificados en este trabajo y los implicados en la carotenogénesis.

Como se ha descrito anteriormente, $P_{MF}::lacZ$ contiene un fragmento derivado del promotor MF1-. El tamaño de ese fragmento (2,3 Kb) es suficientemente grande para permitir su recombinación con el promotor endógeno de la bacteria. La recombinación entre los dos fragmentos homólogos causa la pérdida de las secuencias entre ellos y, por consiguiente, del plásmido pMAR932, que no puede replicarse autónomamente. El procedimiento empleado se representa en la Figura 3.24. Se prepararon cultivos líquidos, en ausencia de kanamicina, de las siete estirpes *sod* en estudio. Dichos cultivos se mantuvieron en fase exponencial mediante diluciones continuadas en medio fresco durante 15-20 días, según la estirpe, con objeto de aumentar la población de células en las que se hubiera producido la pérdida del plásmido por recombinación homóloga intramolecular. Se sembraron diferentes diluciones de cultivos de las estirpes MR1158, MR1161 y MR1163 en cajas de X-Gal, congelando el resto de los cultivos para posibles aplicaciones futuras. Tras 3-4 días de crecimiento a 33 °C, aquellas estirpes que mostraron un fenotipo Lac^- en cajas de X-Gal se sembraron por duplicado en cajas de CTT y CTTK. Las estirpes $Lac^- Km^S$ procedentes de los

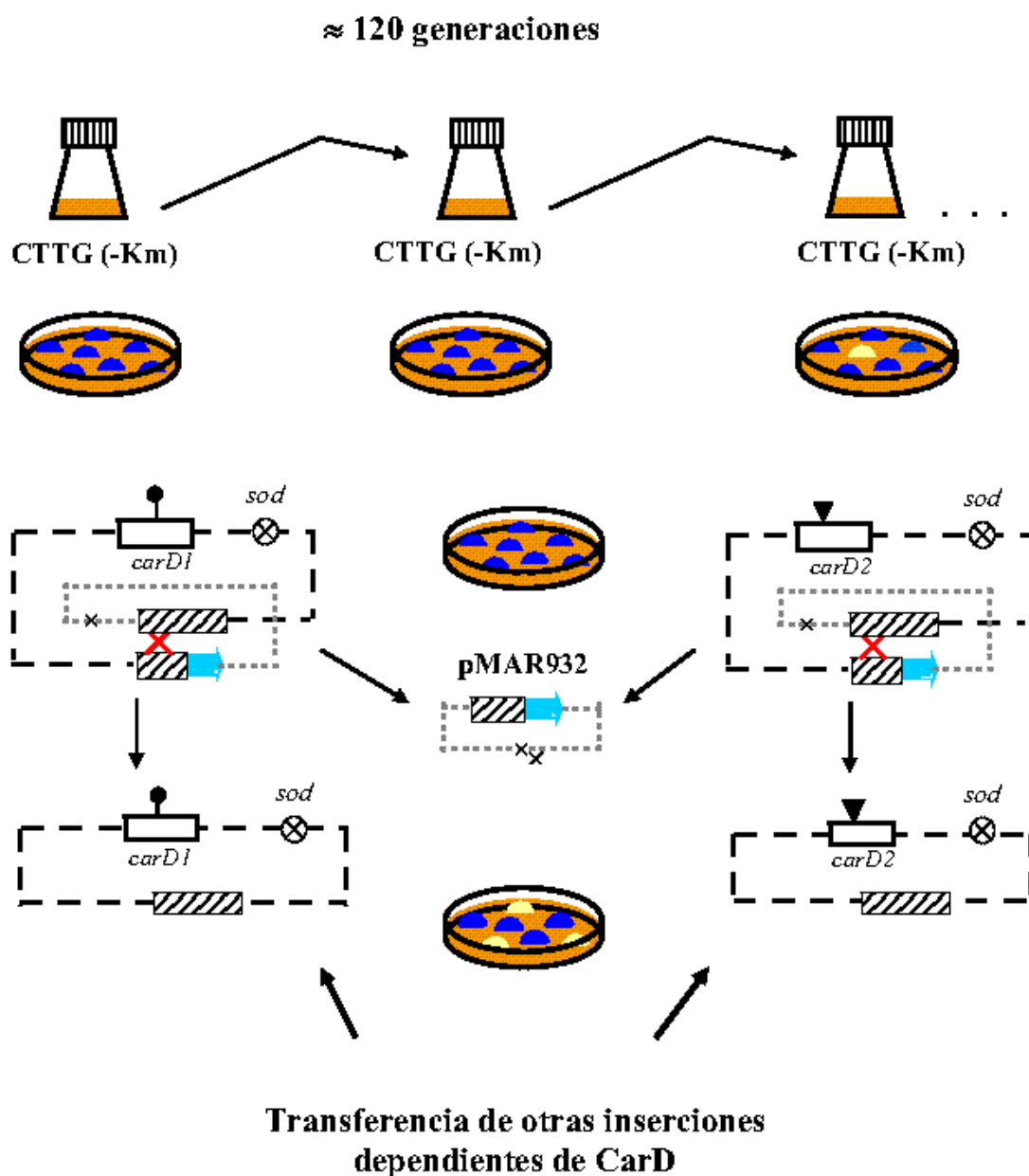


Figura 3.24 Procedimiento de eliminación del plásmido pMAR932. CTTG es medio CTT que contiene 10 µg/ml de gentamicina, antibiótico al que *M. xanthus* es resistente natural. Su presencia disminuye la probabilidad de contaminación durante las sucesivas diluciones de los cultivos.

distintos cultivos se denominaron MR1165 (*carD1 sodA1*), MR1168 (*carD2 sodB1*) y MR1170 (*carD2 sodC1*).

Que las estirpes citadas carecían realmente del plásmido pMAR932 se comprobó mediante un análisis Southern, utilizando como sonda un fragmento *SacI-BglIII* de 1,6 Kb derivado del locus Ω MR900, obtenido del plásmido pMAR913. Este fragmento de DNA está presente en la construcción de pMAR932. Como se indica en la Figura 3.25a, la estirpe con el plásmido pMAR932 integrado contiene dos copias de dicho fragmento. Como se esperaba, en la autorradiografía se observaron dos bandas, de 3,7 Kb y 2,2 Kb, cuando el DNA se digirió con *SacI* (Figura 3.25b). En cambio, en la estirpe silvestre DK1050, y en aquéllas que habían perdido el plásmido, sólo se observó la banda de 2,2 Kb, correspondiente a la versión silvestre del promotor (Figura 3.25b).

III.4.4 Supresión del efecto de mutaciones *carD*⁻ sobre otros promotores

Una vez eliminada la construcción $P_{MF}::lacZ$, se estudió el efecto de las mutaciones *sod* sobre la actividad de los cuatro promotores regulados por CarD obtenidos en este trabajo, en presencia de una mutación *carD*⁻. Las estirpes MR1165 (*carD1 sodA1*), MR1168 (*carD2 sodB1*) y MR1170 (*carD2 sodC1*) son sensibles al antibiótico kanamicina, como consecuencia de la pérdida del plásmido pMAR932. De modo que en la transducción de las inserciones dependientes de CarD desde las estirpes donantes MR900, MR915, MR1100 y MR1104 a las estirpes recipientes MR1165, MR1168 y MR1170 puede seleccionarse el fenotipo Km^R conferido por la inserción de Tn5-*lac*. De las colonias Km^R obtenidas, se sembraron 25 transductantes de cada tipo en cajas de X-Gal para la comprobación visual de su fenotipo Lac. Sólo se obtuvieron resultados claros en el caso del promotor MF1-, ya que el efecto de la mutación

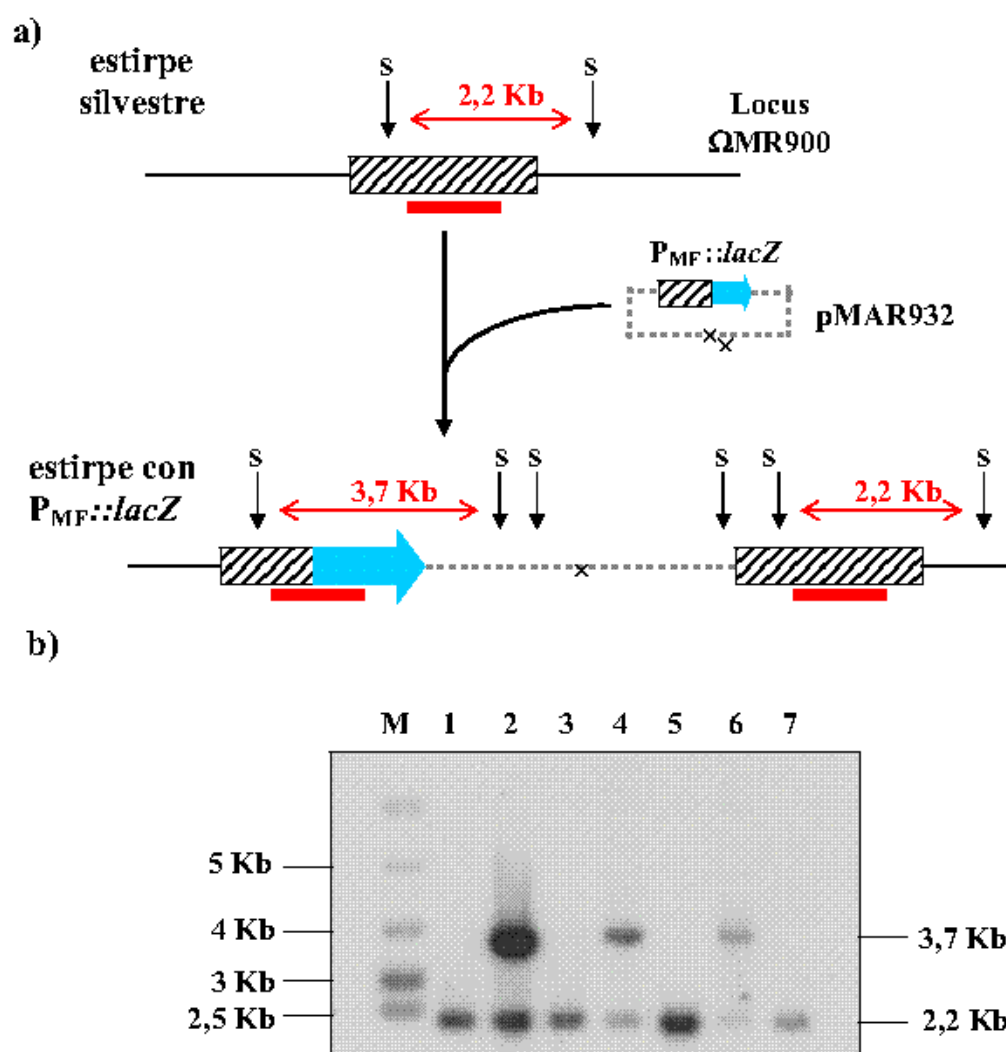


Figura 3.25 Análisis Southern de estirpes *sod*. En **a)** se indican los puntos de corte de *SacI* en el cromosoma de una estirpe con la construcción $P_{MF}::lacZ$ o sin ella. También se indican los fragmentos que hibridan con la sonda derivada del locus Ω MR900 (línea gruesa roja). **b)** Se digirió con *SacI* el DNA cromosómico de las estirpes: **1.** DK1050 (estirpe silvestre), **2.** MR1158 (*carD1 sodA1* $P_{MF}::lacZ$), **3.** MR1165 (*carD1 sodA1*), **4.** MR1161 (*carD2 sodB1* $P_{MF}::lacZ$), **5.** MR1168 (*carD2 sodB1*), **6.** MR1163 (*carD2 sodC1* $P_{MF}::lacZ$) y **7.** MR1170 (*carD2 sodC1*). El marcador de tamaño de 1 Kb (M) se cargó en la primera calle del gel.

carD⁻ sobre la actividad de los otros tres promotores es más suave y, por tanto, es difícil determinar el grado de supresión de dicho efecto en cajas de X-Gal. El análisis del fenotipo Lac de las colonias que contenían la inserción Ω MR900 sugería que, efectivamente, las mutaciones *sodA1*, *sodB1* y *sodC1* suprimían el efecto de *carD*⁻ sobre el promotor MF1-. Posteriormente, se realizaron ensayos enzimáticos con algunas de las colonias transductantes (Figura 3.26). La nomenclatura de las estirpes utilizadas, su genotipo y procedencia se indican en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2 Estirpes *sod* utilizadas en el ensayo de actividad específica β -galactosidasa

Nombre	Genotipo	Procedencia
a) MR1177	Ω MR900::TnS-lac <i>sodB1 carD2</i>	MR900 x MR1168
b) MR1182	Ω MR900::TnS-lac <i>sodC1 carD2</i>	MR900 x MR1170
c) MR1171	Ω MR900::TnS-lac <i>sodA1 carD1</i>	MR900 x MR1165
d) MR1158	$P_{MF}::lacZ$ <i>sodA1 carD1</i>	pMAR932 x MR1165
e) MR1172	Ω MR915::TnS-lac <i>sodA1 carD1</i>	MR915 x MR1165
f) MR1173	Ω MR1100::TnS-lac <i>sodA1 carD1</i>	MR1100 x MR1165
g) MR1175	Ω MR1104::TnS-lac <i>sodA1 carD1</i>	MR1104 x MR1165

Como se observa en las Figuras 3.26a y 3.26b, las mutaciones *sodB1* y *sodC1* suprimían casi por completo el efecto de la mutación *carD2* sobre el promotor MF1-. El efecto supresor de *sodA1* sobre el mismo promotor (Figura 3.26c) no es tan notable como el observado sobre la actividad del fragmento $P_{MF}::lacZ$ derivado del mismo (Figura 3.22c). Esto puede ser debido a que el fragmento $P_{MF}::lacZ$ eliminado contuviera alguna mutación que provocaba un efecto supresor adicional sobre la actividad del mismo. Para descartar esta

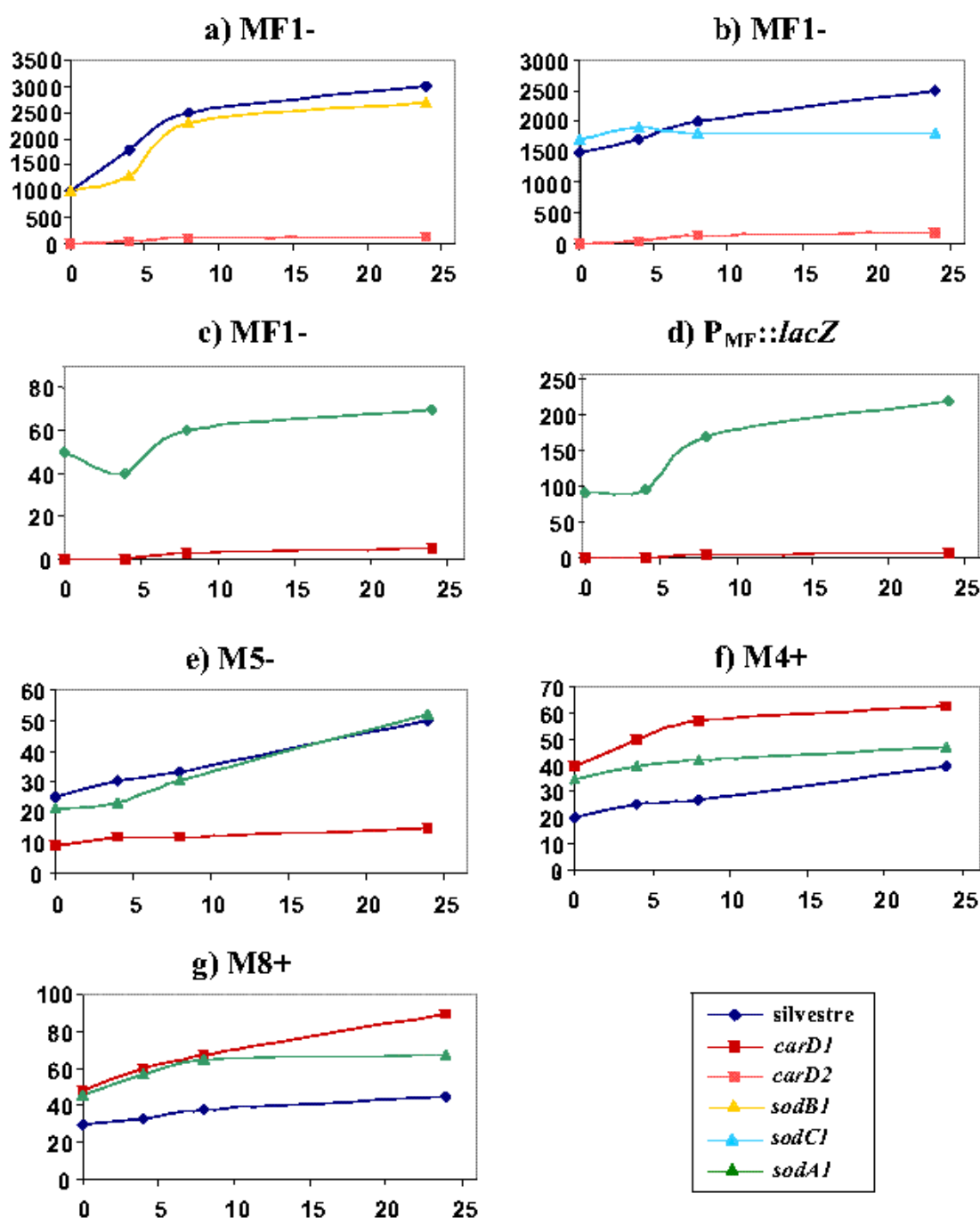


Figura 3.26 Efecto de mutaciones *sod* sobre las inserciones de *Tn5-lac* dependientes de *CarD*. Expresión de actividad β -galactosidasa a partir de: **a, b, c)** Ω MR900 **d)** $P_{MF}::lacZ$, **e)** Ω MR915, **f)** Ω MR1100 y **g)** Ω MR1104. Los promotores correspondientes se indican en la parte superior de la gráfica. Los fondos genéticos son: *carD*⁺ *sodA*⁺ *sodB*⁺ *sodC*⁺ (línea azul oscuro), *carD1* (línea roja oscura) *carD2* (línea roja clara), *carD2* *sodB1* (línea amarilla) *carD2* *sodC1* (línea azul claro) *carD1* *sodA1* (línea verde). La denominación de cada una de las estirpes, su genotipo y procedencia se indican en la Tabla 3.2.

posibilidad, el plásmido pMAR932 se transdujo a la estirpe MR1165 (*carD1* *sodA1*) y se analizó la expresión de β -galactosidasa a partir del fragmento $P_{MF}::lacZ$. Como muestra la Figura 3.26d, se obtuvo un valor de actividad enzimática equivalente al encontrado en la estirpe original (MR1158) en la cual se aisló la mutación. Estos resultados indican que la diferencia entre el grado de supresión por la mutación *sodA1* observado en la actividad del promotor MF1- y la del fragmento $P_{MF}::lacZ$ no se debe a la existencia de mutaciones adicionales en dicho fragmento provocadas por la luz ultravioleta.

Con relación a las otras tres inserciones dependientes de CarD, se estudió el efecto de la mutación *sodA1* sobre los promotores correspondientes en presencia de la mutación *carD1*. En la Figura 3.26e se observa que la mutación *sodA1* rescató también la actividad del promotor M5- hasta los niveles observados en la estirpe *carD*⁺. En cambio, el efecto de *sodA1* sobre la actividad de los promotores M4+ y M8+ resultó ser menos significativo, sobre todo en el caso de M8+ (Figura 3.26f y g).

III.4.5 Efecto de *sodA1* sobre la expresión de los promotores P_{crtI} y P_{carQ}

La mutación *sodA1* no suprime el fenotipo Car⁻ de la estirpe *carD1* (III.4.2). Sin embargo, es posible que restaure la activación transcripcional de alguno de los dos promotores de la carotenogénesis (P_{crtI} y P_{QRS}) dependientes de CarD en presencia de la mutación *carD1*. En el laboratorio se disponía de fusiones transcripcionales de dichos promotores con el gen *lacZ*. La fusión transcripcional del operón *carQRS* con el gen *lacZ* (*carQ::lacZ*) está incluida en el plásmido pDAH217 (Hogdson, 1993) y la fusión transcripcional del gen *crtI* con *lacZ* (*crtI::lacZ*) se encuentra en el plásmido pMAR206 (Fontes *et al.*, 1993). Los plásmidos pDAH217 y pMAR206 derivan a su vez de pDAH274, que

contiene un gen de resistencia a kanamicina. Como en el caso de pMAR932, la introducción de pDAH217 y pMAR206 en el cromosoma de *M. xanthus* origina una duplicación del fragmento homólogo integrado, generando una versión silvestre del locus correspondiente y otra interrumpida por el gen *lacZ*, a partir de la cual se analiza la actividad β -galactosidasa. Los plásmidos pDAH217 y pMAR206 se introdujeron en la estirpe MR1165 mediante electroporación (selección de Km^R). Simultáneamente, se electroporó el tipo silvestre DK1050 y la estirpe *carD1*, como controles del experimento.

Las estirpes *sodA1* con las construcciones *crtI::lacZ* y *carQ::lacZ* se denominaron MR1193 y MR1194, respectivamente. En la estirpe *carD*⁺, la expresión de β -galactosidasa a partir de los promotores P_{QRS} y P_{crtI} se activa por la luz. La activación del promotor P_{crtI} requiere, además, que las células se encuentren en la fase estacionaria (Fontes *et al.*, 1993). Así pues, para el ensayo de actividad enzimática, se tomaron muestras procedentes de cultivos incubados en la luz o en la oscuridad desde el comienzo de la fase estacionaria hasta ocho horas después. En las gráficas de la Figura 3.27 se observa la ausencia de actividad de los promotores, tanto en la luz como en la oscuridad, en presencia de la mutación *carD1*, aun estando presente la mutación *sodA1*. Por consiguiente, esta mutación *sodA1* no es capaz de suplir la falta de función del gen *carD* para la activación transcripcional de P_{crtI} y P_{QRS}.

III.4.6 Análisis de ligamiento entre las mutaciones *carD1* y *sodA1*

Un estudio más detallado de la relación entre la mutación supresora *sodA1* y el gen *carD* implica la localización de aquélla. Por ejemplo, es posible que *sodA1* se encuentre precisamente en el locus *carD* o ligada a él. Para examinar esta posibilidad, se transfirió el locus *carD1* desde la estirpe MR1158 (*carD1*

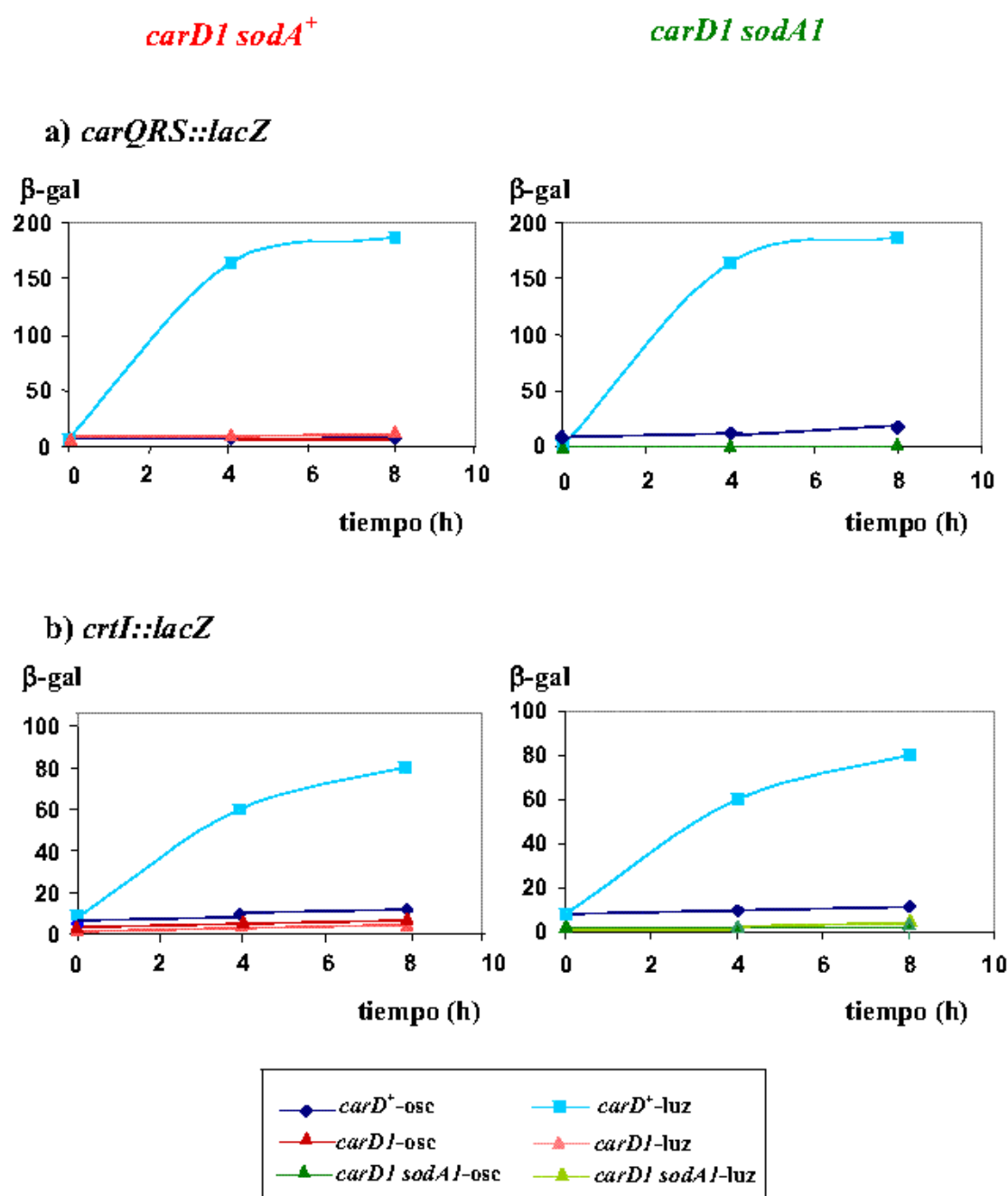


Figura 3.27 Efecto de *sodA1* sobre la actividad de los promotores P_{QRS} y P_{crtI} en presencia de la mutación *carD1*. Expresión de β -galactosidasa a partir de las fusiones transcripcionales a) *carQRS::lacZ* y b) *crtI::lacZ* de las estirpes: *carD1 sodA*⁺ (líneas rojas clara y oscura), *carD1 sodA1* (líneas verde claro y oscuro) y tipo silvestre (líneas azules claro y oscuro). Las líneas de color claro corresponden a las medidas realizadas en condiciones de luz, mientras que las de color oscuro indican de condiciones de oscuridad.

sodA1) a MR1141, una cepa silvestre en la cual se había introducido el plásmido pMAR932 (con el fragmento $P_{MF}::lacZ$). Esto se realizó mediante la transducción con Mx4 y posterior selección del carácter Tc^R conferido por el transposón Tn5-132 integrado en el locus *carD1*. En caso de haber algún tipo de ligamiento entre *carD* y *sodA*, la mayoría de los transductantes $Km^R Tc^R$ obtenidos manifestaría un fenotipo Lac^+ en cajas de X-Gal. Por el contrario, si los loci *sodA* y *carD* no se encuentran ligados, casi todas las colonias deberían mostrar un fenotipo Lac^- . Se analizaron 100 transductantes $Km^R Tc^R$ en presencia de X-Gal y sólo tres de ellos presentaron un fuerte color azul en las cajas. Esta proporción puede ser debida a que exista un ligero ligamiento entre ambos genes o a que Tn5-132 haya “saltado” a otros sitios del cromosoma de *M. xanthus*. En cualquier caso, de estos resultados se deduce que la mutación *sodA1* no afecta al locus *carD*. En el caso de las mutaciones supresoras *sodB1* y *sodC1* no pudo llevarse a cabo el mismo tipo de análisis por no disponer de un marcador seleccionable para la transducción del locus *carD2*.

III.4.7 Efecto de las mutaciones *sodB1* y *sodC1* sobre la mutación *carD1*

Como se ha mencionado anteriormente, el transposón Tn5-132 integrado en el alelo *carD1* confiere resistencia al antibiótico tetraciclina (Tc^R). La existencia de este marcador hace posible la selección de transductantes del locus *carD1*. Esto fue aprovechado para averiguar si las mutaciones *sodB1* y *sodC1* (supresoras de *carD2*) suprimían o no el efecto de *carD1* sobre la expresión de $P_{MF}::lacZ$. Así pues, se transdujo el locus *carD1* a las estirpes MR1161 (*carD2 sodB1* $P_{MF}::lacZ$) y MR1163 (*carD2 sodC1* $P_{MF}::lacZ$) mediante el fago Mx4. La integración por recombinación homóloga del fragmento de DNA responsable del carácter Tc^R tiene como consecuencia la sustitución del alelo *carD2* de la estirpe

recipiente por el alelo *carD1* de la estirpe donante. Se analizó el fenotipo Lac de 75 transductantes de cada tipo. Se observó que en todos los casos las colonias presentaban una coloración azul intensa en cajas de X-Gal y, por tanto, parecían haber recuperado la actividad promotora normal de la construcción $P_{MF}::lacZ$. Al tratar de cultivarlas en medio líquido para ensayar la expresión de β -galactosidasa, se comprobó que las estirpes *carD1 sodB1* y *carD1 sodC1* crecían muy mal, especialmente esta última. A pesar de las dificultades derivadas de la aparente letalidad de la combinación de estas mutaciones, pudieron realizarse ensayos enzimáticos a distintos tiempos (Figura 3.28). En ellos se confirmó la supresión del efecto de *carD1* por las mutaciones *sodB1* y *sodC1*.

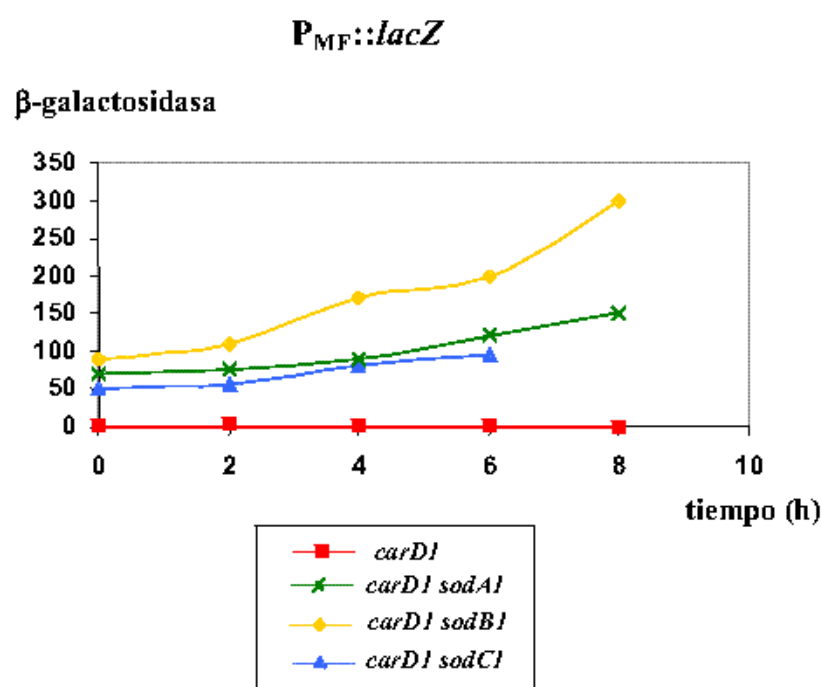


Figura 3.28 Efecto supresor de *sodB1* y *sodC1* sobre la actividad del fragmento $P_{MF}::lacZ$ en presencia de la mutación *carD1*. Ensayo de actividad β -galactosidasa en las estirpes: *carD1* (línea roja), *carD1 sodA1* (línea verde), *carD1 sodB1* (línea amarilla) y *carD1 sodC1* (línea azul). En el caso de esta última estirpe, sólo fue posible tomar muestras hasta las 6 horas de crecimiento en medio líquido.

IV. Discusión

IV.1 NUEVOS PROMOTORES REGULADOS POR CarD

Trabajos anteriores demostraron que el producto del gen *carD* es necesario para la activación de dos conjuntos de promotores de *M. xanthus*, ambos implicados en respuestas a estímulos ambientales. Un conjunto de promotores se activa tras la iluminación con luz azul y el otro lo hace en las condiciones de ayuno que conducen al proceso de desarrollo multicelular (Nicolás *et al.*, 1994; Cayuela, 1999). De acuerdo con su secuencia de aminoácidos, la proteína CarD resulta ser novedosa en el reino procariótico, ya que contiene cuatro copias de un dominio de unión al DNA (*gancho AT*), conocido previamente sólo en proteínas nucleares eucarióticas (las proteínas HMGA). Dicho dominio les confiere una función arquitectónica, de manera que estas proteínas no son consideradas en sí mismas como factores transcripcionales, sino como elementos auxiliares que favorecen y estabilizan la unión de factores transcripcionales específicos (Bustin y Reeves, 1996; Thanos y Maniatis, 1992; Yie *et al.*, 1997). De este modo, las proteínas HMGA están involucradas en la regulación, tanto positiva como negativa, de genes que participan en procesos celulares muy diversos (Bewley *et al.*, 1998). Si la proteína CarD de *M. xanthus* comparte esta característica auxiliar con sus equivalentes eucarióticas, cabe esperar que su falta de función afecte a un buen número de funciones génicas.

Empleando el transposón Tn5-*lac*, y siguiendo la estrategia descrita en el apartado III.1.1, se ha comprobado en este trabajo el efecto de la mutación *carD1* sobre 613 promotores que demuestran al menos cierta actividad durante el crecimiento vegetativo de *M. xanthus*. Seis de ellos se ven afectados significativamente por dicha mutación, y otros siete resultan afectados ligeramente. Ninguno de ellos corresponde a alguno ya conocido como dependiente de CarD. Estos datos apoyan la idea de que CarD ejerce una acción

reguladora global, participando, directa o indirectamente, en el control transcripcional de numerosos genes de *M. xanthus*, regulados o no por estímulos externos. Los datos citados implican que CarD no actúa del mismo modo en la activación de distintos promotores. Datos que apuntaban en esta misma dirección ya eran conocidos en el caso de los genes específicos del desarrollo dependientes de CarD (no así en los genes carotenogénicos, cuya activación por la luz es prácticamente bloqueada por la mutación *carDI* en todos los casos). De los genes específicos del desarrollo, unos resultan ser absolutamente dependientes de CarD y otros lo son sólo parcialmente (Nicolás *et al.*, 1994; Cayuela, 1999). Sin embargo, la presencia durante el desarrollo de distintos tipos celulares y distintas rutas de señalización complicaban la interpretación de esos datos previos. La variación del efecto de CarD sobre distintos promotores recuerda a la que se produce con otro factor arquitectónico bacteriano bien conocido, el IHF. Su ausencia por mutación afecta sólo parcialmente a algunos promotores, como algunos de los que dependen de factores del tipo σ^{54} , y más drásticamente a otros. Se han descrito incluso algunos promotores cuya activación depende exclusivamente del IHF, sin participación de otros factores (Goosen y van de Putte, 1995).

Sólo uno de los promotores dependientes de CarD conocidos hasta ahora (el del gen *asgA*, implicado en la producción de la señal intercelular A) es regulado negativamente por dicha proteína (Cayuela, 1999). Como se observa en la Figura 3.2, al gen *asgA* se añaden ahora cuatro nuevos genes cuyos promotores, F2+, M8+, M4+ y D2+, están regulados negativamente por CarD. D2+ parece incluso un promotor “críptico” en el tipo silvestre, al menos en condiciones de crecimiento vegetativo. Otros dos nuevos promotores, MF1- y M5-, están regulados positivamente por CarD. Esta acción dual de CarD, como activador o represor, la relaciona también funcionalmente con la proteína HMGA, así como

con el ya citado IHF. Éste actúa la mayoría de las veces como factor positivo, pero se conocen algunos casos en los que colabora en acciones reguladoras negativas (Huang *et al.*, 1990; Pratt *et al.*, 1997; Colland *et al.*, 2000).

Las mutaciones por inserción de Tn5-*lac*, si ocurren dentro de la región estructural de un gen, inactivan, con cierta seguridad, la función génica correspondiente (tal es el caso de las inserciones localizadas con precisión en este trabajo). Aparte de no afectar a la carotenogénesis o al desarrollo multicelular, ninguna de las inserciones estudiadas provocan una alteración fenotípica aparente en el crecimiento o motilidad celular, al menos en ausencia de otras mutaciones (véase apartado IV.3). Ello indica que los genes afectados no son esenciales para procesos vitales de la célula.

Otras mutaciones *carD*⁻ (*carD2*, una delección de 4 pb y *carD3*, una delección completa y “en fase” de la región estructural de *carD*) tienen, en general, un efecto similar al de *carD1* sobre la actividad de los promotores en estudio. El efecto resulta algo más reducido sobre los promotores MF1-, M5- y M8+, y justo el contrario sobre el promotor M4+ (Figuras 3.2 y 3.4). Teniendo en cuenta el efecto esperado de la mutación *carD3*, cabe pensar que CarD actúe realmente como un factor positivo sobre el promotor M4+, o incluso que tal promotor no dependa de la función de *carD*, dada la escasa diferencia de actividad de M4+ según que el fondo genético sea silvestre o *carD3*. No obstante, tal diferencia ha resultado muy reproducible en experimentos independientes, lo cual indica que la ausencia de *carD* afecta verdaderamente a la actividad de dicho promotor, acaso de un modo indirecto.

El efecto diferencial de la mutación *carD1* podría estar relacionado con una acción anormal de la versión truncada de CarD (*carD1* es una inserción de Tn5-132 que no afecta a los primeros 161 aminoácidos, mientras que *carD2* no afecta a los primeros 132 aminoácidos) o con un posible efecto polar de la

inserción del transposón. A continuación de *carD*, en la misma dirección de transcripción, se encuentran varios ORF's. Cabría pensar que alguno de esos ORF's estén implicados en la regulación de los promotores en estudio, en particular del promotor MF1-, completamente inactivo en la estirpe *carD1* y que mantiene del orden de un 10 % de su actividad normal en los mutantes *carD2* y *carD3*. En el caso del promotor M4+ habría que pensar que la ausencia en la estirpe *carD1* del producto de alguno de los ORF's citados provoca la desrepresión del promotor, con independencia de la ausencia de *carD*. Cabe decir, en cualquier caso, que ninguno de los ORF's situados a continuación de *carD* muestra similitud significativa con ninguna proteína depositada en los bancos de datos (Nicolás *et al.*, 1996; datos no mostrados de nuestro laboratorio). La delección "en fase" de cada uno de los ORF's adyacentes al locus *carD*, y la posterior comprobación de un posible efecto adicional al de *carD3* sobre la actividad de los promotores en estudio, permitiría comprobar la posible función reguladora de alguno de los ORF's citados.

IV.2 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE LOS LOCI DEPENDIENTES DE CarD

IV.2.1 Análisis del locus Ω MR900

La secuencia de nucleótidos del ORF interrumpido por la inserción Ω MR900 predice una proteína de gran tamaño (991 aminoácidos). No se ha encontrado similitud alguna entre la secuencia de aminoácidos de esta supuesta proteína y las depositadas en las bases de datos. Además, la proporción de pares G-C en la tercera posición de los tripletes no se ajusta a la desviación descrita para los genes de *M. xanthus*, siendo incluso algo menor (63 %) que la proporción

global de pares G-C de todo el ORF (65 %). Ello pone en duda la presencia real de la proteína citada. El análisis correspondiente tampoco ha detectado similitud entre la secuencia de nucleótidos de este locus y la de alguna molécula de RNA funcional, tipo ribosómico o transferente. La estirpe portadora de la inserción Ω MR900, tanto en un fondo *carD*⁺ como en un fondo *carD*⁻ manifiesta un comportamiento completamente normal en relación con el crecimiento, la carotenogénesis, la motilidad aparente, y el desarrollo multicelular de *M. xanthus*. No obstante, la inserción del transposón parece haberse producido cerca del extremo 3' del locus y, por tanto, cabría la posibilidad de que la función de la posible proteína no se encontrase gravemente afectada. En el momento actual, la función de este locus permanece desconocida.

IV.2.2 Análisis del locus Ω MR1104

La secuenciación del locus Ω MR1104 (asociado al promotor M8+) reveló la existencia de un ORF de 1.785 nucleótidos, responsable de una supuesta proteína de 595 aminoácidos. Dicha proteína muestra un ligero parecido ($E = 2 \times 10^{-4}$) a un probable precursor de lipoproteína de la membrana externa de *Pseudomonas aeruginosa*, al cual no se le ha atribuido hasta el momento una función. Lo más destacable de la proteína de *M. xanthus* es la presencia de dos dominios del tipo OEP (del inglés, *outer membrane efflux protein*) en los últimos dos tercios de la proteína, cuya alineación con la secuencia representativa de dicho dominio puede observarse en la Figura 4.1. Además, mediante un programa de predicción de estructuras secundarias (*TMpred*, del BCM), se ha comprobado la presencia de dos posibles dominios transmembranales. Los dominios OEP se encuentran en proteínas de la membrana externa de bacterias Gram-negativas, tales como la proteína TolC de *E. coli* (Koronakis *et al.*, 1997 y 2000) o la

proteína OprM de *P. aeruginosa* (Poole *et al.*, 1993). Estas proteínas están encargadas del transporte al exterior de una gran variedad de sustancias nocivas para la célula, desde agentes antimicrobianos pequeños, como antibióticos y metales pesados, hasta enzimas u otras toxinas de gran tamaño (Nikaido, 1994).

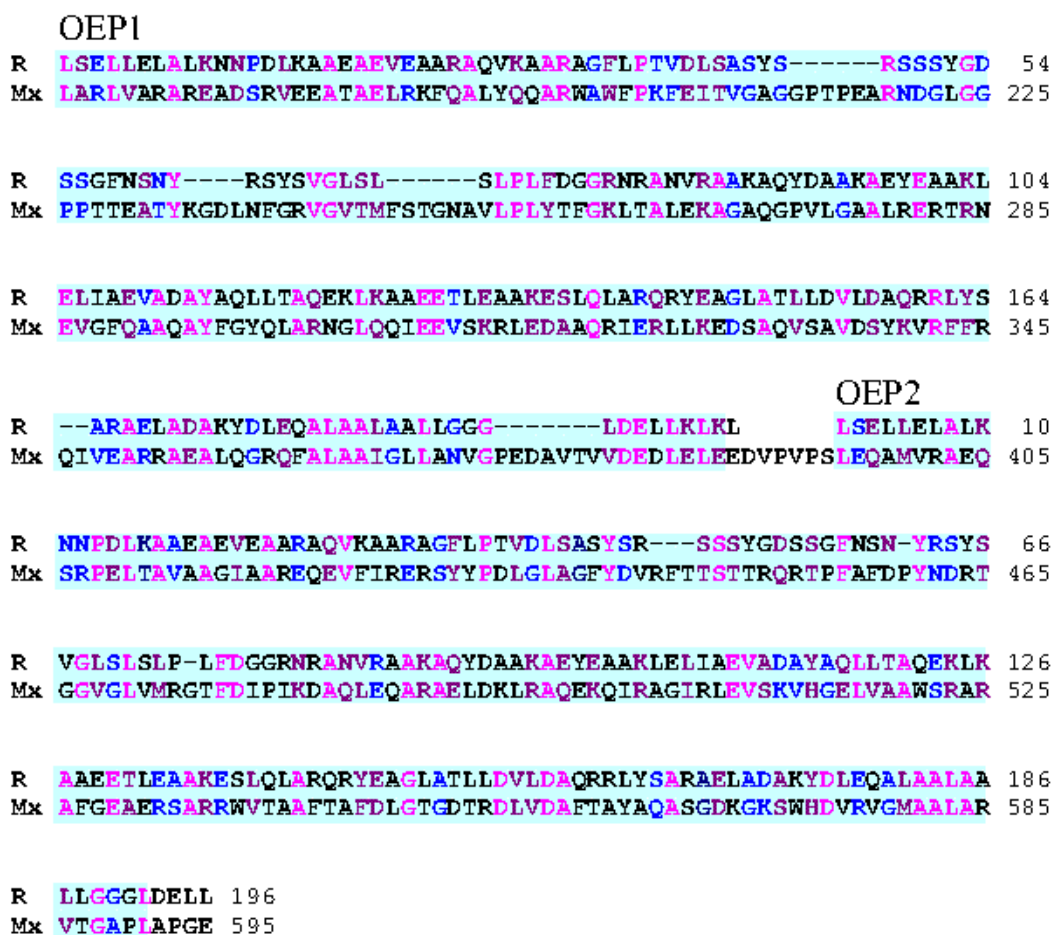


Figura 4.1 Alineación de la secuencia de aminoácidos deducida del locus Ω MR1104 de *M. xanthus* (Mx) con la secuencia representativa del dominio OEP (R). Los aminoácidos idénticos se indican en rosa, las sustituciones conservativas en violeta y las sustituciones semiconservativas en azul. Los dos dominios OEP aparecen sombreados en azul claro.

En el caso del patógeno oportunista *P. aeruginosa*, se ha comprobado que la proteína OprM forma parte de un sistema de transporte activo que consta de tres componentes: una proteína asociada a la membrana citoplasmática que funciona como transportador de toxinas/H⁺ “antiporte”, una proteína situada en la membrana externa que forma un túnel en ésta, y una proteína accesoria que se encuentra en el espacio periplásmico y hace de puente entre las dos primeras. El acoplamiento de las tres proteínas permite la expulsión directa de la toxina correspondiente mediante el transporte a través de un canal continuo (Li *et al.*, 1995). Estos sistemas de bombeo contribuyen de manera importante a la resistencia intrínseca a diversos tóxicos de ciertas bacterias Gram-negativas, lo cual ha suscitado interés en el ámbito clínico. En el caso de *P. aeruginosa*, la bomba de la que forma parte la proteína OprM confiere a este microorganismo resistencia a un gran espectro de antibióticos que incluyen la tetraciclina, el cloranfenicol, las quinolonas, la novobiocina, los macrólidos, la trimetoprima, los β -lactámicos y sus inhibidores (Poole *et al.*, 1993).

El gen *oprM* de *P. aeruginosa* se encuentra en un operón junto a los genes que determinan los otros dos componentes del sistema de transporte (*mexA* y *mexB*). La posibilidad de que la proteína de *M. xanthus* forme parte de un sistema de bombeo de toxinas similar al constituido por el operón *mexA-mexB-oprM* se ve apoyada por la presencia de parte de otro ORF, adyacente al ORF interrumpido por la inserción Ω MR1104 y en su misma dirección de transcripción, que parece determinar una proteína del espacio periplásmico. La inserción Ω MR1104 no causa un fenotipo manifiesto, pero de ser cierta la función predicha para este locus, cabría esperar que la cepa portadora de dicha inserción muestre una mayor sensibilidad a distintos antibióticos o sustancias nocivas para las que *M. xanthus* presente una cierta resistencia intrínseca. Por el contrario, el mutante *carD1* (sin el transposón Ω MR1104) mostraría una mayor resistencia a dichos compuestos.

Se han descrito sistemas de bombeo homólogos, determinados por distintos operones, en otras bacterias Gram-negativas y en la propia *P. aeruginosa*. En ésta, la expresión de dichos operones varía de unos a otros, dependiendo del nivel de expresión de operones complementarios y de la fase de crecimiento, siendo regulada la expresión de *oprM* tanto positiva como negativamente (Poole *et al.*, 1996; Evans y Poole, 1999; Li *et al.*, 2000). En el caso de que el gen de *M. xanthus* perteneciera a uno de estos operones, el control negativo de su expresión estaría mediado por una proteína del tipo HMG, como es CarD.

IV.2.3 Análisis del locus Ω MR1100

La inserción Ω MR1100 (correspondiente al promotor M4+) interrumpe un ORF de más de 1.737 nucleótidos (402 nucleótidos adicionales fueron obtenidos mediante consulta a la base de datos del genoma de *M. xanthus*), que podría determinar una proteína de al menos 579 aminoácidos, semejante a varios receptores de membrana dependientes de la proteína TonB. La similitud encontrada entre dichas proteínas y la concerniente a este trabajo, aunque no muy notable ($E = e^{-14}$), se distribuye a lo largo de toda la secuencia de aminoácidos.

La proteína TonB se encuentra anclada a la membrana interna de bacterias Gram-negativas, junto con otras dos proteínas de membrana que parecen estabilizar y reciclar su actividad, ExbB y ExbD (Postle, 1993). El complejo formado por estas tres proteínas es necesario para el transporte de hierro o de vitamina B₁₂. De modo similar a lo descrito para los sistemas de bombeo de toxinas, los sistemas de transporte dependientes de TonB comprenden tres elementos: un receptor de alta afinidad situado en la membrana externa, una proteína periplásmica y un complejo proteico localizado en la membrana

citoplasmática necesario para el transporte activo al interior de la célula. TonB se extiende hacia el espacio periplásmico e interacciona transitoriamente con los receptores de la membrana externa. En los sistemas citados, TonB se comporta como un transductor de energía, acoplando la energía procedente del potencial electroquímico de la membrana interna al transporte de alta afinidad de sideróforos y de vitamina B₁₂ a través de la membrana externa (consúltense revisiones de Postle, 1990; Lee, 1995; Moeck y Coulton, 1998).

Algunas bacteriocinas producidas por *E. coli* y bacterias relacionadas, (caso de la colicina I) han “parasitado” los receptores de vitamina B₁₂ o sideróforos para su transporte a través de la membrana externa, aprovechando la importancia de éstos en procesos esenciales para la bacteria (Lazdunski, *et al.*, 1998). Este hecho también ha despertado interés, posibilitando la administración de conjugados de antibióticos y sideróforos que hacen uso de la permeabilidad de membrana mediada por receptores dependientes de TonB. De modo que, incluso en el caso de que se seleccionaran mutantes que no expresaran los receptores, dichos mutantes estarían sujetos a una limitación severa de hierro y vitamina B₁₂ para su crecimiento (Moeck y Coulton, 1998).

Todos los receptores dependientes de TonB descritos en la bibliografía presentan en la región amino-terminal un motivo denominado *caja-TonB*, mediante el cual interaccionan con la proteína TonB. Sin embargo, la proteína de *M. xanthus* presenta dicho motivo en la región central de la proteína (Figura 4.2). Ciertos problemas con el banco de datos de la secuencia de *M. xanthus* han impedido disponer del ORF completo correspondiente al locus Ω MR1100. Pese a ello, y mediante la secuencia de nucleótidos obtenida en este trabajo, puede predecirse la presencia en la proteína deducida de, al menos, tres dominios transmembranales (programa *TMpred*, BCM), así como dos motivos de unión a agrupaciones de hierro y azufre del tipo 2Fe-2S, similares a los presentes en la

ferredoxina (*ScanProsite*, EBI). Además, la similitud de la supuesta proteína a los receptores de sideróforos se distribuye de forma regular a lo largo de la secuencia de aminoácidos, mientras que la encontrada con los receptores de vitamina B₁₂ está limitada al extremo amino, muy conservado, por otro lado, entre los distintos receptores dependientes de TonB.

M	C	R	A	S	T	A	P	P	F	C	G	L	R	N	D	A	E	V	L	20
F	L	L	N	G	H	R	L	N	S	F	F	D	G	K	A	L	M	N	L	40
P	V	E	N	L	E	R	V	E	V	I	R	G	P	G	S	A	L	Y	G	60
A	G	A	F	L	G	V	V	N	I	V	T	D	T	S	D	G	V	R	T	80
A	V	S	V	G	G	Y	P	G	Q	D	D	R	L	A	V	T	G	N	G	100
H	I	S	A	G	H	T	A	G	N	L	R	V	F	A	D	I	D	V	W	120
S	Q	A	G	D	S	T	V	I	E	N	D	G	L	D	D	E	S	R	S	140
Q	G	L	R	D	V	T	D	P	A	G	R	T	R	D	E	R	F	L	F	160
N	A	G	A	G	V	T	Y	A	M	G	D	A	G	R	L	G	A	S	A	180
R	F	L	T	E	R	R	S	A	L	V	G	L	F	D	T	V	G	E	D	200
S	K	L	G	W	N	V	F	L	A	D	L	T	W	E	R	S	F	G	P	220
D	V	T	L	R	A	R	A	A	Y	D	Q	Q	S	T	D	R	F	F	Q	240
I	T	P	H	D	F	S	A	G	T	G	A	N	R	L	F	E	E	G	M	260
Q	E	Q	T	R	V	S	V	R	S	L	T	G	S	V	D	A	D	V	A	280
L	G	A	Y	N	R	L	S	L	G	A	V	V	D	Q	Q	S	L	G	E	300
Y	D	Y	V	T	N	Y	T	L	D	A	Q	V	R	P	D	G	L	T	R	320
P	E	G	L	V	D	L	T	S	G	A	A	S	R	R	L	N	V	G	L	340
F	A	Q	D	Q	W	T	V	V	N	A	L	T	L	T	F	G	V	R	M	360
D	A	T	Q	L	P	T	V	D	A	S	G	A	I	N	G	T	R	F	V	380
P	T	L	N	P	R	V	G	L	V	F	A	A	T	D	A	L	V	E	R	400
A	L	Y	G	R	A	F	R	A	P	T	L	Q	E	L	V	E	R	I	P	420
D	T	E	Y	N	Q	G	R	F	E	G	N	P	R	L	Q	P	A	T	V	440
D	T	F	E	L	G	A	D	L	I	Q	S	A	G	D	A	R	V	R	L	460
R	A	N	A	Y	V	A	L	F	G	S	P	I	V	P	V	D	T	S	G	480
N	I	V	P	L	R	N	R	E	L	G	V	R	V	Y	G	V	E	G	E	500
A	R	L	E	A	S	K	R	A	Y	A	W	L	N	A	S	I	S	R	A	520
E	D	L	E	L	P	A	Q	S	R	L	L	T	D	T	P	Q	A	R	F	540
N	A	G	V	T	M	P	I	G	A	Y	V	N	F	D	V	V	V	R	T	560
G	A	E	R	R	N	N	S	R	S	V	L	E	L	I	R	R	Y	K	...	579

Figura 4.2 Secuencia de aminoácidos de parte de la proteína deducida del locus Ω MR1100. Los dos sitios de unión a agrupaciones hierro-azufre se indican en marrón y el motivo *caja TonB* se indica en verde.

Aunque el transporte de hierro al interior de la célula parece depender de más de un receptor, algunos incluso no dependientes de TonB, si la proteína de *M. xanthus* correspondiera a un receptor de hierro, la carencia de dicha proteína debería producir una reducción importante en la tasa de crecimiento de la estirpe correspondiente en condiciones limitantes de hierro, tal y como se ha observado en otras bacterias Gram-negativas (Postle, 1990; Lee, 1995). La expresión de varios receptores de sideróforos está sujeta a regulación por hierro, de modo que niveles altos de hierro intracelular reprimen la transcripción de los genes correspondientes (Lee, 1995). Así pues, cabe sugerir que en el futuro se estudie la posible regulación nutricional del locus asociado al promotor M4+.

IV.2.4 Análisis del locus Ω MR915

La secuencia del locus Ω MR915, asociado al promotor M5-, obtenida a partir de un fragmento de DNA adyacente al sitio de inserción de Tn5-*lac*, y extendida posteriormente en la otra dirección mediante consulta a la base de datos del genoma de *M. xanthus* (<http://microbial.cereon.com>), reveló la existencia de dos ORF's. El codón "fin de mensaje" del primer ORF se encuentra separado sólo por tres pares de bases del codón de inicio de la traducción del segundo ORF. Ello apunta a que se trata de dos genes transcritos a partir de un mismo promotor. El primer ORF corresponde al interrumpido por la inserción del transposón y determina un factor de transcripción de 158 aminoácidos del tipo AsnC/Lrp, mientras que el segundo ORF presenta un alto grado de semejanza con distintas enzimas transaminasas de valina-piruvato.

El primer ORF cifra una proteína que muestra un 26 % de identidad y un 67,7 % de similitud con la proteína Lrp de *E. coli*. Cuando dicho ORF se compara con las proteínas Lrp de *Bradyrhizobium japonicum* y de *Caulobacter crescentus*,

se observa un 36,8 % y 36,7 % de identidad, y un 74,3 % y 71,6 % de similitud, respectivamente (Figura 4.3).

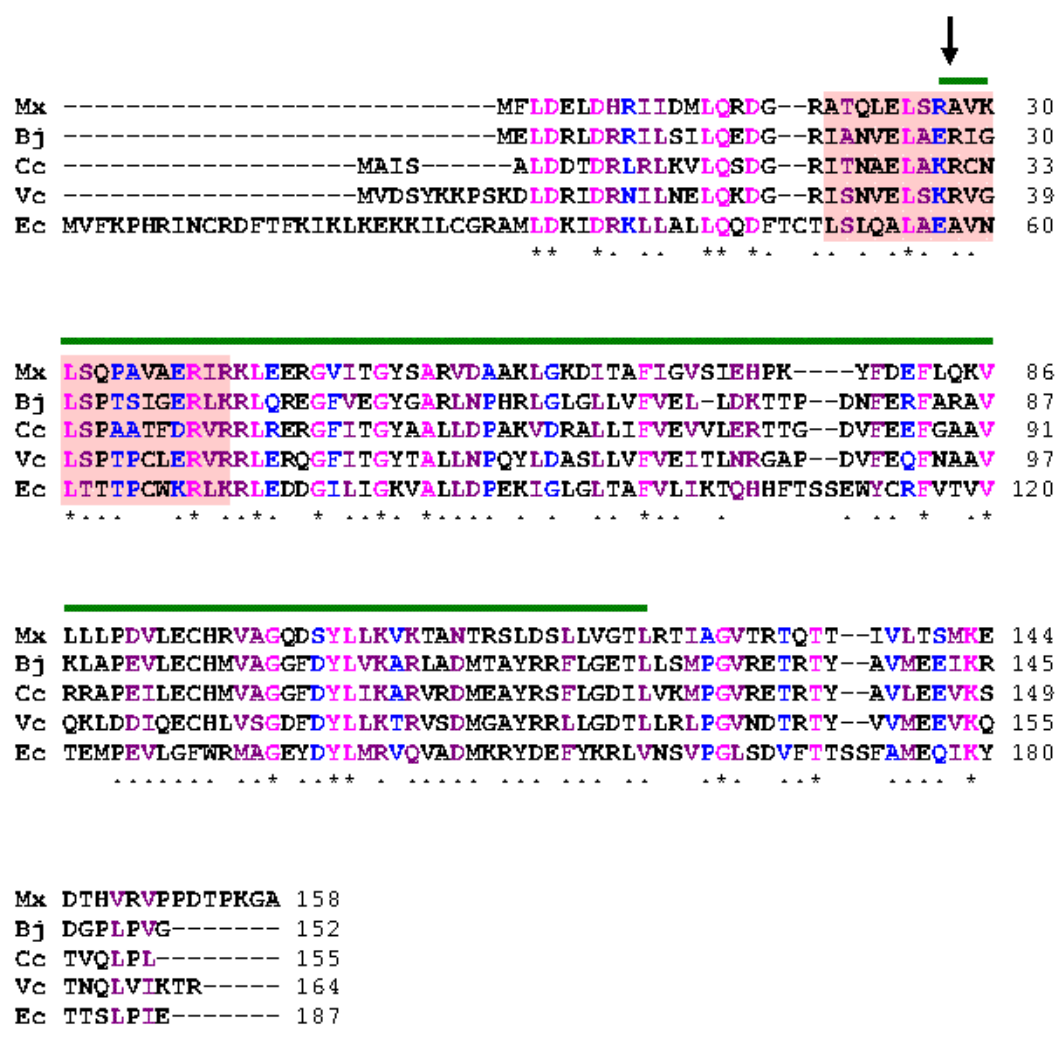


Figura 4.3 Comparación de la secuencia de aminoácidos deducida del locus Ω MR915 de *M. xanthus* (Mx) con la de las proteínas Lrp de *Bradyrhizobium japonicum* (Bj), *Caulobacter crescentus* (Cc), *Vibrio cholerae* (Vc) y *Escherichia coli* (Ec). Los aminoácidos idénticos en las cinco proteínas se denotan con una letra rosa. Las sustituciones conservativas o semiconservativas se denotan en violeta y azul, respectivamente. Los asteriscos indican las posiciones conservadas en las cinco secuencias, mientras que los puntos indican las posiciones conservadas en, al menos, tres de las secuencias. El motivo hélice-giro-hélice aparece sombreado en color salmón y el dominio de activación transcripcional se indica con una línea superior de color verde. La flecha negra indica el sitio de inserción del transposón Tn5-lac.

La proteína Lrp (del inglés, *leucine-responsive regulatory protein*) es una proteína básica de pequeño tamaño, compuesta por dos subunidades idénticas que forman un dímero en disolución (Willins *et al.*, 1991). Lrp fue identificada como un factor transcripcional que mediaba la respuesta a L-leucina (de ahí, su nombre), aunque posteriormente se comprobó que también afectaba a la expresión de genes cuya respuesta era independiente de leucina (Lin *et al.*, 1992; D'Ari *et al.*, 1993). La proteína Lrp es un regulador global de la transcripción, influyendo en la expresión de genes de *E. coli* cuyos productos están implicados en la biosíntesis y la degradación de aminoácidos, en el metabolismo del nitrógeno, en la degradación de hidratos de carbono, en la generación de fimbrias y en el transporte. Se piensa que afecta al 5-10% de los genes de *E. coli*, actuando en algunos casos como activador y en otros como represor de la transcripción (véase revisión de Newman y Lin, 1995).

Las proteínas Lrp contienen un motivo de unión a DNA del tipo hélice-giro-hélice en el extremo amino (Platko y Calvo, 1993). La unión de Lrp al DNA produce una curvatura que varía entre 52° y 135°, dependiendo del número de moléculas unidas. Ello facilita el ensamblaje de un complejo nucleoproteico regulador de la transcripción, actuando así Lrp como un factor arquitectónico (Wang y Calvo, 1993). De modo similar a los otros dos factores arquitectónicos descritos en este trabajo (Introducción, I.1), Lrp se une a tramos de DNA ricos en pares AT que presentan una curvatura intrínseca, lo cual sugiere que la proteína Lrp también reconoce, más que una secuencia específica, una determinada conformación del DNA (Newman y Lin, 1995).

Todas las proteínas del tipo Lrp estudiadas están sometidas a autorregulación, en la mayoría de los casos, negativa (Madhusudhan *et al.*, 1995; Peekhaus *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1994). Sin embargo, diversos factores metabólicos relacionados con las fuentes de nitrógeno o carbono presentes en el

medio contribuyen a su nivel de expresión de modo más importante que la propia Lrp (Chen *et al.*, 1997), siendo dicha expresión muy reducida durante el crecimiento en medio rico (Lin *et al.*, 1992). Adicionalmente, su nivel de expresión está controlado por la fase de crecimiento, alcanzando su máximo en la fase exponencial tardía (Chen *et al.*, 1997; Azam *et al.*, 1999)

La inserción del transposón en el locus Ω MR915 de *M. xanthus* interrumpe el motivo hélice-giro-hélice de la proteína deducida (Figura 4.3), siendo, pues, improbable que la proteína resultante conserve parte de su función. A pesar de la posibilidad de que se trate de un regulador global de la transcripción, la alteración del locus Ω MR915 no produce un fenotipo mutante evidente, ni en un fondo genético silvestre ni en presencia de una mutación adicional *carD*⁻. Se sabe que los mutantes *lrp* de *E. coli* crecen, si bien lentamente, incluso en medio mínimo, estando mucho menos afectados en el crecimiento que, por ejemplo, un mutante carente de la proteína tipo histona H-NS (Newman y Lin, 1995).

La expresión del gen *lrp* de *E. coli* se ha estudiado mediante el uso de una fusión transcripcional con el gen *lacZ* (Wang *et al.*, 1994). En relación con los valores de actividad obtenidos por los autores citados, el nivel de expresión del gen de *M. xanthus* resulta considerablemente más bajo. Esto podría estar relacionado con las condiciones de cultivo utilizadas, ya que las muestras analizadas en este trabajo procedían de cultivos incubados en medio rico. Alternativamente, es posible que su expresión se encuentre parcialmente reducida a causa de la inactivación del propio gen por la inserción de Tn5-*lac*. Aunque la mayoría de las proteínas Lrp están sometidas a autorregulación negativa, la proteína LrpC de *Bacillus subtilis* activa su propia transcripción (Beloïn *et al.*, 2000).

Que CarD sea necesaria para activar la expresión de una proteína como Lrp, que en otras bacterias actúa como un regulador global, resulta de un interés

especial en el contexto de este trabajo. Por un lado, confirmaría y ampliaría el papel de CarD como regulador global de la expresión génica, pero por otro, plantea la cuestión de que la supuesta acción global de CarD no sea más que un efecto indirecto de su acción sobre la expresión de la proteína Lrp de *M. xanthus*. La disponibilidad de un mutante que carece, probablemente, de dicha proteína permitirá comprobar directamente qué genes aparentemente dependientes de *carD* lo son en realidad de *lrp*. No obstante, el hecho de que la inyección QMR915 no afecte a la respuesta carotenogénica a la luz azul, ni al desarrollo multicelular de *M. xanthus*, permite descartar, al menos, que todos los efectos previamente adjudicados a *carD* estén relacionados con su acción sobre *lrp*.

IV.2.5 Análisis preliminar de las secuencias promotoras

Pese a que no se han realizado experimentos que permitirían localizar con exactitud el sitio de inicio de la transcripción en cada caso, se examinaron las secuencias correspondientes a la región 5' de cada locus dependiente de *carD*, con objeto de identificar regiones promotoras candidatas a ser sitios de unión de CarD. No obstante, hay que señalar que, en general, las secuencias de reconocimiento de los distintos factores σ de la polimerasa de RNA son relativamente variables entre distintos promotores de *M. xanthus* (Botella *et al.*, 1995; Nicolás *et al.*, 1996; Martínez-Argudo *et al.*, 1998; Moreno *et al.*, 2001), lo cual dificulta la identificación *a priori* de las regiones promotoras de los genes correspondientes.

En el presunto promotor M5-, se identificaron distintos tramos de pares AT que podrían corresponder a sitios de unión de la proteína CarD (Figura 4.4). En dicho promotor, se encuentran dos largas ristas de pares AT en fase de hélice que podrían también corresponder a sitios de unión de la proteína Lrp. En *E. coli*, uno

o dos sitios de unión de Lrp a su propio promotor están situados a una distancia relativamente grande del inicio de la traducción (267 pb), en la región comprendida entre los nucleótidos -32 y -80 respecto al inicio de la transcripción (Wang *et al.*, 1994). En cambio, se ha descrito que en el promotor del gen *osmY* de *E. coli* la proteína Lrp se une a varios sitios comprendidos entre los nucleótidos -90 y +1, abarcando la totalidad del promotor (Colland *et al.*, 2000). En el promotor M5- de *M. xanthus*, las ristas largas de pares AT se encuentran relativamente próximas al inicio de la traducción, en una región comprendida entre 60 pb y 17 pb del codón inicial (Figura 4.4).

CCATGGCCTCGCGAGAGGTGCTGCGCCGCAAGGCAGACTCTCAGCGCGCCACTGGCAGCCCCACATAGGT
GCCCCGGCAGGTGCAGCCGAGGCGCCCCGAGCCGCGCACCGAGCTGGTTCTGTCACCTCACGGATGCGCCGC
TCGATCGCAACAACCCAGCCCACTTGGGCGTGCTGCTTCGAACCGATGAGCGCTTTCCGGAAATCGGTGGG
CGCGCTGCGCCGTGAACAGTCAGGCGCCAGCCCTCCGTTTCATCCGGACACAATGCGCGGCGTCAACGAGCC
CCGGGCAGGTGCCACCGCACCTGGCTCGCCCCAGGTTCCCGCCGCGCTCCGGCCGAGGCGGCATCCGGCGG
ACGGACACACCTTTCCACTGTCAGCATCGACACAGTTACGGTGCGAATGGACGTCGCGTTCGAGGTTGCA
CCCTTGGAGCATCAAATATAAATTATCTGCGGTCCCGCAAAAGTGCCTATAAATTCAAGGCCAAACGCCCC
ATG

Figura 4.4 Secuencia de nucleótidos de la región 5' del locus Ω MR915. El posible sitio de unión al ribosoma aparece subrayado, y en negrita se indica el codón de inicio de la traducción. Aparecen sombreadas tres ristas de pares AT que quedan en fase de hélice, candidatas a ser sitios de unión para alguna de las proteínas CarD, IhfA o Lrp.

Por otro lado, como se discutirá mas adelante (apartado IV.3), el factor IhfA, proteína que también reconoce tramos de DNA intrínsecamente curvados, parece desempeñar un papel adicional regulador de la expresión de este locus, complicando así la determinación de posibles sitios de unión para las proteínas CarD, Lrp o IhfA. Este hecho, junto con la ausencia de un consenso genérico para la unión de cualquiera de las tres proteínas citadas al DNA (Newman y Lin, 1995; Rice *et al.*, 1996; Huth *et al.*, 1997), hace necesaria la comprobación de dicha unión de manera experimental, tal como se hizo para demostrar la unión de las

proteínas IhfA y CarD a distintos promotores relacionados con la respuesta a la luz (Nicolás *et al.*, 1996; Moreno, 1997; Cayuela, 1999).

En los promotores MF1-, M4+ y M8+ no se encontraron sitios candidatos para la unión de la proteína CarD. En el caso de MF1-, los datos procedentes de la secuencia de nucleótidos parecen indicar la existencia de un ORF anterior transcrito a partir de un mismo promotor, de manera que aún no dispondríamos de la secuencia de tal promotor. En cualquier caso, que la falta de función de CarD afecte a la expresión de un gen no implica necesariamente una interacción directa con su promotor, pudiendo ser un efecto indirecto relacionado con la regulación de otros factores, como Lrp.

IV.3 RELACIÓN FUNCIONAL ENTRE LAS PROTEÍNAS CarD E IhfA

Estudios anteriores habían demostrado la participación de CarQ, CarD e IhfA en la activación del promotor P_{QRS} (Martínez-Laborda y Murillo, 1989; Gorham *et al.*, 1996; Nicolás *et al.*, 1994; Moreno *et al.*, 2001). Por tanto, nos pareció oportuno averiguar la posible cooperación de estas tres proteínas en la regulación de otros promotores regulados por CarD. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que, mientras que la ausencia de CarQ no afecta a la actividad de ninguno de los promotores analizados (Figura 3.18), la ausencia de IhfA sí afecta, al menos, a uno de ellos, el promotor M5- (Figura 3.19b). Estos datos apoyan la idea de que CarQ es un factor ECF- σ específico de genes activados en respuesta a la luz, mientras que la proteína IhfA de *M. xanthus*, como sus homólogas de otras bacterias, influye en la actividad de diversos tipos de promotores (Moreno *et al.*, 2001; Goosen y van de Putte, 1995; Pérez-Martín y de Lorenzo, 1997).

La influencia de IhfA sobre la actividad del promotor M5- resulta particularmente interesante, dado que se trata del promotor del gen responsable del "factor arquitectónico" Lrp. Se conocen ejemplos en los cuales otras proteínas tipo histona (como IHF o H-NS) participan, junto con Lrp, en la regulación de una misma actividad relacionada con el DNA (Blomfield *et al.*, 1997; Landgraf *et al.*, 1994; Marshall *et al.*, 1999; Colland *et al.*, 2000). Adicionalmente, como ya se ha comentado, se ha comprobado que el gen *lpr* de *E. coli* está sometido a regulación negativa, tanto por parte de la propia Lrp como de la proteína tipo histona H-NS (Wang *et al.*, 1994; Oshima *et al.*, 1995). No obstante, éste que describimos aquí sería el primer caso en el que se implica al factor IHF, junto con una proteína de tipo HMG, en la regulación de la expresión de una proteína semejante a Lrp. Además, la proteína IHF de *E. coli* está sometida a autorregulación negativa (Aviv *et al.*, 1994). En el caso de *M. xanthus*, también se ha demostrado que el factor IhfA regula negativamente su propia expresión (Moreno *et al.*, 2001). Todo ello sugiere la existencia de una compleja red de auto- y trans-regulación de factores arquitectónicos en *M. xanthus*.

No fue posible determinar el efecto de la mutación *ihfA2* sobre la expresión de los promotores M4+ (locus Ω MR1100) y M8+ (locus Ω MR1104). Si bien las inserciones Ω MR1100 y Ω MR1104 por sí solas no generan un fenotipo mutante apreciable, la combinación de cada una de ellas con la mutación *ihfA2* resulta "semiletal" para la célula. Como ya hemos comentado, los loci Ω MR1100 y Ω MR1104 parecen determinar proteínas de membrana encargadas de la captación de ciertos nutrientes y del transporte externo de toxinas, respectivamente. Su ausencia de la célula, junto con la falta de otras funciones dependientes de IhfA, podría comprometer la viabilidad celular por fallo nutricional, en un caso, e intoxicación, en el otro. Hay que señalar que experimentos realizados anteriormente en nuestro laboratorio indican que la

mutación *ihfA2* resulta letal para algunas cepas silvestres de *M. xanthus* (Moreno *et al.*, 2001). Se ha descrito que la ausencia simultánea de las proteínas "tipo histona" IHF, HU y H-NS es letal para las células de *E. coli* (Yasuzawa *et al.*, 1992). Paradójicamente, la mutación doble *ihfA2* Ω MR915, que supone la falta de función de dos proteínas tipo histona (IhfA y Lrp), aun manteniendo los efectos fenotípicos que acarrea la mutación *ihfA2* (Moreno, 1997), no parece tener ningún efecto sobre la viabilidad de la estirpe correspondiente.

En cualquier caso, la participación de IhfA en la activación de determinados promotores dependientes de CarD, y no de otros, apoya la idea de la versatilidad de CarD para interaccionar con otras proteínas en su acción reguladora de la expresión génica. Situación análoga, por otro lado, a la de la proteína HMGA (Bustin, 1999).

IV.4 SUPRESORES DE MUTACIONES *carD*⁻

En este trabajo se han identificado varias mutaciones (mutaciones *sod*) que suprimen el efecto de *carD1* y *carD2* sobre la actividad del promotor MF1-. Entre ellas, se encuentran cuatro supresoras de la mutación *carD1* y tres de la mutación *carD2*, siendo estas últimas capaces de restaurar la actividad del promotor citado hasta los niveles observados en la cepa silvestre (véase Figura 3.22). Ninguna de las mutaciones *sod* suprime el fenotipo Car⁻ causado por las mutaciones *carD1* o *carD2*, habiéndose confirmado en un caso (*sodA1*) que no se restaura la actividad de los dos promotores relacionados con la carotenogénesis que dependen de CarD. Todo ello indica claramente que no se trata de reversiones de las mutaciones *carD*⁻ originales, idea confirmada por los análisis que demuestran la falta de ligamiento entre el locus *carD* y la mutación *sodA1*.

La estirpe *carD1*, a partir de la cual se aisló la mutación *sodA1*, proviene de la cepa silvestre DK1050, mientras que la estirpe *carD2*, a partir de la cual se aislaron las mutaciones *sodB1* y *sodC1*, proviene de la cepa silvestre DK1622. Esta última desarrolla cuerpos fructíferos más simétricos y en mayor número que la estirpe DK1050. Además, como se ha indicado anteriormente, la mutación *carD1* bloquea el proceso de desarrollo en una etapa más temprana que la mutación *carD2*. Por tanto, al utilizar las estirpes *sodA1*, *sodB1* y *sodC1* en experimentos de desarrollo multicelular, se esperaría que, en ausencia de algún efecto supresor, *sodB1* y *sodC1* exhibieran mayor capacidad de fructificación que *sodA1*. Curiosamente, fue esta última la única mutación que rescató parcialmente la capacidad de fructificación de una estirpe *carD⁻*. Resultaría interesante, pues, comprobar el efecto supresor de la mutación *sodA1* sobre la actividad de los distintos promotores regulados por CarD implicados en el proceso de desarrollo, así como sobre la expresión de algunos marcadores del desarrollo dependientes de la señal A o C, cuya dependencia de CarD es pronunciada (Nicolás *et al.*, 1994). Dicho análisis permitiría determinar en qué etapa/s del proceso de desarrollo *sodA1* actúa como supresor de *carD1*.

El efecto supresor de *sodB1* y *sodC1* sobre la mutación *carD2* es similar, bien se determine la expresión de *lacZ* a partir de la inserción Ω MR900::Tn5-*lac* o a partir del fragmento P_{MF} ::*lacZ* (Figura 3.26a y b). Sin embargo, el efecto supresor de *sodA1* sobre *carD1* es distinto según que la expresión de *lacZ* se analice a partir de la inserción Ω MR900::Tn5-*lac* o a partir del fragmento P_{MF} ::*lacZ* (Figura 3.26c y d). Estos resultados sugieren que para la acción supresora de *sodA1* sobre *carD1*, es relevante el contexto en el cual se estudia la actividad del promotor correspondiente. El menor efecto obtenido en el caso del transposón se debería, bien a la secuencia de 60 pb que separa a *lacZ* del DNA de *M. xanthus*, a la izquierda del transposón, o bien a la mera presencia del

transposón (>12 Kb de DNA foráneo) en esa región, que puede alterar su estructura localmente.

La mutación *sodA1* suprime también el efecto de *carD1* sobre otros dos promotores en estudio, M5- y M4+, siendo menos evidente su acción supresora en el caso del promotor M8+ (Figura 3.26). Ello sugiere que el producto génico de *sodA* actúa también, directa o indirectamente, como un “regulador global” cuya acción está conectada de alguna forma con la de CarD.

No ha sido posible determinar el efecto supresor de *sodA1* sobre el alelo *carD2*, debido a la naturaleza no seleccionable de dichas mutaciones. Con respecto a *sodB1* y *sodC1*, en cambio, sí se ha comprobado que, además de suprimir a la mutación *carD2*, suprimen a la mutación *carD1* en cuanto a su efecto sobre el promotor MF1- (Figura 3.28). Cabe resaltar que las mutaciones *sodB1* y *sodC1*, que por sí solas o en combinación con *carD2* apenas afectan al crecimiento de *M. xanthus*, resultan “semiletales” en combinación con la mutación *carD1*. Ello confirma la peculiaridad de *carD1* ya comentada y explicada por algún efecto polar o debido a la versión truncada de *carD*. Si contamos los otros dos casos ya descritos, los dobles mutantes *ihfA2* Ω MR1100 e *ihfA2* Ω MR1104, este trabajo ha puesto de manifiesto cuatro situaciones distintas (tres, si *sodB1* y *sodC1* fueran mutaciones alélicas) de “semiletalidad” debida a mutaciones dobles. En principio sorprendente, este fenómeno se relaciona probablemente con que dos de los productos génicos implicados en una u otra situación (IhfA y CarD) actúan como reguladores globales, afectando a la expresión de muchos otros genes. Cabe pensar en algún tipo de redundancia genética que asegura que la falta de función de un solo gen de las características funcionales de *ihfA* o *carD* no resulte dramática para la célula.

La disponibilidad de las mutaciones *sod* debe permitir en un futuro inmediato la clonación de los genes correspondientes y, por tanto, la

identificación de los “asistentes moleculares” de CarD en la activación de cada grupo de promotores. Este trabajo ya se ha iniciado en nuestro laboratorio y se basa en la utilización de una genoteca del tipo silvestre de *M. xanthus* en la que se buscarán clones que complementen a las distintas mutaciones *sod* (restauración de la falta de expresión de los promotores dependientes de CarD en presencia de mutaciones *carD*).

La clonación de los distintos loci *sod* permitirá conocer su estructura y la naturaleza de las mutaciones *sodA1*, *sodB1*, etc. (secuenciación y análisis comparativo de secuencias), comprobar si determinan proteínas que se unen o no físicamente a CarD (sistema de los dos híbridos de levadura), y otros ensayos. Sin el conocimiento derivado de estos estudios, no cabe sino especular sobre el modo de operación de los distintos genes *sod*. En términos muy generales y entre varias posibilidades, cabe pensar que el producto de un gen *sod* colabore normalmente con CarD en su acción sobre algunos promotores “diana”, y que la proteína Sod mutante haya adquirido la capacidad de realizar dicha acción por sí sola, haciendo dispensable la función de CarD. Alternativamente, una mutación *sod* habría alterado un elemento de acción “cis” de un gen regulador dependiente de CarD, liberándolo de dicha dependencia.

V. Conclusiones

Los resultados de este trabajo conducen a las siguientes conclusiones:

1. La estrategia original usada en experimentos destinados a identificar promotores de *M. xanthus* cuya actividad está regulada por CarD, una proteína con un dominio de unión a DNA típico de la proteína eucariótica "arquitectónica" HMGA, ha resultado efectiva y podría ser utilizada en situaciones similares.
2. Los resultados de los experimentos citados indican que 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 "foto-inducibles" o específicos del desarrollo multicelular, que CarD es un regulador global de la transcripción.
3. Entre los genes de *M. xanthus* dependientes de CarD se encuentran algunos relacionados con la resistencia a agentes tóxicos, otros relacionados con la captación de nutrientes y otro gen de secuencia similar al gen bacteriano conocido como *lrp*, responsable de otro "factor arquitectónico".
4. La mutación *carD1*, una inserción del transposón Tn5 ó Tn5-132 provoca efectos distintos a la falta completa del gen *carD*, lo cual podría ser resultado de la versión truncada concreta que genera dicha mutación o de un efecto polar del transposón.
5. CarQ, el factor sigma que activa los promotores "foto-inducibles" dependientes de CarD, no actúa sobre los nuevos promotores identificados en este trabajo. El factor Ihf, que coopera con CarD en la regulación de

alguno de los promotores "foto-inducibles", participa en la activación normal del gen *lrp*, pero no de los otros nuevos promotores citados. Además de revelar un juego de interacciones reguladoras entre distintos factores arquitectónicos, estos resultados ponen de manifiesto la versatilidad de CarD respecto al tipo de promotores sobre los que actúa, reflejo quizás de su capacidad de interactuar físicamente con distintos tipos de factores transcripcionales.

6. La falta de función *ihfA*, en combinación con las inserciones de transposón Ω MR1100 ú Ω MR1104, afecta dramáticamente a la tasa de crecimiento de *M. xanthus*.
7. De siete mutaciones distintas que suprimen, parcial o totalmente, el efecto de las mutaciones *carD1* o *carD2* sobre la actividad de un promotor vegetativo muy dependiente de *carD*, ninguna suprime el efecto de dichas mutaciones sobre la carotenogénesis. Una de ellas, *sodA1*, suprime parcialmente el efecto de *carD1* sobre el desarrollo multicelular.
8. La mutación *sodA1* no está ligada a *carD*.
9. El locus *sodA* puede ser responsable de un factor que coopera con CarD en su acción reguladora sobre diversos promotores, ya que la mutación *sodA1* suprime el efecto de *carD1* sobre tres de los cuatro nuevos promotores vegetativos analizados.
10. Los supresores *sodB1* y *sodC1* no son específicos de mutación, ejerciendo su efecto tanto sobre la mutación *carD1* como *carD2*.

VI. Bibliografia

- Appleyard, R.K. (1954).** Segregation of new lysogenic types during growth of a doubly lysogenic strain derived from *Escherichia coli* K12. *Genetics* 39:440
- Aravind, L. y Landsman, D. (1998).** AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA binding proteins. *Nucleic Acids Res* 26:4413-4421.
- Arfin, S.M., Long, A.D., Ito, E.T., Toller, L., Riehle, M.M. Paegle, E.S. y Hatfield, W. (2000).** Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12: The effects of the integration host factor. *J Biol Chem* 275(38):29672-29684.
- Ashar, H.R., Fejzo, M.S., Tkachenko, A., Zhou, X., Fletcher, J.A., Weremowicz, S., Morton, C.C. y Chada, K., (1995).** Disruption of the architectural factor HMGI-C: DNA binding AT hook motifs fused in lipomas to distinct transcriptional regulatory domains. *Cell* 82:57-65.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith y J.A. Struhl, K. (1989).** Anonymous current protocols in molecular biology. Greene publishing associates and Wiley-Interscience, Nueva York.
- Avery, L. y Kaiser, D. (1983)** In situ transposon replacement and isolation of a spontaneous tandem genetic duplication. *Mol Gen Genet* 191:99-109
- Aviv, M., Giladi, H., Schreiber, G., Oppenheim, A.B. y Glaser, G. (1994).** Expression of the genes coding for the *Escherichia coli* integration host factor are controlled by growth phase, *rpoS*, ppGpp and by autoregulation. *Mol Microbiol* 14:1021-1031.
- Ayora, S., Rojo, F., Ogasawara, N., Nakai, S. y Alonso, J.C. (1996).** The Mfd protein of *Bacillus subtilis* 168 is involved in both transcription-coupled DNA repair and DNA recombination. *J Mol Biol* 256:301-318.
- Azam, A., Iwata, A., Nishimura, A., Ueda, S. y Ishihama, A. (1999).** Growth-phase dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid. *J. Bacteriol* 181(20):6361-6370.
- Bagga, R. y Emerson, M. (1997).** An HMG I/Y-containing repressor complex and supercoiled DNA topology are critical for long-range enhancer-dependent transcription *in vitro*. *Genes Dev* 11:629-639.
- Balsalobre, J.M., Ruiz-Vázquez, R.M. y Murillo, F.J. (1987).** Light induction of gene expression in *Myxococcus xanthus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:2359-2362
- Beloin, C., Exley, R., Mahé, A. L., Zouine, M., Cubasch, S. y Le Hégarat, F. (2000).** Characterization of LrpC DNA-binding properties and regulation of *Bacillus subtilis* *lrpC* gene expression. *J Bacteriol* 182(16):4414-4424.

Bensasson, R.V., Land, E.J., Truscot, T.G. (1993). *Excited states and free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, Oxford, UK.

Berg, D.E., Davis, J., Allet, B. y Rochaix, J.D. (1975). Transposition of R factor genes to bacteriophage lambda. *Proc Natl Acad Sci USA* 72:3628-3632

Berlingieri, M.T., Manfioletti, G., Santoro, M., Bandiera, A., Visconti, R., Giancotti, V. y Fusco, A. (1995). Inhibition of HMGI-C protein synthesis suppresses retrovirally induced neoplastic transformation of rat thyroid cells. *Mol Cell Biol* 15:1545-1553.

Bewley, C.A., Gronenborn, A.M. y Clore, G.M. (1998). Minor groove-binding architectural proteins: structure, function and DNA recognition. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 27:105-131

Bianchi, M.E., Beltrame, M. y Paonessa, G. (1989). Specific recognition of cruciform DNA by nuclear protein HMG-1. *Science* 243:1056-1059

Blomfield, I.C., Kulasekara, D.H., Eisenstein, B.I. (1997). Integration host factor stimulates both FimB- and FimE-mediated site-specific DNA inversion that controls phase variation of type 1 fimbriae expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 23(4):705-717.

Bonnefoi, E., Bandu, M.T. y Doly, J. (1999). Specific binding of high mobility group I (HMGI) protein and histone H1 to the upstream AT-rich region of the murine beta interferon promoter: HMGI protein acts as a potential antirepressor of the promoter. *Mol Cell Biol* 19(4):2803-2816.

Botella, J.A. (1996). Un operón de la bacteria *Myxococcus xanthus* implicado en la síntesis de carotenoides y su regulación. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia. Murcia.

Botella, J.A., Murillo, F.J. y Ruiz-Vázquez, R.M. (1995). A cluster of structural and regulatory genes for light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*. *Eur J Biochem* 233:238-248

Bretscher, A.P. y Kaiser, D. (1978) Nutrition of *Myxococcus xanthus*, a fruiting myxobacterium. *J Bacteriol* 133:763-768

Browning, D.F., Cole, J.A. y Busby, S.J. (2000). Suppression of FNR-dependent transcription activation at the *Escherichia coli* *nir* promoter by FIS, IHF and H-NS: modulation of transcription initiation by a complex nucleo-protein assembly. *Mol Microbiol* 37(5):1258-1269.

Brunetti, A., Manfioletti, G., Chiefari, E., Goldfine, I.D. y Foti, D. (2001). Transcriptional regulation of human insulin receptor gene by the high mobility group protein HMGI(Y). *FASEB J* 15(2):492-500.

Burchard, R. y Dworkin, M. (1966). Light-induced lysis and carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* 91:535-545.

Bustin, M (1999). Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high mobility group chromosomal proteins. *Mol Cell Biol* 19(8):5237-5246.

Bustin, M. (2001). Revised nomenclature for high mobility group (HMG) chromosomal proteins. *TIBS* 26(3):152-153.

Bustin, M., Lehn, D.A. y Landsman, D. (1990). Structural features of the HMG chromosomal proteins and their genes. *Biochem Biophys Acta* 1049:231-243

Bustin, M. y Reeves, R. (1996). High-mobility-group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 54:35-100.

Casadaban, M.J. y Cohen, S.N. (1980). Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *E.coli*. *J Mol Biol* 138:179-207

Cayuela, M.L. (1999). Caracterización de CarD, un factor transcripcional de la bacteria *Myxococcus xanthus*. Tesis doctoral. Universidad de Murcia. Murcia.

Cervantes, M. (2000). Acción de genes estructurales y reguladores en la respuesta a la luz de *Myxococcus xanthus*. Tesis doctoral. Universidad de Murcia. Murcia.

Claus, P., Schulze, E. y Wisniewski, J.R. (1994). Insect proteins homologous to mammalian high mobility group proteins I/Y (HMGI(Y)). Characterization and binding to linear and four-way junction DNA. *J Biol Chem* 269:33042-33048

Claverie-Martin, F. y Magasanik, B. (1991). Role for integration host factor in the regulation of the *glnHp2* promoter of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:1631-1635.

Colland, F., Barth, M., Hengge-Aronis, R y Kolb, A. (2000). Sigma factor selectivity of *Escherichia coli* RNA polymerase: role for CRP, IHF and Lrp transcription factors. *EMBO J* 19(22):3028-3037.

Craig, N.L. y Nash, .A. (1984). *Escherichia coli* integration host factor binds to specific sites in DNA. *Cell* 39:707-716.

Chalmers, R., Guhathakurta, A., Benjamin, H. y Kleckner, N. (1998). IHF modulation of Tn10 transposition: sensory transduction of supercoiling status via a proposed protein/DNA molecular spring. *Cell* 93:897-908.

- Chen, H.W., Keseler, I.M. y Shimkets, L.J. (1990).** The genome size of *Myxococcus xanthus* determined by pulsed-field electrophoresis. *J Bacteriol* 172:4206-4213.
- Chiappetta, G., Tallini, G., De Biasio, M.C., Manfioletti, G., Martinez-Tello, F.J., Pentimalli, F., de Nigris, F., Mastro, A., Botti, G., Fedele, M., Berger, N., Santoro, M., Giaconetti, V. y Fusco, A. (1998).** Detection of high mobility group I HMGI(Y) protein in the diagnosis of thyroid tumors: HMGI(Y) expression represents a potential diagnostic indicator of carcinoma. *Cancer Res* 58:4193-4198.
- Cho, K. y Zusman, D.R. (1999).** AsgD, a new two-component regulator required for A-signalling and nutrient sensing during early development of *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* 34(2):268-281.
- Chuvpilo, S., Shomberg, C., Gerwig, R., Heinfling, A., Reeves, R., Grummt, F. y Serfling, E. (1993).** Multiple closely-linked NFAT/octamer and HMGI(Y) binding sites are part of the interleukin-4 promoter. *Nucleic Acids Res* 21:5694-5704.
- D'Ari, R., Lin, R.T. y Newman, E.B. (1993).** The leucine-responsive regulatory protein: more than a regulator? *Trends Biochem Sci* 18:260-263.
- Davis, J.M., Mayor, J. y Plamann, L. (1995).** A missense mutation in *rpoD* results in an A-signalling defect in *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* 18:943-952.
- Ditto, M.D., Roberts, D. y Weisberg, R.A. (1994).** Growth phase variation of integration host factor level in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 176:3738-3748.
- Drlica, K. y Rouvière-Yaniv, J. (1987).** Histone-like proteins of bacteria. *Microbiol Rev* 51:301-319.
- Du, W., Thanos, D. y Maniatis, T. (1993)** Mechanisms of transcriptional synergism between distinct virus-inducible enhancer elements. *Cell* 74:887-898
- Dworkin, M. (1962).** Nutritional requirements for vegetative growth of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* 84:250-257.
- Dworkin, M. (1996).** Recent advances in the Social and Developmental Biology of the Myxobacteria. *Microbiol Rev* 60:70-102.
- Dworkin, J., Ninfa, A.J. y Model, P. (1998).** A protein-induced DNA bend increases the specificity of a prokaryotic enhancer-binding protein. *Genes Dev* 12:894-900.
- Dworkin, M. y Kaiser, D. (1993).** Myxobacteria II. In: Dworkin M, Kaiser D (eds) American Society for Microbiology, Washington.

Engelhorn, M. y Geiselman, J. (1998). Maximal transcriptional activation by the IHF protein of *Escherichia coli* depends on optimal DNA bending by the activator. *Mol Microbiol* 30(2):431-441.

Evans, K. y Poole, K. (1999). The MexA-MexB-OprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa* is growth-phase regulated. *FEMS Microbiol.* 173(1):35-39.

Falvo, J.V., Thanos, D. y Maniatis, T. (1995). Reversal of intrinsic DNA bends on the INFB gene enhancer by transcription factors and the architectural protein HMGI(Y). *Cell* 83:1101-1111.

Farnet, C.M. y Bushman, F.D. (1997). HIV-1 cDNA integration: requirement of HMGI(Y) protein for function of preintegration complexes in vitro. *Cell* 88:483-492

Fontes, M., Ruiz-Vázquez, R.M. y Murillo, F.J. (1993). Growth phase dependence of the activation of a bacterial gene for carotenoid synthesis by blue light. *EMBO J* 12:1265-1275

Frank, O., Schwanbeck, R. y Wisniewski, J.R. (1998). Protein footprinting reveals specific binding modes of a high mobility group protein I to DNA. *J Biol Chem* 273:20015-20020.

French, S.W., Schmidt, M.C. y Glorioso, J.C. (1996). Involvement of a high-mobility-group protein in the transcriptional activity of herpes simplex virus latency-active promoter 2. *Mol Cell Biol* 16:5393-5399

Garza, A.G., Harris, B.Z., Pollack, J.S. y Singer, M. (2000). The *asgE* locus is required for cell-cell signalling during *Myxococcus xanthus* development. *Mol Microbiol* 35(4):812-824.

Geisselsoder, J., Campos, J.M. y Zusman, D.R. (1978). Physical characterization of bacteriophage Mx4, a generalized transducing phage for *Myxococcus xanthus*. *J Mol Biol* 119:179-189

Giladi, H., Koby, S., Prag, G., Engelhorn, M., Geiselman, J. y Oppenheim, A.B. (1998). Participation of IHF and a distant UP element in the stimulation of the phage λ P_L promoter. *Mol Microbiol* 30:443-451.

Gill, R.E. y Cull, M.G. (1986). Control of the developmental gene expression by cell-to-cell interactions in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* 168:341-347

Gill, R.E y Shimkets, L. J. (1993). Genetic approaches for analysis of myxobacterial behavior. In: Dworkin M, Kaiser D (eds) *Myxobacteria II*. American Society for Microbiology, Washington, pp 129-155.

Goodman, S.D. y Kay, O. (1999). Replacement of integration host factor protein-induced DNA bending by flexible regions of DNA. *J Biol Chem* 274(52):37004-37011.

Goodman, S.D., Nicholson, S.C. y Nash, H.A. (1992). Deformation of DNA during site-specific recombination of bacteriophage lambda: replacement of IHF protein by HU protein or sequence directed bends. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:11910-11914.

Goodrich, J.A., Schwartz, M.L. y McClure, W.R. (1990). Searching for and predicting the activity of sites for DNA binding proteins: compilation and analysis of the binding sites for *Escherichia coli* integration host factor (IHF). *Nucleic Acids Res* 18:4993-5000.

Goodwin, G.H. (1998). The high mobility group protein, HMGI-C. *Int J Biochem Cell Biol* 30:761-766.

Goosen, N. y van de Putte, P. (1995). The regulation of transcription initiation by integration host factor. *Mol Microbiol* 16:1-7

Gorham, H.C., McGowan, S.J., Robson, P. y Hodgson, D.A. (1996). Light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: light-dependent membrane sequestration of ECF sigma factor CarQ by anti-sigma factor CarR. *Mol Microbiol* 19:171-186.

Griffo, G., Oppenheim, A.B. y Gottesman, M.E. (1989). Repression of the lambda *pcin* promoter by integrative host factor. *J Mol Biol* 209:55-64.

Grimwade, J.E., Ryan, V.T. y Leonard, A.C. (2000). IHF redistributes bound initiator protein, DnaA, on supercoiled *oriC* of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 35:835-844.

Hales, L.M., Gumpert, R.I. y Gardner, J.F. (1994). Determining the DNA sequence elements required for binding integration host factor to two different target sites. *J Bacteriol* 176:2999-3006.

Hagen, D.C., Bretscher, A.P. y Kaiser, D. (1978). Synergism between morphogenetic mutants of *Myxococcus xanthus*. *Dev Biol* 64:284-296.

Hagen, D.C. y Shimkets, L.J. (1990). Nucleotide sequence and transcriptional products of the *csg* locus of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* 172:15-23.

Himes, S.R., Coles, L.S., Reeves, R. y Shannon, M.F. (1996). High Mobility group protein I(Y) is required for function and for c-rel binding to CD28 response elements within the GM-CSF and IL-2 promoters. *Immunity* 5:479-489.

- Hodgkin, J. y Kaiser, D. (1977).** Cell-cell stimulation of movement in non motile mutants of *Myxococcus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:2938-2942
- Hodgson, D.A. (1993).** Light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: genetic analysis of the *carR* region. *Mol Microbiol* 7:471-488
- Hodgson, D.A y Murillo, F.J. (1993).** Genetics of regulation and pathway of synthesis of carotenoids. In: Dworkin M, Kaiser D (eds) *Myxobacteria II*. American Society for Microbiology, Washington, pp 157-181.
- Holmes, D.S. y Quigley, M. (1981).** A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmid. *Anal Biochem* 114:193-197
- Hoover, T.R., Santero, E., Porter, S. y 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.
- Huth, J.R., Bewley, C.A., Nissen, M.S., Evans, J.N.S., Reeves, R., Gronenborn, A.M. y Clore, G.M. (1997).** The solution structure of an HMGI(Y)-DNA complex defines a new architectural minor groove binding motif. *Nat Struct Biol* 4:657-665
- Huang, L., Tsui, P. y Freundlich, M. (1990).** Integration host factor is a negative effector of *in vivo* and *in vitro* expression of *ompC* in *E. coli*. *J Bacteriol* 172:5293-5298
- Hwang, D.S. y Kornberg, A. (1992).** Opening of the replication origin of *Escherichia coli* by DnaA protein with protein HU or IHF. *J Biol Chem* 267:23083-23086.
- Jayaraman, L., Moorthy, N.C., Murthy, K.G., Manley, J.L., Bustin, M y Prives, C. (1998).** High mobility group protein-1 (HMG-1) is a unique activator of p53. *Genes Dev* 12:462-472.
- Jain, R. e Inouye, S. (1998).** Inhibition of development of *Myxococcus xanthus* by eukaryotic protein kinase inhibitors. *J Bacteriol* 180:6544-6550
- John, S., Reeves, R., Lin, J., Child, R., Leiden, J., Thompson, C.B. y Leonard, W.J. (1995).** Regulation of cell-type-specific interleukin-2 receptor alpha-chain gene expression: potential role of physical interactions between ELF-1, HMGI(Y), and NF- κ B family proteins. *Mol Cell Biol* 15:1786-1796
- Johnson, J.M. y Church, G.M. (1999).** Alignment and structure prediction of divergent protein families: periplasmic and outer membrane proteins of bacterial efflux pumps. *J Mol Biol* 287:695-715

- Kaiser, D. (1979).** Social gliding is correlated with the presence of pili in *Myxococcus xanthus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:5952-5956
- Kaiser, D. y Dworkin, M. (1975).** Gene transfer to a myxobacterium by *Escherichia coli* phage P1. *Science* 187:653-654
- Kaiser, D. y Kroos, L. (1993).** Intercellular signaling. In: Dworkin M, Kaiser D (eds) *Myxobacteria II*. American Society for Microbiology, Washington, pp 257-283
- Kas, E., Poljak, L., Adachi, Y. y Lamml, U.K. (1993).** A model for chromatin opening: stimulation of topoisomerase II and restriction enzyme cleavage of chromatin by distamycin. *EMBO J* 12(1):115-26.
- Kazmierczak, B., Rosigkeit, J., Wanschura, S., Meyer-Bolte, K., van de Ven, W.J.M., Kayser, K., Kriehoff, B., Kastendiek, H., Bartnitzke, S. y Bullerdiek, J. (1996).** HMGI-C rearrangements as the molecular basis for the majority of pulmonary chondroid hamartomas: a survey of 30 tumors. *Oncogene* 12:515-5521.
- Kim, S.K. y Kaiser, D. (1990a).** Cell motility is required for the transmission of C-factor, an intercellular signal that coordinates fruiting body morphogenesis of *Myxococcus xanthus*. *Genes Dev* 4:896-905
- Kim, S.K. y Kaiser, D. (1990b).** C-factor: a cell-cell signaling protein required for fruiting body morphogenesis of *Myxococcus xanthus*. *Cell* 61:19-26
- Kim, S.K. y Kaiser, D. (1990c).** Cell alignment required in differentiation of *Myxococcus xanthus*. *Science* 249:926-928.
- Korak, R., y Kivisaar, M. (1998).** Expression of the transposase gene *tnpA* of Tn4652 is positively affected by integration host factor. *J Bacteriol* 180(11):2822-2829.
- Koronakis, V., Li, J., Koronakis, E. y Stauffer, K. (1997).** Structure of TolC, the outer-membrane component of the bacterial type I efflux system, derived from two-dimensional crystals. *Mol Microbiol* 23:617-626.
- Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B y Hughes, C (2000).** Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* 405:914-919
- Krause, H.M. y Higgins, P. (1986).** Positive and negative regulation of the Mu operator by Mu repressor and *Escherichia coli* integration host factor. *J Biol Chem* 261:3744-3752.

- Kroos, L. y Kaiser, D. (1984). Construction of Tn5-lac, a transposon that fuses lacZ expression to exogenous promoters, and its introduction into *Myxococcus xanthus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:5816-5820
- Kroos, L. y Kaiser, D. (1987). Expression of many developmentally regulated genes in *Myxococcus xanthus* depends on a sequence of cell interactions. *Genes Dev* 1:840-854
- Kroos, L., Kuspa, A. y Kaiser, D. (1986). A global analysis of developmentally regulated genes in *Myxococcus xanthus*. *Dev Biol* 117:252-266
- Kuner, J.M. y Kaiser, D. (1981). Introduction of transposon Tn5-lac into *Myxococcus xanthus* for analysis of developmental and other non-selectable mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:425-429
- Kur, J., Hasam, M. y Szybalski, W. (1989). Physical and biological consequences of interactions between integration host factor (IHF) and coliphage lambda late *p*'R promoter and its mutants. *Gene* 81:1-15.
- Kuspa, A. y Kaiser, D. (1989). Genes required for developmental signaling in *Myxococcus xanthus*: three *asg* loci. *J Bacteriol* 171:2762-2772
- Kuspa, A., Kroos, L. y Kaiser, D. (1986). Intercellular signaling is required for developmental gene expression in *Myxococcus xanthus*. *Dev Biol* 117:267-276.
- Kuspa, A., Plamann, L. y Kaiser, D. (1992a). Identification of a heat-stable A-factor from *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* 174:3319-3326.
- Kuspa, A., Plamann, L. y Kaiser, D. (1992b). A-signaling and the cell density requirement for *Myxococcus xanthus* development. *J Bacteriol* 174:7360-7369
- Kustu, S., Santero, E., Keener, J., Popham, D. y Weiss, D. (1989). Expression of σ^{54} (ntrA)-dependent genes is probably united by a common mechanism. *Microbiol Rev* 53:367-376.
- Landgraf, J.R., Levinthal, M. y Danchin, A. (1994). The role of H-NS in one carbon metabolism. *Biochimie* 76(10-11):1063-1070.
- Laux, T., Seurinck, J. y Goldberg, R.B. (1991). A soybean embryo cDNA encodes a DNA binding protein with histone and HMG-protein-like domains. *Nucleic Acids Res* 19:4768.
- Lazdunski, C.J., Bouveret, E., Rigal, L.J., Lloubès, R. y Bénédicti, H. (1998). Colicin import into *Escherichia coli* cells. *J Bacteriol* 180(19):4993-5002.

Lee, B.C. (1995). Quelling the red menace: haem capture by bacteria. *Mol Microbiol* 18(3):383-390.

Lewis, H., Kaszubska, W., DeLamater, J.F. y Whelan, J. (1994). Cooperativity between two NF-kappa-B complexes, mediated by high mobility-group protein I(Y), is essential for cytokine-induced expression of the E-selectin promoter. *Mol Cell Biol* 14:5701-9

Li, L., Farnet, C.M., Anderson, W.F. y Bushman, F.D. (1998). Modulation of activity of Moloney murine leukemia virus preintegration complex by host factors in vitro. *J. Virol.* 72: 2125-2131.

Li, S., Bheong-Uk, L. y Shimkets, L.J. (1992). *csgA* expression entrains *Myxococcus xanthus* development. *Genes Dev* 6:401-410.

Li, X.Z., Nikaido, H. y Poole, K. (1995). Role of *mexA-mexB-oprM* in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemoter* 39(9):1948-1953.

Li, X.Z., Barre, N. y Poole, K. (2000). Influence of the MexA-MexB-OprM multidrug efflux system on expression of the MexC-MexD-OprJ and MexE-MexF-OprN multidrug efflux systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemoter* 46(6):885-893.

Lin, R.T., D'Ari, R. y Newman, E.B. (1993). λ placMu insertions in genes of the leucine regulon: extension of the regulon to genes not regulated by leucine. *J Bacteriol* 174:1948-1955.

Lonetto, M.A., Brown, K.L., Rudd, K.E. y Butter, M.J. (1994). Analysis of the *Streptomyces coelicolor sigE* gene reveals the existence of a subfamily of eubacterial RNA polymerase sigma factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:7573-7577

Losick, R. y Kroos, L. (1989). Dependence pathways for the expression of genes involved in endospore formation in *Bacillus subtilis*. In: Smith I, Slepecky R, Seilow P (eds) Regulation of Prokaryotic Development. American Society for Microbiology, Washington, pp 223-241

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275

Madhusudhan, K. T., Huang, N. y Sokatch, J.R. (1995). Characterization of BkdR-DNA binding protein in the expression of the *bkd* operon of *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* 177:636-641.

Marshall, D.G., Sheehan, B.J. y Dorman, C.J. (1999). A role of leucine-responsive regulatory protein and integration host factor in the regulation of the *Salmonella*

plasmid virulence (*spv*) locus in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 34(1):134-145

Martínez-Argudo, I.M., Ruiz-Vázquez, R.M. y Murillo, F.J. (1998). The structure of an ECF- σ -dependent, light-inducible promoter from the bacterium *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* 30:883-893

Martínez-Laborda, A. y Murillo, F.J. (1989). Genetic and allelic interactions in the carotenogenic response of *Myxococcus xanthus* to blue light. *Genetics* 122:481-490

McGowan, S.J., Gorham, H.C. y Hodgson, D.A. (1993). Light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: DNA sequence analysis of the *carR* region. *Mol Microbiol* 10:713-735

Meijer, L., Ostvold, A., Walaas, S.I., Lund, T. y Laland, S.G. (1991). High-mobility-group proteins P1, I and Y as substrates of the m-phase-specific p34^{cdc2} / cyclin^{cdc13} kinase. *Eur J Biochem* 196:557-567.

Miller, J. (1972). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, pp 325-355

Miller, H.I. y Friedman, D.I. (1980). An *E. coli* gene product required for lambda site-specific recombination. *Cell* 20:711-719.

Moeck, G.S. y Coulton, J.W. (1998). TonB-dependent iron acquisition: mechanisms of siderophore-mediated active transport. *Mol Microbiol* 28(4):675-681.

Molina-López, J.A., Govanes, F y Santero, E. (1994). Geometry of the process of transcription activation at the σ^{54} -dependent *nifH* promoter of *Klebsiella pneumoniae*. *J Biol Chem* 269:25419-25425.

Moreno, A. (1997). Identificación y caracterización de un gen de la bacteria *Myxococcus xanthus* implicado en la regulación de la carotenogénesis. Tesis doctoral. Universidad de Murcia. Murcia.

Moreno, A.J., Fontes, M. y Murillo, F.J. (2001). *ihfA* gene of the bacterium *Myxococcus xanthus* and its role in activation of carotenoid genes by blue light. *J Bacteriol* 183:557-569.

Munshi, N., Merika, M., Yie, J., Senger, K., Chen, G y Thanos, D. (1998). Acetylation of HMGI(Y) by CBP turns off INF- β expression by disrupting the enhanceosoma. *Mol Cell* 2:457-467.

Murphy, L.D. y Zimmerman, S.B. (1997). Isolation and characterization of spermidine nucleoids from *Escherichia coli*. *J Struct Biol* 119:321-335.

- Nash, H.A. (1981).** Integration and excision of bacteriophage lambda: the mechanism of conservative site-specific recombination. *Annu Rev Genet* 15:143-147.
- Nash, H.A. (1996).** The *E. coli* HU and IHF proteins: accessory factors for complex protein-DNA assemblies. In *Regulation of Gene Expression in Escherichia coli*. Lin, E.C.C., and Lynch, A.S. (eds). Austin, TX: Landes, pp.149-166.
- Nash, H.A., Robertson, C.A., Flamm, E., Weisberg, R.A. y Miller, H.I. (1987)** Overproduction of *Escherichia coli* IHF, a protein with non-identical subunits. *J Bacteriol* 169: 4124-4127.
- Nelson, H.C.M., Finch, J.T., Luisi, B.F. y Klug, A. (1987).** The structure of an oligo(dA)-oligo(dT) tract and its biological implications. *Nature* 330:221-226.
- Newman, E.B. y Lin, R. (1995).** Leucine-responsive regulatory protein: a global regulator of gene expression in *E. coli*. *Annu Rev Microbiol* 49:747-775.
- Nicolás, F.J. (1995).** Un gen de *Myxococcus xanthus*, *carD*, que regula la carotenogénesis y controla el proceso de desarrollo multicelular. Tesis doctoral. Universidad de Murcia. Murcia.
- Nicolás, F.J., Ruiz-Vázquez, R.M. y Murillo, F.J. (1994).** A genetic link between light response and multicellular development in the bacterium *Myxococcus xanthus*. *Genes Dev* 8:2375-2387
- Nicolás, F.J., Cayuela, M.L., Martínez-Argudo, I.M., Ruiz-Vázquez, R.M. y Murillo, F.J. (1996).** High mobility group I(Y)-like DNA domains on a bacterial transcription factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:6881-6885.
- Nieto-Sotelo, J., Ichida, A. y Quail, P.H. (1994a).** Positive factor 1 (PF1) from oat is an HMGY- and H1 histone-like protein that binds a functionally defined d(AT)-rich element in the oat phytochrome A gene (PHYA3) promoter. *Nucleic Acids Res* 22:1115-1116
- Nieto-Sotelo, J., Ichida, A., Quail, P.H. (1994b).** PF1: an A-T hook containing DNA binding protein from rice that interacts with a functionally defined d(AT)-rich element phytochrome A3 gene promoter. *Plant Cell* 6:287-301
- Nikaido, H. (1994).** Prevention of drug access to bacterial targets: permeability and active efflux. *Science* 264:382-388.
- Nissen, M.S., Langan, T.A. y Reeves, R. (1991).** Phosphorylation by cdc2 Kinase modulates DNA binding activity of High Mobility Group I nonhistone chromatin protein. *J Biol Chem* 266:19945-19952.

Oberto, J., Drlica, K. y Rouviere-Yaniv, J. (1994). Histones, HMG, HU, IHF: Môme combat. *Biochimie* 76:901-908

Oshima, T., Ito, K., Kabayama, H. y Nakamura, Y. (1995). Regulation of *lrp* expression by H-NS and Lrp proteins in *Escherichia coli*: dominant negative mutations in *lrp*. *Mol Gen Genet* 247:521-528.

Pabo, C.O. y Sauer, R.T. (1992). Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu Rev Biochem* 61:1053-1088.

Parekh, B.S. y Hatfield, G.W. (1996). Transcriptional activation by protein-induced DNA bending: Evidence for a DNA structural transmission model. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:1173-1177.

Peekhaus, N., Tolner, B., Poolman, B. y Kramer, R. (1995). The glutamate uptake regulatory protein (Grp) of *Zymomonas mobilis* and its relation to the global regulator Lrp of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 177:5140-5147.

Pérez-Martín, J., Timmis, K.N. y de Lorenzo V (1994). Co-regulation by bent DNA. Functional substitutions of the integration host factor site at σ^{54} -dependent promoter Pu of the upper-TOL operon by intrinsically curved sequences. *J Biol Chem* 269:22657-22662.

Pérez-Martín, J. y de Lorenzo V. (1995). Integration host factor suppresses promiscuous activation of the σ^{54} -dependent promoter Pu of *Pseudomonas putida*. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:7277-7281.

Pérez-Martín, J. y de Lorenzo, V. (1997). Clues and consequences of DNA bending in transcription. *Annu Rev Microbiol* 51:593-628

Piekielko, A., Drung, A., Rogalla, P., Schwanbeck, R., Heyduk, T., Gerharz M., Bullerdiel, J. y Wisniewski, J.R. (2001). Distinct organization of DNA complexes of various HMGI/Y family proteins and their modulation upon mitotic phosphorylation. *J Biol Chem* 276:1984-1992.

Pinna, L. (1990). Casein kinase 2: an "eminence grise" in cellular regulation? *Biochem Biophys Acta* 1054:267-284

Plamann, L., Kuspa, A. y Kaiser, D. (1992). Proteins that rescue A-signal-defective mutants of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* 174:3311-3318.

Plamann, L., Davis, J.M., Cantwell, B. y Mayor, J. (1994). Evidence that *asgB* encodes a DNA-binding protein essential for growth and development of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* 176:2013-2020

Plamann, L., Yonghui, L., Cantwell, B. y Mayor, J. (1995). The *Myxococcus xanthus* *asgA* gene encodes a novel signal transduction protein required for multicellular development. *J Bacteriol* 177:2014-2020

Platko, J.V. y Calvo, J.M. (1993). Mutations affecting the ability of *Escherichia coli* Lrp to bind DNA, activate transcription, or respond to leucine. *J. Bacteriol.* 175:1110-1117.

Poole, K., Krebes, K., McNally, C. y Neshat, S (1993). Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *J Bacteriol* 175:7363-7372.

Poole, K., Tetro, K., Zhao, Q, Neshat, S., Heinrichs, D.E. y Bianco, N. (1996). Expression of the multidrug resistance operon *mexA-mexB-oprM* in *Pseudomonas aeruginosa*: *mexR* encodes a regulator of operon expression. *Antimicrob Agents Chemoter* 40(9):2021-2028.

Postle, K. (1990). TonB and the Gram-negative dilemma. *Mol. Microbiol.* 4(12):2019-2025.

Postle, K. (1993). TonB protein and energy transduction between membranes. *J Bioenerg Biomemb* 25:591-601.

Pratt, T.S., Steiner, T., Feldman, L.S., Walker, K.A. y Osuna, R. (1997). Deletion analysis of the *fis* promoter region in *Escherichia coli*: antagonistic effects of integration host factor and Fis. *J Bacteriol* 179:6367-6377

Ptashne, M. (1988). How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature* 335:683-689.

Ramani, N., Huang, L. y Freundlich, M. (1992). *In vivo* interactions of integration host factor with the *ompF* promoter regulatory-region of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 231:248-255.

Rau, W. (1988). Functions of carotenoids other than in photosynthesis. In *Plant pigments* (ed. T. Goodwin), pp 231-255. Academic Press, London, UK.

Reeves, R. (1992). Chromatin changes during the cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* 4:413-23.

Reeves, R. y Nissen, M.S. (1990). The AT-DNA binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal protein. A novel peptide motif for recognizing DNA structure. *J Biol Chem* 265:8573-8582.

Reeves, R. y Nissen, M.S. (1995). Cell cycle regulation and functions of HMGI(Y). *Prog Cell Cycle Res* 1:339-349.

- Rice, P.A., Yang, S.W., Mizuuchi, K. y Nash, H.A. (1996). Crystal structure of an IHF-DNA complex: a protein-induced DNA U-turn. *Cell* 87:1295-1306
- van Rijn, P.A., van de Putte, P. y Goosen, N. (1991). Analysis of the IHF binding site in the regulatory region of bacteriophage Mu. *Nucl Acids Res* 19:2825-2834.
- Rothstein, S.J., Jorgensen, R.A., Yin, J.C.P., Young-Di, Z., Johnson, R.C. y Reznikoff, W.S. (1981). Genetic organization of Tn5. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 45:99-105
- Rouvière-Yaniv, J. y Gros, F. (1975). Characterization of a novel, low-molecular weight DNA-binding protein from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 72:3428-3432.
- Ruiz-Vázquez, R.M., Fontes, M. y Murillo, F.J. (1993). Clustering and co-ordinated activation of carotenoid genes in *Myxococcus xanthus* by blue light. *Mol Microbiol* 10:25-34.
- Ruiz-Vázquez, R.M. y Murillo, F.J. (1984). Abnormal motility and fruiting behavior of *Myxococcus xanthus* bacteriophage resistant strains induced by a clear plaque mutant of bacteriophage Mx8. *J Bacteriol* 160:818-821
- Sager, B. y Kaiser, D. (1993a). Two cell-density domains within the *Myxococcus xanthus* fruiting body. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:3690-3694
- Saitoh, Y. y Laemmli, U. (1994) Metaphase chromosome structure: bands arise from a differential folding path of the highly AT-rich scaffold. *Cell* 76: 609-622.
- Sakai, J.S., Kleckner, N., Yang, X. y Guhathakurta, A. (2000). Tn10 transpososome assembly involves a folded intermediate that must be unfolded for target capture and strand transfer. *EMBO J* 19(4):776-785.
- Sambrook, G., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York.
- Sandman, K., Pereira, S.L. y Reeve, J.N. (1998) Diversity of prokaryotic chromosomal proteins and the origin of the nucleosome. *Cell Mol Life Sci* 54: 1350-1364
- Scala, S., Portella, G., Fedele, M., Chiappetta, G. y Fusco, A. (2000). Adenovirus-mediated supresión of HMGI(Y) protein sintesis as potential therapy of human malignant neoplasias. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(8):4256-4261.
- Schmid, M.B. (1990). More than just "histone-like" proteins. *Cell* 63:451-453.

- Schröder, I., Darie, S. y Gunsalus, R.P. (1993). Activation of the *Escherichia coli* nitrate reductase (*narGHJf*) operon by NarL and Fnr requires integration host factor. *J Biol Chem* 268:771-774.
- Schwanbeck, R., Manfioletti, G. y Wisniewski, J.R. (2000). Architecture of high mobility group protein I-C-DNA complex and its perturbation upon phosphorylation by Cdc2 kinase. *J Biol Chem* 275:1793-1801.
- Selby, C.P. y Sancar, A. (1994). Mechanisms of transcription-repair coupling and mutation frequency decline. *Microbiol Rev* 58:317-329.
- Shang, C., Attema, J., Cakouros, D., Cockerill, P.N. y Shannon, M.F. (1999). Nuclear factor of activated T cells contributes to the function of the CD28 response region of the granulocyte macrophage stimulating factor promoter. *Int Immunol* 11(12):1945-1956.
- Shimkets, L.J. (1993). The Myxobacterial genome. In: Dworkin M, Kaiser D (eds) *Myxobacteria II*. American Society for Microbiology, Washington, pp 85-107.
- Shimkets, L.J. (1999). Intercellular Signaling During Fruiting-Body Development of *Myxococcus xanthus*. *Annu Rev Microbiol* 53:525-549.
- Shimkets, L.J. y Asher, S.J. (1988). Use of recombination techniques to examine the structure of the *csg* locus of *Myxococcus xanthus*. *Mol Gen Genet* 211:63-71.
- Shimkets, L.J., Gill, R.E. y Kaiser, D. (1983). Developmental cell interactions in *Myxococcus xanthus* and the *spoC* locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:1406-1410
- Shimkets, L.J. y Kaiser, D. (1982) Induction of coordinated cell movement in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* 97:1165-1168.
- Shimkets, L.J. y Rafiee, H. (1990). CsgA, an extracellular protein essential for *Myxococcus xanthus* development. *J Bacteriol* 172:5299-5306
- Short, J.M., Fernandez, J.M., Sorge, J.A. y Huse, W.D. (1988). Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with *in vivo* excision properties. *Nucleic Acids Res* 16(15):7583-600.
- Skalnik, D.G. y Neufeld, E.J. (1992). Sequence-specific binding of HMG-I(Y) to the proximal promoter of the *gp91-phox* gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 187(2):563-9.
- Skarstad, K., Baker, T.A. y Kornberg, A. (1990). Strand separation required for initiation of replication at the chromosomal origin of *Escherichia coli* is facilitated by a distant RNA-DNA hybrid. *EMBO J* 9:2341-2348

Skarstad, K. y Boye, E. (1994). The initiator protein DnaA: evolution, properties and function. *Biochem Biophys Acta* 1217:111-130

Slauch, J.M. y Silhavy, T.J. (1991). Cis-acting *ompF* mutations that result in *ompR* constitutive expression. *J Bacteriol* 173(13):4039-48.

Strick, R. y Laemmli, U.K. (1995). SARs are cis DNA elements of chromosome dynamics: synthesis of a SAR repressor protein. *Cell* 83:1137-1148

Tkachenko, A., Ashar, H.R., Meloni, A.M., Sandberg, A.A. y Chada, K.K. (1997). Misexpression of disrupted HMGI architectural factors activates alternative pathways of tumorigenesis. *Cancer Res* 57:2276-2280.

Thaxter, R. (1892). Contributions from the Cryptogamic Laboratory of Harvard University. XVIII. On the Myxobacteriaceae, a new order of Schizomycetes. *Bot Gaz* 14:389-406.

Thanos, D. y Maniatis, T. (1992). The high mobility group protein HMGI(Y) is required for NF- κ B dependent virus induction of the human IFN- β gene. *Cell* 71:777-789

Thanos, D. y Maniatis, T. (1995). Virus induction of human INF- β gene expression requires the assembly of an enhanceosome. *Cell* 83:1091-1100.

Thomas, J.O y Travers, A.A. (2001). HMG 1 and 2, and related "architectural" DNA-binding proteins. *TIBS* 26(3):167-174.

Tsui, P., Huang, L. y Freundlich, M. (1991). Integration host factor binds specifically to multiple sites in the *ompB* promoter of *Escherichia coli* and inhibits transcription. *J Bacteriol* 173:5800-5807

Wall, D., Kolenbrander, P. y Kaiser, D. (1998). The *Myxococcus xanthus pilQ* (*sglA*) gene encodes a secretin homolog required for type IV pilus biogenesis, social motility and development. *J Bacteriol* 181:24-33

Wang, D., Ray, P. y Boothby, M. (1995). Interleukin 4-inducible phosphorylation of HMGI(Y) is inhibited by Rapamycin. *J Biol Chem* 270:22924-22932.

Wang, Q. y Calvo, J.M. (1993). Lrp, a global regulatory protein of *Escherichia coli*, binds cooperatively to multiple sites and activates transcription of *ilvIH*. *J Mol Biol* 229:306-318.

Wang, Q., Jingcai, W., Friedberg, D., Platko, J. y Calvo, J.M. (1994). Regulation of the *Escherichia coli lrp* gene. *J Bacteriol* 176(7):1831-1839.

Weisberg, R.A., Freundlich, M., Friedman, D., Gardner, J., Goosen, N. y Nash, H. (1996). Nomenclature of the genes encoding IHF. *Mol Microbiol* 19:642.

Werner, M.H., Gronenborn, A.M. y Clore, G.M. (1996). Intercalation, DNA kinking, and the control of transcription. *Science* 271:778-784.

van de Wetering, M. y Clevers, H. (1992). Sequence-specific interaction of the HMG box proteins TCF-1 and SRY occurs within the minor groove of a Watson-Crick double helix. *EMBO J* 11:3039-3044.

White, S.W., Appelt, K., Wilson, K.S. y Tanaka, I. (1989) A protein structural motif that bends DNA. *Proteins* 56: 281-288.

Whitley, M.Z., Thanos, D., Read, M.A., Maniatis, T., Collins, T. (1994). A striking similarity in the organization of the E-selectin and beta interferon gene promoters. *Mol Cell Biol* 14:6464-6475

Willins, D.A., Ryan, C.V., Platko, J.V. y Calvo, J.M. (1991). Characterization of Lrp, an *Escherichia coli* regulatory protein that mediates a global response to leucine. *J Biol Chem* 266:10768-10774.

Yanofsky, C., Platt, T., Crawford, I.P., Michols, B.P., Christie, G.E., Horowitz, H. y vanCleemput, M. (1981). The complete nucleotide sequence of the tryptophan operon of *Escherichia coli*. *Nucleic Acid Res* 9:6647-6668

Yasuzawa, K., Hayashi, N., Goshima, N., Kohno, K., Imamoto, F. y Kano, Y. (1992). Histone-like proteins are required for cell growth and constraint of supercoils in DNA. *Gene* 122:9-15.

Yie, J., Liang, S., Merika, M. y Thanos, D. (1997). Intra- and intermolecular cooperative binding of High-Mobility-Group Protein I(Y) to the beta-Interferon Promoter. *Mol Cell Biol* 17:3649-3662

Yu, A. y Haggard-Ljungquist, E. (1993). Characterization of the binding sites of two proteins involved in the bacteriophage P2 site-specific recombination system. *J Bacteriol* 175(5):1239-1249.

Zhang, W., Muñoz-Dorado, J., Inouye, M. e Inouye, S. (1992). Identification of a putative eukaryotic-like protein kinase family in the developmental bacterium *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* 174:5450-5453

Zhao, K., Kas, E., González, E., Laemmli, U.K. (1993). SAR-dependent mobilization of histone H1 by HMGI(Y) in vitro: HMGI(Y) is enriched in H1-depleted chromatin. *EMBO J* 12:3237-3247.

Zlatanova, J. y van Holde, K. (1998) Binding to four-way junction DNA: a common property of architectural proteins?. *FASEB J* 12: 421-431

Zhou, X., Benson, H., Ashar, H.R. y Chada, K. (1995). Pygmy gene encodes HMGI-C, member of an embryonically expressed architectural factor family. *Nature* 376:771-774.

Zhou, X.J. y Chada, K. (1998). HMGI family proteins: architectural transcription factors in mammalian development and cancer *Keio J Med* 47:73-77.