

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



**BASES MOLECULARES DE LA REGULACIÓN
TRANSCRIPCIONAL DE LA RUTA DE DEGRADACIÓN DEL
ÁCIDO 3-HIDROXIFENILPROPIÓNICO EN *Escherichia coli***

TESIS DOCTORAL

ISABEL MARÍA MANSO COBOS

Madrid, 2009

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



**BASES MOLECULARES DE LA REGULACIÓN
TRANSCRIPCIONAL DE LA RUTA DE DEGRADACIÓN DEL
ÁCIDO 3-HIDROXIFENILPROPIÓNICO EN *Escherichia coli***

TESIS DOCTORAL
ISABEL MARÍA MANSO COBOS

DIRECTORES:
Dr. BEATRIZ GALÁN SICILIA
Dr. JOSÉ LUIS GARCÍA LÓPEZ

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

Madrid, 2009

Las teorías son redes que lanzamos para apresar aquello que llamamos “el mundo”: para racionalizarlo, explicarlo y dominarlo. Y tratamos de que la malla sea cada vez más fina.

Karl Popper (1902-1994).

La lógica de la investigación científica.

A mis padres y hermanos
A Andrés

Agradecimientos

Quisiera expresar mi agradecimiento a todas las personas que han colaborado en la realización de esta Tesis.

Quiero agradecer al Dr. José Luis García, por brindarme la oportunidad de entrar a formar parte de su laboratorio. Agradezco mucho su dirección, apoyo y dedicación. Quisiera expresar también mi agradecimiento a la Dra. Beatriz Galán, codirectora de esta Tesis. Ha sido un honor para mí ser su primera doctoranda. Gracias por haber estado siempre pendiente de mí y enseñarme, entre otras cosas, a trabajar en un laboratorio, diseñar experimentos, así como gran parte de las técnicas llevadas a cabo en este trabajo (ha sido para mí como haberlas aprendido en el Instituto Pasteur). Y gracias también por tu santa paciencia.

Me gustaría agradecer a la Dra. Margarita Menéndez el haberme acogido temporalmente en su laboratorio y enseñarme a utilizar el dicrógrafo, a manejar diversos programas de análisis de datos y a interpretar los resultados. Al Dr. José Manuel Andreu por enseñarme a utilizar el fluorímetro, por dirigir los ensayos de fluorescencia, analizar los datos y por estar siempre accesible. A los Dres. Jesús Sanz y Beatriz Maestro por modelar la proteína MhpR y por muchas más aportaciones que han enriquecido con creces este trabajo. A los Dres. Germán Rivas y Carlos Alfonso por realizar los ensayos de ultracentrifugación analítica; gracias por haber sido tan generosos conmigo. Al Dr. Fernando Díaz y Noemí Bustamante por haber realizado el experimento de SAXS con el correspondiente análisis de datos. A los Dres. Juan Hermoso y Celia Maya por haber intentado por todos los medios la cristalización de MhpR: la culpa fue de la proteína. Al Dr. Rafael Giraldo por sus sabios consejos y porque siempre tuvo tiempo para responder a mis preguntas.

Agradezco a los Dres. Auxi Prieto, Eduardo Díaz y Manuel Carmona por haber contribuido desinteresadamente en muchos aspectos de este trabajo. A los Dres. Pedro García, Ernesto García y Rubens López por el ánimo y buen trato que siempre he recibido de ellos.

A los que dejaron sus huellas en el CIB: Cristina M., Pepa, Cristina F., Patricia, Jose Ignacio, Valeria, Dani, Violeta, Irene y Merche. Me pregunto si se acordarán tanto de mí como yo de ellos...

Al mejor cocktail de promesas científicas que pueda existir dentro del CIB: en primer lugar, a Ana G., por haberse acordado de mí en muchas ocasiones y haberme animado aquel día a hacer la Tesis: gracias a ti hoy estoy aquí. A Miriam, Jose Y., María, Miri, Susana y Elisa (siento mucho no haber estado más cerca de vosotros durante todo este tiempo, ¡dichosas paredes!). A Tere (por enseñarme su guía de la A a la Z de cómo ser más práctica en la vida), Laura (¡por los momentos “palmeriles”!; sólo pido que algún día entierre el diccionario tarugo-español), Juan (por haberme ayudado en muchas ocasiones; ha sido un honor haber estado en los primeros puestos de tu lista top-ten), Gonn (porque hablar contigo es terminar riendo y perder la vergüenza), Blas (porque contigo la wikipedia es otra), Iria y Jose R. (por ser la combinación perfecta del 344), Virginia, Isabel F., Nina, Javier y Andrés (con decir que siento no haber hecho la Tesis desde el principio con vosotros ya es suficiente).

A las técnicas de laboratorio, Elo, Ana y Valle, porque sin su colaboración y eficacia nada sería igual. A todo el personal de servicios comunes del centro, en especial, al servicio de secuenciación, química de proteínas y radiactividad.

A los vecinos del 343: Juan, Ana María, Eli y Luque. A Tere, Viky, Julio y David del laboratorio del Dr. Julián Perera. Siempre recordaré los buenos ratos vividos con vosotros, ¡lástima que no fueran más!.

Gracias a Susana y Mauro por haberme acogido en su casa durante mi estancia en Madrid y haberme hecho sentir como parte de la familia. Lamento no haber adquirido ni un ápice de vuestro acento argentino ni haber aprendido italiano. Convivir con vosotros ha sido demasiado fácil. Siempre os recordaré.

A Esmeralda y Minerva, sencillamente por ser tan especiales.

A mis padres y hermanos, gracias por vuestro cariño, interés y comprensión durante todo este tiempo, os quiero mucho. En especial, a mi tía Angelita, porque siempre se alegró de que una de sus “sobris” siguiera sus pasos.

Gracias de todo corazón a Andrés por estar siempre ahí y haberme apoyado en todo momento. Siempre te tengo presente.

Todos juntos me habéis hecho disfrutar mucho de este viaje tan inolvidable.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
1. Biodegradación de compuestos aromáticos en <i>Escherichia coli</i> .	1
1.1. Rutas de degradación de compuestos aromáticos en <i>E. coli</i> .	1
1.2. Regulación de las rutas catabólicas de compuestos aromáticos de <i>E. coli</i>	3
1.2.1. Reguladores específicos que controlan el catabolismo de compuestos aromáticos en <i>E. coli</i> .	4
1.2.2. Regulación global de las rutas de degradación de compuestos aromáticos en <i>E. coli</i> .	5
1.3. Proteínas de transporte de compuestos aromáticos en <i>E. coli</i> : La permeasa MhpT.	9
2. Degradación de 3HPP y 3HCl en <i>E. coli</i> K-12.	10
2.1. Ruta de degradación de 3HPP y 3HCl en <i>E. coli</i> K-12.	10
2.2. Regulación de la ruta de degradación de 3HPP/3HCl.	13
2.2.1. Regulación específica.	13
2.2.2. Regulación global.	17
3. Degradación de PP/CI en <i>E. coli</i> .	18
3.1. Ruta de degradación de PP/CI en <i>E. coli</i> .	18
3.2. Regulación de la ruta de degradación de PP/CI en <i>E. coli</i> .	20
3.2.1. Regulación específica.	20
3.2.2. Regulación global.	21
II. OBJETIVOS.	22
III. MATERIALES Y MÉTODOS.	24
1. Cepas bacterianas y plásmidos.	24
2. Medios y condiciones de cultivo.	27
3. Transformación de células de <i>E. coli</i> .	28
4. Transferencia de plásmidos por conjugación.	28
5. Técnicas de manipulación de DNA.	28
5.1. Aislamiento de DNA plasmídico.	28
5.2. Reacción de amplificación en cadena con DNA polimerasa	29

termorresistente (PCR).	
5.3. Secuenciación de DNA.	30
5.4. Análisis de los datos de secuencia.	31
5.5. Mutagénesis al azar del gen <i>mhpR</i> .	31
5.6. Mutagénesis dirigida del gen <i>mhpR</i> .	31
5.7. Mutagénesis dirigida del gen <i>mhpR-His</i> .	32
6. Técnicas de manipulación de RNA.	33
6.1. Extracción de RNA.	33
6.2. Retrotranscripción seguida de reacción de PCR (RT-PCR).	33
6.3. Técnica de <i>primer extension</i> o extensión con cebador.	34
7. Técnicas de manipulación de proteínas.	36
7.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE).	36
7.2. Obtención de anticuerpos anti-MhpR.	36
7.3. Obtención de extractos celulares.	37
7.4. Técnica de Western blot.	37
7.5. Sobreproducción y purificación de las proteínas MhpR-His nativa y mutantes.	38
7.6. Purificación de la proteína CRP.	39
7.7. Ensayo de actividad β -galactosidasa.	40
7.8. Ultracentrifugación analítica.	40
7.9. Ensayos de fluorescencia.	41
7.10. Dicroísmo circular (CD).	42
7.11. Modelado tridimensional de MhpR.	42
7.12. Modelado de la estructura tridimensional de la proteína MhpR-His en solución mediante SAXS (<i>small angle X-ray scattering</i>).	43
8. Ensayos de unión DNA-proteína.	44
8.1. Marcaje de sondas con ^{32}P .	44
8.2. Ensayos de retardo en gel.	45
8.3. Ensayos de protección frente a la digestión con DNasa I (<i>footprinting</i>).	46
8.4. Ensayo de <i>footprinting</i> con permanganato potásico (KMnO_4).	46
8.5. Ensayos de transcripción <i>in vitro</i> .	47
IV. RESULTADOS.	49

1. Estudio de la regulación específica del <i>cluster mhp</i> .	49
1.1. Clonación e hiperproducción de la proteína MhpR-His.	49
1.2. Purificación de la proteína MhpR-His.	51
1.3. Estudio de la interacción de la proteína MhpR-His con la región intergénica <i>mhpR-mhpA</i> .	52
1.4. Análisis biofísico de la proteína MhpR-His mediante ultracentrifugación analítica.	53
1.5. Análisis <i>in vitro</i> de la función de MhpR-His sobre la transcripción mediada por <i>Pa</i> .	56
1.6. Modelado de la estructura tridimensional de MhpR.	57
1.7. Sitio de unión a ligando de la proteína MhpR.	62
1.8. Modelo de SAXS de MhpR.	65
1.9. Estudios de interacción proteína-ligando.	67
1.9.1. Estudio de la interacción MhpR-His-ligando mediante espectroscopía de fluorescencia.	67
1.9.2. Estudio de la interacción MhpR-His-ligando mediante dicroísmo circular.	73
2. Estudio de la regulación global del <i>cluster mhp</i> .	76
2.1. Purificación de la proteína CRP mediante cromatografía de afinidad.	76
2.2. Análisis <i>in vitro</i> del papel de CRP en la transcripción de <i>Pa</i> .	77
2.2.1. Análisis del papel de CRP en la transcripción de <i>Pa</i> mediante RT-PCR.	77
2.2.2. Análisis del papel de CRP en la transcripción de <i>Pa</i> mediante ensayos de transcripción <i>in vitro</i> .	78
2.3. Estudios sobre la represión catabólica del gen <i>mhpR</i> .	80
2.3.1. Estudios <i>in vivo</i> sobre la represión catabólica del gen <i>mhpR</i> .	80
2.3.2. Estudios <i>in vitro</i> sobre la represión catabólica del gen <i>mhpR</i> .	81
2.3.3. Determinación del sitio de iniciación de la transcripción.	82
2.3.4. Estudios <i>in vitro</i> de la interacción de la proteína CRP con la región promotora <i>Pr</i> .	83
2.3.5. Influencia de CRP sobre la formación del complejo abierto en el promotor <i>Pr</i> .	86

2.3.6. Análisis <i>in vitro</i> del papel de CRP en la transcripción de <i>Pr</i> .	88
3. Análisis del efecto sinérgico del PP en la activación de MhpR.	89
3.1. Obtención de la cepa de <i>E. coli</i> ED1061::AL.	90
3.2. Análisis <i>in vivo</i> del efecto sinérgico de PP en la activación de MhpR.	91
3.3. Análisis <i>in vitro</i> del efecto sinérgico de PP en la activación de MhpR.	92
3.4. Estudio del efecto del PP sobre la proteína MhpR-His.	95
3.4.1. Estudio del efecto del PP sobre la proteína MhpR-His mediante espectroscopía de fluorescencia.	95
3.4.2. Estudio del efecto del PP sobre la proteína MhpR-His mediante dicroísmo circular.	100
4. Análisis del efecto de la mutación de MhpR en su función.	102
4.1. Obtención de mutantes MhpR mediante mutagénesis al azar.	102
4.2. Estudios <i>in vivo</i> de la capacidad de activación de las proteínas MhpR mutantes.	107
4.3. Efecto sinérgico del PP sobre la inducción del promotor <i>Pa</i> mediada por las proteínas MhpR mutantes.	109
4.4. Solubilidad de las proteínas MhpR mutantes dentro de la célula bacteriana.	111
4.5. Localización de las mutaciones en el modelo tridimensional de MhpR.	113
4.6. Mutagénesis dirigida del gen <i>mhpR-His</i> .	117
4.7. Purificación de las proteínas MhpR-His mutantes.	117
4.8. Estudio de la interacción de las proteínas MhpR-His mutantes con el promotor <i>Pa</i> .	118
4.9. Caracterización de las proteínas MhpR-HisQ252R y MhpR-HisV272A.	120
4.9.1. Estudio <i>in vitro</i> de la capacidad inductora de la transcripción de las proteínas MhpR-HisQ252R y MhpR-HisV272A.	120
4.9.2. Análisis del efecto sinérgico ejercido por CRP sobre la activación transcripcional mediada por las proteínas MhpR-HisQ252R y MhpR-HisV272A.	123

4.9.3. Estudio de la interacción entre las proteínas MhpR-His mutantes y sus efectores mediante espectroscopía de fluorescencia.	125
4.9.4. Estudio de la interacción entre las proteínas MhpR-His mutantes y sus efectores mediante dicroísmo circular.	127
4.9.5. Análisis del cambio conformacional inducido por las sustituciones Q240R y V260A en la proteína MhpR.	132
5. Estudio de la proteína transportadora de 3HPP/3HCl.	133
5.1. Estudio de la expresión del gen <i>mhpT</i> .	133
5.2. Estudio del papel de la proteína transportadora MhpT.	136
5.2.1. Construcción de la cepa MG1655mhpTΔ.	136
5.2.2. Estudio del efecto de la mutación del gen <i>mhpT</i> en <i>E. coli</i> MG1655.	139
V. DISCUSIÓN.	141
1. Estudio del regulador MhpR.	141
2. Modelo de la estructura tridimensional de MhpR.	145
3. Estudio del efecto sinérgico del PP.	148
4. Análisis de la regulación global del <i>cluster mhp</i> .	151
4.1. Estudio del papel de CRP en la transcripción de <i>Pa</i> .	151
4.2. Estudio del papel de CRP en la transcripción de <i>Pr</i> .	152
5. Modelo de regulación de los genes <i>mhp</i> de <i>E. coli</i> K-12.	154
6. Relaciones estructura-función del regulador MhpR.	157
7. Estudio de la proteína transportadora MhpT.	162
VI. CONCLUSIONES.	165
VII. BIBLIOGRAFÍA.	167

ABREVIATURAS

- 3HCl**: ácido 3-hidroxicinámico
3HPA: ácido 3-hidroxifenilacético
3HPP: ácido 3-hidroxifenilpropiónico
4HPA: ácido 4-hidroxifenilacético
A: adenina
aa: aminoácido(s)
Ap^r: resistencia a ampicilina
ATP: adenosina trifosfato
BIMES: *Bacterial interspersed mosaic elements*
BSA: seroalbúmina bovina
C: citosina
°C: grado centígrado
C-terminal: carboxilo terminal
cAMP: adenosina monofosfato cíclico
CD: dicroísmo circular (*Circular dichroism*)
cDNA: ADN complementario
Ci: curio
CI: ácido cinámico
Cm^r: resistencia a cloranfenicol
CoA: Coenzima A
cpm: cuentas por minuto
CRP: proteína receptora de cAMP (*cAMP receptor protein*)
CTP: citidina trifosfato
D_{max}: diámetro máximo
Da: Dalton
dATP: desoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP: desoxicitidina 5'-trifosfato
DEPC: dietilpirocarbonato
dGTP: desoxiguanosina 5'-trifosfato
DHCl: ácido 2,3-dihidroxicinámico
DHPP: ácido 2,3-dihidroxifenilpropiónico
DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico
dNTP: desoxinucleótido trifosfato
DO₆₀₀: densidad óptica medida a 600 nm
DTT: ditioneitol
dTTP: desoxitimidina 5'-trifosfato
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
F: fluorescencia
F_{min}: fluorescencia mínima
G: guanina
GTP: guanosina trifosfato
h: hora
His₆: secuencia de aminoácidos compuesta por 6 histidinas
HK₂NA: ácido 2-hidroxi-6-ceto-nona-2,4-dieno-1,9 dioico
HK₂NTA: ácido 2-hidroxi-6-ceto-nona-2,4,7-trieno 1,9 dioico
HK₄P: ácido 4-hidroxi-2-cetopentanoico
HP₂DA: ácido 2-hidroxi-penta-2,4 dienoico
HTH: motivo hélice-giro-hélice
IHF: factor de integración del huésped (*integration host factor*)
IPTG: isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
kb: 1000 pares de bases
K_b: constante de asociación
K_d: constante de disociación aparente
kDa: 1000 Dalton
Km^r: resistencia a kanamicina
L: litro
[L]_F: concentración de ligando libre
LB: medio Luria-Bertani
M63: medio mínimo M63
MFS: superfamilia de facilitadores transmembrana (*Major facilitator superfamily*)
min: minuto
ml: mililitro
mM: milimolar
n: nucleótido
N-terminal: amino terminal

NAD: nicotinamida-adenina-dinucleótido
NADH: nicotinamida-adenina-dinucleótido reducido
NCBI: *National Center for Biotechnology Information*
nm: nanómetro
p/v: relación peso/volumen
P(r): función de distribución de distancias entre pares de átomos
PA: ácido fenilacético
PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida
pb: pares de bases
PCR: reacción de amplificación en cadena con DNA polimerasa termorresistente
PDB: *Protein Data Bank*
PP: ácido 3-fenilpropiónico
R_g: radio de giro
RBS: secuencia de unión a ribosoma
Rif^r: resistencia a rifampicina
RNA: ácido ribonucleico
RNA1: RNA control
rpm: revoluciones por minuto
RT-PCR: reacción de retrotranscripción acoplada a PCR
σ: factor sigma de la RNA polimerasa
SDS: dodecilsulfato sódico
Sm^r: resistencia a estreptomicina
Sp^r: resistencia a espectinomicina
T: timina
T_m: temperatura de fusión o desnaturalización
TBE: tampón Tris-borato-EDTA
TE: tampón Tris-EDTA
TLC: cromatografía en capa fina
Tris: tri(hidroximetil)aminometano
U: unidad de actividad enzimática
UTP: uridina trifosfato
UV: ultravioleta
v/v: relación volumen-volumen
X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido

I. INTRODUCCIÓN

1. Biodegradación de compuestos aromáticos en *Escherichia coli*.

Escherichia coli es un microorganismo paradigmático desde el punto de vista genético y bioquímico. Puede ser comensal del intestino de animales de sangre caliente, así como patógeno de los sistemas digestivo, urinario, pulmonar y nervioso (Savage, 1977; Peekhaus y Conway, 1998; Prieto *et al.*, 2004). *E. coli* puede colonizar fácilmente diferentes hábitats extracorpóreos tales como el suelo o el agua, e incluso se ha encontrado dentro de protozoos (Neidhardt, 1996; Barker *et al.*, 1999; Prieto *et al.*, 2004). De hecho, es un microorganismo muy adaptable que dispone de un amplio repertorio de genes metabólicos y reguladores que posibilitan la colonización de una gran variedad de ambientes aeróbicos y anaeróbicos (Neidhardt, 1996; Dougan *et al.*, 2001; Prieto *et al.*, 2004).

Los compuestos aromáticos constituyen el segundo grupo de compuestos orgánicos más ampliamente distribuido en la naturaleza. Aunque algunos de estos compuestos son recalcitrantes o tóxicos para la gran mayoría de microorganismos, las bacterias han desarrollado una maquinaria genética y bioquímica que les permite utilizar los compuestos aromáticos como única fuente de carbono y energía (Widdel y Rabus, 2001; Lovley, 2003). Los compuestos aromáticos constituyen una fuente de carbono para *E. coli* en su hábitat extraintestinal. Aunque aún se desconoce el conjunto de sustratos que *E. coli* encuentra en el intestino grueso y las rutas que le confieren una ventaja metabólica para competir con otras bacterias con las que comparte el mismo hábitat, es probable que los compuestos aromáticos presentes en el intestino animal sean también una fuente de carbono frecuente para *E. coli* (Díaz *et al.*, 2001; Prieto *et al.*, 2004).

1.1. Rutas de degradación de compuestos aromáticos en *E. coli*.

Todas las estirpes de *E. coli* ensayadas hasta la fecha crecen utilizando como únicas fuentes de carbono y energía compuestos aromáticos como son: el ácido 3-fenilpropiónico (PP), el ácido 3-(3-hidroxifenil)propiónico (3HPP) o el ácido 3-hidroxicinámico (3HCI) (Tabla 1). La estirpe K-12 puede catabolizar además ácido fenilacético (PA) pero no sus derivados 3-hidroxifenilacético (3HPA) y 4-hidroxifenilacético (4HPA) (Tabla 1), a diferencia de las estirpes B y C que pueden metabolizar estos últimos pero no PA (Tabla 1). La estirpe W puede degradar tanto PA

como sus derivados hidroxilados, así como otros derivados aromáticos, por lo que parece estar especialmente capacitada para la mineralización de este tipo de compuestos (Tabla 1) (Burlingame y Chapman, 1983; Díaz *et al.*, 2001). Ninguna de las cepas ensayadas hasta la fecha ha sido capaz de degradar 2-hidroxifenilacético (2HPA), ácido cinámico (CI) y sus derivados hidroxilados en posiciones 2 ó 4, ni los derivados hidroxilados de PP en posiciones 2 ó 4 (Burlingame y Chapman, 1983; Prieto *et al.*, 2004).

Tabla 1. Compuestos aromáticos degradados por distintas estirpes de *E. coli* (modificado de Burlingame y Chapman, 1983).

Compuesto	Estirpe			
	B	C	W	K-12
Ácido fenilacético (PA)	-	-	+	+ ^a
Ácido 3-hidroxifenilacético (3HPA)	+	+	+	-
Ácido 4-hidroxifenilacético (4HPA)	+	+	+	-
Ácido 3-fenilpropiónico (PP)	+	+	+	+
Ácido 3-(3-hidroxifenil)propiónico (3HPP)	+	+	+	+
Ácido 3-hidroxicinámico (3HCI)	+	+	+	+

^aAlgunas cepas de *E. coli* K-12, tales como DH5 α , HB101, JM109, CC118 y DH1 no metabolizan el PA.

Se han caracterizado molecularmente los *clusters* génicos responsables de la degradación de 4HPA y 3HPA (*cluster hpa*) (Prieto *et al.*, 1996), 3HPP y 3HCI (*cluster mhp*) (Ferrández *et al.*, 1997a), PP (*cluster hca*) (Díaz *et al.*, 1998; Turlin *et al.*, 2001), PA (*cluster paa*) (Ferrández *et al.*, 1998) y de algunas aminas aromáticas (*cluster mao*) (Yamashita *et al.*, 1996; Ferrández *et al.*, 1997b). La figura 1 muestra los *clusters* génicos que codifican las rutas responsables del catabolismo de compuestos aromáticos y su localización en el cromosoma de *E. coli*. También se representan los mecanismos reguladores de la expresión de estas rutas (ver más adelante).

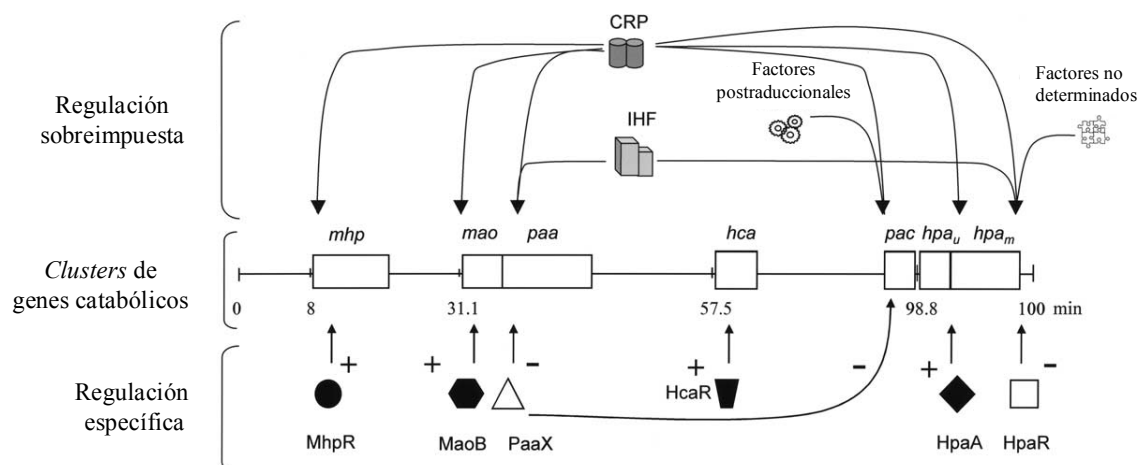


Figura 1. Esquema de los clusters génicos que codifican las rutas catabólicas responsables de la degradación aeróbica de compuestos aromáticos en *E. coli*. Los clusters génicos *mhp*, *mao*, *paa*, *hca*, *hpa_u* (*hpa-upper cluster*) y *hpa_m* (*hpa-meta cluster*) y el gen *pac* que codifica la pencilina G acilasa se representan en bloques blancos. Se indica la localización de los clusters en el cromosoma de *E. coli* K-12 (el cluster *hpa* y el gen *pac* están presentes en el cromosoma de *E. coli* W y ausentes en el de *E. coli* K-12). Los elementos reguladores globales implicados en los sistemas de regulación sobreimpuesta se indican en la parte superior de la figura. CRP, proteína receptora de cAMP; IHF, factor de integración del huésped. Las proteínas reguladoras específicas están representadas en la parte inferior de la figura: activadores transcripcionales (en símbolos rellenos) y represores transcripcionales (en símbolos vacíos). Los signos + y – significan activación y represión, respectivamente.

1.2. Regulación de las rutas catabólicas de compuestos aromáticos de *E. coli*.

Tanto como bacteria hospedador-dependiente como organismo de vida libre, *E. coli* se enfrenta a fluctuaciones en la disponibilidad de nutrientes y, por tanto, los genes implicados en la maquinaria catabólica están sometidos a varios tipos de controles fisiológicos que ajustan sus niveles de expresión a las condiciones ambientales (Galán *et al.*, 2001; Prieto *et al.*, 2004). Las proteínas reguladoras específicas y los promotores que ellas regulan son los elementos principales que permiten la transcripción de operones catabólicos sólo cuando se requieren y a unos niveles que garanticen un adecuado recambio metabólico cuando el sustrato es abundante y puede servir como nutriente (Figs. 1 y 2). Además, existen circuitos reguladores globales que se superponen a los mecanismos de regulación específicos que le permiten dar una respuesta metabólica adecuada a la presencia del sustrato específico de manera coordinada con los estados metabólico y fisiológico de la bacteria en cada momento (Díaz y Prieto, 2000; Cases y de Lorenzo, 2001; Prieto *et al.*, 2004) (Figs. 1 y 2).

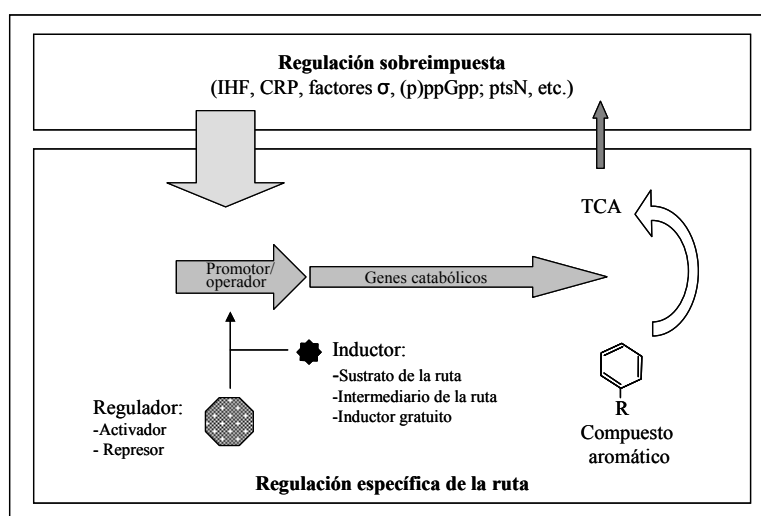


Figura 2. Esquema de los dos niveles de regulación transcripcional de las rutas catabólicas de compuestos aromáticos en bacterias. La pareja regulador-promotor es el elemento clave para la regulación específica. El regulador se une a la región operadora del promotor catabólico y, en presencia de la molécula inductora, permite la expresión de los genes catabólicos. La molécula inductora o efector puede ser el sustrato de la ruta y/o un intermediario de esta. El regulador puede actuar como un activador de la transcripción o como un represor en ausencia de inductor. Un segundo nivel de control es la regulación global o sobreimpuesta, mediada por factores de transcripción como IHF (*integration host factor*), CRP (*cAMP Receptor Protein*), factores sigma (σ) alternativos de la RNA polimerasa, etc.

1.2.1. Reguladores específicos que controlan el catabolismo de compuestos aromáticos en *E. coli*.

En la regulación específica de las rutas catabólicas de compuestos aromáticos descritas en *E. coli* participan cuatro activadores transcripcionales (HpaA, MaoB, MhpR y HcaR) y tres represores transcripcionales (HpaR, su homólogo HpcR, y PaaX) (Tabla 2). Todas estas proteínas tienen su propia molécula efectora. Además, su estructura primaria y, particularmente, sus motivos de reconocimiento de DNA difieren entre ellos, y por ello estas proteínas reguladoras pertenecen a diferentes familias de proteínas reguladoras, a excepción de HpaA y MaoB, que pertenecen a la misma familia. Estos hechos explican la gran diversidad y evolución divergente que existe en los sistemas reguladores que controlan el catabolismo de compuestos aromáticos en *E. coli* (Díaz *et al.*, 2001; Prieto *et al.*, 2004; Tropel y van der Meer, 2004).

Tabla 2. Proteínas reguladoras de rutas catabólicas de compuestos aromáticos en *E. coli*.

Regulador	Familia	Cepa	Actividad	Ruta	Número de acceso
HcaR	LysR	<i>E. coli</i> K-12	Activador	PP	Q47141
HpaA	XylS/AraC	<i>E. coli</i> W	Activador	4HPA	Z37980
HpaR	MarR	<i>E. coli</i> W	Represor	Homoprotocatecuato	Z37980
HpcR	MarR	<i>E. coli</i> C	Represor	Homoprotocatecuato	S30280
MaoB	XylS/AraC	<i>E. coli</i> K-12	Activador	Tiramina	BAA11058
MhpR	IclR	<i>E. coli</i> K-12	Activador	3HPP	P77569
PaaX	GntR	<i>E. coli</i> W	Represor	PA	CAA66101

La organización en dominios de las diferentes familias de reguladores transcripcionales de rutas catabólicas de compuestos aromáticos se muestra en la figura 3. El dominio de unión a DNA puede localizarse en el extremo N-terminal (reguladores pertenecientes a las familias LysR, IclR y GntR), en el extremo C-terminal (reguladores

de la familia XylS/AraC) o en una posición central (reguladores de la familia MarR) (Fig. 3) (modificado de Tropel y van der Meer, 2004).

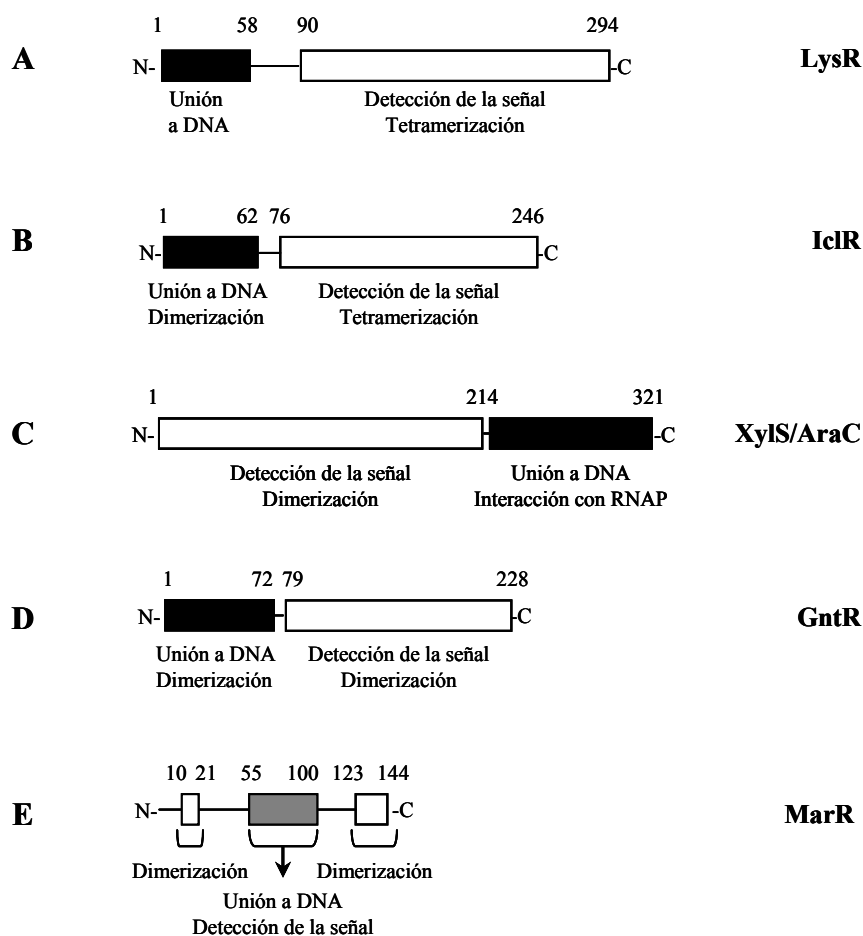


Figura 3. Representación esquemática de la organización en dominios de las diferentes familias de reguladores. El dominio que contiene el motivo HTH de unión a DNA se indica en negro. El dominio de unión del efector se indica en blanco. El dominio implicado en la unión a DNA y en la detección de la señal se muestra en color gris.

1.2.2. Regulación global de las rutas de degradación de compuestos aromáticos en *E. coli*.

En general, la regulación de la transcripción no sólo depende de la actuación de un regulador específico que responde a una señal externa, ya que también es muy importante la actuación de mecanismos globales que conectan la actividad de promotores individuales con el estado metabólico de la célula (Díaz y Prieto, 2000; Cases y de Lorenzo, 2001). Esta regulación sobreimpuesta está mediada por factores o reguladores globales tales como factores σ alternativos de la RNA polimerasa, y

reguladores globales como por ejemplo las proteínas CRP (*cAMP Receptor Protein*), IHF (*Integration Host Factor*), FIS (*Factor for Inversion Stimulation*), o H-NS (*Histone like Nucleoid-Structuring Protein*) (revisado en Cases y de Lorenzo, 1998 y en Cases y de Lorenzo, 2001).

Cuando las bacterias se enfrentan a una mezcla de nutrientes, son capaces de utilizar preferentemente aquella que favorece un mayor rendimiento energético. La represión catabólica es el mecanismo por el cual la expresión de genes que se requieren para la utilización de fuentes de carbono secundarias es anulada por la presencia de sustratos más preferibles (Dworkin y Losick, 2001). Así, las bacterias que crecen en un medio compuesto por dos azúcares, siendo uno de ellos glucosa, muestran un crecimiento diáuxico (o en dos pasos) debido a que la presencia de glucosa en el medio de cultivo impide la utilización de cualquier otro azúcar (Kimata *et al.*, 1997). La denominación original de represión catabólica se debe a Magasanik (1961) que sugirió que la utilización de glucosa producía niveles muy altos de catabolitos intermedios, que causaban la represión de enzimas catabólicas inducibles. Más adelante los primeros estudios sobre el cAMP establecieron que los niveles de este compuesto respondían a la presencia o ausencia de glucosa en el medio de cultivo (Makman y Sutherland, 1965). Posteriormente la identificación de la proteína reguladora CRP (dímero de 45 kDa) y la utilización de mutantes defectivos en *crp* y *cya* sirvieron para establecer el concepto de que CRP, actuando conjuntamente con el cAMP, permite el acoplamiento entre la expresión de operones catabólicos y la presencia de glucosa en el medio (Botsford y Harman, 1992; Crasnier, 1996; Kolb *et al.*, 1993; Pastan y Adhya, 1976).

Diversos estudios permitieron establecer que el efecto inhibitorio de la glucosa, también denominado “efecto glucosa”, no es debido únicamente al complejo cAMP-CRP, sino que también depende de un mecanismo llamado “exclusión del inductor”, por el cual se inhibe el transportador específico del azúcar menos favorable, por ejemplo la lactosa (Stülke y Hillen, 1999). También se determinó que el efecto glucosa dependía directamente del sistema de fosfotransferasas dependientes de fosfoenolpiruvato (PTS, *phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase transport system*), el cual coordina y modula no sólo el efecto debido al complejo cAMP-CRP sino también el efecto de la exclusión del inductor (Postma *et al.*, 1993; Inada *et al.*, 1996). La misión principal de este mecanismo es que las fuentes de carbono alternativas que puedan existir en el medio permanezcan en el exterior celular evitando así que otros operones catabólicos se

puedan inducir. Todo esto constituye un ejemplo de cómo *E. coli* es capaz de detectar mediante un sistema de transporte de nutrientes la presencia o ausencia de azúcares, y de transducir la señal a un segundo mensajero (cAMP) que interacciona directamente con una proteína reguladora (CRP).

En el caso del metabolismo de compuestos aromáticos de *E. coli* se ha descrito el fenómeno de “represión catabólica” (Yamashita *et al.*, 1996; Prieto y García, 1997a; Díaz y Prieto, 2000; Ferrández *et al.*, 2000). Por ejemplo, se ha observado el efecto de represión catabólica en la expresión de *maoB*, regulador transcripcional en el catabolismo de aminas aromáticas. Mediante el uso de un mutante *crp⁻* y *cya⁻* de *E. coli* que contiene la fusión *maoB::lacZ* se ha demostrado que esta represión catabólica por glucosa está mediada por el complejo cAMP-CRP en el promotor *P_{maoB}*, el cual contiene un posible sitio de interacción con CRP (Yamashita *et al.*, 1996).

La regulación transcripcional sobreimpuesta del operón *meta-hpa* del catabolismo de homoprotocatecuato es la mejor estudiada dentro de los sistemas de regulación que controlan la rutas catabólicas de aromáticos en *E. coli* (Galán *et al.*, 2001). Cuando las células de *E. coli* crecen en un medio que contiene glucosa y 4HPA la expresión de los genes catabólicos *hpa* mediada por el promotor *Pg* se reprime hasta que las células alcanzan la fase estacionaria tardía de su crecimiento. Sin embargo, cuando utilizan como fuente de carbono el acetato o el glicerol, la expresión de los genes *hpa* es máxima durante la fase exponencial de crecimiento (Galán *et al.*, 2001). La expresión del promotor *Pg* está controlada por un mecanismo de represión catabólica estricto mediado por CRP e IHF (Galán *et al.*, 2001). Cuando las células crecen rápidamente en glucosa, producen acetato a través de la ruta de la fosfotransacetilasa-acetato quinasa (ruta Pta-AcK), que es secretado al medio de cultivo. Durante la transición a la fase estacionaria, después de consumir la glucosa, las células reabsorben el acetato externo y lo activan a acetil-CoA por medio de la acetil-CoA sintetasa (ruta Acs), generando energía y componentes biosintéticos a través del ciclo de los ácidos tricarbónicos y del ciclo del glioxilato, respectivamente (Kumari *et al.*, 2000). En el caso del sistema regulador de los genes *hpa*, el acetato excretado en la fase estacionaria actúa como un metabolito que puede proveer la energía para producir cAMP y adaptar rápidamente las células a la utilización de una fuente de carbono nueva menos favorable como son los compuestos aromáticos (Galán *et al.*, 2001). Por tanto, la activación rápida del promotor *Pg* en la fase estacionaria de crecimiento de *E. coli* W no depende

solamente de la reducción de la cantidad de glucosa en el medio de cultivo, sino también del acetato excretado y acumulado en el medio de cultivo (Galán *et al.*, 2001). La estrategia de reutilizar el acetato excretado como energía para las células proporciona una ventaja cuando las fuentes de carbono más favorables son escasas y la bacteria necesita hacer frente con fuentes de carbono menos favorables a través de rutas que han sido adquiridas durante la evolución para situaciones de hambre. Aunque después de consumir la glucosa, las células puedan utilizar 4HPA como única fuente de carbono y de energía, este proceso adaptativo puede requerir un largo período de tiempo cuando la concentración de 4HPA en el medio es baja. Para reducir la duración del proceso de adaptación y, por tanto, aumentar la posibilidad de sobrevivir bajo condiciones ambientales críticas, las células pueden reutilizar el acetato secretado para obtener la energía necesaria y adaptarse rápidamente al catabolismo de 4HPA (Galán *et al.*, 2001). Recientemente se ha demostrado que además la expresión del promotor *Pg* se reprime cuando las células son cultivadas en medio LB y se encuentran en la fase exponencial de crecimiento. En este proceso de represión está implicada la proteína FIS, que es capaz de reconocer *in vitro* varias secuencias operadoras dentro del promotor *Pg*. Mediante ensayos de retardo en gel se ha demostrado que la proteína FIS compete eficientemente con la proteína CRP para unirse al promotor *Pg* (Galán *et al.*, 2008).

En la regulación de los genes *paa*, responsables de la degradación del PA, CRP actúa como un activador de la expresión génica dirigida desde los promotores *P_a* y *P_z*. En el promotor *P_a* existe un sitio conservado para la interacción con CRP centrado en la posición -61,5. Aunque la proteína CRP es también necesaria para la activación del promotor divergente *P_z*, mediante ensayos de retardo en gel no se ha detectado unión de CRP, lo que sugiere que la unión de CRP a *P_a* es capaz de activar también al promotor divergente *P_z*. La proteína IHF también se une a la región intergénica *paaZ-paaA* y estimula la transcripción a partir de los promotores *P_a* y *P_z* (Ferrández *et al.*, 2000).

La regulación global de los genes *mhp* y *hca* responsables del catabolismo de 3HPP y PP, respectivamente, se expone más adelante (apartados 2.2.2 y 3.2.2 de la Introducción).

La represión catabólica mediada por CRP no es un mecanismo universal y así diversos estudios han puesto de manifiesto la existencia de la proteína Cra (*Catabolite Repressor/Activator*), un regulador pleiotrópico que regula la utilización de muchas fuentes de carbono (Saier, 1997). En otros microorganismos como *Pseudomonas*, la presencia de un ácido orgánico, como el lactato o un intermediario del ciclo de Krebs,

inhibe la expresión de rutas catabólicas de compuestos aromáticos como el benceno, estireno, anilina, protocatecuato, fenol, tolueno y compuestos cloroaromáticos mediante un mecanismo independiente de cAMP-CRP (Díaz y Prieto, 2000). Se conocen hasta cinco proteínas implicadas en la represión catabólica en *P. putida*, como son: Crc (Hester *et al.*, 2000; Morales *et al.*, 2004; Rojo y Dinamarca, 2004), CRP (Vfr en *P. aeruginosa*) (West *et al.*, 1994; Suh, *et al.*, 2002), CyoB (Dinamarca *et al.*, 2002; Petruschka *et al.*, 2001), RelA (Sze y Shingler, 1999; Jishage *et al.*, 2002), y el sistema PTS (Cases *et al.*, 1999; Aranda-Olmedo *et al.*, 2005).

1.3. Proteínas de transporte de compuestos aromáticos en *E. coli*: La permeasa MhpT.

Aunque los compuestos aromáticos, y en particular los ácidos aromáticos débilmente lipofílicos, pueden entrar dentro de las células por difusión pasiva cuando están presentes a altas concentraciones (milimolar), el transporte activo aumenta la eficiencia y el nivel de adquisición de sustrato y por tanto puede proporcionar una ventaja en el crecimiento en ambientes naturales, donde estos compuestos se presentan a bajas concentraciones (micromolares) (Nichols y Harwood, 1997).

Además de la permeasa de triptófano (TnaB), implicada en el catabolismo del triptófano, se han caracterizado en *E. coli* dos permeasas para la incorporación de 4HPA/3HPA (HpaX) (Prieto y García, 1997a) y 3HPP/3HCI (MhpT) (Tesis doctoral B. Torres, 2002). Mediante análisis de secuencia del genoma de *E. coli* se han identificado dos posibles permeasas para la incorporación de PP (HcaT) (Díaz *et al.*, 1998) y PA. Las proteínas transportadoras implicadas en el catabolismo de compuestos aromáticos en *E. coli* normalmente pertenecen a la superfamilia MFS (*major facilitator superfamily*) de proteínas transportadoras (Pao *et al.*, 1998).

El transportador de 3HPP/3HCI (MhpT) es el producto del gen *mhpT* que se localiza a 0,35 kb en posición *downstream* al extremo 3' del operón catabólico *mhp*. El gen *mhpT* está flanqueado por dos secuencias BIMEs (*Bacterial Interspersed Mosaic Elements*) (Fig. 4) que constituyen una de las familias de secuencias repetitivas conservadas, identificadas en regiones de DNA de enterobacterias que se transcriben pero no se traducen (Bachellier *et al.*, 1994; Ferrández *et al.*, 1997a). La proteína MhpT (418 aminoácidos) muestra similitud con miembros de la familia AAHS (*aromatic acid:H⁺ symporter*) de proteínas MFS, una familia de transportadores que incluye la

mayoría de permeasas descritas hasta el momento para la incorporación de compuestos aromáticos (Pao *et al.*, 1998; Díaz *et al.*, 2001). Mediante la construcción de una cepa de *E. coli* que contiene la fusión *mhpR/P_a::lacZ* (Fig. 32A) en cromosoma y el gen *mhpT* clonado en *trans* en un plásmido, se ha demostrado que la proteína transportadora MhpT es necesaria para la entrada de 3HPP dentro de la célula cuando la concentración de dicha fuente de carbono en el medio es inferior a 100 μ M. Además del 3HPP, MhpT es capaz de transportar con una eficiencia similar al otro sustrato de la ruta (3HCI) y con menor eficiencia, al derivado dihidroxilado DHPP (Tesis doctoral B. Torres, 2002).

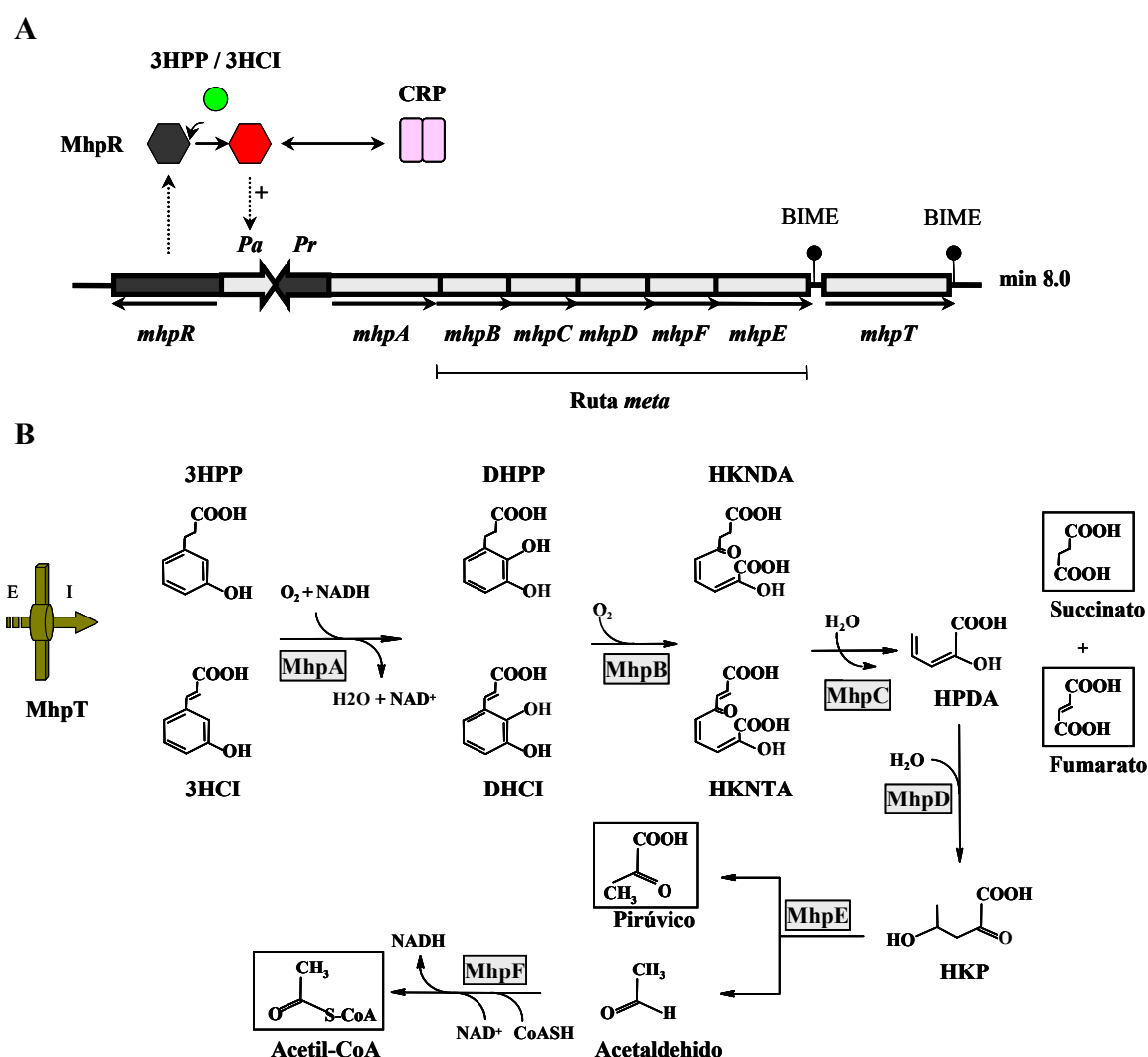
2. Degradación de 3HPP y 3HCI en *E. coli* K-12.

Los ácidos 3HPP y PP son compuestos aromáticos que se encuentran en el suelo, en la orina y heces de animales. Estos compuestos se generan mediante la acción de la microflora intestinal sobre constituyentes vegetales, tales como, los ácidos ferúlico y cafeico, los flavonoides miricetina y hesperetina, los aminoácidos fenilalanina y tirosina y metabolitos derivados (Burlingame y Chapman, 1983).

2.1. Ruta de degradación de 3HPP y 3HCI en *E. coli* K-12.

Los primeros en identificar la capacidad de *E. coli* para degradar PP y 3HPP fue el grupo de P. Chapman (Revisado en Burlingame, 1983). Estos autores también describieron que *E. coli* podía utilizar 3HCI como fuente de carbono, sugiriendo que este compuesto se degrada a través de la misma ruta enzimática empleada para la degradación de 3HPP (Burlingame y Chapman, 1983) (Fig. 4). El aislamiento de mutantes incapaces de degradar PP y 3HPP confirmó los análisis bioquímicos previos, así como que la inducción de las rutas se producía en presencia de sus correspondientes sustratos, PP y 3HPP (Burlingame *et al.*, 1986). Sin embargo, no fue hasta el año 1997 cuando se describió la organización genética de la ruta de biodegradación de 3HPP en *E. coli* K-12 (Ferrández *et al.*, 1997a; Díaz *et al.*, 2001) (Fig. 4). Distintas estirpes de *E. coli*, tales como *E. coli* B, C, W y K-12, son capaces de degradar 3HPP (Burlingame y Chapman, 1983). El primer paso de esta ruta catabólica está catalizado por la monooxigenasa MhpA que inserta un átomo de oxígeno en la posición 2 del anillo fenólico del 3HPP, produciendo ácido 2,3-dihidroxifenilpropiónico (DHPP). El DHPP se mineraliza a través de una ruta *meta* de tipo hidrolítico, la cual comienza con la

ruptura del anillo aromático mediante la dioxigenasa MhpB que, con la participación de una molécula de oxígeno, produce ácido 2-hidroxi-6-ceto-nona-2,4-dieno-1,9-dioico (HKND A) (Spence *et al.*, 1996; Bugg *et al.*, 1997). La hidrolasa MhpC rompe el HKND A produciendo succinato y ácido 2-hidroxi-penta-2,4 dienoico (HPDA), que es hidratado y convertido en ácido 4-hidroxi-2-cetopentanoico (HKP) mediante la acción de la hidratasa MhpD. Posteriormente, la aldolasa MhpE cataliza la fisión del HKP para dar piruvato y acetaldehído, el cual se convertirá más tarde en acetil-CoA mediante la acción de la acetaldehído deshidrogenasa acilante (MhpF) (Burlingame y Chapman, 1983; Lam y Bugg, 1997; Pollard *et al.*, 1998; Pollard y Bugg, 1998) (Fig. 4).



(dímero de color rosa). Se señalan también los promotores divergentes *Pr* y *Pa*. Los círculos negros indican la localización de las secuencias BIME. **B)** Bioquímica de la ruta catabólica. Las enzimas codificadas por los genes catabólicos son: MhpA, 3-(3-hidroxifenil)propionato monooxigenasa; MhpB, 3-(2,3-dihidroxifenil)propionato 1,2-dioxigenasa; MhpC, 2-hidroxi-6-cetonona-2,4-diendioato hidrolasa; MhpD, 2-ceto-4-pentenoato hidratasa; MhpE, 4-hidroxi-2-cetoverato aldolasa; MhpF, acetaldehído deshidrogenasa (acilante). MhpT, es el presunto transportador de la ruta. Los productos finales de la ruta se indican en recuadros. Las abreviaturas utilizadas para los compuestos intermediarios son: DHPP (ácido 2,3-dihidroxifenilpropiónico), DHCI (ácido 2,3-dihidroxicinámico), HKNDA (2-hidroxi-6-ceto-nona-2,4-dieno-1,9 dioico), HKNTA (ácido 2-hidroxi-6-ceto-nona-2,4,7-trieno 1,9 dioico), HPDA (ácido 2-hidroxi-penta-2,4 dienoico), HKP (ácido 4-hidroxi-2-cetopentanoico). El transportador MhpT se indica con una flecha gruesa que atraviesa la envuelta celular. E e I, indican exterior e interior de la célula, respectivamente.

El catabolismo del 3HCI sigue la misma ruta que el 3HPP, con la formación de fumarato, piruvato y acetil-CoA como productos finales (Fig. 4). El *cluster mhp* se ha clonado y expresado en distintas bacterias Gram-negativas tales como *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* y *Rhizobium*, confiriéndoles la capacidad de utilizar 3HPP y 3HCI como única fuente de carbono (Ferrández *et al.*, 1997a).

Los genes responsables de la degradación de 3HPP están localizados en el minuto 8.0 del cromosoma de *E. coli*, entre los genes *lacI* (el represor transcripcional del operón *lac*) y *yaiL*, un gen adyacente a *adhC* que codifica una alcohol deshidrogenasa. El análisis del *cluster mhp* reveló la existencia de 8 genes que se organizan de la siguiente manera (Fig. 4): i) seis genes catabólicos que codifican la monooxigenasa inicial (*mhpA*), la extradiol dioxigenasa (*mhpB*) y el resto de las enzimas de la ruta “meta” (*mhpCDFE*), ii) un gen regulador (*mhpR*) y iii) un gen que codifica una posible proteína transportadora (*mhpT*) (Ferrández *et al.*, 1997a; Díaz *et al.*, 2001; Torres *et al.*, 2003). El gen *mhpT* esta flanqueado por dos regiones BIME que pertenecen a la subfamilia BIME-2. Aunque la función de las regiones BIME no está muy clara, se cree que la secuencias palindrómicas que forman parte de las regiones BIME pueden dar lugar a bucles con una alta energía libre (Bachellier *et al.*, 1999) y podrían participar en la terminación de la transcripción.

Todos los genes del *cluster mhp* se transcriben en la misma dirección con la única excepción de *mhpR*. Las secuencias de unión al ribosoma (RBS) de los genes *mhpR*, *mhpA* y *mhpC* están localizadas en regiones intergénicas. En cambio, los sitios de unión al ribosoma de los genes *mhpB*, *mhpD*, *mhpF* y *mhpE* solapan con los marcos de lectura abiertos que los preceden (Ferrández *et al.*, 1997a; Díaz *et al.*, 2001). Recientemente se ha demostrado que la expresión de MhpF y MhpE está regulada de forma coordinada mediante acoplamiento traduccional que consiste en un mecanismo de

control de la expresión génica y de mantenimiento de la estequiometría entre productos génicos contenidos en mRNA policistrónicos (Lee *et al.*, 2006).

2.2. Regulación de la ruta de degradación de 3HPP/3HCl.

2.2.1. Regulación específica.

Como ya se ha comentado el gen *mhpR* codifica la proteína activadora de la transcripción del operón *mhp* (Tabla 2). La proteína MhpR pertenece a la familia IclR (Ferrández *et al.*, 1997a; Díaz *et al.*, 2001; Torres *et al.*, 2003; Prieto *et al.*, 2004). La familia IclR es un grupo muy amplio de reguladores transcripcionales de eubacterias y archaeas. Se han encontrado miembros de esta familia en 61 genomas microbianos que pertenecen a 42 géneros de bacterias gram-positivas y de α -, β - y γ -Proteobacterias y Archaeas, lo que comporta una amplia distribución taxonómica (Molina-Henares *et al.*, 2006). Recientemente, se ha definido el perfil (zona de la proteína muy conservada) que caracteriza a los reguladores de esta familia y que se localiza dentro del dominio de unión del efector (Krell *et al.*, 2006). Estos reguladores presentan un dominio N-terminal que contiene un motivo HTH de unión a DNA y un dominio C-terminal implicado en la oligomerización de la proteína y unión del efector (Tropel y van de Meer, 2004). Generalmente, estos reguladores se unen a sus operadores como dímeros o como tetrámeros y pueden actuar, según los casos, como represores, activadores o proteínas con doble función (Tabla 3). Las funciones reguladoras específicas de los miembros de esta familia son diversas (Krell *et al.*, 2006) encontrándose implicados en diversos tipos de procesos como por ejemplo, en el metabolismo del carbono en enterobacterias (Yamamoto e Ishihama, 2003), en la degradación de compuestos aromáticos en bacterias de suelo (Gerischer *et al.*, 1998), en la tolerancia a solventes en *Pseudomonas* (Guazzaroni *et al.*, 2004), en la inactivación de señales de *quorum sensing* en *Agrobacterium* (Zhang *et al.*, 2004), en la virulencia en plantas determinadas por enterobacterias (Reverchon *et al.*, 1991), o en la esporulación en *Streptomyces* (Jiang y Kendrick, 2000) (Tabla 3).

Tabla 3. Miembros de la familia IclR cuya función ha sido identificada (modificado de Molina-Henares *et al.*, 2006).

Proteína	Número de acceso	Microorganismo	Función	Referencias
AreB	A7DWG0	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	Modula la biosíntesis de leucina y la producción de cefamicina C y de ácido clavulánico. AreB se une a la región intergénica <i>areB-leuCD</i> actuando como activador.	Santamarta <i>et al.</i> (2007)
AttJ	Q8VPD8	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Represor del operón <i>attMKL</i> implicado en la degradación de acil-homoserina lactonas que actúan como señales en el plásmido de transferencia Ti.	Zhang <i>et al.</i> (2004)
CatR	Q70AP1	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Reprime su propia expresión y la del gen <i>cata</i>	Vesely <i>et al.</i> (2007)
CatR	O33539	<i>Rhodococcus opacus</i>	Regulador de los genes <i>catABC</i> responsables del catabolismo del catecol a través de la ruta de rotura del anillo de tipo "orto".	Eulberg y Schlömann (1998)
DitR	Q9X4X3	<i>Pseudomonas abietaniphila</i>	Los genes <i>dit</i> codifican las enzimas implicadas en el catabolismo del abietano. <i>ditR</i> forma un <i>cluster</i> con los genes <i>ditA3BCD</i> y <i>ditE</i> . Aunque no se requiere estrictamente de DitR para el crecimiento en abietano, la mutación <i>ditR:Km^r</i> produjo una reducción de la inducción de <i>ditA3</i> .	Martin y Mohn (2000)
GclR o AllR	Q8VP30/ P77734	<i>Escherichia coli</i>	Represor de la expresión de la glicolato carboligasa	Rintoul <i>et al.</i> (2002)
GylR	Q828K3	<i>Streptomyces avermitilis</i>	Control del metabolismo del glicerol	Bolotin y Biro (1990), Hindle y Smith (1994) Smith y Chater (1988a,b)
HmgR	Q6EMJ0	<i>Pseudomonas putida</i>	Controla la expresión inducible de los genes <i>hmgABC</i> . HmgR es un represor	Arias-Barrau <i>et al.</i> (2004)
HppR	O05148	<i>Rhodococcus globerulus</i>	El gen <i>hppR</i> forma parte del <i>cluster hppCBKR</i> implicado en el metabolismo del ácido 3-(3-hidroxifenil)propiónico. No se han realizado estudios de la funcionalidad de este regulador.	Barnes <i>et al.</i> (1997)
IclR	P16528	<i>Escherichia coli</i>	Represor del operón <i>aceBAK</i> del ciclo del glioxilato. Regula su propia síntesis.	Sunnarborg <i>et al.</i> (1990)
IclR	Q8D1U3	<i>Yersinia pestis</i>	Control del metabolismo del acetato	Song <i>et al.</i> (2004)
KdgR	P3778/ Q6D4G5	<i>Erwinia</i> sp.	Represor de la producción de exoenzima	Reverchon <i>et al.</i> (1991) Bell <i>et al.</i> (2004)
LtbR		<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Regula la expresión de genes implicados en la biosíntesis de leucina y triptófano	Brune <i>et al.</i> (2007)
MhpR	Q9S159	<i>Comamonas testosteroni</i>	Mutantes en el gen <i>mhpR</i> fueron incapaces de degradar el ácido 3-(3-hidroxifenil)propiónico y ácido 3-hidroxicinámico.	Arai <i>et al.</i> (1999)
MhpR	P77569	<i>Escherichia coli</i> K-12	Induce la expresión del <i>cluster mhpA-E</i> .	Ferrández <i>et al.</i> (1997a)
NdgR	O86533	<i>Streptomyces coelicolor</i>	Regulador implicado en el metabolismo de aminoácidos, en la producción de antibióticos y en <i>quorum sensing</i>	Yang <i>et al.</i> , 2008

NdpR		<i>Rhodococcus opacus</i>	Reprime la expresión de los genes <i>ndpI</i> y <i>ndpC</i> responsables de la degradación del ácido pícrico.	Nga <i>et al.</i> (2004)
OhbR	Q9Z5W3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Posible regulador del operón <i>ohbAB</i> del metabolismo del 2-clorobenzoato	Tsoi <i>et al.</i> (1999)
PcaR	Q52154	<i>Pseudomonas putida</i>	Regulador positivo de los genes <i>pca</i> responsables del metabolismo de 3,4-dihidroxibenzoato. Induce la expresión de los genes <i>pcaIJ</i> , <i>pcaK</i> , <i>pcaF</i> y <i>pcaTBDC</i>	Romero-Steiner <i>et al.</i> (1994)
PcaR	O67983	<i>Rhodococcus opacus</i>	Presunto regulador del <i>cluster pcaHGBLRF</i>	Eulberg <i>et al.</i> (1998)
PcaR	Q6NB48	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	Control del metabolismo del protocatecuato	Larimer <i>et al.</i> (2004)
PcaR	Q92TL3	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Activa la expresión de los genes <i>pcaIJF</i> . Reprime su propia expresión.	MacLean <i>et al.</i> (2006)
PcaU	O83046	<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1	Regulador positivo de <i>pcaIJFBDKCHG</i> , <i>pcaU</i> .	Kok <i>et al.</i> (1998)
PobR	Q43992	<i>Acinetobacter</i>	Regulador positivo de <i>pobA</i> , que codifica una p-hidroxibenzoato hidroxilasa. Regula su propia síntesis	DiMarco <i>et al.</i> (1993)
QsmR		<i>Burkholderia glumae</i>	Activa la expresión de los genes <i>flhDC</i> responsables de la biosíntesis del flagelo, funciones motoras y quimiotaxis	Kim <i>et al.</i> (2007)
RexZ	Q6CZM8	<i>Erwinia</i> sp.	Activador de la producción de exoenzima	Bell <i>et al.</i> (2004)
SsfR	Q9L688	<i>Streptomyces griseus</i>	Regulador implicado en la esporulación a través de la activación de <i>ssgA</i>	Jiang y Kendrick (2000), Yamazaki <i>et al.</i> (2003)
SsgR		<i>Streptomyces coelicolor</i>	Regulador implicado en esporulación	Zhu y Winans (1999)
TsaQ	Q6XL52	<i>Comamonas testosteroni</i>	Regulador positivo de los genes <i>tsaST</i> implicados en la conversión de p-toluenosulfonato en p-toluenocarboxilato	Tralau <i>et al.</i> (2003)
TtgT	Q8G976	<i>Pseudomonas putida</i>	Represor de los operones <i>ttgDEF</i> y <i>ttgGHI</i> .	Duque <i>et al.</i> (2001), Mosqueda y Ramos (2000), Terán <i>et al.</i> (2007)
TtgV	Q93PU6	<i>Pseudomonas putida</i>	Represor de los operones <i>ttgDEF</i> y <i>ttgGHI</i> .	Guazzaroni <i>et al.</i> (2004), Rojas <i>et al.</i> (2003)
Yiaj	P37671	<i>Escherichia coli</i>	Regulador positivo del metabolismo de la xilulosa	Ibañez <i>et al.</i> (2000)

La proteína MhpR (277 residuos) es el regulador específico del *cluster mhp* responsable de la degradación de 3HPP y 3HCI en *E. coli* (Díaz y Prieto, 2000; Torres *et al.*, 2003; Prieto *et al.*, 2004) (Tabla 3). El extremo N-terminal de MhpR contiene un motivo HTH de unión a DNA y el dominio C-terminal presenta el patrón de aminoácidos que define a la familia IclR (Krell *et al.*, 2006). Normalmente los miembros de la familia IclR se transcriben divergentemente con respecto a los genes que controlan, y los promotores correspondientes se superponen en una región de DNA corta (Díaz y Prieto, 2000; Prieto *et al.*, 2004). En el *cluster mhp* de *E. coli*, el gen regulador *mhpR* se expresa a partir de un promotor divergente en orientación opuesta a

los genes catabólicos *mhp* (Fig. 4). Los promotores del gen *mhpR* (*Pr*) y de los genes catabólicos *mhp* (*Pa*) están localizados dentro de una región intergénica de 178 pb, entre los sitios de iniciación de la traducción de los genes *mhpR* y *mhpA* que se transcriben divergentemente (Torres *et al.*, 2003; Prieto *et al.*, 2004).

Mediante la utilización de las fusiones traduccionales *Pr-lacZ* y *Pa-lacZ* y la realización de ensayos de retardo en gel se demostró que el producto del gen *mhpR* es una proteína que se une al promotor *Pa* activando la transcripción en presencia de 3HPP. Sin embargo, la expresión de *mhpR* a partir de *Pr* es constitutiva e independiente de MhpR (Torres *et al.*, 2003; Prieto *et al.*, 2004). Esta última característica le distingue de otros reguladores de la familia IclR de rutas catabólicas de aromáticos, por ejemplo PcaR de *P. putida* y PobR y PcaU de *Acinetobacter* sp. ADP1, los cuales actúan como activadores transcripcionales de genes catabólicos pero se comportan como represores de su propia expresión (DiMarco y Ornston, 1994; Guo y Houghton, 1999; Trautwein y Gerischer, 2001; Prieto *et al.*, 2004). Además, algunos reguladores de la familia IclR, tales como PcaU, actúan sobre el mismo promotor como activador, en presencia de su inductor, y como represor, en ausencia de la molécula inductora (Popp *et al.*, 2002; Prieto *et al.*, 2004). Sin embargo, esta doble función reguladora no se ha observado con el activador MhpR y el promotor *Pa* dado que no se detectó actividad β -galactosidasa en células de *E. coli* portadoras de la fusión *Pa-lacZ* ($\Delta mhpR$) (Torres *et al.*, 2003; Prieto *et al.*, 2004).

El perfil de inductores del activador MhpR incluye a los dos sustratos de la ruta (3HPP y 3HCI), al primer intermediario de ésta (DHPP) y, en menor medida, al inductor gratuito 2HPP (análogo estructural del 3HPP). Análogos estructurales tales como el 4HPP y el CI actúan como anti-inductores. (Tesis doctoral B. Torres, 2002).

Mediante ensayos de *footprinting* con DNasa I (realizados con extractos crudos que contenían la proteína MhpR hiperproducida) y análisis mutacional, se localizó la región operadora de MhpR, centrada en la posición -58 con respecto al inicio de transcripción de *Pa* (Fig. 5). Esta secuencia operadora contiene un motivo palindrómico imperfecto de 17 pb (GGTGCACCTGGTGCACA). Además, la interacción de la proteína MhpR con su operador en el DNA, no requiere la presencia del promotor *Pr*. Mediante la realización de ensayos de retardo en gel (realizados con extractos crudos que contenían la proteína MhpR hiperproducida) se demostró que esta proteína es capaz de unirse a su operador en ausencia de 3HPP. Sin embargo, esta interacción se favorece por la presencia de 3HPP (Torres *et al.*, 2003; Prieto *et al.*, 2004).

2.2.2. Regulación global.

En la ruta de degradación del 3HPP existe un control estricto de represión catabólica mediado por el complejo cAMP-CRP sobre el promotor *Pa*, sobreimpuesta a la regulación específica ejercida por el regulador MhpR. Este control permite la expresión de los genes catabólicos *mhp* cuando no existe glucosa disponible en el medio y sin embargo existe 3HPP (Fig. 4). Mediante ensayos de retardo en gel llevados a cabo con la proteína CRP purificada en presencia de cAMP se demostró que esta proteína es capaz de unirse a la región *Pa-Pr* únicamente en presencia de MhpR, posiblemente generando un complejo ternario DNA-CRP-MhpR (Torres *et al.*, 2003; Prieto *et al.*, 2004). Mediante un análisis de secuencia se identificó en el promotor *Pa* un posible sitio de unión de CRP centrado en la posición -95,5 con respecto al sitio de inicio de la transcripción de *Pa* (Fig. 5). Sin embargo, la mitad del posible sitio de unión difiere mucho de la secuencia de unión consenso de CRP (Torres *et al.*, 2003; Prieto *et al.*, 2004), lo que podría explicar la necesidad de MhpR para la unión de CRP a su operador en el DNA.

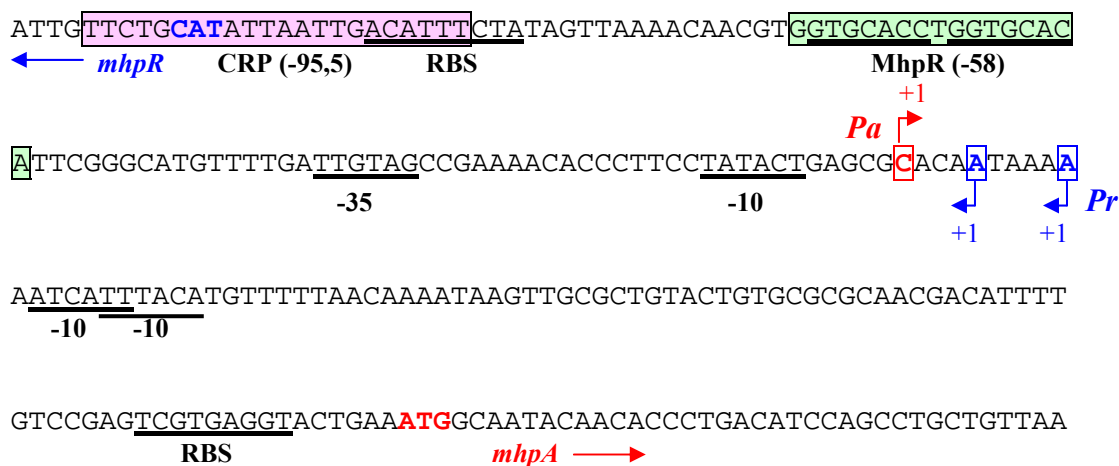


Figura 5. Secuencia nucleotídica de la región intergénica *mhpR-mhpA*. Las flechas gruesas indican la dirección de la transcripción de los genes *mhpR* y *mhpA*. Se señalan los codones de iniciación de la traducción del gen *mhpR* (en letra azul) y del gen *mhpA* (en letra roja). Se han subrayado los posibles RBS. La secuencia operadora de MhpR se señala con un recuadro de color verde. El posible sitio de unión de la proteína CRP se indica con un recuadro de color rosa. Se muestran las posiciones de inicio de la transcripción de los promotores *Pa* (en un recuadro rojo) y *Pr* (en recuadros de color azul). Se han señalado las posibles cajas -10 y -35 de los promotores *Pa* y *Pr*.

Este mecanismo de co-dependencia entre dos activadores transcripcionales se utiliza frecuentemente en organismos eucariotas, mientras que existen pocos ejemplos descritos en procariotas (Wade *et al.*, 2001; Prieto *et al.*, 2004). La proteína MhpR es el primer regulador de la familia IclR en el que se ha descrito este mecanismo, y no existen ejemplos de co-dependencia en otros reguladores de rutas catabólicas de compuestos aromáticos. La región rica en adenina localizada entre el posible sitio de unión para CRP y el operador de MhpR (Torres *et al.*, 2003; Prieto *et al.*, 2004) puede actuar como un elemento UP facilitando la interacción del dominio α -CTD de la RNA polimerasa con el promotor y CRP, de acuerdo con el mecanismo de activación dependiente de CRP de clase I (Busby y Ebright, 1999; Estrem *et al.*, 1998; Prieto *et al.*, 2004). Sin embargo, la activación de la transcripción sinérgica mediada por el complejo cAMP-CRP y el activador MhpR permite clasificar al promotor *Pa* del *cluster mhp* como un promotor dependiente de CRP de clase III (Torres *et al.*, 2003; Prieto *et al.*, 2004).

3. Degradación de PP/CI en *E. coli*.

3.1. Ruta de degradación de PP/CI en *E. coli*.

En *E. coli* la degradación aeróbica del PP y del 3HPP (compuestos I y IV de la figura 6B, respectivamente) se lleva a cabo por dos rutas inicialmente separadas que convergen en el ácido 2,3-dihidroxifenilpropiónico (DHPP) (compuesto III), el cual sufre una rotura del anillo y es finalmente degradado hasta intermediarios del ciclo de Krebs (Fig. 6B) (Burlingame y Chapman, 1983; Burlingame *et al.*, 1986; Bugg, 1993; Díaz *et al.*, 1998 y 2001). El catabolismo del PP en *E. coli* comienza por una ruta dioxigenolítica (Fig. 6B) (Burlingame y Chapman, 1983; Burlingame *et al.*, 1986; Díaz *et al.*, 1998 y 2001). El primer paso está catalizado por la 3-fenilpropionato dioxigenasa, la cual inserta los dos átomos del oxígeno molecular en las posiciones 2 y 3 del anillo aromático del PP, produciendo *cis*-3-(3-carboxietil)-3,5-ciclohexadieno-1,2-diol (PP-dihidrodiol; compuesto II), el cual es oxidado por la 3-fenilpropionato-dihidrodiol deshidrogenasa para producir DHPP (compuesto III) (Fig. 6B) (Burlingame y Chapman, 1983; Burlingame *et al.*, 1986; Díaz *et al.*, 1998 y 2001). Se ha demostrado mediante ensayos enzimáticos que la síntesis de las enzimas que se requieren para convertir los dos sustratos iniciales (PP y 3HPP) en DHPP son inducibles y están sujetas a un control

independiente (Burlingame y Chapman, 1983; Burlingame *et al.*, 1986; Díaz *et al.*, 1998).

El *cluster hca*, responsable del catabolismo de PP, se compone de: (i) cinco genes catabólicos que codifican una PP-dioxigenasa (*hcaEFC*D; antes llamada *hcaA1A2CD*) y una PP-dihidrodiol deshidrogenasa (*hcaB*); (ii) un gen regulador (*hcaR*); y (iii) un gen que podría codificar un transportador (*hcaT*) (Fig. 6A) (Díaz *et al.*, 1998 y 2001). En posición 3' al gen *hcaD* se encuentra la secuencia *orfX* que podría pertenecer también al *cluster hca*, y que codifica una proteína de 155 aminoácidos de función desconocida. Los sitios de unión a ribosoma de los genes *hcaE*, *hcaF*, *hcaC*, *hcaB* y *hcaD* solapan con los genes anteriores, lo que sugiere la existencia de un mecanismo de acoplamiento traduccional (Díaz *et al.*, 1998 y 2001). En posición 3' a la secuencia *orfX* existe una secuencia repetida invertida que podría actuar como terminador transcripcional del operón *hca*. Los genes *hcaR* y *hcaT* están localizados en posición 5' a los genes *hcaEFCBDorfX*, pero son transcritos en dirección opuesta a los otros genes (Fig. 6A) (Díaz *et al.*, 1998 y 2001).

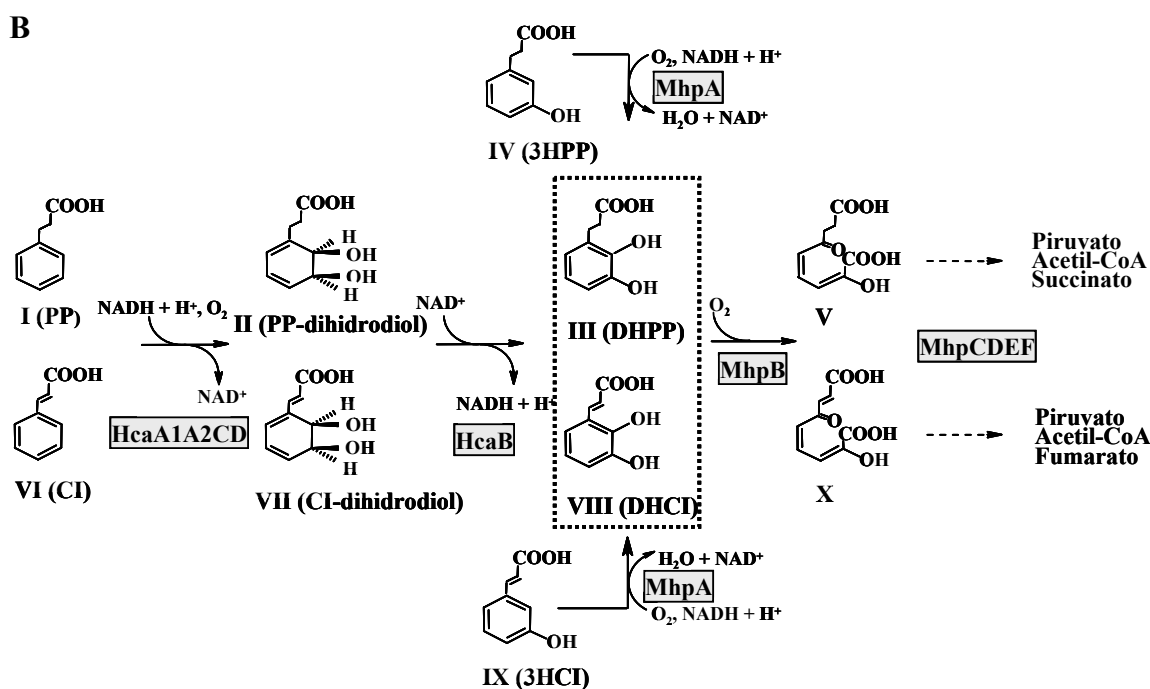
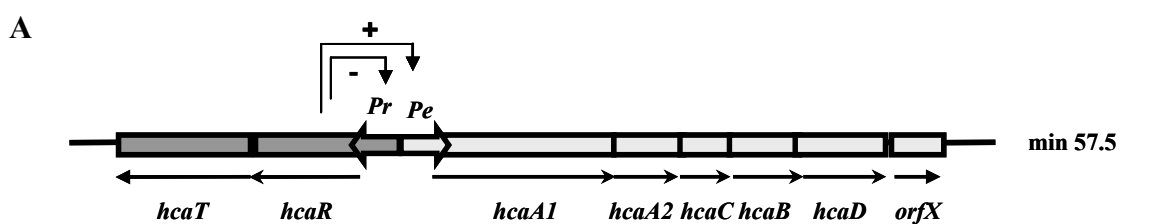


Figura 6. Convergencia de las rutas catabólicas de PP (CI) y 3HPP (3HCI) en *E. coli*.
A) Mapa genético del *cluster hca*. Con flechas se indica la dirección de la transcripción de los genes. **B)** Ruta bioquímica propuesta del catabolismo del PP (3HPP) y CI (3HCI). HcaA1A2CD y HcaB son las enzimas codificadas por los correspondientes genes estructurales *hca*. Desde MhpA a MhpF son las enzimas responsables del catabolismo de 3HPP (3HCI) y DHPP (DHCI). Los metabolitos son PP (compuesto I), *cis*-3-(3-carboxietil)-3,5-ciclohexadieno-1,2-diol (compuesto II), DHPP (compuesto III), 3HPP (compuesto IV), 2-hidroxi-6-ceto-nona-2,4-dieno-1,9 dioico (compuesto V), CI (compuesto VI), *cis*-3-(3-carboxietenil)-3,5-ciclohexadieno-1,2-diol (compuesto VII), DHCI (compuesto VIII), 3HCI (compuesto IX), y ácido 2-hidroxi-6-ceto-nona-2,4,7-trieno 1,9 dioico (compuesto X). Enzimas: HcaA1A2CD, 3-fenilpropionato dioxigenasa; HcaB, 3-fenilpropionato-dihidrodiol deshidrogenasa; MhpA, 3-(3-hidroxifenil)propionato monooxigenasa; MhpB, 3-(2,3-dihidroxifenil)propionato 1,2-dioxigenasa; MhpC, 2-hidroxi-6-cetonona-2,4-diendioato hidrolasa; MhpD, 2-ceto-4-pentenoato hidratasa; MhpE, 4-hidroxi-2-cetovalerato aldolasa; MhpF, acetaldehído deshidrogenasa (acilante).

El *cluster hca* está localizado en el minuto 57.5 del cromosoma de *E. coli* en posición 3' al gen *csiE*, que codifica una proteína que se induce en fase estacionaria, y por tanto muy lejos del minuto 8.0, donde se localiza el *cluster mhp* responsable de la degradación del DHPP (Fig. 1). La dioxigenasa HcaA1A2CD y la dihidrodiol deshidrogenasa HcaB, transforman el CI en DHCI (Fig. 6B) (Burlingame y Chapman, 1983; Díaz *et al.*, 1998 y 2001). Cuando se expresan los *clusters hca* y *mhp* de *E. coli* en *Salmonella typhimurium* LT2, la cepa resultante puede crecer en un medio mínimo que contenga CI como única fuente de carbono y energía (Díaz *et al.*, 1998 y 2001). Por tanto, mientras algunas especies de *Pseudomonas* de suelo y en *Lactobacillus pastorianus* el catabolismo de CI podría lograrse con una reducción inicial del doble enlace de la cadena lateral para formar PP, el catabolismo de CI por las enzimas Hca en *S. typhimurium* produce DHCI, el cual, a través de la ruta codificada por los genes *mhp*, finalmente se convierte en piruvato, acetil-CoA y fumarato (Díaz *et al.*, 1998 y 2001) (Fig. 6B). Mientras que el CI puede inducir la expresión de los genes *hca* y se convierte en DHCI por células de *E. coli* en procesos de *resting-cell*, esta bacteria es incapaz de crecer con CI como única fuente de carbono y energía (Díaz *et al.*, 1998 y 2001).

3.2. Regulación de la ruta de degradación de PP/CI en *E. coli*.

3.2.1. Regulación específica.

El gen *hcaR* codifica una proteína (296 aminoácidos) que pertenece a la familia de reguladores transcripcionales LysR (Tabla 2) (Díaz y Prieto, 2000; Díaz *et al.*, 1998; Turlin *et al.*, 2001). El dominio N-terminal contiene un motivo HTH de unión a DNA y el dominio C-terminal contiene un posible motivo de multimerización que caracteriza a

la familia LysR (Schell, 1993). El gen regulador *hcaR* se transcribe divergentemente con respecto a los genes catabólicos (Fig. 6A) (Díaz *et al.*, 1998). La expresión de los genes *hca* de *E. coli* en *S. typhimurium* LT-2 demostró la función activadora de HcaR y la identificación de los compuestos PP y CI como inductores del *cluster hca* (Díaz *et al.*, 1998). HcaR, además de regular positivamente la expresión de los genes catabólicos, regula negativamente su propia expresión. (Turlin *et al.*, 2001). Los sitios de iniciación de la transcripción de los genes *hcaR* y *hcaA* han sido identificados y se ha localizado un posible sitio de unión para HcaR en la región *hcaR-hcaA* entre las posiciones -70 y -55 con respecto al sitio de iniciación de la transcripción de *hcaA* (Turlin *et al.*, 2005). Mediante ensayos de retardo en gel se ha demostrado que la presencia de PP no influye en la formación del complejo DNA-proteína (Turlin *et al.*, 2005).

3.2.2. Regulación global.

La ruta de degradación del PP también está sujeta a represión catabólica. Cuando *E. coli* crece en presencia de glucosa y PP las células utilizan los dos compuestos secuencialmente. La utilización de PP se reprime inmediatamente por glucosa, tanto si la glucosa se añade al principio en la mezcla, como si se añade mientras las células crecen con PP como única fuente de carbono y energía (Kovárová *et al.*, 1996). Sin embargo, ambos sustratos se consumen simultáneamente en cultivos continuos con fuente de carbono limitante (Kovárová *et al.*, 1997). Esta última situación puede parecerse más a las condiciones ambientales, donde el crecimiento está limitado principalmente por el carbono y los microorganismos utilizan varias fuentes de carbono y energía simultáneamente (Kovárová-Kovar y Egli, 1998). Estudios llevados a cabo por Turlin y colaboradores (2001) han revelado que la expresión del gen regulador *hcaR* es reprimida en presencia de glucosa. Además, la represión glucosa-dependiente de la expresión de *hcaR* desaparece parcialmente mediante la adición de cAMP exógeno. Dado que no les fue posible demostrar la unión de CRP al promotor del gen *hcaR*, estos autores han sugerido que el control cAMP-dependiente de la expresión de *hcaR* puede ser indirecto (Turlin *et al.*, 2001).

II. OBJETIVOS

Al comienzo de esta tesis ya se había caracterizado el *cluster mhp* de *E. coli* y se había realizado el estudio bioquímico de la ruta de degradación del 3HPP. Los circuitos implicados en la regulación transcripcional de este *cluster* habían sido descifrados sólo en parte. Por otro lado, se había identificado la proteína responsable del transporte del 3HPP hacia el interior de las células de *E. coli*, aunque no se sabía si el gen que la codifica (*mhpT*) formaba parte del operón de genes catabólicos *mhp*. También, se desconocía la importancia de la presencia de la proteína transportadora en el crecimiento de *E. coli* en un medio en el que la única fuente de carbono disponible sea el 3HPP. A la vista de estos resultados previos, en esta tesis se han abordado los siguientes objetivos:

1.- Estudio de la regulación específica del *cluster mhp*. Mediante este objetivo se pretendía profundizar en los mecanismos de regulación del *cluster* que se anticipaban peculiares. Para ello era necesario purificar en primer lugar el activador MhpR para poder llevar a cabo su caracterización molecular *in vitro* y ratificar después a la vista de los resultados obtenidos su comportamiento *in vivo*.

2.- Estudio de la regulación global del *cluster mhp*. Mediante este objetivo se pretendía estudiar cómo los promotores *Pa* y *Pr* responden a la regulación sobreimpuesta y determinar tanto *in vitro* como *in vivo* los factores implicados en este proceso.

3.- Estudio del efecto sinérgico del PP en la activación de MhpR. Mediante estos estudios se pretendía desentrañar los mecanismos moleculares implicados en la activación que proporciona la presencia de PP en la expresión del *cluster mhp*.

4.- Estudio de la expresión del gen transportador *mhpT*. Dado que se desconocía como se coordinaba la expresión del gen transportador con la expresión del resto de genes del *cluster mhp* se propuso como objetivo determinar el promotor de este gen y los mecanismos de expresión involucrados.

5.- Análisis del papel de la proteína transportadora MhpT en el crecimiento de *E. coli*. Con el desarrollo de este objetivo se proponía investigar la importancia fisiológica

que confiere la presencia del transportador en el proceso de metabolización del 3HPP y por ende en el crecimiento de la bacteria.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas bacterianas y plásmidos.

Las diferentes cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo se recogen en la tabla 4 junto con sus genotipos y características más relevantes.

Tabla 4. Cepas de *E. coli* empleadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo/fenotipo relevante	Referencia
S17-1 λ pir	Tp ^r , Sm ^r , <i>recA</i> , <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>hsdRM</i> ^r , RP4::2-Tc::Mu::Km, Tn7, λ pir	de Lorenzo y Timmis, 1994
SM10 λ pir	Km ^r , <i>thi</i> -1, <i>thr</i> , <i>leu</i> , <i>tonA</i> , <i>lacY</i> , <i>supE</i> , <i>recA</i> ::RP4-2-Tc::Mu, λ pir	Simon <i>et al.</i> , 1983
DH5 α	<i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>thi</i> -1, <i>recA1</i> <i>gyrA</i> (Nal ^r), <i>relA1</i> , Δ (<i>argF-lac</i>) U169, <i>depR</i> Φ 80 <i>dlac</i> Δ (<i>lacZ</i>)M15	Sambrook y Russell, 2001
MC4100	<i>araD319</i> , Δ (<i>argF-lac</i>)U169, <i>rpsL150</i> (Sm ^r) <i>relA1</i> , <i>flbB5301</i> , <i>deoC1</i> , <i>ptsF25</i> , <i>rbsR</i>	Prieto y García, 1997b
AFMC	MC4100 resistente a rifampicina	Ferrández <i>et al.</i> , 2000
AFMC::RL	AFMC portadora en cromosoma de la fusión traduccional Δ <i>mhpR/Pr</i> :: <i>lacZ</i> ; Km ^r , Sm ^r , Rif ^r	Torres <i>et al.</i> , 2003
AFMC::AL	AFMC portadora en cromosoma de la fusión traduccional Δ <i>mhpR/Pa</i> :: <i>lacZ</i> ; Km ^r , Sm ^r , Rif ^r	Torres <i>et al.</i> , 2003
AFMC::RAL	AFMC portadora en cromosoma de la fusión traduccional <i>mhpR/Pa</i> :: <i>lacZ</i> ; Km ^r , Sm ^r , Rif ^r	Torres <i>et al.</i> , 2003
SBS688	Derivada de MC4100, Δ <i>crp</i>	Prieto y García, 1997b
AFSB	Derivada de AFMC, Δ <i>crp</i>	Ferrández <i>et al.</i> , 2000
AFSB::RL	Derivada de AFSB, Δ <i>mhpR/Pr</i> :: <i>lacZ</i> , Km ^r , Sm ^r , Rif ^r	Torres <i>et al.</i> , 2003
AFSB::RAL	Derivada de AFSB, <i>mhpR/Pa</i> :: <i>lacZ</i> , Km ^r , Sm ^r , Rif ^r	Torres <i>et al.</i> , 2003
ED1061	<i>hsdR</i> , <i>mcrB</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>araABC-leu</i>)7679, Δ <i>lacX74</i> , <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , <i>thi</i> , <i>hcaE</i> ::Km ^r , Sm ^r	Díaz <i>et al.</i> , 1998
ED1061::AL	ED1061 portadora en cromosoma de la fusión traduccional Δ <i>mhpR/Pa</i> :: <i>lacZ</i> ; Km ^r , Sm ^r , Sp ^r	Este trabajo
CC118	Δ (<i>ara-leu</i>) <i>araD</i> , Δ <i>lacX74</i> , <i>galE</i> , <i>galK</i> , <i>phoA20</i> , <i>thi</i> -1, <i>rpsE</i> , <i>rpoB</i> , <i>argE</i> (Am), <i>recA1</i> Rf ^r , Sp ^r	Herrero <i>et al.</i> , 1990
CC118::AL	CC118 portadora en cromosoma de la fusión traduccional Δ <i>mhpR/Pa</i> :: <i>lacZ</i> ; Km ^r , Rf ^r , Sp ^r	Tesis doctoral B. Torres 2002
M15	Cepa de expresión de vectores pQE	Qiagen
MCG11	Derivada de AFMC portadora en cromosoma de la fusión <i>Pg</i> :: <i>lacZ</i>	Galán <i>et al.</i> , 2001
MG1655	F ⁻ , λ ⁻	Blattner <i>et al.</i> , 1997
MG1655 (Rf)	Derivada de MG1655, Rf	Este trabajo
MG1655 <i>mhpT</i> Δ	Derivada de MG1655 portadora en cromosoma de <i>mhpT</i> Δ , Rif ^r	Este trabajo

Los plásmidos utilizados y construidos en este trabajo se describen en la tabla 5.

Tabla 5. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Genotipo/Fenotipo relevante	Referencia
pUC18/pUC19	Ap ^r , vector de clonación	Sambrook y Russell, 2001
pBeBe	Ap ^r , derivado de pUC19 que contiene el gen <i>crp</i>	Galán <i>et al.</i> , 2008
pSJ3	Ap ^r , vector que contiene el gen <i>lacZ</i> sin promotor, <i>oriColE1</i>	Ferrández <i>et al.</i> , 1998
pRAL	Ap ^r , derivado de pSJ3 que contiene la fusión <i>mhpR/Pa::lacZ</i>	Torres <i>et al.</i> , 2003
pAL	Ap ^r , derivado de pSJ3 que contiene la fusión Δ <i>mhpR/Pa::lacZ</i>	Torres <i>et al.</i> , 2003
pJCD01	Ap ^r , contiene el polilinker de pUC19 entre los sitios <i>EcoRI</i> y <i>PstI</i> flanqueado por los terminadores transcripcionales <i>rpoC</i> y <i>rrnBT1T2</i> , respectivamente.	Marschall <i>et al.</i> , 1998
pJCDAR	Ap ^r , derivado de pJCD01 que contiene los promotores <i>Pr-Pa</i>	Este trabajo
pJCDA	Ap ^r , derivado de pJCD01 que contiene el promotor <i>Pa</i>	Este trabajo
pJCDA	Ap ^r , derivado de pJCD01 que contiene el promotor <i>Pr</i>	Este trabajo
pREP4	Km ^r , plásmido que expresa el represor LacI	Qiagen
pQE32	Ap ^r , <i>oriColE1</i> , promotor T5, operador <i>lac</i> , terminadores λ <i>t</i> / <i>E. coli rrnB T1</i> , N-terminal His ₆	Qiagen
pQMH	Ap ^r , derivado de pQE32 que expresa la proteína MhpR-His	Este trabajo
pQMHmut35	Ap ^r , derivado de pQE32 que expresa el gen <i>mhpR-His</i> con la mutación N35S	Este trabajo
pQMHmut58	Ap ^r , derivado de pQE32 que expresa el gen <i>mhpR-His</i> con la mutación T58S	Este trabajo
pQMHmut126	Ap ^r , derivado de pQE32 que expresa el gen <i>mhpR-His</i> con la mutación D126N	Este trabajo
pQMHmut252	Ap ^r , derivado de pQE32 que expresa el gen <i>mhpR-His</i> con la mutación Q252R	Este trabajo
pQMHmut272	Ap ^r , derivado de pQE32 que expresa el gen <i>mhpR-His</i> con la mutación V272A	Este trabajo
pQMHmut276	Ap ^r , derivado de pQE32 que expresa el gen <i>mhpR-His</i> con la mutación A276T	Este trabajo
pUC18Not	Ap ^r , Derivado de pUC18 con dos sitios <i>NotI</i> flanqueando la región polilinker	Herrero <i>et al.</i> , 1990
pPAL	Ap ^r , derivado de pUC18Not que contiene el gen <i>mhpR</i>	Torres <i>et al.</i> , 2003
pPALmut1	Ap ^r , derivado de pUC18Not que contiene el gen <i>mhpR</i> con las mutaciones R45L y D99G y truncada en el residuo 222	Este trabajo
pPALmut4	Ap ^r , derivado de pUC18Not que contiene el gen <i>mhpR</i> con las mutaciones R102G y S128G	Este trabajo
pPALmut6	Ap ^r , derivado de pUC18Not que contiene el gen <i>mhpR</i> con la mutación D114N	Este trabajo
pPALmut7	Ap ^r , derivado de pUC18Not que contiene el gen <i>mhpR</i> con la mutación E166G y truncada en el residuo 218	Este trabajo
pPALmut9	Ap ^r , derivado de pUC18Not que contiene el gen <i>mhpR</i> con las mutaciones D116E, L143P, S219R, M236V y A248V	Este trabajo
pPALmut10	Ap ^r , derivado de pUC18Not que contiene el gen <i>mhpR</i>	Este trabajo

	truncado en el residuo 226	
pPALmut13	Ap ^r , derivado de pUC18Not que contiene el gen <i>mhpR</i> con las mutaciones R17C y Q255R	Este trabajo
pPALmut23	Ap ^r , derivado de pUC18Not que contiene el gen <i>mhpR</i> con la mutación N23S	Este trabajo
pPALmut26	Ap ^r , derivado de pUC18Not que contiene el gen <i>mhpR</i> con las mutaciones E261V y H275R	Este trabajo
pPALmut38	Ap ^r , derivado de pUC18Not que contiene el gen <i>mhpR</i> con la mutación A38T	Este trabajo
pPALmut41	Ap ^r , derivado de pUC18Not que contiene el gen <i>mhpR</i> con la mutación R13S	Este trabajo
pPALmut42	Ap ^r , derivado de pUC18Not que contiene el gen <i>mhpR</i> con la mutación D175V	Este trabajo
pPALmut46	Ap ^r , derivado de pUC18Not que contiene el gen <i>mhpR</i> con la mutación T46S	Este trabajo
pPALmut58	Ap ^r , derivado de pUC18Not que contiene el gen <i>mhpR</i> con la mutación R49Q	Este trabajo
pPALmut98	Ap ^r , derivado de pUC18Not que contiene el gen <i>mhpR</i> con las mutaciones N23S y T46S	Este trabajo
pPALmut110	Ap ^r , derivado de pUC18Not que contiene el gen <i>mhpR</i> con la mutación V260A	Este trabajo
pPALmut117	Ap ^r , derivado de pUC18Not que contiene el gen <i>mhpR</i> con las mutaciones F132L y A264T	Este trabajo
pPALmut136	Ap ^r , derivado de pUC18Not que contiene el gen <i>mhpR</i> con las mutaciones A38T y Q240R	Este trabajo
pPALmut137	Ap ^r , derivado de pUC18Not que contiene el gen <i>mhpR</i> con la mutación P247L	Este trabajo
pPALmut143	Ap ^r , derivado de pUC18Not que contiene el gen <i>mhpR</i> con las mutaciones A38T y E258G	Este trabajo
pPALmut192	Ap ^r , derivado de pUC18Not que contiene el gen <i>mhpR</i> con la mutación N200S	Este trabajo
pPALmut240	Ap ^r , derivado de pUC18Not que contiene el gen <i>mhpR</i> con la mutación Q240R	Este trabajo
pUTmini-Tn5 Sm/Sp	Ap ^r , Sm ^r /Sp ^r , plásmido portador del minitransposón mini-Tn5 Sm/Sp, R6KoriV, RP4oriT	de Lorenzo <i>et al.</i> , 1990
pUTAL2	Ap ^r , Sm ^r /Sp ^r , pUTmini-Tn5 Sm/Sp que contiene la fusión $\Delta mhpR/Pa::lacZ$	Este trabajo
pBT17	Cm ^r , vector que expresa el gen <i>mhpT</i> bajo el control de P_{trcs} , oriVpSC101	Tesis doctoral B. Torres (2002)
pBT17 Δ	Cm ^r , vector derivado de pBT17 digerido con <i>SacII/DraIII</i>	Este trabajo
pKNG101	Sm ^r , vector de clonación suicida para la construcción de mutantes por recombinación homóloga, Mob ⁺ , <i>sacB</i> , R6KoriV	Kaniga <i>et al.</i> , 1991
pKNGBB	Sm ^r , vector derivado de pKNG101 que contiene el gen <i>mhpT</i> (incompleto)	Este trabajo
pPADR2	Km ^r , <i>rep/mob</i> , vector que contiene los genes <i>mhpRABCFET</i>	Ferrández <i>et al.</i> , 1997a
pUJ9	Ap ^r , vector que contiene el gen <i>lacZ</i> sin promotor	de Lorenzo <i>et al.</i> , 1990
pUJT1	Ap ^r , vector derivado de pUJ9 que contiene la región intergénica <i>mhpE-mhpT</i>	Este trabajo

2. Medios y condiciones de cultivo.

Todas las soluciones y medios de cultivo utilizados en este trabajo se esterilizaron por calor húmedo en un autoclave a 121 °C y 1 at de presión, o mediante filtración utilizando filtros estériles Millipore de 0,2 micras de diámetro.

El medio rico utilizado para cultivar las células de *E. coli* fue el medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook y Russell, 2001). Los cultivos en medio sólido se realizaron con medio LB suplementado con Bacto Agar (Pronadisa) al 1,5% (p/v). Cuando fue necesario se añadió 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-Gal) a una concentración de 0,08 mM, isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosido (IPTG) a una concentración de 0,2 mM y compuestos aromáticos (3HPP y PP) a una determinada concentración según el experimento a desarrollar.

El medio mínimo empleado en este trabajo fue el medio mínimo M63 (Miller, 1972), al que se añadió agar al 1,5% (p/v) para los crecimientos en medio sólido. El medio mínimo se suplementó con la fuente de carbono específica: glicerol (20 mM), glucosa (10 mM), 3HPP (0,5 mM) así como con las vitaminas y aminoácidos necesarios para cada cepa a las concentraciones recomendadas por Gerhardt y colaboradores (1994).

Las células de *E. coli* se incubaron a 37 °C ó 30 °C en un agitador orbital a 300 rpm. El crecimiento en medio líquido fue seguido por turbidimetría a 600 nm (DO₆₀₀) empleando un espectrofotómetro Beckman DU-520. El tiempo de generación (g) reflejado en el apartado 5.2.2 de Resultados fue calculado a partir de la representación de logDO₆₀₀ versus tiempo de incubación. Posteriormente, se aplicó la siguiente fórmula: $g = (t \times \log 2) / (\log N - \log N_0)$, donde t representa el tiempo de incubación (en min) y N₀ y N representan DO₆₀₀ inicial y final del cultivo, respectivamente.

Los antibióticos se prepararon en soluciones acuosas mil veces concentradas con respecto a las concentraciones finales, a excepción de la ampicilina, que se preparó en solución acuosa 250 veces concentrada, el cloranfenicol, que se preparó en etanol absoluto y la rifampicina, que se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO). Las soluciones preparadas se esterilizaron por filtración y se conservaron a -20 °C. Los antibióticos se utilizaron a las concentraciones finales que se indican a continuación: ampicilina (Ap, 100 μ g/ml), cloranfenicol (Cm, 34 μ g/ml), kanamicina (Km, 50 μ g/ml), rifampicina (Rf, 50 μ g/ml). Durante períodos inferiores a un mes las cepas se conservaron a 4 °C en placas de LB o medio mínimo. Para la conservación a largo plazo, las bacterias se

congelaron en medio LB con los antibióticos correspondientes y glicerol al 10% (v/v) y se mantuvieron a -80 °C.

3. Transformación de células de *E. coli*.

Las células de *E. coli* se transformaron utilizando dos procedimientos distintos. Uno de los métodos empleados para la preparación de células competentes y transformación de las mismas fue el del RbCl y choque térmico (Sambrook y Russell, 2001). El otro procedimiento empleado fue la electroporación (Wirth *et al.*, 1989) utilizando un equipo Gene pulser/Pulse Controller (Bio-Rad).

4. Transferencia de plásmidos por conjugación.

Los plásmidos se movilizaron por conjugación biparental siguiendo el método descrito por de Lorenzo y Timmis (1994). Los transconjugantes fueron seleccionados en LB o medio mínimo con los correspondientes antibióticos.

5. Técnicas de manipulación de DNA.

La manipulación del DNA así como otras técnicas de biología molecular fueron aplicadas esencialmente como ha sido descrito por Sambrook y Russell (2001). Las enzimas de restricción fueron suministradas por Takara y New England Biolabs. La enzima T4 DNA ligasa fue proporcionada por USB (Amershan Biosciences), la DNA polimerasa I y la polimerasa *Pfu* fueron suministradas por Biotools B. M. Labs. Todas las enzimas se utilizaron siguiendo las indicaciones de las respectivas casas comerciales. Los fragmentos de DNA se purificaron empleando geles de agarosa, usando el *GeneClean Turbo kit* (Q-BIOgene) o el *High Pure™ PCR Product Purification Kit* (Roche).

5.1. Aislamiento de DNA plasmídico.

La purificación de DNA plasmídico se realizó mediante el uso de *High Pure™ Plasmid Purification Kit* (Roche), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Para

obtener mayores volúmenes de preparaciones plasmídicas, se utilizó el *Plasmid Midi kit* (QIAGEN).

5.2. Reacción de amplificación en cadena con DNA polimerasa termorresistente (PCR).

La amplificación de fragmentos de DNA se realizó en un equipo *Mastercycler Gradient* de Eppendorf. Las enzimas que se emplearon fueron la Biotools DNA polimerasa y la DNA polimerasa Pfu, ambas proporcionadas por Biotools B. M. Labs. Las mezclas de reacción contenían MgCl₂ 1,5 mM y dNTPs 0,25 mM. Los productos amplificados se purificaron con el sistema *High Pure™ PCR Product Purification Kit* (Roche).

Los distintos oligonucleótidos empleados en las reacciones de PCR se indican en la tabla 6. Los oligonucleótidos fueron sintetizados empleando un equipo Oligo-1000M (Beckman Instruments, Inc.) en el servicio de Química de Proteínas del Centro de Investigaciones Biológicas, o bien fueron proporcionados por Sigma-Genosys.

Tabla 6. Oligonucleótidos sintéticos utilizados en este trabajo. Las secuencias subrayadas se corresponden con las dianas de restricción creadas.

Nombre	Secuencia (5' → 3')
mhpR-His5'	CGAGGAT <u>CCCGC</u> GAGAACAATGAGCAGACGG/ <i>Bam</i> HI
mhpR-His3'	CCCAAGCTTTCAACGTAATGCATGCCGC/ <i>Hind</i> III
pQE-REV	GTTCTGAGGTCATTACTGGATCT
pQE-PP	CCCCGAAAAGTGCCACCTG
PrBam	CGGGATCCTAGTTCGCCATCATCAGCCC/ <i>Bam</i> HI
PrEco	CGCGAATTCAAATCATTTACATGTTTTTAACAAAATA/ <i>Eco</i> RI
PaEco	CGCGAATTCAACATGTAAATGATTTTTTATTGTGCGC/ <i>Eco</i> RI
PaBam	CGGGATCCTAATAACATTAGACCGCGGG/ <i>Bam</i> HI
23R	GGTCTAATGTTATTAAGTATGTTAAATAAAC
23F	GTTTATTTAACATACTTAATAACATTAGACC
38R	GTCGGGCTGCTGACGGA ACTCAGC
38F	GCTGAGTTC CGTCAGCAGCCCGAC
46R	CTGCATCGCTCCACTGTGCGGCGACTG
46F	CAGTCGCCGCACAGTGGAGCGATGCAG
114R	TCCACGCTGAATGTTGATGCA
114F	TGCATCAACATTCAGCGTGGA
240R	GACCATTGAACGGGCAGCGGAA
240F	TTCCGCTGCCCGTTCAATGGTC
260R	GAAGAAGGGGCTGAATCGCAG
260F	CTGCGATT CAGCCCCCTTCTTC
264R	GTTGAATCGCAGACTATTCTGGTGGCC
264F	GGCCACCAGAATAGTCTGCGATTCAAC
Pa-Pr 5'	CGCGAATTCCGTTTTGTATTCCGTCTGC/ <i>Eco</i> RI

Pa-Pr 3'	CGCGGATCCCATTTTCAGTACCTCACGACTC/ <i>Bam</i> HI
AR5'	CGGTTTTGTATTCCGTCTGC
AR3'	CATTTTCAGTACCTCACGACTC
Lac-57	CGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGG
PrE	AAATCATTTACATGTTTTTAACAAAATA
PP6	CCGTCTGCTCATTGTTCTG
PP6R	CAGAACAATGAGCAGACGG
114	TGCATCAACATCCAGCGTGGGA
R24	AGCGGATAACAATTTACACAGGA
F24	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC
F17	GTAAAACGACGGCCAGT
MhpT5'	CCGGATCCTAAGGAGGTTGGCAATGTATCAGTCGCGATTCA CC/ <i>Bam</i> HI
MhpT3'	GGAAAGCTTAAGGCACGTCAGGCATCGGCGC/ <i>Hind</i> III
pT5'	CGGAATTCGGATATGATCGTTGACGTGGCGCTG/ <i>Eco</i> RI
pT3'	CGGGATCCATTGCCAGCCGCGTAATCAGAAC/ <i>Bam</i> HI
T1	CATAAGATGAACCTCGTTGCGAGTGC
Tpl	GTTGGTTGGCGGAATGCTGG
RT-Tp2	GGGAACACCGCAATACATCAGGC
DnaE5'	GGACGCAGTCTTTTGCCTGGTAAC
DnaE3'	GTGCGTCAAAGTCGCTGCTGTCG
RT-MhpB3	CGGTCGCGCATATGGGCATC
MhpB-1	CTCGGTGGGCTGGATAAGG

5.3. Secuenciación de DNA.

La secuenciación del DNA se llevó a cabo utilizando un secuenciador automático modelo *ABI Prism 377™ automated DNA sequencer* (Applied Biosystems Inc), en el Servicio de Secuenciación Automática de DNA del Centro de Investigaciones Biológicas. Para la reacción de secuenciación se utilizó el *Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Applied Biosystems), y la DNA polimerasa AmpliTaq FS, siguiendo las recomendaciones de los suministradores. Las reacciones se llevaron a cabo con un termociclador *Gene Amp PCR System 2400* (Perkin-Elmer) en el servicio de Secuenciación Automática de DNA del CIB.

En el caso concreto de los experimentos de extensión por cebador (*primer extension*), la secuenciación del DNA patrón se llevó a cabo según el método de terminación de la polimerización por dideoxinucleótidos (Sanger *et al.*, 1977) utilizando el *T7 Sequencing™ Kit* (Pharmacia Biotech), y [α - 32 P]dCTP ($14,8 \times 10^{12}$ Bq/mmol, $3,7 \times 10^5$ Bq/ μ l) (Amersham Biosciences) como deoxinucleósido trifosfato marcado radiactivamente, siguiendo las recomendaciones de los fabricantes.

5.4. Análisis de los datos de secuencia.

El análisis de las secuencias nucleotídicas fue realizado con el servidor Infobiogen (<http://www.infobiogen.fr/services/menuserv.html>). Las secuencias de nucleótidos y las secuencias deducidas de aminoácidos fueron comparadas con las existentes en las bases de datos mediante el uso de los algoritmos BLASTN y TBLASTN, respectivamente (Altschul *et al.*, 1990) a través del servidor del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/genom_table.cgi). La comparación de dos secuencias proteicas se realizó con el programa ALIGN (Wilbur y Lipman, 1983) y los alineamientos múltiples de secuencias, con el programa CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994). Las masas moleculares teóricas de las proteínas se calcularon con el programa Compute pI/Mw del servidor Expasy (http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html).

5.5. Mutagénesis al azar del gen *mhpR*.

Para la introducción de mutaciones al azar en la secuencia del gen *mhpR* se empleó la técnica de *error-prone* PCR descrita previamente por Bulter y colaboradores (2003) con alguna modificación. Para llevar a cabo la reacción se utilizó el equipo *Mastercycler* (Eppendorf) y la enzima AmpliTaq™ DNA polimerasa junto con el tampón II (Applied Biosystems). En la mezcla de reacción se añadió el plásmido pPAL (1 ng/μl) como molde (Tabla 5), los oligonucleótidos F24 y R24 (ambos a 0,5 mM) (Tabla 6), una concentración de dNTPs desbalanceada: ATP y GTP (ambos a 0,2 mM) y CTP Y TTP (ambos entre 0,4 y 0,6 mM), tampón II sin MgCl₂ (1x), MnCl₂ (0,2 mM), MgCl₂ (0,75 mM), DMSO (5%) y la DNA polimerasa (50 U/ml). La amplificación se llevó a cabo utilizando el siguiente programa: un ciclo de 4 min a 95 °C, 2 min a 60 °C, y 1,5 min a 72 °C y 30 ciclos de 1 minuto a 95 °C, 1 minuto a 60 °C y 1,5 min a 72 °C. Los fragmentos generados mediante esta técnica fueron purificados y clonados en el vector pUC18Not (Tabla 5).

5.6. Mutagénesis dirigida del gen *mhpR*.

La construcción de los genes *mhpR* mutantes (*mhpRN23S*, *mhpRA38T*, *mhpRT46S* y *mhpRQ240R*) se llevó a cabo mediante mutagénesis dirigida llevando a

cabo dos etapas sucesivas de PCR. En una primera etapa, se amplificó el gen dividido en dos fragmentos utilizando como molde el plásmido pPAL (Tabla 5). El primero de ellos comprende desde la secuencia que hibrida con el oligonucleótido R24 (Tabla 6) hasta la secuencia que contiene el codón donde se inserta la mutación, y es reconocida por el oligonucleótido (23F (*mhpRN23S*); 38F (*mhpRA38T*); 46F (*mhpRT46S*) o 240F (*mhpRQ240R*), todos ellos en la tabla 6). El segundo fragmento comprende el resto del gen, desde la mutación (oligonucleótido 23R (*mhpRN23S*); 38R (*mhpRA38T*); 46R (*mhpRT46S*) o 240R (*mhpRQ240R*), todos ellos en la tabla 6) hasta la secuencia que hibrida con el oligonucleótido F24 (Tabla 6) posterior al codón *stop*. En la segunda etapa de PCR se emplearon como molde los dos fragmentos obtenidos anteriormente, que solapan en la región de la mutación, y se amplificaron con los oligonucleótidos que hibridan en el inicio (R24; Tabla 6) y en el final (F24; Tabla 6) del gen *mhpR*, regenerando un gen completo que incluye la mutación deseada. Los productos de PCR así obtenidos fueron purificados y se clonaron en el vector pUC18Not (Tabla 5) empleando las dianas de restricción *EcoRI* y *HindIII*. Los plásmidos obtenidos se denominaron pPALmut23, pPALmut38, pPALmut46 y pPALmut240 (Tabla 5). La incorporación de la mutación en cada secuencia resultante fue comprobada mediante secuenciación utilizando los oligonucleótidos F24 y R24 (Tabla 6).

5.7. Mutagénesis dirigida del gen *mhpR-His*.

La construcción de los genes *mhpR-His* mutantes (*mhpR-HisN35S*, *mhpR-HisT58S*, *mhpR-HisD126N*, *mhpR-HisQ252R*, *mhpR-HisV272A*, *mhpR-HisA276T*) se llevó a cabo mediante mutagénesis dirigida desarrollando dos etapas sucesivas de PCR.

En una primera etapa, se amplificó el gen dividido en dos fragmentos utilizando como molde el plásmido pQMH (Tabla 5). El primero de ellos comprende desde la secuencia de restricción *BamHI* (extremo 5' de la secuencia) hasta la secuencia, que contiene el codón donde se inserta la mutación, reconocida por el oligonucleótido (23F (*mhpR-HisN35S*), 46F (*mhpR-HisT58S*), 114F (*mhpR-HisD126N*), 240F (*mhpR-HisQ252R*), 260F (*mhpR-HisV272A*) o 264F (*mhpR-HisA276T*), todos ellos en tabla 6). El segundo fragmento comprende el resto del gen, desde la secuencia que contiene la mutación y que es reconocida por el oligonucleótido (23R (*mhpR-HisN35S*), 46R (*mhpR-HisT58S*), 114R (*mhpR-HisD126N*), 240R (*mhpR-HisQ252R*), 260R (*mhpR-HisV272A*) o 264R (*mhpR-HisA276T*), todos ellos en tabla 6) hasta la secuencia de

restricción *Hind*III (extremo 3' de la secuencia) posterior al codón *stop*. En la segunda etapa de PCR se emplearon como molde los dos fragmentos obtenidos anteriormente, que solapan en la región de la mutación, y se amplificaron con los oligonucleótidos que hibridan en el inicio (MhpR-His 5'; Tabla 6) y en el final (MhpR-His 3'; Tabla 6) del gen *mhpR-His*, regenerando un gen completo que incluye la mutación deseada. Los productos de PCR así obtenidos fueron purificados y se clonaron en el vector pQE-32 (Tabla 5) empleando las dianas de restricción *Bam*HI y *Hind*III presentes en los oligonucleótidos MhpR-His 5' y MhpR-His 3', respectivamente. Los plásmidos resultantes se denominaron pQMHmut35, pQMHmut58, pQMHmut126, pQMHmut252, pQMHmut272 y pQMHmut276 (Tabla 5). La incorporación de la mutación en cada secuencia resultante fue comprobada mediante secuenciación utilizando los oligonucleótidos pQE-PP y pQE-REV (ambos en Tabla 6).

6. Técnicas de manipulación de RNA.

6.1. Extracción de RNA.

Las células de *E. coli* AFMC::RAL y AFSB::RAL (Tabla 4), se cultivaron a 37 °C en 50 ml de medio mínimo M63 con glicerol (20 mM) o glucosa (10 mM), en presencia o ausencia de 3HPP (1 mM) hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,8. Las células de *E. coli* MG1655 se cultivaron a 37 °C en 25 ml de medio mínimo M63 suplementado con vitamina B1 (1 µg/ml), vitamina B12 (1 µg/ml), sulfato magnésico (1 mM) y glicerol (20 mM) o 3HPP (5 mM), hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,4. Se recogieron 6 ml del cultivo por centrifugación durante 2 min a 13.000 rpm, y se resuspendieron en 100 µl de una solución de TE (Sambrook y Russell, 2001) que contenía lisozima 0,4 mg/ml (Sigma). La lisis de las células se realizó en tres ciclos de congelación (en un baño de nieve carbónica/etanol) y descongelación a 37 °C.

La extracción de RNA se realizó siguiendo las indicaciones del Kit RNeasy (Qiagen). A continuación, el RNA fue procesado para la eliminación de DNA contaminante mediante el tratamiento con el *Dnase and Removal treatment kit* (Ambion) siguiendo las especificaciones del fabricante.

6.2. Retrotranscripción seguida de reacción de PCR (RT-PCR).

Para la obtención de cDNA se utilizó 1 µg de RNA purificado, 200 U de la transcriptasa reversa *SuperScript™ II RT* (Invitrogen) y *pd(N)₆ random hexamer*

5'phosphate (3,75 μ M) (Amersham Biosciences), en un volumen final de 20 μ l y se incubó la mezcla a 42 °C durante 1 h. En la reacción de retrotranscripción desarrollada en el apartado 5.1 de Resultados, en lugar de *pd(N)₆ random hexamer 5'phosphate*, se emplearon los oligonucleótidos específicos Tp2 y RT-MhpB3' (5 pmoles) (Tabla 6). A continuación, se emplearon 5 μ l de esta reacción (cDNA) como molde para la PCR posterior. El cDNA se amplificó utilizando 1 U de la DNA polimerasa de Biotools. En cada una de las reacciones de PCR se incluye un control con 5 μ l de la reacción de RT en la que no se empleó la transcriptasa reversa, y en el que no se obtuvo ninguna banda de amplificación, lo que indica que las preparaciones de RNA no contenían DNA contaminante.

6.3. Técnica de *primer extension* o extensión con cebador.

La técnica de *primer extension* permitió determinar los sitios de iniciación de la transcripción de las regiones promotoras *Pa* y *Pr* y comprobar que ambos promotores son inducibles por CRP. Para ello, se cultivaron células de *E. coli* MC4100 (pRAL) y SBS688 (pRAL) a 37 °C en 25 ml de medio LB en ausencia y presencia de 3HPP 1 mM. Cuando las células alcanzaron una DO₆₀₀ de 0,6, se recogieron 6ml de cada cultivo que se centrifugaron, lavaron y resuspendieron para proceder a la extracción de su RNA siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente. Una vez extraído el RNA, se procedió al análisis de los sitios de inicio de la transcripción mediante la técnica de extensión por cebador. La extensión se realiza mediante un cebador que hibrida con el mRNA en una posición más o menos cercana del supuesto sitio de iniciación de la transcripción. Para la identificación de la posición +1 del promotor *Pa* se empleó el oligonucleótido Lac-57 (Tabla 6), que hibrida entre los nucleótidos 39 y 62 en posición 3' respecto al residuo de adenina del codón de inicio de la traducción del gen *lacZ*. En el caso del promotor *Pr*, se utilizó el oligonucleótido PP6 (Tabla 6) que hibrida en la región 5' del gen *mhpR* (entre los nucleótidos 4 y 22 respecto al residuo de adenina del codón de inicio de la traducción del gen *mhpR*).

Los oligonucleótidos PP6 y Lac57 fueron marcados en paralelo. En cada reacción de marcaje se emplearon 7 μ l del oligonucleótido (2,15 μ M), 2 μ l de tampón T4 polinucleótido kinasa 10x (Biolabs), 10 μ l de [γ -³²P]ATP (3.000 Ci/mmol) (Amersham Pharmacia Biotech) y 10 U de T4 polinucleótido kinasa (Biolabs) en un volumen total de 20 μ l. Esta mezcla se incubó a 37 °C durante 30 min y la reacción se

paró añadiendo 0,5 µl de SDS 10% (p/v) y 0,5 µl de EDTA 0,5 M pH 8,0. La mezcla de reacción se calentó a 65 °C durante 10 min y a continuación se añadió tampón TE hasta un volumen final de 100 µl. Finalmente los oligonucleótidos marcados fueron purificados mediante la utilización de una columna de Sephadex G-25 previamente equilibrada en tampón TE.

Se tomaron 15 µg de RNA purificado, el oligonucleótido marcado en el paso anterior (5×10^5 cpm), 10 µl de tampón acetato sódico 3 M pH 5,2 y agua destilada hasta completar un volumen final de 100 µl. La mezcla resultante fue precipitada y lavada con etanol absoluto y etanol 70%, respectivamente. Tras secar la muestra a temperatura ambiente, el pellet resultante se resuspendió en 30 µl de tampón de hibridación (PIPES 40 mM pH 6,6, formamida 1 mM, EDTA 1 mM pH 8, NaCl 0,4 M), se calentó a 85 °C durante 10 min. La muestra que contenía el oligonucleótido PP6 se dejó durante toda la noche a 30 °C, mientras que la que contenía el oligonucleótido Lac57 se dejó a 45 °C. Después de ese tiempo, se añadieron otros 70 µl de tampón de hibridación y la mezcla resultante fue precipitada con etanol absoluto y lavada con etanol 70% secándose posteriormente a temperatura ambiente.

El sedimento obtenido en el paso anterior se resuspendió en 10 µl de una mezcla de reacción compuesta por 2 µl de tampón 5x de transcriptasa reversa AMV (Promega), 3,6 µl de dNTPs 2,5 mM, 3 U de transcriptasa reversa AMV (Promega) y agua destilada hasta 10 µl. Esta mezcla se incubó 1 h a 42 °C y después de ese tiempo se detuvo la reacción añadiendo 2 µl de NaOH 2 N. La muestra se mantuvo a temperatura ambiente durante una noche y después fue precipitada añadiendo 1,5 µl de acetato sódico 3M y 30 µl de etanol absoluto. Finalmente la muestra se lavó y secó obteniéndose un sedimento que fue resuspendido en 4 µl de solución STOP (formamida 0,5% (v/v), EDTA 20 mM; azul de bromofenol 0,05% (p/v) y xilencianol 0,05% (p/v)). El resultado de la reacción fue analizado por electroforesis en gel de poliacrilamida 6%-urea 8M (Sambrook y Russell, 2001), detectándose los productos de la reacción por autorradiografía en películas HyperfilmTM-MP (Amersham Pharmacia Biotech) utilizando pantallas amplificadoras (Cronex Lightning Plus DuPont)). La secuenciación del plásmido pRAL se realizó utilizando los oligonucleótidos PP6 o Lac57, como se describe en el apartado 5.3 de esta sección.

7. Técnicas de manipulación de proteínas.

7.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE).

Las electroforesis analíticas de proteínas se realizaron en todos los casos en condiciones desnaturizantes en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS). La técnica utilizada fue la descrita por Laemmli (1970) utilizando geles de poliacrilamida en placa (PAGE) a una concentración del 12,5%. Las muestras se hirvieron durante 5 min en presencia del tampón de ruptura (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS 2%, β -mercaptoetanol 5%, glicerol 10% y azul de bromofenol (0,005%). Las electroforesis se realizaron a temperatura ambiente y a 100 V, utilizando un electrolito que contenía Tris-HCl 25 mM pH 8,8, glicina 192 mM y SDS 0,1%. Las proteínas se tiñeron con azul brillante de Coomassie R-250, según se describe por Swank y Munkres (1971). Las proteínas empleadas como marcadores de tamaño molecular se adquirieron de Bio-Rad: (miosina, 200 kDa; β -galactosidasa, 116,2 kDa; fosforilasa B, 97,4 kDa; BSA, 66,2 kDa; ovoalbúmina, 45 kDa; anhidrasa carbónica, 31 kDa; inhibidor de tripsina, 21,5 kDa; lisozima 14,4 kDa; aprotinina, 6,5 kDa) se adquirieron de Bio-Rad (marcadores Broad-Range).

7.2. Obtención de anticuerpos anti-MhpR.

Los anticuerpos frente a MhpR de *E. coli* se obtuvieron mediante inmunización de un conejo con proteína MhpR. La inmunización del animal se realizó en tres pasos, en cada uno de los cuales se inyectaron 0,1 g de proteína en tampón PBS de forma intramuscular. La primera dosis se preparó en adyuvante de Freund completo, y la segunda y tercera en adyuvante de Freund incompleto, dejando transcurrir 15 días entre cada una de ellas. Pasado este tiempo se extrae el antisuero y se limpia de restos celulares, tras eliminar el coágulo sanguíneo por centrifugación del suero a 5000 rpm, 5 min a 4 °C. Posteriormente se inactivan las proteínas del complemento incubando a 56 °C durante 15 min. Tras este tratamiento se alicuotó y congeló a -20 °C. La especificidad del antisuero obtenido se ensayó mediante Western blot.

7.3. Obtención de extractos celulares.

Los cultivos se diluyeron en 100 ml de medio LB, a partir de un preinóculo de células en fase estacionaria y se incubaron de nuevo a 37 °C hasta alcanzar una DO_{600} de 0,8-1,0. Las células se recuperaron por centrifugación a 4 °C y fueron lavadas con un volumen del tampón de ensayo correspondiente. Una vez lavadas, las células se resuspendieron en 5 ml del tampón de ensayo y se lisaron mediante el empleo de una prensa de French (Aminco Corp.) a una presión de 20.000 Psi. La suspensión obtenida se centrifugó a 14.000 rpm durante 30 min en un rotor SS-34 (Sorvall Instruments) a 4 °C. El sobrenadante se decantó cuidadosamente y se empleó como extracto celular crudo, el cual se almacenó en alícuotas a -20 °C. La determinación de la concentración de proteína se realizó empleando el método de Bradford (1976), usando albúmina de suero bovino (BSA) como patrón.

7.4. Técnica de Western blot.

Una vez sometidos a SDS-PAGE (12,5%) 2,25 µg de proteína total de extractos celulares, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Sambrook y Russell, 2001). La membrana se saturó con leche en polvo desnatada al 5% (p/v) en tampón PBS (fosfato sódico 10 mM, pH 7,4 conteniendo NaCl 140 mM) mediante incubación a 4 °C durante 12 h. Tras 3 lavados de 10 min con PBS que contenía Tween 20 al 0,1% (v/v), se incubó a temperatura ambiente con agitación suave durante 1 h en presencia de suero anti-MhpR en dilución 1/1.000. Posteriormente, se repitieron los tres lavados con PBS-Tween y la membrana se incubó durante 30 min a temperatura ambiente y agitación suave en presencia de una dilución 1/10.000 de anticuerpos ECLTM Anti-rabbit IgG (GE Healthcare). Finalmente, tras cuatro lavados con PBS-Tween, las bandas se revelaron con el sistema ECLTM Western Blotting Detection (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las membranas se expusieron en películas Hyperfilm MP (Amersham Pharmacia Biotech) durante 1 min. La cuantificación de la proteína MhpR se realizó utilizando el programa Quantity-One (Bio-Rad).

7.5. Sobreproducción y purificación de las proteínas MhpR-His nativa y mutantes.

El plásmido recombinante pQMH (Tabla 5) contiene el gen *mhpR* desprovisto de su codón de inicio de la traducción y con una secuencia añadida de 6 histidinas en su extremo 5'. La sobreproducción de esta proteína MhpR-His se realizó en una cepa de *E. coli* M15 portadora del plásmido pREP4 (Tabla 5), que contiene el gen *LacI* para el control de la expresión del gen *mhpR-His* clonado bajo el control del promotor P_{T5} en el plásmido pQMH. A partir de un preinóculo de células *E. coli* M15 (pREP4) (pQMH) en fase estacionaria, se inoculó un cultivo de 2 L a una DO_{600} inicial de 0,05 y se incubó de nuevo a 37 °C hasta alcanzar una DO_{600} de 0,6. En ese momento se indujo el cultivo añadiendo IPTG a una concentración final de 0,2 mM y se mantuvo en agitación a 37 °C durante 4 h. Transcurrido ese tiempo se recuperaron las células por centrifugación a 4 °C.

Las células se resuspendieron en un volumen de tampón X (NaH_2PO_4 50 mM pH 8, NaCl 300 mM e imidazol 100 mM) y se lisaron empleando una French-Press (Aminco Corp.) a una presión de 20.000 Psi. La suspensión obtenida se centrifugó a 13.000 rpm durante 20 min en un rotor SS-34 (Sorvall Instruments) a 4 °C. El sobrenadante se decantó cuidadosamente y se ultracentrifugó a 35.000 rpm durante 1 h en un rotor SW-41 (Beckman) a 4 °C. Al sobrenadante obtenido tras la ultracentrifugación se le añadió un 2% de sulfato de estreptomicina para precipitar el DNA presente. La mezcla resultante se mantuvo en agitación suave durante 1 h a 4 °C y después de ese tiempo fue centrifugada. El sobrenadante libre de ácidos nucleicos fue dializado frente a tampón X. La fracción dializada fue centrifugada a 13.000 rpm durante 30 min y el sobrenadante recuperado se hizo pasar a través de una columna que contenía 5 ml de *Ni-NTA Agarosa* (Qiagen), previamente equilibrada en tampón X, donde quedó retenida la proteína MhpR-His mediante interacciones de afinidad. A continuación, se lavó la columna con 3 volúmenes de tampón X manteniendo un flujo de 0,5 ml/min. Una vez realizado el lavado de la columna se procedió a la elución de la proteína unida a ésta con tampón Y (NaH_2PO_4 50 mM pH 8, NaCl 300 mM e imidazol 500 mM) manteniendo un flujo de 0,2 ml/min y se analizó la pureza de las muestras recogidas mediante SDS-PAGE. Las fracciones recogidas se dializaron frente a tampón Z (Tris-HCl 100 mM pH 7,5, KCl 500 mM y Glicerol 10%) para eliminar el imidazol. Las muestras dializadas se centrifugaron para eliminar restos de proteína precipitada durante el proceso de diálisis. Las muestras recuperadas se almacenaron finalmente a -

80 °C. Mediante este procedimiento se obtuvieron concentraciones máximas de 6-7 mg/ml.

Cuando el experimento a desarrollar requería la utilización de pequeñas cantidades de proteína, se procedió a la purificación a pequeña escala utilizando el QIAexpress Kit (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, pero empleando los mismos tampones X, Y y Z descritos en la purificación a gran escala. Mediante este segundo procedimiento se alcanzó una concentración de hasta 0,5 mg/ml de proteína purificada.

Las proteínas MhpR-His mutantes (MhpR-HisN35S, MhpR-HisT58S, MhpR-HisD126N, MhpR-HisQ252R, MhpR-HisV272A, MhpR-HisA276T) fueron purificadas tal y como se ha descrito para la proteína MhpR-His nativa.

7.6. Purificación de la proteína CRP.

A partir de un cultivo de 2 L de *E. coli* MCG11 (pBeBe), se obtuvieron 9 mg de células (peso húmedo) que fueron resuspendidas en tampón de lisis (NaH_2PO_4 20 mM pH 7,2, NaCl 20 mM, EDTA 2 mM, β -mercaptoetanol 5 mM y 5% de glicerol) y se lisaron empleando una French-Press (Aminco Corp.) a una presión de 20.000 Psi. A continuación, se centrifugó el extracto y se llevó a cabo una precipitación fraccionada de proteínas con sulfato amónico realizada en dos pasos. En un primer paso, se añadió al extracto crudo sulfato amónico al 40% de saturación. En un segundo paso, se centrifugó la mezcla obtenida y se recuperó el sobrenadante al que se le añadió sulfato amónico hasta alcanzar el 70% de saturación. Posteriormente, se centrifugó la mezcla y se recuperó el pellet que fue resuspendido en un volumen de tampón A (NaH_2PO_4 200 mM pH 7,2, EDTA 2 mM, β -mercaptoetanol 5 mM y 5% de glicerol) suplementado con NaCl 0,5 M. Esta resuspensión fue dializada, primero, frente al mismo tampón durante 2 h y después, frente al tampón A durante toda la noche. Al mismo tiempo, se empaquetó una columna con 5 ml de agarosa-cAMP (Sigma) lavada con tampón A que contenía NaCl 1 M y posteriormente equilibrada en tampón A. Al día siguiente, la fracción dializada fue centrifugada y el sobrenadante obtenido se pasó a través de la columna. A continuación, se aplicó tampón de lavado (tampón A con NaCl 300 mM) y finalmente, la proteína CRP retenida en la columna por interacción específica con cAMP, fue eluída con tampón A con NaCl 0,5 M y cAMP 5 mM. La fracción de mayor concentración contenía 0,14 mg/ml de proteína. El nucleótido cíclico (cAMP),

contenido en las fracciones de proteína eluidas, fue eliminado mediante la utilización de una columna de desalado PD-10 (Sephadex). Para ello, esta columna se equilibró con tampón A suplementado con NaCl 0,5 M y a continuación se pasó el volumen de proteína obtenida en el paso anterior. La proteína fue eluida posteriormente con tampón de elución B (NaH₂PO₄ 1 M pH 7,2, EDTA 0,2 mM, DTT 0,2 mM, KCl 0,5 M y 5% de glicerol). Finalmente, la proteína recuperada en este último paso fue dializada frente a tampón SB (NaH₂PO₄ 10 mM, pH 6,8, NaCl 100 mM y 50% de glicerol) para conservar la proteína congelada a -80 °C.

7.7. Ensayo de actividad β -galactosidasa.

Para el ensayo se emplearon células cultivadas en medio rico LB o en medio mínimo M63 en ausencia y en presencia de 3HPP 1mM. Los cultivos se incubaron a 30 °C hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,8-1,0. La actividad β -galactosidasa se analizó permeabilizando las células según el método descrito por Miller (1972), y las unidades (U) de actividad enzimática (Unidades Miller) que se presentan en este trabajo han sido calculadas teniendo en cuenta la corrección por el número de células en cada caso.

7.8. Ultracentrifugación analítica.

Los ensayos se llevaron a cabo en una ultracentrífuga analítica modelo Optima XL-A (*Beckman*) equipada con un espectrofotómetro UV-visible, con un rotor An50Ti. Para la detección del gradiente de concentración de proteína, las medidas fueron llevadas a cabo utilizando una longitud de onda de absorción de 280 nm. La concentración de proteína MhpR-His fue de 10 μ M. Los experimentos se llevaron a cabo en ausencia y presencia de 3HPP (400 y 800 μ M), a 20 °C. La velocidad fue de 50.000 rpm y el volumen de muestra fue 400 μ l. La distribución de coeficientes de sedimentación se calculó mediante el programa SEDFIT (Schuck y Rossmannith, 2000; Schuck *et al.*, 2002). Los coeficientes de sedimentación fueron corregidos por la composición del tampón utilizando el programa SEDNTERP (Laue *et al.*, 1992) para obtener los valores estándares correspondientes (en agua y a 20 °C).

Para la realización de los experimentos de velocidad de sedimentación de la proteína MhpR-His unida al DNA, se incubaron diferentes concentraciones de MhpR-His (0,4 μ M, 0,8 μ M y 1,6 μ M) junto con el fragmento de DNA (0,2 μ M). La sonda de

DNA utilizada en el ensayo abarca los promotores *Pa* y *Pr* (227 pb) (en el promotor *Pa* se encuentra la secuencia operadora de MhpR-His) y fue obtenida mediante PCR utilizando los oligonucleótidos AR5', que hibrida entre los nucleótidos 819 y 838 del *cluster mhp* dentro de la región codificante del gen *mhpR* y AR3', que hibrida entre los nucleótidos 1025 y 1045 del *cluster mhp*. Estos experimentos se llevaron a cabo en un tampón Tris-HCl 30 mM pH 7,5, KCl 100 mM y glicerol 5%. Se detectó la absorbancia a 260 nm.

Las masas moleculares de las diferentes especies obtenidas en los experimentos de velocidad de sedimentación fueron determinadas utilizando el programa SEDPHAT.

7.9. Ensayos de fluorescencia.

La intensidad de fluorescencia de MhpR-His (nativa o mutante) fue determinada a 25 °C utilizando un espectrofluorímetro *Fluorolog* y una cubeta de cuarzo de 5 mm (excitación) x 10 mm (emisión). Durante los ensayos, las muestras se mantuvieron en agitación suave para evitar una posible fotólisis de la proteína. Se utilizó una longitud de onda de excitación de 295 nm (para excitar solamente a los triptófanos) y se recogió la emisión desde 305 hasta 400 nm utilizando una amplitud de banda de excitación y emisión de 1 nm y 5 nm, respectivamente. Las muestras de proteína fueron diluidas hasta una concentración final de 500 nM en un tampón Tris-HCl 20 mM pH 7,5 y KCl 100 mM. Los compuestos 3HPP, DHPP y PP (preparados en el mismo tampón) fueron añadidos a la muestra de proteína de 1 en 1 µl desde 10 hasta 100 µM en un volumen total de reacción de 1 ml. Con objeto de evitar cualquier efecto de filtro interno, se valoraron las absorbancias de las soluciones de ligando a 295 nm y 340 nm, siendo éstas inferiores a 0,020 y 0,005, respectivamente. Todos los espectros fueron corregidos por la emisión del tampón, del ligando libre (concentración correspondiente) y dilución de la muestra. El *quenching* de la proteína causado por la unión del ligando fue analizado con un modelo de unión a un único sitio, empleando la siguiente función: $F = I - (I - F_{min}) (K_b[L]_{Libre}) / (1 + K_b[L]_{libre})$, donde F_{min} representa el valor de fluorescencia mínima, K_b representa la constante de asociación y $[L]_{libre}$ representa la concentración de ligando libre. Los datos experimentales se ajustaron a esta función utilizando el programa Sigma Plot, lo que permitió la determinación de los valores de las constantes de asociación y *quenching* máximo para los diferentes efectores.

7.10. Dicroísmo circular (CD).

Las medidas de dicroísmo se realizaron en un espectropolarímetro *Jasco J-715*. En los ensayos se utilizó una cubeta de cuarzo de 0,1 cm de paso óptico en la que se introdujo 0,2 ml de muestra. La concentración de proteína MhpR-His (nativa o mutante) utilizada en los ensayos fue 6,5 μM que fue diluida en un tampón fosfato potásico 20 mM pH 7,5 y KCl 100 mM. Los compuestos 3HPP y PP se prepararon en el mismo tampón y cuando se requería, se añadieron a una concentración 1 mM. Los espectros de CD de las proteínas fueron generados a 20 °C en el ultravioleta lejano (260-200 nm) utilizando una amplitud de banda de 1 nm, una respuesta de 4 segundos y una velocidad de 20 nm/min. Se acumularon cinco espectros en cada ensayo y al espectro resultante se le sustrajo el espectro del tampón de ensayo sin o con ligando, según el experimento. Los ensayos de desnaturalización térmica se llevaron a cabo utilizando las mismas muestras empleadas anteriormente que, en este caso, se recubrieron con un aceite mineral. Se determinó la señal de CD a 220 nm mientras aumentaba la temperatura en el soporte de la cubeta controlada por un Peltier (accesorio controlador de la temperatura) desde 5 °C hasta 90 °C a una velocidad de calentamiento de 50 °C/h. Para obtener información estructural, los espectros de CD fueron analizados mediante tres programas diferentes: CONTIN, (Provencher y Glockner, 1981); SELCON, (Sreerama y Woody, 2000) y CDNN (Böhm *et al.*, 1992).

7.11. Modelado tridimensional de MhpR.

Las estructuras tridimensionales de las proteínas MhpR, MhpRQ240R y MhpRQ260V se modelaron usando el programa Swiss PDB Viewer 3.7 (Guex y Peitsch, 1997). El molde utilizado fue la proteína RHA06195, que es un posible regulador transcripcional de *Rhodococcus* sp. RHA 1 (código PDB: 2IA2). La proteína MhpR muestra una similitud de secuencia de un 50% y una identidad del 29% con RHA06195. El modelo inicial se optimizó posteriormente por sucesivos pasos de minimización de energía. La identificación del sitio de unión al ligando se realizó mediante comparación de la región de unión de la proteína IclR de *E. coli* (Lorca *et al.*, 2007; códigos PDB: 1TD5, 2099 y 209A). Las moléculas de 3HPP se generaron usando el programa ChemOffice 8.0 (CambridgeSoft) y se introdujeron de manera manual en el

modelo del tetrámero de MhpR usando RASTOP 2.0.2. Las figuras se realizaron con los programas RASMOL 2.7.1 (Bernstein, 2000) y PyMOL (DeLano, 2002).

7.12. Modelado de la estructura tridimensional de la proteína MhpR-His en solución mediante SAXS (*small angle X-ray scattering*).

La dispersión de rayos X con longitudes de onda del orden de 0,1 nm se utiliza para la caracterización estructural de la materia. Mediante SAXS un haz de rayos X incide sobre una muestra generando un perfil de dispersión que es detectado por un detector y contiene información sobre la estructura de la muestra. Esta metodología permite investigar la organización en dominios de proteínas modulares o monitorizar los diferentes estados conformacionales cuando impliquen cambios de tamaño y forma de la proteína.

Para el análisis de la proteína MhpR-His se utilizaron 0,5 ml a una concentración 4,5 mg/ml, diluida en un tampón Tris-HCl 100 mM pH 7,5, KCl 500 mM y 10% glicerol. La toma de datos se llevó cabo en el sincrotrón de la estación 2.1 de Daresbury (Reino Unido). La cámara se ajustó en un rango de vectores de dispersión (definido como el recíproco del espaciado de Braggs, es decir, $2 \sin\Phi/\lambda_r$) desde 0,05 hasta $0,5 \text{ nm}^{-1}$ aproximadamente. Los valores absolutos del vector de dispersión se obtuvieron tomando como referencia los valores del vector S de los órdenes de la repetición de 67 nm del colágeno de cola de rata hidratado. La temperatura de las muestras seleccionada fue 4 °C y los perfiles de dispersión de rayos X se registraron en intervalos de tiempo desde 15 a 60 segundos.

El procesamiento de datos fue llevado a cabo utilizando un paquete de programas proporcionado por el *Collaborative Computational Project for Fibre Diffraction and Solution Scattering* (www.ccp13.ac.uk/software/software.htm). Los datos se normalizaron antes de ser procesados por la intensidad del haz de luz y la respuesta del detector. Los intervalos de tiempo que mostraban un daño de la proteína por radiación se eliminaron antes de calcular el promedio. El radio de giro (R_g), la intensidad de dispersión hacia adelante (I_0) y la función de distribución de distancias entre cada par de átomos ($P(r)$) se calcularon a partir de los datos de dispersión experimentales utilizando el programa GNOM (Svergun, 1992). El valor del diámetro máximo de la partícula, D_{max} , se determinó empíricamente examinando la calidad del ajuste a los datos experimentales para un rango de valores de D_{max} . La envoltura de baja

resolución de la proteína fue modelada *ab initio* utilizando un programa basado en algoritmos genéticos (DALAI_GA) (Chacón *et al.*, 1998 y 2000). Se generaron 10-15 modelos que se superpusieron y alinearon por parejas con SUPCOMB (Volkov y Svergun, 2003). Los modelos más divergentes fueron descartados y la estructura más probable se determinó a partir de los modelos restantes. El modelo con discrepancia espacial promedio más baja fue considerado como el más probable, mientras que aquellos con discrepancias mayores se descartaron. Las estructuras alineadas seleccionadas fueron posteriormente promediadas y filtradas utilizando los programas DAMAVER y DAMFILT, respectivamente (Volkov y Svergun, 2003). El volumen excluido promedio de DAMMAVER se utilizó como punto de exclusión para DAMFILT. El procesamiento de datos de la dispersión en solución y el Radio de giro (R_g) de los modelos atómicos se realizó utilizando el programa CRY SOL (Svergun *et al.*, 1995).

El modelo tridimensional de la proteína MhpR se ajustó dentro de la envoltura de baja resolución obtenida a partir de los mejores resultados promedio utilizando SITUS (Wriggers y Chacón, 2001). Las mejores posiciones ajustadas fueron refinadas aún más utilizando una herramienta de ajuste basada en el programa ADP-EM (Garzón *et al.*, 2007). Esta herramienta lleva a cabo un análisis de tipo Monte Carlo sobre las coordenadas internas para maximizar la densidad de solapamiento entre la envoltura de SAXS y el modelo atómico flexionado.

Los valores de correlación-cruzada se mejoraron desde 0,82 (se corresponde con la posición inicial del cuerpo-rígido) hasta 0,91. Se utilizó el programa *USCF Chimera* (Pettersen *et al.*, 2004) para visualizar las estructuras ajustadas (Fig. 23).

8. Ensayos de unión DNA-proteína.

8.1. Marcaje de sondas con ^{32}P .

Mediante este método se marcó el oligonucleótido Lac57. Para la reacción de marcaje se emplearon 2,5 μl del oligonucleótido (2 μM), 1,25 μl de tampón kinasa 10x (Biolabs), 3 μl de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (3000 Ci/mmol) (Amersham Pharmacia Biotech) y 10 U de T4 polinucleótido kinasa 10 U/ μl (Biolabs) en un volumen total de 10 μl . La mezcla de reacción se incubó 30 min a 37 °C. Al término de la incubación se comprobó el nivel de incorporación del nucleótido radiactivo al oligonucleótido mediante una cromatografía en capa fina (TLC). Para ello se depositaron 0,5 μl de la sonda marcada

sobre una membrana de sílica gel 60 (Merck) utilizando HCl 1 N como fase móvil. A continuación se realizó una autorradiografía empleando una película *Hyperfilm™ MP* (Amersham Pharmacia Biotech). Una vez marcado el oligonucleótido de interés se obtuvo mediante PCR el fragmento PA-PR (274 pb) utilizando como molde el plásmido pRAL (Tabla 5) y los oligonucleótidos PP6 y Lac57. En este caso la reacción de PCR difiere de la descrita en el apartado 5.2 de esta sección. Se añadieron 10 µl del oligonucleótido marcado (5 pmoles), 7,5 µl del oligonucleótido frío a 1 µM (7,5 pmoles), 4 µl de dNTPs a 2,5 mM (0,2 mM final), 5 µl de tampón Pfu 10x, 1 µl de *Pfu*, 1 µl de DNA molde (10 ng/µl), en un volumen final de 50 µl. A continuación se cargaron 3 µl de la reacción de PCR en un gel de acrilamida al 7,5% para comprobar la cantidad y el tamaño del fragmento de DNA obtenido. Una vez terminada la electroforesis el gel se tiñó con bromuro de etidio, se secó y a continuación se expuso en una película *Hyperfilm MP* (Amersham Pharmacia Biotech) durante aproximadamente 1 min.

8.2. Ensayos de retardo en gel.

En los ensayos de unión de MhpR-His (nativa o mutante) a la sonda PA-PR, las mezclas de reacción contenían Tris-HCl 30 mM pH 7,5, KCl 100 mM, β-mercaptoetanol 2 mM, glicerol 10%, 1 nM de sonda PA-PR (marcada mediante el método descrito en el apartado anterior), 50 µg/ml seroalbúmina bovina, 50 µg/ml DNA esperma de salmón, la proteína MhpR-His (nativa o mutante, todas purificadas en este trabajo) y, cuando se ensayó la unión DNA-proteína en presencia de ligando, se añadió 3HPP (0,5 mM) o PP (0,5 mM) o ambos (cada uno a 0,25 mM) en un volumen final de 10 µl.

Después de incubar las diferentes mezclas de reacción durante 20 min a 25 °C, las muestras se analizaron por electroforesis en gel no desnaturizante de poliacrilamida al 4%. Los geles se corrieron en cubetas de electroforesis “Miniprotein II” (Bio-Rad) a 120 V en tampón TBE (Tris-borato 45 mM pH 8,3 y EDTA 1 mM) a temperatura ambiente. En los ensayos de retardo en gel en los que se ensayó la proteína CRP se añadió al tampón TBE, cAMP 200 µM. Los geles se secaron al vacío sobre papel Whatman 3MM y se expusieron en películas *Hyperfilm MP* (Amersham Pharmacia Biotech). La cuantificación de los complejos DNA-proteína se realizó utilizando el programa Quantity-One (Bio-Rad).

8.3. Ensayos de protección frente a la digestión con DNasa I (*footprinting*).

Para los experimentos de *footprinting* con DNasa I se amplificó por PCR el fragmento PA-PR utilizando PP6 (Tabla 6) como oligonucleótido frío y Lac57 (Tabla 6) como oligonucleótido marcado (procedimiento descrito en el apartado 8.1 de esta sección) para marcar el extremo 3' de dicho fragmento. La obtención de la sonda PA-PR con los oligonucleótidos Lac57-marcado y PP6-frío nos permitió realizar experimentos de *footprinting* con la región promotora *Pa-Pr*. Una vez purificada la sonda se formaron los complejos proteína-DNA durante 20 min a 25 °C en 12 µl de tampón (Tris-HCl 30 mM pH 7,5, KCl 100 mM, β-mercaptoetanol 2 mM, MgCl₂ 5 mM y glicerol 10%) que contenía: 1 nM del fragmento PA-PR, cAMP 200 µM, BSA 500 µg/ml y las proteínas CRP (200 nM) y *E. coli RNA Polymerase Holoenzyme* (1 U/µl; Epicentre) (100 nM). Transcurrida la incubación se añadieron 3 µl de solución DNasa I (1µg/ml (marca DNasa I) en Tris-HCl 10 mM pH 7,0, MgCl₂ 10 mM, CaCl₂ 10 mM y KCl 125 mM) y se incubó a 37 °C durante 20 s. La reacción se paró al añadir 180 µl de la solución DNasa STOP, que contiene acetato sódico 0,4 M, EDTA 2,5 mM, tRNA 50 µg/ml y 5 µg/ml de DNA de esperma de salmón. Las muestras se trataron con fenol/cloroformo/alcohol isoámilico y posteriormente fueron precipitadas y lavadas con etanol absoluto y etanol 70%, respectivamente. Las muestras se secaron, se resuspendieron en tampón de carga (formamida al 98%, EDTA 10 mM pH 8,0 y cantidades traza de azul de bromofenol y azul de xilencianol) y se desnaturalizaron por incubación a 95 °C durante varios min. Posteriormente se analizaron en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 6% (v/v)-urea 8 M. Los geles se secaron al vacío sobre papel Whatman 3MM y se expusieron en películas Hyperfilm™ MP (Amersham Pharmacia Biotech). La secuenciación del fragmento PA-PR se llevó a cabo mediante el método A+G descrito por Maxam y Gilbert (1977).

8.4. Ensayo de *footprinting* con permanganato potásico (KMnO₄).

Mediante estos ensayos se puede observar el complejo abierto formado por la RNA polimerasa en estadios muy tempranos del inicio de la transcripción (Sasse-Dwight y Gralla, 1989). Se trata de un ensayo de *footprinting* en el cual el permanganato potásico reacciona con residuos de timina en regiones de DNA

monocatenario, es decir, aquellas regiones en las que se está produciendo el complejo abierto debido a la iniciación de la transcripción. Para realizar el *footprinting* de permanganato se obtuvieron los complejos DNA-proteína de la misma forma que en el apartado anterior. En este caso se utilizaron las proteínas MhpR-His (100 nM), CRP (200 nM) y *E. coli RNA Polymerase Holoenzyme* (1 U/ μ l; Epicentre) (100 ó 200 nM). Se comenzó la reacción cuando se añadieron a los 15 μ l de complejo DNA-proteína, 2,5 μ l de KMnO_4 40 mM incubándose durante 30 s a 37° C. Se paró la reacción con 2 μ l de una solución β -mercaptoetanol 2 M. El tratamiento posterior de la muestra es idéntico que para el footprinting de DNasa I. Una vez precipitadas las muestras con etanol se resuspendieron en 150 μ l de piperidina 10% (v/v) y se incubaron durante 30 min a 90 °C. Después la piperidina se evaporó en una Speed Vac (Pacisa) y se lavó dos veces con 20 μ l de agua destilada. La cuantificación de las bandas obtenidas (complejo abierto) se realizó utilizando el programa Quantity-One (Bio-Rad).

8.5. Ensayos de transcripción *in vitro*.

Todas las soluciones se prepararon con agua destilada que contenía el inhibidor de RNasa dietilpicrocarbonato (DEPC) (Sigma) y fueron filtradas antes de su uso. El tampón utilizado para la reacción contenía Tris-HCl pH 7,5 40 mM, MgCl_2 10 mM y KCl 100 mM. El volumen final de la mezcla de reacción fue de 12 μ l que contenían DNA plasmídico 5 nM, cAMP 200 μ M y BSA a 500 μ g/ml. Además se añadieron las proteínas de interés en cada caso, diluidas previamente en el tampón anteriormente mencionado que contenía además ditiotretitol 2 mM y BSA a 500 μ g/ml, en las siguientes concentraciones finales: CRP (25, 50, 100, 150 ó 200 nM) y MhpR-His nativa o mutante (25 ó 100 nM; preparada junto con cualquier ligando 3HPP, DHPP o PP por separado o con uno de los dos primeros combinados con el tercero, a una determinada concentración según el experimento). Se incubó esta mezcla a 37 °C durante 10 min y después se añadieron 3 μ l de *E. coli RNA Polymerase Holoenzyme* 375 nM (1 U/ μ l; Epicentre) también diluida en el mismo tampón. Posteriormente se incubó la muestra durante 5 min para permitir la formación de los *complejos abiertos*. La elongación de la cadena de RNA naciente comenzó al añadir 3 μ l (15 μ l en total) de una mezcla que contiene ATP, CTP y GTP 1 mM, 500 μ g/ml de heparina (sólo en experimentos *single round*, para permitir que la RNA polimerasa hiciera una única

ronda de transcripción) y 1 μCi de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ UTP (Amersham Biosciences). Se paró la reacción al cabo de 5 min con 10 μl de una solución que contenía formamida al 80% (v/v), EDTA 20 mM, azul de bromofenol y azul de xilencianol. Las muestras se calentaron a 70 °C antes de cargar 7 μl de las mismas en un gel desnaturizante de poliacrilamida 6% (v/v)-urea 8 M. La electroforesis se desarrolló a 60 W. Los geles se secaron al vacío sobre papel Whatman 3MM y se expusieron en películas Hyperfilm™ MP (Amersham Pharmacia Biotech). La cuantificación de las bandas correspondientes a los transcritos se realizó mediante el programa Quantity One (Bio-Rad).

IV. RESULTADOS

Como se ha mencionado en el apartado 2.2 de la Introducción, el *cluster mhp* está sometido a una regulación global mediada por la proteína receptora de cAMP (CRP) y a una regulación específica controlada por la proteína activadora MhpR. El objetivo principal de esta tesis ha sido profundizar en el mecanismo de acción de la proteína MhpR, a nivel específico y de CRP, a nivel global.

1. Estudio de la regulación específica del *cluster mhp*.

En este capítulo abordamos el estudio de la regulación específica del *cluster mhp* mediada por la proteína MhpR.

1.1. Clonación e hiperproducción de la proteína MhpR-His.

Para llevar a cabo ensayos *in vitro* con MhpR era necesario disponer de un sistema de hiperproducción y purificación de esta proteína reguladora. A partir del plásmido pPAL (Tabla 5) se amplificó por PCR el gen *mhpR* sin su codón de inicio (ATG) y se subclonó en el plásmido pQE32 (Tabla 5), portador de un promotor artificial del fago T5, que contiene dos regiones operadoras *lac* y una secuencia “tag” que codifica 6 histidinas, y permite la producción de una proteína recombinante que puede ser purificada mediante cromatografía de afinidad en columnas de Ni-NTA (Fig. 7). El plásmido resultante, pQMH (Tabla 5) contiene clonado un gen *mhpR* recombinante (*mhpR-His*) cuyo extremo 5' codifica una secuencia de 13 aminoácidos nuevos (MRGSHHHHHHGIP) fusionada en fase al segundo residuo de la proteína MhpR nativa (Fig. 7). El plásmido pQMH fue introducido en células de *E. coli* M15 portadoras del plásmido pREP4 (Tabla 5) que produce el represor LacI necesario para el control estricto de la expresión génica cuando se emplean promotores que contienen regiones operadoras *lac*. La cepa *E. coli* M15 (pREP4, pQMH) se seleccionó en medio LB con ampicilina y kanamicina.

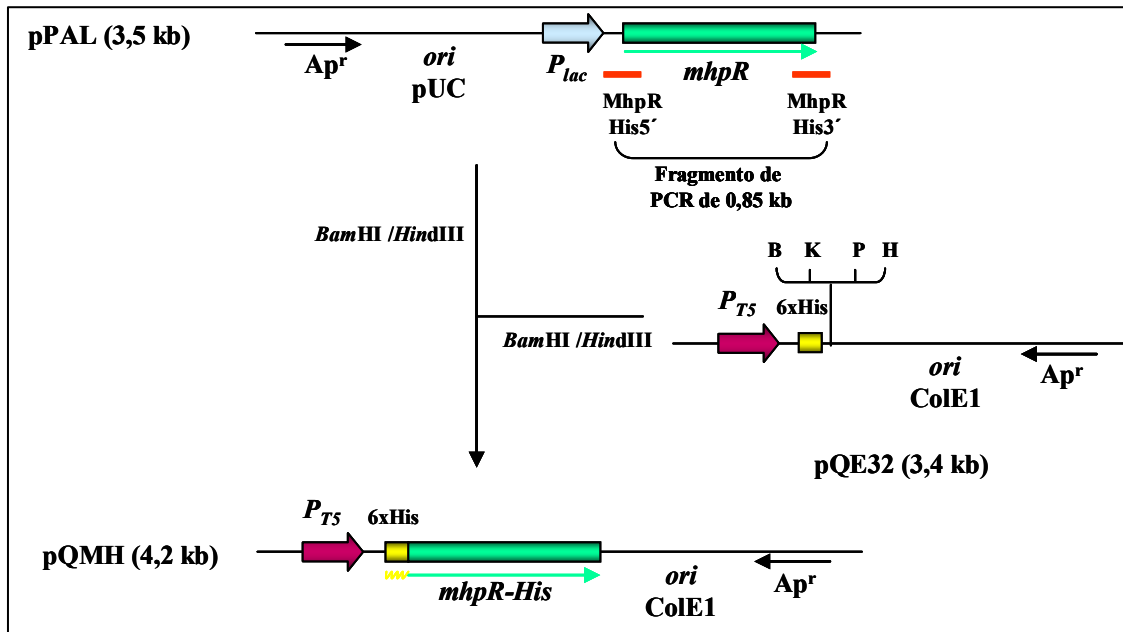


Figura 7. Construcción del plásmido pQMH. Con flechas se indica el sentido de la transcripción de los genes. En verde se indica el gen que codifica el regulador transcripcional *mhpR* y en amarillo, la secuencia “tag” que codifica 6 histidinas. Con flechas de color azul y morado se representan los promotores P_{lac} y P_{T5} , respectivamente. Se indican en rojo los oligonucleótidos MhpR-His5' y MhpR-His3' (Tabla 6) utilizados para la amplificación por PCR, del gen *mhpR*. En la figura se señalan los orígenes de replicación, *ori*pUC y *ori*ColE1 y las dianas de restricción *Bam*HI (B), *Hind*III (H), *Kpn*I (K), y *Pst*I (P). Ap^r indica el gen que confiere resistencia a ampicilina.

El análisis de un extracto celular de *E. coli* M15 (pREP4, pQMH) mediante SDS-PAGE reveló la existencia de una banda de hiperproducción localizada por encima del marcador de peso molecular de 31 kDa, que concuerda perfectamente con la masa molecular teórica de MhpR-His calculada a partir de la secuencia de aminoácidos (32,7 kDa).

Dado que la proteína MhpR-His posee una fusión de 13 aminoácidos en su extremo N-terminal que podría afectar la función de este regulador, se procedió a confirmar su actividad *in vivo*. Para ello, se transformó *E. coli* AFMC::AL (Tabla 4) con el plásmido pQMH. La cepa resultante junto con la cepa de *E. coli* AFMC::AL (pPAL) (cepa control) fueron cultivadas en medio mínimo M63 en ausencia y presencia de 3HPP (1 mM) para la realización de ensayos de actividad β -galactosidasa. Ambas cepas contienen en monocopia la fusión traduccional AL (*Pa*::*lacZ*) (Torres *et al.*, 2003) (Fig. 8A) y en multicopia el gen *mhpR* bajo el control de promotores heterólogos, P_{T5} (en el plásmido pQMH) y P_{lac} (en el plásmido pPAL), (Fig. 7). Los resultados obtenidos mostraban que la inducción de la fusión AL producida en presencia de 3HPP en ambas cepas era semejante (Fig. 8B). Estos datos sugerían que la proteína MhpR-His tenía una

actividad similar sobre el promotor *Pa* que la mostrada por la proteína MhpR original, por lo que se procedió a purificar la proteína MhpR-His para la realización de los ensayos *in vitro*.

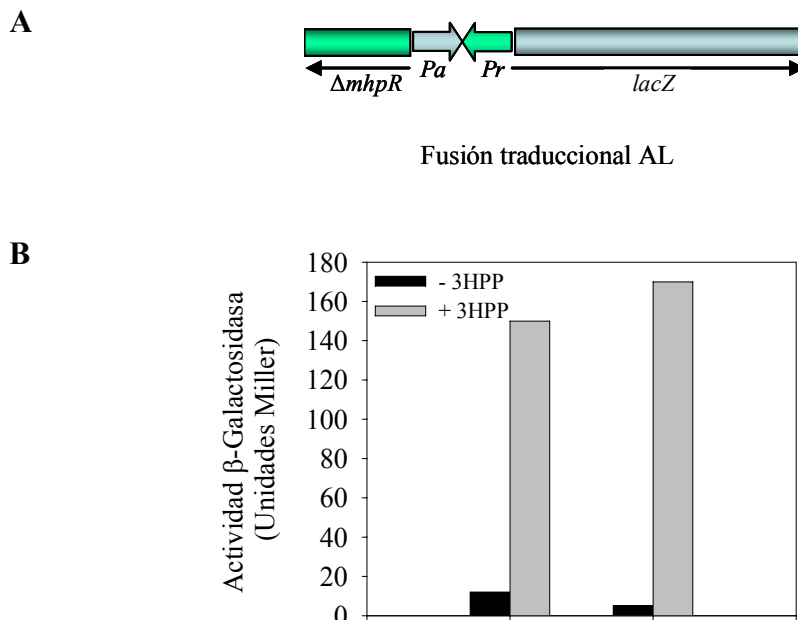


Figura 8. A) Esquema de la fusión traduccional AL (*Pa::lacZ*). Las flechas indican la dirección de la transcripción de los genes. $\Delta mhpR$, indica el gen *mhpR* deletado. **B) Comparación de la actividad β -galactosidasa de las cepas *E. coli* AFMC::AL (pPAL) y AFMC::AL (pQMH).** Estas cepas se cultivaron en medio mínimo M63 con glicerol 20 mM en ausencia (en barras negras) o en presencia (en barras grises) de 3HPP (1mM). Los ensayos de actividad β -galactosidasa se realizaron como se indica en el apartado 7.7 de Materiales y Métodos utilizando cultivos en fase exponencial de crecimiento (DO_{600} 0,9). Se muestran los resultados de un experimento, pero estos resultados fueron reproducibles en tres experimentos distintos.

1.2. Purificación de la proteína MhpR-His.

La purificación de MhpR-His se llevó a cabo a partir de células de *E. coli* M15 (pREP4, pQMH) que fueron cultivadas en LB e inducidas en presencia de IPTG. Una vez inducidas, las células se recuperaron mediante centrifugación y se obtuvo un extracto crudo a partir del cual se purificó la proteína como se detalla en Materiales y Métodos. La concentración de proteína pura contenida en las fracciones purificadas se estimó mediante espectrofotometría a DO_{280} , teniendo en cuenta el coeficiente de extinción molar teórico de la proteína a 280 nm de $30.560 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$. Se obtuvieron concentraciones máximas de 6 mg/ml. Como se muestra en la figura 9, la proteína MhpR-His se purificó a homogeneidad electroforética.

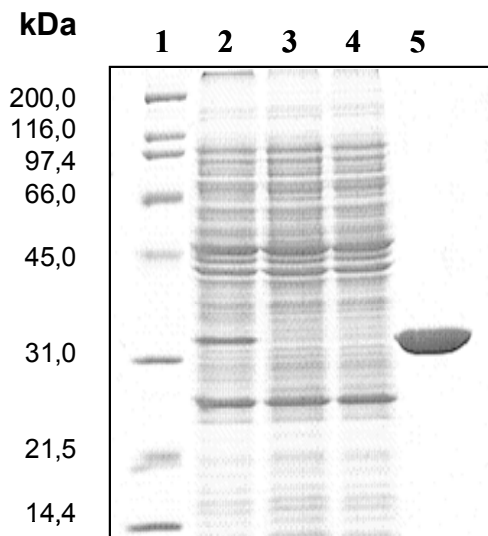


Figura 9. Análisis por SDS-PAGE de las distintas fracciones obtenidas en el proceso de purificación de MhpR-His. Calle 1, marcadores de peso molecular (en el margen izquierdo de la figura se detallan los pesos moleculares (en kDa) de los marcadores); calle 2, fracción soluble de un extracto celular de *E. coli* M15 (pREP4, pQMH); calle 3, fracción proteica no retenida en la columna de purificación Ni-NTA; calle 4, fracción proteica eluida con el tampón de lavado y calle 5, proteína MhpR-His eluida con imidazol 500 mM. La posición de la proteína MhpR-His se indica con una flecha.

1.3. Estudio de la interacción de la proteína MhpR-His con la región intergénica *mhpR-mhpA*.

Ensayos publicados previamente (Torres *et al.*, 2003) demostraron la capacidad de unión de extractos proteicos que contenían la proteína MhpR hiperproducida a la región intergénica *mhpR-mhpA* (PA-PR). Para determinar si la proteína MhpR-His recombinante, una vez purificada, conservaba la capacidad de unión a dicho promotor, se realizaron ensayos de retardo en gel utilizando como sonda de DNA marcada radiactivamente, el fragmento PA-PR y concentraciones crecientes de proteína MhpR-His purificada (0,5-80,0 nM) (Fig. 10).

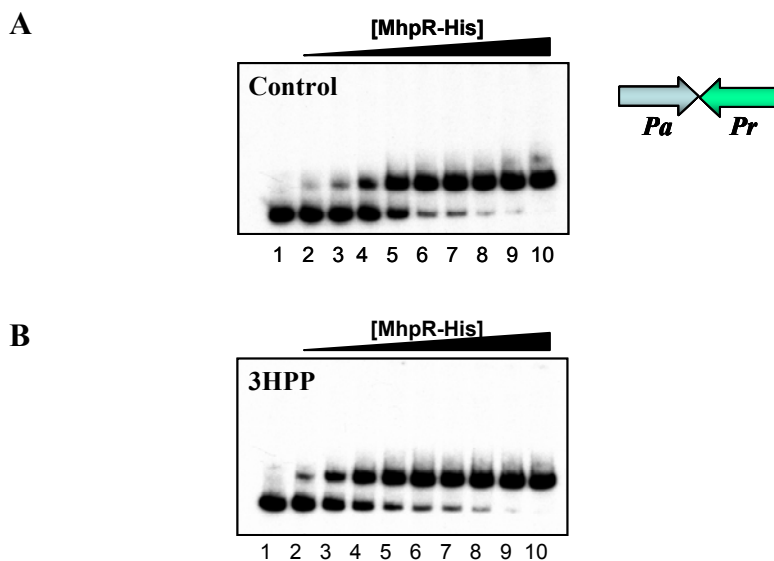


Figura 10. Ensayos de retardo en gel de la proteína MhpR-His purificada con la región intergénica *mhpR-mhpA* (PA-PR) en ausencia (A) y presencia (B) de 3HPP (0,5 mM). Se ensayaron concentraciones crecientes de MhpR-His: calle 1 (0 nM), calle 2 (0,5 nM), calle 3 (1 nM), calle 4 (2,5 nM), calle 5 (5 nM), calle 6 (7,5 nM), calle 7 (10 nM), calle 8 (20 nM), calle 9 (40 nM) y calle 10 (80 nM). Se muestra un esquema de la sonda PA-PR utilizada en los ensayos.

Mediante estos ensayos se comprobó que MhpR-His se une de forma específica a la región intergénica *mhpR-mhpA* tanto en ausencia (Fig. 10A) como en presencia de 3HPP (0,5 mM) (Fig. 10B). En ambos casos, se determinó el valor de la constante de disociación (K_d) de formación del complejo MhpR-His/DNA mediante densitometrado de las marcas detectadas. En ausencia de inductor, la K_d calculada fue 4,5 nM mientras que en presencia de éste, fue 1,5 nM. Como se esperaba, la afinidad de MhpR-His por el DNA es mayor si el 3HPP está presente en la mezcla de reacción al producirse un retraso completo de la sonda marcada a una concentración de proteína inferior a la necesaria sin inductor (Figs. 10A y 10B). En definitiva, estos resultados demuestran que la adición de un *tag* de histidinas en el extremo N-terminal de la proteína MhpR no altera la capacidad de unión al DNA y además, la unión MhpR-His/DNA está favorecida en presencia de 3HPP.

1.4. Análisis biofísico de la proteína MhpR-His mediante ultracentrifugación analítica.

Con el fin de valorar la homogeneidad de una muestra de proteína MhpR-His, se determinó el perfil de distribución de coeficientes de sedimentación mediante velocidad de sedimentación. Para ello se analizó una muestra a 15 μ M. La distribución de coeficientes de sedimentación (Fig. 11) muestra como la totalidad de MhpR-His sedimenta como una única especie molecular con un coeficiente de sedimentación de 4,25 S, compatible con un dímero de la proteína.

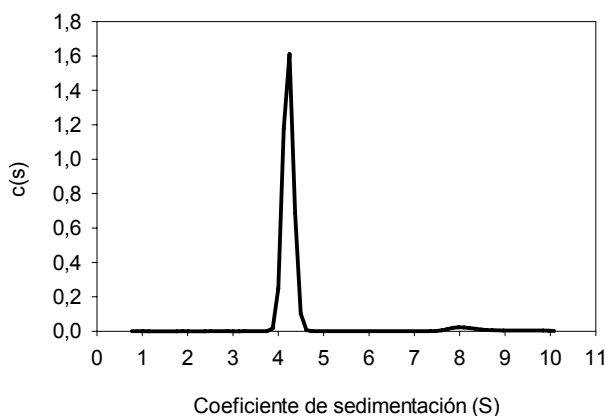


Figura 11. Determinación del coeficiente de sedimentación de MhpR-His. Distribución continua de concentraciones representada frente al coeficiente de sedimentación tras el análisis mediante velocidad de sedimentación. Las velocidades y condiciones empleadas en el ensayo se detallan en el apartado 7.8 de Materiales y Métodos.

Para determinar si el coeficiente de sedimentación de la proteína MhpR-His cambia en presencia de inductor se realizó otro experimento de velocidad de sedimentación en el que se utilizó una concentración de proteína 10 μM en ausencia y presencia de 3HPP a 400 μM y 800 μM . Los perfiles de distribución de coeficientes de sedimentación obtenidos en presencia de 3HPP fueron idénticos al perfil registrado en ausencia de éste. Así, en las muestras de proteína analizadas en presencia de ligando, se detectó una única especie en solución también compatible con una estructura dimérica. Por tanto, en las condiciones ensayadas, la unión del ligando 3HPP a la proteína MhpR-His no altera el coeficiente de sedimentación de la proteína reguladora.

Con objeto de identificar el coeficiente de sedimentación de MhpR-His cuando se encuentra unida específicamente al DNA se realizó otro experimento de velocidad de sedimentación. Se sometieron a ultracentrifugación muestras de DNA (sonda PA-PR) en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de proteína MhpR-His. La concentración de sonda PA-PR utilizada en el ensayo fue de 0,2 μM . Durante la ultracentrifugación, se hizo un seguimiento de la absorbancia de las muestras a 260 nm, longitud de onda a la cual la absorción de las muestras es debida fundamentalmente al DNA. Al final del proceso, en la muestra que contenía sólo DNA se pudo identificar un pico con un coeficiente de sedimentación de 6,22 S (Fig. 12, en línea continua). En las muestras de DNA con proteína se identificaron dos picos, uno de ellos correspondiente al DNA libre y el otro, correspondiente al complejo MhpR-His/PA-PR, con un coeficiente de sedimentación 7,42 S (Fig. 12, en línea discontinua). La altura del segundo pico fue mayor cuando la relación DNA:proteína ensayada fue de 1:4, lo que podría ser compatible con que la proteína se une al DNA en forma de tetrámero (Fig. 12B). Cuando la relación DNA:proteína en la mezcla fue de 1:8 (Fig. 12C) la altura del segundo pico fue menor, apareciendo un tercer pico con un coeficiente de sedimentación de 8,8 S. Se detectó un perfil idéntico cuando la relación DNA:proteína ensayada fue 1:10 (datos no mostrados). De acuerdo con esto, en los ensayos de retardo en gel mostrados anteriormente (Fig. 10A) se detectó un segundo complejo DNA-proteína minoritario cuando la relación DNA:proteína ensayada fue 1:40 y 1:80 (en las calles 9 y 10) que podría corresponderse con el tercer pico detectado mediante

ultracentrifugación analítica. Entre ambos experimentos existen algunas diferencias. El volumen de reacción empleado en los ensayos de retardo en gel fue de 9 μ l mientras que en los ensayos de ultracentrifugación analítica fueron 400 μ l. Además, en los ensayos de retardo en gel, y no en los experimentos de ultracentrifugación analítica, las mezclas de reacción contenían seroalbúmina bovina, cuya presencia puede simular al ambiente celular, y DNA inespecífico, al que pueden unirse inespecíficamente moléculas de proteína. Por tanto, la relación DNA:proteína necesaria para la formación de este segundo complejo DNA-proteína podría depender del volumen de reacción y de la presencia o ausencia de BSA y DNA inespecífico.

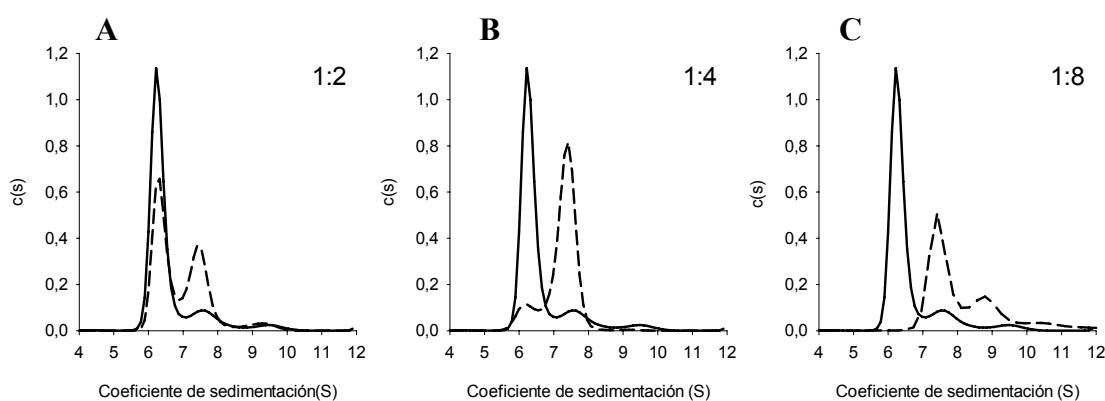


Figura 12. Análisis de la unión de MhpR-His a la sonda PA-PR mediante velocidad de sedimentación. Se representa la distribución continua de concentraciones frente al coeficiente de sedimentación tras el análisis mediante velocidad de sedimentación. Se muestra en línea continua, la distribución de coeficientes de sedimentación de la sonda PA-PR y en línea discontinua, la de la mezcla MhpR-His/PA-PR. La relación DNA:proteína ensayada fue 1:2 (panel A), 1:4 (panel B) y 1:8 (panel C). El experimento se realizó a 48.000 rpm y a 20 °C.

No pudo realizarse el experimento de velocidad de sedimentación en presencia de inductor 3HPP dado que éste interfiere en la medida de absorbancia a 260 nm. Sin embargo, en los ensayos de retardo en gel realizados con la sonda PA-PR y la proteína MhpR-His y que fueron llevados a cabo en ausencia y en presencia de 3HPP (Fig. 10), observamos una banda con movilidad electroforética retardada y siempre a la misma altura. Este hecho sugiere que el inductor, además de no influir sobre el estado de asociación de la proteína cuando ésta se encuentra en solución, tampoco influiría en el estado de asociación cuando está unida al DNA.

1.5. Análisis *in vitro* de la función de MhpR-His sobre la transcripción mediada por *Pa*.

Con objeto de demostrar la activación específica de la transcripción desde el promotor *Pa*, se realizaron ensayos de transcripción *in vitro* utilizando la RNA polimerasa de *E. coli* y la proteína MhpR-His purificada. Como molde para la transcripción se utilizó el plásmido pJCDA obtenido a partir de pJCD01 (Tabla 5), que contiene el promotor *Pa* flanqueado por los terminadores de la transcripción *rpoCT* y *rrnBT1T2*, tal y como se muestra en la figura 13.

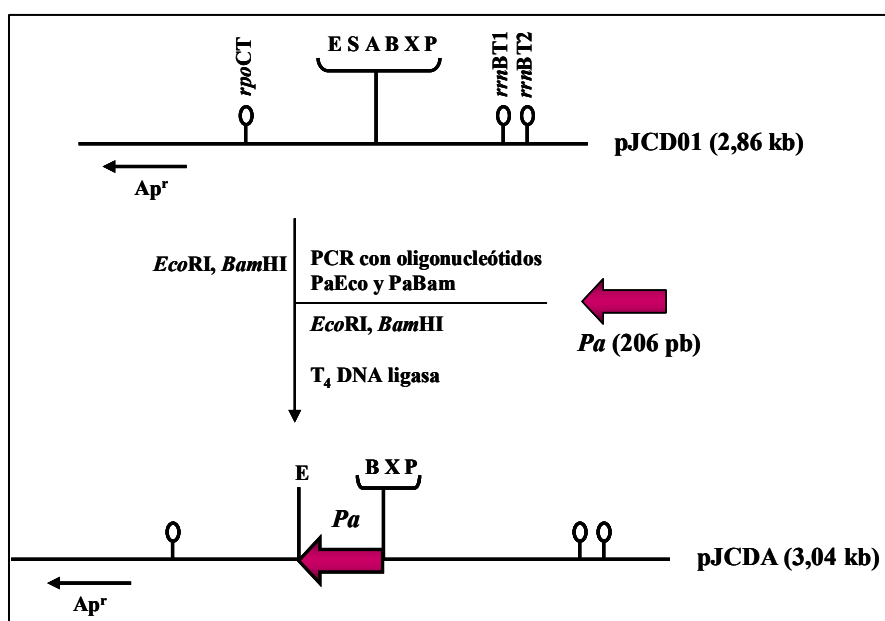


Figura 13. Construcción del plásmido pJCDA. Se incluyen los sitios de restricción más relevantes: E: *EcoRI*; S: *SacI*; A: *AvaI*; B: *BamHI*; X: *XbaI* y P: *PstI*. *Ap^r* indica el gen que confiere resistencia a ampicilina. Flanqueando a los sitios de restricción se encuentran los terminadores de la transcripción (*rpoCT*, *rrnBT1* y *rrnBT2*) representados en la figura por unos bucles.

La mezcla de reacción utilizada en estos ensayos contenía RNA polimerasa (100 nM), MhpR-His (100 nM) y concentraciones crecientes de 3HPP (0-1000 μ M). En la figura 14 se muestra el resultado de un ensayo de transcripción *in vitro*. En ausencia de inductor sólo se detecta el transcrito debido al RNA control (RNA1), (calle 1). En presencia de 3HPP, aparece el transcrito control junto con el transcrito esperado de 148 nucleótidos a partir del promotor *Pa* (calles 2-7). Además, la intensidad de la banda correspondiente a este transcrito es mayor conforme aumenta la concentración de 3HPP

añadida en el ensayo. Con este resultado se confirma *in vitro* la dependencia total del activador MhpR-His y del inductor 3HPP en la expresión mediada por *Pa*.

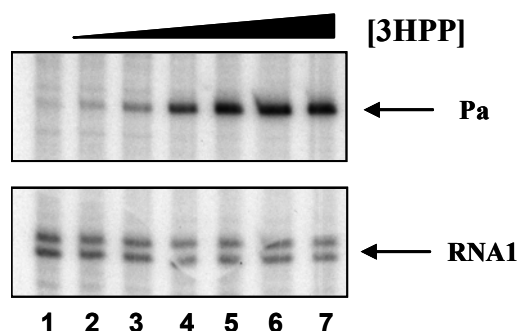


Figura 14. Activación de la transcripción a partir de *Pa* mediada por MhpR-His en presencia de 3HPP. Ensayo de transcripción *in vitro* (*multiple round*) a partir de *Pa* en presencia de MhpR-His y 3HPP. La concentración de proteínas en todos los pocillos fue: RNA polimerasa 100 nM y MhpR-His 100 nM. Se utilizaron concentraciones crecientes de 3HPP, calle 1 (0 μ M), calle 2 (50 μ M), calle 3 (100 μ M), calle 4 (250 μ M), calle 5 (500 μ M), calle 6 (750 μ M) y calle 7 (1000 μ M). Los transcritos detectados se indican con flechas. El transcrito denominado RNA1 de 107-108 nucleótidos es un control interno del plásmido pJCDA.

1.6. Modelado de la estructura tridimensional de MhpR.

Se ha determinado la estructura de 10 proteínas pertenecientes a la familia IclR mediante cristalografía de rayos X. Pero, sólo han sido caracterizadas tres de ellas: TM-IclR, también conocida como TM0065, de *Thermotoga maritima* (Zhang *et al.*, 2002; PDB: 1MKM), el dominio C-terminal de AllR de *E. coli* (Walker *et al.*, 2006; PDB: 1TF1 y 1T9L) y el dominio C-terminal de IclR de *E. coli* (Lorca *et al.*, 2007; PDB: 1TD5, 2099 y 209A).

La secuencia de la proteína MhpR se comparó con la de los representantes de la familia IclR cristalizados, detectándose una mayor identidad (29%) con RHA06195, un posible regulador transcripcional de *Rhodococcus* sp. RHA1 (Fig. 15). La estructura tridimensional de la proteína RHA06195 determinada a una resolución de 2,1 Å (PDB: 2IA2) fue empleada para generar el modelo estructural de MhpR (ver apartado 7.11 de Materiales y Métodos). Resulta interesante destacar que las proteínas RHA06195 y TM-IclR comparten una estructura terciaria muy similar.

En el modelo tridimensional propuesto, la proteína MhpR aparece constituida por un tetrámero que sería compatible, según los resultados obtenidos mediante ultracentrifugación analítica, con el estado de oligomerización de la proteína cuando está unida a DNA. Como en los casos de RHA06195 y TM-IclR, este tetrámero sería

asimétrico y estaría compuesto por las cadenas, que en MhpR, denominamos: A, B, C y D (Fig. 16). Las cadenas A y B serían equivalentes, así como las cadenas C y D entre sí ya que estas cadenas presentan ligeras diferencias en su geometría. Resultados mostrados anteriormente (apartado 1.4 de Resultados) revelaron que MhpR en solución (en ausencia de DNA) sería compatible con un dímero. Según el modelo propuesto y en estas condiciones, MhpR estaría constituida por un dímero, también asimétrico, compuesto por las cadenas A y D (dímero A-D) o por las cadenas B y C (dímero B-C), (Fig. 16).

```

RHA06195      MTATEPTEKILPSPDYVQSLARGLAVIRCFDHRNQRRRLSDVARATDLTRATARRFLLTL 60
MhpR          MQNNEQTEYKT----VRGLTRGLMLLNMLNKLDGGASVGLLAELSGLHRTTVRRLLLETL 55
              *  . * **          *.:*:*:*: .: .: : .: .: .: .: *.:*:*:* **

RHA06195      VELGYVATDGS--AFWLTTPRVLELGYSLSSLSLPEVAQPHLEKLSHKVHESSSVSILDG 118
MhpR          QEEGVVRRSPSDDSFRLTIKVRQLSEGFRRDQWISALAAPLLGDLLEVVWPTDVSITLDV 115
              * ** * . * : * ** : * : * . : . : . : * * * . * : * : . : * * **

RHA06195      ADIVYVARVP-VSRIMTVGITIGTRLPAYATSMGRVLLAGLPDDELDAYLEKLDIQRLE 177
MhpR          DAMVVRETTHRFSLSFHRAMVGRRLPLLKTASGLTWLAFCEQDRKELIEMLAS-RPGD 174
              : * . . ** :          : * ** * : * . * * * : : . : * * * :

RHA06195      RTITARDELKAAILAVRAD---GICVLDAQLEAGLRSMAPIRGASGLTVAAVNISTPA 233
MhpR          DYQLAREPLKLEAILARARKEGYQNYRGWDQEEKIASIAVPLRSEQ-RVIGCLNLVYMA 233
              ** : * : . ** * . : * : * : * : * : * : . : . : * :

RHA06195      ARYSLEDLHSDLIPSLRVTATDIEQDLATVNR----- 265
MhpR          SAMTIEQAAEKHLPALQRVAKQIEEGVESQAAILVAGRRSGMHLR 277
              : : * : . . : * : * : * . : * : * :

```

Figura 15. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la proteína MhpR de *E. coli* K-12 (Código de acceso: P77569) con la del posible regulador transcripcional RHA06195 de *Rhodococcus* sp. RHA1 (Código de acceso: Q0SH23). El alineamiento de secuencias se generó con el programa CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994). La proteína MhpR comparte una identidad de secuencia del 29% y una similitud del 50% con RHA06195. Los aminoácidos se indican con el código estándar de una sola letra y se numeraron a la derecha. Se muestran con asteriscos y en letra de color rojo los residuos conservados en el alineamiento, con dos puntos y en letra de color azul se indican cambios conservativos, mientras que con un punto y en letra de color verde, se indican cambios de aminoácidos que poseen cierta similitud en su estructura y/o propiedades físicoquímicas.

Cada monómero de proteína está constituido por un dominio N-terminal conectado por una hélice α (H4) a un dominio C-terminal (Fig. 17). El dominio N-terminal comprende tres hélices α (H1-H3) y una horquilla β con forma alada constituyendo un motivo de reconocimiento del DNA muy característico, conocido como hélice-giro-hélice alado (*winged-helix-turn-helix*). En la proteína TM-IclR de *T. maritima* este dominio participa en la unión a DNA y en la dimerización de la proteína. La hélice α H4 (aminoácidos Ile74 – Glu86) establece la conexión entre los dominios N-terminal y C-terminal y es equivalente a la región *linker* descrita en la proteína TM-IclR. En esta proteína, la hélice α H4 participa, junto con el dominio N-terminal, en la

dimerización de la proteína. En el caso de MhpR, esta hélice α entrecruzaría la cadena A con la D (en el dímero A-D) y la cadena B con la C (en el dímero B-C), (Fig. 16).

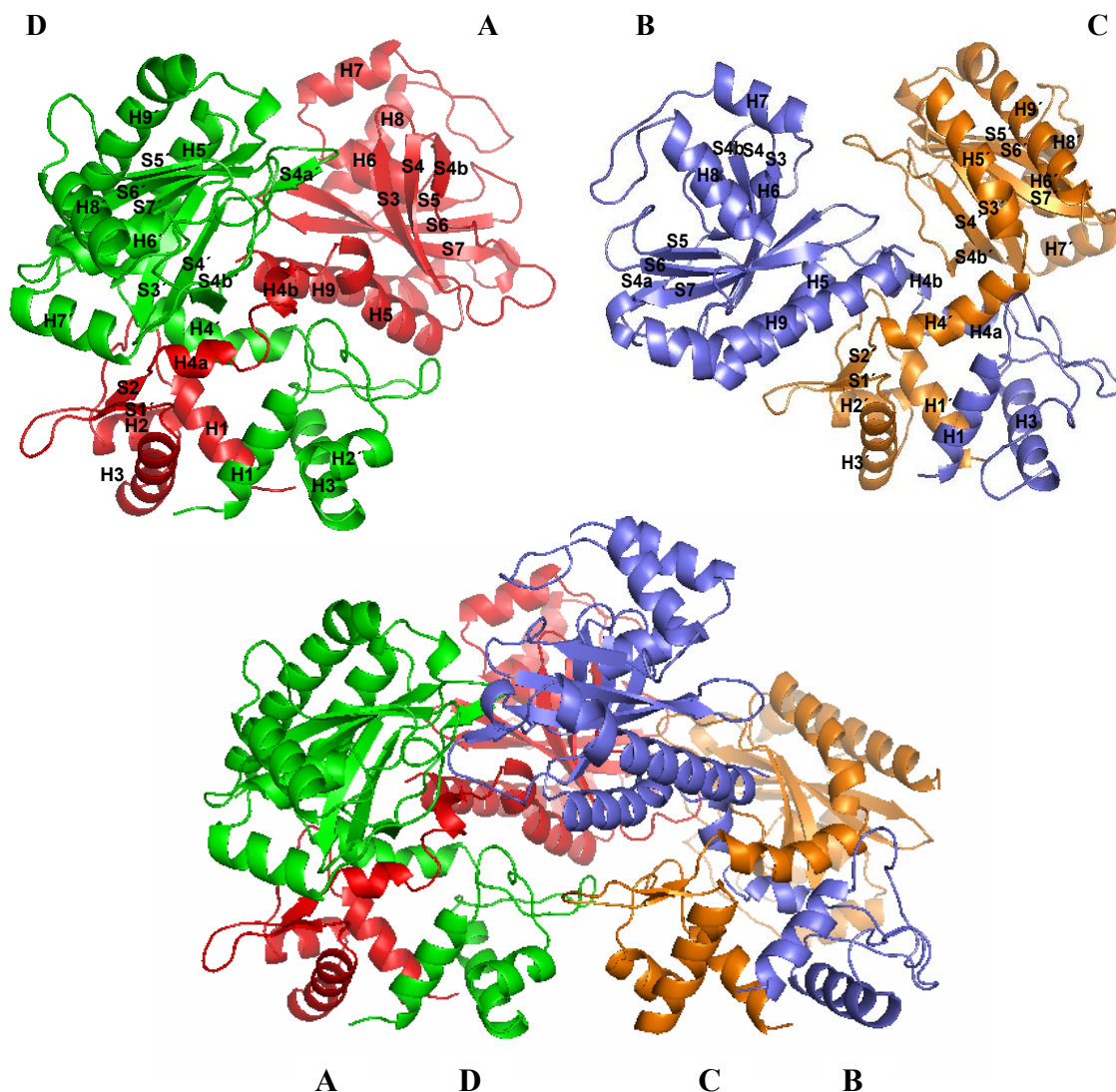


Figura 16. Modelo tridimensional propuesto de MhpR. Se muestran los diagramas de *ribbon* del dímero A-D (parte superior izquierda) y del dímero B-C (parte superior derecha). Se detalla la numeración de las hélices α (H1-H9) y de las hebras β (S1-S7). Abajo se representa la estructura tridimensional del tetrámero de MhpR. Se muestra la cadena A (en rojo), la cadena B (en azul), la cadena C (en naranja) y la cadena D (en verde). El programa empleó como modelo la proteína RHA06195 de *Rhodococcus* sp. RHA1 (PDB: 2IA2). Las figuras fueron generadas mediante el programa PyMOL (DeLano, 2002).

La arquitectura del dominio C-terminal de MhpR (C-MhpR) es similar a la que puede encontrarse en TM-IclR de *T. maritima*, así como en los dominios C-terminales de otros miembros de la familia IclR, cristalizados sin el dominio N-terminal, como

son: AllR, IclR, KdgR (PDB:1YSP) y YiaJ (PDB:1YSQ), todas ellas de *E. coli*. Además, el dominio C-terminal muestra una similitud estructural muy significativa con el dominio GAF/PAS, implicado en la unión de moléculas de pequeño tamaño. De la misma forma que en estas proteínas, el dominio C-terminal de MhpR es un dominio α/β constituido por una hoja β , formada por seis hebras antiparalelas, situada en posición central y rodeada, por un lado, por dos hélices- α (H5 y H9) y por otro, por tres hélices α más cortas (H6, H7 y H8). La hoja β está fuertemente curvada formando un dominio conocido como *half-barrel* (medio barril) y esa curvatura provoca que la hélice α pequeña H6 encaje dentro de la lámina β (Fig. 20). Esta estructura forma una cavidad en la que presuntamente entra el ligando.

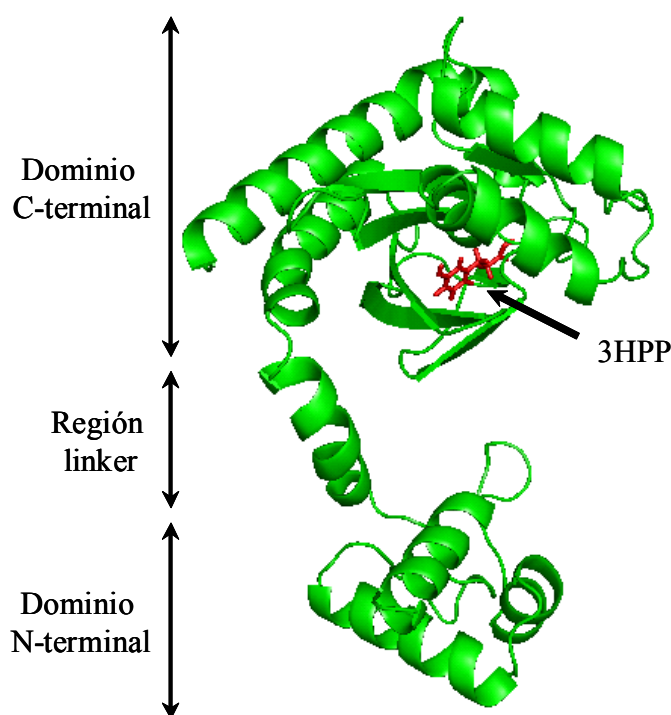


Figura 17. Representación de uno de los monómeros de MhpR (cadena D). Diagrama de *ribbon* donde se indican con flechas el dominio de unión a DNA, la región *linker* y el dominio C-terminal de MhpR. Se indica con una flecha el efector 3HPP (en rojo). La figura fue generada mediante el programa PyMOL (DeLano, 2002).

Las interacciones que harían posible la formación del tetrámero en MhpR tendrían lugar entre los dominios C-terminal de las cuatro cadenas (Fig. 18). En el tetrámero tendrían lugar contactos centralizados en diferentes regiones que estarían separadas en la estructura primaria (Fig. 19) pero próximas en la estructura terciaria (Fig. 18). Se postula que los aminoácidos His-133, Leu-141 y Gln-206 participarían

tanto en la unión del ligando como en la tetramerización de la proteína reguladora (Fig. 19).

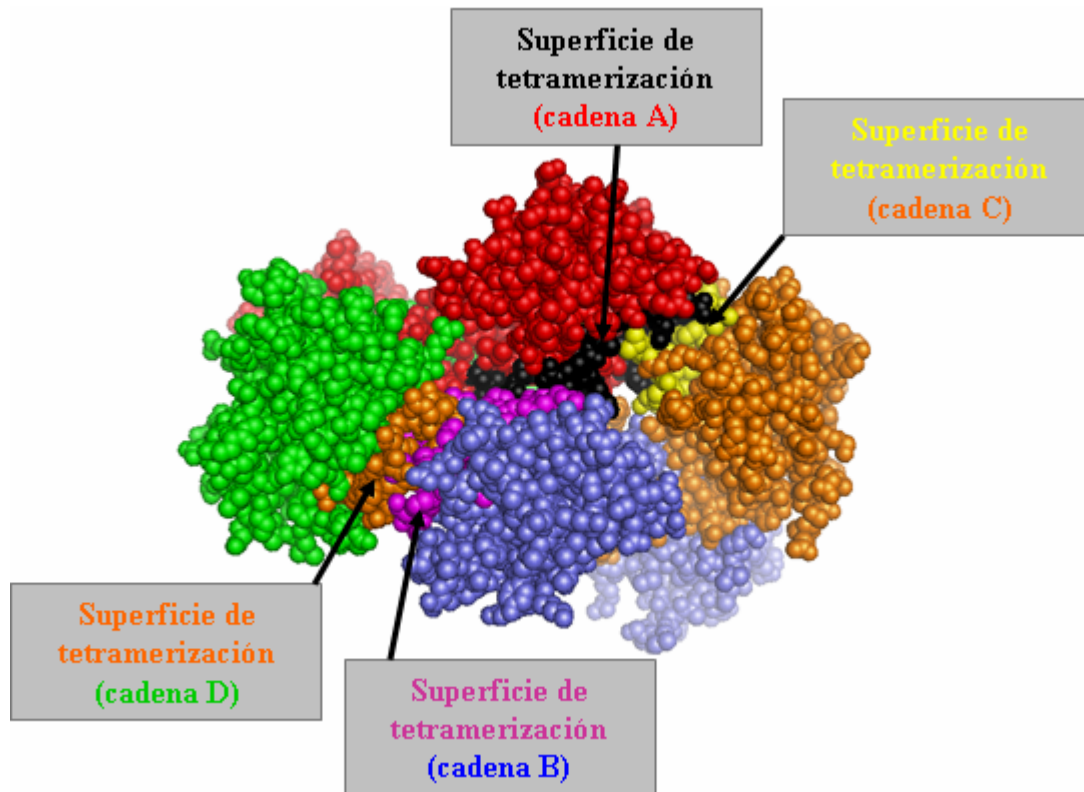


Figura 18. Modelo de la superficie de tetramerización de la proteína MhpR. Se muestran, en representación de esferas, las cuatro cadenas que formarían el tetrámero: en rojo (cadena A), en azul (cadena B), en naranja (cadena C) y en verde (cadena D). Se indican las regiones que estarían implicadas en la formación del tetrámero: en negro (cadena A), en violeta (cadena B), en amarillo (cadena C) y en naranja (cadena D). La imagen fue generada mediante el programa PyMOL (DeLano, 2002).

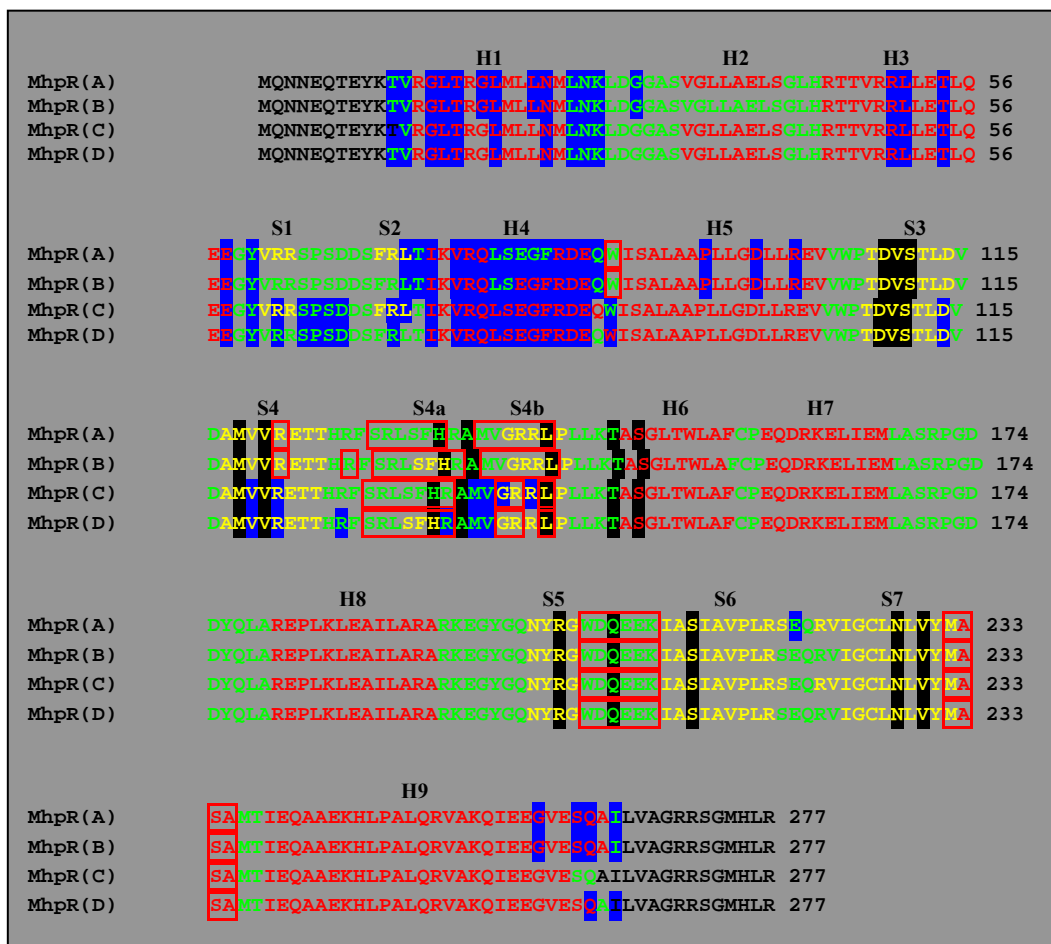


Figura 19. Localización de los residuos clave que participarían en dimerización/tetramerización y reconocimiento de ligando dentro de la estructura secundaria de MhpR, de acuerdo con el modelo estructural propuesto. Se muestran las secuencias de aminoácidos de las cuatro cadenas que constituyen la proteína MhpR (A, B, C y D). Los aminoácidos se indican con el código estándar de una sola letra y se numeraron a la derecha. Se muestran los residuos que formarían parte de hélice α (en rojo), hebra β (en amarillo) y *loop* (en verde). Se detalla la numeración de las hélices α (H1-H9) y de las hebras β (S1-S7). Se señalan, dentro de recuadros de color rojo, los residuos que participarían en la formación del tetrámero de MhpR. En color azul se resaltan los aminoácidos que estarían implicados en la dimerización de la proteína. En color negro se resaltan los 15 residuos que interaccionarían con el efector.

1.7. Sitio de unión a ligando de la proteína MhpR.

En el modelo de MhpR, el ligando, presumiblemente, está alojado dentro de una cavidad formada por la lámina β curvada y debajo del extremo N-terminal de la hélice α H6 (Fig. 20). Esta cavidad fue identificada tal y como se indica en el apartado 7.11 de Materiales y Métodos y está formada por la región comprendida entre las hebras β , S3 y S7 (Fig. 20A). Resulta interesante destacar que la mayoría de los residuos situados dentro de esta cavidad son de carácter polar. En la figura 20B se muestra un modelo del

sitio de unión de ligando con los 15 aminoácidos que presumiblemente rodean e interaccionan directamente con el 3HPP. En la figura 19 se indica su localización dentro de la estructura secundaria de la proteína.

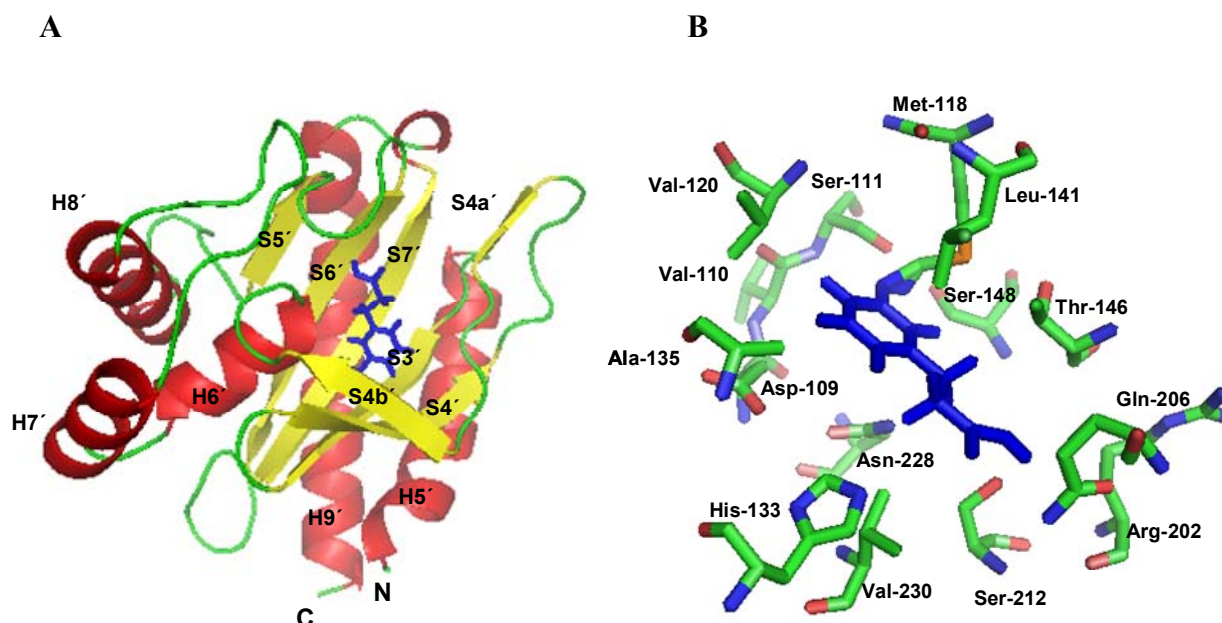


Figura 20. Representación del complejo formado por C-MhpR (cadena D) y la molécula efectora 3HPP. **A)** Representación en diagrama de *ribbon* del dominio C-terminal de MhpR (cadena D) donde se observan las seis hebras β (en amarillo) y las 5 hélices α (en rojo). Se detalla la numeración de las hélices α (H5'-H8') y de las hebras β (S4'-S7'). Se indican los extremos amino- y carboxi-terminal con las letras N y C, respectivamente. **B)** Representación de la zona de unión del ligando 3HPP en el dominio C-terminal de MhpR (cadena D). Se muestran los 15 aminoácidos que presumiblemente interaccionan con el 3HPP. En los residuos se indican en rojo los átomos de oxígeno y en azul los átomos de nitrógeno. En el centro de la figura y en color azul se representa la molécula de 3HPP. Ambas figuras fueron generadas mediante el programa PyMOL (DeLano, 2002).

Los residuos que establecerían contactos de Van der Waals con el anillo aromático serían Asp-109, Met-118, Val-120, Ala-135, Leu-141, Thr-146, Asn-228 y Val-230, siendo este último el que posiblemente interacciona con la cadena del ácido propiónico presente en los compuestos 3HPP, DHPP y PP (la interacción con PP se trata más adelante) (Fig. 21). Los residuos Ser-111 y Ser-148 establecerían enlaces de hidrógeno con el grupo hidroxilo localizado en posición 3 (3-OH) del 3HPP y DHPP (Fig. 21) y los residuos Arg-202, Gln-206 y Ser-212, establecerían enlaces de hidrógeno con el grupo carboxilo de estas moléculas (Fig. 21). Los aminoácidos Asp-109 y Asn-228 podrían estabilizar otro grupo hidroxilo adicional al de la posición 3 como el que posee el ligando DHPP, en posición 2. Si en esa cavidad, en lugar de

3HPP, se alojara el PP, tendrían lugar estas mismas interacciones, con la excepción de los enlaces de hidrógeno con Ser-111 y Ser-148 que involucran al grupo 3-OH del 3HPP.

Los sitios de unión de ligando en los monómeros A y C difieren poco de los existentes en los monómeros B y D, ya que los aminoácidos implicados en la unión al ligando son los mismos. Sin embargo, la geometría de estos sitios es diferente, siendo esta diferencia más notoria en la posición del residuo Arg-202 que, por su situación dentro de los monómeros A y C, establecería un puente salino con el grupo carboxilo del ligando (Fig. 21A), mientras que, dentro de los monómeros B y D dicha interacción no sería posible al situarse este residuo más alejado del ligando (Fig. 21B). Esto podría explicar tanto la diferente afinidad mostrada por el 3HPP como el hecho de que el PP pudiera unirse sólo a un tipo de estos sitios. Además, los contactos de van der Waals que tendrían lugar entre la Met-118 de MhpR y el anillo aromático del ligando, serían más intensos en las cadenas C y D que en las cadenas A y B.

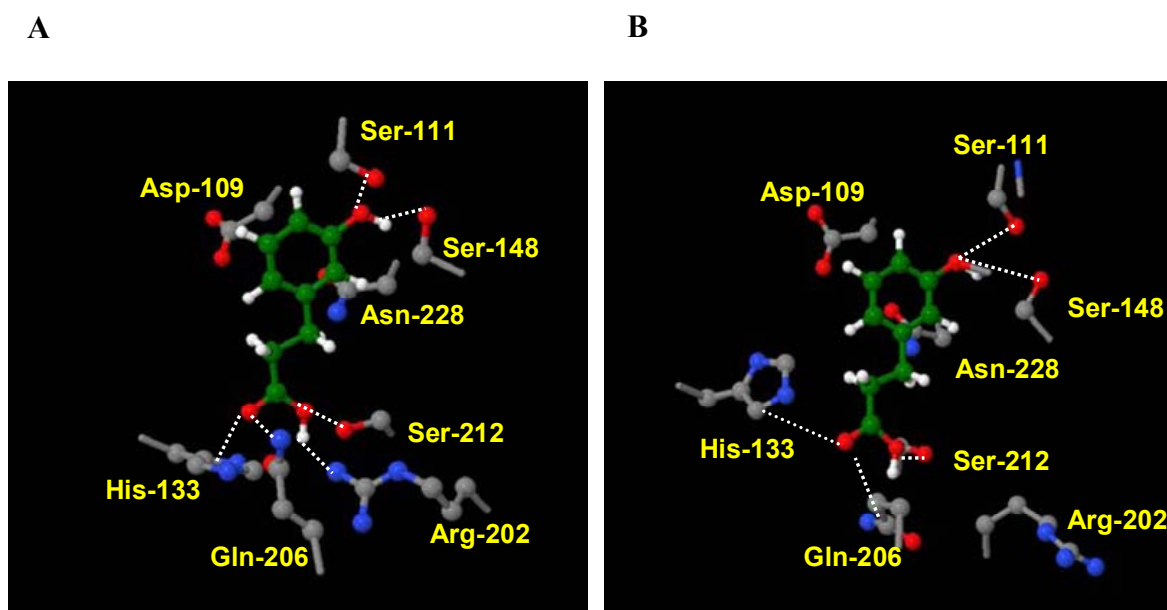


Figura 21. Representación de la zona de unión de ligando de C-MhpR. **A)** Zona de unión de ligando en la cadena A (similar en la cadena C). **B)** Zona de unión de ligando en la cadena B (similar en la cadena D). Se muestran algunas de las interacciones que pueden tener lugar entre los aminoácidos localizados dentro de la cavidad del dominio C-terminal de MhpR y la molécula efectora. En representación de *sticks* y en color verde se muestra el esqueleto de la molécula de 3HPP. Se representan los átomos de oxígeno (en rojo), nitrógeno (en azul) e hidrógeno (en blanco). Con una línea blanca de puntos se representan algunos de los enlaces de hidrógeno que pueden establecerse en el reconocimiento del efector.

1.8. Modelo de SAXS de MhpR.

Con objeto de resolver la estructura tridimensional de MhpR en solución y afianzar el modelo tridimensional propuesto para MhpR (apartado 1.6 de Resultados), se analizó una muestra de esta proteína (4,5 mg/ml) mediante SAXS (*Small angle X-ray scattering*). Esta metodología permite resolver estructuras macromoleculares a baja resolución y monitorizar los diferentes estados conformacionales de una proteína siempre que impliquen cambios en su tamaño y forma.

En la figura 22 se compara el perfil de dispersión experimental (línea de puntos) con el perfil teórico del modelo estructural (línea continua de color negro). Como puede apreciarse en esta figura, existen diferencias entre ambos perfiles. El perfil teórico de SAXS muestra un hombro prominente alrededor de un valor de S igual a $0,029 \text{ \AA}^{-1}$ que cambia conforme disminuye el valor de S ($0,019 \text{ \AA}^{-1}$) en el perfil experimental. A partir de los perfiles de dispersión se determinaron los radios de giro (R_g) de ambos modelos, tal y como se indica en el apartado 7.12 de Materiales y Métodos. En este análisis se obtuvo que el R_g del modelo teórico (2,68 nm) es mucho más pequeño que el experimental (3,21 nm).

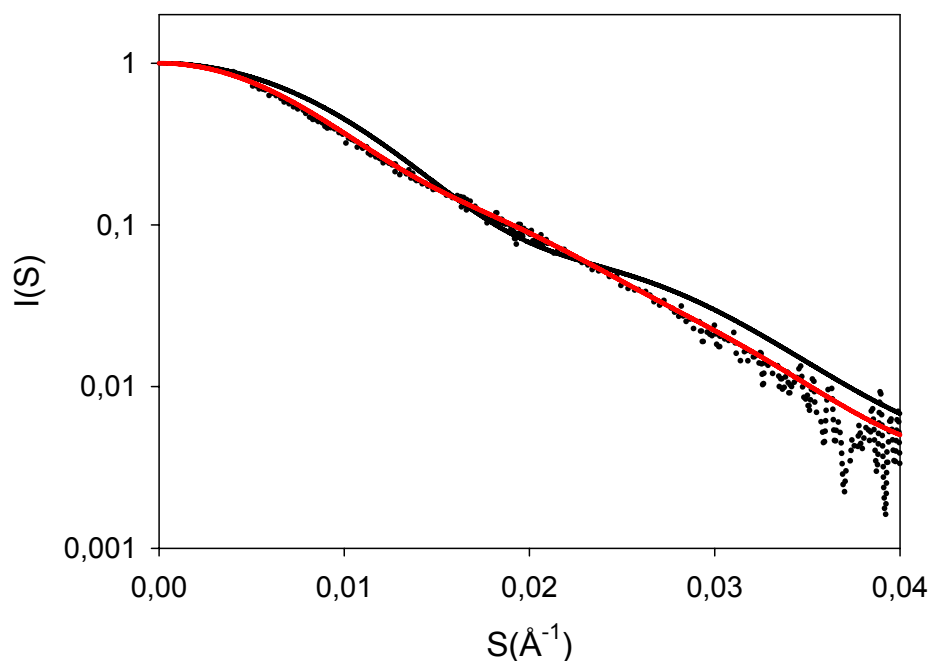


Figura 22. Superposición del perfil experimental de SAXS de MhpR (línea de puntos) con los perfiles teóricos del modelo tridimensional de cuerpo rígido (línea continua de color negro) y del modelo generado mediante *flexible docking* (línea continua de color rojo). El eje de ordenadas tiene escala logarítmica.

El acoplamiento del modelo dentro de la envoltura calculada (Fig. 23A) muestra claramente que la estructura en solución de la proteína ha de ser más grande y menos compacta que el modelo propuesto y la distancia entre los dos dominios, que se refleja en el hombro ($0,029 \text{ \AA}^{-1}$), debe de ser mayor tal y como se refleja en la desaparición del hombro hacia valores de más bajo ángulo (Fig. 22). En parte, la diferencia de tamaño puede deberse a que en el modelo tridimensional no se modeló el *tag* de histidinas que contiene la proteína en el extremo N-terminal y que sí se incluye en la envoltura calculada.

A la vista de estos resultados se ha generado un nuevo modelo de la molécula de MhpR mediante la técnica denominada *flexible docking* (Fig. 23B). Este modelo tiene un radio de giro más grande (3,07 nm), mucho más próximo al valor experimental, y su perfil de dispersión (Fig. 22, línea continua de color rojo) se ajusta mejor a los datos experimentales. En la generación de este nuevo modelo se tuvo en cuenta la región *linker* helicoidal de cada monómero, la cual, puede ser flexible en solución y modificar la disposición relativa de los monómeros.

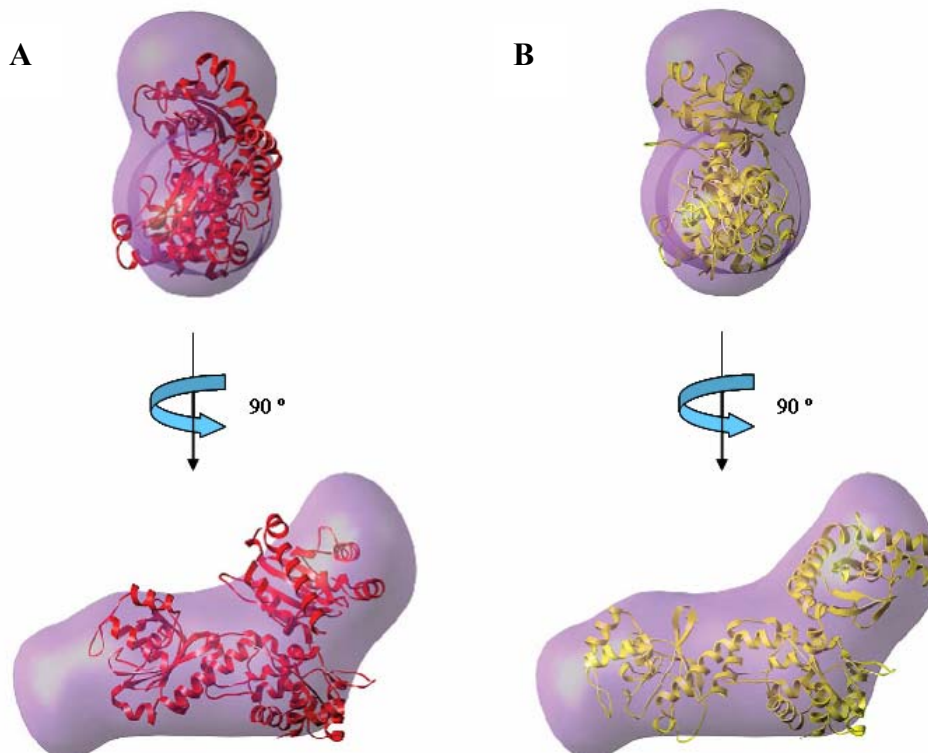


Figura 23. Envoltura de baja resolución de MhpR en solución que contiene el modelo tridimensional de cuerpo rígido (A) y el modelo generado mediante *flexible docking* (B).

Por otro lado, se determinó para cada modelo, la función de distribución de distancias entre cada par de átomos o $P(r)$. En la figura 24 se observa que las distancias más frecuentes y la distancia máxima (D_{\max}) dentro del modelo obtenido por *flexible docking* se aproximan mucho a los valores experimentales.

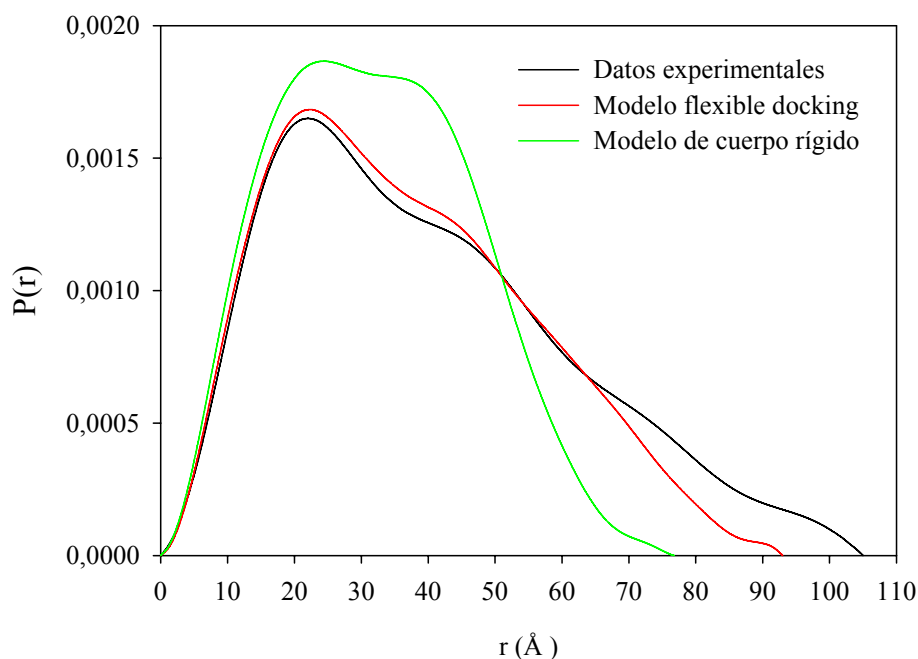


Figura 24. Funciones $P(r)$ de los datos experimentales obtenidos mediante SAXS (línea de color negro), del modelo tridimensional de cuerpo rígido (línea verde) y del modelo generado mediante flexible docking (línea roja).

1.9. Estudios de interacción proteína-ligando.

En este apartado hemos centrado la atención en el análisis de la interacción entre MhpR-His y sus inductores (3HPP y DHPP), mediante las técnicas de espectroscopía de fluorescencia y dicroísmo circular.

1.9.1. Estudio de la interacción MhpR-His-ligando mediante espectroscopía de fluorescencia.

La espectroscopía de fluorescencia permite el estudio de procesos de unión, tales como las asociaciones proteína-proteína o proteína-ligando, ya que la emisión de fluorescencia de los fluoróforos proteicos, principalmente la del triptófano, depende fuertemente de su entorno local y éste cambia cuando se produce la asociación, bien

B

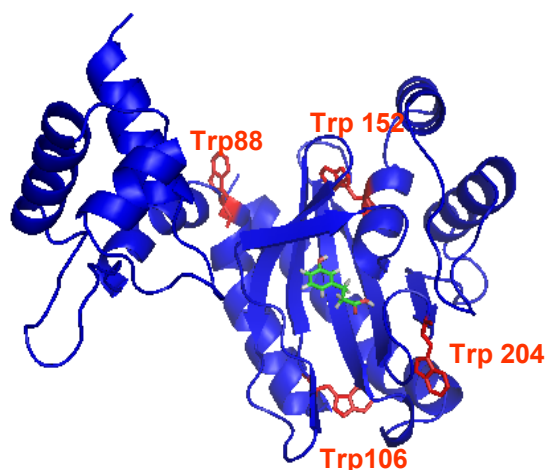
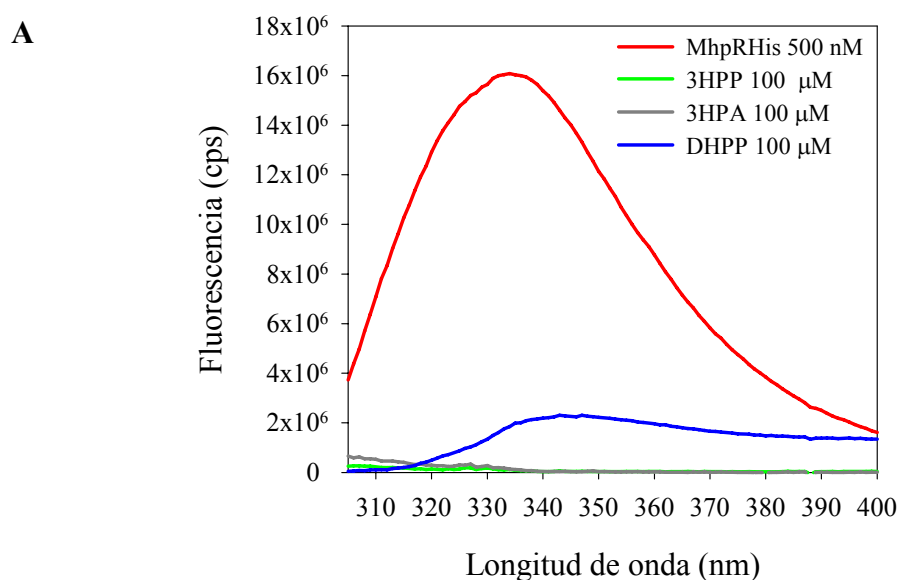


Figura 25. A) Posición de los triptófanos dentro de la cadena D de la proteína MhpR-His. Los aminoácidos se indican con el código estándar de una sola letra y se numeraron a la derecha. Se muestran los residuos que forman parte de hélice α (en rojo), hebra β (en amarillo) y *loop* (en verde). Se detalla la numeración de las hélices α (H1-H9) y de las hebras β (S1-S7). Los triptófanos (W) están resaltados en color azul. **B) Posición de los triptófanos dentro del modelo tridimensional propuesto para la cadena D de MhpR.** Se indican en rojo los cuatro triptófanos de la proteína y en verde, el compuesto 3HPP.

Se realizaron espectros de excitación de muestras de proteína (500 nM) y de los diferentes compuestos (100 μ M) utilizando una longitud de onda de excitación de 295 nm. En la figura 26A se muestra que a esta longitud de onda sólo se excita y, por tanto, emite fluorescencia, la preparación de proteína. El compuesto DHPP a esa concentración mostró una emisión de fluorescencia algo superior a la del resto de compuestos (prácticamente nula) pero este hecho no impidió trabajar con DHPP porque esa concentración fue la máxima que se utilizó en los ensayos que se muestran a continuación. En cualquier caso, los espectros de emisión de las diferentes mezclas proteína-ligando fueron corregidos por la emisión del correspondiente ligando. En la figura 26B se muestran los valores de los coeficientes de extinción molar a 295 nm de estos compuestos determinados experimentalmente.

De acuerdo con el resultado obtenido en este experimento, se decidió utilizar una longitud de onda de excitación de 295 nm para analizar la interacción entre la proteína MhpR-His y los compuestos 3HPP o DHPP. Los espectros de emisión se realizaron como se indica en el apartado 7.9 de Materiales y Métodos. En primer lugar, se analizó la interacción entre la proteína reguladora y el inductor 3HPP. A 1 ml de una muestra de MhpR-His (0,5 μ M) se le fue añadiendo progresivamente 3HPP (10-100 μ M). Cada adición de ligando fue de 1 μ l (10 mM) para que la dilución de la muestra de proteína

fuera mínima. La muestra se mantuvo a 25 °C y en agitación suave durante todo el proceso para evitar la fotólisis de la proteína. Inmediatamente después de cada adición de ligando se aplicó una longitud de onda de excitación de 295 nm sobre la mezcla y se registró un espectro de emisión (310-400 nm). Cada espectro de emisión fue corregido por el de emisión de su correspondiente blanco y por el efecto de dilución de la muestra. Al solapar todos los espectros obtenidos se observó que al añadir ligando, la emisión de fluorescencia de la proteína disminuía conforme aumentaba la concentración de 3HPP añadido en la muestra (Fig. 27A). Al final de todo el proceso, la emisión de fluorescencia de la proteína se redujo un 34% con respecto a la emisión inicial, en ausencia de ligando.



B

Compuesto	$\epsilon_{295} (M^{-1} \times cm^{-1})$
3HPA	10,9
3HPP	8,0
DHPP	196,1

Figura 26. A) Espectros de emisión de la proteína MhpR-His y de los compuestos 3HPP, 3HPA y DHPP. La concentración de proteína ensayada fue 500 nM y la de los compuestos, 100 μM. La longitud de onda de excitación que se empleó fue 295 nm. Se muestran los espectros ya corregidos por la emisión de fluorescencia del tampón. **B) Coeficientes de extinción a 295 nm (ϵ_{295}) de los compuestos aromáticos utilizados en los ensayos de fluorescencia.** Los valores de estos coeficientes fueron determinados experimentalmente.

En segundo lugar, se realizó el mismo experimento con DHPP. A otra muestra de MhpR-His (0,5 μM) se le añadió DHPP (10-100 μM) y después de cada adición se recogió el espectro de emisión resultante de la excitación de la mezcla a 295 nm.

Cuando se solaparon todos los espectros obtenidos se observó que la fluorescencia de la proteína también disminuía por efecto de la adición del compuesto. La reducción total de la emisión en este caso fue del 41% (Fig. 27B).

Para comprobar la especificidad de este efecto, se ensayó la fluorescencia de MhpR-His en presencia de un compuesto aromático que fuera análogo estructural y que, según se había comprobado mediante experimentos de actividad β -galactosidasa (Tesis doctoral B. Torres, 2002), no fuera inductor de este regulador. Por ello, se escogió el 3HPA y se ensayó de igual forma que se hizo con los compuestos 3HPP y DHPP. Los espectros recogidos se solaparon y pudo comprobarse que la fluorescencia de la proteína prácticamente no disminuía (6%) (Fig. 27C). Estos resultados sugieren que la disminución de la emisión de fluorescencia experimentada por la proteína en presencia de 3HPP o DHPP es específica.

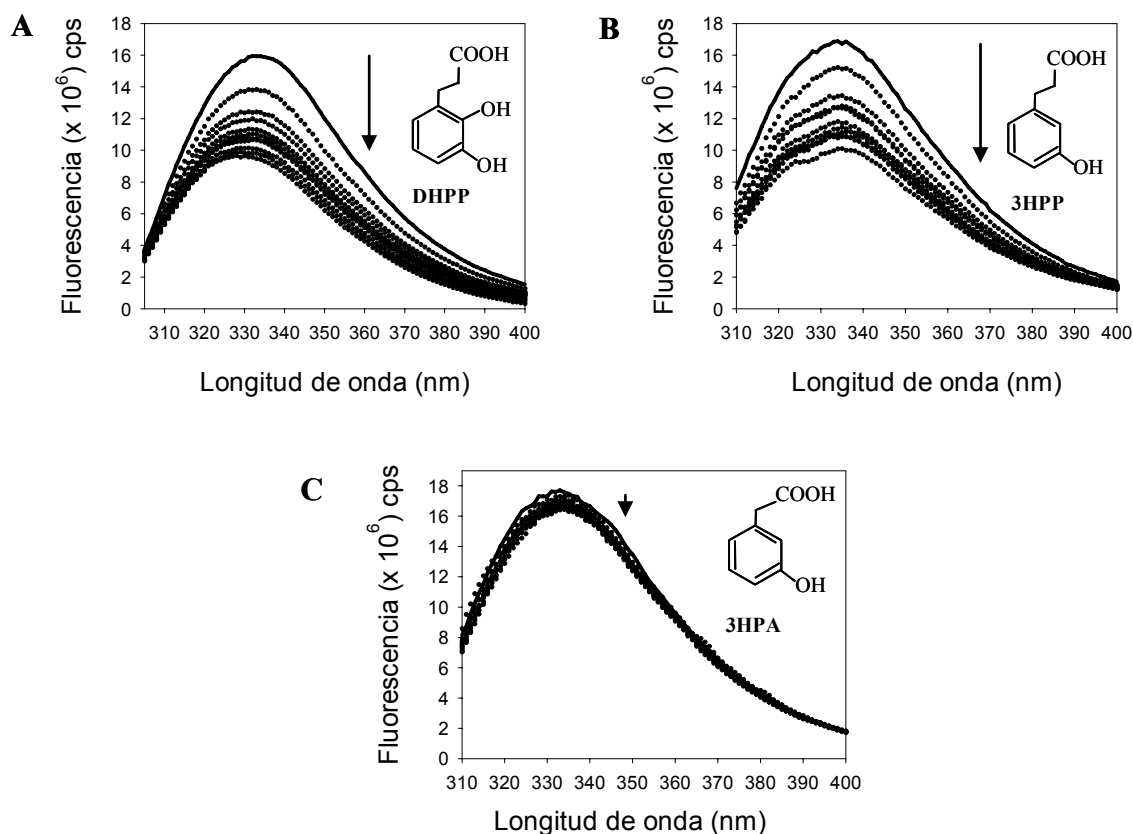


Figura 27. *Quenching* de la emisión de fluorescencia de la proteína MhpR-His en presencia de concentraciones crecientes de (A) 3HPP, (B) DHPP y (C) 3HPA (control negativo). La concentración de proteína en el ensayo fue 0,5 μ M y las concentraciones de ligando añadidas fueron desde 10 hasta 100 μ M. Con flechas se indica la disminución de la emisión de fluorescencia producida al añadir concentraciones crecientes de ligando. Se representa con una línea continua la emisión de fluorescencia de la proteína MhpR-His en ausencia de ligando y con una línea de puntos, en presencia de concentraciones crecientes de ligando. La longitud de onda de excitación empleada en los experimentos fue 295 nm.

El efecto de atenuación de la fluorescencia observado se conoce por el término *quenching* y consiste en una disminución de la intensidad de la emisión de los fluoróforos, como consecuencia de su interacción con una molécula ajena denominada atenuador (*quencher*). En este caso los compuestos 3HPP y DHPP actúan a modo de *quencher* sobre la emisión de los fluoróforos (triptófanos) de la proteína. Los resultados obtenidos indican que estos compuestos, por separado, inducen un cambio en la conformación de la proteína que se manifiesta por un efecto de *quenching* de la emisión de fluorescencia de la proteína.

Para calcular las constantes de asociación de MhpR-His para cada ligando, se representó la intensidad del máximo de emisión (335 nm) frente a la concentración del ligando en cuestión y los datos fueron ajustados a la siguiente función:

$$F = 1 - (1 - F_{min}) (K_b[L]_F)/(1 + K_b[L]_F)$$

Donde F y F_{min} representan fluorescencia y fluorescencia mínima, respectivamente, K_b , representa la constante de asociación y $[L]_F$, significa concentración de ligando libre, no unido a la proteína. Los ajustes que se muestran en la figura 28 permitieron determinar los valores de F_{min} y K_b para cada ligando. En la tabla 7 se muestra que las K_b calculadas para los dos ligandos son del mismo orden de magnitud aunque la calculada para DHPP es ligeramente mayor. Además, según los valores de F_{min} ambos compuestos inductores ejercen el mismo efecto de *quenching* sobre la fluorescencia de la proteína.

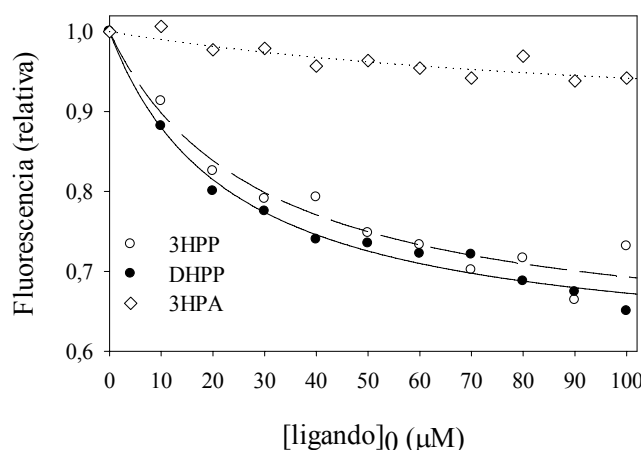


Figura 28. Representación del *quenching* de la fluorescencia de MhpR-His en función de la concentración de ligando. Se representa la señal del máximo de emisión de fluorescencia a 335 nm, expresada en unidades relativas, en función de la concentración de 3HPA (rombos vacíos), 3HPP (círculos vacíos) y DHPP (círculos llenos). Se indican con líneas (· · ·), (— —), (— —), (—) los ajustes de los puntos a una curva en presencia de 3HPA, 3HPP y DHPP respectivamente. Las curvas fueron generadas utilizando la ecuación $F = 1 - (1 - F_{min}) (K_b[L]_F)/(1 + K_b[L]_F)$.

Ligando	$K_b \times 10^4 \text{ (M}^{-1}\text{)}$	F_{min}
3HPP	$3,4 \pm 0,9$	$0,60 \pm 0,03$
DHPP	$4,2 \pm 0,6$	$0,59 \pm 0,02$

Tabla 7. Parámetros de la unión de diferentes ligandos a la proteína MhpR-His. Se muestran los valores de las constantes F_{min} y de asociación (K_b) con su desviación típica.

1.9.2. Estudio de la interacción MhpR-His-ligando mediante dicroísmo circular.

La espectroscopía de dicroísmo circular, CD, es una técnica de absorción basada en la interacción de ciertas moléculas con la luz polarizada circularmente. Se define como la diferencia entre la absorción de luz polarizada circularmente a la izquierda y la absorción de luz polarizada circularmente a la derecha por una muestra que exhibe asimetría molecular. La unión de un ligando a una proteína puede inducir cambios en la estructura secundaria y/o terciaria de la proteína. En este sentido, mediante CD en el UV lejano (180-260 nm) pueden detectarse cambios en la estructura secundaria y/o terciaria, mientras que en el UV cercano (260-320 nm) se pueden detectar cambios en la estructura terciaria (Blauer, 1974; Greenfield, 1975). Para comprobar si la unión del compuesto 3HPP a la proteína MhpR-His provoca un reordenamiento de su estructura secundaria y/o terciaria, se llevaron a cabo experimentos de CD utilizando muestras de proteína MhpR-His (6,5 μM) en ausencia y presencia de 3HPP (1 mM). En la figura 29A se muestran los espectros de CD en el UV lejano de MhpR-His en ausencia y presencia de inductor. El espectro de CD de la proteína MhpR-His tiene la forma típica de una proteína con alto contenido en hélice α (Woody, 1995; Kelly y Price, 2000) ya que presenta dos bandas negativas, con mínimos característicos alrededor de 222 nm y 208 nm, y una banda positiva, con un máximo cercano a 190 nm. En presencia de 3HPP el espectro de CD de la proteína cambia, detectándose un aumento del valor absoluto de la señal de CD en 222 y 208 nm, lo que podría estar relacionado con un incremento en la cantidad de estructura secundaria helicoidal (Woody, 1995). Para confirmar este hecho se realizaron predicciones de la estructura secundaria de la proteína, en las diferentes condiciones ensayadas, mediante la utilización de diferentes programas informáticos (apartado 7.10 de Materiales y Métodos). En la figura 29B se muestra el valor promedio de todas las predicciones realizadas. Así, en ausencia de ligando, la proteína estaría compuesta por un $36,0 \pm 2,0\%$ de hélice α , un $16,0 \pm 0,6\%$ de lámina β , y un $47,6 \pm 1,7\%$ de estructura desordenada. En presencia de 3HPP, el contenido en

hélice α incrementaría un 3,8% y el de estructura desordenada, un 1% en detrimento de un 4,4% del contenido de lámina β .

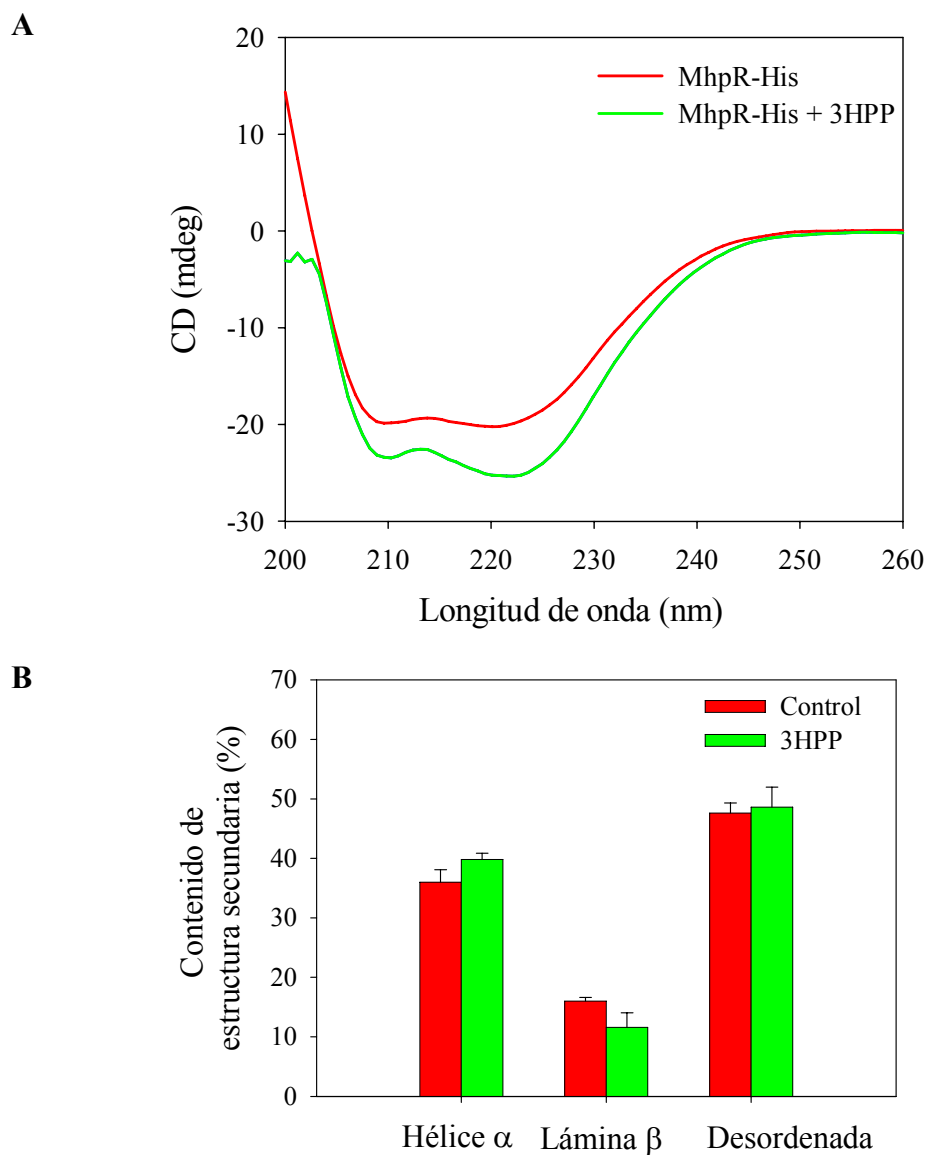


Figura 29. Caracterización de la estructura secundaria de MhpR-His mediante CD en el UV lejano. **A)** Espectros de CD en el UV lejano (200-260 nm) de muestras de MhpR-His en ausencia (rojo) y presencia de 3HPP (verde). Las concentraciones de proteína y de ligando utilizadas en los ensayos fueron 6,5 μ M y 1 mM, respectivamente. Las muestras se prepararon en tampón fosfato potásico 20 mM, pH7,5 y KCl 100 mM. **B)** Predicción de la estructura secundaria de la proteína MhpR-His en ausencia (rojo) y presencia de 3HPP (verde). Se muestra el promedio de la predicción de estructura secundaria obtenido mediante la utilización de diferentes programas informáticos (ver apartado 7.10 de Materiales y Métodos). Se indica el promedio con su correspondiente desviación estándar.

Otra de las aplicaciones de la técnica de CD es que permite obtener información sobre la estabilidad de las proteínas. Para comparar la estabilidad de MhpR-His, en ausencia y presencia de ligando, se llevaron a cabo experimentos de desnaturación

térmica utilizando las mismas muestras analizadas anteriormente. Estas, se sometieron a un calentamiento progresivo (50 °C/h), desde 5 °C hasta 95 °C y se hizo un seguimiento de la señal de CD a 220 nm, durante todo el tiempo. Los resultados obtenidos mostraron una disminución del valor absoluto de la señal de CD a 220 nm conforme aumentaba la temperatura. En la curva de desnaturalización de una proteína constituida por un único dominio globular, cada paso o *plateau*, puede corresponderse con un estado de plegamiento definido; el paso inicial de la curva, a bajas temperaturas, se corresponde con la conformación plegada (nativa), mientras que el segundo *plateau*, a altas temperaturas, refleja el estado completamente desplegado (desnaturalizado) (Pace y Scholtz, 1997). Los resultados obtenidos muestran que la proteína MhpR-His presenta, en todas las condiciones ensayadas, una única transición entre los estados nativo y desnaturalizado, comportándose, por tanto, como una única entidad. A partir de esta curva se calculó el valor de temperatura de *melting* o T_m (temperatura a la cual se alcanza un 50% de desnaturalización). En ausencia de ligando se obtuvo una T_m de 47,1 °C. La adición de 3HPP produjo un incremento en la T_m de 6,6 °C. Por tanto, la presencia de este compuesto aromático aumenta considerablemente la estabilidad de MhpR-His.

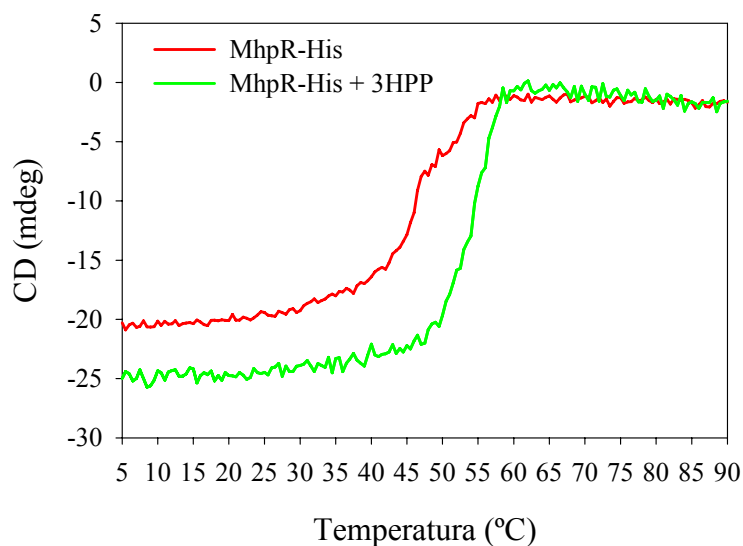


Figura 30. Estudio de estabilidad térmica de MhpR-His mediante CD en el UV lejano. Curvas de desnaturalización térmica de MhpR-His (6,5 μ M) en ausencia (rojo) y presencia de una concentración 1 mM de 3HPP (verde). Se representa la señal de CD (en *milidegrees*) a 220 nm en función de la temperatura (°C).

2. Estudio de la regulación global del *cluster mhp*.

Como se ha comentado previamente, la expresión de los genes *mhp* está sujeta tanto a una regulación global como específica. Uno de los mecanismos más frecuentes de regulación global es la represión catabólica mediada por la proteína receptora de cAMP (CRP). Tal y como se ha descrito por Torres y colaboradores (2003), en el *cluster mhp*, la expresión del promotor *Pa* está sujeta a una fuerte represión catabólica por glucosa que está mediada por el complejo cAMP-CRP. En este capítulo hemos profundizado en el estudio del mecanismo de acción de la proteína CRP sobre los promotores *Pa* y *Pr*.

2.1. Purificación de la proteína CRP mediante cromatografía de afinidad.

Para poder realizar *in vitro* los experimentos necesarios para el estudio del mecanismo de represión catabólica mediado por CRP, era necesario comenzar por la purificación de esta proteína. La proteína CRP fue hiperproducida a partir de células de *E. coli* MCG11 (pBeBe) (Tablas 4 y 5). El protocolo de purificación que se llevó a cabo fue el desarrollado por Ghosaini y colaboradores (1988), incluyendo algunas modificaciones como se describe en Materiales y Métodos. La proteína CRP fue purificada a homogeneidad electroforética tal y como se muestra en la figura 31 y fue utilizada en diferentes experimentos realizados *in vitro* presentados en esta tesis.

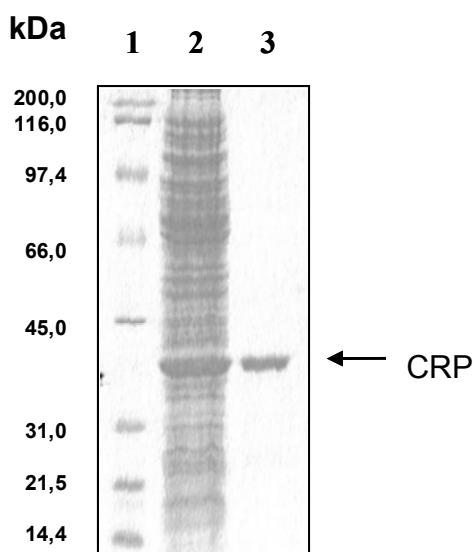


Figura 31. Purificación de la proteína CRP. Calle 1, marcadores de peso molecular (en el margen izquierdo de la figura se detallan los pesos moleculares de los marcadores); calle 2, fracción soluble de un extracto celular de *E. coli* MCG11 (pBeBe); calle 3, proteína purificada. La posición de la proteína CRP se indica con una flecha.

2.2. Análisis *in vitro* del papel de CRP en la transcripción de *Pa*.

Torres y colaboradores (2003), demostraron, mediante ensayos *in vivo* consistentes en la medición de actividad β -galactosidasa, que el promotor catabólico de los genes *mhp* (*Pa*) estaba sometido a represión catabólica por glucosa mediada por el complejo cAMP-CRP. Para demostrar que este proceso de represión catabólica tiene lugar a nivel transcripcional, se realizaron experimentos de RT-PCR y ensayos de transcripción *in vitro*.

2.2.1. Análisis del papel de CRP en la transcripción de *Pa* mediante RT-PCR.

Los experimentos de RT-PCR se llevaron a cabo a partir de cultivos de la cepa parental *E. coli* AFMC::*RAL* y de la cepa mutante *E. coli* AFSB::*RAL* (*crp*⁻), ambas portadoras de la fusión traduccional *RAL* en monocopia en el cromosoma (Tabla 4 y fig. 32A). Estas cepas se cultivaron en medio mínimo M63 con glicerol (20 mM) o glucosa (10 mM) en presencia o ausencia de 3HPP (1 mM) hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento (DO₆₀₀ 0,9). A partir de estos cultivos, se aisló el RNA total necesario para la realización de experimentos de RT-PCR tal y como se indica en el apartado 6.2 de Materiales y Métodos.

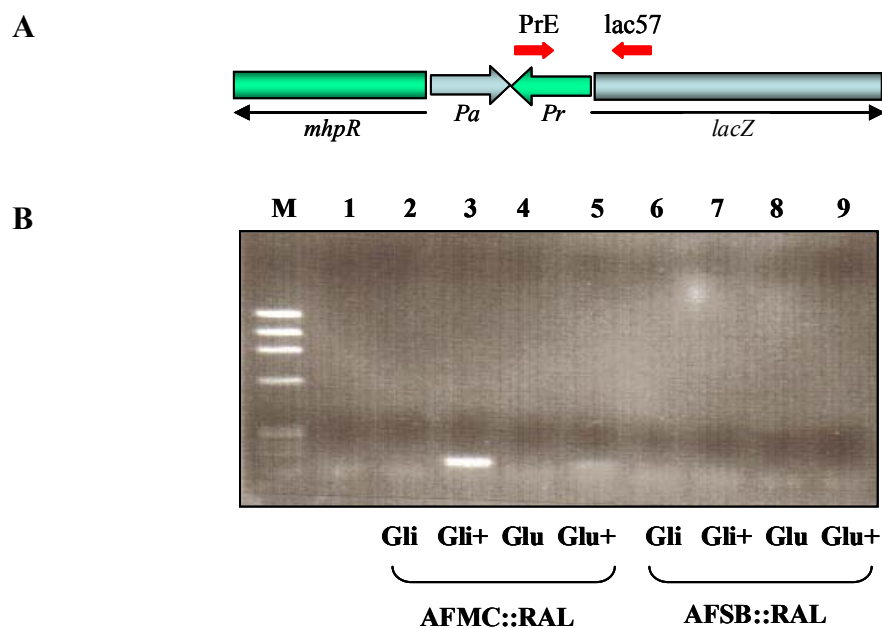


Figura 32. Electroforesis en gel de agarosa del producto de RT-PCR del fragmento *Pr-lacZ*. A) Esquema de la fusión traduccional RAL con los oligonucleótidos PrE y Lac57 que fueron utilizados en la reacción de RT-PCR. B) Amplificación de cDNA obtenido mediante retrotranscripción a partir de RNA total utilizando la técnica de RT-PCR. Como marcadores de peso molecular (M) se emplearon los fragmentos generados tras la digestión de DNA del fago Φ X174 con *Hae*III (New England Biolabs). Calle 1, reacción de PCR control sin reacción de retrotranscripción inicial (control de ausencia de contaminación de DNA en la preparación de RNA). Calles 2-5, reacciones de PCR a partir de cDNA de la cepa AFMC::*RAL* y calles 6-9, reacciones de PCR a partir de cDNA de la cepa AFSB::*RAL*. Gli y Glu indica en presencia de glicerol y glucosa, respectivamente. – y + representa en ausencia y presencia de 3HPP, respectivamente.

Los resultados obtenidos indican que en la cepa *E. coli* AFMC::*RAL* la expresión del gen tástigo *lacZ* dirigida por el promotor *Pa* se induce en presencia de glicerol y 3HPP, apreciándose una expresión basal en presencia de glucosa y 3HPP. Sin embargo, las células de *E. coli* AFSB::*RAL* (*crp*⁻) no mostraron expresión del gen *lacZ* en ninguna de las condiciones de crecimiento ensayadas. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en el experimento de actividad β -galactosidasa (Torres *et al.*, 2003), concluyéndose que la expresión a partir del promotor *Pa* está sujeta a represión catabólica por glucosa, a nivel transcripcional, mediada por el regulador global CRP.

2.2.2. Análisis del papel de CRP en la transcripción de *Pa* mediante ensayos de transcripción *in vitro*.

Para comprobar *in vitro* el efecto de la proteína CRP purificada sobre la transcripción a partir del promotor *Pa*, se llevó a cabo un ensayo de transcripción *in vitro*, utilizando las proteínas RNA polimerasa, MhpR-His y CRP, y el plásmido pJCDA (Tabla 5) como molde (Fig. 33). En las mezclas de reacción se incluyó heparina (ver apartado 8.5 de Materiales y Métodos) con objeto de que la RNA polimerasa realizara una única ronda de transcripción (*single-round*). Ya habíamos observado anteriormente (Fig. 14) que cuando se añaden a la mezcla de reacción las proteínas RNA polimerasa y MhpR-His junto con el inductor 3HPP, se detectan los transcritos RNA1 (RNA control) y PA (obtenido a partir del promotor *Pa*). Además, el nivel de expresión del transcrito PA depende de la concentración de 3HPP presente en el ensayo (Fig. 14). En el panel 33A se muestra un ensayo de transcripción *in vitro* en el que se observa el efecto de CRP sobre la expresión del promotor *Pa* y en el panel 33B, se representa el resultado obtenido al cuantificar, mediante densitometrado, la intensidad de las bandas que se corresponden con los transcritos obtenidos (ratio PA/RNA1). En los tres primeros carriles del gel, se muestra el nivel de expresión a partir del promotor

Pa detectado en ausencia del regulador global CRP y en presencia de tres concentraciones de 3HPP (100, 250 y 500 μ M). Al añadir a la mezcla de reacción, concentraciones crecientes del complejo cAMP-CRP, la transcripción a partir de *Pa* aumentó significativamente, indicando la existencia de un mecanismo de activación sinérgica a nivel del promotor *Pa*. Este efecto fue observado en presencia de todas las concentraciones de 3HPP ensayadas. Estos resultados demuestran por primera vez *in vitro* el efecto sinérgico mediado por el complejo cAMP-CRP sobre la inducción a partir del promotor *Pa*.

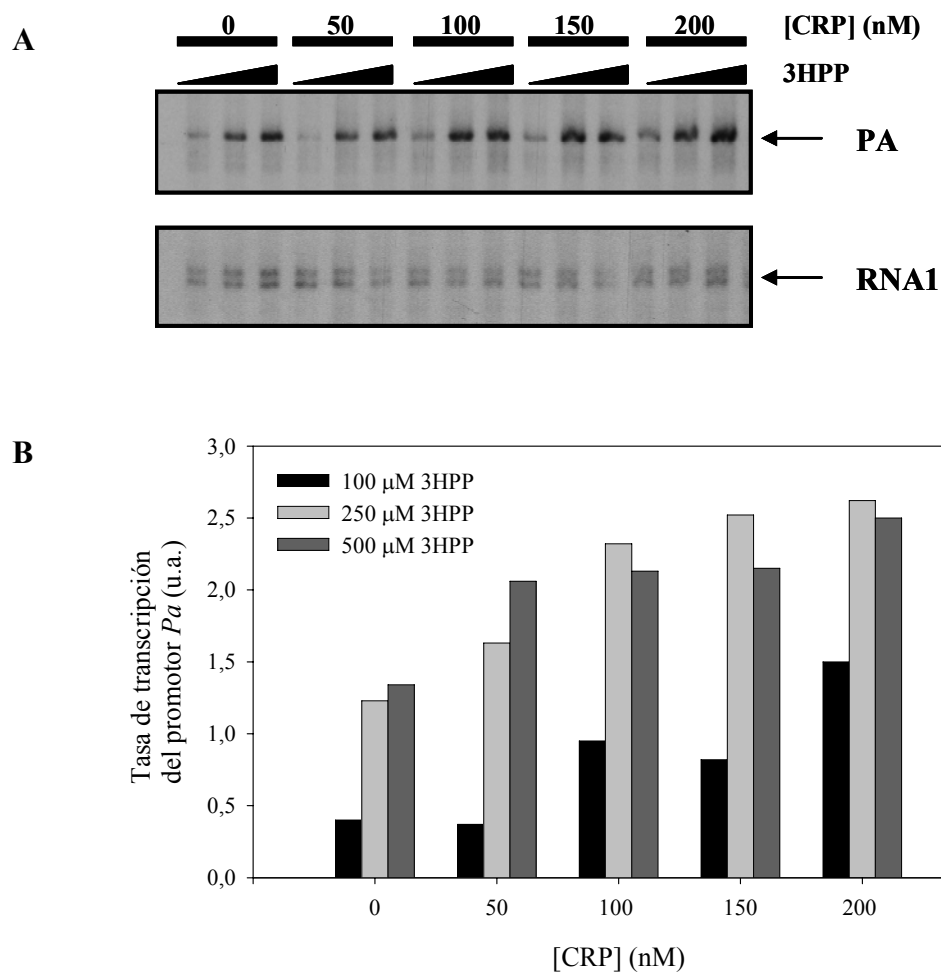


Figura 33. Efecto sinérgico de la proteína CRP en la transcripción mediada por *Pa*. **A)** Ensayo de transcripción *in vitro* (*single round*) a partir de *Pa* en presencia de MhpR-His y CRP. La concentración de proteínas fue: RNA polimerasa 100 nM, MhpR-His 100 nM y concentraciones crecientes de CRP (0, 50, 100, 150, 200 nM). Las concentraciones de 3HPP ensayadas fueron 100, 250 y 500 μ M. Los transcritos detectados se indican con flechas. El transcrito denominado RNA1 de 107-108 nucleótidos es un control interno del plásmido pJCDA. **B)** Tasa de transcripción del promotor *Pa*. Se muestra el resultado obtenido al expresar la intensidad de la banda correspondiente al transcrito a partir del promotor *Pa* en función de la intensidad de la banda correspondiente al RNA1 control.

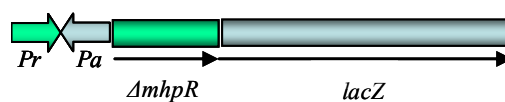
2.3. Estudios sobre la represión catabólica del gen *mhpR*.

Experimentos previos realizados *in vivo* (Torres *et al.*, 2003) demostraron que la expresión del promotor *Pr* era independiente del regulador específico de la ruta *mhp*. En este apartado se analizó la existencia de represión catabólica mediada por el complejo cAMP-CRP sobre la expresión del gen regulador *mhpR*, tal y como sucede sobre la expresión de los genes catabólicos.

2.3.1. Estudios *in vivo* sobre la represión catabólica del gen *mhpR*.

Con el fin de determinar si la expresión dirigida por *Pr* estaba sometida, igual que *Pa*, a represión catabólica por glucosa, se llevaron a cabo ensayos de actividad β -galactosidasa con las cepas de *E. coli* AFMC::RL y *E. coli* AFSB::RL (*crp*⁻), portadoras de la fusión traduccional RL (*Pr*::*lacZ*) en monocopia (Torres *et al.*, 2003), (Fig. 34A). Ambas cepas fueron cultivadas en medio mínimo M63 con glicerol (20 mM) o glucosa (10 mM), en ausencia o presencia de 3HPP (1 mM). Cuando se compararon los niveles de actividad β -galactosidasa obtenidos con la cepa de *E. coli* AFMC::RL cultivada en presencia de glicerol con los obtenidos en presencia de glucosa, ya sea en presencia o ausencia de 3HPP, se observó que en presencia de glucosa la expresión de la fusión *Pr*::*lacZ* fue 6 veces menor que en presencia de glicerol, lo que sugiere la existencia de un posible efecto de represión catabólica. La actividad del promotor *Pr* obtenida a partir de cultivos de la cepa de *E. coli* AFSB::RL (*crp*⁻) en cualquiera de las condiciones ensayadas, fue similar a la obtenida a partir de cultivos de la cepa de *E. coli* AFMC::RL en presencia de glucosa. Estos resultados indican que CRP actúa como activador de la transcripción del promotor del gen regulador.

A



Fusión traduccional RL

B

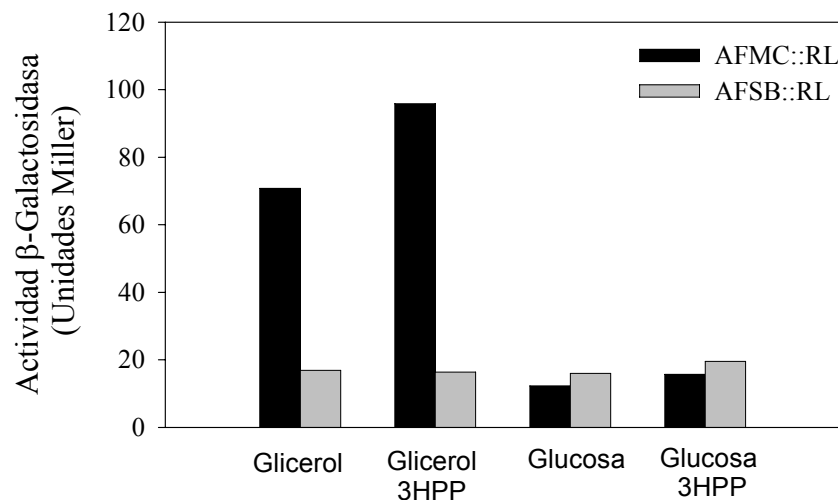


Figura 34. A) Esquema de la fusión traduccional RL (*Pr::lacZ*). Las flechas indican la dirección de la transcripción de los genes. $\Delta mhpR$, significa un gen *mhpR* deletado. **B) Estudio de represión catabólica mediada por glucosa sobre el gen *mhpR*.** Ensayos de actividad β -galactosidasa a partir de células AFMC::RL (negro) y AFSB::RL (gris) cultivadas en medio mínimo M63 con glicerol (20 mM) o glucosa (10 mM) en presencia o ausencia de 3HPP (1 mM). Los ensayos de actividad β -galactosidasa se realizaron como se indica en el apartado 7.7 de Materiales y Métodos. Se muestran los resultados de un experimento. Estos resultados fueron reproducibles en tres experimentos distintos.

2.3.2. Estudios *in vitro* sobre la represión catabólica del gen *mhpR*.

Para determinar si el efecto de represión catabólica sobre la expresión del promotor *Pr*, tiene lugar a nivel transcripcional se llevaron a cabo experimentos de RT-PCR. Para ello se aisló RNA total de cultivos de *E. coli* AFMC::RAL y *E. coli* AFSB::RAL crecidos en medio mínimo M63 con glicerol (20 mM) o glucosa (10 mM), en ausencia o presencia de 3HPP (1 mM) y en fase exponencial de crecimiento. Los experimentos de RT-PCR se realizaron como se indica en el apartado 6.2 de Materiales y Métodos, utilizando los oligonucleótidos 114 y PP6R que hibridan en la secuencia codificante del gen *mhpR* (Fig. 35A), (Tabla 6) y amplifican un fragmento de 348 nucleótidos. Los resultados obtenidos en los ensayos de RT-PCR que se muestran en la figura 35B revelan que en las células de *E. coli* AFMC::RAL la expresión del gen *mhpR* se induce en presencia de glicerol, ya sea, en ausencia o en presencia de 3HPP, apreciándose una expresión basal en presencia de glucosa. Sin embargo, las células de *E. coli* AFSB::RAL (*crp*⁻) mostraron una expresión basal del gen *mhpR* en todas las condiciones de crecimiento ensayadas. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en los experimentos de actividad β -galactosidasa, concluyéndose que la

cultivaron en presencia de 3HPP (Fig. 36B). Estos resultados demuestran que todos los RNA mensajeros que se utilizaron no estaban degradados y que, por tanto, para la inducción de la transcripción de *Pr* es imprescindible la presencia de CRP.

Además, según el tamaño del transcrito obtenido en el apartado 1.5 de Resultados, de todos los sitios de inicio de la transcripción identificados en el panel Pa (Fig. 36B), la transcripción *in vitro* a partir de *Pa* comienza a partir del nucleótido citosina (cadena codificante). Este nucleótido equivale a la guanina (cadena no codificante) identificada en la parte superior de la figura 36B.

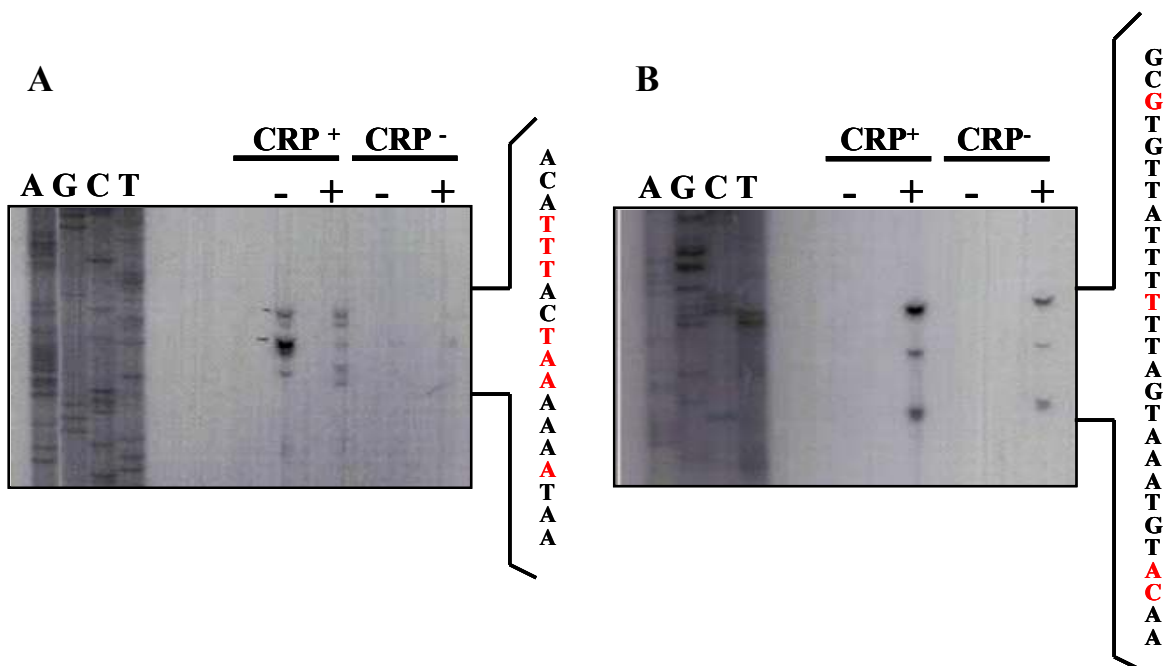
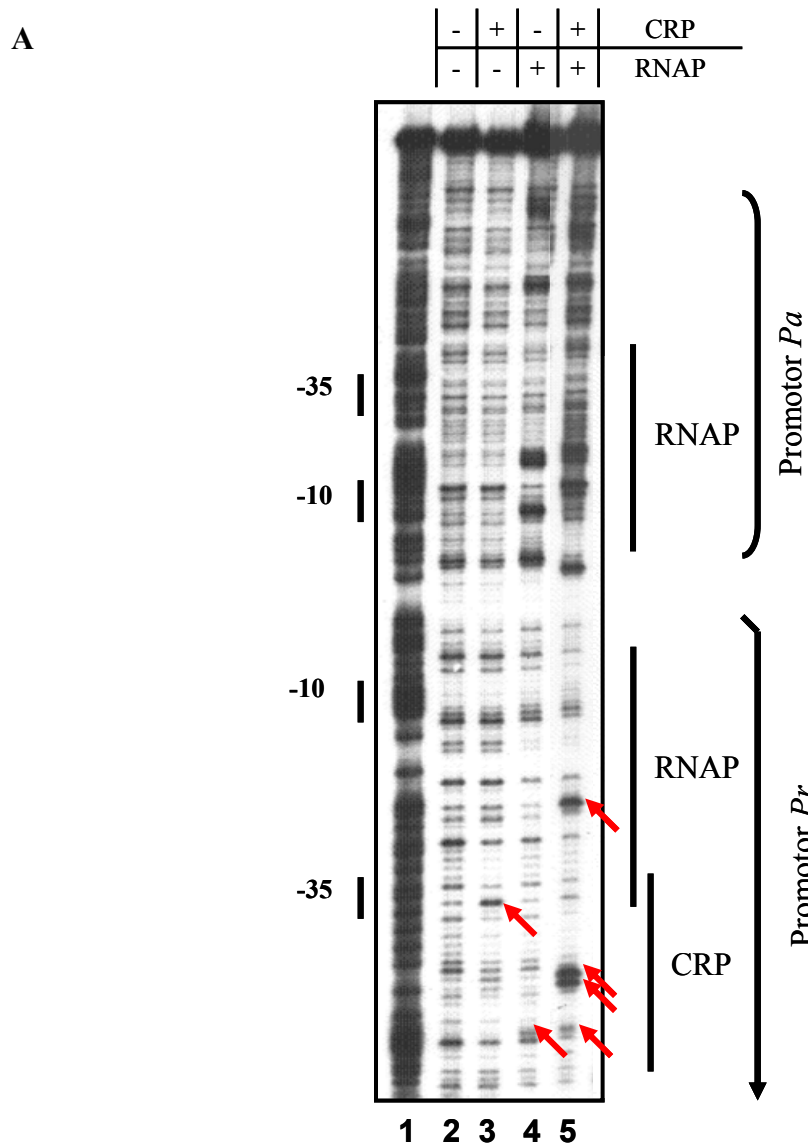


Figura 36. Identificación del inicio de la transcripción (+1) de los promotores *P_a* y *P_r*. CRP⁺ y CRP⁻ representan las cepas AFMC (pRAL) y AFSB (pRAL), respectivamente. Se indica ausencia (-) y presencia (+) de 3HPP. **A)** A la izquierda (calles A, G, C y T) se muestra la secuencia del plásmido recombinante pRAL, que incluye la región promotora *P_r*, realizada con el oligonucleótido PP6 (Tabla 6). Las posiciones +1 del promotor *P_r* se corresponden con los nucleótidos marcados en rojo en la hebra no codificante. **B)** A la izquierda, (calles A, C, G y T) se muestra la secuencia del plásmido recombinante pRAL, que incluye la región promotora *P_a*, realizada con el oligonucleótido Lac-57 (Tabla 6). Las posiciones +1 del promotor *P_a* se corresponden con los nucleótidos marcados en rojo en la hebra no codificante.

2.3.4. Estudios *in vitro* de la interacción de la proteína CRP con la región promotora *Pr*.

Como se ha mencionado en apartados anteriores, CRP regula la expresión dirigida por los promotores *Pa* y *Pr*. Torres y colaboradores (2003) demostraron la capacidad de unión de CRP al promotor *Pa* mediante ensayos de retardo en gel, por lo

que en este apartado nos centramos en el estudio de la capacidad de unión de CRP al promotor *Pr*. Para localizar la secuencia reconocida por CRP dentro del promotor *Pr* se realizaron ensayos de protección frente a la digestión con DNasa I con las proteínas CRP y RNA polimerasa y el fragmento PA-PR marcado en el extremo 3', tal y como se indica en el apartado 8.1 de Materiales y Métodos. Como se muestra en la figura 37A, la unión de CRP a la sonda PA-PR provoca una huella de protección no muy clara además de un ligero cambio en el patrón de bandas en la zona de la caja -35 (5'-CGCACA-3') del promotor *Pr*. La RNA polimerasa se une a los promotores *Pa* y *Pr* contenidos en la sonda, sin necesidad de interaccionar con otra proteína reguladora. Centrándonos en la secuencia del promotor *Pr*, la unión de RNA polimerasa produce una huella de protección que comprende la caja -10 (5'-TAAAAA-3') y la región situada entre las cajas -10 y -35 (Figs. 37A y 37B). La unión de RNA polimerasa a *Pr* en presencia de CRP induce la formación de una zona de hipersensibilidad entre las cajas -10 y -35 (Fig. 37A, ver calle 5; Fig. 37B) que indica una deformación del DNA. Además, la unión de CRP a *Pr* en presencia de RNA polimerasa es más evidente que en ausencia de ésta, al inducir la formación de otras zonas de hipersensibilidad a la DNasa I alrededor de la caja -35, distintas a las producidas cuando sólo se utiliza CRP, que indican también cambios topológicos en el DNA, inducidos por la presencia de CRP (Figs. 37A y 37B). En esa región se localizó una secuencia (5'-AAATGTCGTTGCGCGCACAGTA-3'), centrada en la posición -40,5 y que difiere en 9 nucleótidos de los 22 que componen la secuencia consenso de CRP (Busby y Ebright, 1999), 3 de los cuales se encuentran dentro de los motivos más conservados de la secuencia CRP consenso (Fig. 37C). La localización de un sitio CRP, centrado en la posición -40,5 solapando con la caja -35, permite clasificar al promotor *Pr* como un promotor dependiente de CRP de clase II.



B



C

CONSENSO	AAATGTGATCTAGATCACA
PROMOTOR <i>Pr</i> (-40,5)	AAATGTCGTTGCGCGCACAGTA
PROMOTOR <i>galP1</i> (-41,5)	TAATTTATCCATGTCACACTT

Figura 37. A) Análisis mediante *footprinting* de los complejos DNA-proteína formados por la sonda PA-PR y las proteínas implicadas en su regulación. Como sonda se utilizó el fragmento PA-PR marcado en el extremo 3'. Las concentraciones de proteínas empleadas en el ensayo fueron RNA polimerasa (100 nM) y CRP (200 nM). La presencia de cada proteína en el ensayo se indica con el signo + en la parte superior de la figura. La calle 1 muestra la secuencia A+G del fragmento PA-PR. Se indican las cajas -10 y -35 de cada promotor. Las bandas de hipersensibilidad a la actividad DNasa I se indican con una flecha roja. **B) Esquema del promotor *Pr* del cluster *mhp*.** Se señala dentro de un recuadro la secuencia operadora de CRP. Las bandas de hipersensibilidad a la actividad DNasa I se indican con una flecha y en rojo. La flecha curvada representa la posición +1 del promotor *Pr*. Se indican en letra azul las cajas -10 y -35 del promotor *Pr*. El codon de iniciación de la traducción del gen *mhpA* se indica en color gris. **C) Alineamiento de las secuencias de los sitios de unión a CRP de *Pr* y *PgalPI* con la secuencia CRP consenso.** En la secuencia CRP consenso se indican los motivos conservados dentro de recuadros. En los sitios de unión de CRP localizados en los promotores *Pr* y *PgalPI* se marcan en gris los nucleótidos que coinciden con los de la secuencia consenso.

2.3.5 Influencia de CRP sobre la formación del complejo abierto en el promotor *Pr*.

Para estudiar si el mecanismo de activación de la transcripción de *Pr* mediado por CRP es a nivel de la iniciación de la transcripción, se realizaron ensayos de *footprinting* con permanganato potásico utilizando el fragmento PA-PR marcado en el extremo 3'. El permanganato potásico reacciona con residuos de timina en regiones de DNA monocatenario. Esta reacción permite observar y localizar la burbuja que se forma en el DNA (complejo abierto) al inicio de la transcripción. Como se muestra en la figura 38A, en presencia de RNA polimerasa (100 ó 200 nM), con o sin la proteína MhpR-His (100 nM) no se observa la formación del complejo abierto en el promotor *Pr*. Esto mismo se observa si además se añade 3HPP 1 mM. Sin embargo, la combinación formada por las proteínas RNA polimerasa (100 nM) y CRP (200 nM) induce 18 veces la formación de complejo abierto en *Pr* y si también está presente el complejo MhpR-His/3HPP, la activación es de 7,6 veces. Este efecto es mayor cuando se añade el doble de concentración de RNA polimerasa (200 nM), detectándose una activación de la formación de complejo abierto de 26 veces con CRP y de 6 veces cuando además está presente el complejo MhpR-His/3HPP (Fig. 38A). El complejo abierto en el promotor *Pr* formado por la RNA polimerasa en presencia de CRP comprende una región de DNA monocatenario que se extiende desde la posición -1 hasta -12 (Figs. 38A y 38B). La disminución de la intensidad del complejo abierto formado en el promotor *Pr* detectada al añadir a la mezcla RNA polimerasa-CRP el complejo MhpR-His/3HPP, puede deberse a una disminución de la concentración

disponible de las proteínas RNA polimerasa y CRP para activar *Pr* al implicarse, en estas condiciones, en la activación de la transcripción del promotor *Pa*. Con estos experimentos se confirma que CRP induce la formación del complejo abierto por parte de la RNA polimerasa en el promotor *Pr*.

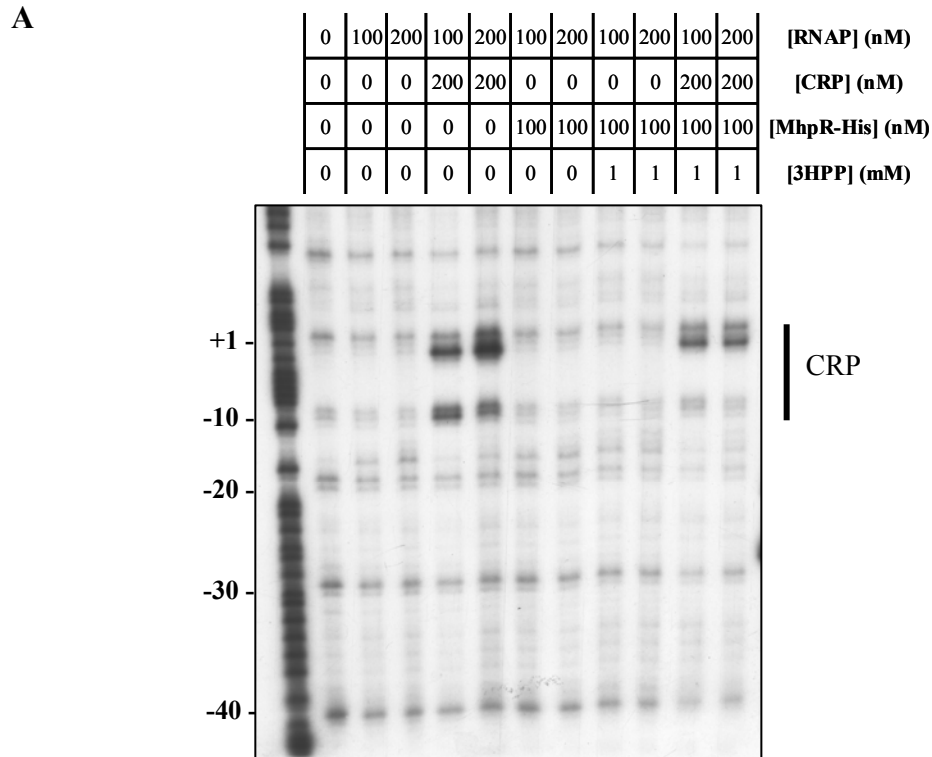
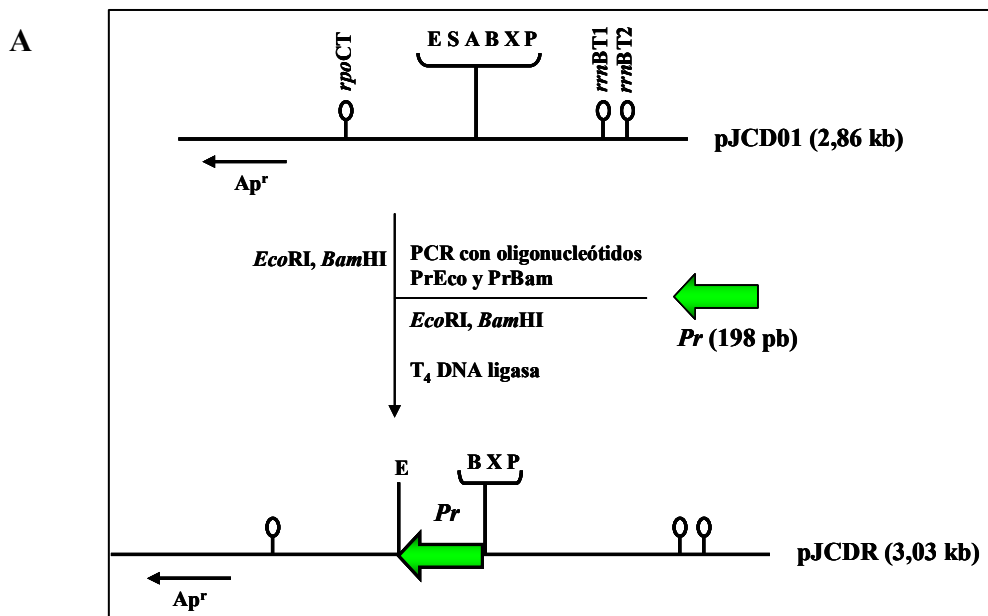


Figura 38. A) Ensayo de footprinting con KMnO_4 . La calle marcada con un asterisco muestra la reacción de secuencia A+G. Las concentraciones de las proteínas utilizadas en cada calle se detallan en la parte superior de la figura. Los residuos de timina que reaccionaron con permanganato potásico se indican con una línea. **B) Esquema de la secuencia del promotor *Pr* (cadena codificante) donde se representa el complejo abierto en presencia de CRP.** En un recuadro de color negro se indica el sitio de iniciación de la transcripción (+1) y en gris, las timinas que reaccionaron en presencia de CRP. Las cajas -10 y -35 y la secuencia operadora de CRP se muestran en la figura. La flecha indica la dirección de la transcripción.

2.3.6. Análisis *in vitro* del papel de CRP en la transcripción de *Pr*.

Con el fin de confirmar *in vitro* el efecto activador del complejo cAMP-CRP en la expresión del gen *mhpR* detectado *in vivo* (Fig. 34), se realizaron experimentos de transcripción *in vitro* utilizando las proteínas RNA polimerasa y CRP. Como molde para la transcripción se utilizó el plásmido pJCDPR que contiene el promotor *Pr* flanqueado por terminadores de la transcripción (Fig. 39A). En las mezclas de reacción se omitió la heparina para permitir que la RNA polimerasa realizara múltiples rondas de transcripción (*multiple-round*). Los resultados presentados en la figura 39B demuestran que en ausencia de la proteína activadora CRP, no hay transcripción debida a *Pr*, detectándose sólo el RNA control. Sin embargo, al añadir a la mezcla de reacción CRP (25 nM) se detecta el transcrito a partir del promotor *Pr*. Con este resultado se demuestra *in vitro* la dependencia total del activador CRP en la expresión mediada por *Pr*.

El tamaño del transcrito desde *Pr* (132 nucleótidos) implica que la transcripción *in vitro* a partir de *Pr* comienza en el nucleótido adenina (cadena codificante) la cual equivale a la timina (cadena no codificante) identificada en el apartado 2.3.3 de Resultados (banda superior de la figura 36A).



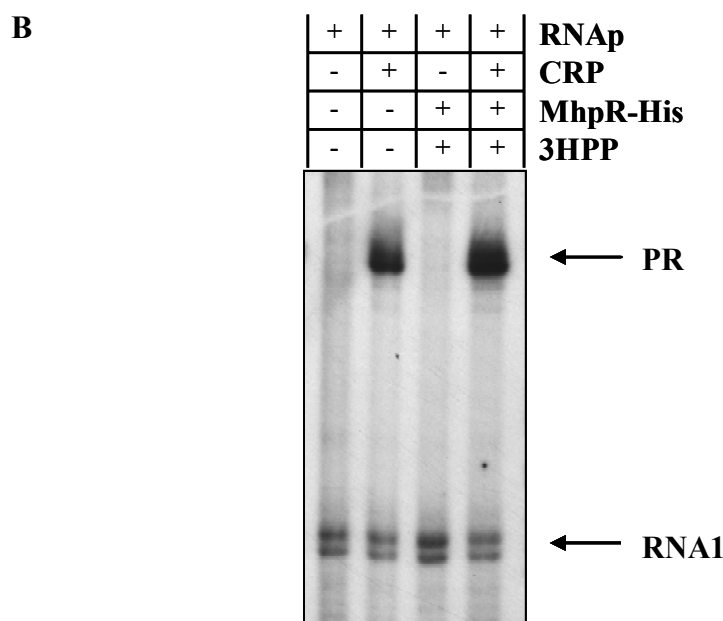


Figura 39. A) Construcción del plásmido pJCDR. Se incluyen los sitios de restricción más relevantes; E: *EcoRI*; S: *SacI*; A: *AvaI*; B: *BamHI*; X: *XbaI* y P: *PstI*. Ap^r indica el gen que confiere resistencia a ampicilina. Flanqueando a los sitios de restricción se encuentran los terminadores de la transcripción (*rpoCT*, *rrnBT1* y *rrnBT2*) representados en la figura por unos bucles. **B) Activación de la transcripción a partir de *Pr* por cAMP-CRP.** Ensayo de transcripción *in vitro* (*multiple-round*) El plásmido pJCDR se incubó en presencia de distintas proteínas: RNA polimerasa (100 nM), CRP (25 nM) y MhpR-His (25 nM) y del inductor 3HPP (1 mM). + indica la presencia de proteína en el ensayo. El transcrito debido a *Pr* (132 nucleótidos) y el RNA1 control (107-108 nucleótidos) se indican con flechas.

3. Análisis del efecto sinérgico del PP en la activación de MhpR.

Resultados previos demostraron que aunque el PP que no es un inductor de los genes catabólicos *mhp*, es capaz de ejercer un efecto de activación sinérgica cuando se suministra simultáneamente con los inductores de MhpR: 3HPP o 3HCl (Tesis doctoral B. Torres, 2002).

Dado que el DHPP es un intermediario que se forma en la degradación del PP y dicho compuesto podría inducir la ruta *mhp*, se decidió comprobar el efecto sinérgico del PP sobre la activación de MhpR en una cepa que fuera incapaz de transformar el PP en DHPP. Por ello se realizaron ensayos con la cepa de *E. coli* ED1061 (Tabla 4) que contiene una mutación insercional en el gen *hcaE* (gen que forma parte del *cluster hca*) y una deleción cromosómica ($\Delta lacX74$) que abarca los primeros genes del *cluster mhp* responsables del catabolismo del DHPP (Díaz *et al.*, 1998).

3.1. Obtención de la cepa de *E. coli* ED1061::AL.

Para profundizar en el estudio del efecto sinérgico mediado por PP en la activación de la proteína MhpR era necesario disponer de una cepa de *E. coli* ED1061 portadora de la fusión traduccional AL (*Pa::lacZ*) en cromosoma (Fig. 40). Para la obtención de dicha cepa se extrajo la fusión AL mediante digestión con la enzima *NotI* a partir del plásmido pAL (Tabla 5) y el fragmento obtenido se introdujo en el minitransposón pUTmini-Tn5Sm/Sp (Fig. 40). La fusión *Pa::lacZ* se introdujo en el cromosoma de ED1061 mediante una conjugación biparental utilizando las cepas *E. coli* S17-1 λ pir (pUTAL2) y *E. coli* ED1061 como cepa donadora y receptora, respectivamente (Fig. 40). Los transjugantes, *E. coli* ED1061::AL, se seleccionaron en placas LB con kanamicina y espectinomicina.

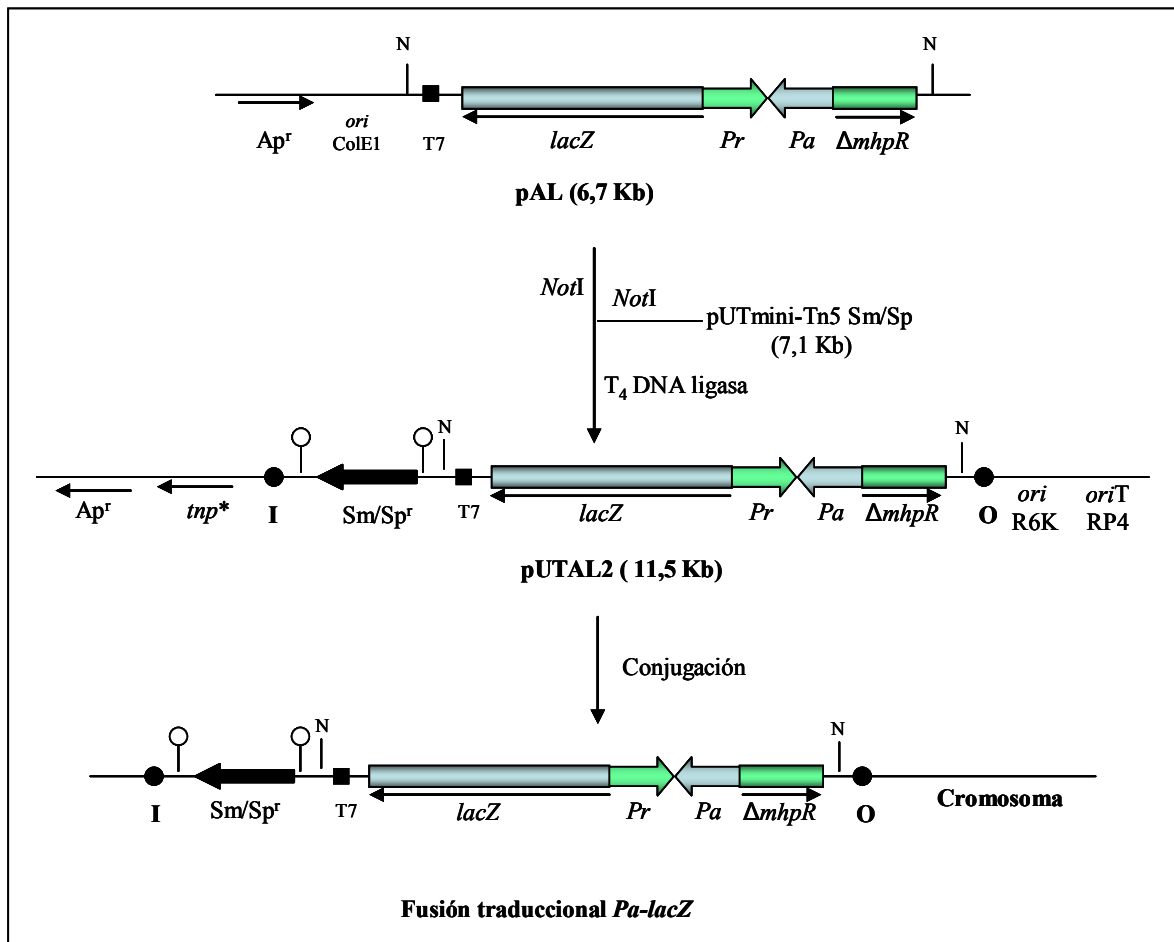
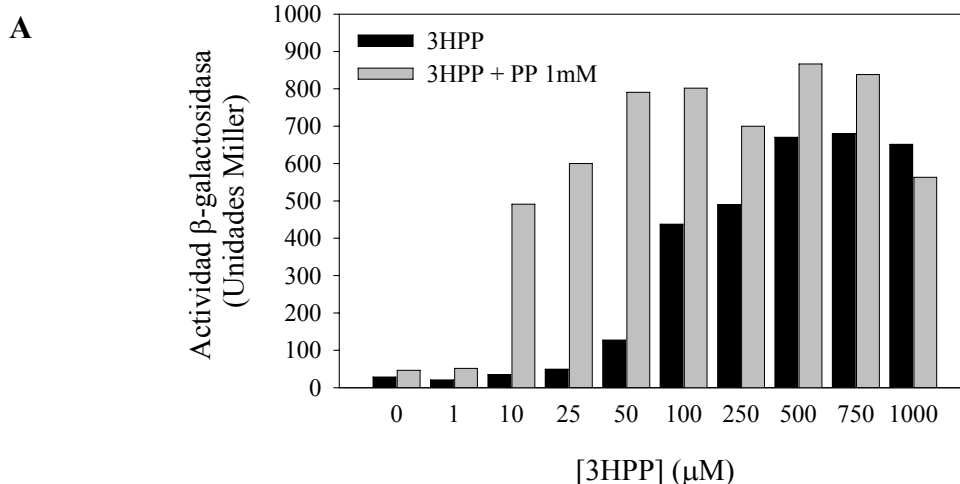


Figura 40. Representación esquemática de la construcción de la cepa de *E. coli* ED1061 que contiene la fusión traduccional *Pa::lacZ*. Las flechas indican la dirección de la transcripción de los genes. Δ *mhpR*, significa un gen *mhpR* deleciónado. Las dianas de restricción *NotI* se señalan en la figura. Los círculos de color negro representan los extremos I (izquierdo) y O (derecho) del minitransposón. *tnp**, representa el gen modificado que codifica la transposasa. Los orígenes de replicación (*oriR6K* y *oriColE1*) y

movilización mediada por RP4 (*oriTRP4*) se señalan en la figura. Ap^r y Sm/Sp^r indican los genes que confieren resistencia a ampicilina y estreptomicina/espectinomicina, respectivamente. T7, terminador de la transcripción temprana del fago T7.

3.2. Análisis *in vivo* del efecto sinérgico de PP en la activación de MhpR.

Para determinar si el efecto sinérgico ejercido por el PP es dependiente de su concentración, se realizaron ensayos de actividad β -galactosidasa a partir de cultivos de *E. coli* ED1061::AL (pPAL), cepa que contiene en multicopia el gen *mhpR* bajo el control del promotor *P_{lac}*, incubados en presencia de concentraciones variables de 3HPP (1-1000 μ M) en ausencia o presencia de una concentración fija de PP (1 mM). Según se muestra en la figura 41A la concentración óptima de 3HPP resultó ser 25 μ M, detectándose un aumento en la actividad β -galactosidasa de hasta 15 veces en presencia de 1 mM de PP. Teniendo en cuenta este resultado, se llevaron a cabo otra serie de medidas de actividad β -galactosidasa a partir de otros cultivos de *E. coli* ED1061::AL (pPAL) que fueron incubados en presencia de una concentración de 3HPP 25 μ M tanto en ausencia como en presencia de concentraciones crecientes de PP. La figura 41B muestra como el efecto sinérgico es mayor cuando la concentración de PP es de 750 μ M y dicho efecto se satura en presencia de concentraciones superiores de este compuesto. Por lo tanto, estos resultados sugieren que el efecto sinérgico es dependiente de la concentración de PP.



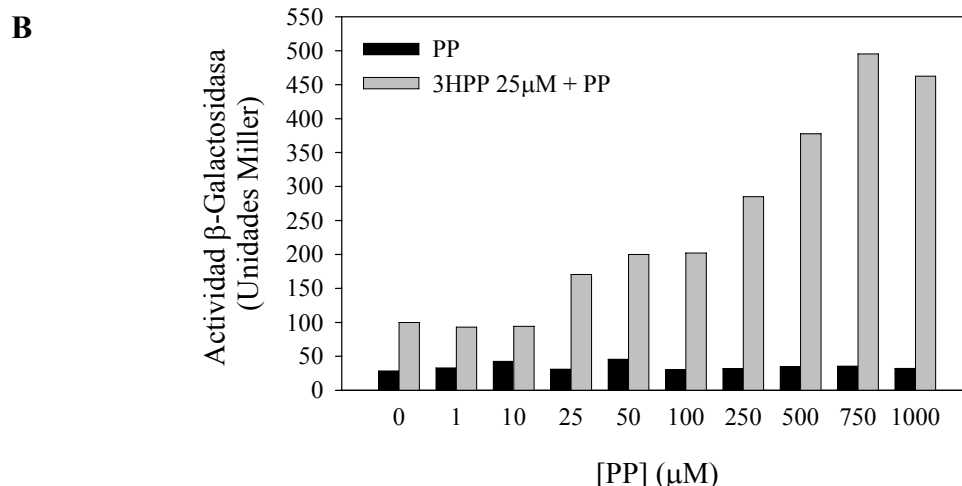


Figura 41. Efecto de la concentración de PP sobre la activación mediada por 3HPP. A) Los cultivos de *E. coli* ED1061::AL (pPAL) se incubaron hasta una DO_{600} 0,9, en medio LB en presencia de concentraciones crecientes de 3HPP en ausencia (negro) y presencia de una concentración fija de PP (1 mM) (gris). **B)** Las mismas células se incubaron en medio LB en presencia de concentraciones crecientes de PP en ausencia (negro) y presencia de una concentración fija de 3HPP (25 μM) (gris). Los ensayos de actividad β -galactosidasa se realizaron como se indica en el apartado 7.7 de Materiales y Métodos. Se muestran los resultados de un experimento. Estos resultados fueron reproducibles en tres experimentos distintos.

3.3. Análisis *in vitro* del efecto sinérgico de PP en la activación de MhpR.

Para analizar la posibilidad de que MhpR-His presentase mayor afinidad por el DNA cuando el PP y el 3HPP estuvieran presentes se llevaron a cabo ensayos de retardo en gel. Como sonda de DNA se utilizó la región intergénica *mhpR-mhpA* (PA-PR) marcada radiactivamente y concentraciones crecientes de MhpR-His (0,5-80 nM). El mismo ensayo fue llevado a cabo en diferentes condiciones que fueron: i) en ausencia de compuesto aromático (Fig. 42, panel control); ii) en presencia de PP 0,5 mM (Fig. 42, panel PP); iii) en presencia de 3HPP 0,5 mM (Fig. 42, panel 3HPP); y iv) en presencia de 3HPP junto con PP a una concentración de 0,25 mM cada uno (Fig. 42, panel 3HPP + PP).

Las bandas obtenidas en todos los ensayos fueron cuantificadas mediante densitometrado, lo que permitió determinar la K_d de formación del complejo proteína-DNA. Así, en ausencia de compuesto aromático la K_d fue 4,5 nM, mientras que en presencia de PP fue 2 nM, en presencia de 3HPP, 1,5 nM y en presencia de ambos, 0,7 nM. Por tanto, ambos compuestos aumentan ligeramente la afinidad de MhpR-His por el DNA.

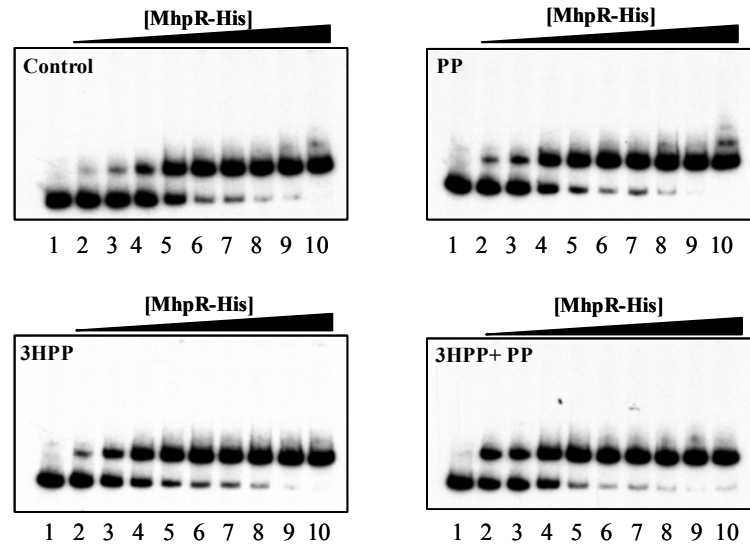


Figura 42. Ensayos de unión de la proteína MhpR-His a la sonda PA-PR. Se ensayaron concentraciones crecientes de MhpR-His purificada, calle 1 (0 nM), calle 2 (0,5 nM), calle 3 (1 nM), calle 4 (2,5 nM), calle 5 (5 nM), calle 6 (7,5 nM), calle 7 (10 nM), calle 8 (20 nM), calle 9 (40 nM) y calle 10 (80 nM). Las concentraciones de 3HPP y PP ensayadas fueron 0,5 mM, cuando se añadieron por separado y 0,25 mM de cada uno cuando se añadieron juntos. La concentración de DNA empleada fue 1 nM.

Para estudiar el efecto sinérgico del PP sobre la activación mediada por MhpR se realizaron ensayos de transcripción *in vitro* con heparina (*single-round*) utilizando como molde el plásmido pJCDAR, portador de los promotores *Pa* y *Pr* del *cluster mhp* (Fig. 43).

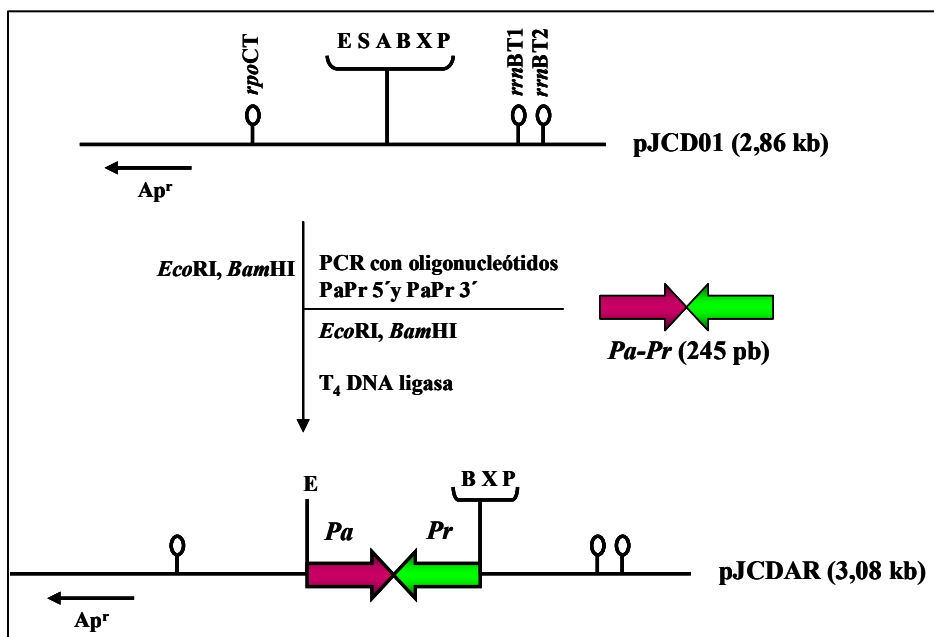
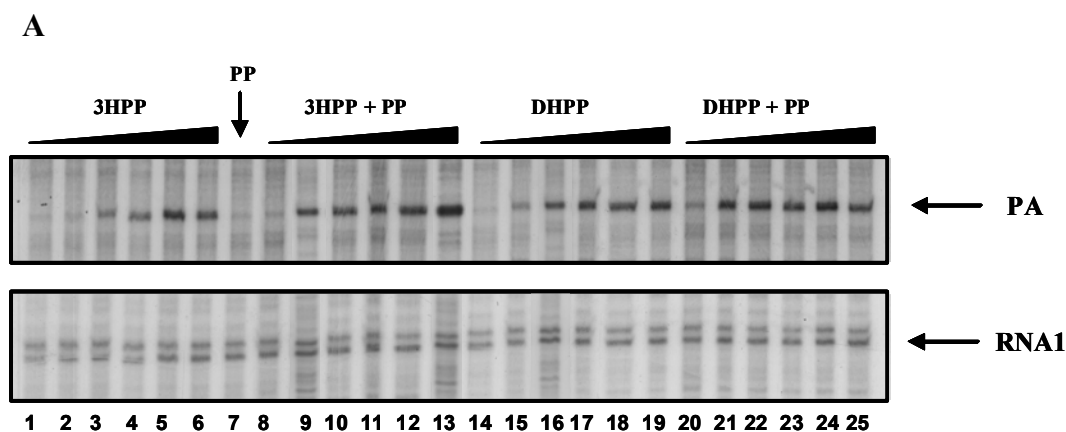


Figura 43. Construcción del plásmido pJCDAR. Se incluyen los sitios de restricción más relevantes: E: *EcoRI*; S: *SacI*; A: *AvaI*; B: *BamHI*; X: *XbaI* y P: *PstI*. Ap^r indica el gen que confiere resistencia a ampicilina. Flanqueando a los sitios de restricción se encuentran los terminadores de la transcripción (*rpoCT*, *rrnBT1* y *rrnBT2*) representados en la figura por unos bucles.

El experimento de transcripción *in vitro* se llevó a cabo con las proteínas RNA polimerasa (100 nM), MhpR-His (100 nM) y CRP (200 nM). Los transcritos obtenidos (PA y RNA1) (Fig. 44A) fueron cuantificados mediante densitometrado (Fig. 44B). La figura 44 muestra como la transcripción a partir del promotor *Pa* es absolutamente dependiente de los efectores 3HPP y DHPP. En presencia de MhpR-His (100 nM), la adición de concentraciones crecientes de 3HPP (de 1 a 1000 μ M) produjo un incremento significativo de la transcripción a partir del promotor *Pa* (Fig. 44A, calles 1-6 y Fig. 44B). Dicho efecto de activación fue observado también en presencia de DHPP (Fig. 44A, calles 14-19 y Fig. 44B). De acuerdo con los resultados obtenidos *in vivo*, en presencia de PP no se detectó el transcrito de interés (Fig. 44A, calle 7) debido a que este compuesto no es un activador de la transcripción de *Pa*. Sin embargo, los ensayos llevados a cabo en presencia de PP junto con 3HPP o DHPP (Fig. 44A, calles 8-13 y calles 20-25, respectivamente y Fig. 44B) revelaron la existencia del efecto sinérgico mediado por el PP sobre la transcripción a partir del promotor *Pa*. Esta respuesta sinérgica fue más evidente cuando se usó DHPP, en lugar de 3HPP, en combinación con PP (Fig. 44B).



B

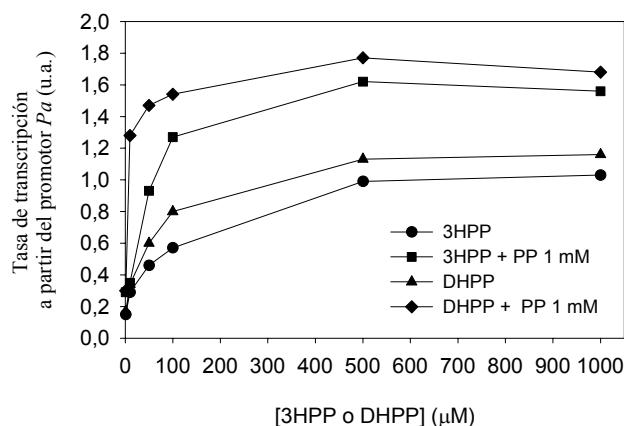


Figura 44. Estudio del efecto sinérgico del PP sobre la transcripción de *Pa* mediante transcripción *in vitro*. **A)** Resultado de un experimento de transcripción *in vitro* (*single round*) en el que se utilizó el plásmido pJCDAR como molde. Las concentraciones de proteína empleadas en el experimento fueron: RNA polimerasa (100 nM), MhpR-His (100 nM) y CRP (200 nM). Las concentraciones de 3HPP ensayadas fueron: en las calles 1, 8, 14 y 20 (1 μM), en las calles 2, 9, 15 y 21 (10 μM), en las calles 3, 10, 16 y 22 (50 μM), en las calles 4, 11, 17 y 23 (100 μM), en las calles 5, 12, 18 y 24 (500 μM) y en las calles 6, 13, 19 y 25 (1000 μM). En las calles 7, 8-13 y 20-25 se ensayó PP (1 mM). La flecha indica la banda correspondiente al transcrito obtenido a partir del promotor *Pa*. **B)** Tasa de transcripción del promotor *Pa*. Se muestra el resultado obtenido al expresar la intensidad de la banda correspondiente al transcrito a partir del promotor *Pa* en función de la intensidad de la banda correspondiente al RNA1 control.

3.4. Estudio del efecto del PP sobre la proteína MhpR-His.

En este apartado se analizó *in vitro* el efecto del PP sobre la proteína MhpR-His empleando las técnicas de espectroscopía de fluorescencia y dicroísmo circular.

3.4.1. Estudio del efecto del PP sobre la proteína MhpR-His mediante espectroscopía de fluorescencia.

Con el fin de determinar si el PP interacciona con MhpR-His se empleó la técnica de espectroscopía de fluorescencia. De la misma forma a como se hizo en el apartado 1.9.1 de Resultados, en primer lugar se realizó un espectro de emisión del PP utilizando una longitud de onda de excitación de 295 nm (Fig. 45A). El espectro resultante fue muy similar al de los compuestos 3HPP y 3HPA y su emisión fue prácticamente despreciable en comparación con la de la proteína. Teniendo en cuenta este resultado, se procedió a estudiar el efecto del PP sobre la proteína MhpR-His mediante fluorescencia empleando una longitud de onda de excitación de 295 nm.

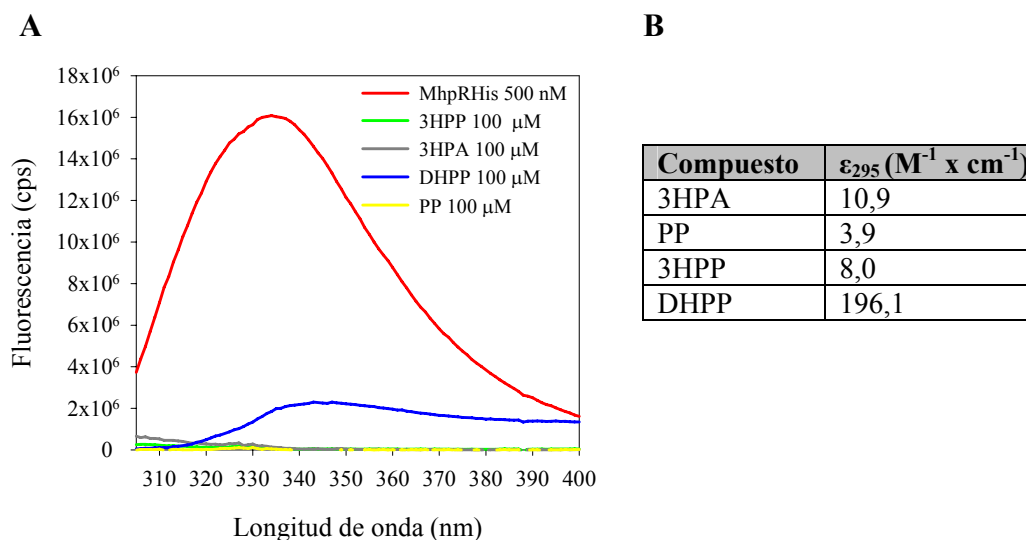


Figura 45. A) Espectros de emisión de la proteína MhpR-His y de los compuestos 3HPP, 3HPA, DHPP y PP. La concentración de proteína ensayada fue 500 nM y la de los compuestos, 100 μM . La longitud de onda de excitación que se empleó fue 295 nm. Se muestran los espectros ya corregidos por la emisión de fluorescencia del tampón. **B) Coeficientes de extinción a 295 nm (ϵ_{295}) de los compuestos aromáticos utilizados en los ensayos de fluorescencia.** Los valores de estos coeficientes fueron determinados experimentalmente.

Los espectros de emisión se realizaron como se indica en el apartado 7.9 de Materiales y Métodos. A 1 ml de una muestra de MhpR-His (0,5 μM) se le fue añadiendo progresivamente PP (10-100 μM). Inmediatamente después de cada adición de ligando se aplicó una longitud de onda de excitación de 295 nm sobre la mezcla y se registró un espectro de emisión (310-400 nm). Cada espectro de emisión fue corregido por el de emisión de su correspondiente blanco y por el efecto de dilución de la muestra. Al solapar todos los espectros obtenidos se observó que al añadir ligando, la emisión de fluorescencia de la proteína disminuía conforme aumentaba la concentración de PP en la mezcla. En la figura 46 se compara el efecto de *quenching* de la emisión de fluorescencia de MhpR-His producido por el PP (Fig 46D) con el producido por los inductores 3HPP (Fig. 46B) o DHPP (Fig. 46C). El PP produjo una reducción de la emisión de fluorescencia de la proteína de un 25% con respecto a la emisión inicial, en ausencia de ligando. Este resultado indicaría que, a pesar de que el PP no sea inductor, también ejercería un efecto sobre la conformación de la proteína.

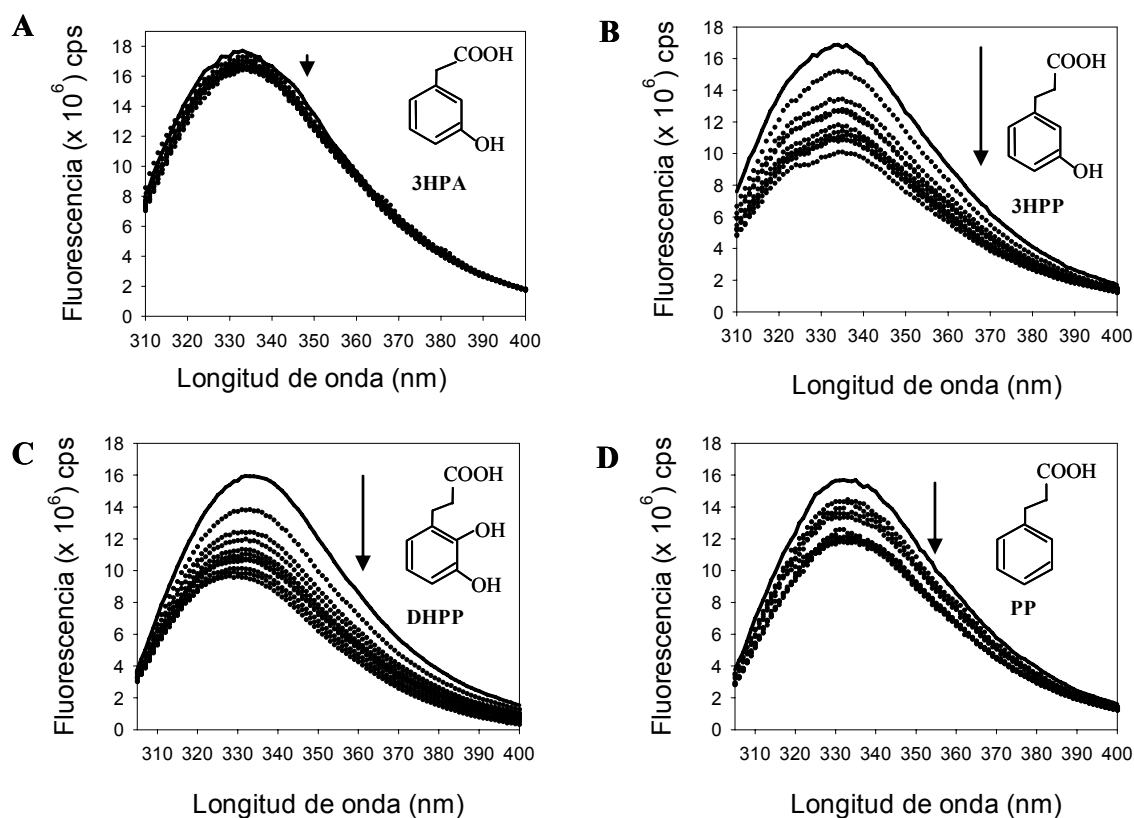


Figura 46. Quenching de la emisión de fluorescencia de la proteína MhpR-His en presencia de concentraciones crecientes de 3HPA (control negativo) (A), 3HPP (B), DHPP (C) y PP (D). La concentración de proteína en el ensayo fue $0,5 \mu\text{M}$ y las concentraciones de ligando añadidas fueron desde 10 hasta $100 \mu\text{M}$. Con flechas se indica la disminución de la emisión de fluorescencia producida al añadir concentraciones crecientes de ligando. Se representa con una línea continua la emisión de fluorescencia de la proteína MhpR-His en ausencia de ligando y con una línea de puntos, en presencia de concentraciones crecientes de ligando. La longitud de onda de excitación empleada en los experimentos fue 295 nm .

Para calcular la constante de asociación de MhpR-His para el PP, se representó la intensidad del máximo de emisión (335 nm) frente a la concentración del PP y los datos fueron ajustados a una curva del mismo modo a como se hizo en el apartado 1.9.1 de Resultados (Fig. 47). A partir de este ajuste se determinaron los valores de F_{min} y K_b . En la tabla 8 se muestra la K_b calculada para el PP junto con las K_b determinadas anteriormente para los compuestos 3HPP o DHPP, siendo todas ellas del mismo orden de magnitud. Con respecto al valor de F_{min} , resulta interesante destacar que es menor en presencia de DHPP o 3HPP ($0,60$) que en presencia de PP ($0,76$), lo que indica que los compuestos inductores ejercen un mayor efecto de *quenching* sobre la fluorescencia de la proteína que el compuesto no inductor.

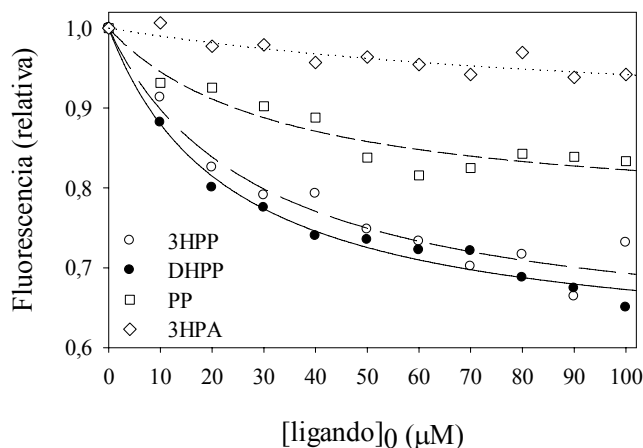


Figura 47. Representación del quenching de la fluorescencia de MhpR-His en función de la concentración de ligando. Se representa la señal del máximo de emisión de fluorescencia a 335 nm, expresada en unidades relativas, en función de la concentración de 3HPA (rombos vacíos), PP (cuadros vacíos), 3HPP (círculos vacíos) y DHPP (círculos llenos). Se indican con líneas (· · ·), (- · -), (- - -), (—) los ajustes de los puntos a una curva en presencia de 3HPA, PP, 3HPP y DHPP respectivamente. Las curvas fueron generadas utilizando la ecuación $F = I - (I - F_{min}) (K_b[L]_F)/(I + K_b[L]_F)$.

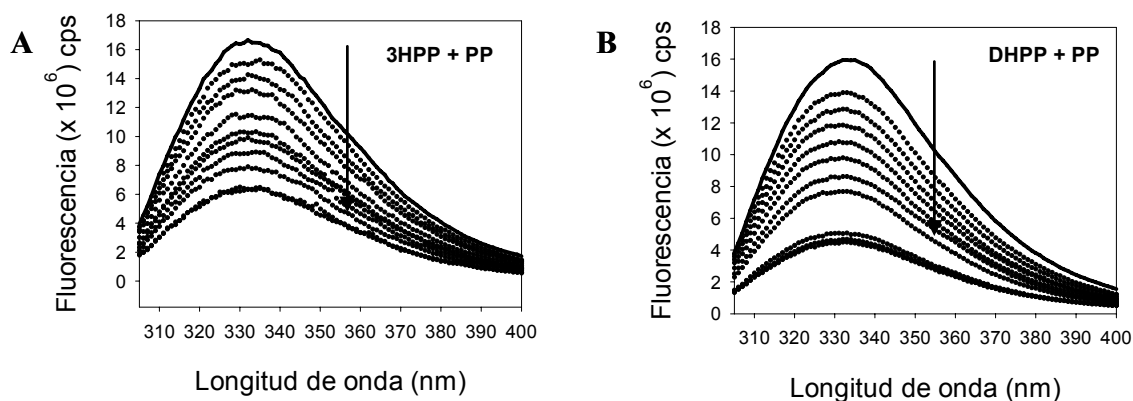
Ligando	$K_b \times 10^4 (M^{-1})$	F_{min}
3HPP	$3,4 \pm 0,9$	$0,60 \pm 0,03$
DHPP	$4,2 \pm 0,6$	$0,59 \pm 0,02$
PP	$3,0 \pm 1,1$	$0,76 \pm 0,03$

Tabla 8. Parámetros de la unión de diferentes ligandos a la proteína MhpR-His. Se muestran los valores de las constantes F_{min} y de asociación (K_b) con su desviación típica.

Mediante fluorescencia, también se analizó si se producía algún efecto sobre la emisión de fluorescencia de MhpR-His al añadir simultáneamente los compuestos 3HPP o DHPP junto con PP. Con este fin, se prepararon dos muestras de proteína, de 1 ml cada una, a una concentración 0,5 µM. A una de las muestras se le añadió una mezcla compuesta por 3HPP y PP y a la otra, una mezcla compuesta por DHPP y PP. Cada adición fue de 1 µl (10 mM de cada compuesto) para que la dilución de la muestra de proteína fuera mínima. En las figuras 48A y 48B se muestra el efecto de la adición simultánea de 3HPP más PP y de DHPP más PP, respectivamente, sobre la emisión de MhpR-His. En ambos casos se observó que la emisión de fluorescencia de la proteína disminuía gradualmente conforme aumentaba la concentración de ambos compuestos en la muestra. Cuando la concentración de 3HPP y PP presente en la mezcla era 100 µM (de cada uno) la emisión de fluorescencia en el máximo (335 nm) se redujo un 61% con respecto a la fluorescencia inicial, en ausencia de ligandos. Un efecto similar se observó

cuando se añadieron los ligandos DHPP y PP a esa misma concentración, detectándose en este caso una reducción del 72%. Cuando se añadieron, por separado, concentraciones crecientes de 3HPP, DHPP o PP a diferentes muestras de proteína, se produjo una reducción de la emisión de fluorescencia de un 34, 41 y 25%, respectivamente. Por tanto, la combinación de compuestos, bien 3HPP junto con PP, o bien, DHPP junto con PP, ejerce un efecto de *quenching* sobre la emisión por parte de la proteína que es el resultado del efecto de cada compuesto por separado.

Por último, se analizó si la adición de 3HPP o DHPP produce algún cambio en la fluorescencia de la proteína MhpR cuando previamente se ha saturado su interacción con PP. Para ello, a una muestra de proteína (0,5 μM) se le añadió, en un solo paso, una concentración de PP 100 μM . A continuación, se añadieron concentraciones crecientes de 3HPP, desde 10 hasta 100 μM . Ya se había comprobado experimentalmente que al añadir a una muestra de proteína concentraciones de PP por encima de 100 μM , no se observaba más atenuación de la fluorescencia. Sin embargo, se observó que el 3HPP sí era capaz de atenuar la fluorescencia más allá de lo que lo hizo el PP. Este mismo resultado se observó después de añadir PP (100 μM) a otra muestra de proteína seguido de una adición progresiva de DHPP. En la figura 48C se muestra la atenuación de la fluorescencia producida por la adición, por separado, de una concentración 100 μM de 3HPP, DHPP o PP solapada con la originada al añadir, previamente y en un solo paso, una concentración de PP (100 μM) y posteriormente, concentraciones crecientes, añadidas gradualmente, de 3HPP o de DHPP. Estos resultados, sumados a los mostrados en las figuras 48A y 48B, sugieren que la proteína MhpR-His podría interaccionar simultáneamente con uno de los inductores (3HPP o DHPP) junto con el compuesto no inductor, PP.



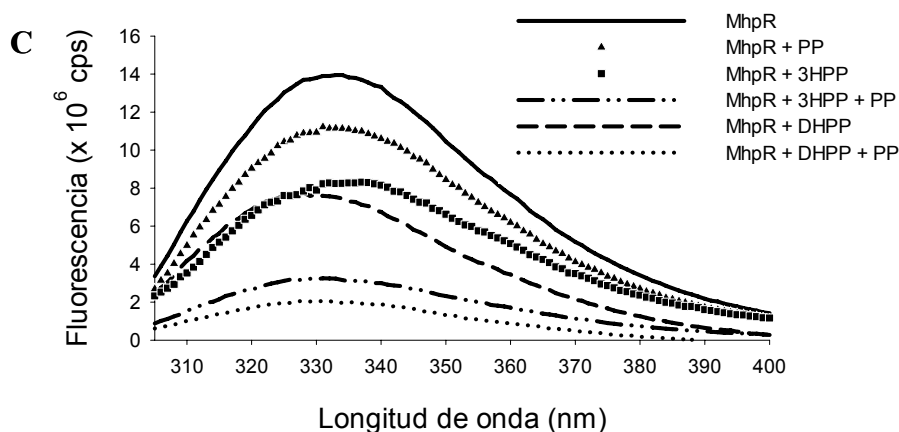


Figura 48. Análisis del efecto sinérgico del PP sobre la activación de MhpR-His mediante fluorescencia. Figuras A) y B) representan el *quenching* de la fluorescencia de la proteína en presencia de concentraciones crecientes de 3HPP más PP y DHPP más PP, respectivamente (desde 10 hasta 100 μ M de cada uno). C) Solapamiento de la atenuación de la fluorescencia causada por la adición de una concentración 100 μ M de 3HPP, PP o DHPP con la atenuación provocada por una previa adición de una concentración 100 μ M de PP seguida de una adición de 3HPP o DHPP (hasta 100 μ M). La concentración de proteína ensayada en estos experimentos fue 0,5 μ M y la longitud de onda de excitación empleada fue 295 nm.

3.4.2. Estudio del efecto del PP sobre la proteína MhpR-His mediante dicroísmo circular.

Para determinar si el PP solo o en combinación con 3HPP, modifican el contenido de estructura secundaria a la proteína MhpR-His, se llevaron a cabo experimentos de CD utilizando muestras de proteína MhpR-His (6,5 μ M) en ausencia y presencia de PP (1 mM), o PP (1 mM) más 3HPP (1 mM). En la figura 49A se muestran los espectros de CD en el UV lejano de MhpR-His obtenidos, así como el que se obtuvo en presencia de 3HPP (ver apartado 1.9.2 de Resultados). A partir de estos espectros se estimó el contenido de estructura secundaria de MhpR-His en las diferentes condiciones ensayadas (Fig. 49B). Según resultados anteriores, la proteína estaría compuesta por un $36,0 \pm 2,0\%$ de hélice α , un $16,0 \pm 0,6\%$ de lámina β , y un $47,6 \pm 1,7\%$ de estructura desordenada. En presencia de 3HPP, el contenido en hélice α incrementaría un 3,8% y el de estructura desordenada, un 1% en detrimento de un 4,4% del contenido de lámina β . En presencia de PP, el contenido de hélice α aumentaría un 5,6%, mientras que el contenido en lámina β y de estructura desordenada, disminuiría un 2,5 y un 2,4%, respectivamente. En presencia de ambos compuestos, el contenido en hélice α podría ascender un 4%, disminuyendo un 1,3 y un 2,1%, la cantidad de lámina β y de estructura desordenada, respectivamente.

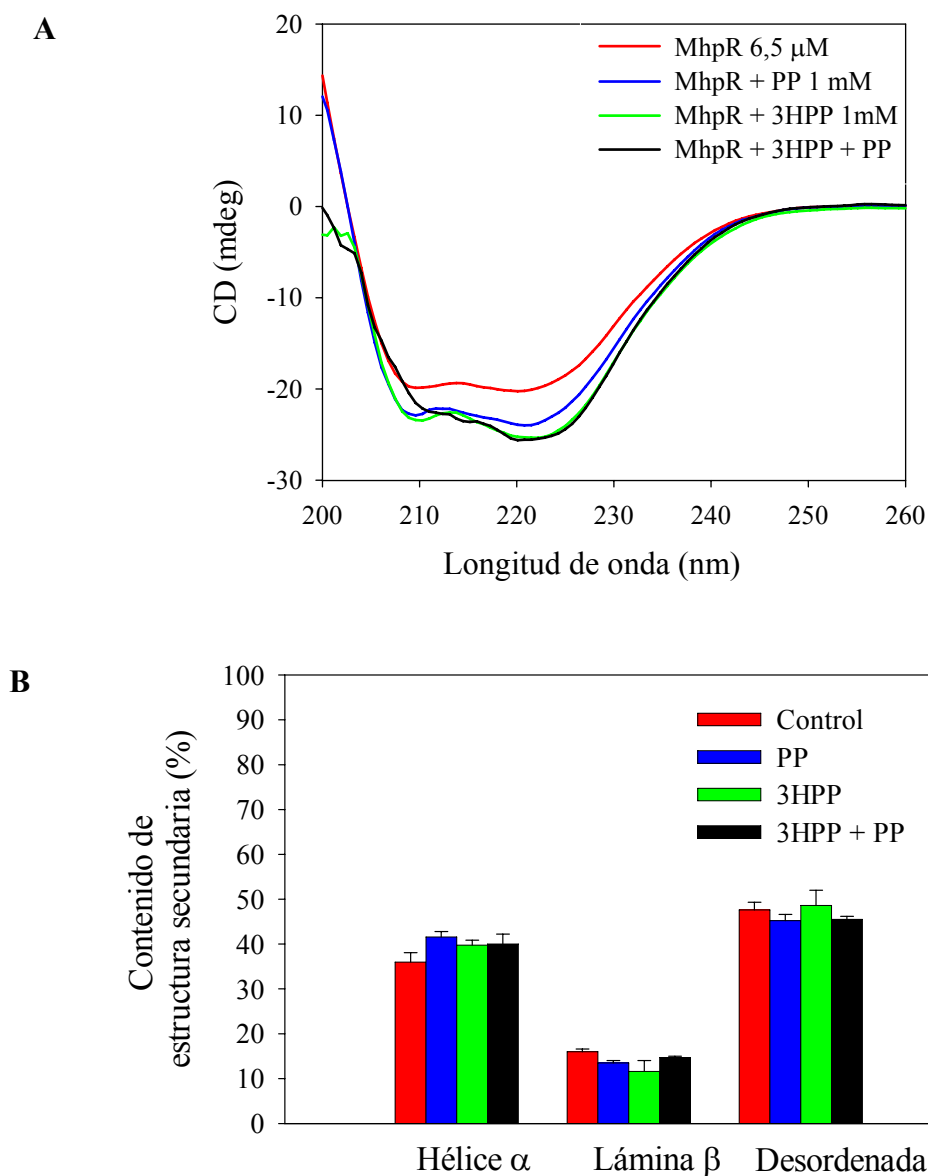


Figura 49. Caracterización de la estructura secundaria de MhpR-His mediante CD en el UV lejano. A) Espectros de CD en el UV lejano (195-260 nm) de muestras de MhpR-His en ausencia (rojo) y presencia de PP (azul), 3HPP (verde) o de ambos (negro). Las concentraciones de proteína y de ligando utilizadas en los ensayos fueron 6,5 μ M y 1 mM, respectivamente. Las muestras se prepararon en tampón fosfato potásico 20 mM, pH7,5 y KCl 100 mM. Los ensayos se llevaron a cabo a 20 °C. **B)** Predicción de la estructura secundaria de la proteína MhpR-His en ausencia (rojo) y presencia de PP (azul), 3HPP (verde), o de ambos (negro). Se muestra la predicción de estructura secundaria promedio obtenida mediante la utilización de diferentes programas informáticos (ver apartado 7.10 de Materiales y Métodos). Se indica el promedio con su correspondiente desviación estándar.

Para determinar la estabilidad de MhpR-His, en presencia de PP sólo o junto con 3HPP, se llevaron a cabo experimentos de desnaturalización térmica utilizando las mismas muestras analizadas anteriormente. Estas, se sometieron a un calentamiento progresivo del mismo modo como se procedió en el apartado 1.9.2 de Resultados. Los

resultados obtenidos mostraron una disminución del valor absoluto de la señal de CD a 220 nm conforme aumentaba la temperatura. En ausencia de ligando se obtuvo una T_m de 47,1 °C. La adición de PP causó un aumento en la T_m de 5,4 °C, mientras que la adición de 3HPP, sin o con PP, produjo un incremento de entre 6,6 y 7,0 °C, respectivamente. Por tanto, mientras que los compuestos 3HPP y PP, por separado, aumentan considerablemente la estabilidad de la proteína, la presencia de ambos compuestos aromáticos no tiene un efecto estabilizante adicional.

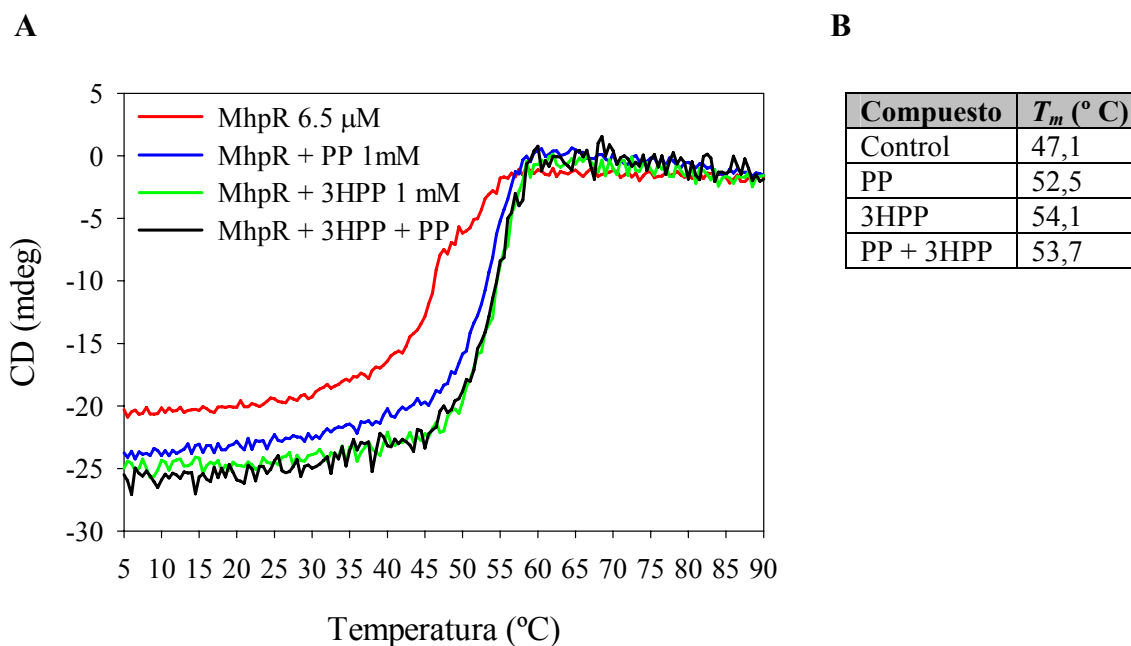


Figura 50. Estudio de estabilidad térmica de MhpR-His mediante CD en el UV lejano.

A) Curvas de desnaturalización térmica de MhpR-His (6,5 μ M) en ausencia (rojo) y presencia de una concentración 1 mM de PP (azul), de 3HPP (verde) y 1 mM de cada uno (negro). Se representa la señal de CD (en *milidegrees*) a 220 nm en función de la temperatura (°C). **B)** Temperatura de *melting* o T_m (°C) de la proteína MhpR-His en cada una de las condiciones ensayadas. Control significa en ausencia de ligando.

4. Análisis del efecto de las mutaciones de MhpR en su función.

4.1. Obtención de mutantes MhpR mediante mutagénesis al azar.

Con el fin de modificar la actividad de la proteína MhpR y obtener información de los residuos clave implicados en el mecanismo de activación, se introdujeron mutaciones en la secuencia del gen *mhpR* mediante mutagénesis al azar. Para ello se empleó la técnica de *error-prone* PCR, descrita en el apartado 5.5 de Materiales y Métodos. Mediante esta técnica se obtuvo una colección de secuencias que se clonó en vectores pUC18Not bajo el control del promotor P_{lac} . Para poder seleccionar las

distintas mutaciones se transformó la cepa *E. coli* CC118::AL portadora de la fusión, en cromosoma, constituida por el promotor *Pa* y el gen testigo *lacZ* con todas las construcciones denominadas pPALmut (Fig. 51). Esta fusión permite monitorizar la expresión génica mediada por este promotor realizando bien ensayos de actividad β -galactosidasa o bien cultivando la cepa en presencia de X-gal, sustrato que la enzima β -galactosidasa es capaz de hidrolizar, generando un fenotipo característico azul. Como control se utilizó la cepa CC118::AL (pPAL) portadora del plásmido pPAL derivado del vector pUC18Not que contiene el gen *mhpR* original bajo el control del promotor constitutivo *P_{lac}*. El sistema para la selección de mutantes se resume en la figura 51. En presencia de X-gal (0,08 mM) y ausencia del compuesto inductor 3HPP esta cepa crece formando colonias de color blanco, debido a que no se activa la transcripción a partir del promotor *Pa*. Sin embargo, en presencia de X-gal (0,08 mM) y 3HPP (1 mM), la proteína MhpR es capaz de activar la transcripción detectándose actividad β -galactosidasa, lo que hace que en presencia de X-gal las colonias sean de color azul (Fig. 51).

Las cepas transformadas con los plásmidos pPALmut se sembraron en placas con X-gal (0,08 mM) en ausencia y presencia de 3HPP (1 mM). Todas las colonias que crecieron sin 3HPP en el medio eran blancas (-), como la cepa control *E. coli* CC118::AL (pPAL), mientras que las que crecieron con 3HPP mostraron diferentes fenotipos: el 50% de las colonias era de color blanco (-), el 8% de color azul claro (+) y el 3% de color azul intenso (+++). El resto de las colonias (39%) presentó un fenotipo azul (++) equivalente al de la cepa control, CC118::AL (pPAL).

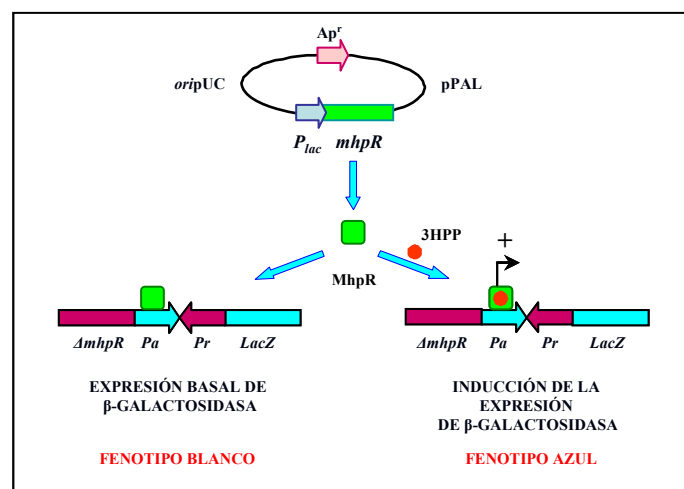


Figura 51. Sistema de selección de mutantes de MhpR. En la cepa control *E. coli* CC118::AL (pPAL) el gen *mhpR* se expresa constitutivamente bajo el control del promotor P_{lac} . En presencia de X-gal y ausencia de 3HPP en el medio las colonias son de color blanco. En presencia de X-gal y 3HPP las colonias son de color azul. Ap^r representa el gen que confiere resistencia a ampicilina, *LacZ*, es el gen testigo que codifica la enzima β -galactosidasa. Los iconos de color verde y naranja representan la proteína MhpR y el ligando 3HPP, respectivamente.

A continuación, para determinar las mutaciones responsables de esos fenotipos, se secuenciaron los plásmidos pPALmut de 19 clones mutantes con fenotipo diferente al de la cepa silvestre *E. coli* CC118::AL (pPAL). En la tabla 9 se resumen las mutaciones detectadas en las secuencias *mhpR* mutantes con su correspondiente frecuencia. El análisis reveló que las mutaciones más frecuentes fueron las transiciones siendo la sustitución de adenina por guanina la más abundante.

Tabla 9. Balance de las mutaciones introducidas por *error-prone* PCR en el gen *mhpR*. Se resumen las mutaciones detectadas en 19 secuencias *mhpR* mutantes.

Transición	Frecuencia	Transversión	Frecuencia	Delección	Frecuencia
G → A	8	A → T	4	G	2
A → G	13	A → C	0	CG	1
C → T	8	C → A	1		
T → C	3	C → G	2		
		G → C	0		
		G → T	1		
		T → A	2		
		T → G	0		

En la tabla 10 se detallan estas mutaciones indicando el cambio de nucleótido y de aminoácido, su posición dentro de la cadena polipeptídica, el tamaño de la proteína portadora de la mutación y el fenotipo de la colonia que produce la correspondiente proteína mutante cuando crece en presencia de 3HPP y X-gal, comparado con el de la estirpe salvaje.

Tabla 10. Características principales de las secuencias obtenidas mediante mutagénesis al azar.

Plásmido ^a	Gen <i>mhpR</i>	Proteína MhpR		Fenotipo ^b
	Mutación	Sustitución	Tamaño proteína (aa)	
pPAL	-	-	277	++
pPALmut1	CGC → CTC GCA → GCT (conservativa) GAT → GGT ΔG535	R45L A91A D99G -	222	-
pPALmut4	CGC → GGC AGC → GGC	R102G S128G	277	-
pPALmut6	GAA → GAG (conservativa) GAT → AAT	E86E D114N	277	+++
pPALmut7	GAA → GGA Δ(C577-G578)	E166G -	218	-
pPALmut9	GAT → GAA CTT → CCT CGC → CGT (conservativa) AGT → AGA ATG → GTG ACC → ACG (conservativa) GCG → GTG	D116E L143P R161R S219R M236V T237T A248V	277	-
pPALmut10	ΔG674	-	226	-
pPALmut13	CGC → TGC GTC → GTT (conservativa) CAG → CGA	R17C V34V Q255R	277	-
pPALmut26	GAA → GTA CAT → CGT	E261V H275R	277	+
pPALmut41	CGC → AGC GGC → GGT (conservativa)	R13S G149G	277	+
pPALmut42	GAC → GTC GAA → GAG (conservativa)	D175V E186E	277	++
pPALmut58	CGG → CAG	R49Q	277	+
pPALmut98	AAT → AGT ACC → TCC GAA → GAG (conservativa)	N23S T46S E239E	277	+++
pPALmut110	GTT → GCT	V260A	277	+++
pPALmut117	TTT → CTT GCT → ACT	F132L A264T	277	+++
pPALmut136	GCG → ACG CAG → CGG	A38T Q240R	277	+++
pPALmut137	CGG → CGA (conservativa) CCG → CTG	R77R P247L	277	+
pPALmut143	GCG → ACG CGC → CGT (conservativa) GAA → GGA	A38T R102R E258G	277	+
pPALmut163	TCG → TCA (conservativa)	S148S	277	++
pPALmut192	AAC → AGC	N200S	277	+

^a Todos los plásmidos de la tabla son derivados de pUC18Not, Ap^r.

^b Fenotipo que presenta la cepa CC118::AL portadora de cada uno de los plásmidos cuando crece en placa de LB en presencia de X-gal (0,08 mM) y 3HPP (1 mM). (-) representa fenotipo blanco, (+) fenotipo azul claro, (++) fenotipo normal y (+++) fenotipo azul intenso. Se indica en negrita el nucleótido afectado por la mutagénesis al azar.

Una vez identificadas todas las mutaciones presentes en las diferentes proteínas MhpR mutantes, se localizaron dentro de las estructuras primaria y secundaria del regulador (Fig. 52). Este análisis reveló que las diferentes mutaciones obtenidas se encontraban distribuidas uniformemente a lo largo de toda la secuencia de la proteína.

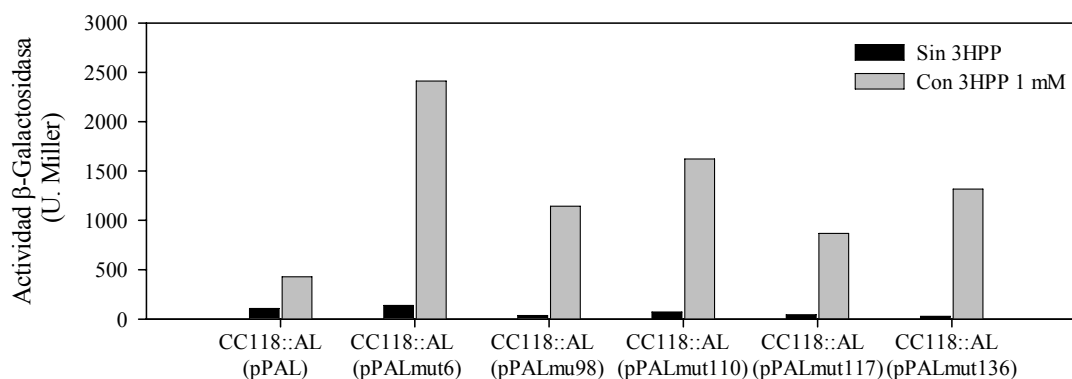
		H1	H2	H3	
MhpR (A)		MQNNEQTEYK	TVRGLTRGLMLLNMLNKL	DGGASVGLLAELSGLHRTTVRRRLETLQ	56
MhpR (B)		MQNNEQTEYK	TVRGLTRGLMLLNMLNKL	DGGASVGLLAELSGLHRTTVRRRLETLQ	56
MhpR (C)		MQNNEQTEYK	TVRGLTRGLMLLNMLNKL	DGGASVGLLAELSGLHRTTVRRRLETLQ	56
MhpR (D)		MQNNEQTEYK	TVRGLTRGLMLLNMLNKL	DGGASVGLLAELSGLHRTTVRRRLETLQ	56
		S	C	S	T
		13	17	23	38
					LS
					45-46
					Q
					49
	S1	S2	H4	H5	S3
MhpR (A)	EEGYVRRSPSDDSFRLTIKVRQLSEGF	RDEQWISALAAPLLGDL	LLREV	VWPTDVSTL	LV
MhpR (B)	EEGYVRRSPSDDSFRLTIKVRQLSEGF	RDEQWISALAAPLLGDL	LLREV	VWPTDVSTL	LV
MhpR (C)	EEGYVRRSPSDDSFRLTIKVRQLSEGF	RDEQWISALAAPLLGDL	LLREV	VWPTDVSTL	LV
MhpR (D)	EEGYVRRSPSDDSFRLTIKVRQLSEGF	RDEQWISALAAPLLGDL	LLREV	VWPTDVSTL	LV
				G	G
				99	102
					N
					114
	S4	S4a	S4b	H6	H7
MhpR (A)	DAMVVRETT	HRFSRSLSF	HRAMVGRRLP	LLKTASGLTWLAF	CPEQDRKELIEMLASRPGD
MhpR (B)	DAMVVRETT	HRFSRSLSF	HRAMVGRRLP	LLKTASGLTWLAF	CPEQDRKELIEMLASRPGD
MhpR (C)	DAMVVRETT	HRFSRSLSF	HRAMVGRRLP	LLKTASGLTWLAF	CPEQDRKELIEMLASRPGD
MhpR (D)	DAMVVRETT	HRFSRSLSF	HRAMVGRRLP	LLKTASGLTWLAF	CPEQDRKELIEMLASRPGD
	E	G	L	P	G
	116	128	132	143	166
	H8	S5	S6	S7	
MhpR (A)	DYQLAREPLKLEAILARARKEGYGQ	MYRCWDQEEKIASIAVPLR	SEQRVIGCLNLVYMA		
MhpR (B)	DYQLAREPLKLEAILARARKEGYGQ	MYRCWDQEEKIASIAVPLR	SEQRVIGCLNLVYMA		
MhpR (C)	DYQLAREPLKLEAILARARKEGYGQ	MYRCWDQEEKIASIAVPLR	SEQRVIGCLNLVYMA		
MhpR (D)	DYQLAREPLKLEAILARARKEGYGQ	MYRCWDQEEKIASIAVPLR	SEQRVIGCLNLVYMA		
	V	S	R		
	175	200	219		
	H9				
MhpR (A)	SAMTIEQAAEKHLPALQ	RVAKQIEEGVESQA	ILVAGRRSGMHLR	277	
MhpR (B)	SAMTIEQAAEKHLPALQ	RVAKQIEEGVESQA	ILVAGRRSGMHLR	277	
MhpR (C)	SAMTIEQAAEKHLPALQ	RVAKQIEEGVESQA	ILVAGRRSGMHLR	277	
MhpR (D)	SAMTIEQAAEKHLPALQ	RVAKQIEEGVESQA	ILVAGRRSGMHLR	277	
	V	R	LV	R	
	236	240	247-248	255	
				G	
				AV	
				T	
				264	
				R	
				275	
				258-260-261	

Figura 52. Localización de los aminoácidos mutantes dentro de la estructura secundaria de MhpR según el modelo estructural propuesto. Se muestran las secuencias de aminoácidos de las cuatro cadenas que constituyen la proteína MhpR (A, B, C y D). Los aminoácidos se indican con el código estándar de una sola letra y se numeraron a la derecha. Se muestran los residuos que forman parte de hélice α (en rojo), hebra β (en amarillo) y *loop* (en verde). Se detalla la numeración de las hélices α (H1-H9) y de las hebras β (S1-S7). Se han resaltado los aminoácidos afectados por la mutagénesis al azar (en color gris) y los aminoácidos que los sustituyen en las diferentes proteínas mutantes (en negro). Debajo de cada sustitución se indica la posición del residuo afectado dentro de la proteína.

4.2. Estudios *in vivo* de la capacidad de activación de las proteínas MhpR mutantes.

Para estudiar la capacidad de activación de la transcripción de las variantes de proteína MhpR obtenidas se midió la expresión del promotor *Pa*, en diez cepas mutantes (cinco con fenotipo azul intenso (+++) y otras cinco con fenotipo azul claro (+), mediante ensayos de actividad β -galactosidasa, tal y como se describe en el apartado 7.7 de Materiales y Métodos. Para ello se cultivaron las cepas mutantes *E. coli* CC118::AL (pPALmut) y la cepa control *E. coli* CC118::AL (pPAL), en medio LB en presencia y ausencia de 3HPP (1 mM). Se realizaron ensayos de actividad β -galactosidasa cuando las cepas alcanzaron la fase exponencial de su crecimiento (DO_{600} 0,9) y los resultados obtenidos se muestran en la figura 53. La inducción del promotor *Pa* se produce en todos los casos únicamente en presencia de 3HPP por lo que ninguno de los mutantes obtenidos es independiente de la molécula inductora. Los resultados indican que los clones con fenotipo azul intenso (+++) (Fig. 53A) presentan una actividad mayor a la del control, CC118:AL (pPAL). Se calculó el número de veces que cada cepa mutante es más activa que la cepa control, obteniéndose: CC118::AL (pPALmut6): 5,6 veces; CC118::AL (pPALmut98): 2,6 veces; CC118::AL (pPALmut110): 3,8 veces; CC118::AL (pPALmut117): 2 veces y CC118::AL (pPALmut136): 3,1 veces. Por otro lado, los clones de fenotipo azul claro (+) (Fig. 53B) muestran una actividad mucho menor a la de la cepa control. Se calculó el número de veces que cada cepa mutante es menos activa que la cepa control, resultando: CC118::AL (pPALmut13): 10 veces; CC118::AL (pPALmut41): 4,5 veces; CC118::AL (pPALmut58): 2,2 veces; CC118::AL (pPALmut137): 2,8 veces y CC118::AL (pPALmut143): 1,2 veces.

A



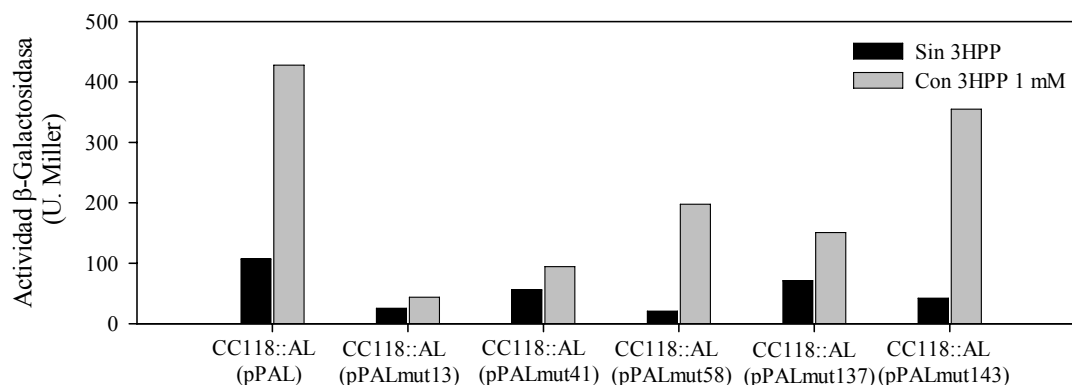
B

Figura 53. Actividad β -galactosidasa de cepas de *E. coli* CC118::AL (pPAL) y CC118::AL portadoras de diferentes plásmidos pPALmut con fenotipo azul intenso (A) y con fenotipo azul claro (B). Las cepas fueron incubadas en medio LB en ausencia (negro) o en presencia (gris) de 3HPP (1 mM). Se muestran los resultados obtenidos en un experimento, los valores obtenidos fueron reproducibles en tres experimentos distintos.

Para demostrar que estas diferencias de actividad no se deben a la presencia de distinto número de copias de plásmido entre los clones mutantes, se aisló plásmido de cada uno de ellos y se observó mediante tinción con bromuro de etidio que la cantidad de DNA plasmídico era similar a la aislada de la cepa control (datos no mostrados). Además, con estos plásmidos aislados se retransformaron de nuevo cepas *E. coli* CC118::AL, demostrándose el mantenimiento de estos fenotipos en presencia de 3HPP.

Con el fin de demostrar que las diferencias en actividad no se deben a diferencias en el nivel de solubilidad de la proteína MhpR, se prepararon extractos crudos a partir de cultivos de cada cepa que posteriormente fueron ultracentrifugados. Se llevó a cabo una SDS-PAGE y un Western-Blot, observándose que la cantidad de proteína MhpR mutante y soluble, presente en cada extracto, era similar a la cantidad detectada en el extracto control (resultados no mostrados). Con estos resultados se demuestra que no existe correlación entre el nivel de producción de proteína y actividad de la proteína. De este modo, los clones con una actividad superior a la del control son más activos, no por presentar un nivel de producción de proteína superior a la del control sino, porque la proteína mutante presenta una característica nueva que le hace ser más activa que la proteína no mutante. Así mismo, los clones con actividad inferior a la del control, no producen menos proteína MhpR que el control, sino que contienen alguna/as mutación/es que le hace ser menos activa.

Entre las mutaciones más interesantes, cabe destacar las mutaciones de naturaleza conservativa, capaces de introducir una leve modificación en la estructura de la proteína que le confiere una mayor actividad. De este modo destacamos por un lado, las mutaciones simples Asp114Asn y Val260Ala, localizadas en el posible dominio de interacción con el ligando y por otro lado, las mutaciones combinadas: Asn23Ser y Thr46Ser localizadas en el posible dominio de interacción con el DNA, Phe132Leu y Ala264Thr, situadas ambas en el dominio C-terminal, Ala38Thr y Gln240Arg, la primera en el dominio de unión al DNA y la segunda en el dominio C-terminal. Estos aminoácidos parecen jugar un papel importante en el mecanismo de acción de este regulador al convertir el regulador en una proteína más activa que la proteína nativa.

4.3. Efecto sinérgico del PP sobre la inducción del promotor *Pa* mediada por las proteínas MhpR mutantes.

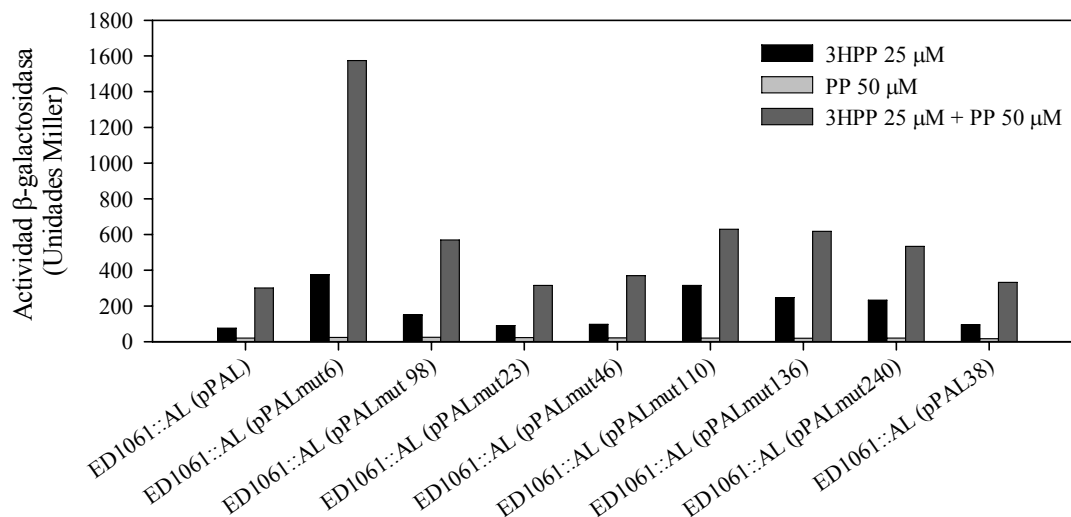
Para estudiar el efecto sinérgico del PP sobre la activación de las diferentes proteínas MhpR mutantes, se transformó la cepa *E. coli* ED1061::AL (Tabla 4) con algunos de los plásmidos portadores de las mutaciones seleccionadas (pPALmut6, pPALmut98, pPALmut110, pPALmut136, pPALmut26, pPALmut41, pPALmut58, pPALmut137 y pPALmut192) (Tabla 5). Dado que los plásmidos pPALmut98 y pPALmut136 portan un gen *mhpR* mutante doble, se decidió aislar las dos mutaciones para estudiarlas por separado. Con ese fin se realizó mutagénesis dirigida sobre la secuencia del gen *mhpR* (apartado 5.7 de Materiales y Métodos) y las secuencias mutantes obtenidas fueron clonadas en vectores pUC18Not. Las construcciones resultantes se identificaron como pPALmut23, pPALmut46, pPALmut38 y pPALmut240 (Tabla 5) y con todas ellas se transformó la cepa ED1061::AL.

En el apartado 3.2 de Resultados se demostró que el efecto sinérgico del PP sobre la inducción del promotor *Pa* en ED1061::AL (pPAL) fue máximo cuando esta cepa fue incubada en LB que contenía 3HPP (25 μ M) y PP (50 μ M). En presencia de estas mismas concentraciones de 3HPP y PP, fueron incubadas las cepas ED1061::AL hiperproductoras de proteína MhpR mutante más activa que la proteína nativa para la realización de los ensayos de actividad β -galactosidasa (Fig. 54A). En presencia de 3HPP, las cepas ED1061::AL (pPALmut23) y ED1061::AL (pPALmut46), productoras de las proteínas MhpRN23S y MhpRT46S, respectivamente, presentaron la misma actividad que la cepa control. Sin embargo, la cepa ED1061::AL (pPAL98), productora

de la proteína MhpRN23ST46S, presentó el doble de actividad que la cepa control. Por tanto, la presencia de ambas mutaciones en la misma secuencia confiere mayor actividad a la proteína reguladora. Además, las cepas ED1061::AL (pPALmut136) y ED1061::AL (pPALmut240), que producen las proteínas MhpRA38TQ240R y MhpRQ240R, respectivamente, presentaron tres veces más actividad que la cepa control. Como la cepa ED1061::AL (pPALmut38) que contiene la proteína MhpRA38T, presentó la misma actividad que la cepa control, la sustitución Q240R es la responsable de dicha actividad en la cepa mutante doble. Las cepas portadoras de los plásmidos pPALmut6 y pPALmut110, presentaron 5 y 4,2 veces más actividad que la cepa control, respectivamente. Igual que sucede con la cepa control, ninguna de las cepas ensayadas presentó inducción del promotor *Pa* en presencia de PP. Cuando el medio de cultivo contenía PP y 3HPP, salvo las cepas que contenían los plásmidos pPALmut110, pPALmut136 o pPALmut240 que presentaron un leve sinergismo en la inducción de *Pa*, el resto de las cepas mostraron un efecto sinérgico muy similar al detectado en el cultivo de la cepa control.

En la figura 54B se muestra la actividad β -galactosidasa de las diferentes cepas ED1061::AL que producen proteína MhpR mutante menos activa que la proteína nativa. Para apreciar mejor las diferencias en los niveles de inducción de *Pa*, estas cepas se cultivaron en medio LB con 3HPP (0,1 mM), PP (1 mM), o ambos. En presencia de 3HPP, las cepas que contienen los plásmidos pPALmut26, pPALmut41, pPALmut58, pPALmut137 y pPALmut192 mostraron menor actividad que la cepa control. Concretamente, mostraron una actividad desde 2 hasta 10 veces menor a la mostrada en cultivos de la cepa control. En presencia de 3HPP y PP la actividad β -galactosidasa mostrada por la cepa control fue el doble de la registrada en presencia de solo 3HPP. Este efecto sinérgico fue muy similar en el resto de cepas mutantes a excepción de la cepa ED1061::AL (pPALmut192) que prácticamente no mostró actividad.

A



B

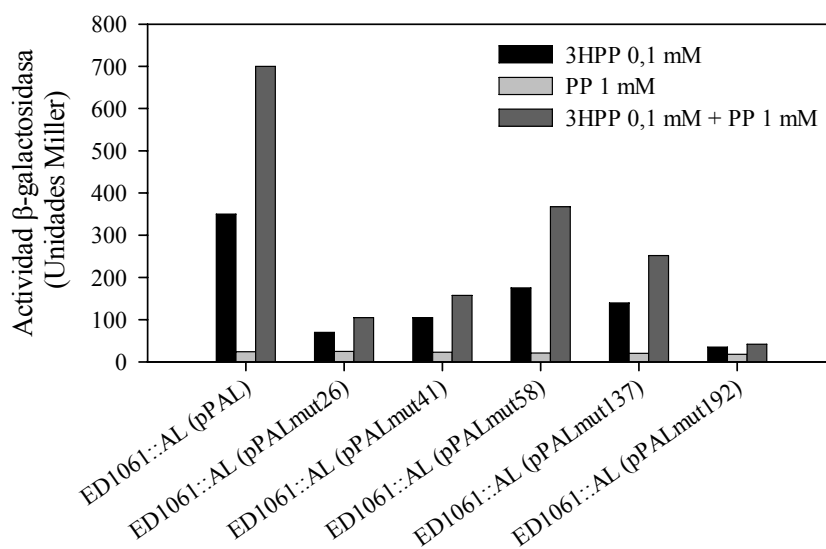


Figura 54. Efecto sinérgico del PP sobre la inducción de la fusión AL en cepas ED1061::AL hiperproductoras de proteína MhpR mutante. A) Actividad β -galactosidasa de cepas portadoras de plásmidos pPALmut que hiperproducen proteína MhpR mutante más activa (exceptuando las cepas portadoras de los plásmidos pPALmut23, pPALmut46 y pPALmut38). Las diferentes cepas fueron cultivadas en medio LB en presencia de 3HPP (25 μ M), PP (50 μ M) o de ambos. B) Actividad β -galactosidasa de cepas portadoras de plásmidos pPALmut que hiperproducen proteína MhpR mutante menos activa que la proteína MhpR nativa. Las diferentes cepas fueron cultivadas en medio LB en presencia de 3HPP (0,1 mM), PP (1 mM) o de ambos. Se realizaron las mediciones de actividad una vez que las cepas alcanzaran la fase exponencial de su crecimiento (DO_{600} igual a 0,9). Estos resultados fueron reproducibles en tres experimentos distintos.

4.4. Solubilidad de las proteínas MhpR mutantes dentro de la célula bacteriana.

Las proteínas MhpR mutantes analizadas anteriormente presentaron mayor o menor actividad que la proteína nativa. Este hecho podría deberse a que la mutación

incorporada en sus secuencias polipeptídicas induce un cambio conformacional en la proteína que favorece o no su actividad. Pero, puede afectar la solubilidad de la proteína dentro de la célula convirtiéndola en una proteína más o menos soluble que la proteína nativa y, por tanto, más o menos activa que esta. Del mismo modo que se hizo en el apartado 4.2 de esta sección, se analizó la solubilidad de las diferentes proteínas MhpR en extractos crudos, procedentes de cultivos de la cepa control ED1061::AL (pPAL), de algunas cepas mutantes más activas, tales como: ED1061::AL (pPALmut6), ED1061::AL (pPALmut98), ED1061::AL (pPALmut110), ED1061::AL (pPALmut136) y de algunas cepas mutantes menos activas, como son: ED1061::AL (pPALmut26), ED1061::AL (pPALmut41), ED1061::AL (pPALmut58) y ED1061::AL (pPALmut137). Todas estas cepas fueron cultivadas en medio LB hasta alcanzar la fase exponencial de su crecimiento. Posteriormente, se recuperaron las células contenidas en cada cultivo mediante centrifugación, se lavaron y se resuspendieron en tampón igualando el número de células. Las células resuspendidas se lisaron y los extractos crudos resultantes fueron ultracentrifugados, recuperándose después el sobrenadante y pellet de cada uno de ellos para ser analizados mediante SDS-PAGE (resultados no mostrados). El nivel de hiperproducción fue similar en todos los casos, detectándose una proporción pequeña de moléculas de proteína en el sobrenadante (fracción soluble) y una mayor proporción, en su correspondiente pellet (fracción insoluble). Para comparar la representación de la proteína MhpR en las diferentes fracciones solubles, se analizaron en SDS-PAGE 2,25 μ g de proteína total de cada sobrenadante. A continuación, se transfirieron las proteínas desde estos geles a membranas de nitrocelulosa, mediante la técnica de Western Blot (ver apartado 7.4 de Materiales y Métodos). Para la detección de la proteína MhpR presente en los sobrenadantes se incubaron las membranas con antisuero frente a MhpR (1:1000). El resultado obtenido después del revelado se muestra en la figura 55.



Figura 55. Detección de la proteína MhpR en las fracciones solubles de extractos crudos mediante Western Blot. En este experimento se utilizó el antisuero (1:1000) frente a MhpR. Se analizó la representación de proteína MhpR silvestre o mutante en las cepas ED1061::AL (pPAL) en la calle C, ED1061::AL (pPALmut6) en la calle 1, ED1061::AL (pPALmut98) en la calle 2, ED1061::AL (pPALmut110) en la calle 3, ED1061::AL (pPALmut136) en la calle 4, ED1061::AL (pPALmut26) en la calle 5, ED1061::AL

(pPALmut41) en la calle 6, ED1061::AL (pPALmut58) en la calle 7 y ED1061::AL (pPALmut137) en la calle 8.

En los sobrenadantes de extractos crudos procedentes de las cepas ED1061::AL (pPALmut98), ED1061::AL (pPALmut136), ED1061::AL (pPALmut26), ED1061::AL (pPALmut41), ED1061::AL (pPALmut58) y ED1061::AL (pPALmut137) se detectó la misma cantidad de proteína MhpR mutante que de proteína nativa en el sobrenadante del extracto control (Fig. 55). Sin embargo, la expresión de proteína MhpR mutante en las cepas ED1061::AL (pPALmut6) (en calle 1) y ED1061::AL (pPALmut110) (en calle 3) fue 2,8 y 1,5 veces, respectivamente, menor que la expresión de la proteína nativa en el extracto control (Fig. 55). Ambas proteínas son las menos insolubles de todas las que se analizaron y, a la vez, son más activas que la proteína nativa, hecho que consideramos interesante para profundizar en su estudio. Con estos resultados puede concluirse que las proteínas MhpR mutantes analizadas más activas (ED1061::AL (pPALmut6), ED1061::AL (pPALmut98), ED1061::AL (pPALmut110) y ED1061::AL (pPALmut136)) no se expresan ni se traducen con mayor eficiencia que la proteína nativa dentro de la célula. Del mismo modo, las proteínas mutantes con menor actividad (ED1061::AL (pPALmut26), ED1061::AL (pPALmut41), ED1061::AL (pPALmut58) y ED1061::AL (pPALmut137)) no se traducen con menor eficiencia o son más insolubles que la proteína MhpR nativa.

4.5. Localización de las mutaciones en el modelo tridimensional de MhpR.

Ya se ha comentado anteriormente que las cadenas A y B de MhpR son equivalentes, así como las cadenas C y D entre sí. De este modo, todo lo que se comente para la cadena A, también se referirá a la cadena B, y lo concerniente a la cadena C, será igual en la cadena D. Basándonos en el modelo tridimensional propuesto para este regulador se detallan a continuación algunos de los efectos que podrían tener lugar en la estructura de MhpR, a consecuencia de la sustitución de un determinado aminoácido por otro en las cepas de *E. coli* portadoras de las siguientes construcciones:

- pPALmut6:

Esta construcción expresa el gen *mhpR* con la sustitución D114N. Este cambio confiere mayor actividad a la proteína reguladora. El residuo D114 se localiza en el dominio C-terminal de MhpR (Figs. 19 y 56) y participaría, por un lado, en la

formación de dímeros de MhpR (Fig. 19). La sustitución D114N, dentro de la cadena C de MhpR, afectaría la interacción con los residuos R140 de la misma cadena e I74 de la cadena B. Por otro lado, el residuo D114 se sitúa en la cadena B, muy próximo a la superficie de tetramerización (Fig. 19). Este residuo interactuaría electrostáticamente con R140 de la misma cadena, residuo que se situaría próximo al sitio de unión a ligando. El cambio D114N provocaría una repulsión entre los residuos R140 de las cadenas A y B.

- pPALmut136:

Este plásmido expresa el gen *mhpR* con dos mutaciones: A38T y Q240R. Por un lado, el aminoácido A38 se situaría dentro de la hélice H2 que forma parte del motivo HTH implicado en la unión a DNA (Figs. 19, 52 y 56). Dado que la proteína MhpR mutante que contiene el aminoácido T38 en lugar de A38 es más activa que la proteína nativa, este nuevo residuo podría inducir un cambio conformacional en este dominio que aumentara la afinidad de la proteína reguladora por el DNA o estabilizara la unión DNA-proteína. Por otro lado, el aminoácido Q240 se encontraría situado en el dominio C-terminal (Fig. 56), lejos de la superficie de dimerización y del sitio de unión del efector, pero próximo a la superficie de tetramerización, en las cadenas B y C (Fig. 19). La sustitución Q240R afectaría, por un lado, su interacción con T237 de la misma cadena, con el que formaría un puente de hidrógeno según el modelo propuesto, y por otro lado, estabilizaría su interacción con E243, también de la misma cadena. Además, podría formarse una red salina junto con E239, E243 y K244.

- pPALmut98:

Esta construcción expresa el gen *mhpR* con dos mutaciones: N23S y T46S, que se localizarían en el motivo HTH de unión a DNA (Figs. 52 y 56). La proteína portadora de ambas mutaciones es más activa que la proteína nativa. Por un lado, el residuo N23 (Fig. 19) intervendría en dimerización, en ambas cadenas B y C. Interaccionaría con L79 de la misma cadena y con L19 e Y60 de la cadena contraria. Con L19 establecería fuerzas de empaquetamiento mientras que con Y60 establecería un puente de hidrógeno que desaparecería al introducirse el cambio N23S. Con la sustitución N23S la estructura del dímero muy probablemente se vería afectada. Por otro lado, el aminoácido T46 estaría situado en la hélice H3 que estaría implicada en el reconocimiento del DNA, en ambas cadenas B y C (Figs. 19, 52 y 56). De acuerdo con

el modelo estructural propuesto, sería un residuo muy expuesto que establecería puentes de hidrógeno con los residuos H44 y R50 y fuerzas de empaquetamiento con los residuos R45 y R49. Este residuo podría participar en la interacción con el DNA.

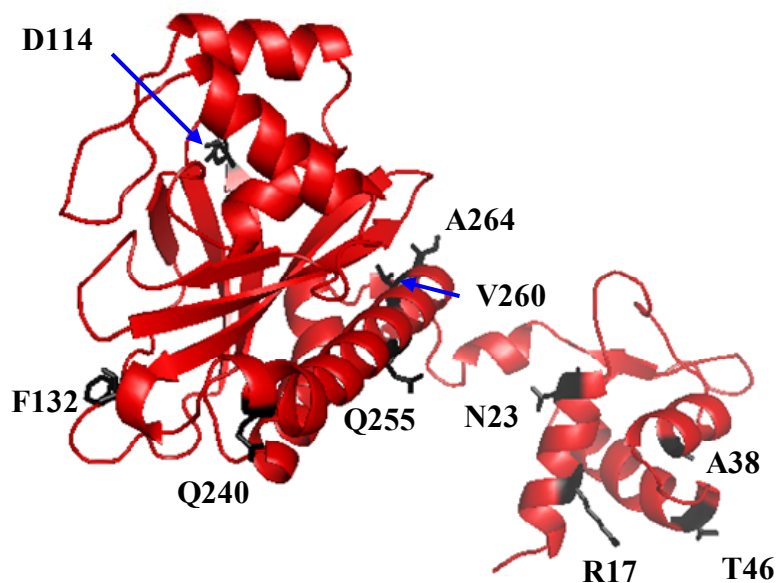


Figura 56. Localización de los residuos afectados por mutagénesis al azar en el modelo tridimensional de la cadena A de MhpR. Los residuos se han representado en *sticks* y en color negro. La figura se realizó mediante la utilización del programa PyMOL (DeLano, 2002).

- pPALmut110:

Este plásmido expresa el gen *mhpR* con la sustitución V260A. Esta mutación se localizaría en el dominio C-terminal (Figs. 52 y 56) y confiere mayor actividad a la proteína reguladora. El residuo V260 estaría próximo a la superficie de dimerización en la cadena B (Fig. 19) y su sustitución por un residuo de alanina podría afectar a la dimerización aunque de forma indirecta. En la cadena C, igual que en la cadena B, parece comportarse como un aminoácido estructural pero se encontraría más alejado de la superficie de dimerización que en el caso de la cadena B (Fig. 19).

- pPALmut117:

Este plásmido expresa el gen *mhpR* con dos mutaciones: F132L y A264T. La proteína portadora de ambas mutaciones, que se localizarían en el dominio C-terminal (Figs. 52 y 56), es más activa que la proteína nativa. En primer lugar, el aminoácido F132, en la cadena C, interaccionaría con la misma F132, pero de la cadena A, a través

de una interacción de tipo aromático–aromático y dos puentes de hidrógeno. También establecería interacciones con F127 de la cadena A y R134 de la cadena C, que a su vez interaccionaría con F132 de la cadena A. La mutación F132L generaría un hueco y rompería estas interacciones afectando, en último término, a la tetramerización. Además, también repercutiría en otras interacciones que establecería el residuo F132 con S128, H133 y H125, todos ellos, de la cadena C. En la cadena B, tendría lugar la misma interacción con F132 de la cadena D y con R134 de la cadena B. Por último, F132 estaría situado muy cerca de Leu130 (Fig. 19), posiblemente implicado en el sitio de unión del efector, junto con otros aminoácidos, pero de la cadena equivalente. Por tanto, la mutación F132L podría afectar, además de la tetramerización del regulador, la unión del ligando. En segundo lugar, el aminoácido A264, se sitúa a 13 aminoácidos del extremo C-terminal de MhpR, muy cerca del residuo V260, por lo que esta zona parece un *hot spot* (Figs 52 y 56). En la cadena D aparecería como un aminoácido muy aislado y aparentemente, no establecería interacciones con otro residuo. En la cadena B se situaría más cercano a la superficie de dimerización que en la cadena D (Fig. 19), aunque tampoco interaccionaría con ningún residuo.

- pPALmut13:

Esta construcción expresa el gen *mhpR* con las sustituciones R17C y Q255R. La primera, se localizaría en la región N-terminal (dentro del motivo HTH) mientras que la segunda, en la región C-terminal (Figs. 52 y 56). La introducción de ambas sustituciones en MhpR supone la pérdida de su actividad reguladora. En primer lugar, el residuo R17 se situaría cerca de la zona de inserción del DNA. Este residuo posee carga neta positiva y, en la cadena C, presentaría una repulsión electrostática con R13 de la misma cadena que desaparecería al mutar por un aminoácido polar y no ionizable como es la cisteína. En la cadena B, establecería una interacción electrostática con E39, fuerzas de empaquetamiento con V48 y L43 y puentes de hidrógeno con T47 y H44, todos ellos de la cadena B. El residuo R13 de esta cadena se encontraría más alejado que en el caso de la cadena C. Estas interacciones se verían afectadas con la sustitución R17C. En segundo lugar, el residuo Q255 estaría más cercano de la zona de dimerización en la cadena B que en el caso de la cadena C (Fig. 19). En ambas cadenas B y C, se encontraría alejado del sitio de unión de ligando y rodeado de aminoácidos cargados (R251, K254, E257, E258 y E261) que se verían afectados con la sustitución Q255R.

4.6. Mutagénesis dirigida del gen *mhpR-His*.

De todas las mutaciones presentes en las proteínas MhpR mutantes ensayadas *in vivo* se seleccionaron las mutaciones N23S, T46S, D114N, Q240R, V260A y A264T para profundizar en el mecanismo por el cual las proteínas que portan cualquiera de estas mutaciones son más activas que la proteína MhpR original. En un primer paso, se realizó mutagénesis dirigida del gen *mhpR-His*, mediante PCR (apartado 5.7 de Materiales y Métodos), obteniéndose seis versiones diferentes de dicho gen. Las seis versiones obtenidas fueron secuenciadas con el fin de comprobar la incorporación de la mutación en cada una de ellas. A continuación, cada una de las secuencias se clonó en el plásmido pQE32 y cada uno de los plásmidos resultantes (pQMHmut35, pQMHmut58, pQMHmut126, pQMHmut252, pQMHmut272 y pQMHmut276) fue introducido en células *E. coli* M15 (pREP4). Se analizaron extractos celulares de las seis cepas resultantes mediante SDS-PAGE y en todos ellos se detectó una banda de hiperproducción correspondiente a cada una de las proteínas MhpR-His mutantes (MhpR-HisN35S, MhpR-HisT58S, MhpR-HisD126N, MhpR-HisQ252R, MhpR-HisV272A y MhpR-HisA276T). Como estas proteínas poseen 12 aminoácidos más que la proteína MhpR nativa (contienen un *tag* de histidinas en el extremo N-terminal), a la posición de cada mutación, incluida en la nomenclatura de los plásmidos y proteínas mutantes, se le suma 12 aminoácidos (Tabla 11).

Tabla 11. Proteínas MhpR y MhpR-His mutantes estudiadas en este trabajo.

Proteínas MhpR mutantes	Proteínas MhpR-His mutantes
MhpRN23S	MhpR-HisN35S
MhpRT46S	MhpR-HisT58S
MhpRD114N	MhpR-HisD126N
MhpRQ240R	MhpR-HisQ252R
MhpRV260A	MhpR-HisV272A
MhpRA264T	MhpR-HisA276T

4.7. Purificación de las proteínas MhpR-His mutantes.

Con el fin de revelar las claves por las que las seis proteínas mutantes seleccionadas son más activas *in vivo* que la proteína MhpR nativa, era necesario comenzar por la purificación de cada una de ellas. Determinados experimentos requerían la utilización de una pequeña concentración de proteína y en esas ocasiones se

procedió a su purificación utilizando el QIAexpress Kit (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Mediante este procedimiento se obtuvo hasta 1 ml de proteína purificada a una concentración de 0,5 mg/ml. Cuando el experimento requirió el uso de una solución con mayor concentración de proteína se procedió a su purificación utilizando el mismo método diseñado para la purificación de la proteína MhpR-His original, obteniéndose 2-3 ml de proteína pura de hasta 3 mg/ml de concentración

El rendimiento de la purificación de la proteína MhpR-HisD126N fue muy escaso dado que se producía de forma insoluble. Con una concentración muy baja de esta proteína fue posible llevar a cabo los ensayos que se exponen a continuación.

4.8. Estudio de la interacción de las proteínas MhpR-His mutantes con el promotor *Pa*.

Una posible explicación de porqué las proteínas MhpR-His mutantes presentan mayor actividad en extracto crudo que la proteína silvestre, podría estar relacionada con una mayor eficacia en el reconocimiento específico de su región operadora en el DNA. Para comprobarlo, se analizó la capacidad de unión al promotor *Pa* de las seis proteínas MhpR-His mutantes, mediante ensayos de retardo en gel, del mismo modo que se hizo con la proteína MhpR-His nativa (ver apartado 1.3 de Resultados). Cada proteína mutante fue ensayada simultáneamente con la proteína MhpR-His nativa, por lo que las condiciones en las que se llevaron a cabo los experimentos (tiempo de incubación, temperatura, voltaje, pH del tampón, etc.) eran idénticas. En cada caso se determinó el valor de la Kd de formación del complejo proteína/DNA mediante densitometrado de las bandas detectadas. Los resultados obtenidos revelaron que todas las proteínas mutantes poseen menor afinidad por su operador que la proteína nativa, tanto en ausencia como en presencia de 3HPP (Fig. 57 y tabla 12).

Las variantes MhpR-HisN35S y MhpR-HisT58S contienen, cada una, una mutación puntual situada en el dominio de reconocimiento del DNA y cabría pensar que esa modificación pudiera mejorar la capacidad de unión a DNA. Sin embargo, ambas presentaron una Kd mayor que la calculada para la proteína nativa, sobre todo, en el caso de MhpR-HisT58S (Tabla 12). La mutación introducida dentro del dominio C-terminal, en el resto de versiones de MhpR-His, se pensó que pudiera favorecer, aunque indirectamente, la unión a DNA. Sin embargo, con las proteínas MhpR-HisD126N y

MhpR-HisT58S se observó lo contrario, presentando una afinidad por el DNA mucho menor que MhpR-His y que el resto de MhpR-His mutantes. Resulta interesante destacar el caso de la proteína MhpR-HisA276T cuyo valor de Kd, tanto en ausencia como en presencia de 3HPP, fue el mismo, a diferencia de lo observado en el resto de proteínas.

En definitiva, las seis proteínas MhpR-His mutantes analizadas *in vitro* no son más efectivas en el reconocimiento del DNA que la proteína original.

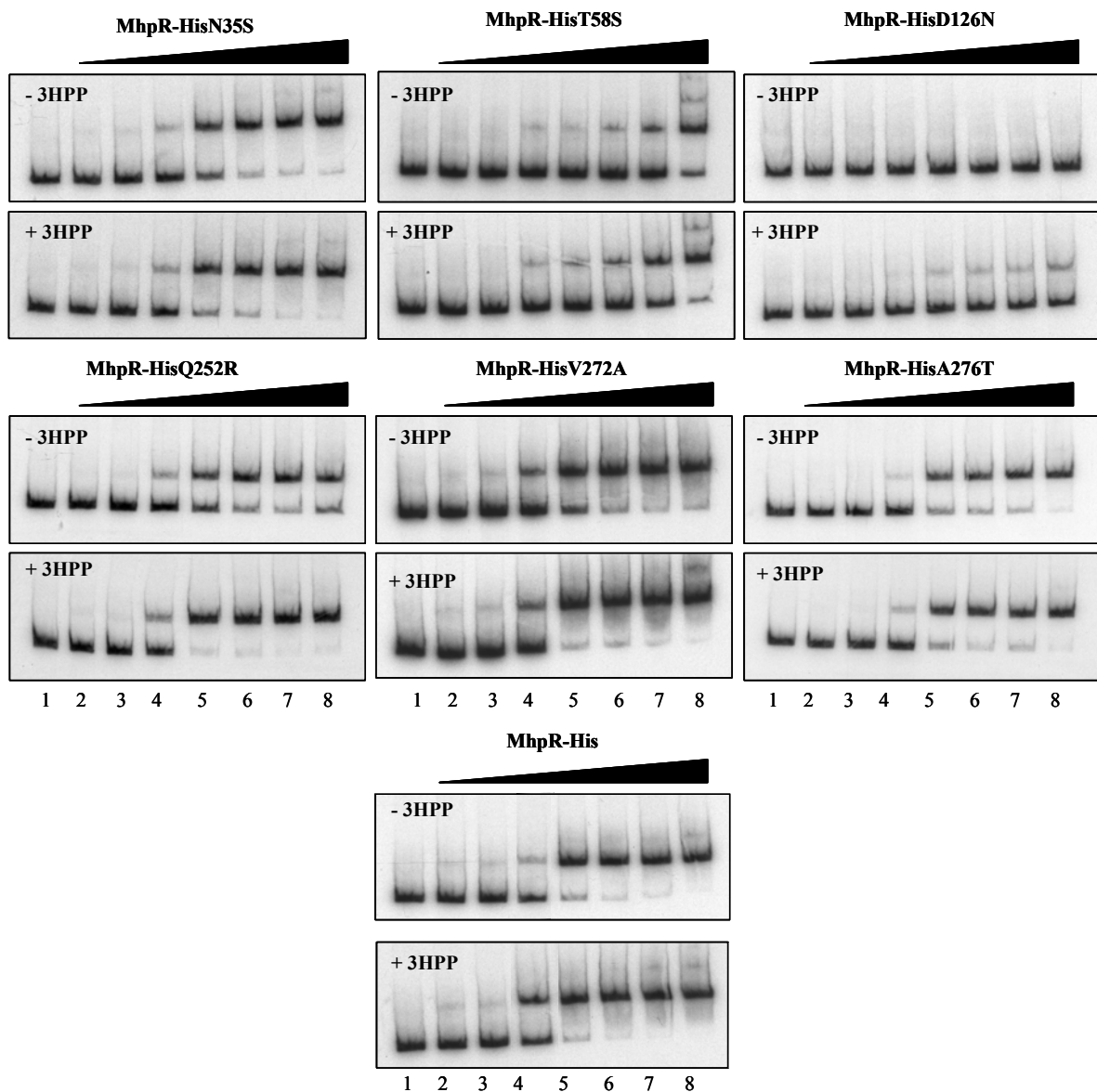


Figura 57. Ensayos de retardo en gel de las proteínas MhpR-His (nativa y mutantes) con la región intergénica *mhpR-mhpA* (PA-PR) en ausencia (- 3HPP) y presencia (+ 3HPP) de 3HPP (0,5 mM). Se ensayaron concentraciones crecientes de proteína : calle 1 (0 nM), calle 2 (0,05 nM), calle 3 (0,1 nM), calle 4 (1 nM), calle 5 (10 nM), calle 6 (25 nM), calle 7 (50 nM) y calle 8 (100 nM).

Proteína	Kd (-3HPP) (nM)	Kd (+3HPP) (nM)
MhpR-His	4,5	1,5
MhpR-HisN35S	13	9
MhpR-HisT58S	100	75
MhpR-HisD126N	>100	>100
MhpR-HisQ252R	9	6
MhpR-HisV272A	6,3	3,7
MhpR-HisA276T	8	8,5

Tabla 12. Constantes de disociación aparentes (Kd) de las proteínas MhpR-His nativa y mutantes calculadas mediante ensayos de retardo en gel. El valor de la Kd fue calculado mediante cuantificación de las bandas obtenidas en los ensayos de retardo en gel realizados en ausencia (-3HPP) y presencia de 3HPP 0,5 mM (+3HPP), a pH 7,5.

4.9. Caracterización de las proteínas MhpR-HisQ252R y MhpR-HisV272A.

De todas las proteínas mutantes MhpR-His mutantes purificadas, se decidió estudiar con mayor profundidad sólo dos de ellas, las versiones MhpR-HisQ252R y MhpR-HisV272A, por las razones que se detallan a continuación. En primer lugar, las proteínas equivalentes MhpRQ240R y MhpRV260A (sin el tag de histidinas) son las más activas de todas según los resultados mostrados en la figura 54A. En segundo lugar, ambas mutaciones se encuentran muy próximas entre sí en la estructura primaria de la proteína (Fig. 52) y cabría la posibilidad de que esta zona de la proteína pudiera ser clave en el mecanismo de acción de regulador. En tercer lugar, resultó interesante analizar si una vez purificadas con el tag de histidinas, a pesar de reconocer a su operador con menor afinidad que la proteína nativa, seguían siendo más activas que la proteína MhpR-His nativa.

4.9.1. Estudio *in vitro* de la capacidad inductora de la transcripción de las proteínas MhpR-HisQ252R y MhpR-HisV272A.

Se realizaron ensayos de transcripción *in vitro* (*single-round*) con objeto de comparar la capacidad de activación transcripcional a partir del promotor *Pa*, que tiene la proteína MhpR-His con la correspondiente a MhpR-HisQ252R y MhpR-HisV272A. Se utilizó como molde el plásmido pJCDAR que contiene los promotores *Pa* y *Pr* del *cluster mhp* (Fig. 43) y, tal y como se hizo en el apartado 3.3 de Resultados, en estos experimentos también centramos nuestro análisis en el promotor *Pa*. El experimento de

transcripción *in vitro* se llevó a cabo con las proteínas RNA polimerasa (100 nM), MhpR-His nativa o mutante (100 nM) y CRP (200 nM). La figura 58 muestra la activación de la transcripción a partir del promotor *Pa* mediada por las proteínas MhpR-His nativa, MhpR-HisQ252R y MhpR-HisV272A, en respuesta a la presencia de concentraciones crecientes de 3HPP (de 1 a 750 μ M) en ausencia y presencia de PP (1 mM).

Los resultados mostrados en la figura 58 revelaron, en primer lugar, que las proteínas MhpR-HisQ252R y MhpR-HisV272A ejercen mayor inducción de la transcripción desde el promotor *Pa* que la proteína MhpR-His nativa en presencia de 3HPP. La activación de la transcripción desde el promotor *Pa* ejercida por las proteínas MhpR-HisQ252R (calles 16-19 de la fig. 58A y fig. 58B) y MhpR-HisV272A (calles 30-33 de la fig. 58A y fig. 58C), en presencia de concentraciones de 3HPP comprendidas entre 10 y 250 μ M, fue de 1,5 a 2,2 veces superior a la que fue capaz de ejercer la proteína nativa (calles 2-5 de la fig. 58A, figs. 58B y 58C). Estos resultados corroboran los obtenidos en los ensayos realizados *in vivo* que se presentaron anteriormente (ver apartado 4.3 de Resultados).

Estos resultados también revelaron que en el caso de la proteína MhpR-HisQ252R se detectaron niveles similares de activación de la transcripción en presencia de 3HPP (1-50 μ M) y PP (1 mM) (calles 22-24 de la fig. 58A, y fig. 58B) que en presencia de sólo 3HPP (calles 15-17 de la fig. 58A, y fig. 58B), lo que sugiere que en estas condiciones no se observa efecto sinérgico del PP. Sin embargo en presencia de concentraciones de 3HPP superiores (100-750 μ M), el efecto sinérgico ejercido por el PP (calles 18-21 y calles 25-28 de la fig. 58A, y fig. 58B) fue el mismo que se observó con la proteína MhpR-His (sobre-activación de 1,5 veces). En el caso de la proteína MhpR-HisV272A el efecto sinérgico del PP se observó en presencia de bajas concentraciones de 3HPP (1-50 μ M) (calles 29-31 y calles 36-38 de la fig. 58A, y fig. 58C) siendo máximo cuando se compara la calle 30 con la 37 (sobre-activación de 2,6 veces). Por encima de una concentración de 3HPP 100 μ M, no se detectó efecto sinérgico del PP (calles 32-35 y calles 39-42 de la fig. 58A y fig. 58C).

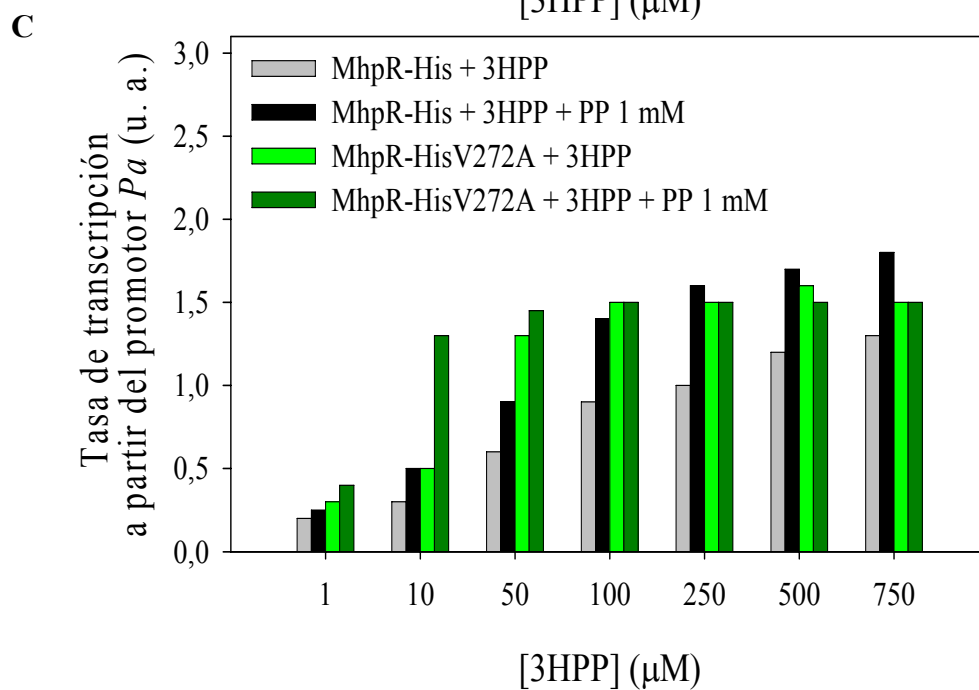
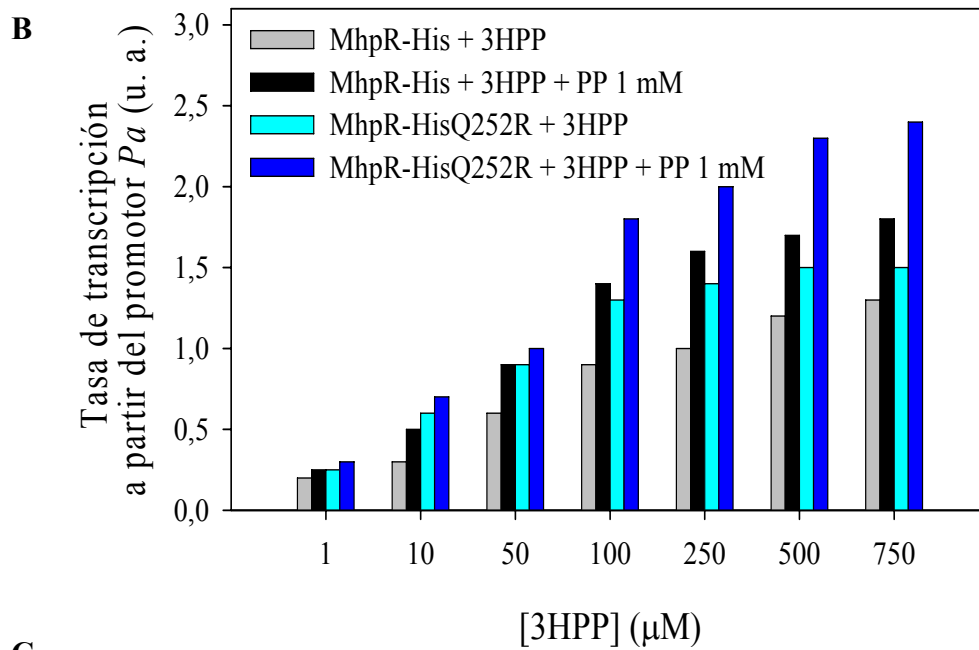
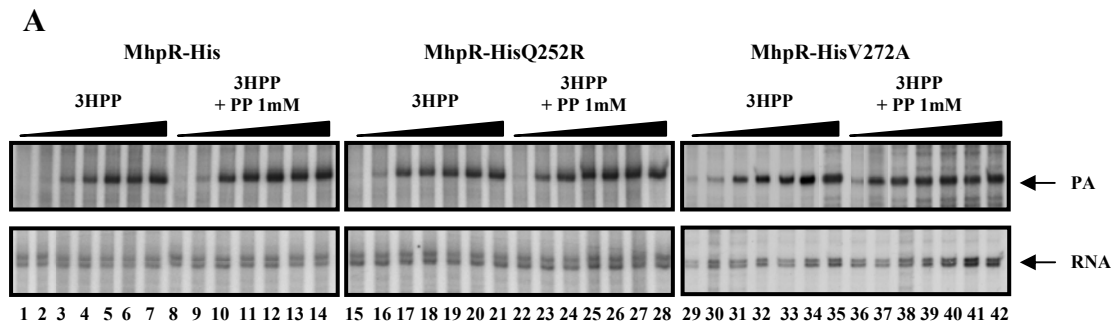


Figura 58. Activación transcripcional a partir del promotor *Pa* mediada por las proteínas MhpR-His, MhpR-HisQ252R y MhpR-HisV272A en presencia de 3HPP y/o PP 1 mM. **A)** Se muestra el resultado de un experimento de transcripción *in vitro* (*single round*) en el que se utilizó el plásmido pJCDAR como molde. Las concentraciones de proteína empleadas en el experimento fueron: RNA polimerasa (100 nM), MhpR-His nativa o mutante (100 nM) y CRP (200 nM). En las calles 1-14 se ensayó la proteína MhpR-His nativa, en las calles 15-28, MhpR-HisQ252R y en las calles 29-42, MhpR-HisV272A. Se ensayaron concentraciones crecientes de 3HPP 1, 10 50, 100, 250, 500 y 750 μ M. La concentración de PP ensayada fue 1 mM. Los transcritos detectados se indican con flechas. El transcrito denominado RNA1 de 108 nucleótidos es un control interno del plásmido pJCDAR. **B) y C)** Comparación de la tasa de transcripción a partir del promotor *Pa* mediada por la proteína MhpR-His nativa con la mediada por la proteína MhpR-HisQ252R (panel B) y MhpR-HisV272A (panel C). La cantidad de transcrito obtenido a partir del promotor *Pa*, así como la correspondiente al RNA1 control, se cuantificó mediante densitometrado de las bandas obtenidas en el ensayo. Posteriormente, la cantidad de transcrito formado a partir de *Pa* fue normalizada por la cantidad de transcrito RNA1 control, localizados ambos, en la misma calle del gel.

Por tanto, la introducción de cualquiera de las sustituciones (Q252R o V272A) en la secuencia de la proteína reguladora aumenta su capacidad de activación transcripcional. Sin embargo, el efecto sinérgico mediado por el PP sobre la actividad de estas proteínas es similar o inferior al ejercido sobre la proteína nativa dependiendo de la concentración de 3HPP añadida en el ensayo.

4.9.2. Análisis del efecto sinérgico ejercido por CRP sobre la activación transcripcional mediada por las proteínas MhpR-HisQ252R y MhpR-HisV272A.

Para estudiar el efecto sinérgico llevado a cabo por la proteína CRP sobre la activación de la transcripción del promotor *Pa* del *cluster mhp* mediada por las proteínas MhpR-HisQ252R y MhpR-HisV272A, se realizaron otra serie de ensayos de transcripción *in vitro* similares a los que se hicieron en el apartado 2.2.2 de Resultados con la proteína MhpR-His nativa. En este caso, se ensayaron solamente las concentraciones de 3HPP y de CRP con las que se detectó de forma más notable el efecto sinérgico de CRP sobre la inducción transcripcional mediada por la proteína MhpR-His. Así, se utilizaron dos concentraciones diferentes de 3HPP (100 y 300 μ M) y una sola de CRP (150 nM).

La figura 59 muestra el efecto de CRP en la activación transcripcional de *Pa* llevada a cabo por las tres proteínas reguladoras. La tasa de transcripción calculada, en presencia de MhpR-His nativa, CRP y 3HPP, es el doble que la detectada en ausencia de CRP (calles 1 y 2 frente a calles 3 y 4 de la fig. 59A, y fig 59B). Sin embargo, en los casos de MhpR-HisQ252R y MhpR-HisV272A, aunque en presencia de 3HPP se induce

la transcripción de forma más eficiente que en la proteína nativa (calles 5-6 y 9-10 de la fig. 59A, y 59B), no se observa el efecto sinérgico de CRP (calles 7-8 y 11-12 de la fig. 59A, y 59B). Este resultado no descarta que el efecto de CRP sobre la inducción de estas proteínas mutantes pueda producirse en presencia de concentraciones inferiores de proteína o de 3HPP a las que se requieren en el caso de la proteína nativa y para su confirmación definitiva se necesitarían ensayos adicionales.

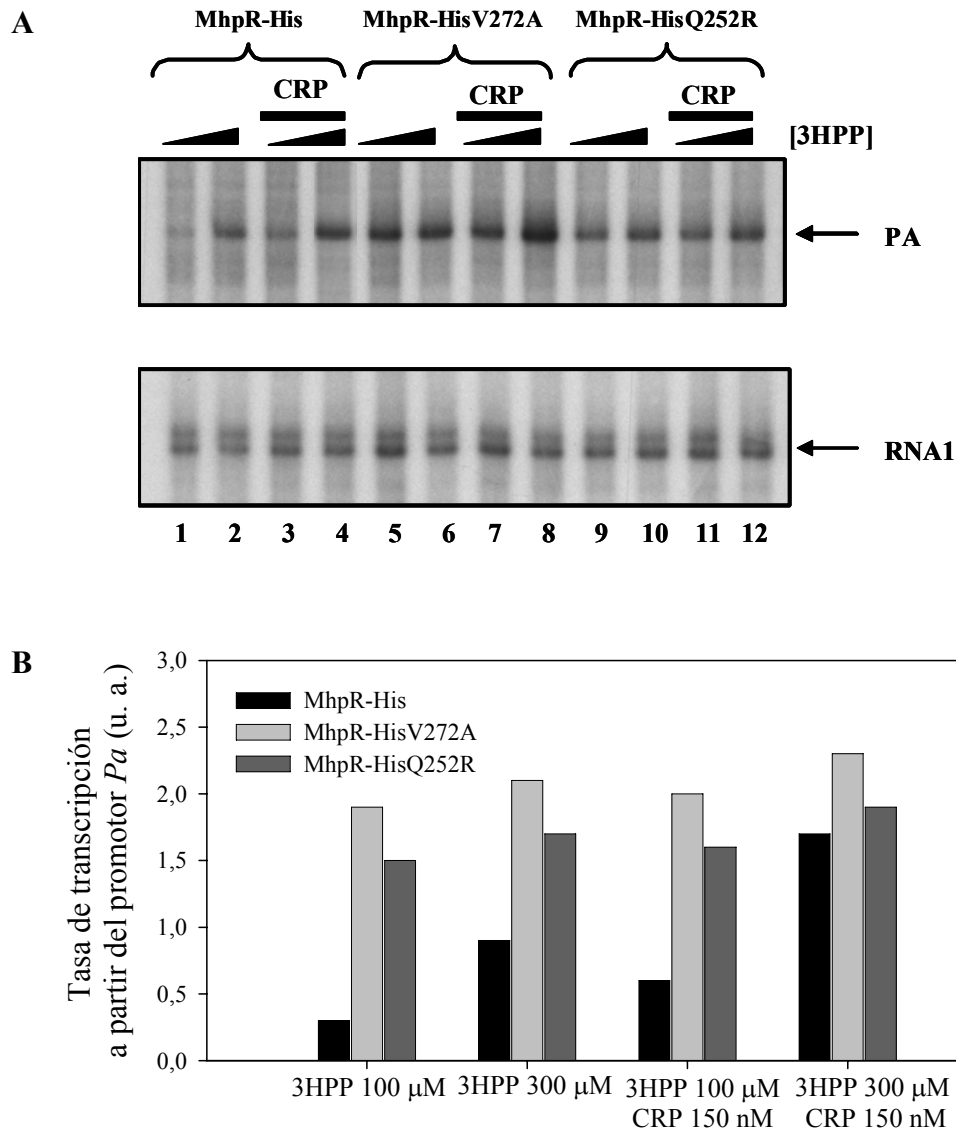


Figura 59. Efecto sinérgico de la proteína CRP sobre la transcripción a partir del promotor *Pa* mediada por las proteínas MhpR-His, MhpR-HisQ252R y MhpR-HisV272A en presencia de 3HPP. A) Se muestra el resultado de un experimento de transcripción *in vitro* (*single round*) en el que se utilizó el plásmido pJCDA como molde. Las concentraciones de proteína empleadas en el experimento fueron: RNA polimerasa (100 nM), MhpR-His nativa o mutante (100 nM) y CRP (150 nM). En las calles 1-4 se ensayó la proteína MhpR-His nativa, en las calles 5-8 MhpR-HisV272A y en las calles 9-12, MhpR-HisQ252R. Las concentraciones de 3HPP ensayadas fueron 100 μM (en calles 1, 3, 5, 7, 9 y 11) y 300 μM (en calles 2, 4, 6, 8, 10 y 12). Los transcritos detectados se indican

con flechas. El transcrito denominado RNA1 de 108 nucleótidos es un control interno del plásmido pJCD4. **B)** Comparación de la tasa de transcripción a partir del promotor *Pa* mediada por la proteína MhpR-His nativa (en negro) con la mediada por las proteínas MhpR-HisV272A (en gris claro) y MhpR-HisQ252R (en gris oscuro). La cantidad de transcrito obtenido a partir del promotor *Pa*, así como la correspondiente al RNA1 control, se cuantificó mediante densitometrado de las bandas obtenidas en el ensayo. Posteriormente, la cantidad de transcrito formado a partir de *Pa* fue normalizada por la cantidad de transcrito RNA1 control, localizados ambos, en la misma calle del gel.

4.9.3. Estudio de la interacción entre las proteínas MhpR-His mutantes y sus efectores mediante espectroscopía de fluorescencia.

Se realizaron ensayos de unión proteína-ligando con las proteínas MhpR-HisQ252R y MhpR-HisV272A y los compuestos 3HPP, DHPP y PP mediante fluorescencia, tal y como se hizo con la proteína MhpR-His (ver apartados 1.9.1 y 3.4.1 de Resultados). Estos experimentos se llevaron a cabo para comparar el efecto de *quenching* observado en la proteína MhpR-His original con el que se obtuviera con las proteínas mutantes. Previamente a la realización de estos ensayos, se comprobó que los espectros de emisión y excitación de las tres proteínas en ausencia de efector eran idénticos tal y como se esperaba ya que las sustituciones Q252R o V272A no suponen la pérdida o adquisición de un triptófano, tirosina o fenilalanina.

En la figura 60 se representa la disminución de la intensidad en el máximo de emisión de fluorescencia (a 335 nm) de las proteínas MhpR-HisQ252R, MhpR-HisV272A y MhpR-His causada por la adición progresiva de 3HPP, DHPP o PP (10-100 μ M). La atenuación de la emisión de fluorescencia de las tres proteínas, debida a la adición de cada ligando, fue ajustada a diferentes curvas ($F = 1 - (1 - F_{min}) (K_b[L]_F) / (1 + K_b[L]_F)$) y estos ajustes permitieron calcular los valores de las constantes de asociación (K_b) y de fluorescencia mínima (F_{min}) de cada proteína para cada efector (Tabla 13).

En primer lugar, la adición de concentraciones crecientes de 3HPP (de 10 a 100 μ M) a cualquiera de las dos muestras de proteína MhpR-His mutante (500 nM), produjo una reducción final del 58% de la emisión de fluorescencia original, siendo una disminución un 24% superior a la observada en el caso de la proteína nativa. A diferencia de la atenuación de la emisión de MhpR-His, causada por la adición de 3HPP y caracterizada por un valor aproximado de F_{min} de 0,6 (Tabla 13), dicho efecto fue mucho más notable en el caso de las proteínas mutantes, en las que se produjo una anulación casi completa de la emisión de fluorescencia, ya que la proteína MhpR-

HisQ252R alcanzó un valor de F_{min} cercano a 0,05 y MhpR-HisV272A, a 0,19 (Tabla 13). Por tanto, la interacción entre estas variantes de MhpR-His y el 3HPP podría afectar al entorno de algún triptófano de la proteína de modo diferente a como sucede en la proteína MhpR-His nativa.

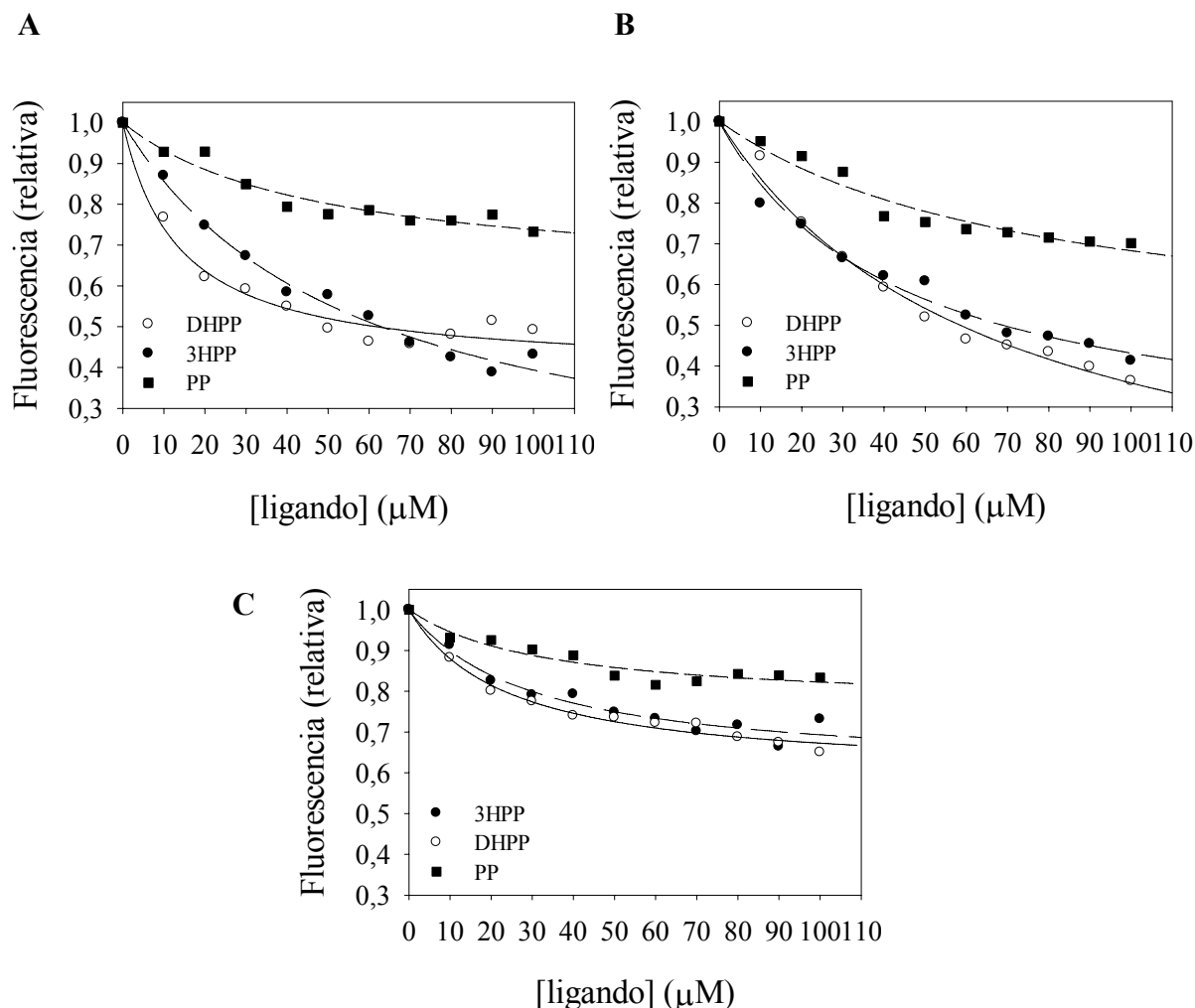


Figura 60. Representación del *quenching* de fluorescencia de MhpR-HisQ252R (A), MhpR-HisV272A (B) y MhpR-His (C) en función de la concentración de ligando. Se representa la señal del máximo de emisión de fluorescencia a 335 nm, expresada en unidades relativas, en función de la concentración de PP (cuadros negros), 3HPP (círculos negros) y DHPP (círculos blancos). Se indican con líneas (---), (- - -), (—) los ajustes de los puntos a una curva en presencia de PP, 3HPP y DHPP, respectivamente. Las curvas fueron generadas utilizando la ecuación $F = 1 - (1 - F_{min}) (K_b[L]_F)/(1 + K_b[L]_F)$

Compuesto	$K_b \times 10^4 (M^{-1})$			F_{min} (relativa)		
	MhpR-His	MhpR-His Q252R	MhpR-His V272A	MhpR-His	MhpR-His Q252R	MhpR-His V272A
3HPP	$3,4 \pm 0,9$	$1,8 \pm 0,3$	$2,3 \pm 0,4$	$0,6 \pm 0,03$	$0,05 \pm 0,06$	$0,19 \pm 0,05$
DHPP	$4,2 \pm 0,6$	$7,4 \pm 1,4$	$1,6 \pm 0,2$	$0,59 \pm 0,02$	$0,39 \pm 0,03$	$0 \pm 0,08$
PP	$3,0 \pm 1,1$	$2,1 \pm 0,01$	$1,3 \pm 0,3$	$0,76 \pm 0,03$	$0,61 \pm 0,05$	$0,44 \pm 0,11$

Tabla 13. Parámetros de la unión de diferentes ligandos a las proteínas MhpR-His, MhpR-HisQ252R y MhpR-HisV272A. Se muestran los valores de las constantes F_{min} y de asociación (K_b) con su correspondiente desviación típica.

En segundo lugar, la adición de DHPP (10-100 μ M) a una muestra de proteína MhpR-HisQ252R produjo una reducción de hasta un 50% de la emisión de fluorescencia, mientras que en el caso de la proteína MhpR-HisV272A, la reducción que se alcanzó fue del 63%. En ambos casos, la atenuación final de la fluorescencia fue mayor que la observada con la proteína MhpR-His nativa (41%). Con este efector, el valor de F_{min} fue 0,39 para MhpR-HisQ252R y prácticamente nulo para MhpR-HisV272A (Tabla 13). Debido a que el valor de F_{min} en el caso de la proteína nativa fue mayor (0,6) puede concluirse que el efecto de la interacción DHPP-proteína sobre el entorno de algún triptófano, es diferente en las tres proteínas.

En tercer lugar, al añadir PP a las muestras de proteínas mutantes, la emisión inicial se redujo un 20-25% al final de todo el proceso, siendo un efecto similar al observado con la proteína nativa. Sin embargo, en cada caso, la tendencia de la curva de ajuste dio lugar a un valor de F_{min} diferente. Si con la proteína MhpR-His nativa el valor de esta constante fue 0,76, los valores obtenidos con MhpR-HisQ252R y MhpR-HisV272A fueron, 0,61 y 0,44, respectivamente (Tabla 13). En ningún caso, este compuesto no inductor, anuló por completo la emisión de la proteína. Todos estos datos parecen indicar que el efecto producido por PP podría ser de naturaleza diferente al descrito anteriormente en la interacción de las proteínas mutantes con 3HPP o DHPP.

Por último, estos experimentos permitieron calcular las constantes de asociación de las diferentes proteínas MhpR-His (nativa y mutante) hacia los diferentes compuestos (Tabla 13). Las proteínas MhpR-HisQ252R y MhpR-HisV272A son más afines por el 3HPP y PP que la proteína nativa. Sin embargo, sólo la proteína MhpR-HisV272A presenta mayor afinidad por DHPP que la proteína nativa.

4.9.4. Estudio de la interacción entre las proteínas MhpR-His mutantes y sus efectores mediante dicroísmo circular.

Los efectores 3HPP y PP indujeron, tanto juntos como por separado, cambios en la estructura secundaria de la proteína MhpR-His nativa (ver apartado 3.4.2 de Resultados). Con el fin de comparar esos cambios con los que podrían acontecer en las proteínas MhpR-HisQ252R y MhpR-HisV272A, se realizaron espectros de CD de estas

proteínas preparadas en diferentes condiciones, que fueron: en ausencia de efector y en presencia de los efectores PP, 3HPP o de ambos. Las concentraciones de proteína y de ligando ensayadas fueron 6,5 μM y 1 mM, respectivamente. En la figura 61 se representan los espectros de CD de ambas proteínas, realizados en el UV lejano (200-260 nm) y a 20 °C.

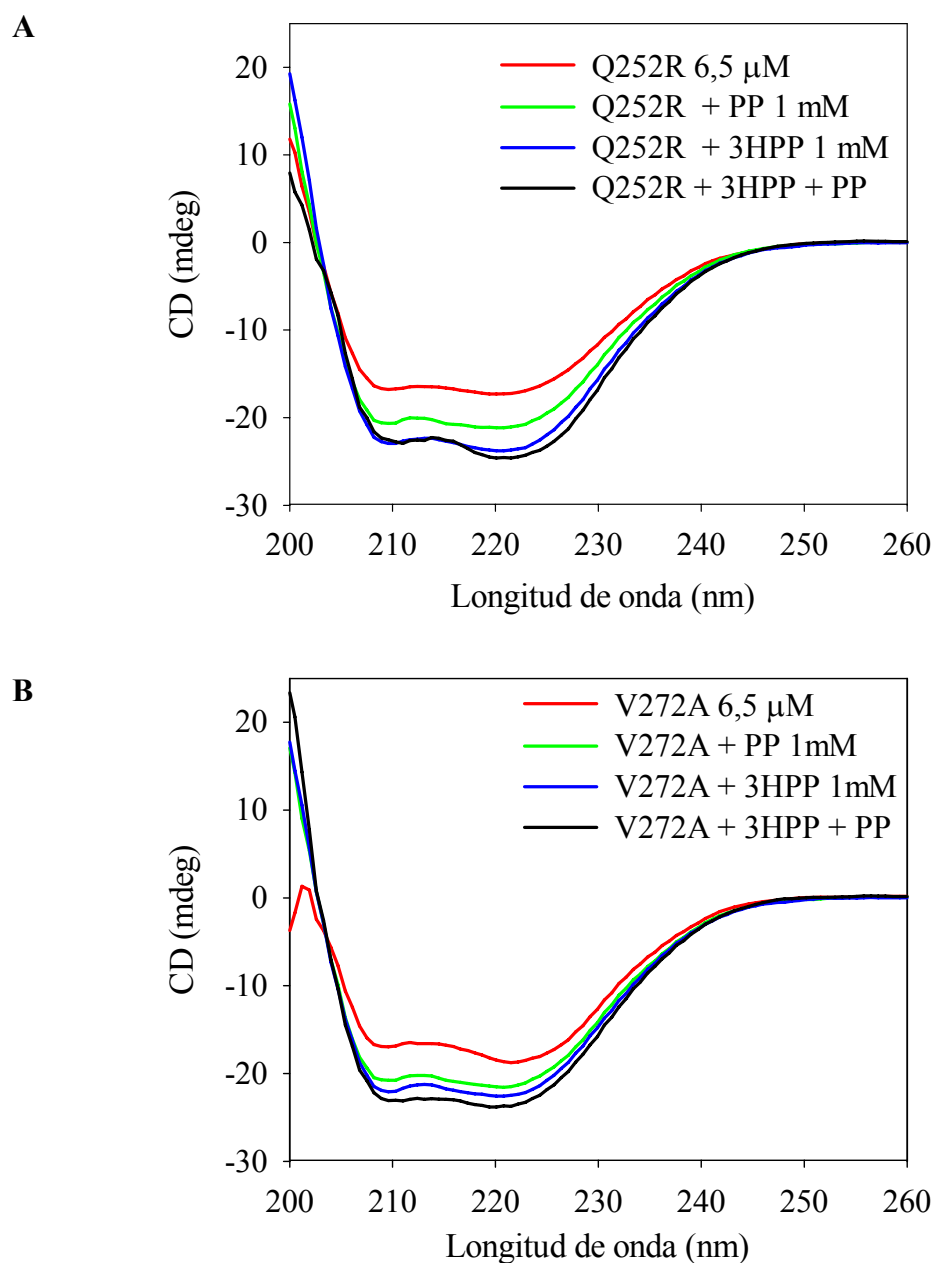


Figura 61. Espectros de CD en el UV lejano (200-260 nm) de las proteínas MhpR-HisQ252R (A) y MhpR-HisV272A (B). Se representan los espectros de CD de ambas proteínas obtenidos en ausencia de efector (rojo) y en presencia de PP (azul), de 3HPP (verde) o de ambos (negro). Las concentraciones de proteína y de ligando utilizadas en los ensayos fueron 6,5 μM y 1 mM, respectivamente. Las muestras se prepararon en tampón fosfato potásico 20 mM, pH 7,5 y KCl 100 mM. Los ensayos se realizaron a 20 °C.

A simple vista, los efectos provocados por la presencia de 3HPP y PP, bien por separado o conjuntamente, sobre la forma de los espectros de ambas proteínas MhpR-His mutantes, fueron muy similares a los observados en el caso de la proteína nativa, ya que las señales de CD a 222 y 208 nm aumentaron (en valores absolutos) en presencia de estos compuestos aromáticos. Estos espectros fueron analizados mediante la utilización de los programas informáticos (ver apartado 7.10 de Materiales y Métodos) con el fin de realizar una predicción de los cambios ocasionados a nivel de estructura secundaria por la presencia de ligando. En la figura 62 se muestran los contenidos (en porcentaje) de hélice α , lámina β y estructura desordenada predichos para ambas proteínas, en las diferentes condiciones ensayadas.

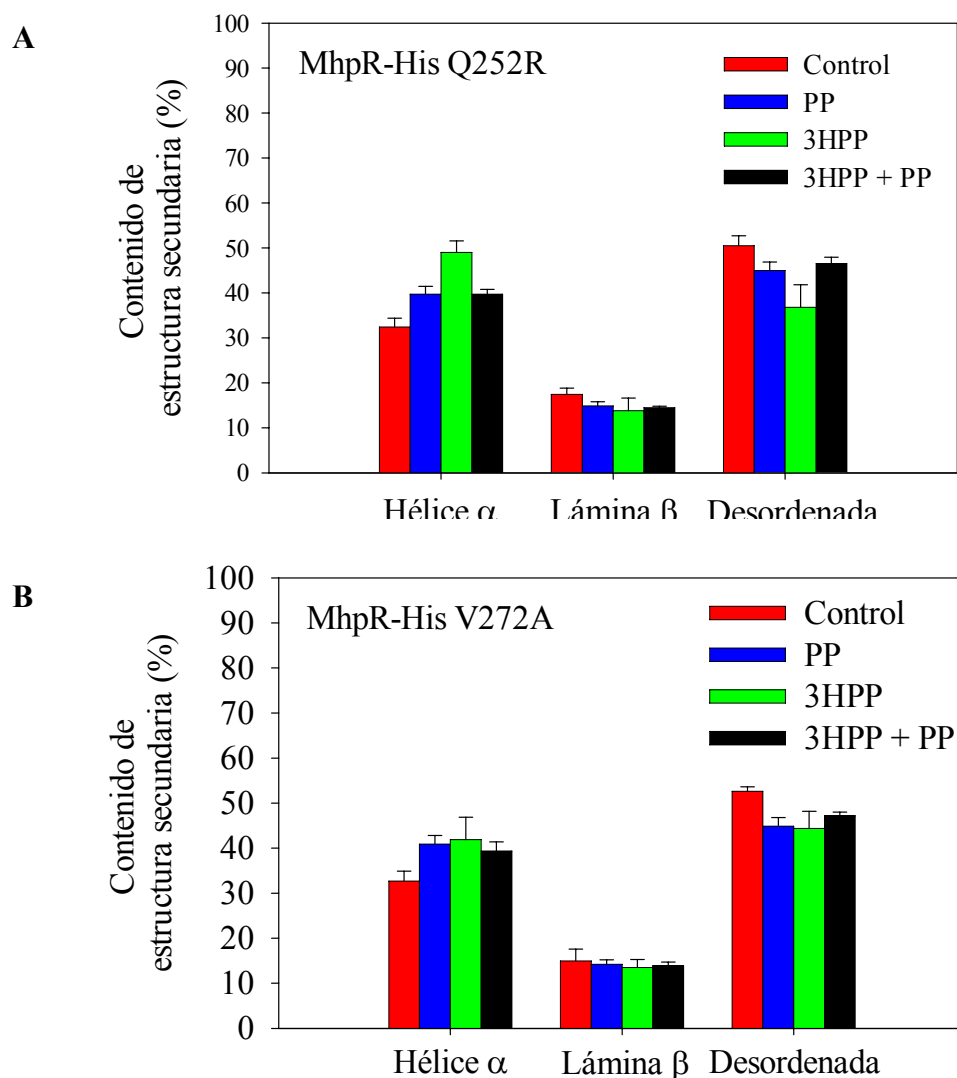


Figura 62. Predicción de la estructura secundaria de las proteínas MhpR-HisQ252R (A) y MhpR-HisV272A (B). Se representa el porcentaje de contenido de estructura secundaria de ambas proteínas en ausencia de efector (rojo) y en presencia de PP (azul), de

3HPP (verde), o de ambos (negro). Se indica el valor promedio con su correspondiente desviación estándar.

En ausencia de efector, la composición en estructura secundaria predicha para MhpR-HisQ252R fue: $32,4 \pm 1,9\%$ de hélice α , $17,4 \pm 1,4\%$ de lámina β y un $50,5 \pm 2,2\%$ de estructura desordenada, mientras que la correspondiente a MhpR-HisV272A fue: $32,7 \pm 2,2\%$ de hélice α , un $15 \pm 2,6\%$ de lámina β y un $52,6 \pm 1,0\%$ de estructura desordenada. Si se comparan estos resultados con el que se obtuvo con la proteína nativa (ver apartado 3.4.2 de Resultados), se demuestra que la introducción de cualquiera de estas dos mutaciones, en la secuencia de la proteína MhpR-His nativa, no influye significativamente, sobre su contenido en estructura secundaria. El efecto de PP, sobre ambas proteínas mutantes, fue ligeramente diferente al observado con la proteína nativa. Así, mientras que en ésta última, el contenido en estructura desordenada disminuyó un 2,4%, en MhpR-HisQ252R y MhpR-HisV272A disminuyó un 5,5 y un 7,7%, respectivamente, efecto que se traduce en todos los casos en un aumento del contenido de hélice α y en una disminución de la cantidad de lámina β . En presencia de 3HPP, el porcentaje de hélice α de las proteínas MhpR-HisQ252R y MhpR-HisV272A aumentó un 16,6% y un 9,2%, respectivamente, frente al aumento del 3,8% observado en el caso de la proteína silvestre. En ambas proteínas mutantes, este efecto se reflejó en un descenso en el porcentaje de estructura desordenada. Las diferencias observadas en presencia de ambos compuestos fueron menos significativas, aumentando ligeramente el contenido de hélice α a expensas de un descenso en el contenido de lámina β y estructura desordenada, en las tres proteínas.

Por último, con objeto de analizar cómo influye la presencia de los diferentes compuestos sobre la estabilidad térmica de cada proteína mutante, las mismas muestras analizadas anteriormente, fueron desnaturalizadas mediante calentamiento. En la figura 63 se representan las curvas de desnaturalización térmica obtenidas en las diferentes condiciones ensayadas con su correspondiente T_m . El efecto observado con las dos mutantes es similar al descrito en el apartado 1.9.2 de Resultados para la proteína nativa, aumentando la estabilidad térmica, entre 5,5 y 5,7 °C, en presencia de PP o de 3HPP. En presencia de ambos la estabilidad aumentó 6,6 °C (en MhpR-HisQ252R) y 7 °C (en MhpR-HisV272A), (Fig. 63C).

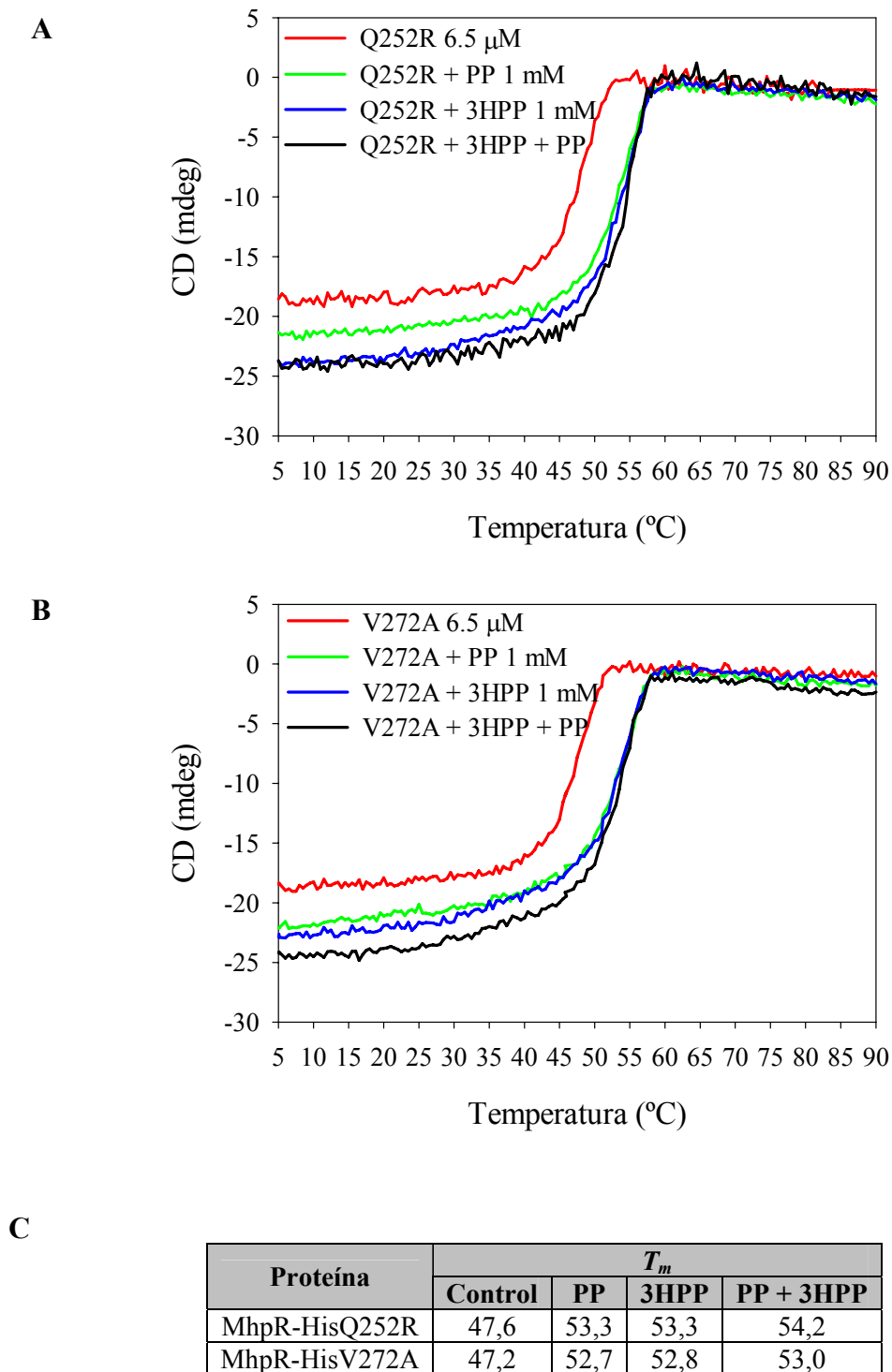


Figura 63. Estudio de estabilidad térmica de las proteínas MhpR-HisQ252R (A) y MhpR-HisV272A (B) mediante CD en el UV lejano. Se representan curvas de desnaturalización térmica de las proteínas MhpR-His mutantes en ausencia de efector (rojo) y presencia de PP (azul), de 3HPP (verde) y de ambos (negro). Las concentraciones de proteína y de ligando utilizadas en los ensayos fueron 6,5 μM y 1 mM, respectivamente. Se representa la señal de CD (en *milidegrees*) a 220 nm en función de la temperatura ($^{\circ}\text{C}$). (C) Temperatura de *melting* o T_m ($^{\circ}\text{C}$) de las proteínas MhpR-His mutantes en ausencia de ligando (control) y presencia de PP, 3HPP o de ambos.

4.9.5. Análisis del cambio conformacional inducido por las sustituciones Q240R y V260A en la proteína MhpR.

Se elaboraron modelos tridimensionales de las proteínas mutantes MhpRQ240R y MhpRV260A del mismo modo que se hizo para MhpR (ver apartado 7.11 de Materiales y Métodos).

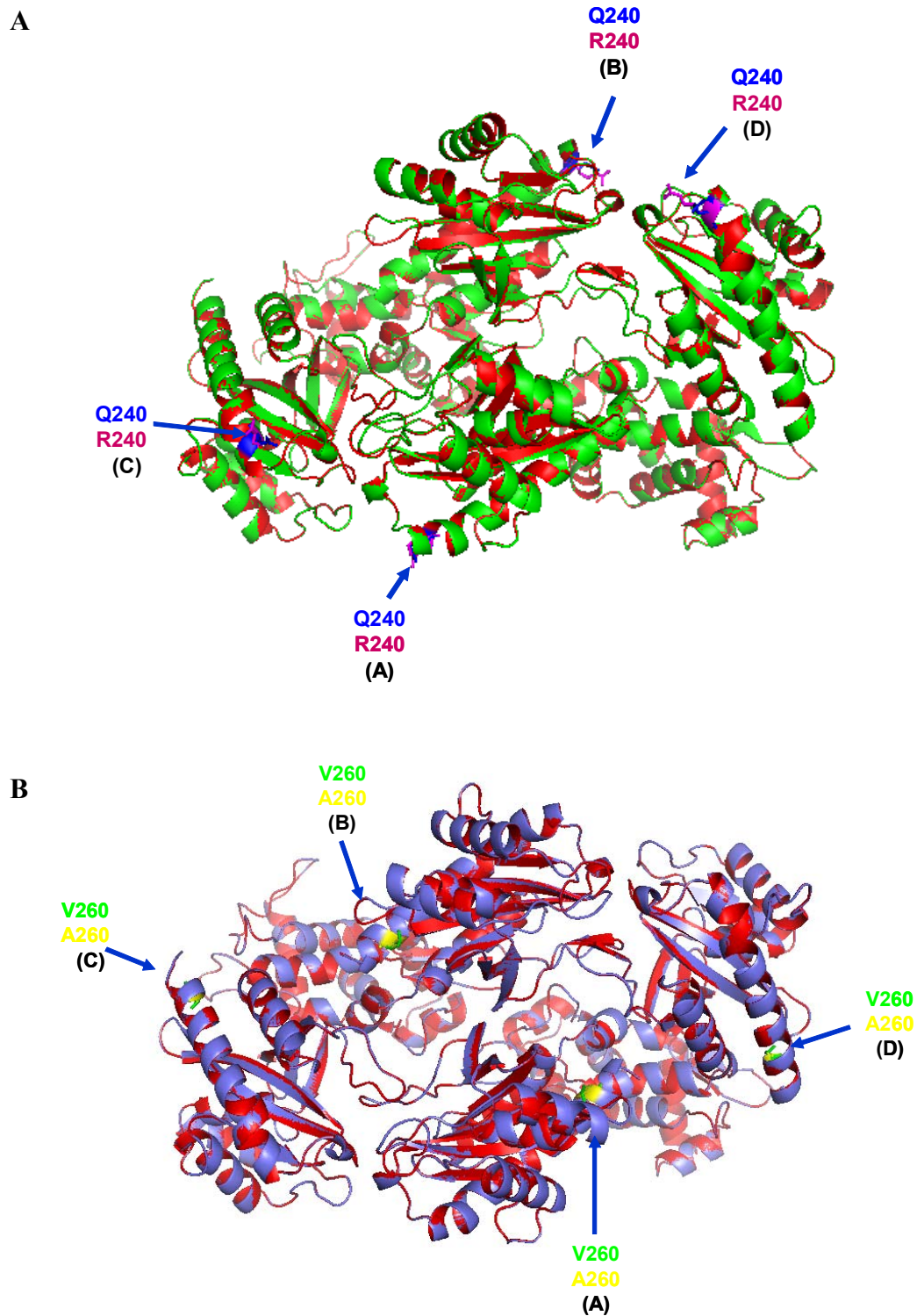


Figura 64. Solapamiento estructural de la proteína MhpR con las proteínas mutantes MhpRQ240R y MhpRV260A. (A) Superposición de las representaciones de *cartoon* de las proteínas MhpR (en rojo) y MhpRQ240R (en verde). En diagrama de *sticks* se muestran los aminoácidos Q240 (en azul) y R240 (en magenta). (B) Superposición de los diagramas de *cartoon* de la proteína MhpR (en rojo) con MhpRV260A (en azul). Se muestran los aminoácidos V260 (en verde) y A260 (en amarillo), en representación de *sticks*. Entre paréntesis se indica la cadena A, B, C o D. Los modelos fueron generados utilizando el programa PyMOL (DeLano, 2002).

En la figura 64 se muestran los modelos tridimensionales de cada proteína mutante superpuestos con el de la proteína nativa reflejándose en ambos casos una gran similitud entre ellas. Por tanto, la introducción de las sustituciones Q240R o V260A en la secuencia proteica de MhpR no inducirían un cambio estructural generalizado sino más bien puntual, lo que estaría de acuerdo con los resultados obtenidos mediante dicroísmo circular (apartado anterior).

5. Estudio de la proteína transportadora de 3HPP/3HCI.

Estudios anteriores (Tesis doctoral B. Torres, 2002) demostraron que el gen *mhpT* del *cluster mhp* codifica una permeasa (MhpT) encargada de transportar 3HPP, 3HCI y, en menor medida, el DHPP hacia el interior de las células de *E. coli*. Para profundizar en el estudio del papel que desempeña el gen *mhpT* en el metabolismo del 3HPP, se analizó la regulación de la expresión de este gen y el efecto que produce su pérdida en el crecimiento de *E. coli*.

5.1. Estudio de la expresión del gen *mhpT*.

Dado que los genes *mhpE* y *mhpT* se encuentran separados por una secuencia de 532 pb (Fig. 65) se analizó la posibilidad de que esta región, a la que hemos denominado secuencia P_T , contuviera un promotor capaz de dirigir la expresión del gen *mhpT*. Con este fin, se realizó una fusión de la región P_T con el gen marcador *lacZ* (Fig. 66). La región P_T se amplificó mediante PCR a partir del plásmido pPADR2 (Tabla 5) utilizando los oligonucleótidos PT5' y PT3' (Tabla 6 y fig. 65). El fragmento amplificado de 596 pb se clonó en el vector pUJ9 dando lugar al plásmido pUJT1 que se utilizó para transformar la cepa *E. coli* DH5 α (pPADR2) (Tabla 4). La cepa *E. coli* DH5 α (pPADR2, pUJT1) se seleccionó en medio LB que contenía kanamicina y ampicilina. Esta cepa fue cultivada en placas de medio LB con X-gal (0,08 mM) y

3HPP (1 mM) y las colonias resultantes no presentaron actividad β -galactosidasa en las condiciones ensayadas. Estos resultados demuestran que la región nucleotídica situada entre los genes *mhpE* y *mhpT* no presenta actividad promotora.

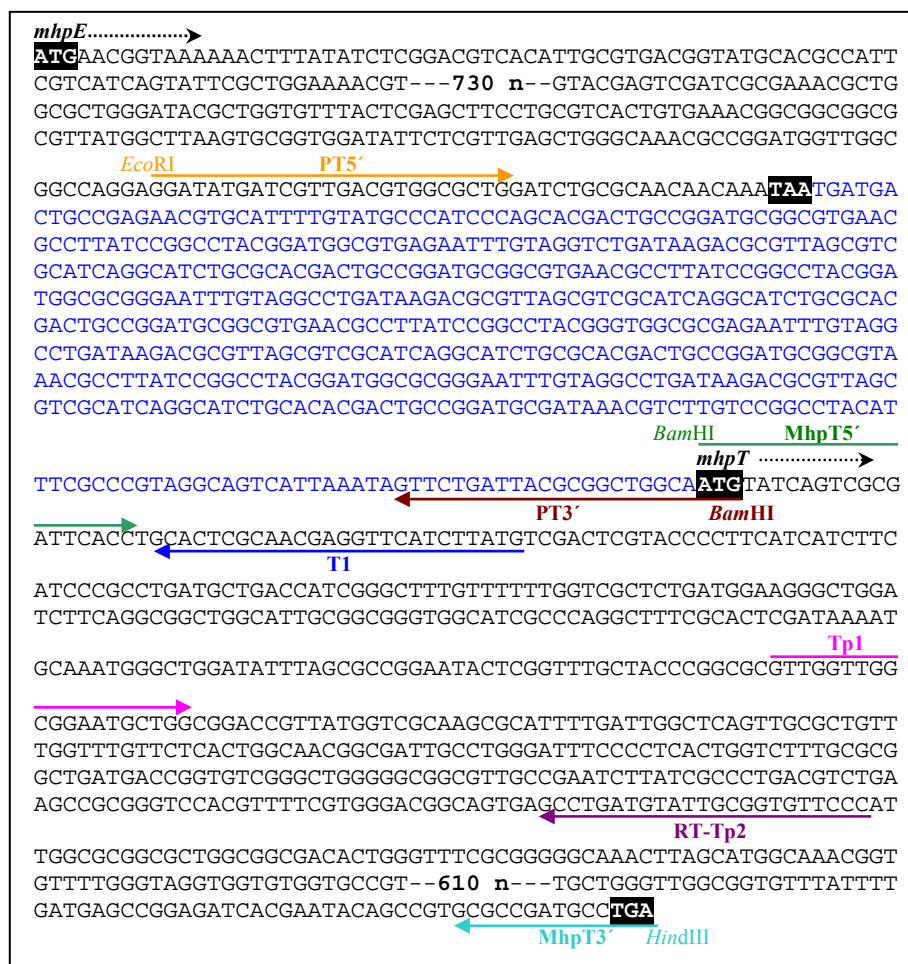


Figura 65. Secuencia de nucleótidos de la región intergénica *mhpE-mhpT*. Se muestra la secuencia de los genes *mhpE* (GeneBank ID: AAC73455.1) y *mhpT* (GeneBank ID: AAC73456.1) del *cluster mhp* de *E. coli* MG1655. Las flechas de trazo discontinuo y color negro indican la dirección de la transcripción de los genes *mhpE* y *mhpT*. Se han resaltado en negro los codones de inicio y fin de la traducción de ambos genes. La región intergénica *mhpE-mhpT* se muestra en letra de color azul. Las flechas de colores indican algunos de los nucleótidos utilizados en este trabajo (ver tabla 6). En la secuencia se han omitido 730 nucleótidos (730 n) de la secuencia del gen *mhpE* y 610 nucleótidos (610 n) de la secuencia del gen *mhpT*.

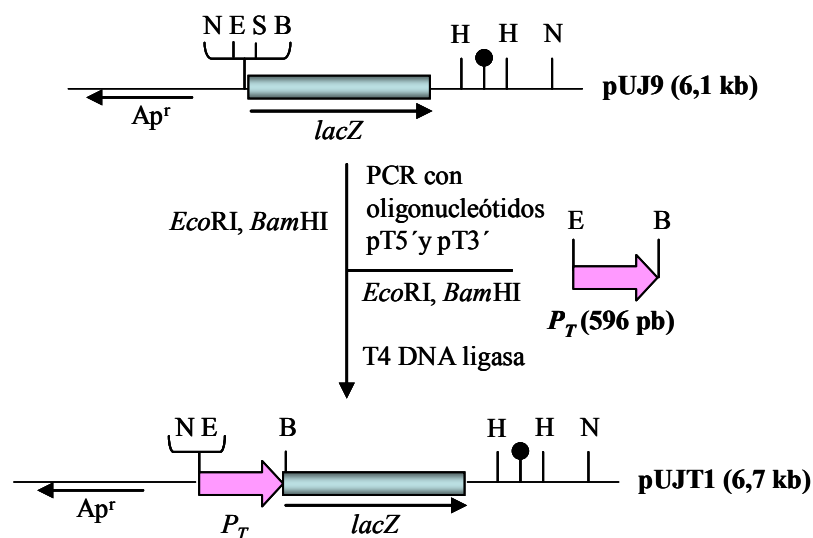


Figura 66. Construcción del plásmido pUJT1. Con flechas se indican la dirección de la transcripción de los genes. Se muestran las dianas de restricción: N (*NotI*), E (*EcoRI*), S (*SmaI*), B (*BamHI*) y H (*HindIII*). El círculo negro representa el terminador de la transcripción del fago T7. *Ap^r* indica el gen que confiere resistencia a ampicilina.

Los resultados anteriores sugieren que el gen *mhpT* estaría controlado por el promotor inducible *Pa*. Para analizar si la expresión del gen *mhpT* es inducible en presencia de 3HPP, se llevaron a cabo ensayos de RT-PCR. Se aisló RNA total de células de *E. coli* MG1655 (*Rif^r*) (Tabla 4) que fueron cultivadas en medio mínimo M63 con glicerol (20 mM) o 3HPP (5 mM) como fuente de carbono y se encontraban en fase exponencial de crecimiento. Los experimentos de RT-PCR se realizaron como se indica en el apartado 6.2 de Materiales y Métodos. En las reacciones de PCR se utilizaron los oligonucleótidos Tp1 y RT-Tp2 (Tabla 6 y figuras 65 y 67A) para amplificar un fragmento interno (247 pb) del gen *mhpT*, y los oligonucleótidos MhpB-1 y RT-MhpB3' (Tabla 6) para amplificar un fragmento interno (215 pb) del gen *mhpB* (control positivo de inducción por 3HPP) (Fig. 67A). Los resultados obtenidos en estos experimentos se muestran en el panel izquierdo de la figura 67B y ponen de manifiesto que la expresión del gen *mhpT* es inducible por 3HPP.

Para comprobar que el gen *mhpT* se co-transcribe con los genes *mhp* catabólicos se realizaron otros experimentos de RT-PCR utilizando los oligonucleótidos pT5' y T1 (Tabla 6 y figuras 65 y 67A) que hibridan al final del gen *mhpE* y al comienzo del gen *mhpT*, respectivamente y amplifican un fragmento de 626 pb (*mhpE-mhpT*) (Fig. 67A). En paralelo se analizó la amplificación de un fragmento de 219 pb del gen *dnaE* (gen constitutivo o *housekeeping* que codifica la subunidad α de la DNA polimerasa III) con

los oligonucleótidos *dnaE5'* y *dnaE3'* (Tabla 6). El resultado mostrado en el panel derecho de la figura 67B demuestra que el gen *mhpT* se co-transcribe con los genes *mhp* a partir del promotor *Pa* y su expresión es inducible por 3HPP, aunque se detecta cierta expresión basal en presencia de glicerol.

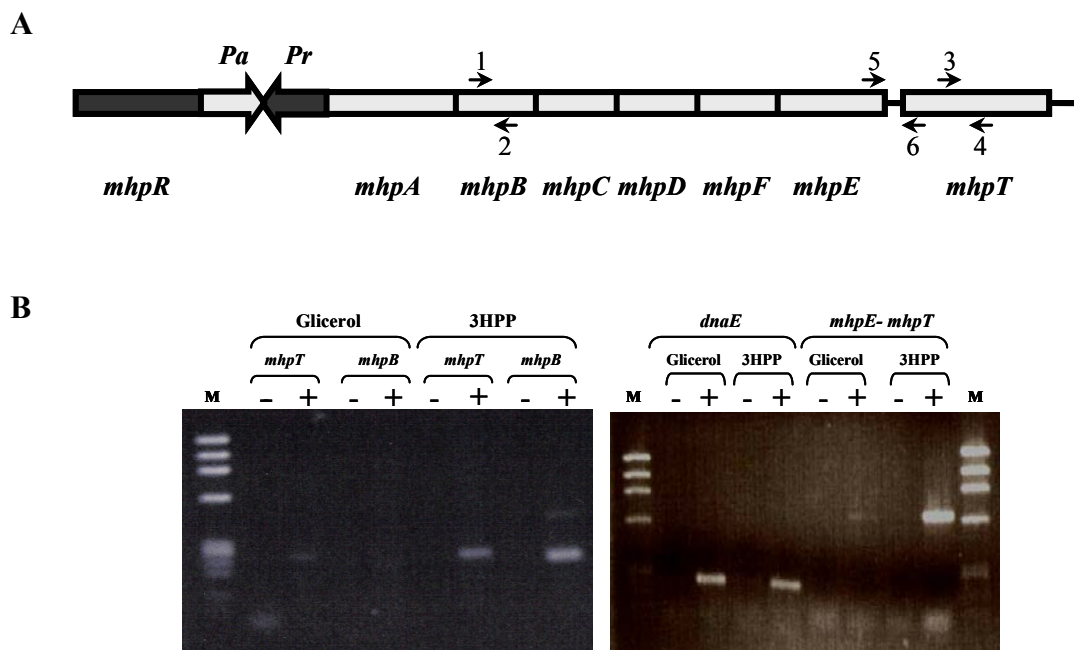


Figura 67. Estudio de la expresión del gen *mhpT* mediante RT-PCR. **A)** Esquema del *cluster mhp* con los oligonucleótidos que fueron utilizados en las reacciones de RT-PCR: 1 (MhpB-1), 2 (RT-MhpB3'), 3 (Tp1), 4 (RT-Tp2), 5 (PT5') y 6 (T1). **B)** Amplificación de cDNA obtenido mediante retrotranscripción a partir de RNA total de la cepa *E. coli* MG1655 utilizando la técnica de RT-PCR. Como marcadores de peso molecular (M) se emplearon los fragmentos generados tras la digestión de DNA del fago Φ X174 con *Hae*III (New England Biolabs). En la parte superior de la figura se indica la fuente de carbono en la que crecieron las células (glicerol o 3HPP). – y + indica ausencia o presencia de enzima retrotranscriptasa en la reacción de retrotranscripción inicial (control de ausencia de contaminación de DNA en la preparación de RNA). Se indican los genes analizados en cada calle: *mhpT*, *mhpB* (gen que codifica la enzima dioxigenasa de la ruta *mhp*, *mhpT-mhpE* (secuencia de nucleótidos que comprende el final del gen *mhpE* y el comienzo del gen *mhpT*) y *dnaE* (gen que codifica la subunidad α de la DNA polimerasa III).

5.2. Estudio del papel de la proteína transportadora MhpT.

5.2.1. Construcción de la cepa MG1655*mhpT* Δ .

Para estudiar cómo influye el transportador MhpT en el crecimiento de *E. coli* nos propusimos construir una cepa mutante con el gen *mhpT* delecionado y comparar después su comportamiento con la cepa nativa. Para construir la cepa mutante se empleó una técnica basada en la utilización del plásmido movilizable y suicida pKNG101. Tal y como se muestra en la figura 68, en un primer paso, se delecionó un fragmento de 221

pb del gen *mhpT* mediante digestión del plásmido pBT17 (Tabla 5) con las enzimas de restricción *SacII* y *DraIII*. Una vez digerido el plásmido pBT17, éste fue tratado con T4 DNA polimerasa y religado con T4 DNA ligasa, obteniéndose finalmente el plásmido pBT17 Δ (Tabla 5). Mediante PCR y utilizando los oligonucleótidos MhpT5' y MhpT3' (Tabla 6 y fig. 65) y el plásmido pBT17 Δ como DNA molde, se amplificó la secuencia del gen *mhpT* delecionado (*mhpT* Δ). Posteriormente, el fragmento *mhpT* Δ fue tratado con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* y posteriormente fue digerido con la enzima de restricción *BamHI*. El plásmido pKNG101 (vector movilizable y suicida) fue digerido con las enzimas de restricción *BamHI* y *SmaI*. Una vez digeridos el plásmido pKNG101 y el fragmento *mhpT* Δ , se ligaron con T4 DNA ligasa, resultando el plásmido pKNGBB (Tabla 5). Con el plásmido pKNGBB se transformó la cepa *E. coli* SM10 λ pir (Tabla 4). Posteriormente, se realizó una conjugación biparental utilizando la cepa SM10 λ pir (pKNGBB) como cepa donadora y la cepa MG1655 (Rif^r) como cepa receptora, en la que tiene lugar el primer suceso de recombinación homóloga (Fig. 68). Los transjugantes (Rif^r y Sm^r) se seleccionaron en un primer paso, en placas LB con rifampicina y estreptomycin. Se analizó por PCR (con los oligonucleótidos MhpT5' y MhpT3') el DNA de las colonias resistentes a ambos antibióticos y se determinaron las colonias con las que se obtuvo doble producto en la amplificación que se corresponden con el gen *mhpT* completo y delecionado. Posteriormente, a partir de las colonias seleccionadas se hizo una segunda selección en placas de medio mínimo M63 con glicerol 20 mM y sacarosa al 5%, para que se produzca la segunda recombinación homóloga. La integración de la versión *mhpT* Δ en cromosoma fue comprobada finalmente mediante PCR. La cepa mutante resultante fue denominada MG1655*mhpT* Δ (Tabla 4).

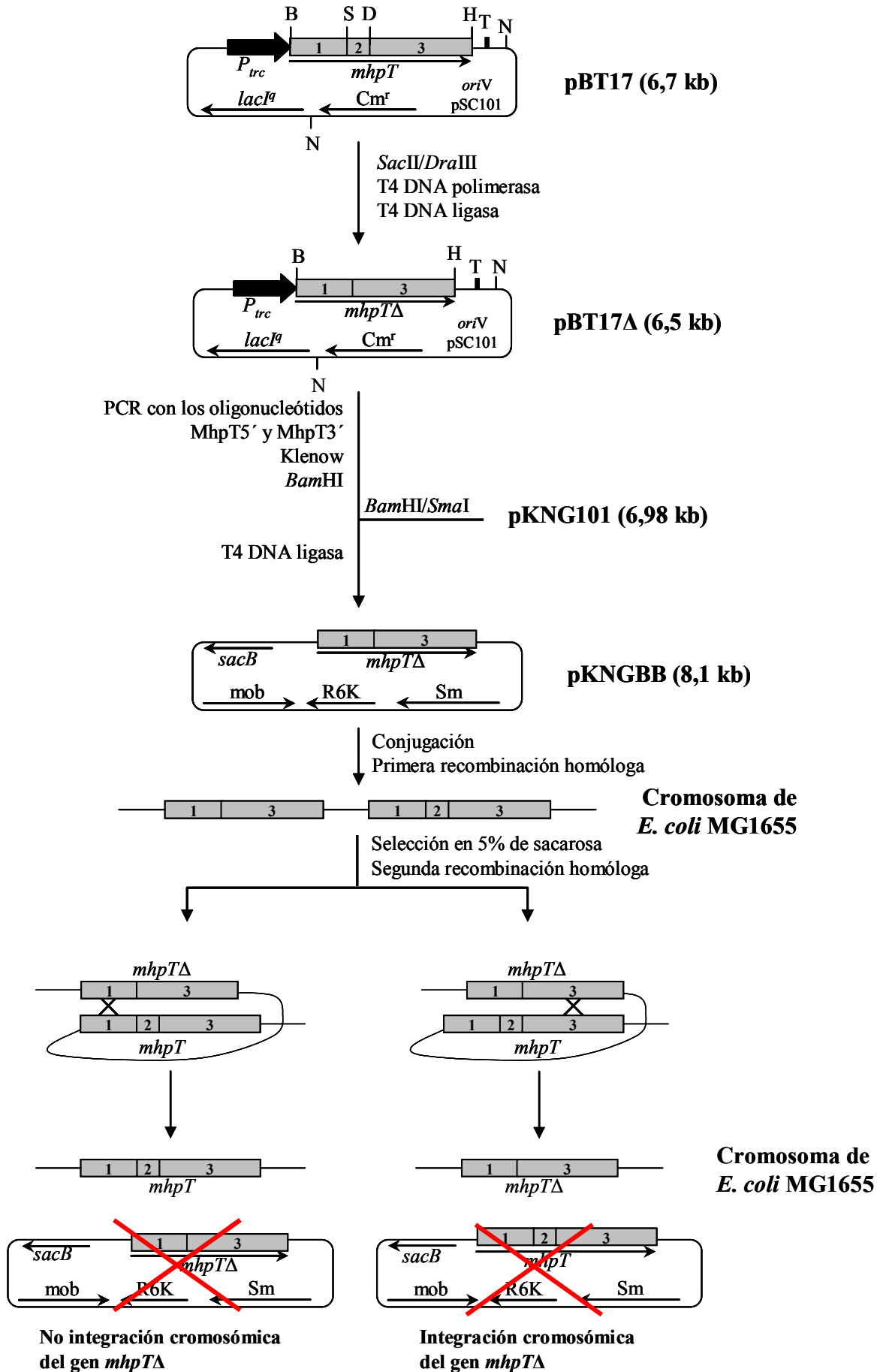


Figura 68. Construcción de la cepa *E. coli* MG1655 mutante en el gen *mhpT*.

Se representa el gen *mhpT* compuesto por 3 segmentos (1, 2 y 3). El gen *mhpT* Δ se compone de los fragmentos 1 y 3 del gen *mhpT*. Las flechas indican la dirección de la transcripción de los genes. El promotor P_{rrc} contiene el operador que reconoce LacI^q y regula su actividad transcripcional. El gen *sacB* codifica una proteína sintetasa de levanos y su expresión se induce en presencia de sacarosa. Se indica la función de movilización (*mob*) en el plásmido pKNGBB. Las dianas de restricción se indican como: *Bam*HI (B), *Dra*III (D), *Hind*III (H), *Not*I (N) y *Sac*II (S). T, señala los terminadores de la transcripción T1/T2 del operón *rrnB* de *E. coli*. *oriVpSC101* y R6K, indican los orígenes de replicación. Los oligonucleótidos MhpT5' y MhpT3' se detallan en la tabla 6 de Materiales y Métodos. Sm y Cm^r indican los genes que confieren resistencia a estreptomicina y cloranfenicol, respectivamente. Con una X de color negro se representan los sucesos de recombinación homóloga. Con una X de color rojo se representa la pérdida de los plásmidos al no poder replicarse dentro de la célula.

5.2.2. Estudio del efecto de la mutación del gen *mhpT* en *E. coli* MG1655.

Para analizar si la pérdida de la función del gen *mhpT* afecta al crecimiento de *E. coli* MG1655 en presencia de 3HPP se comparó el tiempo de generación de esta cepa con el de *E. coli* MG1655*mhpT* Δ . Para ello, se cultivaron ambas cepas en medio líquido que contenía medio mínimo M63 con glicerol (20 mM) o 3HPP (0,5 mM) como única fuente de carbono. Según se muestra en la figura 69A, cuando las dos cepas se cultivaron en presencia de glicerol, ambas presentaron un tiempo de duplicación similar de aproximadamente 90-93 min. Sin embargo, cuando las cepas crecieron a expensas de 3HPP como única fuente de carbono, el tiempo de duplicación de la cepa mutante fue 1,5 veces mayor que el de la cepa silvestre. Estos resultados ponen de manifiesto que la acción de la permeasa MhpT facilita el crecimiento de *E. coli* K-12 cuando la única fuente de carbono disponible en el medio es el 3HPP.

En otra serie de experimentos se determinó si existían diferencias fenotípicas entre las colonias que forma *E. coli* MG1655 y las que forma *E. coli* MG1655*mhpT* Δ cuando se cultivan en medio sólido. Para ello, ambas cepas fueron inoculadas a igual DO₆₀₀ en placas de agar que contenían medio mínimo M63 con glicerol (20 mM) o con 3HPP (0,5 mM). Después de incubar las células a 37 °C durante dos días, se observó que ambas cepas presentaban un fenotipo muy similar en glicerol. Sin embargo, en el medio que contenía 3HPP las colonias de la cepa *E. coli* MG1655 tenían un diámetro mayor (1,4 veces) al de las colonias de la cepa mutante en el gen *mhpT* si bien su aspecto morfológico era similar (Fig. 69B). Estos resultados ratifican el resultado observado en medio líquido de que la presencia del transportador favorece el crecimiento de *E. coli* MG1655 cuando la única fuente de carbono disponible es el 3HPP. El hecho de que la morfología de la colonia y de las células no cambie sugieren

que la ausencia del transportador no produce ninguna alteración fisiológica o toxicidad significativa en la célula, salvando el hecho de que al disminuir la velocidad de transporte del 3HPP al interior celular reduce la velocidad de aprovechamiento y por ende del crecimiento, aportando así una ventaja evolutiva clara a las células que lo transportan más rápido.

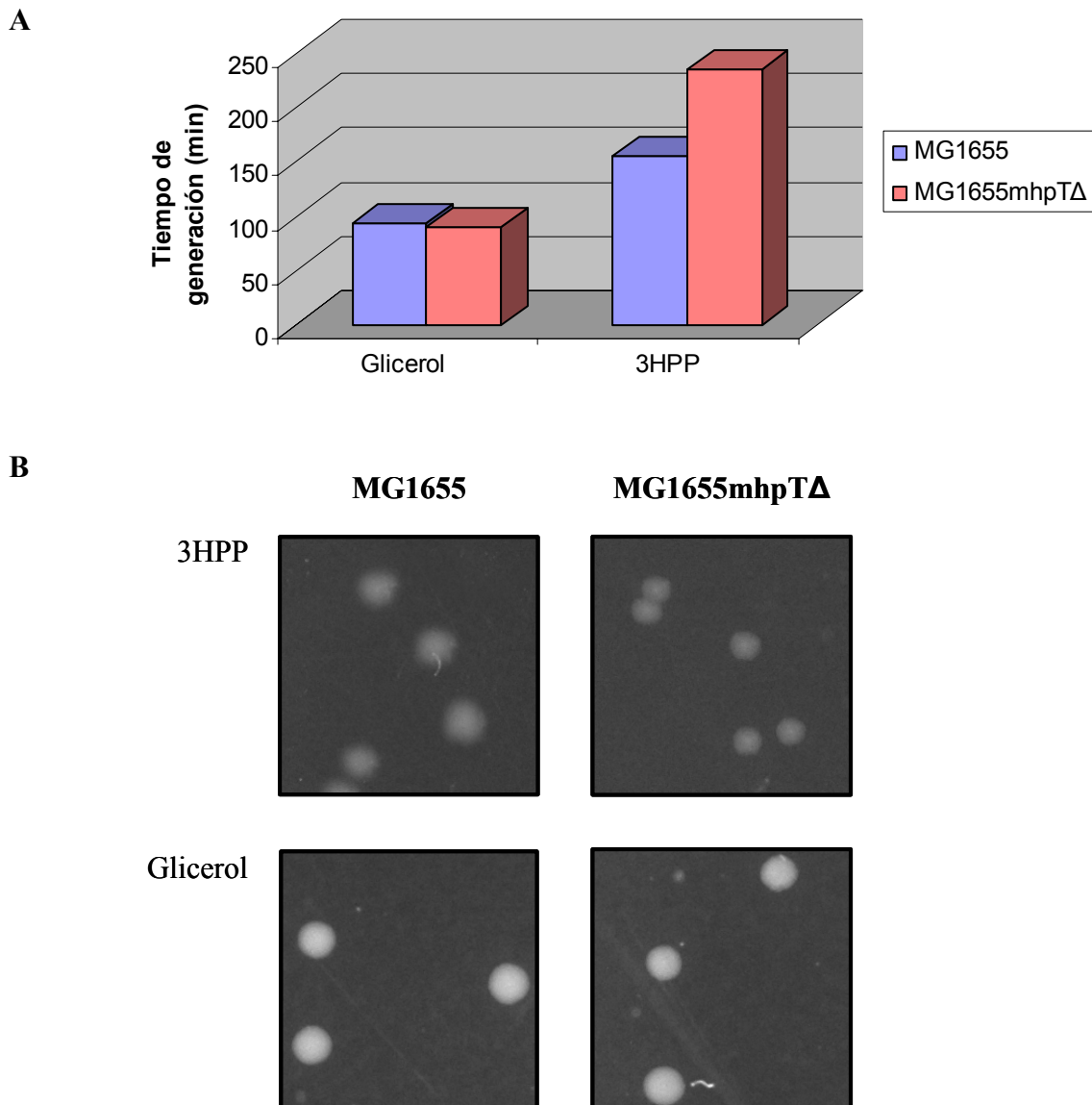


Figura 69. Comparación del crecimiento de *E. coli* MG1655 y *E. coli* MG1655mhpTA cuando se cultivan en presencia de 3HPP. A) Tiempo de generación (en minutos) de ambas cepas cuando se cultivan en medio mínimo que contiene glicerol (20 mM) o 3HPP (0,5 mM) como única fuente de carbono. Se ha representado el valor medio de tres experimentos independientes. B) Crecimiento de ambas cepas en placas de agar que contienen medio mínimo M63 con 3HPP (0,5 mM) o glicerol (20 mM) como única fuente de carbono.

V. DISCUSIÓN

1. Estudio del regulador MhpR.

Como ya se ha mencionado a lo largo de esta tesis, MhpR regula positivamente la expresión del *cluster mhp* de la ruta de degradación del 3HPP. Esta proteína muestra una similitud significativa con miembros de la familia de reguladores transcripcionales IclR. MhpR contiene entre los residuos Arg-139 y Gln-221 el perfil de aminoácidos que mejor define a la familia (Krell *et al.*, 2006). A diferencia de otras familias de reguladores transcripcionales, tales como XylS/AraC (Gallegos *et al.*, 1997) y TetR (Ramos *et al.*, 2005), la familia IclR incluye a represores, activadores y proteínas con doble función: como represor de unos genes (incluyendo autorregulación) y como activador de otros (Molina-Henares *et al.*, 2006) (Tabla 3). En el caso de la proteína MhpR se trata de un activador transcripcional que no auto-reprime su propia expresión (Torres *et al.*, 2003). Cuando se compara la secuencia de la proteína MhpR con las de otros miembros de la familia IclR, se observa que presenta una identidad de secuencia moderada con activadores transcripcionales que controlan rutas del catabolismo de compuestos aromáticos, tales como: CatR (23%) y PcaR (27%) de las rutas del catecol y protocatecuato en *Rhodococcus opacus* 1CP (Eulberg y Schlömann, 1998; Eulberg *et al.*, 1998); PcaR (22%) de la ruta del protocatecuato en *Pseudomonas putida* PRS2000 (Romero-Steiner *et al.*, 1994); PobR (24%) y PcaU (24%) de las rutas del 4-hidroxibenzoato y protocatecuato en *Acinetobacter* sp. ADP1 (DiMarco y Ornston, 1994; Gerischer *et al.*, 1998). Sin embargo, y como era de esperar, la proteína MhpR muestra una mayor identidad de secuencia con el presunto regulador de la ruta *mhp* de *Klebsiella pneumoniae* (77%; *locus tag*: KPN02123, *Gene ID*: 5340519) y con el regulador de la ruta de degradación de 3HPP en *Comamonas testosteroni* (42%) (Arai *et al.*, 1999).

Mediante ensayos de retardo en gel se ha demostrado que la proteína MhpR-His purificada es capaz de unirse a una secuencia localizada dentro del promotor *Pa* con una constante de disociación aparente (Kd) de 4,5 nM. Cuando estos ensayos se realizaron en presencia de 3HPP, la eficiencia de unión a DNA mejoró 2,3 veces, aunque la presencia de este compuesto no fue indispensable para la unión *in vitro* de MhpR-His al promotor *Pa*. Estos resultados están de acuerdo con los experimentos llevados a cabo con extractos crudos que contenían la proteína MhpR hiperproducida (Torres *et al.*, 2003), descartando así la posibilidad de que este efecto de unión en ausencia de inductor pudiera deberse a la presencia de una molécula inductora análoga a 3HPP en el extracto

crudo y por tanto, este resultado ratifica que MhpR-His es capaz de reconocer *in vitro* una secuencia operadora situada dentro del promotor *Pa* en ausencia de efector. Sin embargo, los ensayos realizados *in vivo* (Torres *et al.*, 2003) y los experimentos de transcripción *in vitro* mostrados en el apartado 3.3 de Resultados demostraron que la iniciación de la transcripción a partir del promotor *Pa* sólo puede llevarse a cabo en presencia de las moléculas efectoras 3HPP o DHPP (Fig. 44 calles 1-6 y calles 14-19, respectivamente).

Este comportamiento no es sorprendente en tanto que ya se ha demostrado que otros activadores transcripcionales pertenecientes a la familia IclR también se unen al DNA tanto en ausencia como en presencia de su efector, como sucede con los reguladores PobR y PcaU de *Acinetobacter* sp. ADP1 (DiMarco y Ornston, 1994; Gerischer *et al.*, 1998; Jerg y Gerischer, 2008), CatR de *R. opacus* 1CP (Eulberg y Schlömann, 1998) y PcaR de *P. putida* PRS2000 (Guo y Houghton, 1999). En el caso del regulador PcaR se han postulado dos posibles mecanismos de inducción de la transcripción a partir del promotor de los genes *pcaIJ*. En este promotor, el operador de PcaR solapa con las cajas -10 y -35 que están separadas por 16 pb (la distancia óptima es de 17 pb). Según el primer mecanismo de activación, PcaR en presencia de β -ceto adipato podría aumentar la formación del complejo cerrado RNA polimerasa-promotor favoreciendo los contactos de la RNA polimerasa con la secuencia -35 no consenso existente en el promotor de forma similar a como se ha descrito para la proteína P4 del fago $\Phi 29$ (Monsalve *et al.*, 1997). Según el segundo mecanismo, PcaR en presencia de β -ceto adipato podría optimizar la distancia entre los elementos promotores -10 y -35, potenciando la formación del complejo abierto de forma similar a como sucede con los reguladores MerR y SoxR (Ansari *et al.*, 1995; Caslake *et al.*, 1997; Hidalgo y Demple, 1997; Guo y Houghton, 1999). De forma similar, el promotor *Pa* del *cluster mhp* contiene, a una distancia de 16 pb de la caja -10, una caja -35 (5'-TTGTAG-3') que se diferencia en 3 nucleótidos de la secuencia consenso que reconoce la subunidad σ^{70} de la RNA polimerasa (5'-TTGACA-3') (Fig. 5). Aunque la secuencia operadora de MhpR (centrada en la posición -58 con respecto al inicio de la transcripción del promotor *Pa*) no solapa con las secuencias que reconoce la RNA polimerasa como en el caso de PcaR, es posible que esta proteína reguladora, por su proximidad a esta zona, interaccione con la RNA polimerasa y actúe mediante cualquiera de los dos mecanismos anteriores. Un mecanismo de activación alternativo sería similar al que se ha propuesto para el regulador PobR, según el cual, la unión de *p*-

hidroxibenzoato al complejo PobR-DNA induce un cambio conformacional que fomenta la unión de la RNA polimerasa a la región intergénica *pobA-pobR* permitiendo la expresión del gen *pobA* (DiMarco y Ornston, 1994).

Mediante el análisis del espectro de CD de MhpR-His se ha estimado que esta proteína contiene un 34-38% de hélice α y entre un 15-17% de lámina β (Fig. 29B). Esta predicción se aproxima a los contenidos de hélice α y de lámina β que presenta la estructura tridimensional del posible regulador transcripcional RHA06195 de *Rhodococcus* sp. Rha1 (código PDB: 2IA2; contenido estructura secundaria: 46% hélice α y 20% de lámina β) que se ha utilizado en esta tesis como *molde* para realizar el modelado de MhpR (véase más adelante). Además, este contenido es similar al que poseen las otras tres proteínas de la familia IclR de las que se conoce su estructura completa (códigos PDB: 2O0Y, 2G7U y 1MKM), lo que sugiere que la composición de la estructura secundaria está muy conservada entre los miembros de esta familia. En este sentido, se ha observado que los perfiles de CD en el UV lejano de otras proteínas de la familia tales como IclR de *E. coli* (Donald *et al.*, 1996) y TtgV de *P. putida* (Guazzaroni *et al.*, 2007a) son muy similares al que presenta MhpR-His (Fig. 29A). Este patrón común se caracteriza por tener la forma típica del espectro que presentan proteínas con un alto contenido en hélice α presentando dos bandas negativas, con mínimos característicos alrededor de 222 nm y 208 nm, y una banda positiva con un máximo cercano a 190 nm (Woody, 1995; Kelly y Price, 2000).

La caracterización de la proteína MhpR-His se completó mediante estudios de ultracentrifugación analítica. Los análisis de velocidad de sedimentación realizados con la proteína MhpR-His revelaron que tanto en ausencia como en presencia de 3HPP la proteína forma una única especie molecular con un coeficiente de sedimentación de 4,25 S, compatible con una estructura dimérica. Este resultado se ha visto ratificado cuando se obtuvo la estructura tridimensional de MhpR-His a baja resolución mediante SAXS, ya que la estructura que mejor encajó dentro de la envoltura calculada para la proteína fue la de un dímero (Fig. 23). Otros miembros de la familia IclR también son dímeros en solución, como son KdgR y Pir de *Erwinia caryophylli* (Nasser *et al.*, 1992, Nomura *et al.*, 1998), PcaR de *P. putida* (Guo y Houghton, 1999), PcaU de *Acinetobacter* sp. ADP1 (Popp *et al.*, 2002) y TM-IclR de *T. maritima* (Zhang *et al.*, 2002). Por el contrario, otras proteínas como el regulador TtgV de *P. putida* es un tetrámero en solución (Guazzaroni *et al.*, 2007b), IclR de *E. coli* forma dímeros o

tetrámeros (Lorca *et al.*, 2007) y AllR de *E. coli* puede encontrarse como monómero, dímero o tetrámero (Walker *et al.*, 2006).

Por otro lado, hemos demostrado que el coeficiente de sedimentación del activador MhpR-His no cambia en presencia del inductor 3HPP. En este sentido se sabe que la unión del efector de los diferentes reguladores IclR puede provocar diferentes efectos en el regulador. Por ejemplo, cuando se unen al DNA los activadores PobR y PcaU de *Acinetobacter* sp. ADP1, CatR de *R. opacus* 1CP y PcaR de *P. putida* PRS2000 su estado de asociación es el mismo en presencia o ausencia de efector (DiMarco y Ornston, 1994; Gerischer *et al.*, 1998; Eulberg y Schlömann, 1998; Guo y Houghton, 1999). Aunque no se dispone de información sobre el estado de asociación de estos activadores en presencia de su correspondiente efector en ausencia de DNA sí que se ha determinado que el estado de asociación de algunos represores como son AllR e IclR de *E. coli* cambia en presencia de su efector (Walker *et al.*, 2006; Lorca *et al.*, 2007). En el caso del represor TtgV (Guazzaroni *et al.*, 2007b), en ausencia de efector se ha comprobado que se une a su promotor en forma de tetrámero y la unión del efector no altera dicho estado de asociación, pero sí facilita la disociación del complejo DNA-represor permitiendo que la RNA polimerasa dispare la expresión génica. Para el regulador TM-IclR se ha postulado que la unión del efector podría producir un cambio conformacional en el dominio de unión a DNA que desencadenaría la disociación del tetrámero (forma unida a DNA) en dímeros, permitiendo que la RNA polimerasa lleve a cabo la transcripción (Zhang *et al.*, 2002).

Los datos presentados en el apartado 1.4 de Resultados sugieren que MhpR-His se une a su región operadora con una estequiometría de unión 1:4 (DNA:proteína), lo que podría indicar que en esas condiciones el regulador podría estar en forma de tetrámero. Igualmente, se ha demostrado que las proteínas IclR (Donald *et al.*, 2001; Yamamoto e Ishihama, 2003), AllR (Donald *et al.*, 2001) y TtgV (Guazzaroni *et al.*, 2007b) se unen a sus correspondientes operadores en forma de tetrámero. Este mismo comportamiento se ha postulado para el regulador TM-IclR (Zhang *et al.*, 2002). Sin embargo, los reguladores PcaR y KdgR se unen al DNA en forma de dímero o de tetrámero dependiendo de la secuencia operadora que reconozcan (Nasser *et al.*, 1994; Guo y Houghton 1999). En este sentido, la secuencia operadora de MhpR se corresponde con un motivo palindrómico imperfecto de 17 pb, GGTGCACCTGGTGCACA, que consta de dos mitades de 8 pb cada una (Torres *et al.*, 2003). De forma similar, la mayoría de regiones identificadas experimentalmente para

reguladores de la familia IclR contienen secuencias palindrómicas o pseudo-palindrómicas (Gerischer *et al.*, 1998; Nasser *et al.*, 1994; Pan *et al.*, 1996), lo que es un reflejo o consecuencia de la naturaleza simétrica de la unión de estos reguladores al DNA.

2. Modelo de la estructura tridimensional de MhpR.

Como ya se ha mencionado la proteína MhpR presenta una identidad de secuencia moderada con proteínas pertenecientes a la familia IclR de estructura conocida, tales como el posible regulador transcripcional RHA06195 de *Rhodococcus* sp. Rha1 (29%; código PDB: 2IA2), el posible regulador de la ruta de degradación del catecol de *Rhodococcus* sp. Rha1 (24%; código PDB: 2G7U) y la proteína TM-IclR de *T. maritima* (22%; código PDB: 1 MKM). De estas tres proteínas, sólo se ha estudiado en detalle la estructura de TM-IclR (Zhang *et al.*, 2002). Una vez identificada la proteína de estructura conocida con la que comparte mayor identidad de secuencia (RHA06195), ésta fue utilizada como *molde* para el modelado de MhpR. Según el modelo resultante, MhpR estaría compuesta por dos dominios N- y C-terminales conectados por una larga hélice α (Fig. 17). Del mismo modo, la proteína TM-IclR presenta un dominio N-terminal que contiene un motivo de tipo HTH alado que, de acuerdo con muchos reguladores transcripcionales que también lo presentan, podría estar implicado en la unión a DNA (Wintjens y Rooman, 1996), y un dominio C-terminal posiblemente implicado en la unión de una molécula pequeña cuya identidad se desconoce (Zhang *et al.*, 2002). En el caso del regulador PobR de *Acinetobacter* sp. ADP1 se sabe que las mutaciones que alteran su unión al DNA están dentro o alrededor del dominio HTH, mientras que las que afectan al reconocimiento del efector se localizan dentro de la región C-terminal (Kok *et al.*, 1998). Además, los dominios C-terminales (desprovistos de la región N-terminal que contiene el motivo HTH) de las proteínas IclR y AllR han sido cristalizados en ambos casos en forma de complejo regulador-efector (Walker *et al.*, 2006; Lorca *et al.*, 2007). Según esta información, parece lógico suponer que el motivo HTH del dominio N-terminal de MhpR podría estar implicado en la unión a DNA mientras que el dominio C-terminal podría estar involucrado en el reconocimiento del efector.

Por otro lado, según el modelo de MhpR, dos monómeros podrían asociarse formando un dímero a través de la región N-terminal y la hélice α que conecta dicha

región con la región C-terminal de cada monómero (Fig. 16). Ya se ha mencionado que varios resultados obtenidos en esta tesis apoyan el hecho de que MhpR pueda constituir un dímero. Sin embargo, no se tienen evidencias de como tiene lugar la interacción entre los dos monómeros de MhpR-His. En el caso de la proteína TM-IclR, que es también un dímero en solución, se sabe a través de la estructura cristalizada de la proteína que el dominio N-terminal y la hélice α conectora de cada monómero interaccionan entre sí formando el dímero (Zhang *et al.*, 2002). Esta misma asociación puede encontrarse en otras proteínas de la familia IclR de las que se dispone de su estructura completa (www.pdb.org), tales como el posible regulador transcripcional Rha1-ro06953 (código PDB: 2O0Y) y el posible regulador de la ruta de degradación de catecol (código PDB: 2G7U), ambos de *Rhodococcus* sp. Rha1.

Asumiendo que la proteína MhpR-His interacciona con la región operadora en forma de tetrámero, en este trabajo se propone que las interacciones que harían posible tal asociación en MhpR tendrían lugar entre los dominios C-terminales de las cuatro cadenas polipeptídicas donde participarían los residuos que constituyen las hebras β S4a y S4b y los *loops* adyacentes (Figs. 18 y 19). En este sentido hay que señalar que las asociaciones que tienen lugar entre los dominios C-terminales de las proteínas TM-IclR, IclR y AllR son similares entre sí (Lorca *et al.*, 2007) y equivalentes a las que postulamos para MhpR.

Por otro lado, el modelo propuesto para MhpR (en forma de dímero) es asimétrico ya que las regiones C-terminales no presentan simetría bilateral. Esta asimetría la comparte MhpR con las demás proteínas de la familia IclR cuyas secuencias completas han sido cristalizadas, si bien dicha característica sólo ha sido analizada en detalle en el caso de TM-IclR. Así, en esta proteína, las regiones que conectan el dominio de unión a DNA con el dominio de reconocimiento del efector adoptan dos conformaciones diferentes en los dos monómeros, lo que conlleva a dos orientaciones diferentes de los dominios de unión de ligando con respecto al dímero HTH. Este fenómeno se debe a que los ángulos de torsión de dos aminoácidos localizados en esa región de conexión son diferentes en los dos monómeros que forman el dímero (Zhang *et al.*, 2002).

Del estudio de la arquitectura del dominio C-terminal de MhpR (Fig. 20A) se deduce que ésta es muy similar a la que presentan otros reguladores IclR que han sido caracterizados estructuralmente. En los últimos años se ha reconocido que el plegamiento de los dominios C-terminales de AllR (código PDB: 1TF1) e IclR (código

PDB: 1TD5), ambas de *E. coli*, es muy similar al del dominio C-terminal de TM-IclR. Así, la estructura del dominio C-terminal de la proteína TM-IclR puede superponerse con la de C-AllR (Walker *et al.*, 2006) y la estructura de ésta última, a su vez, puede superponerse con la de C-IclR (Lorca *et al.*, 2007). Además, mediante un análisis *in silico* de la estructura del dominio C-terminal que poseen los otros cinco reguladores IclR de estructura conocida, inclusive la del posible regulador transcripcional RHA06195 de *Rhodococcus* sp. Rha1 que ha servido como *molde* para el modelado de MhpR, se ha comprobado que presentan el mismo patrón de las proteínas caracterizadas (datos no mostrados). Este patrón común consiste en un dominio α/β que contiene en el centro una lámina β , formada por 6 hebras antiparalelas, rodeada por un lado, por dos hélices α largas (H5 y H9) y por el otro lado, por tres hélices α más cortas (H6-H8). La lámina β estaría fuertemente curvada y la hélice α (H6) más corta se encajaría dentro de la estructura *half-barrel* (Zhang *et al.*, 2002; Walker *et al.*, 2006; Lorca *et al.*, 2007).

Por otro lado, hemos modelado la cavidad donde presuntamente MhpR aloja el efector (Fig. 20) y para ello fue necesario un estudio previo de la cavidad donde IclR de *E. coli* aloja el efector dado que esta proteína, a diferencia del *molde* de MhpR, fue co-cristalizada junto con su efector (Lorca *et al.*, 2007). En ese estudio se detectó dentro de la cavidad del dominio C-terminal de IclR una gran cantidad de aminoácidos polares expuestos. Del mismo modo, en el dominio C-terminal de MhpR se identificaron en la misma posición aminoácidos del mismo carácter. Así, en MhpR los residuos que presuntamente interaccionarían con el efector, serían: Asp-109, Val-110, Ser-111, Met-118, Val-120, His-133, Ala-135, Leu-141, Thr-146, Ser-148, Arg-202, Gln-206, Ser-212, Asn-228 y Val-230. En la proteína MhpR de *K. pneumoniae* todos estos aminoácidos excepto Val-110 y Ser-111, están presentes en igual posición. En la proteína MhpR de *C. testosteroni* no están presentes los dos residuos anteriores, así como tampoco Ala-135, Ser-148, Arg-202 y Ser-212. Los residuos Leu-141, Thr-146 y Asn-228 están presentes en igual posición en las proteínas PcaU y PobR de *Acinetobacter* sp. ADP1 y en las proteínas PcaR de *R. opacus* y *P. putida*. Además, el residuo Val-110 está presente en PcaR de *R. opacus* y PcaU de *Acinetobacter*, el residuo Ser-111 en PcaR de *R. opacus* y el residuo Ser-212 en las proteínas PcaR de *R. opacus* y *P. putida*. Esta coincidencia puede ser explicada dada la similitud estructural existente entre los inductores 3HPP o 3HCI de MhpR y el inductor de PobR de *Acinetobacter* sp. ADP1 (*p*-hidroxibenzoato) y, de forma semejante, entre los inductores

DHPP o DHCI de MhpR y el inductor de PcaU de *Acinetobacter* sp. ADP1 (protocatecuato) (DiMarco, *et al.*, 1993; Popp *et al.*, 2002; Nichols y Harwood, 1997).

3. Estudio del efecto sinérgico del PP.

Los resultados presentados demuestran que aunque el PP no es un inductor de MhpR, produce *in vivo* un efecto sinérgico en la activación transcripcional en presencia de 3HPP. Además, este efecto depende de la concentración de PP produciéndose la máxima activación a 750 μ M en las condiciones ensayadas (Fig. 41B). Una respuesta sinérgica similar, pero no idéntica, se ha descrito en el caso del regulador BenM (familia LysR) de *Acinetobacter* sp. ADP1 que responde a dos metabolitos, benzoato y *cis, cis*-muconato. En este caso, ambos efectores son verdaderos inductores siendo el *cis, cis*-muconato más efectivo que el benzoato como co-activador. La estructura del dominio de unión del efector de BenM reveló la existencia de dos sitios de unión del efector (Bundy *et al.*, 2002; Ezezika *et al.*, 2007). Por otro lado, también el regulador IclR de *E. coli* es capaz de unir dos metabolitos diferentes, glioxilato y piruvato, mostrando un efecto antagonista. El glioxilato impide la formación del complejo IclR/operador favoreciendo el estado dimérico de la proteína mientras que el piruvato favorece la unión de IclR a su operador estabilizando la forma activa (tetramero) de la proteína. La estructura cristalizada de este regulador transcripcional confirmó la unión de ambas moléculas en un único sitio de reconocimiento del efector (Lorca *et al.*, 2007).

Nuestros datos demuestran que dos compuestos que son metabolizados por diferentes rutas de degradación, 3HPP y PP, actúan sinérgicamente para activar la expresión de los genes del operón *mhp* a través de MhpR. Mediante EMSA se ha confirmado que MhpR-His se une al DNA más eficientemente cuando los compuestos 3HPP y PP están presentes en el ensayo, siendo la Kd 0,7 nM en comparación con 1,5 nM y 2,0 nM cuando cada uno de los compuestos se presentan por separado, respectivamente (Fig. 42). Los ensayos de transcripción *in vitro* han demostrado que el nivel de transcripción mediado por MhpR fue mayor en respuesta a ambos compuestos que en presencia de cada compuesto por separado. Además, esta respuesta sinérgica fue más eficiente cuando se utilizó DHPP, en lugar de 3HPP, como inductor (Fig. 44) sugiriendo que en condiciones fisiológicas el efecto sinérgico del PP sobre la transcripción sea más eficiente a medida que se produce el DHPP.

En esta tesis se han estudiado las interacciones de MhpR-His con los compuestos 3HPP y PP mediante CD en el UV lejano y los datos obtenidos han sido analizados mediante diversos programas informáticos de predicción de estructura secundaria. Según los resultados obtenidos, la estructura secundaria de MhpR se modificaría ligeramente (entre 1,0-5,6%, según el tipo de elemento de estructura secundaria) en presencia de PP, 3HPP o ambos. Por el contrario resulta interesante constatar que cuando mediante esta misma técnica se determinó el contenido de estructura secundaria de TtgV se observó que no variaba en presencia o ausencia de 1-naftol (Guazzaroni *et al.*, 2007a). Además, hay que señalar que la estructura (secundaria y terciaria) del dominio C-terminal de IclR (código PDB: 1TD5) o la del complejo que forma este dominio con el piruvato (código PDB: 2O9A) o con el glioxilato (código PDB: 2O99) son muy similares entre sí (Lorca *et al.*, 2007). Igualmente, la estructura (secundaria y terciaria) del dominio C-terminal de AllR sin ligando unido (código PDB: 1TF1) coincide prácticamente con la estructura del complejo que constituye con el glioxilato (código PDB: 1T9L) (Walker *et al.*, 2006), sugiriendo que, a diferencia de lo que se observa en MhpR, la unión del efector en los reguladores IclR no produce ningún cambio en sus estructuras secundaria y terciaria.

Se ha descrito que pequeños ligandos pueden alterar la termoestabilidad de una proteína induciendo cambios estructurales (Brandts y Lin, 1990, Weber *et al.*, 1995, Gloss y Matthews, 1997). Por ello se estudió mediante CD si la interacción de MhpR con sus efectores producía cambios en la termoestabilidad de la proteína. Así se determinó que la T_m de esta proteína (47,1 °C) aumenta 5,4 °C y 6,6 °C en presencia de PP y 3HPP, respectivamente. La presencia de ambos compuestos produjo un leve incremento del valor de la T_m de 0,4 °C. Un efecto termoestabilizante similar, en este caso causado por el glioxilato, se ha descrito para otros reguladores IclR, tales como C-AllR y C-IclR (Lorca *et al.*, 2007). En estos casos el incremento de la T_m fue mayor, siendo de 11,1 °C para C-IclR y de 9,9 °C para C-AllR. Aunque en ambos casos los valores de T_m se determinaron mediante *static light scattering*, el incremento de la T_m de C-IclR en presencia del glioxilato fue confirmado mediante CD (Lorca *et al.*, 2007).

Dado que los cambios en la estructura de MhpR observados mediante CD en presencia de 3HPP y PP eran muy pequeños, se decidió analizar los posibles cambios conformacionales mediante la técnica de espectroscopía de emisión de fluorescencia con la que pueden detectarse cambios en el entorno de los fluoróforos intrínsecos de la proteína, como consecuencia de la interacción proteína-ligando. Cuando esta técnica se

utilizó para estudiar la interacción entre MhpR-His y cada uno de los ligandos (3HPP, DHPP y PP) se detectó que cualquiera de ellos y de forma específica, produce una reducción de la emisión de fluorescencia de la proteína (efecto *quenching*) dependiente de la concentración de ligando. Estos ensayos permitieron la determinación de las constantes de asociación para cada ligando, siendo: $K_b(3HPP) = (3,4 \pm 0,9) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$; $K_b(DHPP) = (4,2 \pm 0,6) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ y $K_b(PP) = (3,0 \pm 1,1) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. De acuerdo con el modelo tridimensional propuesto de MhpR, no existiría ninguna interacción directa triptófano-ligando en ninguno de los monómeros de MhpR. Los cuatro triptófanos se situarían alrededor del sitio de unión de ligando (Fig. 25B). Los residuos Trp-152 y Trp-204 estarían más cercanos al ligando y Trp-88 y Trp-106, un poco más alejados. Ninguno de los triptófanos quedaría completamente oculto en el modelo. Teóricamente, el residuo Trp-88, a pesar de que está relativamente alejado del sitio de unión, podría ser el triptófano más susceptible de sufrir *quenching* por estar situado en la región conectora. El cambio conformacional producido por la unión del ligando generalmente involucra a la región conectora que presentan este tipo de proteínas. Este efecto de *quenching* de la fluorescencia del triptófano producido por la unión proteína-ligando se ha observado en la unión de benzoato y *cis*, *cis*-muconato al activador transcripcional BenM (Clark *et al.*, 2004), la unión de molibdato al activador transcripcional ModE (Boxer *et al.*, 2004), la unión de cloroformo a BSA (Johanson, 1997) y la unión de gatifloxacina a BSA (Guo *et al.*, 2004). Por tanto, de estos estudios de espectroscopía de fluorescencia se concluye que la interacción entre MhpR-His y sus efectores, altera el entorno de algún triptófano de la proteína. Además, esta técnica nos ha permitido analizar el efecto de la adición simultánea de los compuestos 3HPP o DHPP junto con PP sobre la fluorescencia de MhpR-His (Figs. 48A y 48B). El resultado de este análisis sugiere que el *quenching* de la fluorescencia podría ser producto del efecto que ejercen ambos compuestos sobre uno o varios triptófanos de la proteína. En este sentido, los resultados que se muestran en la Fig. 48C ponen de manifiesto que la proteína MhpR-His podría interaccionar simultáneamente con el verdadero inductor (3HPP o DHPP) y con el compuesto no inductor (PP). Curiosamente, en el dímero TM-IclR, debido a la diferente orientación de los dominios de unión de ligando, los dos sitios de unión de ligando, cuya identidad se desconoce, son ligeramente diferentes en tamaño, forma, y localización relativa a los dominios de unión a DNA (Zhang *et al.*, 2002). En el caso del regulador IclR de *E. coli* se ha demostrado que el glioxilato y el piruvato se unen en el mismo sitio de unión aunque con diferente afinidad (Lorca *et al.*, 2007). Sin embargo,

en el caso del regulador TtgV, que puede reconocer una gran variedad de compuestos químicos de estructura diferente, no existen evidencias de la unión simultánea de diferentes efectores a la proteína (Guazzaroni *et al.*, 2005).

A partir del conjunto de estudios llevados a cabo *in vitro* se puede concluir que la proteína MhpR-His es responsable de la respuesta a los dos compuestos y que la unión simultánea de PP y 3HPP puede alterar la conformación de MhpR-His de manera que cambie significativamente la interacción regulador-DNA-RNA polimerasa y se induzca la transcripción a partir del promotor *Pa*. Por tanto, se asume que en presencia de ambos compuestos el regulador MhpR adquiere una conformación que favorece un nivel mayor de transcripción que cuando se encuentra únicamente unido el 3HPP.

Para explicar el papel del PP como efector sinérgico de MhpR se ha de tener en cuenta la convergencia existente entre las rutas de degradación de PP y 3HPP. Como se muestra en la Fig. 6, las células necesitan activar la ruta *mhp* para catabolizar el PP, una vez que se sintetiza el DHPP. Sin embargo, dado que el DHPP como otros catecoles es un compuesto altamente tóxico para las células y éstas deben de degradarlo tan pronto como sea posible, el efecto sinérgico que ejercen el PP y el DHPP favorecería una síntesis rápida de la dioxigenasa MhpB en presencia de muy bajas concentraciones de DHPP. De esta manera el DHPP no se acumularía nunca en grandes cantidades en el interior de la célula con lo que se reduciría su efecto tóxico.

4. Análisis de la regulación global del *cluster mhp*.

En este apartado se discute por separado el papel de CRP en la regulación de la expresión de los promotores *Pa* y *Pr* del *cluster mhp*.

4.1. Estudio del papel de CRP en la transcripción de *Pa*.

Torres y colaboradores (2003) demostraron mediante ensayos *in vivo* que el promotor *Pa* del *cluster mhp* está sometido a represión catabólica por glucosa y que la proteína CRP es la responsable de dicho efecto. También, mediante ensayos de retardo en gel demostraron que la unión del activador específico MhpR es esencial para la unión del segundo activador, CRP, al promotor *Pa*. Dada la activación sinérgica del promotor *Pa* por las proteínas MhpR y CRP, este promotor fue clasificado dentro de la clase III de promotores dependientes de CRP (Busby y Ebright, 1999, Torres *et al.*, 2003). El

activador MhpR es el primer miembro de la familia IclR que es indispensable para el reclutamiento de CRP a su secuencia promotora.

En esta tesis se ha demostrado mediante RT-PCR, *primer extension* y transcripción *in vitro* que el efecto de CRP en la activación de *Pa* tiene lugar a nivel transcripcional. Especialmente, los ensayos de transcripción *in vitro* han demostrado que, si bien para la activación de *Pa* es absolutamente necesaria la presencia del regulador específico MhpR y de su inductor, el regulador global CRP aumenta aún más dicho nivel de activación. De forma similar, CRP interacciona con el promotor *melAB* de *E. coli* (promotor clase III) e induce aún más la activación de la transcripción dependiente del complejo MelR-melobiosa, siendo CRP también en este caso incapaz de unirse a dicho promotor a no ser que la proteína MelR esté presente (Belyaeva *et al.*, 2000; Wade *et al.*, 2001). Otro mecanismo por el cual CRP puede activar la transcripción de promotores de clase III implica un efecto de *DNA bending*, como sucede en el promotor *MalKp* de *E. coli* donde se requiere la presencia de CRP y MalT para conseguir la máxima activación de la transcripción (Chapon, 1982). La unión de CRP curva el DNA y provoca que la posición de MalT cambie para que pueda activar la transcripción (Richet y Soogard-Andersen, 1994).

4.2. Estudio del papel de CRP en la transcripción de *Pr*.

Como se ha mencionado en la Introducción, el regulador MhpR no reprime su propia expresión (Torres *et al.*, 2003). En este trabajo se ha analizado si la expresión del gen regulador *mhpR* está sujeta a represión catabólica como lo están los genes *mhp* catabólicos. Los resultados obtenidos mediante los ensayos de actividad β -galactosidasa, RT-PCR y *primer-extension* revelaron que la expresión de la fusión *Pr-lacZ* está sujeta a represión catabólica por glucosa mediada por CRP. La expresión de otros reguladores de la familia IclR, como el activador transcripcional RexZ de *E. carotovora* (Tabla 3), está también controlada por el complejo cAMP-CRP. En este caso, la secuencia reconocida por CRP está centrada en la posición -41,5 con respecto al posible sitio de inicio de la transcripción del gen *rexZ* (Thomson *et al.*, 1999). Un caso diferente es la expresión del represor YiaJ de *E. coli* (Tabla 3), homólogo a TM-IclR de *T. maritima*. En ausencia de glucosa, el complejo cAMP-CRP impide la expresión del regulador YiaJ mientras que induce la expresión de los genes catabólicos YiaK-S (Ibañez *et al.*, 2000). De forma similar a *Pr*, otros promotores que dirigen la expresión

de activadores de rutas catabólicas, pertenecientes a otras familias de reguladores, están controlados por el regulador global CRP. Algunos ejemplos son: el promotor del gen *melR* de *E. coli* (Webster *et al.*, 1988), el promotor del gen *hcaR* de *E. coli* (Turlin, *et al.*, 2001), el promotor del gen *prpR* de *Salmonella enterica* y *E. coli* (Lee *et al.*, 2005) el promotor del gen *dcuR* de *E. coli* (Oyamada *et al.*, 2007) y el promotor del gen *rosR* de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (Janczarek y Skorupska, 2007).

Mediante ensayos de retardo en gel se ha confirmado la unión, aunque débil, del complejo cAMP-CRP al promotor *Pr* (Fig. 37A). Además, se ha identificado un sitio de unión para CRP centrado en la posición -40,5 respecto al sitio de iniciación de la transcripción del promotor *Pr*. Esta localización se diferencia en 1 nucleótido de la posición óptima (-41,5) que ocupa CRP en un promotor dependiente de CRP de clase II (Busby y Ebright, 1999). El sitio de unión de CRP en *Pr* difiere en 9 nucleótidos (3 de ellos de los más conservados y 6 de ellos de los menos conservados) de los 22 que componen la secuencia consenso (Fig. 37C). Por este motivo los ensayos de retardo en gel revelaron que si bien CRP reconoce a *Pr*, lo hace con baja afinidad. Además, según los ensayos de *footprinting* con DNaseI llevados a cabo con el promotor *Pr*, CRP no produce una huella perfectamente definida en esa zona sino bandas de hipersensibilidad indicadoras, al menos, de un cambio en la topología en esa zona concreta del DNA debido a la unión de CRP (Figs. 37A y 37B). De forma similar, el promotor *galPI* del operón *gal*, uno de los promotores dependientes de CRP de clase II mejor estudiado (Gaston *et al.*, 1990), contiene un sitio de unión de CRP que se diferencia en 8 nucleótidos (3 de ellos de los más conservados y 5 de los menos conservados) de la secuencia consenso (Fig. 37C). Diversos estudios han demostrado que la afinidad de la unión de CRP por la secuencia que es capaz de reconocer en *galPI* está relacionada con la desviación de la secuencia nucleotídica de la secuencia consenso (Kolb *et al.*, 1983, Jansen *et al.*, 1987; Gaston *et al.*, 1988). Además, según estudios realizados por Gaston y colaboradores (1988 y 1989) con el promotor *galPI*, cuando se introducen cambios en los nucleótidos menos conservados en la secuencia consenso de reconocimiento de CRP, los complejos CRP-DNA se disocian más rápidamente. Así también, demostraron la existencia de una correlación inversa entre la estabilidad *in vitro* de los complejos CRP-DNA y la represión por glucosa de la expresión dependiente de estos sitios *in vivo* (Gaston *et al.*, 1988 y 1989). Estos datos sugieren que, de forma similar a como sucede en el promotor *galPI*, pese a la existencia en *Pr* de una secuencia que es reconocida por CRP con baja afinidad, este reconocimiento es el responsable de la inducción de la

transcripción a partir de *Pr* cuando no existe glucosa en el medio. Los resultados obtenidos en el ensayo de *footprinting* con permanganato potásico demuestran que la proteína CRP induce la formación del complejo abierto en el promotor *Pr*.

Por otro lado, los resultados obtenidos en los ensayos de transcripción *in vitro* que se muestran en la figura 39 reflejan el efecto activador de CRP en la transcripción de *Pr*. Diversos estudios han corroborado que CRP estimula la unión de la RNA polimerasa así como la formación del complejo abierto en los promotores *galP1* y *lacP1* (promotor del operón *lac*) de *E. coli* (Herbert *et al.*, 1986; Straney *et al.*, 1989; Lavigne *et al.*, 1992; Choy y Adhya, 1993; Tagami y Aiba, 1995; Liu *et al.*, 2003 y 2004). También, la iniciación de la transcripción del gen regulador *melR* (familia AraC de reguladores transcripcionales) de *E. coli* es CRP-dependiente (Belyaeva *et al.*, 2000).

5. Modelo de regulación de los genes *mhp* de *E. coli* K-12.

Los promotores *Pa* y *Pr* del *cluster mhp* son promotores divergentes (transcriben genes adyacentes en direcciones opuestas) del subtipo *face-to-face* (Beck y Warren, 1988; Yamada *et al.*, 2003) que generan transcritos que solapan parcialmente por sus extremos 5' (Fig. 70). Los transcritos desde *Pa* y *Pr* solapan en 18 nucleótidos, en su mayoría adenina y uridina, y este hecho, muy posiblemente, constituye un mecanismo de regulación adicional del sistema que controla la expresión de los genes *mhp*.

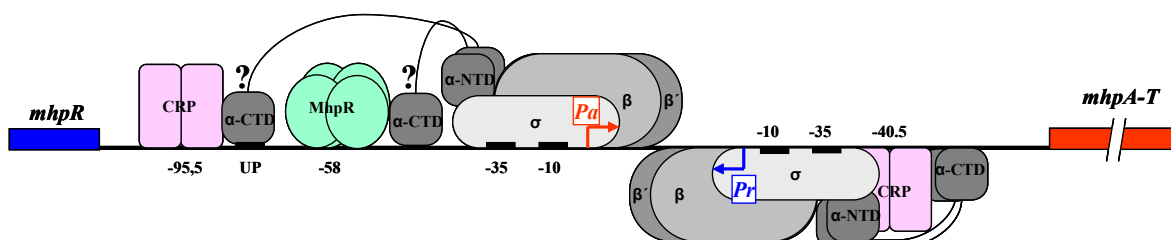
Al principio de esta tesis, ya se conocía que la proteína MhpR centrada en la posición -58 con respecto al sitio de inicio de la transcripción de *Pa* (Fig. 70) activa la transcripción del promotor *Pa* (Torres *et al.*, 2003). Desde esta posición el complejo MhpR-inductor podría contactar con el dominio C-terminal de la subunidad α (α -CTD) de la RNA polimerasa (Fig. 70A) y favorecer la formación del complejo cerrado RNA polimerasa-promotor y/o su isomerización a complejo abierto. Además, la activación del promotor *Pa* es máxima si además del complejo MhpR-inductor se encuentra presente el complejo cAMP-CRP, el cual, requiere de la presencia previa de la proteína MhpR para unirse a *Pa*, posiblemente en un sitio de unión de baja afinidad centrado en la posición -95,5 (Fig. 70) (Torres *et al.*, 2003). Entre el operador de MhpR y el posible sitio de unión de CRP existe una posible secuencia UP (Fig. 70) que podría ser reconocida por el dominio α -CTD de la RNA polimerasa (Fig. 70A). La proximidad entre el elemento UP y el posible sitio de unión de CRP nos lleva a pensar que el

activador global podría interactuar con el dominio α -CTD y favorecer así la formación de complejo cerrado RNA polimerasa-promotor *Pa*. Se ha descrito que la activación sinérgica de promotores dependientes de CRP de clase III (con dos sitios de reconocimiento de CRP centrados en las posiciones -61,5 y -91,5) requiere de la interacción directa entre ambos dímeros de CRP y los dos dominios α -CTD de la RNA polimerasa (Joung *et al.*, 1993; Lloyd *et al.*, 2002; Beatty *et al.*, 2003). Por tanto, en el promotor *Pa*, MhpR y CRP podrían interactuar cada una con un dominio α -CTD de la RNA polimerasa.

En este trabajo se ha demostrado que CRP reconoce una secuencia centrada en la posición -40,5 con respecto al sitio de iniciación de la transcripción de *Pr* (Fig. 37) y favorece la formación del complejo abierto (Fig. 38). Como se ha descrito en otros promotores de clase II, CRP interactúa íntimamente con los dominios α -CTD y α -NTD de la RNA polimerasa. Por un lado, la interacción entre el dominio α -CTD y CRP favorece la unión de α -CTD a una secuencia de DNA adyacente a CRP y, por tanto, la formación de complejo cerrado RNA polimerasa-promotor. Por otro lado, la interacción entre el dominio α -NTD y CRP favorece la isomerización del complejo cerrado RNA polimerasa-promotor a complejo abierto (Busby y Ebright, 1999). En la figura 70A se ha representado cómo podría ser la disposición del complejo CRP-RNA polimerasa dentro del promotor *Pr* en base a la estructura de un promotor típico de clase II dependiente de CRP.

El modelo de regulación de los promotores divergentes *Pa* y *Pr* se resume en la figura 71. Cuando la glucosa está presente en el medio de cultivo existe un mecanismo de represión catabólica muy estricto dependiente de cAMP-CRP. En esta situación la RNA polimerasa se uniría a ambos promotores pero no sería capaz de iniciar la transcripción de los genes del *cluster mhp* (Fig. 71A). Cuando no existe glucosa disponible en el medio, el nivel intracelular de cAMP aumenta y la formación del complejo cAMP-CRP induce la transcripción a partir de *Pr*. Además, si en esta situación se detecta 3HPP, CRP junto con el complejo MhpR-3HPP, activan la expresión del promotor *Pa* (Fig. 71B).

A



B

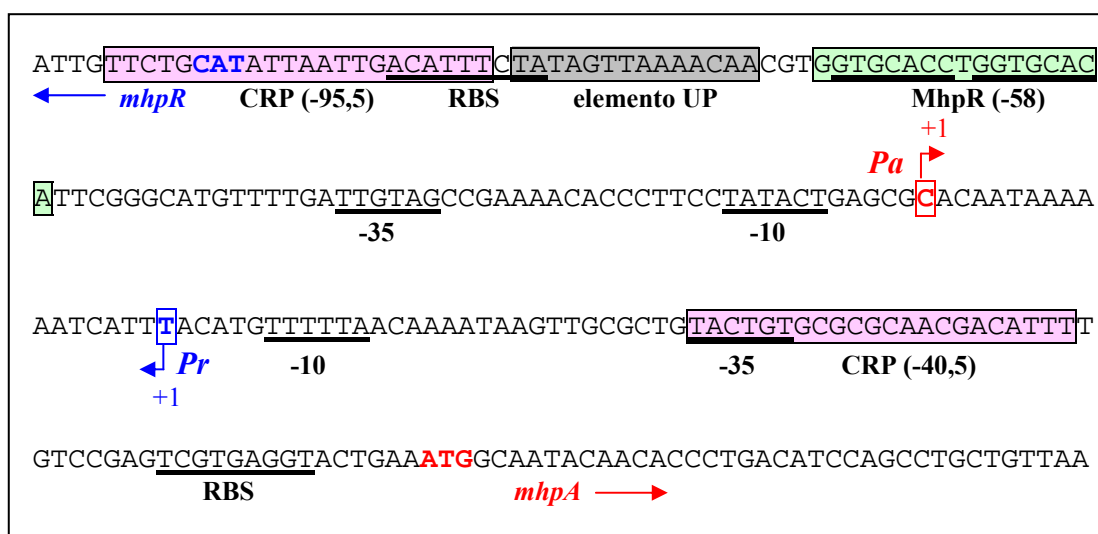


Figura 70. A) Esquema de la región promotora Pa-Pr del cluster mhp y de los elementos que participan en su regulación. Se representan el gen regulador *mhpR* (caja azul) y los genes *mhpA-T* (caja roja). Las flechas curvadas representan las posiciones +1 de los promotores *Pa* y *Pr*. Se indican las posiciones -10 y -35 de los promotores *Pa* y *Pr*, y el posible elemento UP del promotor *Pa*. Se representan las distintas subunidades que forman la RNA polimerasa ($\alpha_2\beta\beta'\sigma$) en diferentes tonos grises. En el promotor *Pa* se representa la proteína MhpR (tetrámero de color verde) centrada en la posición -58 y la proteína CRP (dímero de color rosa) centrada en la posición -95,5. Se desconoce si los dominios α -CTD de la RNA polimerasa interaccionan con el promotor *Pa* en las posiciones indicadas con signos de interrogación. En el promotor *Pr* se representa la proteína CRP centrada en la posición -40,5. **B) Localización de los elementos reguladores dentro de la secuencia de nucleótidos de la región promotora del cluster mhp.** Las flechas gruesas indican la dirección de la transcripción de los genes *mhpA* y *mhpR*. Se indican con una raya los posibles RBS. Se señalan los codones de iniciación de la traducción del gen *mhpR* (en letra azul) y del gen *mhpA* (en letra roja). Se muestran las posiciones de inicio de la transcripción de los promotores *Pa* (en un recuadro rojo) y *Pr* (en un recuadro azul). Se indican las posiciones -10 y -35 de los promotores *Pa* y *Pr*. Dentro de *Pa* se indica el posible sitio de unión de CRP (recuadro rosa), el operador de MhpR (recuadro verde) y el posible elemento UP (recuadro gris). En el promotor *Pr* se indica en un recuadro rosa el sitio de unión de CRP.

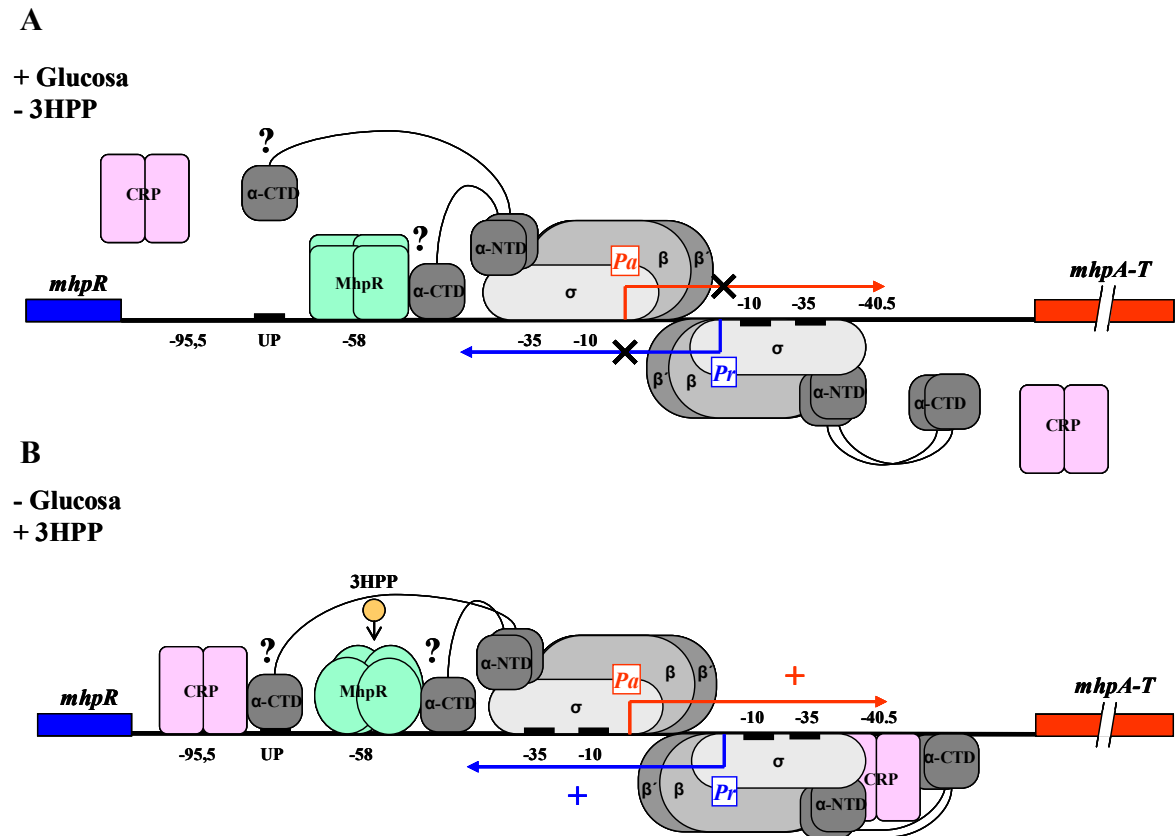


Figura 71. A) Modelo del mecanismo de represión catabólica de los genes *mhp* en presencia de glucosa. B) Modelo del mecanismo de activación transcripcional de los genes *mhp* en presencia de 3HPP. Se representan el gen regulador *mhpR* (caja azul) y los genes *mhpA-T* (caja roja). Las flechas curvadas representan las posiciones +1 de los promotores *Pa* (roja) y *Pr* (azul). Se indican las posiciones de las cajas -10 y -35 de cada promotor y el posible elemento UP dentro del promotor *Pa*. Se representan las distintas subunidades de la RNA polimerasa (en tonos grises) y la proteína CRP (en rosa). La proteína MhpR se muestra de color verde y con dos formas diferentes: una rectilínea (proteína inactiva) y otra curvilínea (proteína activa). Con un círculo naranja se representa la molécula de 3HPP. Se desconoce si los dominios α -CTD de la RNA polimerasa interactúan con el promotor *Pa* en las posiciones indicadas con signos de interrogación. Se indica la ausencia de transcripción con una X y la activación de la transcripción con un signo +.

6. Relaciones estructura-función del regulador MhpR.

Para determinar el papel que juegan en la funcionalidad del regulador MhpR los distintos aminoácidos que configuran su estructura se realizó un experimento de mutagénesis al azar utilizando la técnica de *error-prone* PCR. En este trabajo se ha puesto a punto un sistema de detección de mutantes basado en la fusión traduccional *Pa:lacZ* construida por Torres y colaboradores (2003) que permite determinar mediante un simple análisis colorimétrico aquellos mutantes con pérdida o ganancia de función (Fig. 51). De esta manera se seleccionaron mutaciones introducidas al azar en la

secuencia del gen que codifica la proteína MhpR. Posteriormente, se aislaron y secuenciaron una serie de mutantes de MhpR que presentaban diferentes modificaciones funcionales con respecto a la proteína nativa (Tabla 10). A partir de varios clones que presentaban un fenotipo diferente a la cepa control se realizaron una serie de ensayos preliminares (medición de actividad β -galactosidasa, control del número de copias del plásmido, retransformación de las cepas, determinación de la solubilidad de las proteínas MhpR mutantes) con los que se pudo demostrar que la introducción de estas mutaciones dentro de la proteína MhpR únicamente afectaba a su funcionalidad.

Los ensayos de actividad β -galactosidasa (Figs. 53A y 54A) revelaron que la inducción del promotor *Pa* mediada por las proteínas MhpR portadoras de cualquiera de las mutaciones N23S, T46S, D114N, Q240R, V260A o A264T era mayor que la inducción llevada a cabo por la proteína nativa. Mientras que los aminoácidos afectados Asn-23 y Thr-46 se localizaron en la región N-terminal del modelo, los residuos Asp-114, Gln-240, Val-260 y Ala-264 fueron localizados en la región C-terminal del mismo (Fig. 56). Para facilitar el estudio de estas mutaciones, estas fueron introducidas mediante mutagénesis dirigida en la secuencia del gen *mhpR-His*. Cada una de las proteínas resultantes fueron purificadas de forma equivalente a como se hizo con la proteína MhpR-His original. Los ensayos de retardo en gel llevados a cabo con estas proteínas revelaron que, independientemente de la presencia o ausencia de 3HPP, poseen menor afinidad por su operador que la proteína original. Curiosamente, aunque estas proteínas *in vivo* son capaces de inducir el promotor *Pa* más que la proteína original, estos ensayos indican que reconocen el DNA de forma menos eficiente *in vitro*. Además, con los ensayos de unión a DNA se demuestra que la zona N-terminal de MhpR, donde se ha identificado el motivo HTH de unión a DNA, junto con la región C-terminal, donde posiblemente reside el sitio de unión de efector, participan en la unión al DNA. La causa de que estas proteínas modificadas presenten mayor actividad *in vivo* que la proteína nativa, es de momento desconocida pero quizás podría deberse a una mayor eficiencia en la interacción con el efector o con las proteínas CRP o RNA polimerasa. En el regulador PobR de *Acinetobacter*, todas las mutaciones que modificaron su capacidad de unión al DNA se localizaron en la región que contiene el motivo HTH de unión a DNA, exceptuando una de ellas situada en la región C-terminal (Kok *et al.*, 1998). En el regulador TtgV de *P. putida*, las mutaciones introducidas de forma dirigida en el sitio de unión del efector, localizado en la región C-terminal de la

proteína, afectaron la unión al DNA (Guazzaroni *et al.*, 2007a). Todos estos hechos sugieren que en estas proteínas existe una transmisión interna de la señal a través de la región que conecta el dominio N-terminal con el C-terminal. Esta supuesta transmisión ha sido descrita en otros reguladores transcripcionales como son, TetR (Orth *et al.*, 2000; Scholz *et al.*, 2003), AraC (Soisson *et al.*, 1997; Reed y Schleif, 1999), MeIR (Kahramanoglou *et al.*, 2006), XylS (Ramos *et al.*, 1986; Zhou *et al.*, 1990) y XylR (Salto *et al.*, 1998). En definitiva, las seis proteínas MhpR-His mutantes analizadas *in vitro* no son más efectivas en el reconocimiento del DNA que la proteína original.

Cuando se comparó la capacidad que tienen las proteínas mutantes MhpR-HisQ252R y MhpR-HisV272A, portadoras ambas de una mutación en la región C-terminal, de inducir *in vitro* la transcripción a partir de *Pa* con la que tiene la proteína original, se demostró que ambas proteínas son responsables de una activación 1,5-2,2 veces superior a la que se produce con la proteína nativa (Fig. 58). Además, se analizó el efecto sinérgico del PP sobre la inducción mediada por estos reguladores mutantes en presencia de 3HPP observándose efectos diferentes a los detectados con la proteína nativa. Si bien el PP ejerce un efecto sinérgico en la inducción de la transcripción a partir de *Pa* mediada por la proteína MhpR-His original en presencia de cualquier concentración de 3HPP comprendida entre 1-750 μM , el efecto sinérgico del PP sobre la inducción de MhpR-HisQ252R sólo se observa a partir de una concentración de 3HPP superior a 100 μM (Figs. 58A y 58B) mientras que en el caso de MhpR-HisV272A, sólo se observó en el intervalo comprendido entre 1-50 μM (Figs. 58A y 58C). Además, la tasa de transcripción regulada por MhpR-His en presencia de 3HPP y PP es equivalente a la tasa que se obtiene con cualquiera de las dos proteínas mutantes en presencia de sólo 3HPP, por lo que ambas mutaciones podrían producir un cambio conformacional en la estructura de la proteína similar al que tendría lugar en la proteína original cuando reconoce ambos efectores, 3HPP y PP.

También se analizó *in vitro* el efecto sinérgico de CRP sobre la activación de la transcripción del promotor *Pa* dirigida por las proteínas MhpR-HisQ252R y MhpR-HisV272A. Los resultados mostrados en la figura 59 demostraron que en ausencia de CRP ambas proteínas son capaces de inducir la transcripción desde *Pa* más de lo que lo hace la proteína original, pero en las condiciones ensayadas no se detectó el efecto sinérgico de CRP y esto posiblemente se deba a un enmascaramiento del efecto activador.

Los ensayos de fluorescencia realizados con las proteínas MhpR-HisQ252R y MhpR-HisV272A y los efectores 3HPP, DHPP y PP revelaron que la atenuación de la emisión de fluorescencia de ambas proteínas causada, sobre todo por los inductores (3HPP o DHPP), es mayor a la que se produce en la proteína nativa (Fig. 60). Estos datos sugieren que el entorno de algún triptófano de estas proteínas mutantes se afecta de forma diferente a como sucede en el caso de la proteína MhpR-His nativa. En este trabajo se han determinado las constantes de asociación de las proteínas mutantes por los distintos efectores (Tabla 13). Así, las proteínas MhpR-HisQ252R y MhpR-HisV272A son más afines por el 3HPP y PP que la proteína original y sólo MhpR-HisV272A presenta mayor afinidad por DHPP que la proteína nativa.

Al analizar la predicción de estructura secundaria de las dos proteínas MhpR-His mutantes a partir de los datos obtenidos mediante CD (Fig. 62) se observa que la introducción de cualquiera de las dos mutaciones en la proteína MhpR-His no afecta significativamente el contenido de su correspondiente estructura secundaria. El análisis del efecto de los ligandos 3HPP y PP sobre el contenido de estructura secundaria de las proteínas mutantes (ver apartado 4.9.4 de Resultados), pone de manifiesto que estos efectores afectan levemente dicho contenido como sucede en el caso de la proteína original. Además, cuando se analiza la termoestabilidad de estas proteínas mutantes se observa como los efectos termoestabilizantes del 3HPP y PP son muy similares a los que se detectan con la proteína original (Fig. 63C).

A partir del modelo tridimensional del regulador, ha sido posible postular las posibles modificaciones estructurales que tendrían lugar en MhpR como consecuencia de la introducción de las sustituciones Q240R y V260A. Por un lado, el residuo Gln-240 se encontraría en todas las cadenas polipeptídicas, próximo a dos de las regiones implicadas en la tetramerización de la proteína (residuos Met-232-Met-236 y Trp-204-Lys-209) y alejado de la superficie de dimerización y del sitio de unión del efector (Fig. 72A). El cambio Q240R afectaría a la interacción con el aminoácido Thr-237 de la misma cadena con el que formaría un puente de hidrógeno y el residuo Glu-243 pudiéndose formar una red salina junto con los residuos Glu-239, Glu-243 y Lys-244. Por otro lado, el aminoácido Val-260, sólo en las cadenas A y B, estaría cercano a la superficie de dimerización formada por las regiones *linker* responsables del entrecruzamiento de las dos cadenas que componen el dímero (residuos Leu-72-Asp-85) y los residuos Glu-258, Gly-259, Ser-262, Gln-263 e Ile-265 de la cadena A (en el dímero A-D) o de la cadena B (en el dímero B-C). En la figura 72B se muestra la

posición de los residuos Val-260 y Ala-260 en un dímero tipo A-D. La sustitución V260A podría afectar de manera indirecta a la formación de los dímeros A-D o B-C. Además, cabría la posibilidad de que los residuos Gln-240 y Val-260 estuvieran implicados en la interacción con la RNA polimerasa y así las sustituciones Q240R y V260A podrían repercutir positivamente en la actividad catalítica de esta enzima.

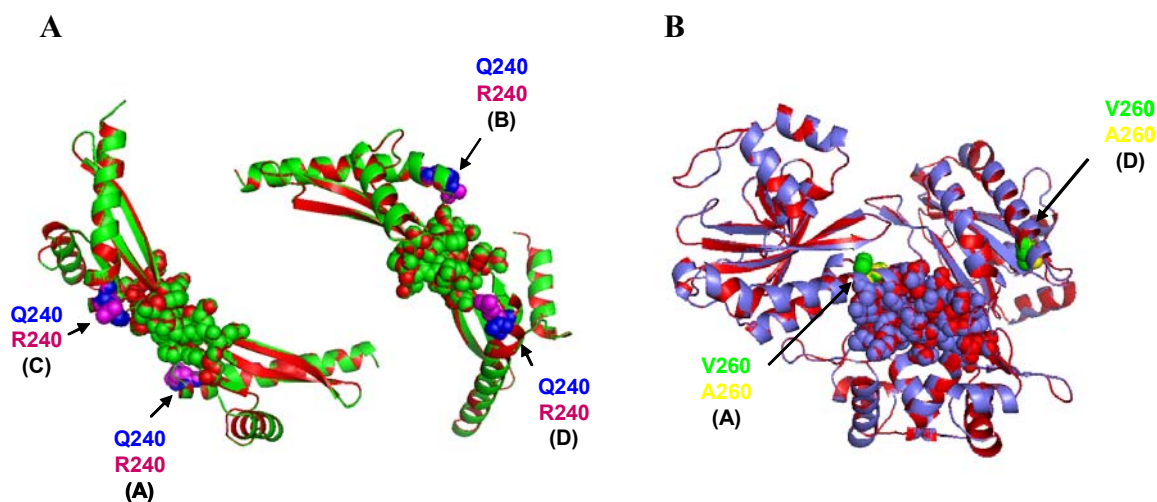


Figura 72. Detalle del cambio conformacional inducido por las sustituciones aminoacídicas Q240R y V260A en la proteína MhpR. **A)** Superposición de los modelos tridimensionales de parte de los dominios C-terminal (residuos L178-I265) de las proteínas MhpR (en rojo) y MhpRQ240R (en verde). En representación de esferas se muestran los residuos Q240 (en azul) y R240 (en magenta) y algunos de los residuos que intervienen en la formación de tetrámeros en ambas proteínas, como son M232-M236 y W204-K209 (todos ellos en color rojo y verde). **B)** Superposición de los modelos tridimensionales de los dímeros tipo A-D formados por las proteínas MhpR (en rojo) y MhpRV260A (en azul). En representación de esferas se muestran los residuos V260 (en verde), A260 (en amarillo) y algunos de los residuos que participan en la formación del dímero, tales como: L72-D85 (región *linker*) de las cadenas A y D y los residuos E258, G259, S262, Q263 e I265, de la cadena A. Entre paréntesis se muestra la cadena A, B, C o D. Las figuras fueron generadas mediante la utilización del programa PyMOL (DeLano, 2002).

De acuerdo con el modelo del regulador MhpR, los aminoácidos Gln-240 y Val-260 posiblemente estén cerca de la parte superficial del mismo (Fig. 72). Por un lado, el residuo Gln-240 es de naturaleza hidrofílica y se encuentra en una posición idéntica en la secuencia de aminoácidos de los reguladores MhpR de *K. pneumoniae* y CatR de *R. opacus*. En otras proteínas de la familia IclR, este residuo es reemplazado por otro del mismo carácter, como glutámico (en MhpR de *C. testosteroni*, PcaR de *P. putida*, KdgR de *E. chrysanthemi* y TM-IclR de *T. maritima*) o aspártico (en PcaR de *R. opacus*, AllR e IclR de *E. coli*). Por otro lado, el residuo Val-260 es de carácter hidrofóbico y se encuentra también en MhpR de *C. testosteroni* y PobR de *Acinetobacter* sp. ADP1. Otro

residuo hidrofóbico ocupa su misma posición en muchos reguladores de la familia, como leucina (en PcaR de *R. opacus* y *P. putida*, PcaU de *Acinetobacter* sp. ADP1, AllR de *E. coli* y TM-IclR de *T. maritima*) o metionina (en MhpR de *K. pneumoniae*, CatR de *R. opacus* y KdgR de *E. chrysanthemi*). En ninguno de estos reguladores se ha descrito la funcionalidad de estos aminoácidos.

7. Estudio de la proteína transportadora MhpT.

La proteína MhpT de *E. coli* pertenece a la familia AAHS (*aromatic acid:H⁺ symporter*) que forma parte de la superfamilia MFS (*Major Facilitator Superfamily*) de proteínas transportadoras (Pao *et al.*, 1998; Saier *et al.*, 1999), donde además se incluyen otras proteínas como son PcaK de *P. putida* (Harwood *et al.*, 1994; Nichols y Harwood, 1997), TfdK de *Ralstonia eutropha* (Leveau *et al.*, 1998), PcaK, BenK, VanK y MucK de *Acinetobacter* sp. ADP1 (Kowalchuk *et al.*, 1994; Collier *et al.*, 1997; Williams y Shaw, 1997, D'Argenio *et al.*, 1999). Al comparar la secuencia de MhpT de *E. coli* con estas proteínas se observa que comparte una mayor similitud con PcaK de *P. putida* (34%) y PcaK de *Acinetobacter* sp. ADP1 (32%) implicadas ambas en el transporte de 4-hidroxibenzoato (Kowalchuk *et al.*, 1994; Harwood *et al.*, 1994; Nichols y Harwood, 1997). Cuando se compara MhpT con otros presuntos transportadores de 3HPP tales como HppK de *R. globerulus* PWD1 (Barnes *et al.*, 1997) y MhpT de *K. pneumoniae* 342, o con el posible transportador de 2HPP, OhpA, de *Rhodococcus* sp. V49 (Powell y Archer, 1998) se observa que mientras MhpT (83%) y HppK (26,4% identidad) también pertenecen a la familia de transportadores AAHS, OhpA (21,8% identidad) no muestra similitud significativa con los miembros de dicha familia. A diferencia de lo que ocurre en estos organismos gram-positivos en donde el gen que codifica el presunto transportador está integrado dentro del correspondiente *cluster* génico (Fig. 73), en *E. coli* el gen *mhpT* está flanqueado y separado del resto de los genes *mhp* por dos secuencias BIME (Fig. 4) que podrían estar implicadas en reordenamientos genómicos (Bachelier *et al.*, 1994). Curiosamente, el *cluster* génico responsable de la degradación de 3HPP en *C. testosteroni* (Arai *et al.*, 1999) no muestra la presencia del gen *mhpT* (Fig. 73). Esto mismo se ha observado en el cromosoma de *Photorhabdus luminescens*, donde curiosamente los genes *mhp* y *hca* constituyen un *cluster* único (Fig. 73), a diferencia de lo que sucede en el cromosoma de *E. coli* K-12 (Chalabaev, *et al.*, 2008).

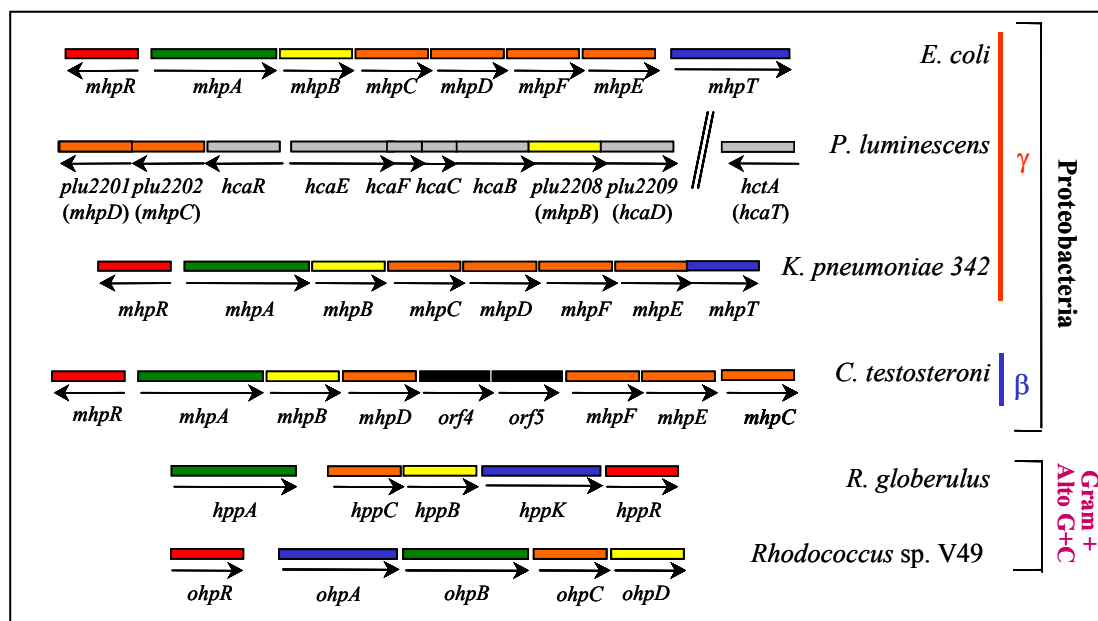


Figura 73. Comparación del ordenamiento genético del cluster *mhp* en *E. coli* K-12, *K. pneumoniae* 342, *P. luminescens* TT01, *C. testosteroni* TA441 (código de acceso: AB024335), *R. globerulus* PWD1 (código de acceso: U89712) y *Rhodococcus* sp. V49 (código de acceso: AF274045) (modificado de Díaz *et al.*, 2001). Las flechas indican la dirección de transcripción de los genes. Con los mismos colores se indican los genes equivalentes en los distintos clusters: rojo (genes reguladores), verde (genes que codifican la monooxigenasa), amarillo (genes que codifican la dioxygenasa de ruptura del anillo aromático), naranja (genes que codifican la ruta hidrolítica *meta*), azul (genes que codifican el posible transportador), negro (genes de función desconocida) y gris (genes *hca*).

Según los resultados obtenidos en los ensayos de RT-PCR (ver apartado 5.1 de Resultados), el gen *mhpT* es inducible por 3HPP y se co-transcribe con los genes catabólicos *mhp* a partir del promotor *Pa*. Además, se ha confirmado que la región intergénica *mhpE-mhpT* no presenta actividad promotora. Todos estos hechos ponen de manifiesto que, si bien las regiones BIME pueden estar implicadas en la terminación de la transcripción (Bachelier *et al.*, 1994), la secuencia BIME que se localiza en la región intergénica *mhpE-mhpT* no está implicada en la terminación de la transcripción de los genes catabólicos, aunque no se descarta que participe en la estabilización del mRNA o en el control de la traducción.

En este trabajo se ha demostrado que la introducción de una mutación en el gen transportador *mhpT* en la cepa *E. coli* MG1655*mhpT*Δ produce que esta cepa crezca más lentamente que la cepa silvestre (tasa de crecimiento 1,5 veces mayor) en un medio que sólo contiene 3HPP como única fuente de carbono. De forma similar, la mutación del gen *benK* (codifica el transportador de benzoato) de *Acinetobacter* sp ADP1 produce

un crecimiento más lento de la cepa mutante en un medio que sólo contenga benzoato como única fuente de carbono (Collier *et al.*, 1997). Sin embargo, la mutación del gen transportador *pcaK* de *P. putida*, no perjudica el crecimiento de la bacteria a expensas de 4-hidroxibenzoato a pH neutro, si bien a pH ligeramente básico, la cepa mutante en el gen *pcaK* crece más lentamente que la cepa silvestre (Harwood *et al.*, 1994). Por el contrario, se han descrito varios ejemplos en los que la introducción de una mutación en la permeasa de ácidos aromáticos bloquea completamente el crecimiento del mutante en presencia del ácido aromático que es reconocido por la permeasa. Tales ejemplos son el transportador de benzoato de *P. putida* PRS2000 (Thayer y Wheelis, 1976), el transportador del ácido 4-hidroxifenilacético de *K. pneumoniae* (Allende *et al.*, 1992), el transportador de 4-hidroxibenzoato de *R. leguminosarum* (Wong *et al.*, 1994) y el transportador de *cis,cis*-muconato de *Acinetobacter* sp. ADP1 (Williams y Shaw, 1997).

VI. CONCLUSIONES

1. La proteína MhpR-His, una vez purificada, es capaz de unirse *in vitro* a una secuencia operadora localizada dentro del promotor *Pa* siendo mayor su afinidad si el 3HPP está presente y así puede inducir la transcripción de los genes *mhp* catabólicos a partir de este promotor.
2. El modelo de estructura tridimensional de MhpR sugiere que este regulador está constituido por un dominio N-terminal de tipo HTH alado (residuos 1 a 73), presuntamente implicado en la unión a DNA y en la dimerización, y por un dominio C-terminal (residuos 87 a 277), posiblemente involucrado en la unión del efector y en la tetramerización de la proteína.
3. La represión catabólica del promotor *Pa* mediada por CRP tiene lugar a nivel transcripcional siendo su inducción *in vitro* máxima si además del complejo MhpR-His/3HPP está presente el complejo cAMP-CRP.
4. La expresión del promotor *Pr* está sujeta a represión catabólica por glucosa mediada por el complejo cAMP-CRP que reconoce a su secuencia operadora centrada en la posición -40,5 con respecto al sitio de inicio de la transcripción, siendo el complejo cAMP-CRP necesario para la inducción *in vitro* de la formación del complejo abierto en este promotor que abarca desde las posiciones -1 a -12.
5. El efecto sinérgico del PP sobre la inducción del promotor *Pa* mediada por MhpR es máximo cuando las células se cultivan en presencia de 3HPP 25 μ M y PP 750 μ M, lo que correlaciona con el hecho de que la unión *in vitro* de MhpR-His a su operador tiene mayor afinidad en presencia de 3HPP y PP que en ausencia de estos.
6. Los efectores de MhpR-His alteran poco su estructura secundaria, pero aumentan de forma notable su termoestabilidad.
7. Las proteínas mutantes MhpR-HisQ252R y MhpR-HisV272A inducen *in vitro* la transcripción a partir del promotor *Pa* de forma más eficiente que la proteína nativa, resultando que el efecto sinérgico del PP sobre la inducción de *Pa*

mediada por cualquiera de estas proteínas mutantes se detecta en presencia de un rango de concentración de 3HPP más estrecho que el necesario para la proteína nativa.

8. Las interacciones entre las proteínas mutantes MhpR-HisQ252R y MhpR-HisV272A y los diferentes efectores altera el entorno de uno o varios de sus triptófanos de forma diferente a como sucede en el caso de la proteína nativa.
9. La expresión del gen transportador *mhpT* del *cluster mhp* tiene lugar a partir del promotor *Pa* que es inducible por 3HPP.
10. La delección del gen transportador *mhpT* hace que *E. coli* crezca más lentamente (1,5 veces) en un medio en el que la única fuente de carbono disponible sea el 3HPP.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. y Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- Allende, J. L., Gibello, A., Martín, M., Garrido-Pertierra, A. (1992). Transport of 4-hydroxyphenylacetic acid in *Klebsiella pneumoniae*. *Arch. Biochem. Biophys.* **292**: 583-588.
- Ansari, A. Z., Bradner, J. E. y O'Halloran, T. V. (1995). DNA-bend modulation in a repressor-to-activator switching mechanism. *Nature*. **374**: 371-375.
- Arai, H., Yamamoto, T., Ohishi, T., Shimizu, T., Nakata, T. y Kudo, T. (1999). Genetic organization and characteristics of the 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid degradation pathway of *Comanomas testosteroni* TA441. *Microbiology*. **145**: 2813-2820.
- Aranda-Olmedo, I., Ramos, J. L. y Marqués, S. (2005). Integration of signals through Crc and PtsN in catabolite repression of *Pseudomonas putida* TOL plasmid pWW0. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 4191-4198.
- Arias-Barrau, E., Olivera, E. R., Luengo, J. M., Fernández, C., Galán, B., García, J. L., Díaz, E. y Miñambres, B. (2004). The homogentisate pathway: a central catabolic pathway involved in the degradation of L-phenylalanine, L-tyrosine, and 3-hydroxyphenylacetate in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **186**: 5062-5077.
- Bachelier, S., Saurin, W., Perrin, D., Hofnung, M. y Gilson, E. (1994). Structural and functional diversity among bacterial interspersed mosaic elements (BIMEs). *Mol. Microbiol.* **12**:61-70.
- Bachelier, S., Clement, J. M. y Hofnung, M. (1999). Short palindromic repetitive DNA elements in enterobacteria: a survey. *Res. Microbiol.* **150**: 627-639.
- Barnes, M. R., Duetz, W. A. y Williams, P. A. (1997). A 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid catabolic pathway in *Rhodococcus globerulus* PWD1: cloning and characterization of the *hpp* operon. *J. Bacteriol.* **179**: 6145-6153.
- Barker, J., Humphrey, T. J., y Brown, M. W. R. (1999). Survival of *Escherichia coli* 0157 in a soil protozoan: implications for disease. *FEMS Microbiol. Lett.* **173**: 291-295.
- Beatty, C. M., Browning, D. F., Busby, S. J. W. y Wolfe, A. J. (2003). Cyclic AMP receptor protein-dependent activation of the *Escherichia coli* *acsP2* promoter by a synergistic class III mechanism. *J. Bacteriol.* **185**: 5148-5157.
- Beck, C. F. y Warren, A. J. (1988). Divergent promoters, a common form of gene organization. *Microbiol. Rev.* **52**: 318-326.
- Belyaeva, T. A., Wade, J. T., Webster, C. L., Howard, V. J., Thomas, M. S., Hyde, E. I. y Busby, S. J. W. (2000). Transcription activation at the *Escherichia coli* *melAB* promoter: the role of MelR and the cyclic AMP receptor protein. *Mol. Microbiol.* **36**: 211-222.

- Bell, K. S., Sebaihia, M., Pritchard, L. et al.** (2004). Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* sp. atroseptica and characterization of virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **101**: 11105-11110.
- Bernstein, H. J.** (2000). Recent changes to RasMol, recombining the variants. *Trends Biochem. Sci.* **25**: 453-455.
- Blattner, F. R., Plunkett, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B. y Shao, Y.** (1997). *Science*. **277**: 1453-1462.
- Blauer, G.** (1974). Probing protein binding sites by circular dichroism spectroscopy. *Struct. Bonding (Berlin)*. **18**: 69-129.
- Böhm, G., Muhr, R y Jaenicke, R.** (1992). Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Eng.* **5**: 191-195.
- Bolotin, A., y Biro, S.** (1990). Nucleotide sequence of the putative regulatory gene and major promoter region of the *Streptomyces griseus* glycerol operon. *Gene*. **87**: 151-152.
- Botsford, J. L. y Harmam, J. G.** (1992). Cyclic AMP in prokaryotes. *Microbiol. Rev.* **56**: 100-122.
- Boxer, D. H., Zhang, H., Gourley, D. G., Hunter, W. N., Kelly, S. M. y Price, N. C.** (2004). Sensing of remote oxyanion binding at the DNA binding domain of the molybdate-dependent transcriptional regulator, ModE. *Org. Biomol. Chem.* **2**: 2829-2837.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Brandts, J. F. y Lin, L. N.** (1990). Study of strong to ultratight protein interactions using differential scanning calorimetry. *Biochemistry*. **29**: 6927-6940.
- Brune, I., Jochmann, N., Brinkrolf, K., Hüser, A. T., Gerstmeir, R., Eikmanns, B. J., Kalinowsky, J., Pühler, A. y Tauch, A.** (2007). The IclR-type transcriptional repressor LtbR regulates the expression of leucine and tryptophan biosynthesis genes in the amino acid producer *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **189**: 2720-2733.
- Bugg, T. D. H.** (1993). Overproduction, purification and properties of 2,3-dihydroxyphenylpropionate 1,2-dioxygenase from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*. **1202**: 258-264.
- Bugg, T. D. H., Sanvoisin, J. y Spence, E. L.** (1997). Exploring the catalytic mechanism of the extradiol catechol dioxygenases. *Biochem. Soc. Transac.* **25**: 81-85.

- Bulter, T., Alcalde, M., Sieber, V., Meinhold, P., Schlachtbauer, C. y Arnold, F. H.** (2003). Functional expression of a fungal laccase in *Saccharomyces cerevisiae* by directed evolution. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 987-995.
- Bundy, B. M., Collier, L. S., Hoover, T. R. y Neidle, E. L.** (2002). Synergistic transcriptional activation by one regulatory protein in response to two metabolites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**: 7693-7698.
- Burlingame, R. P.** (1983). Ph.D. Tesis. University of Minnesota, Minneapolis (USA).
- Burlingame, R. P. y Chapman, P. J.** (1983). Catabolism of phenylpropionic acid and its 3-hydroxy derivative by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **155**: 113-121.
- Burlingame, R. P., Wyman, L. y Chapman, P. J.** (1986). Isolation and characterization of *Escherichia coli* mutants defective for phenylpropionate degradation. *J. Bacteriol.* **168**: 55-64.
- Busby, S. y Ebricht, R. H.** (1999). Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J. Mol. Biol.* **293**: 199-213.
- Cases, I. y de Lorenzo, V.** (1998). Expression systems and physiological control of promoter activity in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**: 303-310.
- Cases, I. y de Lorenzo, V.** (2001). The black cat/white cat principle of signal integration in bacterial promoters. *EMBO J.* **20**: 1-11.
- Cases, I., Pérez-Martín, J. y de Lorenzo, V.** (1999). The IAN^{tr} (PtsN) protein of *Pseudomonas putida* mediates the C source inhibition of the σ^{54} -dependent Pu promoter of the TOL plasmid. *J. Biol. Chem.* **274**: 15562-15568.
- Caslake, L. F., Ashraf, S. I. y Summers, A. O.** (1997). Mutations in the alpha and sigma-70 subunits of RNA polymerase affect expression of the *mer* operon. *J. Bacteriol.* **179**: 1787-1795.
- Chacón, P., Morán, F., Díaz, J. F., Pantos, E. y Andreu, J. M.** (1998). Low-resolution structures of proteins in solution retrieved from X-ray scattering with a genetic algorithm. *Biophys. J.* **74**: 2760-2775.
- Chacón, P., Díaz, J. F., Morán, F. y Andreu, J. M.** (2000). Reconstruction of protein form with X-ray solution scattering and a genetic algorithm. *J. Mol. Biol.* **299**: 1289-1302.
- Chalabaev, S., Turlin, E., Bay, S., Ganneau, C., Brito-Fravallo, E., Charles, J-F, Danchin, A. y Biville, F.** (2008). Cinnamic acid, an autoinducer of its own biosynthesis, is processed via Hca enzymes in *Photobacterium luminescens*. **74**: 1717-1725.
- Chapon, C.** (1982). Role of the catabolite activator protein in the maltose regulon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **150**: 722-729.

- Choy, H. E. y Adhya, S.** (1993). RNA polymerase idling and clearance in *gal* promoters: use of supercoiled minicircle DNA template made *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 472-476.
- Clark, T. J., Phillips R. S., Bundy, B. M., Momany, C. y Neidle, E. L.** (2004). Benzoate decreases the binding of *cis,cis*-Muconate to the BenM regulator despite the synergistic effect of both compounds on transcriptional activation. *J. Bacteriol.* **186**: 1200-1204.
- Collier, L. S., Nichols, N. N. y Neidle, E. L.** (1997). *benk* encodes a hydrophobic permease-like protein involved in benzoate degradation by *Acinetobacter* sp. strain ADP1. *J. Bacteriol.* **179**: 5943-5946.
- Crasnier, M.** (1996). Cyclic AMP and catabolite repression. *Res. Microbiol.* **147**: 479-482.
- D'Argenio, D. A., Segura, A., Coco, W. M., Bünz, P. V. y Ornston, L. N.** (1999). The physiological contribution of *Acinetobacter* PcaK, a transport system that acts upon protocatechuate, can be masked by the overlapping specificity of VanK. *J. Bacteriol.* **181**: 3505-3515.
- DeLano, W.L.** (2002) The PyMOL Molecular graphics system. DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA.
- de Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U. y Timmis, K. N.** (1990). Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.* **172**: 6568-6572.
- de Lorenzo, V. y Timmis, K. N.** (1994). Analysis and construction of stable phenotypes in Gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol.* **235**: 386-405.
- Díaz, E., Ferrández, A. y García, J. L.** (1998). Characterization of the *hca* cluster encoding the dioxygenolytic pathway for initial catabolism of 3-phenylpropionic acid in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **180**: 2915-2923.
- Díaz, E. y Prieto, M. A.** (2000). Bacterial promoters triggering biodegradation of aromatic pollutants. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**: 467-475.
- Díaz, E., Ferrández, A., Prieto, M. A. y García, J. L.** (2001). Biodegradation of aromatic compounds by *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**: 523-569.
- DiMarco, A. A., Averhoff, B. y Ornston, L. N.** (1993). Identification of the transcriptional activator *pobR* and characterization of its role in the expression of *pobA*, the structural gene for *p*-hydroxybenzoate hydroxylase in *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Bacteriol.* **175**: 4499-4506.
- DiMarco, A. A. y Ornston, L. N.** (1994). Regulation of *p*-hydroxybenzoate hydroxylase synthesis by PobR bound to an operator in *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Bacteriol.* **176**: 4277-4284.

- Dinamarca, M. A., Ruíz-Manzano, A. y Rojo, F.** (2002). Inactivation of cytochrome *o* ubiquinol oxidase relieves catabolic repression of the *Pseudomonas putida* GP01 alkane degradation pathway. *J. Bacteriol.* **184**: 3785-3793.
- Donald, L. J., Chernushevich, I. V., Zhou, J., Verentchikov, A., Poppe-Schriemer, N., Hosfield, D. J., Westmore J. B., Ens, W., Duckworth, H. W. y Standing, K. G.** (1996). Preparation and properties of pure, full-length IclR protein of *Escherichia coli*. Use of time-of-flight mass spectrometry to investigate the problems encountered. *Protein Sci.* **5**: 1613-1624.
- Donald, L. J., Hosfield, D. J., Cuvelier, S. L., Ens, W., Standing, K. G. y Duckworth, H. W.** (2001). Mass spectrometric study of the *Escherichia coli* repressor proteins, IclR and Gc1R, and their complexes with DNA. *Protein Sci.* **10**: 1370-1380.
- Dougan, G., Haque, A., Pickard, D., Frankel, G., O'Goara, P. y Wain, J.** (2001). The *Escherichia coli* gene pool. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**: 90-94.
- Duque, E., Segura, A., Mosqueda, G. y Ramos, J. L.** (2001). Global and cognate regulators control the expression of the organic solvent efflux pumps TtgABC and TtgDEF of *Pseudomonas putida*. *Mol. Microbiol.* **39**: 1100-1106.
- Dworkin, J. y Losick, R.** (2001). Linking nutritional status to gene activation and development. *Genes & Development* **15**: 1051-1054.
- Estrem, S. T., Gaal, T., Ross, W., y Gourse, R. L.** (1998). Identification of an UP element consensus sequence for bacterial promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 9761-9766.
- Eulberg, D. y Schlömann, M.** (1998). The putative regulator of catechol catabolism in *Rhodococcus opacus* 1CP, an IclR-type, not a LysR-type transcriptional regulator. *Antonie van Leeuwenhoek.* **74**: 71-82.
- Eulberg, D., Lakner, S., Golovleva, L. A. y Schlömann, M.** (1998). Characterization of a protocatechuate catabolic gene cluster from *Rhodococcus opacus* 1 CP: evidence for a merged enzyme with 4-carboxymuconolactone-decarboxylating and 3-oxoadipate enol-lactone-hydrolyzing activity. *J. Bacteriol.* **180**: 1072-1081.
- Ezezika, O. C., Haddad, S., Clark, T. J., Neidle, E. L. y Momany, C.** (2007). Distinct effector-binding sites enable synergistic transcriptional activation by BenM, a LysR-type regulator. *J. Mol. Biol.* **367**: 616-629.
- Ferrández, A., García, J. L. y Díaz, E.** (1997a). Genetic characterization and expression in heterologous hosts of the 3-(3-hydroxyphenyl)propionate catabolic pathway of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **179**: 2573-2581.
- Ferrández, A., Prieto, M. A., García, J. L. y Díaz, E.** (1997b). Molecular characterization of PadA, a phenylacetaldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **406**: 23-27.

- Ferrández, A., Miñambres, B., García, B., Olivera, E. R., Luengo, J. M., García, J. L. y Díaz, E.** (1998). Catabolism of phenylacetic acid in *Escherichia coli*. Characterization of a new aerobic hybrid pathway. *J. Biol. Chem.* **273**: 25974-25986.
- Ferrández, A., García, J. L. y Díaz, E.** (2000). Transcriptional regulation of the divergent *paa* catabolic operons for phenylacetic acid degradation in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **275**: 12214-12222.
- Galán, B., Prieto, M. A. y García, J. L.** (2001). Superimposed levels of regulation of the 4-hydroxyphenylacetate catabolic pathway in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **276**: 37060-37068.
- Galán, B., Manso, I., Kolb, A., García, J. L. y Prieto, M. A.** (2008). The role of FIS protein in the physiological control of the expression of the *Escherichia coli meta-hpa* operon. *Microbiology.* **154**: 2151-2160.
- Gallegos, M. T., Schleif, R., Bairoch, A., Hofmann, K. y Ramos, J. L.** (1997). AraC/XylS family of transcriptional regulators. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 393-410.
- Garzón, J. L., Kovacs, J., Avagyan, R. y Chacón, P.** (2007). ADP-EM: fast exhaustive multi-resolution docking for high-throughput coverage. *Bioinformatics.* **23**: 427-433.
- Gaston, K., Chan, B., Kolb, A., Fox, J. y Busby, S.** (1988). Alterations in the binding site of the cyclic AMP receptor protein at the *Escherichia coli* galactose operon regulatory region. *Biochem. J.* **253**: 809-818.
- Gaston, K., Kolb, A. y Busby, S.** (1989). Binding of the *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein to DNA fragments containing consensus nucleotide sequences. *Biochem J.* **261**: 649-653.
- Gaston, K., Bell, A., Kolb, A., Buc, H. y Busby, S.** (1990). Stringent spacing requirements for transcription activation by CRP. *Cell.* **62**: 733-743.
- Gerhardt, P., Morroy, R. G. E., Woody, W. A. y Krieg, N. R.** (1994). En: Methods for General and Molecular Bacteriology; American Society for Microbiology Washington D C.
- Gerischer, U., Segura, A. y Ornston, N.** (1998). PcaU, a transcriptional activator of genes for protocatechuate utilization in *Acinetobacter*. *J. Bacteriol.* **180**: 1512-1524.
- Ghosaini, L. R., Brown, A. M. y Sturtevant, J. M.** (1988). Scanning calorimetric study of the thermal unfolding of catabolite activator protein from *Escherichia coli* in the absence and presence of cyclic mononucleotides. *Biochemistry.* **27**: 5257-5261.
- Gloss, L. M. y Matthews, C. R.** (1997). Urea and thermal equilibrium denaturation studies on the dimerization domain of *Escherichia coli* Trp repressor. *Biochemistry.* **36**: 5612-5623.

Greenfield, N. J. (1975). Circular dichroism studies of dihydrofolate reductase from a methotrexate-resistant strain of *Escherichia coli* B, MB 1428: ternary complexes. *Biochim. Biophys. Acta.* **403**: 32-46.

Guazzaroni, M. E., Terán, W., Zhang, X., Gallegos, M. T. y Ramos, J. L. (2004). TtgV bound to a complex operator site represses transcription of the promoter for the multidrug and solvent extrusion TtgGHI pump. *J. Bacteriol.* **186**: 2921-2927.

Guazzaroni, M. E., Krell, T., Felipe, A., Ruiz, R., Meng, C., Zhang, X., Gallegos, M. T. y Ramos, J. L. (2005). The multidrug efflux regulator TtgV recognizes a wide range of structurally different effectors in solution and complexed with target DNA. *J. Biol Chem.* **280**: 20887-20893.

Guazzaroni, M. E., Gallegos, M. T., Ramos, J. L. y Krell, T. (2007a). Different modes of binding of mono- and biaromatic effectors to the transcriptional regulator TTGV. Role in differential derepression from its cognate operator. *J. Biol. Chem.* **282**: 16308-16316.

Guazzaroni, M. E., Krell, T., Gutiérrez del Arroyo, P., Vélez, M., Jiménez, M., Rivas, G. y Ramos, J. L. (2007b). The transcriptional repressor TtgV recognizes a complex operator as a tetramer and induces convex DNA bending. *J. Mol. Biol.* **369**: 927-939.

Guex, N. y Peitsch, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis.* **18**: 2714-2723.

Guo, Z. y Houghton, J. E. (1999). PcaR-mediated activation and repression of *pca* genes from *Pseudomonas putida* are propagated by its binding to both the -35 and the -10 promoter elements. *Mol. Microbiol.* **32**: 253-263.

Guo, M., Zou, J. W., Yi, P. G., Shang, Z. C., Hu, G. X. y Yu, Q. S. (2004). Binding interaction of gatifloxacin with bovine serum albumin. *Anal. Sci.* **20**: 465-470.

Harwood, C. S., Nichols, N. N., Kim, M. K., Ditty, J. L. y Parales, R. E. (1994). Identification of the *pcaRKF* gene cluster from *Pseudomonas putida*: involvement in chemotaxis, biodegradation, and transport of 4-hydroxybenzoate. *J. Bacteriol.* **176**: 6479-6488.

Herbert, M., Kolb, A. y Buc, H. (1986). Overlapping promoters and their control in *Escherichia coli*: the *gal* case. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**: 2807-2811.

Herrero, M., de Lorenzo, V. y Timmis, K. N. (1990). Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **72**: 6557-6567.

Hester, K. L., Lehman, J., Najar, F., Song, L., Roe, B. A., MacGregor, C. H., Hager, P. W., Phibbs Jr, P. V., y Sokatch, J. R. (2000). Crc is involved in catabolite repression control of the *bkd* operons of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **182**: 1144-1149.

- Hidalgo, E. y Demple, B.** (1997). Spacing of promoter elements regulates the basal expression of the *soxS* gene and converts SoxR from a transcriptional activator into a repressor. *EMBO J.* **16**: 1056-1065.
- Hindle, Z. y Smith, C.P.** (1994). Substrate induction and catabolite repression of the *Streptomyces coelicolor* glycerol operon are mediated through the GylR protein. *Mol. Microbiol.* **12**: 737-745.
- Ibañez, E., Campos, E., Baldoma, L., Aguilar, J. y Badia, J.** (2000). Regulation of expression of the *yiaKLMNOPQRS* operon for carbohydrate utilization in *Escherichia coli*: involvement of the main transcriptional factors. *J. Bacteriol.* **182**: 4617-4624.
- Inada, T., Kimata, K. Y Aiba, H.** (1996). Mechanism responsible for glucose-lactose diauxie in *Escherichia coli*: challenge to the cAMP model. *Genes Cells* **1**: 293-301.
- Janczarek, M. y Skorupska, A.** (2007). The *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* RosR: transcriptional regulator involved in exopolysaccharide production. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **20**: 867-881.
- Jansen, C., Gronenborn, A. y Clore G. M.** (1987). The binding of the cyclic AMP receptor protein to synthetic DNA sites containing permutations in the consensus sequence TGTGA. *Biochem. J.* **246**: 227-232.
- Jerg, B. y Gerischer, U.** (2008). Relevance of nucleotides of the PcaU binding site from *Acinetobacter baylyi*. *Microbiology.* **154**: 756-766.
- Jiang, H. y Kendrick, K. E.** (2000). Characterization of *ssfR* and *sgsA*, two genes involved in sporulation of *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **182**: 5521-5529.
- Jishage, M., Kvint, K., Shingler, V. y Nystrom, T.** (2002). Regulation of sigma factor competition by the alarmone ppGpp. *Genes Dev.* **16**: 1260-1270.
- Johanson, J. S.** (1997). Binding of the volatile anesthetic chloroform to albumin demonstrated using tryptophan fluorescence quenching. *J. Biol. Chem.* **272**: 17961-17965.
- Joung, J. K., Le, L. U. y Hochschild, A.** (1993). Synergistic activation of transcription by *Escherichia coli* cAMP receptor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 3083-3087.
- Kahramanoglou, C., Webster, C. L., El-Robh, M. S., Belyaeva, T. A. y Busby, S. J. W.** (2006). Mutational analysis of the *Escherichia coli melR* gene suggests a two-state concerted model to explain transcriptional activation and repression in the melibiose operon. *J. Bacteriol.* **188**: 3199-3207.
- Kaniga, K., Delor, I. y Cornelis, G. R.** (1991). A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene.* **109**: 137-141.
- Kelly, S. M. y Price, N. C.** (2000). The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Curr. Protein. Pept. Sci.* **1**: 349-384.

Kim, J., Kang, Y., Choi, O., Jeong, Y., Jeong, J. E., Lim, J. Y., Kim, M., Moon, J. S., Suga, H. y Hwang, I. (2007). Regulation of polar flagellum genes is mediated by quorum sensing and FlhDC in *Burkholderia glumae*. *Mol. Microbiol.* **64**: 165-179.

Kimata, K., Takahashi, H., Inada, T., Postma, P., y Aiba, H. (1997). cAMP receptor protein-cAMP plays a crucial role in glucose-lactose diauxic by inactivating the major glucose transporter gene in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**: 12914-12919.

Kok, R. G., D'Argenio, D. A. y Ornston, L. N. (1998). Mutation analysis of PcbR and PcaU, closely related transcriptional activators in *Acinetobacter*. *J. Bacteriol.* **180**: 5058-69.

Kolb, A., Spassky, A., Chapon, C., Blazy, B. y Buc, H. (1983). On the different binding affinities of CRP at the *lac*, *gal* and *malt* promoter regions. *Nucleic Acids Res.* **11**: 7833-7852.

Kolb, A., Igarashi, K., Ishihama, A., Lavigne, M., Buckle, M. y Buc, H. (1993). *E. coli* RNA polymerase, deleted in the C-terminal part of its α -subunit, interacts differently with the cAMP-CRP complex at the *lacP1* and at the *galP1* promoter. *Nucleic Acids Res.* **21**: 319-326.

Kovárová, K., Käch, A., Chaloupka, V. y Egli, T. (1996). Cultivation of *Escherichia coli* with mixtures of 3-phenylpropionic acid and glucose: dynamics of growth and substrate consumption. *Biodegradation.* **7**: 445-453.

Kovárová, K., Käch, A., Zehnder, A. J. B. y Egli, T. (1997). Cultivation of *Escherichia coli* with mixtures of 3-phenylpropionic acid and glucose: steady-state growth kinetics. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2619-2624.

Kovárová-Kovar, K. y Egli, T. (1998). Growth kinetics of suspended microbial cells: from single-substrate-controlled growth to mixed-substrate kinetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 646-666.

Kowalchuk, G. A., Hartnett, G. B., Benson, A., Houghton, J. E., Ngai, K. L. y Ornston, N. (1994). Contrasting patterns of evolutionary divergence within the *Acinetobacter calcoaceticus pca* operon. *Gene.* **146**: 23-30.

Krell T., Molina-Henares, A. J. y Ramos, J. L. (2006). The IclR family of transcriptional activators and repressors can be defined by a single profile. *Protein Sci.* **15**: 1207-1213.

Kumari, S. Beatty, C. M., Browning, F. B., Busby, S. J. W., Simel, E. J., Hovel-Miner, G. y Wolfe, A. J. (2000). Regulation of acetyl coenzyme A synthetase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **182**: 4173-4179.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

- Lam, W. W. y Bugg, T. D.** (1997). Purification, characterization, and stereochemical analysis of a C-C hydrolase:2-hydroxy-6-keto-nona-2,4-diene-1,9-dioic acid 5,6-hydrolase. *Biochemistry*. **36**: 12242-12251.
- Larimer, F. W., Chain, P., Hauser, L., et al.,** 2004. Complete genome sequence of the metabolically versatile photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Nat. Biotech.* **22**: 55-61.
- Laue, T. M., Shah, B. D., Ridgeway, T. M. y Pelletier, S. L.** (1992). Analytical ultracentrifugation in biochemistry and polymer science (Harding, S., Rowe, A., y Horton, J., eds). 90-125. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
- Lavigne, M., Kolb, A. y Buc, H.** (1992). Transcription activation by cAMP receptor protein (CRP) at the *Escherichia coli galP1* promoter. Crucial role for the spacing between the CRP binding site and the -10 region. *Biochemistry*. **31**: 9647-9656.
- Lee, S. J., Ko, J. H., Kang, H. Y. y Lee, Y.** (2006). Coupled expression of MhpE aldolase and MhpF dehydrogenase in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **346**: 1009-1015.
- Lee, S. K., Newman, J. D. y Keasling, J. D.** (2005). Catabolite repression of the propionate catabolic genes in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*: evidence for involvement of the cyclic AMP receptor protein. *J. Bacteriol.* **187**: 2793- 2800.
- Leveau, J. H. J., Zehnder, A. J. B. y Van der Meer, J. R.** (1998). The *tdfK* gene product facilitates uptake of 2,4-dichlorophenoxyacetate by *Ralstonia eutropha* JMP134(pJP4). *J. Bacteriol.* **180**: 2237-2243.
- Liu, M., Gupte, G., Roy, S., Bandwar, R. P., Patel, S. S. y Garges, S.** (2003). Kinetics of transcription initiation at *lacP1*. Multiple roles of cyclic AMP receptor protein. *J. Biol. Chem.* **278**: 39755-39761.
- Liu, M., Garges, S. y Adhya, S.** (2004). *lacP1* promoter with an extended -10 motif. Pleiotropic effects of cyclic AMP protein at different steps of transcription initiation. *J. Biol. Chem.* **279**: 54552-54557.
- Lorca, G. L., Ezersky A., Lunin, V. V., Walker, J. R., Altamentova, S., Evdokimova, E., Vedadi, M., Bochkarev, A. y Savchenko, A.** (2007). Glyoxylate and pyruvate are antagonistic effectors of the *Escherichia coli* IclR transcriptional regulator. *J. Biol. Chem.* **282**: 16476-16491.
- Lovley, D. R.** (2003). Cleaning up with genomics: applying molecular biology to bioremediation. *Nat. Rev.* **1**: 35-44.
- Lloyd, G. S., Niu, W., Tebbutt, J., Ebright, R. H. y Busby, S. J. W.** (2002). Requirement for two copies of RNA polymerase α subunit C-terminal domain for synergistic transcription activation at complex bacterial promoters. *Genes and development*. **16**: 2557-2565.

- MacLean, A. M., MacPherson, G., Aneja, P. y Finan, T. M.** (2006). Characterization of the beta-ketoadipate pathway in *Sinorhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 5403-5413.
- Magasanik, B.** (1961). Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **26**: 249-256.
- Makman, R. S. y Sutherland, E. W.** (1965). Adenosine 3',5'-phosphate in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **240**: 1309-1314.
- Marschall, C., Labrousse, V., Kreimer, M., Weichart, D., Kolb, A. y Hengge-Aronis, R.** (1998). Molecular analysis of the regulation of *csiD*, a carbon starvation-inducible gene in *Escherichia coli* that is exclusively dependent on σ^S and requires activation by cAMP-CRP. *J. Mol. Biol.* **276**: 339-353.
- Martin, V. J. J. y Mohn, W. W.** (2000). Genetic investigation of the catabolic pathway for degradation of abietane diterpenoids by *Pseudomonas abietaniphila* BKME-9. *J. Bacteriol.* **182**: 3784-3793.
- Maxam, A. M. y Gilbert, W.** (1977). A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**: 560-564.
- Miller, J. H.** (1972). Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Molina-Henares, A. J., Krell, T., Guazzaroni, M. E., Segura, A. y Ramos, J. L.** (2006). Members of the IclR family of bacterial transcriptional regulators function as activators and/or repressors. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**: 157-186.
- Monsalve, M., Mencia, M., Salas, M., y Rojo, F.** (1997). Transcription activation or repression by phage f29 protein p4 depends on the strength of the RNA polymerase promoter interactions. *Mol. Cell.* **1**: 99-107.
- Morales, G., Linares, J. F., Beloso, A., Albar, J. P., Martínez, J. L., y Rojo, F.** (2004). The *Pseudomonas putida* Crc global regulator controls the expression of genes from several chromosomal catabolic pathways for aromatic compounds. *J. Bacteriol.* **186**: 1337-1344.
- Mosqueda, G. y Ramos, J. L.** (2000). A set of genes encoding a second toluene efflux system in *Pseudomonas putida* DOT-T1E is linked to the *tod* genes for toluene metabolism. *J. Bacteriol.* **182**: 937-943.
- Nasser, W., Reverchon, S. y Robert-Baudouy, J.** (1992). Purification and functional characterization of the KdgR protein, a major repressor of pectinolytic genes of *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Microbiol.* **6**: 257-265.
- Nasser, W., Reverchon, S., Condemine, G. y Robert-Baudouy, J.** (1994). Specific interactions of *Erwinia chrysanthemi* KdgR repressor with different operators of genes involved in pectinolysis. *J. Mol. Biol.* **236**: 427-440.

- Neidhardt, F. C.** (1996). The enteric bacterial cell and the age of bacteria, p. 1-3. En F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low., B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter y H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2^a ed. ASM Press, Washington, D.C. (USA).
- Nga, D. P., Altenbuchner, J. y Heiss, G. S.** (2004). NpdR, a repressor involved in 2,4,6-Trinitrophenol degradation in *Rhodococcus opacus* HL PM-1. *J. Bacteriol.* **186**: 98-103.
- Nichols, N. N. y Harwood, C. S.** (1997). PcaK, a high-affinity permease for the aromatic compounds 4-hydroxybenzoate and protocatechuate from *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **179**: 5056-5061.
- Nomura, K., Nasser, W., Kawagishi, H. y Tsuyumu, S.** (1998). The *pir* gene of *Erwinia chrysanthemi* EC16 regulates hyperinduction of pectate lyase virulence genes in response to plant signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 14034-14039.
- Orth, P., Schnappinger, D., Hillen, W., Saenger, W. y Hinrichs, W.** (2000). Structural basis of gene regulation by the tetracycline inducible Tet repressor-operator system. *Nat. Struct. Biol.* **7**: 215-219.
- Oyamada, T., Yokoyama, K., Morinaga, M., Suzuki, M. y Makino, K.** (2007). Expression of *Escherichia coli* DcuS-R two component regulatory system is regulated by the secondary internal promoter which is activated by CRP-cAMP. *J. Microbiol.* **45**: 234-240.
- Pace, C. N. y Scholtz, J. M.** (1997). Measuring the conformational stability of a protein. Protein Structure. T. E. Creighton, editor. Oxford University Press, Oxford. 299-321.
- Pan, B., Unnikrishnan, I. y LaPorte, D. C.** (1996). The binding site of the IclR repressor protein overlaps the promoter of *aceBAK*. *J. Bacteriol.* **178**: 3982-3984.
- Pao, S. S., Paulsen, I. T. y Saier, M. H. Jr.** (1998). Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 1-34.
- Pastan, I. y Adhya, S.** (1976). Cyclic adenosine 5'-monophosphate in *Escherichia coli*. *Bacteriol. Rev.* **40**: 527-551.
- Peekhaus, N. y Conway, T.** (1998). What's for dinner?: Entner-Doudoroff metabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**: 3495-3502.
- Petruschka, L., Burchardt, G., Muller, C., Wehie, C. y Herrmann, H.** (2001). The *cyo* operon of *Pseudomonas putida* is involved in carbon catabolite repression of phenol degradation. *Mol. Genet. Genomics.* **266**: 199-206.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C. y Ferrin, T. E.** (2004). UCSF Chimera-a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**: 1605-1612.

Pollard, J. R. y Bugg, T. D. H. (1998). Purification, characterisation and reaction mechanism of monofunctional 2-hydroxypentadienoic acid hydratase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **251**: 98-106.

Pollard, J. R., Rialland, D. y Bugg, T. D. H. (1998). Substrate selectivity and biochemical properties of 4-hydroxy-2-keto-pentanoic acid aldolase from *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4093-4094.

Popp, R., Kohl, T., Patz, P., Trautwein, G. y Gerischer, U. (2002). Differential DNA binding of transcriptional regulator PcaU from *Acinetobacter* sp. strain ADP1. *J. Bacteriol.* **184**: 1988-1997.

Postma, P. W., Lengeler, J. N., y Jacobson, R. (1993). Phosphoenolpyruvate carbohydrate phosphotransferase system in bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**: 543-594.

Powell, J. A. C. y Archer, J. A. C. (1998). Molecular characterisation of a *Rhodococcus ohp* operon. *Antonie van Leeuwenhoek.* **74**: 175-188.

Prieto, M. A., Díaz, E. y García, J. L. (1996). Molecular characterization of the 4-hydroxyphenylacetate catabolic pathway of *Escherichia coli* W: engineering a mobile aromatic degradative cluster. *J. Bacteriol.* **178**: 111-120.

Prieto, M. A. y García, J. L. (1997a). Identification of 4-hydroxyphenylacetate transport gene of *Escherichia coli* W: construction of a highly sensitive cellular biosensor. *FEBS Lett.* **414**: 293-297.

Prieto, M. A. y García, J. L. (1997b). Identification of a novel positive regulator of the 4-hydroxyphenylacetate catabolic pathway of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **232**: 759-765.

Prieto, M. A., Galán, B., Torres, B., Ferrández, A., Fernández, C., Miñambres, B., García, J. L. y Díaz, E. (2004). Aromatic metabolism versus carbon availability: the regulatory network that controls catabolism of less-preferred carbon sources in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**: 503-518.

Provencher, S. W y Glockner, J. (1981). Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry.* **20**: 33-37.

Ramos, J. L., Stolz, A., Reineke, W., y Timmis, K. N. (1986). Altered effector specificities in regulators of gene expression: TOL plasmid *xylS* mutants and their use to engineer expansion of the range of aromatics degraded by bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**: 8467-8471.

Ramos, J. L., Martínez-Bueno, M., Molina-Henares, A. J., Terán, W., Watanabe, K., Zhang, X., Gallegos, M. T., Brennan, R., y Tobes, R. (2005). The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**: 326-356.

Reed, W. L. y Schleif, R. F. (1999). Hemiplegic mutations in AraC protein. *J. Mol. Biol.* **294**: 417-425.

- Reverchon, S., Nasser, W. y Robert-Baudouy, J.** (1991). Characterisation of *kdgR*, a gene of *Erwinia chrysanthemi* that regulates pectin degradation. *Mol. Microbiol.* **5**: 2203-2216.
- Richet, E. y Sogaard-Andersen, L.** (1994). CRP induces the repositioning of MaIT at the *Escherichia coli malKp* promoter primarily through DNA bending. *EMBO J.* **13**: 4558-4567.
- Rintoul, M. R., Cusa, E., Baldomá, L., Badia, J., Reitzer, L. y Aguilar, J.** (2002). Regulation of the *Escherichia coli* allantoin regulon: coordinated function of the repressor AllR and the activator AllS. *J. Mol. Biol.* **324**: 599- 610.
- Romero-Steiner, S., Parales, R. E., Harwood, C. S. y Houghton, J. E.** (1994). Characterization of the *pcaR* regulatory gene from *Pseudomonas putida*, which is required for the complete degradation of *p*-hydroxybenzoate. *J. Bacteriol.* **176**: 5771-5779.
- Rojas, A., Segura, A., Guazzaroni, M. E., Terán, W., Hurtado, A., Gallegos, M. T. y Ramos, J. L.** (2003). *In vivo* and *in vitro* evidence that TtgV is the specific regulator of the TtgGHI multidrug and solvent efflux pump of *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **185**: 4755-4763.
- Rojo, F. y Dinamarca, A.** (2004). Catabolite repression and physiological control. J. L. Ramos (ed), *Pseudomonas*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, London, United Kingdom. 365-387.
- Saier, M. H.** (1997). Multiple mechanism controlling carbon metabolism in bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* **58**: 170-174.
- Saier, M. H. Jr., Beatty, J. T., Goffeau, A., Harley, K. T., Heijne, W. H., Huang, S. C., Jack, D. L., Jähn, P. S., Lew, K., Liu, J., Pao, S. S., Paulsen, I. T., Tseng, T. T. y Virks, P. S.** (1999). The major facilitator superfamily. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1**: 257-279.
- Salto, R., Delgado, A., Michán, C., Marqués, S. y Ramos, J. L.** (1998). Modulation of the function of the signal receptor domain of XylR, a member of a family of prokaryotic enhancer-like positive regulators. *J. Bacteriol.* **180**: 600-604.
- Sambrook, J. y Russell, D. W.** (2001). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. CSHL Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.
- Sanger, T., Nicklen, S. y Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**: 5463-5467.
- Santamarta, I., López-García, M. T., Pérez-Redondo, R., Koekman, B., Martín, J. F. y Liras, P.** (2007). Connecting primary and secondary metabolism: AreB, an IclR-like protein, binds the ARE (*ccaR*) sequence of *S. clavuligerus* and modulates leucine biosynthesis and cephamycin C and clavulanic acid production. *Mol. Microbiol.* **66**: 511-524.

- Sasse-Dwight, S. y Gralla, J. D.** (1989). KMnO₄ as a probe for *lac* promoter melting and mechanism *in vivo*. *J. Biol. Chem* **264**: 8074-8081.
- Savage, D. C.** (1977). Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Ann. Rev. Microbiol.* **31**: 107-133.
- Schell, M. A.** (1993). Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**: 597-626.
- Scholz, O., Kostner, M., Reich, M., Gastiger, S. y Hillen, W.** (2003). Teaching TetR to recognize a new inducer. *J. Mol. Biol.* **329**: 217-227.
- Schuck, P. y Rossmanith, P.** (2000) Determination of the sedimentation coefficient distribution by least-squares boundary modeling. *Biopolymers.* **54**: 328-341.
- Schuck, P., Perugini, M. A., Gonzales, N. R., Howlett, G. J. y Schubert, D.** (2002). Size-distribution analysis of proteins by analytical ultracentrifugation: strategies and application to model systems. *Biophys. J.* **82**:1096-1111.
- Simon, R., Priefer, U. y Pühler, A.** (1983). A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technology.* **1**: 784-791.
- Smith, C. P. y Chater, K. F.** (1988a). Structure and regulation of controlling sequences for the *Streptomyces coelicolor* glycerol operon. *J. Mol. Biol.* **204**: 569-580.
- Smith, C. P. y Chater, K. F.** (1988b). Cloning and transcription analysis of the entire glycerol utilization (*gylABX*) operon of *Streptomyces coelicolor*A3(2) and identification of a closely associated transcription unit. *Mol. Gen. Genet.* **211**: 129-137.
- Soisson, S. M., MacDougall-Shackleton, B., Schleif, R. y Wolberger, C.** (1997). Structural basis for ligand-regulated oligomerization of AraC. *Science.* **276**: 421-425.
- Song, Y., Tong, Z., Wang, J. et al.** (2004). Complete genome sequence of *Yersinia pestis* strain 91001, an isolate avirulent to humans. *DNA Res.* **11**: 179-197.
- Spence, E. L., Kawamukai, M., Sanvoisin, J., Braven, H. y Bugg, T. D. H.** (1996). Catechol dioxygenases from *Escherichia coli* (MhpB) and *Alcaligenes eutrophus* (MpcI): sequence analysis and biochemical properties of a third family of extradiol dioxygenases. *J. Bacteriol.* **178**: 5249-5256.
- Sreerama, N. y Woody, R. W.** (2000). Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal. Biochem.* **287**: 252-260.
- Straney, D. C., Straney, S. B. y Crothers, D. M.** (1989). Synergy between *Escherichia coli* CAP protein and RNA polymerase in the *lac* promoter open complex. *J. Mol. Biol.* **206**: 41-57.

- Stülke, J. y Hillen, W.** (1999). Carbon catabolite repression in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**: 195-201.
- Suh, S. J., Runyen-Janecky, L. J., Maleniak, T. C., Hager, P., MacGregor, C. H., Zielinski-Mozny, N. A., Phibbs Jr., P. V. y West, S. E.** (2002). Effect of *yfr* mutation on global gene expression and catabolite repression control of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology.* **148**: 1561-1569.
- Sunnarborg, A., Klumpp, D., Chung, T. y Laporte, D. C.** (1990). Regulation of the glyoxylate bypass operon: cloning and characterization of IclR. *J. Bacteriol.* **172**: 2642-2649.
- Svergun, D. I.** (1992). Determination of the regularization parameter in Indirect-Transform Methods using perceptual criteria. *J. Appl. Cryst.* **25**: 495-503.
- Svergun, D. I., Barberato, C. y Koch, M. H. J.** (1995). CRY SOL – a program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *J. Appl. Cryst.* **28**: 768-773.
- Swank, R. T. y Munkres, K. D.** (1971). Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrilamide gel with sodium dodecyl sulfate. *Anal. Biochem.* **39**:462-477.
- Sze, C. C. y Shingler, V.** (1999). The alarmone (p)ppGpp mediates physiological-responsive control at the sigma 54-dependent Po promoter. *Mol. Microbiol.* **31**: 1217-1228.
- Tagami, H. y Aiba, H.** (1995). Role of CRP in transcription activation at *Escherichia coli lac* promoter: CRP is dispensable after the formation of open complex. *Nucleic Acids Research.* **23**: 599-605.
- Terán, W., Felipe, A., Fillet, S., Guazzaroni, M. E., Krell, T., Ruiz, R., Ramos, J. L. y Gallegos, M. T.** (2007). Complexity in efflux pump control: cross-regulation by the paralogues TtgV and TtgT. *Mol. Microbiol.* **66**: 1416-1428.
- Thayer, J. R. y Wheelis, M. L.** (1976). Characterization of a benzoate permease mutant of *Pseudomonas putida*. *Arch. Microbiol.* **110**: 37-42.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. y Gibson, J. D.** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-4680.
- Thomson, N. R., Nasser, W., McGowan, S., Sebahia, M. y Salmond, G. P. C.** (1999). *Erwinia carotovora* has two KdgR-like proteins belonging to the IclR family of transcriptional regulators: identification and characterization of the RexZ activator and the KdgR repressor of pathogenesis. *Microbiology.* **145**: 1531-1545.
- Torres, B.** (2002). Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

- Torres, B., Porras, G., García, J. L. y Díaz, E.** (2003). Regulation of the *mhp* cluster responsible for 3-(3-hydroxyphenyl) propionic acid degradation in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **278**: 27575-27585.
- Tralau, T., Cook, A. M. y Ruff, J.** (2003). An additional regulator, TsaQ, is involved with TsaR in regulation of transport during the degradation of ρ -toluenesulfonate in *Comamonas testosteroni* T-2. *Arch. Microbiol.* **180**: 319-326.
- Trautwein, G. y Gerischer, U.** (2001). Effects exerted by transcriptional regulator PcaU from *Acinetobacter* sp. strain ADP1. *J. Bacteriol.* **183**: 873-881.
- Tropel, D. y van der Meer, J. R.** (2004). Bacterial transcriptional regulators of degradation pathways of aromatic compounds. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**: 474-500.
- Tsoi, T. V., Plotnikova, E. G., Cole, J. R., Guerin, W. F., Bagdasarian, M. y Tiedje, J. M.** (1999). Cloning, expression, nucleotide sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* 142 *ohb* genes coding for oxygenolytic ortho dehalogenation of halobenzoates. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2151-2162.
- Turlin, E., Perrotte-piquemal, M., Danchin, A. y Biville, F.** (2001). Regulation of the early steps of 3-phenylpropionate catabolism in *Escherichia coli*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**: 127-133.
- Turlin, E., Sismeiro, O., Le Caer, J. P., Labas, V., Danchin, A. y Biville, F.** (2005). 3-phenylpropionate catabolism and the *Escherichia coli* oxidative stress response. *Res. Microbiol.* **156**: 312-321.
- Veselý, M., Knoppová, M., Nesvera, J. y Pátek, M.** (2007). Analysis of *catRABC* operon for catechol degradation from phenol-degrading *Rhodococcus erythropolis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76**: 159-168.
- Volkov, V. V. y Svergun, D. I.** (2003). Uniqueness of *ab initio* shape determination in small-angle scattering. *J. Appl. Cryst.* **36**: 860-864.
- Wade, J. T., Belyaeva, T. A., Hyde, E. I. y Busby, S.** (2001). A simple mechanism for co-dependence on two activators at an *Escherichia coli* promoter. *EMBO J.* **20**: 7160-7167.
- Walker, J. R., Altamentova, S., Ezersky, A., Lorca, G., Skarina, T., Kudritska, M., Ball, L. J., Bochkarev, A. y Savchenko, A.** (2006). Structural and biochemical study of effector molecule recognition by the *E. coli* glyoxylate and allantoin utilization regulatory protein AIIR. *J. Mol. Biol.* **358**: 810-828.
- Weber, P. C. Pantoliano, M. W. y Salemme, F. R.** (1995). Crystallographic and thermodynamic comparison of structurally diverse molecules binding to streptavidin. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **51**: 590-596.
- Webster, C., Gaston, K. y Busby, S.** (1988). Transcription from the *Escherichia coli melR* promoter is dependent on the cyclic AMP receptor protein. *Gene.* **68**: 297-305.

- West, S. E., Sample, A. K. y Runyen-Janecky, L. J.** (1994). The *vfr* gene product, required for *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and protease production, belongs to the cyclic AMP receptor protein family. *J. Bacteriol.* **176**: 7532-7542.
- Widdel, F. y Rabus, R.** (2001). Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**: 259-276.
- Wilbur, W. J. y Lipman, D. J.** (1983). Rapid similarity searches of nucleic acid and protein data banks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**: 725-730.
- Williams, P. A. y Shaw, L. E.** (1997). *mucK*, a gene in *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1 (BD413), encodes the ability to grow on exogenous *cis, cis*-muconate as the sole carbon source. *J. Bacteriol.* **179**: 5935-5942.
- Wintjens, R. y Rooman, M.** (1996). Structural classification of HTH DNA-binding domains and protein-DNA interaction modes. *J. Mol. Biol.* **262**: 294-313.
- Wirth, R., Friesenegger, A. y Fiedler, S.** (1989). Transformation of various species of Gram-negative bacteria belonging to 11 different genera by electroporation. *Mol. Gen. Genet.* **216**: 175-177.
- Wong, C. M., Dilworth, M. J. y Glenn, A. R.** (1994). Cloning and sequencing show that 4-hydroxybenzoate hydroxylase (PobA) is required for uptake of 4-hydroxybenzoate in *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology.* **140**: 2775-2786.
- Woody, R. W.** (1995). Circular dichroism. *Methods Enzimol.* **246**: 34-71.
- Wriggers, W. y Chacón, P.** (2001). Using *situs* for the registration of protein structures with low-resolution bead models from X-ray solution scattering. *J. Appl. Cryst.* **34**: 773-776.
- Yamada, M., Kabir, M. S. y Tsunedomi, R.** (2003). Divergent promoter organization may be a preferred structure for gene control in *Escherichia coli*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **6**: 206-210.
- Yamamoto, K. e Ishihama, A.** (2003). Two different modes of transcription repression of the *Escherichia coli* acetate operon by IclR. *Mol. Microbiol.* **47**: 183-194.
- Yamashita, M., Azakami, H., Yokoro, N., Roh, J.H., Suzuki, H., Humagai, H. y Murooka, Y.** (1996). *maoB*, a gene that encodes a positive regulator of the monoamine oxidase (*maoA*) in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**: 2941-2947.
- Yamazaki, H., Ohnishi, Y. y Horinouchi, S.** (2003). Transcriptional switch on a *ssgA* by A-factor, which is essential for spore septum formation in *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **185**: 1273-1283.
- Yang, Y. H., Song, E., Kim, E. J., Lee, K., Kim, W. S., Park, S. S., Hahn, J. S., y Kim, B. G.** (2008). NdgR, an IclR-like regulator involved in amino-acid-dependent growth, quorum sensing, and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*

Zhang, H. B., Wang, C. y Zhang, L. H. (2004). The quorumone degradation system of *Agrobacterium tumefaciens* is regulated by starvation signal and stress alarmone (p)ppGpp. *Mol. Microbiol.* **52**: 1389-1401.

Zhang, R. G., Kim, Y., Skarina, T., Beasley, S., Laskowski, R., Arrowssmith, C., Edwards, A., Joachimiak, A. y Savchenko, A. (2002). Crystal structure of *Thermotoga maritima* 0065, a member of the IclR transcriptional factor family. *J. Biol. Chem.* **277**: 19183-19190.

Zhou, L., Timmis, K. N. y Ramos, J. L. (1990). Mutations leading to constitutive expression from the TOL plasmid meta-cleavage pathway operon are located at the C-terminal end of the positive regulator protein XylS. *J. Bacteriol.* **172**: 3707-3710.

Zhu, J. y Winans, S. C. (1999). Autoinducer binding by the quorum-sensing regulator TraR increases affinity for target promoters *in vitro* and decreases TraR turnover rates in whole cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**: 4832-4837.