



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

**Función de la Proteína CdnL en las Bacterias
Myxococcus xanthus y *Caulobacter crescentus***

D^a. Aránzazu Gallego García

2015



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

**Función de la Proteína CdnL en las Bacterias
Myxococcus xanthus y *Caulobacter crescentus***

D^a. Aránzazu Gallego García

2015

ÍNDICES

ÍNDICE DE MATERIAS

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 Regulación de la expresión génica en bacterias.....	3
I.1.1 La polimerasa de RNA	3
I.1.1.1 Estructura	3
I.1.1.2 Los promotores bacterianos	6
I.1.1.3 Inicio de la transcripción.....	8
I.1.2 Factores σ en bacterias.....	11
I.1.3 Reguladores transcripcionales	14
I.1.3.1 Activación transcripcional simple.....	15
I.1.3.2 Represión transcripcional simple.....	18
I.1.3.3 Reguladores que interaccionan con la RNAP	21
I.1.4 La respuesta general al estrés ("stringent response"): regulación de la transcripción del rRNA	25
I.2 <i>Myxococcus xanthus</i>	34
I.2.1 Características generales de las mixobacterias.....	34
I.2.2 Ciclo de vida de <i>M. xanthus</i>	35
I.2.3 Carotenogénesis en <i>M. xanthus</i>	37
I.2.4 CarD y CarG de <i>M. xanthus</i>	39
I.2.4.1 El operón carD-carG	39
I.2.4.2 La proteína CarD.....	40
I.2.4.3 CdnL	43
I.3 Objetivos	45
II. MATERIALES Y MÉTODOS	47
II.1 Estirpes y plásmidos	49
II.1.1 Estirpes.....	49
II.1.1.1 Estirpes de <i>M. xanthus</i>	49
II.1.1.2 Estirpes de <i>C. crescentus</i>	51
II.1.1.3 Estirpes de <i>E. coli</i>	54
II.1.2 Plásmidos	55
II.2 Medios de crecimiento	64
II.2.1 Medios ricos para <i>M. xanthus</i>	64
II.2.2 Medio de fructificación para <i>M. xanthus</i>	65
II.2.3 Medio rico para <i>C. crescentus</i>	65
II.2.4 Medios mínimos para <i>C. crescentus</i>	65

II.2.5 Medios ricos para <i>E. coli</i>	67
II.3 Condiciones de cultivo.....	68
II.4 Inducción del desarrollo multicelular de <i>M. xanthus</i>	68
II.5 Tampones y soluciones	68
II.5.1 Electroforesis de DNA	68
II.5.2 Electroforesis de proteínas.....	69
II.5.3 Purificación de proteínas.....	69
II.5.4 Detección de proteínas mediante anticuerpos específicos	69
II.5.5 Determinación de la actividad β -galactosidasa.....	70
II.5.6 Inmunoprecipitación de cromatina.....	70
II.6 Extracción de DNA	70
II.7 Transferencia de DNA	71
II.7.1 Transformación de <i>E. coli</i>	71
II.7.2 Transformación de <i>M. xanthus</i>	71
II.7.3 Transformación de <i>C. crescentus</i>	71
II.8 Tratamiento enzimático del DNA	72
II.9 Amplificación de DNA mediante PCR	72
II.10 Secuenciación de DNA.....	73
II.11 Extracción de RNA	73
II.11.1 Extracción de RNA en <i>C. crescentus</i>	73
II.11.2 Cuantificación de RNA y calidad del RNA	73
II.12 Procedimientos de mutagénesis	75
II.13 Técnicas electroforéticas.....	75
II.13.1 Electroforesis de DNA en gel de agarosa.....	75
II.13.2 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS	76
II.13.3 Electroforesis de DNA en gel de acrilamida no desnaturalizante.....	76
II.13.4 Electroforesis de DNA en gel de acrilamida desnaturalizante.....	76
II.14 Expresión y purificación de proteínas	77
II.15 Detección de proteínas mediante anticuerpos específicos.....	78
II.16 Ensayos de cuantificación relativa mediante RT-PCR en tiempo real	80
II.17 Ensayo de doble híbrido bacteriano (DHB)	82
II.18 Expresión de β-galactosidasa	83
II.18.1 Expresión de β -galactosidasa en <i>C. crescentus</i>	83
II.18.2 Expresión de β -galactosidasa en <i>E. coli</i>	84
II.19 Ensayos de cambio en la movilidad electroforética	84
II.19.1 Transcripción <i>in vitro</i>	84
II.20 Inmunoprecipitación de cromatina.....	85
II.21 Observación de células al microscopio óptico	87

III. RESULTADOS	89
III.1 Análisis de la estructura-función de CdnL de <i>M. xanthus</i>	91
III.1.1 Arquitectura de dominios de CdnL e interacciones.....	92
III.1.2 Estructura tridimensional de CdnL determinada por RMN	95
III.1.2.1 El dominio N-terminal de CdnL.....	95
III.1.2.2 El dominio C-terminal de CdnL.....	96
III.1.2.3 Comparación de la estructura de CdnL determinada por RMN con la de sus homólogos TtCdnL y MtCdnL determinadas por cristalografía.....	97
III.1.3 Conservación de los contactos proteína-proteína entre CdnL y la β RNAP	98
III.1.3.1 Interacción CdnL- β RNAP en <i>T. thermophilus</i>	99
III.1.3.2 Interacción CdnL- β RNAP en <i>M. xanthus</i>	101
III.1.4 Efecto de la pérdida de la interacción CdnL-RNAP <i>in vivo</i> en <i>M. xanthus</i>	104
III.1.5 CdnLCt ejerce un papel específico y crucial en la función de CdnL.....	106
III.1.5.1 Efecto <i>in vivo</i> de las mutaciones en CdnLCt	107
III.1.5.2 CdnLCt no se une al DNA <i>in vitro</i>	109
III.1.6 CdnL, a diferencia de DksA, no está implicado en la respuesta al estrés nutricional en <i>M. xanthus</i>	110
III.1.7 CdnL estabiliza la unión de la RNAP y promueve la transcripción de los promotores dependientes de σ^A	113
III.1.7.1 Estudio de la asociación de CdnL a P_{4rmD} y P_B <i>in vivo</i> mediante inmunoprecipitación de cromatina	113
III.1.7.2 Análisis del efecto de CdnL sobre la unión del holoenzima RNAP- σ^A a P_{4rmD} y P_B <i>in vitro</i> mediante retraso en la movilidad electroforética.....	115
III.1.7.3 Ensayos de transcripción <i>in vitro</i>	117
III.2 Caracterización funcional del homólogo de CdnL en <i>C. crescentus</i>	118
III.2.1 Análisis del contexto genómico y de la estructura primaria de CdnL de <i>C. crescentus</i> (CcCdnL).....	119
III.2.2 CcCdnL es esencial para el crecimiento y la viabilidad celular en <i>C. crescentus</i>	122
III.2.3 El gen $cccdnL$ se expresa constitutivamente <i>in vivo</i>	124
III.2.4 CcCdnL está sujeta a degradación por ClpXP	126
III.2.5 Análisis de la interacción de CcCdnL con la subunidad β de la RNAP, consigo misma y con el DNA	129
III.2.6 CcCdnL se une <i>in vivo</i> a la región promotora del rRNA y activa su transcripción	133
III.2.7 Las mutaciones que afectan a la función de CcCdnL son sensibles a frío	

III.2.7.1 Mutaciones en el dominio N-terminal de CcCdnL.....	137
III.2.7.2 Las mutaciones que afectan a la función de CcCdnL son sensibles a frío	140
IV. DISCUSIÓN.....	143
IV.1 CdnL de <i>M. xanthus</i>.....	145
IV.1.1 Arquitectura de dominios de CdnL en <i>M. xanthus</i>	145
IV.1.2 Interacción de CdnL con la RNAP: importancia y conservación evolutiva	147
IV.1.3 El dominio C-terminal de CdnL es esencial para su función	148
IV.1.4 CdnL no está implicado en el desarrollo multicelular	149
IV.1.5 Función reguladora de CdnL	150
IV.2 CdnL de <i>C. crescentus</i>.....	156
IV.2.1 Conservación de la función de CdnL en <i>C. crescentus</i>	156
IV.2.2 Regulación de la expresión de CdnL en <i>C. crescentus</i>	157
IV.2.3 Implicación de CcCdnL en la regulación de la expresión del rRNA	158
IV.2.4 Las mutaciones que afectan a la función de CcCdnL son sensibles a frío	160
V. CONCLUSIONES.....	163
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	167

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	4
Figura 2	6
Figura 3	7
Figura 4	9
Figura 5	10
Figura 6	12
Figura 7	15
Figura 8	16
Figura 9	18

Figura 10	19
Figura 11	23
Figura 12	26
Figura 13	27
Figura 14	28
Figura 15	29
Figura 16	30
Figura 17	31
Figura 18	32
Figura 19	36
Figura 20	39
Figura 21	41
Figura 22	74
Figura 23	82
Figura 24	92
Figura 25	93
Figura 26	94
Figura 27	95
Figura 28	96
Figura 29	98
Figura 30	99
Figura 31	100
Figura 32	101

Figura 33	102
Figura 34	103
Figura 35	105
Figura 36	106
Figura 37	108
Figura 38	109
Figura 39	110
Figura 40	111
Figura 41	112
Figura 42	113
Figura 43	114
Figura 44	115
Figura 45	116
Figura 46	117
Figura 47	118
Figura 48	119
Figura 49	120
Figura 50	121
Figura 51	122
Figura 52	123
Figura 53	124
Figura 54	125
Figura 55	126

Figura 56	127
Figura 57	128
Figura 58	129
Figura 59	131
Figura 60	132
Figura 61	133
Figura 62	134
Figura 63	135
Figura 64	136
Figura 65	138
Figura 66	139
Figura 67	139
Figura 68	140
Figura 69	140
Figura 70	141
Figura 71	142
Figura 72	142
Figura 73	152
Figura 73	155
Figura 74	159

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	49
Tabla 2	52
Tabla 3	55
Tabla 4	55
Tabla 5	59
Tabla 6	62
Tabla 7	121

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Regulación de la expresión génica en bacterias

Las bacterias habitan nichos muy diversos. Podemos encontrarlas en tierra, agua y aire; en animales y plantas; y bajo condiciones ambientales extremas. Todo ello sugiere una capacidad casi infinita de desarrollar mecanismos para adaptarse a la enorme variedad de ambientes que hay en la Tierra. Pese a esta gran variedad de estilos de vida que observamos, muchos genes o productos génicos están conservados en las diferentes especies bacterianas. Por ello, en muchas ocasiones, dicha adaptación viene mediada por cuánto y cuándo se expresan dichos genes. Así pues, las bacterias deben detectar los cambios que tienen lugar en su entorno, y responder de forma adecuada activando o reprimiendo determinados grupos de genes. El primer evento que tiene lugar en el proceso de expresión génica es la transcripción, que consiste en la síntesis de RNA utilizando como molde DNA. En bacterias, la transcripción de los distintos tipos de RNA es llevada a cabo por un único enzima, la polimerasa de RNA (en adelante RNAP), y en el proceso de transcripción se distinguen tres etapas: iniciación, elongación y terminación. Aunque el control de la expresión génica puede tener lugar a cualquier nivel, es el inicio de la transcripción el paso que suele ser objeto de regulación. A su vez, el inicio de la transcripción comprende varios pasos, cada uno de los cuales supone una oportunidad para la actuación de distintos factores: los componentes de la propia RNAP, los factores de acción trans (activadores, represores y adaptadores) y los elementos de acción cis (promotores, operadores e intensificadores).

I.1.1 La polimerasa de RNA

I.1.1.1 Estructura

La RNAP es una holoenzima formada por un núcleo catalítico (con una masa molecular de ~ 400 kDa) muy conservado a lo largo de la evolución tanto en secuencia como en estructura y función, capaz por sí mismo de la síntesis de RNA, y por una subunidad adicional denominada sigma, σ , presente solo en bacterias, que permite el reconocimiento de una secuencia específica (promotor) a partir de la cual tiene lugar el inicio de la transcripción (Ebright, 2000).

El núcleo catalítico de la RNAP está formado por 5 subunidades, $\alpha_2\beta\beta'\omega$ (Figura 1), cuyo ensamblaje tiene lugar de forma secuencial. En primer lugar se forma un homodímero de subunidades α , que actúa como andamio sobre el cual se ancla la subunidad β ($\alpha_2\beta$). A continuación, a este intermedio se une la subunidad β' , con ayuda de la subunidad ω (Browning & Busby, 2004; Haugen *et al.*, 2008a). Finalmente, al núcleo catalítico ensamblado, se incorpora el factor σ , que aporta la mayoría de los determinantes para el reconocimiento del promotor (sobre el que se elaborará más adelante) y la apertura de la hebra de DNA, necesarios para la formación del complejo de transcripción abierto.

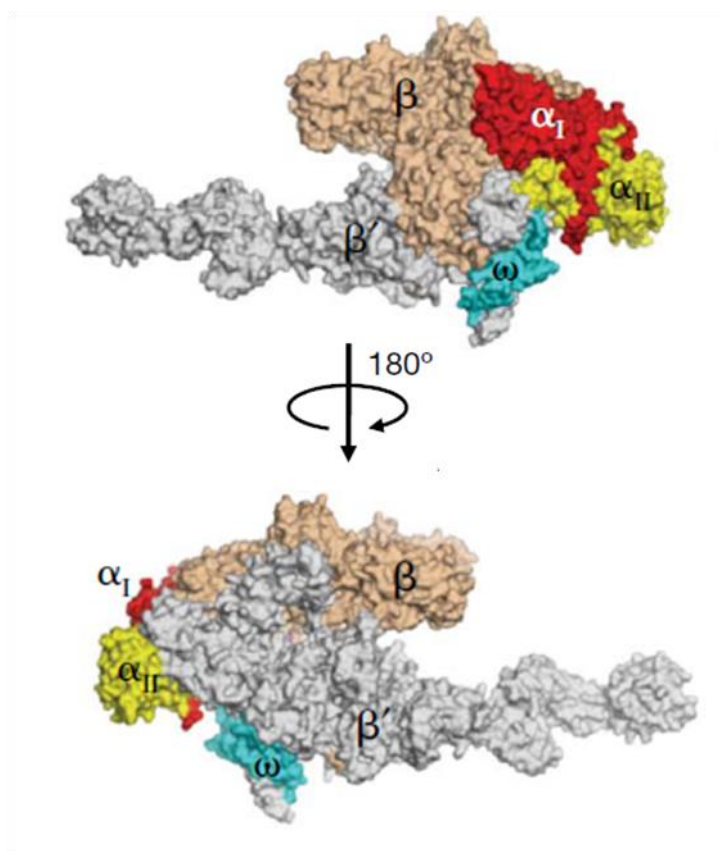


Figura 1. Estructura del núcleo de la polimerasa de RNA de *Thermus aquaticus*. Cada subunidad está marcada con un único color. Tomada de (Hirata *et al.*, 2008).

Los trabajos realizados con la RNAP de *Escherichia coli*, así como los estudios llevados a cabo con sus homólogas en las bacterias termófilas *Thermus thermophilus* y *Thermus aquaticus*, han permitido obtener datos a nivel estructural, y profundizar en su modo de acción. Estos estudios muestran que la arquitectura general, tanto del holoenzima como del núcleo, asemeja a las pinzas de un cangrejo, donde la extremidad pequeña de esta pinza sería la subunidad β , mientras que la subunidad β'

correspondería a la extremidad de mayor tamaño (Figura 1) (Borukhov & Nudler, 2003). Ambas proteínas forman así un amplio canal interno en cuya parte posterior se sitúa el centro activo de la enzima. Este centro activo está definido por una secuencia muy conservada de la subunidad β' , el motivo NADFDGD, cuyos aspartatos coordinan un ión Mg^{2+} crucial para la actividad de la enzima (Zaychikov *et al.*, 1996). Parte de la subunidad β' , “la hélice puente”, se extiende formando una pared que bifurca el canal en dos canales separados, el canal principal o de unión del DNA, y el canal secundario o de entrada de los nucleósidos 5'-trifosfato (NTPs) (Murakami, 2013; Zhang *et al.*, 1999). Cada una de las subunidades α de la RNAP consta de dos dominios unidos por un segmento conector flexible: un dominio N-terminal (α NTD) de mayor tamaño, implicado en la dimerización y en el ensamblaje de la RNAP, y un dominio C-terminal (α CTD), de interacción con el DNA, importante en la regulación de algunos promotores (Browning & Busby, 2004). Aunque ambas subunidades α son idénticas, la subunidad β interacciona únicamente con el dominio α NTD de uno de los monómeros mientras que la subunidad β' interacciona con el otro monómero (Zhang *et al.*, 1999).

La formación del holoenzima, interacción entre el núcleo y el factor σ , va acompañada de una serie de cambios en los distintos dominios estructurales (Vassilyev *et al.*, 2002). Sorprendentemente, la unión del factor σ provoca el cierre de las “pinzas” en lugar de su apertura, como cabría esperar dado que ha de acomodar la futura hebra de DNA de cadena doble (Figura 2) (Borukhov & Nudler, 2003). En el holoenzima, el factor σ se encuentra extendido, con cada uno de sus dominios efectuando amplias interacciones a lo largo de una de las caras de la RNAP. El área total de contacto entre el factor σ y el núcleo abarca una superficie de más de 8,200 Å² (Murakami *et al.*, 2002).

Los factores σ reconocen secuencias específicas de DNA, participan en la apertura del DNA, intervienen en las primeras etapas de la transcripción, y con frecuencia interactúan con reguladores de la transcripción.

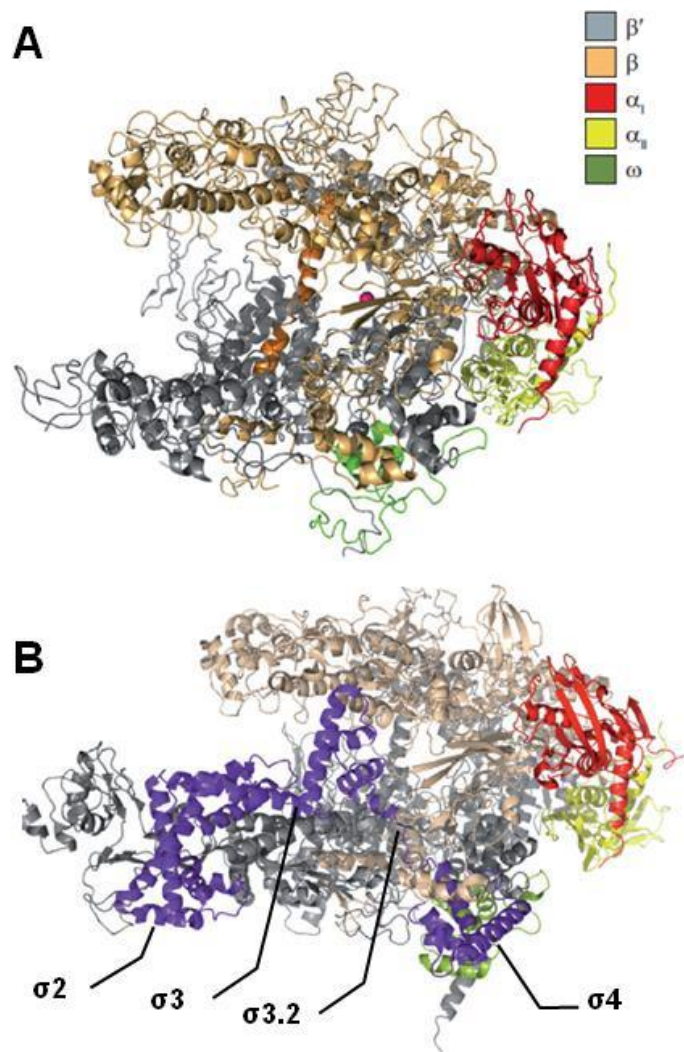


Figura 2. Unión del factor σ a la RNAP. A) Núcleo de la RNAP. B) Holoenzima con el factor σ^{70} , indicado en violeta (basado en *Thermus thermophilus*). Los colores (indicados en la leyenda) coinciden con aquellos en la figura 1, excepto la subunidad ω que está representada en verde en esta figura. Tomada de (Werner & Grohmann, 2011).

I.1.1.2 Los promotores bacterianos

El primer paso en el inicio de la transcripción es el reconocimiento por parte del holoenzima de secuencias aguas arriba del inicio de la transcripción denominadas promotores. Los elementos críticos de un promotor son aquellos cuya modificación provoca una pérdida significativa de la eficacia del inicio de la transcripción. De forma general, los promotores constan de dos elementos críticos, separados por una distancia óptima. La naturaleza de estos elementos determina el tipo de subunidad σ por la que serán reconocidos, modula la cantidad de RNA producido y es probable que contribuya también a la respuesta a los reguladores transcripcionales. Aunque el análisis comparativo de múltiples secuencias promotoras permite establecer

secuencias consenso, un promotor concreto rara vez coincide con dicho consenso, sugiriendo que a lo largo de la evolución la modificación de estas secuencias ha ido dirigida a rendir cantidades fisiológicamente apropiadas de cada transcrito específico. Puesto que en el reconocimiento del promotor por la RNAP interviene la subunidad σ , las diferentes clases de factores σ requieren distintas secuencias consenso. Se han descrito dos familias de factores σ , la familia σ^{54} y la familia σ^{70} . Dado que el objeto de estudio de esta tesis es una proteína implicada en la regulación de promotores dependientes de un miembro de esta última familia, a continuación se describirán los aspectos más relevantes de los promotores dependientes de los factores σ^{70} , principalmente basados en los estudios en *E. coli*. (Figura 3).

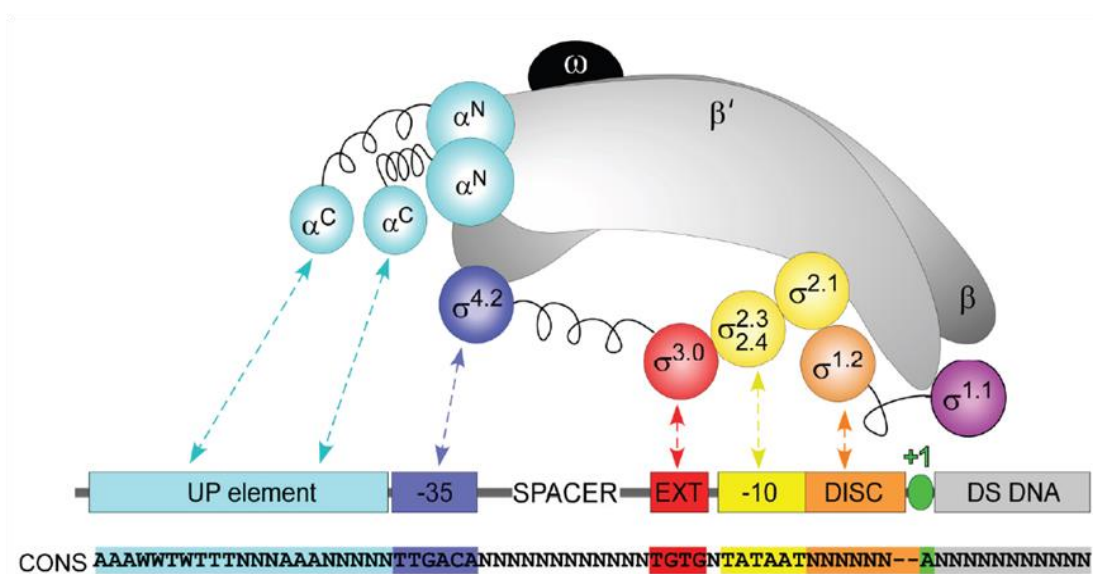


Figura 3. Esquema representativo del núcleo de la RNAP unido al factor σ^{70} y del promotor bacteriano dependiente de σ^{70} . Se indica mediante flechas las interacciones específicas entre el holoenzima y los determinantes para el reconocimiento de la secuencia promotora. RNAP: α , celeste; β y β' , gris; ω , negro. Promotor: elemento UP, celeste; elemento -35, azul, -10 extendida, rojo; elemento -10, amarillo; discriminador, naranja; inicio de la transcripción, verde; DNA aguas abajo del inicio de la transcripción, gris. Los segmentos flexibles de unión entre los distintos dominios en α y en σ se representan como muelles. Tomado de (Ruff *et al.*, 2015).

Los elementos principales, y más conservados, presentes en este tipo de promotores son: dos hexámeros conocidos como región -35 (TTGACA) y región -10 (TATAAT), localizados aproximadamente 35 y 10 pares de bases (pb) aguas arriba del inicio de la transcripción (+1) (Feklistov, 2013), separados por un fragmento de DNA, o región espaciadora (espaciador), que suele ser de 17 pb, aunque su tamaño puede oscilar entre 15 y 21 pb.

Existen, asimismo, otra serie de elementos que podemos encontrar en un promotor: la región -10 extendida, el elemento “UP”, la región discriminatoria y el elemento CRE. La región -10 extendida, cuya secuencia consenso es 5'TGn3' (siendo n cualquier nucleótido), está situada inmediatamente aguas arriba de la región -10 (Sanderson *et al.*, 2003) y confiere mayor estabilidad al híbrido DNA-RNA. El elemento “UP” es una secuencia de aproximadamente 20 pb rica en pares AT situada aguas arriba de la región -35 (-40 a -60). En los promotores que presentan el elemento “UP”, el dominio α CTD interacciona a través del surco menor con dicho elemento (Ross *et al.*, 2001). La región discriminatoria, o discriminador, es una secuencia rica en pares GC de unos 6-8 pb situada inmediatamente aguas abajo de la región -10. Dado el alto contenido en pares GC de esta región, inicialmente se consideró que su función iba dirigida a impedir la separación de la doble hebra de DNA (Jung & Lee, 1997; Lamond & Travers, 1985; Pemberton *et al.*, 2000; Travers, 1980). Sin embargo, estudios posteriores sugieren que el discriminador juega un papel importante regulando la vida media del complejo de transcripción abierto (Haugen *et al.*, 2006). Además, en algunos promotores podemos encontrar un elemento denominado CRE (del inglés core recognition element), situado entre las bases -2 y +4 de la cadena codificante, que es reconocido por la subunidad β de la RNAP cuando ya se ha formado la burbuja de transcripción (Zhang *et al.*, 2012).

La importancia de cada uno de estos elementos depende del promotor. Así, promotores deficientes en alguno de sus elementos pueden compensar dicha falta con la presencia o mejora de otro. Por lo tanto, es el conjunto de elementos de un promotor lo que determina en gran parte su eficiencia. En ocasiones, para una mejor regulación, es necesaria la participación de otros factores, denominados reguladores transcripcionales, que se encargan de modular la actividad de un determinado promotor o grupo de promotores en función de las condiciones ambientales y del estado metabólico de la bacteria.

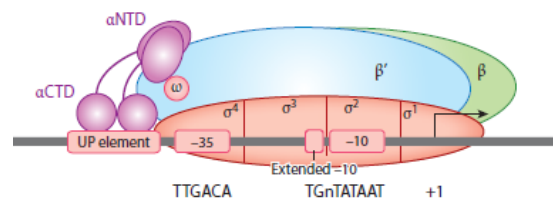
I.1.1.3 Inicio de la transcripción

El inicio de la transcripción es un proceso que comprende múltiples pasos (Figura 4 y 5). En primer lugar, el holoenzima se une a una secuencia promotora formando el complejo inicial de reconocimiento o complejo cerrado (RP_c), denominado así ya que en este paso el DNA permanece íntegramente en forma de doble cadena o cerrado. En el RP_c , la RNAP reconoce elementos específicos en el promotor (comentados en el apartado anterior), pero este complejo DNA-RNAP no es muy

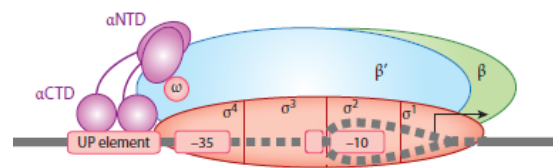
estable y puede ser fácilmente revertido en presencia de competidores tales como DNA inespecífico o heparina (un polianión).

La interacción de la RNAP con el DNA origina una serie de cambios en ambas biomoléculas, en conjunto conocidos como “isomerización”, en los cuales el DNA es doblado a nivel del nucleótido -11/-12 y tiene lugar la apertura de aproximadamente unas 13 pb, desde el elemento -10 hasta más allá del inicio de la transcripción, dando lugar a la formación de una burbuja de transcripción inicial y un complejo abierto inestable. A continuación, el DNA alrededor del inicio de la transcripción se posiciona en el centro activo, con el nucleótido +1 de la hebra molde listo para el emparejamiento con el NTP entrante. El dúplex de DNA aguas abajo es retenido por las “pinzas” que forman la subunidad β y β' , estabilizándose así el RP_0 . En general, el RP_0 es resistente a competidores, aunque la estabilidad de este complejo varía en función de las características propias de cada promotor. Una vez formado el RP_0 , comienza la síntesis de RNA, y por tanto, la formación del complejo inicial de transcripción (RP_i). Sin embargo, en la mayoría de los promotores, se requieren varios intentos previos, en los que se sintetizan y liberan RNAs abortivos, de una longitud de entre 2-12 nucleótidos. La región 3.2 del factor σ (de la que se hablará en el apartado

Unión de la RNAP al promotor



Isomerización



Transcripción

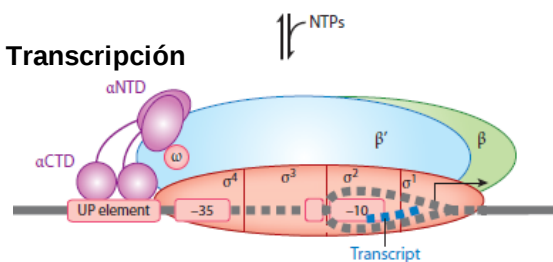


Figura 4. Pasos en el inicio de la transcripción.
Tomado de (Lee *et al.*, 2012a).

siguiente) está posicionada en el canal de salida del RNA. Así, cuando la cadena de RNA sintetizado alcanza una longitud mayor, y comienza a salir a través de este canal, el factor σ es desplazado. Con la liberación del factor sigma (en algunos casos parcial), la iniciación abortiva cesa, la fase de iniciación se considera completa, y comienza la fase de elongación (Gries *et al.*, 2010; Hook-Barnard & Hinton, 2007).

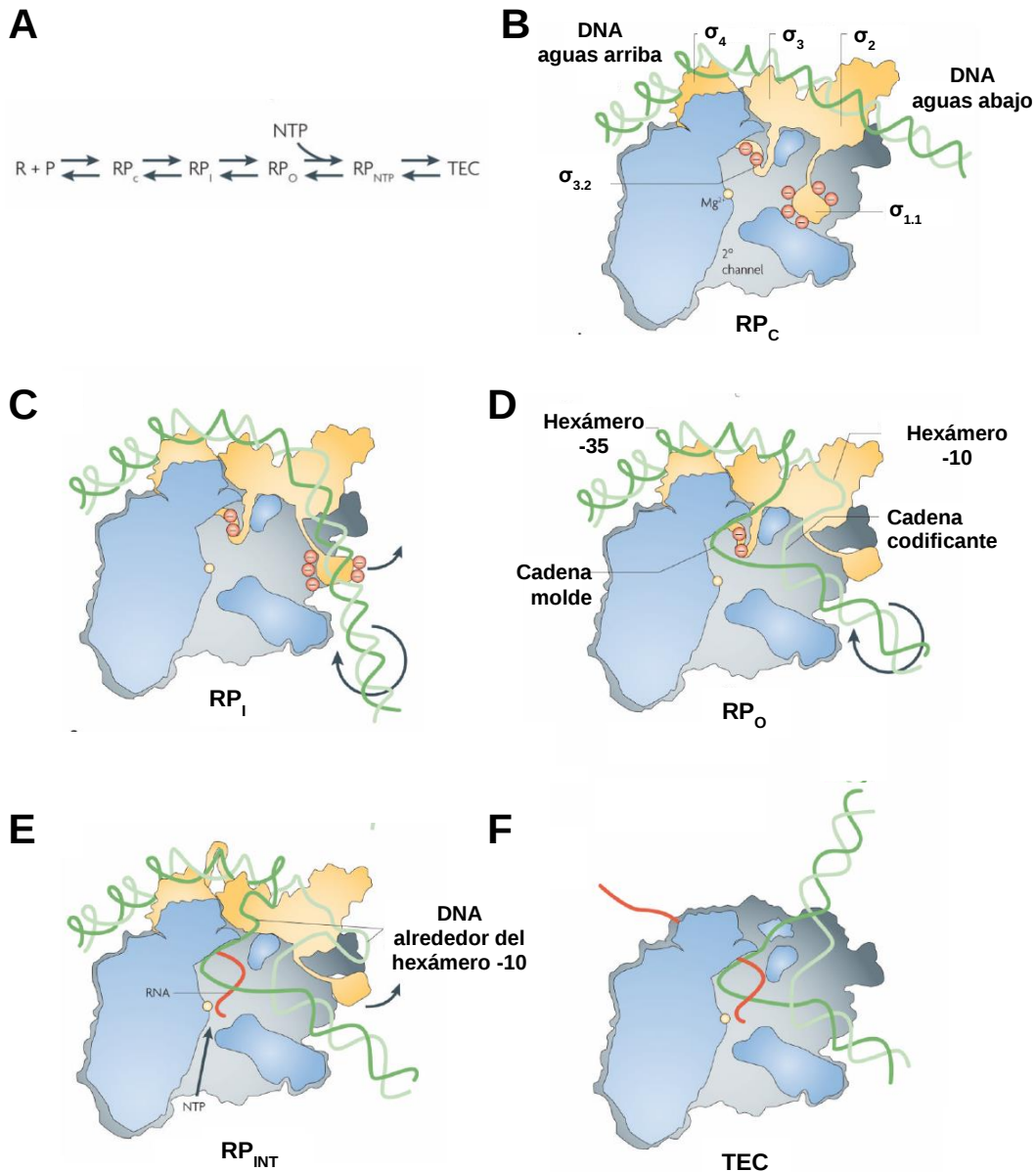


Figura 5. Detalle de los pasos en el inicio de la transcripción. En A se resumen los diferentes pasos en el inicio de la transcripción (NTPs, nucleósido trifosfato), mostrados de forma más detallada en B-F. RP_c , complejo cerrado; RP_i , hace referencia a los diferentes intermediarios formados durante la isomerización; RP_o , complejo abierto; RP_{INT} , complejo inicial de transcripción; TEC , complejo transcripcional de elongación. En verde oscuro, la cadena molde; en verde claro, la cadena codificante; y en rojo, el RNA transcrito saliendo por el canal de salida del RNA. (Tomado de Haugen *et al.*, 2008)

I.1.2 Factores σ en bacterias

Las bacterias poseen un único factor σ principal, responsable de la transcripción de la gran mayoría de promotores durante la fase de crecimiento vegetativo y, generalmente, varios factores σ alternativos que reconocen grupos de genes activables en condiciones específicas. Tal repertorio de factores σ varía ampliamente de una especie a otra y suele reflejar su estilo de vida. Aquellas bacterias cuyo ambiente es relativamente estable suelen poseer un único factor σ , como es el caso del patógeno intracelular *Mycoplasma genitalium*. En cambio, *E. coli*, cuyo hábitat es el tracto digestivo, presenta 7 factores σ . El número de factores σ se incrementa notablemente en organismos que se encuentran sometidos a constantes fluctuaciones en sus condiciones de crecimiento, como ocurre con *Streptomyces coelicolor* que cuenta con más de 60 factores σ alternativos de tipo ECF (de *extracytoplasmatic function*; véase más abajo) (Gruber & Gross, 2003). Muchas mixobacterias también se caracterizan por un número elevado de factores σ -ECF, como *Myxococcus xanthus* (~45), *Sorangium cellulosum* (~87), y *Plesiocystis pacifica* (~118), que presenta el mayor número de σ -ECF conocido hasta el momento (Abellón-Ruiz *et al.*, 2014). Todo este arsenal de factores σ proporciona a la bacteria la oportunidad tanto de mantener la expresión génica basal como de responder de manera eficiente ante un determinado estímulo.

Basado en la similitud de secuencia, los factores σ se pueden clasificar en dos familias: la familia σ^{70} y la familia σ^{54} , denominadas así por los factores σ^{70} y σ^{54} de *E. coli*. Ambas familias presentan poca o ninguna similitud en cuanto a su secuencia aminoacídica (Lonetto *et al.*, 1992) y, pese a interaccionar con el mismo núcleo de la RNAP, dan lugar a holoenzimas que difieren sustancialmente en su modo de acción. Mientras que la familia σ^{54} está formada por un único grupo de factores σ , la familia σ^{70} está dividida en 4 grupos filogenéticos que comparten estructura y, con frecuencia, función (Hermann, 2002; Lonetto *et al.*, 1992):

- **Grupo 1:** incluye el factor σ^{70} de *E. coli* y sus ortólogos. Son proteínas esenciales responsables de la transcripción de la mayoría de los genes durante el crecimiento activo de la bacteria, por lo que a menudo se les denomina sigmas primarios.
- **Grupo 2:** proteínas estrechamente relacionadas con las anteriores, pero dispensables para el crecimiento exponencial. En muchas ocasiones, las secuencias reconocidas por este grupo son casi idénticas a aquellas reconocidas

por los miembros del grupo 1. La proteína más estudiada dentro de este grupo es el factor regulador de la respuesta al estrés en *E. coli*, σ^S .

- **Grupo 3:** formado por factores cuya secuencia difiere de modo significativo con respecto a los anteriormente descritos. Estos factores se pueden dividir en grupos evolutivamente relacionados, a menudo con funciones conservadas o relacionadas, como son la respuesta a choque térmico, la síntesis de flagelos o la esporulación.
- **Grupo 4:** es el grupo más numeroso y heterogéneo, y engloba a los factores σ -ECF. Los miembros descritos inicialmente tenían en común su participación en aspectos relacionados con la superficie celular (transporte, secreción, estrés extracitoplasmático). Actualmente, este grupo incluye también factores σ que participan en otros procesos.

El alineamiento de secuencia de los miembros de la familia σ^{70} revela 4 regiones conservadas, que a su vez pueden dividirse en subregiones (Figura 6). Basado en estudios bioquímicos, genéticos y estructurales se han asignado a dichas regiones distintas funciones en el proceso de inicio de la transcripción (Figura 3).

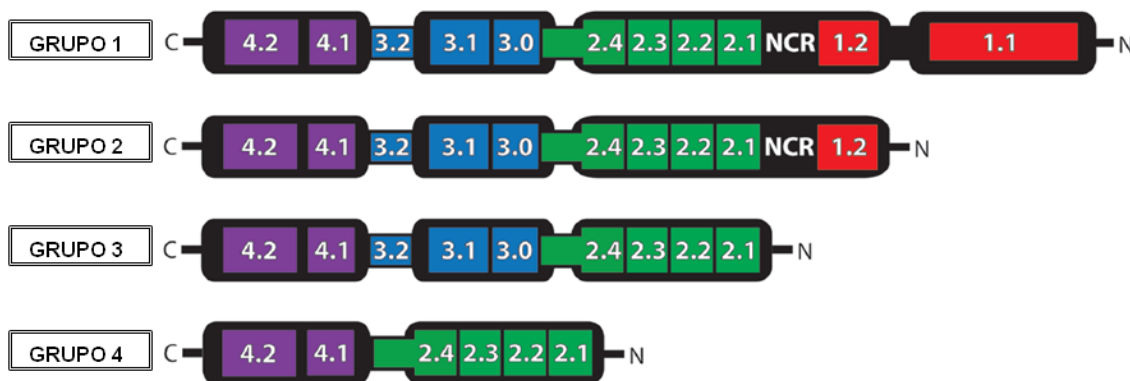


Figura 6. Representación esquemática de los dominios conservados en los cuatro grupos de factores σ . Tomado de (Souza *et al.*, 2014).

- ♦ **Región 1:** a su vez se divide en dos subregiones, 1.1 y 1.2. La región 1.1 se encuentra solo en factores σ primarios e impide que estos interactúen con el DNA antes de la formación del holoenzima (Dombroski *et al.*, 1993; Dombroski *et al.*, 1992). En el factor σ libre la subregión 1.1, cuya superficie está cargada negativamente, se encuentra próxima a las regiones 2 y 4, cargadas

positivamente, adoptando una estructura compacta incompatible con la unión al DNA (Schwartz *et al.*, 2008). Además, una vez formado el complejo cerrado, la región 1.1 parece ser importante para la transición de complejo cerrado a complejo abierto (Wilson & Dombroski, 1997). La región 1.2, por su parte, se encuentra en todos los factores sigma de esta familia, a excepción de los factores σ -ECF. Esta subregión contacta con la región discriminatoria afectando a la tasa de disociación de complejo abierto a complejo cerrado (Haugen *et al.*, 2006).

- ◆ **Región 2:** es la región más conservada y en ella se distinguen 4 subregiones, cada una de ellas con una función específica. La región 2.1 es importante para la interacción con el núcleo de la RNAP (Lesley & Burgess, 1989). La región 2.4 está implicada en el reconocimiento del hexámero -10 del promotor (Daniels *et al.*, 1990; Kahn & Ditta, 1991; Siegele *et al.*, 1989; Tatti *et al.*, 1991; Waldburger *et al.*, 1990; Zuber *et al.*, 1989). En los factores σ primarios, que reconocen hexámeros -10 muy semejantes, la región 2.4 se encuentra muy conservada. Ello no es así en los factores σ alternativos, ya que estos últimos reconocen secuencias -10 que difieren considerablemente del consenso antes mencionado. La región 2.3 es indispensable para la apertura de la hélice de DNA e interacciona con el DNA de cadena sencilla en la región -10, lo que lleva a la estabilización de la burbuja de transcripción inicial (Hermann & Chamberlin, 1988; Juang & Hermann, 1994).
- ◆ **Región 3:** Esta región se encuentra muy conservada entre los factores σ principales, y poco o nada conservada, e incluso ausente, entre el resto de factores de esta familia. Residuos de la región 3.0 (antes denominada 2.5) están implicados en el reconocimiento de la región -10 extendida (Barne *et al.*, 1997). Esta interacción es crucial para aquellos promotores cuyos hexámeros -35 o -10 están poco conservados con respecto a la secuencia consenso. La región 3.1 presenta un dominio que asemeja a los motivos de unión al DNA de tipo hélice-giro-hélice (Zhou *et al.*, 1992). Sin embargo, no hay evidencias de que esta región participe en la unión al DNA y, de hecho, parece participar en la interacción con el núcleo de la RNAP (Hernandez & Cashel, 1995; Joo *et al.*, 1998; Sharp *et al.*, 1999). La región 3.2, cuyos residuos conservados son en gran parte ácidos, está situada próxima al núcleo catalítico del holoenzima. Esta región determina el camino que ha de seguir la hebra molde de DNA, posicionando de ese modo las bases del DNA de forma adecuada y facilitando así su unión a los ribonucleósidos trifosfato de inicio (iNTPs). Además, parece estar implicada en la estabilización de los transcritos

abortivos pequeños que, eventualmente, alcanzan un tamaño mayor (~12 nt) desplazando a esta región fuera del centro activo y permitiendo así el inicio del proceso de elongación (Kulbachinskiy & Mustaev, 2006; Murakami, 2013; Severinov *et al.*, 1994).

- ♦ **Región 4:** participa en el reconocimiento del hexámero -35 y consta de dos subregiones, 4.1 y 4.2, separadas por un pequeño segmento de longitud y secuencia variable. La región 4.1 forma una hélice α anfipática que esta conservada a lo largo de todos los factores σ . Por su parte, la región 4.2 presenta un motivo de unión al DNA de tipo hélice-giro-hélice muy conservado entre los factores σ primarios, aunque menos entre los factores σ alternativos (Brennan & Matthews, 1989; Gribskov & Burgess, 1986; Helmann & Chamberlin, 1988; Stragier *et al.*, 1985). La región 4.2, unida al elemento -35 del promotor, puede interactuar directamente con la subunidad α CTD en aquellos promotores en los que esta subunidad contacta con el elemento UP (Ross *et al.*, 2003).

Los análisis realizados mediante cristalografía de los fragmentos parciales del factor principal σ^{70} de *Thermus aquaticus* han permitido establecer su estructura (Campbell *et al.*, 2002). Estos factores presentan tres dominios estructurales globulares: el dominio estructural 2, que incluye las regiones 1.2 a 2.4 (incluida la región NCR, del inglés “nonconserved región” presente en algunos factores σ), el dominio estructural 3, que incluye las regiones 3.0 y 3.1, y el dominio estructural 4, que comprende las regiones 4.1 y 4.2 (Figura 6). Todos estos dominios están conectados mediante tramos flexibles. La región 1.1 no se ha podido visualizar en estructuras de alta resolución, por lo que se desconoce su disposición espacial. Los datos estructurales son congruentes con los obtenidos mediante proteólisis limitada, que también identificaban 3 dominios globulares (Gribskov & Burgess, 1983; Lowe *et al.*, 1979; Severinova *et al.*, 1996).

I.1.3 Reguladores transcripcionales

Existen cuatro componentes principales implicados en la distribución de la RNAP a lo largo de los distintos promotores y que, por tanto, determinan su actividad. Estos son: la propia secuencia promotora, los factores σ , los factores transcripcionales y la estructura del cromosoma bacteriano (Browning & Busby, 2004). Como se ha comentado en apartados anteriores, los elementos presentes en los distintos promotores difieren de forma significativa de un promotor a otro, lo que permite

modular el grado de unión de la RNAP. Por otro lado, dado que cada holoenzima (núcleo catalítico unido a un determinado factor σ) reconoce un grupo diferente de genes dependiendo del factor σ asociado, un mecanismo sencillo de control implica modular los niveles relativos de los distintos holoenzimas en función de las necesidades celulares. Dichos niveles vendrán determinados por la concentración de cada factor σ y su afinidad por el núcleo de la polimerasa (Figura 7).

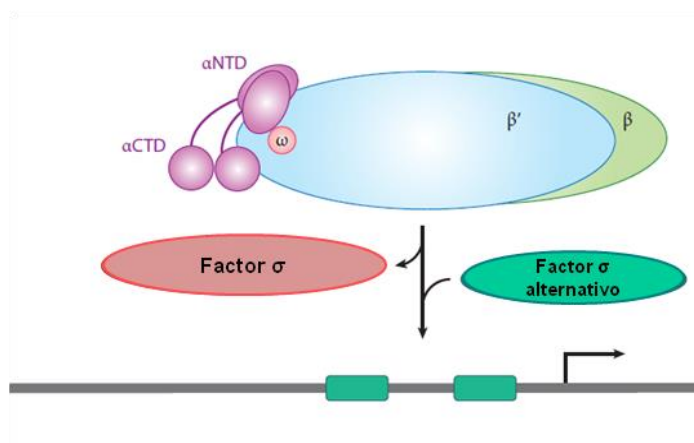


Figura 7. La polimerasa de RNA es reprogramada por un factor σ alternativo, alterando la preferencia por el promotor. Tomado de (Lee *et al.*, 2012a).

Además, la expresión de muchos promotores está controlada por factores transcripcionales, que actúan promoviendo (activadores) o impidiendo (represores) el inicio de la transcripción. Algunos reguladores actúan únicamente como activadores o represores, mientras que otros pueden realizar una u otra labor en función del promotor sobre el que actúen. Por último, mientras que algunos promotores están sujetos a control por un único factor transcripcional (activación o represión simple), otros muestran una regulación más compleja, dependiente de la acción de varios factores transcripcionales sobre un mismo promotor.

I.1.3.1 Activación transcripcional simple

Los activadores pueden aumentar el rendimiento de un promotor bien mejorando la interacción de la RNAP con el promotor y, por tanto, la formación del complejo cerrado, o bien estabilizando la formación del complejo abierto o acelerando la transición hacia su formación. Diferentes estrategias permiten a los activadores actuar sobre estos parámetros.

Algunos factores reguladores alteran la conformación del DNA facilitando la unión de la RNAP a las regiones -10 y/o -35. Este es el caso de los miembros de la familia MerR, que actúan sobre promotores cuyo espaciador (secuencia entre el elemento -35 y el elemento -10) no presenta una longitud óptima. Dos de los ejemplos más estudiados son la proteína Tn501, la cual regula genes de resistencia a mercurio, y BmrR de *Bacillus subtilis*, implicada en multiresistencia a drogas. Estas proteínas se unen a la secuencia espaciadora y distorsionan el DNA, provocando el alineamiento de los elementos -35 y -10 del promotor y facilitando así su reconocimiento por el factor σ de la RNAP (Heldwein & Brennan, 2001) (Figura 8A). Siguiendo esta misma

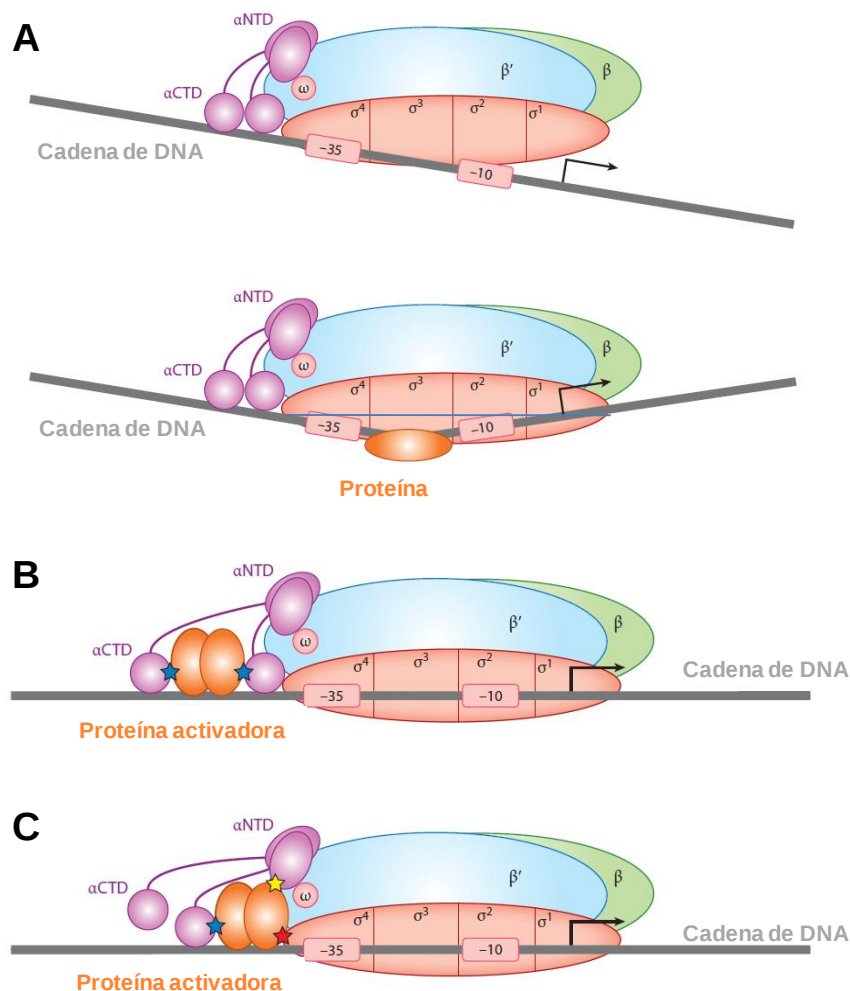


Figura 8. Mecanismos de activación simple. La figura ilustra la disposición de la RNAP en promotores activados mediante activación simple. **A)** Activación por cambios conformacionales del DNA. **B)** Activación simple de clase I: el activador se une aguas arriba de la región -35 y contacta con α CTD de la RNAP. **C)** Activación simple de clase II: el activador se une a secuencias adyacentes a la región -35 e interacciona con el dominio σ^4 y/o α NTD. Tomado de (Lee *et al.*, 2012a)

línea, las proteínas que modifican la compactación del cromosoma bacteriano pueden tener efecto sobre la transcripción. La función principal de estas proteínas asociadas al nucleóide es plegar y compactar el cromosoma, uniéndose de forma casi inespecífica a cualquier secuencia del DNA. Sin embargo, algunos miembros de este grupo muestran cierta preferencia por determinadas secuencias o estructuras, provocando cambios locales en la topología del DNA que pueden modular la actividad promotora (McLeod & Johnson, 2001).

Por otra parte, para la activación de muchos promotores es necesaria la interacción directa del factor transcripcional con la RNAP. Los sistemas mejor analizados dentro de esta categoría provienen de estudios realizados con la proteína receptora de AMP cíclico (CRP) de *E. coli* y con la proteína cI del fago λ . Tradicionalmente, los mecanismos de activación mediados por CRP (y, por analogía, por otros activadores) se han clasificado en dos tipos, de clase I y de clase II, en función de la posición que ocupa el activador una vez unido a la región promotora y de sus contactos con la RNAP. En los de clase I, tomando como ejemplo la activación del promotor *lac* de *E. coli*, un homodímero de CRP se une al DNA aguas arriba de la región -35 e interacciona, a través de su dominio AR1 (activating región 1), con un dominio α CTD de la subunidad α de la RNAP (la interacción de CRP con el otro dominio α CTD no parece ser crítica para la función del activador). La interacción de CRP con la subunidad α facilita su unión al promotor y, por tanto, la unión de la RNAP. Esta interacción, además, sitúa a este dominio α CTD adyacente al dominio 4 del factor σ^{70} (Figura 8B). La interacción entre ambas proteínas no provoca cambios conformacionales, lo que sugiere que la activación ocurre mediante un simple mecanismo de reclutamiento (Lawson *et al.*, 2004). En los de clase II, ilustrado por la activación del promotor *galP1* de *E. coli*, la secuencia a la que se une CRP solapa con el elemento -35. En este tipo de activación, aunque la región de interacción AR1 contribuye a la actividad de CRP (interaccionado con α CTD), una segunda región (AR2), que interacciona con el dominio α NTD de la RNAP, parece tener un papel más importante, promoviendo la transición de complejo cerrado a complejo abierto. Aunque CRP no interacciona con la subunidad σ , la mutación de un único residuo (Lys-52) desenmascara una nueva región de interacción (AR3) que contacta con el dominio 4 de σ e incrementa la actividad transcripcional (Busby & Ebright, 1997) (Figura 8C). Otro mecanismo de clase II ampliamente estudiado es el mediado por la proteína cI del bacteriófago λ , que activa la transcripción de su propio gen a través del promotor P_{RM} (promotor de la síntesis del represor para el mantenimiento de la lisogenia). Para

ello, un dímero de cI interacciona con secuencias que solapan con el elemento -35 de P_{RM} . Residuos ácidos de cI , adyacentes a su región de unión al DNA, interaccionan con residuos básicos del dominio 4 de la subunidad σ^{70} , situados justo al lado de su región de reconocimiento del elemento -35, cuando ambas proteínas están unidas al DNA. La interacción entre cI y σ^{70} no provoca cambios conformationales, pero acelera la formación del complejo abierto en P_{RM} (Jain *et al.*, 2004; Li *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1994).

I.1.3.2 Represión transcripcional simple

Los mecanismos que afectan negativamente el inicio de la transcripción pueden funcionar por simple impedimento estérico, bloqueando la unión de la RNAP a un promotor determinado (Figura 9A), o pueden ser más complejos y afectar la actividad de otros reguladores e incluso intervenir en otras etapas de la transcripción (Figura 9B, C). Probablemente, uno de los represores más intensamente estudiados,

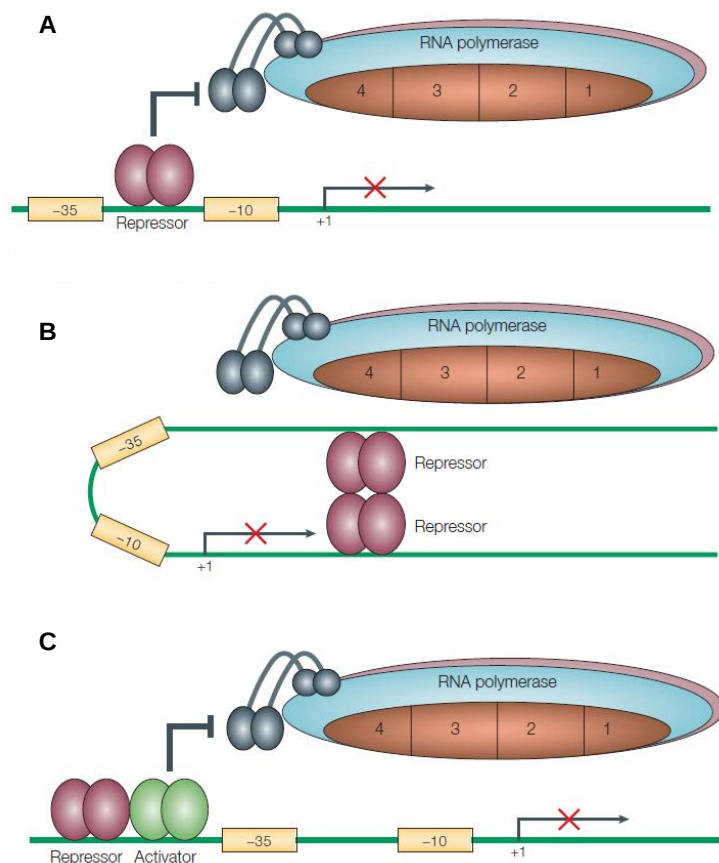


Figura 9. Mecanismos de represión simple. A) Represión mediante impedimento estérico. La zona de unión del represor solapa con la región -35 y/o -10. **B)** La unión del represor al DNA provoca la formación de un bucle que impide el inicio de la transcripción. **C)** El represor modula de forma negativa la acción del activador. Tomado de (Browning & Busby, 2004).

tanto a nivel bioquímico, como genético y estructural, sea el represor Lac de *E. coli*. El represor Lac consta de cuatro módulos: un dominio N-terminal a modo de “casco”, responsable del reconocimiento del operador, la región “bisagra” que une el casco con el núcleo, responsable de la dimerización y donde se encuentran los determinantes para el reconocimiento del inductor, y por último, una hélice C-terminal, responsable de la formación del tetrámero. En ausencia del inductor natural, la lactosa, el represor Lac se une a la región operadora en forma de tetrámero, y dado que los operadores están situados inmediatamente aguas abajo de la región promotora, la unión del represor reprime la transcripción del operador *lac* (Müller-Hill, 1998).

A diferencia de lo descrito en el apartado anterior, existen dos proteínas (parálogas) de la familia MerR cuya acción no es activar sino reprimir la transcripción.

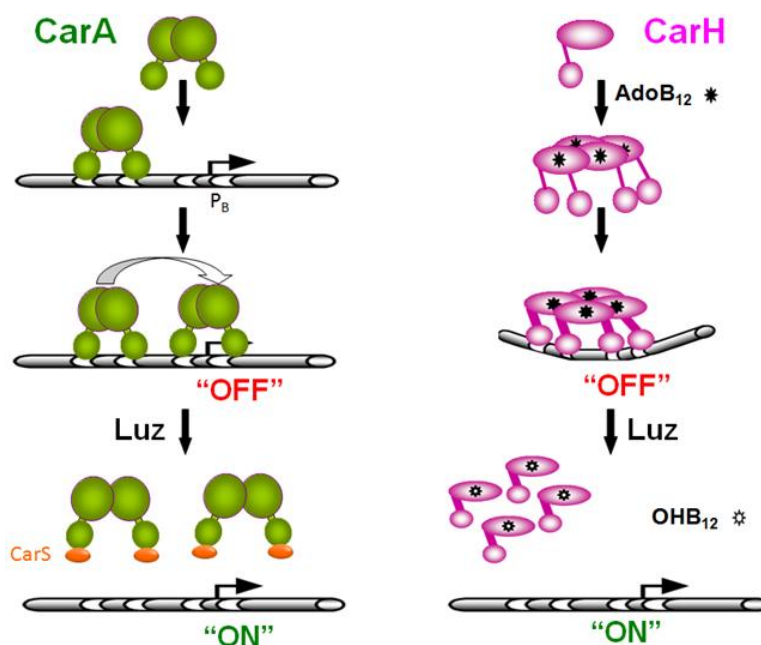


Figura 10. Modelo de regulación del promotor P_B por CarA/CarS (izquierda) y por AdoB₁₂-CarH (derecha). Tomado de (Ortiz-Guerrero, 2013).

Estas son las proteínas CarA y CarH, cuyo mecanismo de acción ha sido ampliamente estudiado en el grupo de investigación donde se ha realizado esta tesis. Estos represores que ejercen su acción sobre el promotor P_B, implicado en la síntesis de carotenos en respuesta a la luz o carotenogénesis (de la que se hablará en el apartado II.1.2). En oscuridad, CarA y CarH dimerizan y tetramerizan, respectivamente, y se unen a regiones que solapan con el elemento -35 del promotor P_B impidiendo su transcripción (López-Rubio *et al.*, 2002; López-Rubio *et al.*, 2004; Ortiz-Guerrero *et al.*, 2011). CarS, un antirrepresor producido solamente en luz, mimetiza las secuencias de DNA reconocidas por CarA y CarH contrarrestando su

efecto (Leon *et al.*, 2010). Ambas proteínas presentan dos dominios, un dominio N-terminal de unión al DNA y un dominio C-terminal de unión a vitamina B₁₂, curiosamente solo CarH requiere B₁₂ (en su forma adenosilcobalamina o Ado-B₁₂) para su actividad (Pérez-Marín *et al.*, 2008). Al parecer, la Ado-B₁₂ promueve la tetramerización de CarH, necesaria para su unión efectiva al DNA. De manera independiente de CarS, la fotólisis de la Ado-B₁₂ “desmontaría” el tetrámero de CarH, que se liberaría del promotor. Por lo tanto, la Ado-B₁₂ actuaría como un cromóforo que confieren la capacidad de detectar la luz a las proteínas a las que está unida (Elias-Arnanz *et al.*, 2011; Jost *et al.*, 2015; Ortiz-Guerrero *et al.*, 2011) (Figura 10).

Otros mecanismos de represión implican regiones operadoras que no solapan con la zona de unión de la RNAP, este es el caso del represor GalR, que presenta dos operadores bipartitos situados ~60 pb aguas arriba y ~ 53 pb aguas abajo del inicio de la transcripción. Un dímero de GalR se une a cada región operadora e interacciona entre sí formando un tetrámero que conduce a la formación de un bucle de DNA que impide el inicio de la transcripción (Figura 9B) (Adhya, 1989; Aki *et al.*, 1996). Asimismo, se han encontrado represores cuyo mecanismo de acción se basa en impedir la acción de un activador (Figura 9C). El promotor *deoP2* de *E. coli* (de clase II) contiene dos sitios de unión para CRP, entre los cuales se halla un sitio de unión para el represor CytR. Cuando CytR se encuentra inactivo (en presencia de citidina), CRP interacciona con la RNAP activando la transcripción (Shin *et al.*, 2001). Por otro lado, en condiciones en las que CytR se encuentra activo (en ausencia de citidina), su unión al DNA resulta en la interacción de CytR con dos CRPs flanqueantes, lo que impide la interacción de CRP con la RNAP, y por tanto, la transcripción (Shin *et al.*, 2001).

Aunque la regulación de algunos promotores se ajusta a un mecanismo sencillo dependiente de un único regulador, la situación más común implica la integración de varios activadores y/o represores que perciben diferentes señales y permiten un control más fino de la cantidad de cada transcrito en función de las necesidades celulares.

I.1.3.3 Reguladores que interaccionan con la RNAP

La mayoría de los reguladores transcripcionales ejercen su función uniéndose a regiones o secuencias específicas del DNA, como se ha descrito en los apartados anteriores. Sin embargo, en los últimos años se han identificado reguladores menos convencionales que regulan la actividad transcripcional sin contactar directamente con el DNA, algunos de los cuales se describen a continuación por su relación con el modo de acción del regulador estudiado en este trabajo

Crl es una proteína de pequeño tamaño (15.8 kDa), necesaria para la transcripción de algunos promotores dependientes de σ^S , un factor σ alternativo implicado en la regulación de la expresión en fase estacionaria y de genes de respuesta a estrés. Ampliamente distribuida y conservada dentro del grupo de las gammaproteobacterias, Crl fue identificada por primera vez en *E. coli* (Arnqvist *et al.*, 1992). Esta pequeña proteína interacciona directamente con el factor σ^S , aumentando la transcripción de los promotores dependientes del holoenzima σ^S -RNAP ($E\sigma^S$) (Bougdour *et al.*, 2004; Pratt & Silhavy, 1998; Robbe-Saule *et al.*, 2007; Typas *et al.*, 2007). Estudios estructurales han establecido que los residuos de σ^S reconocidos por Crl se encuentran en dos regiones no contiguas: el motivo DEP situado en la región 2.3 y un aspartato en la región que correspondería a la NCR en σ^{70} (Banta *et al.*, 2014; Banta *et al.*, 2013). El principal mecanismo de acción propuesto implica un incremento de la cantidad de $E\sigma^S$, aumentando la afinidad de σ^S por la polimerasa o bien estabilizando el propio holoenzima. Sin embargo, dado que Crl interacciona con el dominio 2 de σ^S , encargado de la unión al elemento -10 del promotor, no se descarta su posible papel en otros pasos del inicio de la transcripción.

RbpA (RNA polymerase binding protein) es una proteína también pequeña (14.1 kDa), presente únicamente en actinobacterias, descubierta inicialmente por su capacidad de interaccionar con la RNAP y de conferir tolerancia a rifampicina en *S. coelicolor* (Newell *et al.*, 2006). Estudios posteriores han puesto de manifiesto que regula positivamente los promotores dependientes del factor mayoritario σ^{HrdB} y, también, del factor de tipo primario σ^{HrdA} (σ^A y σ^B , respectivamente, en micobacterias). Es un regulador esencial en micobacterias y, aunque no lo es en *S. coelicolor*, su falta causa defectos en el crecimiento (Bortoluzzi *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2012). RbpA comprende una cola N-terminal no estructurada y dos dominios estructurales (dominio central y dominio C-terminal) conectados por un segmento flexible. El dominio central interacciona con la superficie externa de la subunidad β de la RNAP, mientras que el dominio C-terminal interacciona con el dominio 2 del factor σ (Bortoluzzi *et al.*, 2013;

Tabib-Salazar *et al.*, 2013). Aunque RbpA interacciona con ambas subunidades (β y σ), su función no consiste en estabilizar el holoenzima sino en mejorar la formación del complejo cerrado, así como su transición a complejo abierto (Hu *et al.*, 2014). En concordancia con estos datos, recientemente se ha demostrado que RbpA se posiciona próxima al elemento -10 del RP_O (Hubin *et al.*, 2015).

En 1990, Kang y Craig identificaron en *E. coli* un nuevo gen cuya sobre-expresión suprimía el fenotipo termosensible (crecimiento lento y filamentoso a baja temperatura) asociado a la delección del gen *dnaKJ*, al que denominaron *dksA* (Kang & Craig, 1990). Muchos han sido los trabajos realizados con la proteína DksA de *E. coli* (EcDksA) que han permitido descifrar, al menos en parte, su función como regulador transcripcional. Algunos de los promotores susceptibles de regulación por esta proteína son los promotores de síntesis de proteínas ribosomales (Lemke *et al.*, 2011), los de biosíntesis de aminoácidos y, los promotores de los RNA ribosómicos (rRNAs), siendo estos últimos los más estudiados por su papel en la denominada “stringent response” (véase más abajo). Ante la falta de alimento, se activa la síntesis a partir de GTP de ppGpp (término que utilizaremos para referirnos tanto al guanosín 5'-difosfato 3'-difosfato como a su precursor el pentafofosfato). Cuando el nivel de ppGpp aumenta, éste se une a la RNAP y reduce el tiempo de vida de todos los complejos abiertos, inhibiendo la transcripción sólo de aquellos cuyos tiempos de vida son *per se* cortos, como es el caso de los promotores de rRNA. EcDksA, proteína de tan sólo 151 aminoácidos, interacciona directamente con el canal secundario de la RNAP potenciando la acción del ppGpp (Lennon *et al.*, 2012). La delección de *dksA* anula casi por completo el efecto de ppGpp sobre estos promotores, confirmando la acción sinérgica de EcDksA y ppGpp (Paul *et al.*, 2004a). La acción conjunta de EcDksA y ppGpp, que produce la disminución de la vida media del complejo abierto, explicaría por qué en promotores que presentan una tasa de disociación relativamente lenta, la consecuencia final es la contraria, es decir, la activación de la transcripción (Paul *et al.*, 2005). Mientras que los niveles de EcDksA se mantienen constantes tanto en fase exponencial como en fase estacionaria de crecimiento, los niveles de ppGpp varían según el estado nutricional de la célula, aportando la señal necesaria para una correcta regulación. Si bien DksA y ppGpp actúan de forma sinérgica en un gran número de promotores, no es así en todos los casos, ya que un elevado número de genes se ven afectados únicamente por la falta de ppGpp o DksA, y no por la falta de ambos elementos reguladores (Aberg *et al.*, 2009).

El análisis estructural de EcDksA revela tres dominios (Figura 11): un dominio globular en el que se encuentra un motivo de tipo dedos de zinc formado por cuatro cisteínas, un dominio central de tipo “hélices entrelazadas” (coiled-coiled) con un motivo ácido (DxxDxA) en su extremo y, por último, un dominio C-terminal de tipo hélice α . El dominio central, mediante el cual interacciona con el canal secundario de la RNAP, parece ser esencial para la función de la proteína (Lee *et al.*, 2012b; Lennon *et al.*, 2012; Perederina *et al.*, 2004).

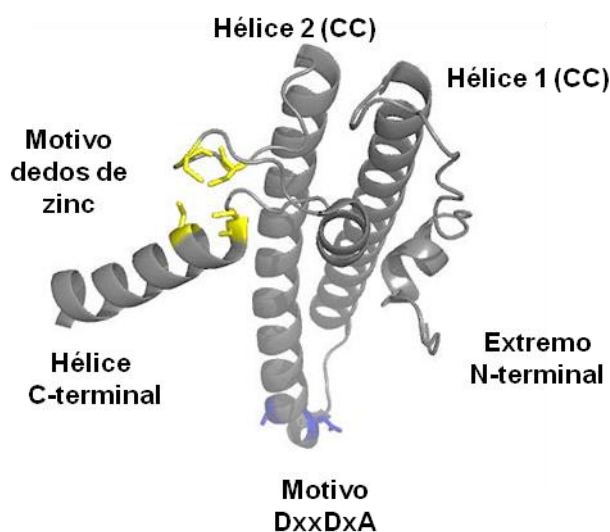


Figura 11. Estructura de DksA de *Escherichia coli* (EcDksA). Los tres dominios de EcDksA son: el dominio globular (formado por las regiones N- y C-terminal) con el motivo dedos de Zn, las hélices entrelazadas (CC o coiled-coiled), y la hélice C-terminal. Las cuatro cisteínas que forman el motivo dedos de Zn están indicadas en amarillo y el motivo DxxDxA en azul. Tomada de (Lennon *et al.*, 2012)

DksA pertenece a la familia DksA/TraR, con miembros en más de 570 géneros bacterianos, cuyos productos génicos presentan diferente grado de conservación de los motivos DxxDxA y dedos de zinc (Furman *et al.*, 2013). Estudios *in vivo* han puesto de manifiesto el efecto pleiotrópico de la delección de *dksA* en diversas especies bacterianas, sin embargo su confirmación *in vitro* se ha llevado a cabo sólo en gammaproteobacterias (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), con la excepción de *R. sphaeroides*, una alfa-proteobacteria capaz de crecer mediante fotosíntesis (en condiciones anaeróbicas) o respiración (en condiciones aeróbicas o anaeróbicas) (Lennon *et al.*, 2014). Al igual que ocurre en otras especies, *R. sphaeroides* presenta más de un miembro de la familia DksA/TraR, dos en este caso, determinados por los genes RSP2654 y RSP0166, cuyos productos génicos difieren tanto en tamaño (158

frente a 105 aminoácidos) como en la conservación de los motivos DxxDxA y dedos de zinc. Al no observarse ningún fenotipo asociado a la delección de RSP0166, los análisis se han centrado en la proteína determinada por RSP2654, que carece del motivo dedos de zinc pero conserva el motivo DxxDxA. Esta proteína es capaz de inhibir la actividad transcripcional de la RNAP de *E. coli* tanto *in vivo* como *in vitro*, y de activar algunos promotores en presencia de ppGpp. Además, provoca una reducción en el tiempo de vida de los complejos abiertos, ya sea con la RNAP de *E. coli* o con la de *R. sphaeroides*, actuando de forma sinérgica junto a ppGpp o en solitario (Lennon *et al.*, 2014). Los efectos provocados por la delección de RSP2654 indican que DksA de *R. sphaeroides* (RsDksA) regula procesos similares a los de su homóloga en *E. coli*, como son la biosíntesis de ácidos grasos y la utilización de aminoácidos pero, además, afecta a procesos específicos de esta bacteria como es el crecimiento fotosintético. Estos datos sugieren que, aunque el modo de acción general de esta familia de proteínas pueda estar conservado, la consecuencia final dependerá del estilo de vida y las características particulares de la bacteria (Lennon *et al.*, 2014).

En los últimos años se ha identificado una familia ampliamente distribuida de proteínas, capaces de interaccionar con la RNAP y regular su actividad, denominada CarD_CdnL_TRCF (Cayuela *et al.*, 2003; García-Moreno *et al.*, 2010; Padmanabhan *et al.*, 2001; Stallings *et al.*, 2009). El prototipo de dicha familia es el dominio N-terminal (CarDNt) de CarD, un regulador global identificado y ampliamente estudiado por el grupo de investigación en el que se ha realizado esta tesis doctoral. La señal de identidad de CarD que, junto con CarG, regula la síntesis de carotenoides en respuesta a la luz azul, el desarrollo multicelular en respuesta a la falta de nutrientes, y otros procesos en *M. xanthus*, es la presencia de un dominio C-terminal de unión al DNA similar a las proteínas eucarióticas HMGA (high mobility group A) (Elías-Arnanz *et al.*, 2010; García-Heras *et al.*, 2009; Nicolás *et al.*, 1996; Padmanabhan *et al.*, 2001). Por otro lado, través de su dominio CarDNt, CarD interacciona consigo misma, con la RNAP, y con CarG (García-Heras *et al.*, 2013; García-Heras *et al.*, 2009; Padmanabhan *et al.*, 2001; Peñalver-Mellado *et al.*, 2006). El efecto regulador global del complejo CarD/CarG probablemente está relacionado con su acción sobre un amplio grupo de promotores cuya expresión depende de varios de los múltiples factores σ -ECF de *M. xanthus* (Abellón-Ruiz *et al.*, 2014). La familia CarD_CdnL_TRCF engloba también el dominio de interacción con la RNAP (RID) del factor TRCF, una proteína con múltiples dominios que acopla la transcripción con la reparación del DNA, capaz también de interaccionar con el DNA a través de otros

dominios (Deaconescu *et al.*, 2006; Deaconescu *et al.*, 2007; Selby & Sancar, 1995). Además, la familia incluye un grupo de proteínas que, a diferencia de CarD y TRCF, carecen de un dominio de unión al DNA, y a las que hemos denominado CdnL (CarD N-terminus-Like) por su similitud en tamaño y secuencia con el extremo N-terminal de CarD, para distinguirlas de CarD (aunque otros investigadores, a pesar de la confusión que ello genera, han optado por usar el término CarD para las proteínas CdnL). Mientras que la presencia de CarD (y CarG) está restringida a mixobacterias, las proteínas CdnL se encuentran ampliamente distribuidas en bacterias, incluyendo algunos patógenos como *Mycobacterium tuberculosis* (Stallings *et al.*, 2009), pero son muy pocas las bacterias en las que se ha estudiado su posible función. En esta tesis doctoral se presenta la caracterización del modo de acción de la proteína CdnL de *M. xanthus* y de su homólogo en la bacteria *Caulobacter crescentus*, y su posible implicación en la regulación de los promotores del RNA ribosómico (rRNA), cuya expresión normalmente está modulada por la denominada “stringent response”.

I.1.4 La respuesta general al estrés (“stringent response”): regulación de la transcripción del rRNA

La “stringent response” es una respuesta, ampliamente conservada en bacterias, causada por multitud de diferentes señales ambientales relacionadas con la falta de nutrientes u otros estreses, cuya finalidad es adaptar el metabolismo general de la célula, optimizando el crecimiento, y asegurando así la supervivencia (Boutte & Crosson, 2013). Dicha adaptación viene marcada por el incremento en la concentración de la “alarmona” ppGpp, mencionada en el apartado anterior. Los niveles de ppGpp están regulados por tres tipos principales de enzimas: las proteínas homólogas a RelA/SpoT (RSH, RelA/SpoT homolog), capaces tanto de sintetizar como de hidrolizar ppGpp, y pequeñas sintetasas de alarmona (SAS, small alarmone synthetase) e hidrolasas (SAH, small alarmone hydrolase) (Atkinson *et al.*, 2011). A excepción de los patógenos intracelulares obligados, prácticamente todas las especies bacterianas presentan este tipo de proteínas, aunque distintas especies pueden presentar combinaciones distintas de ellas. Estas enzimas son, por tanto, la diana sobre la que actúa la célula ante una señal de estrés, pudiendo ser reguladas a diferentes niveles: transcripcional, post-transcripcional y mediante interacción directa proteína-proteína. Aunque suele asumirse que la “stringent response” se activa ante la escasez de nutrientes, las señales concretas que activan esta respuesta, así como los

genes diana susceptibles de ser activados o reprimidos, varían en función del estilo de vida de la bacteria (Boutte & Crosson, 2013).

E. coli posee dos enzimas RSH: RelA, que presenta sólo el dominio de síntesis, y SpoT, con ambos dominios. Ante la escasez de aminoácidos, RNAs transferentes (tRNAs) no cargados se unen al sitio “A” del centro activo del ribosoma, y detienen la traducción. RelA detecta este suceso molecular y se activa, probablemente por el contacto directo entre el tRNA no cargado y RelA (Agirrezabala *et al.*, 2013). Estudios recientes revelan la activación directa del gen *relA* por medio de NtrC, el principal regulador en la respuesta al estrés por falta de nitrógeno (Brown *et al.*, 2014). Mientras que RelA es sensible a la falta de cualquier aminoácido individual, SpoT sólo sintetiza ppGpp cuando escasean varios aminoácidos a la vez. Además, SpoT puede sintetizar ppGpp en respuesta a otros estreses, como son la falta de fósforo, hierro (Spira *et al.*, 1995; Vinella *et al.*, 2005), carbono o ácidos grasos. Esta respuesta parece ser mediada por la interacción directa de ACP (acyl carrier protein), un factor esencial en el metabolismo de los ácidos grasos, con SpoT. En este sentido, algunos autores proponen que, dado que la falta de fuente de carbono reduce la síntesis de ácidos grasos, ambas señales podrían estar conectadas (Battesti & Bouveret, 2006) (Figura 12).

Escherichia coli

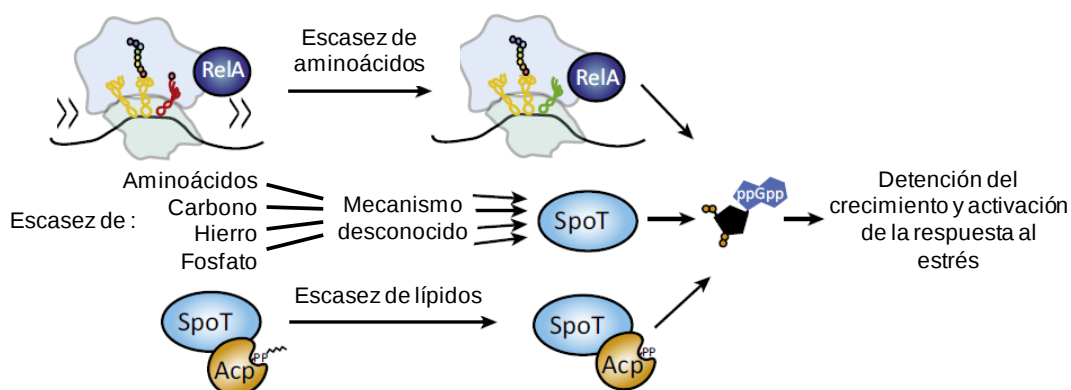


Figura 12. Mecanismos de activación de la “stringent response” en *Escherichia coli*. Tomado de (Boutte & Crosson, 2013).

En respuesta al ayuno, *M. xanthus*, cuyo hábitat es el suelo, forma estructuras de resistencia denominadas cuerpos fructíferos. Dicho desarrollo multicelular es regulado por, al menos, dos tipos de señalización intercelular que dependen de ppGpp (Crawford & Shimkets, 2000; Harris *et al.*, 1998): la mediada por la señal A, que

permite evaluar el estado nutricional y la densidad celular, y la mediada por la señal C, que garantiza la correcta agregación tanto espacial como temporalmente (Kaiser, 2004). A diferencia de *E. coli*, *M. xanthus* posee una única proteína RSH, de tipo RelA, capaz de sintetizar ppGpp en respuesta a la falta de aminoácidos, fuente de carbono y amonio (Manoil & Kaiser, 1980a, b). El ppGpp activa los genes *asg* (A-signal generating), que controlan la expresión o el transporte al exterior de proteasas extracelulares, provocando la degradación de proteínas y un aumento de la concentración de aminoácidos. Cuando la densidad celular es elevada, la concentración extracelular de aminoácidos acaba alcanzando un valor superior a 10 μM , generándose así la señal A. Una vez que se ha acumulado suficiente ppGpp y señal A, el programa de desarrollo multicelular puede proseguir (Kaplan & Plamann, 1996).

Myxococcus xanthus

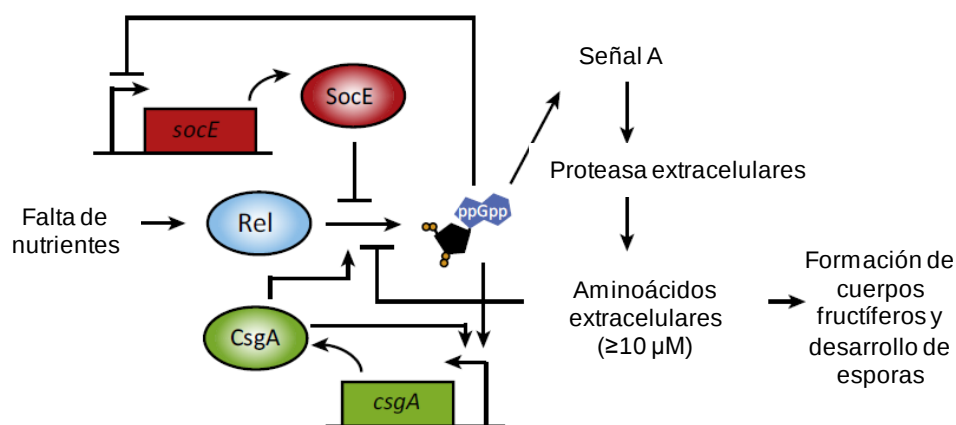


Figura 13. Mecanismos de activación de la "stringent response" en *Myxococcus xanthus*. Tomado de (Boutte & Crosson, 2013).

La señal C evita que los aminoácidos que conforman la señal A se interpreten como una mejora en las condiciones nutritivas y se utilicen para fomentar el crecimiento vegetativo. Para ello, la señal C regula positivamente la actividad de RelA, garantizando que los niveles de ppGpp se mantengan elevados a pesar del aumento transitorio en la concentración de aminoácidos en la fase inicial del proceso de desarrollo. La transmisión de la señal C, que depende del contacto célula a célula, está mediada por CsgA, una proteína de 17 kDa generada mediante proteólisis por PopC, a partir de un precursor de 25 kDa (CsgA-25) (Rolbetzki *et al.*, 2008). Durante el crecimiento vegetativo CsgA-25 se acumula en la membrana, mientras que PopC se

acumula en el citosol. En el citosol, PopC forma un complejo con PopD (una proteína de 16 kDa y expresada a partir del operón *popC-popD*). Así, PopD inhibe la actividad proteolítica de PopC y bloquea su secreción. La activación de RelA provoca la degradación de PopD, por medio de una tercera proteasa, permitiendo la secreción de PopC y la activación de CsgA (Konovalova *et al.*, 2012). CsgA, a su vez activa la

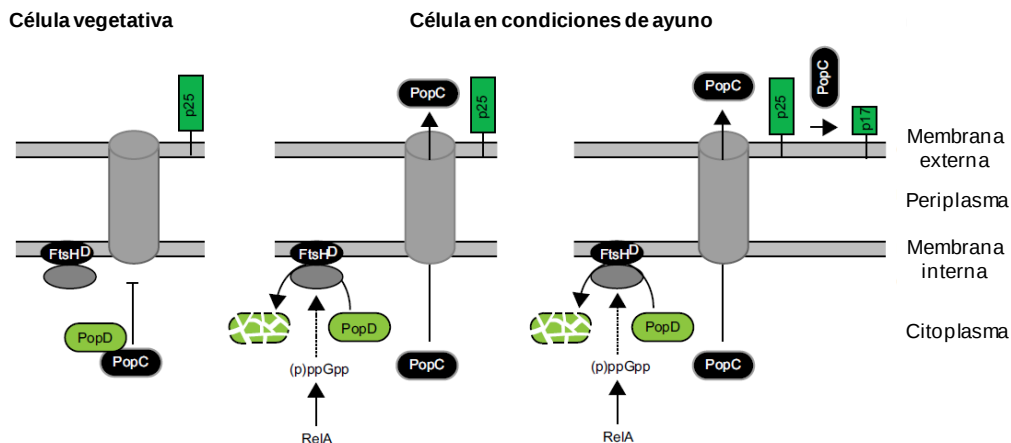


Figura 14. Activación de la señal C en *Myxococcus xanthus*. En la célula vegetativa, CsgA (en verde) permanece en su forma inactiva de 25KDa, anclado a la membrana externa de la célula, mientras que popC permanece secuestrado en el citosol por PopD. En respuesta al ayuno, se activa la síntesis de ppGpp, que desencadena, mediante un mecanismo desconocido, la degradación de PopC de manera dependiente de FtsHD (FtsHD hace referencia tanto a FtsH como a FtsD). Una vez liberado, PopC es secretado al exterior donde ejerce su actividad proteolítica sobre CsgA que pasa a su forma activa de 17KDa. Tomado de (Konovalova *et al.*, 2014).

síntesis de ppGpp, generándose un bucle positivo que mantiene altos los niveles de esta alarma. Además, en la regulación de los niveles de ppGpp, interviene otra proteína, SocE, que actúa inhibiendo su síntesis. Los niveles relativos de ambas proteínas, CsgA y SocE, determinan si la célula se dirige hacia el desarrollo o retorna al crecimiento vegetativo (Crawford & Shimkets, 2000) (Figura 13 y 14).

Especies que viven en ambientes en los que, de forma habitual, hay escasez de nutrientes, deben desarrollar mecanismos que aseguren su supervivencia. Este es el caso de *Caulobacter crescentus*, una alfa-proteobacteria que se caracteriza por dividirse de forma asimétrica dando lugar a dos tipos celulares distintos: las células nadadoras y las células pedunculadas que se fijan al sustrato. Cuando las condiciones son desfavorables, las células nadadoras buscan ambientes más ricos y, una vez encontrado un entorno más óptimo, se diferencian a células pedunculadas, las únicas capaces de replicar su DNA y dividirse. *C. crescentus* posee una sola proteína RSH bifuncional, CcRel (Lesley & Shapiro, 2008), capaz de sintetizar ppGpp en respuesta a

la falta de aminoácidos y, además, de carbono o nitrógeno (Boutte & Crosson, 2011). Por otro lado, la acumulación de ppGpp a altos niveles ocurre preferentemente en las células nadadoras. Aunque se desconoce el mecanismo que controla esta acumulación diferencial de ppGpp, se trata de un determinante importante de las diferentes respuestas propias de estos dos tipos celulares (Boutte *et al.*, 2012) (Figura 15).

Caulobacter crescentus

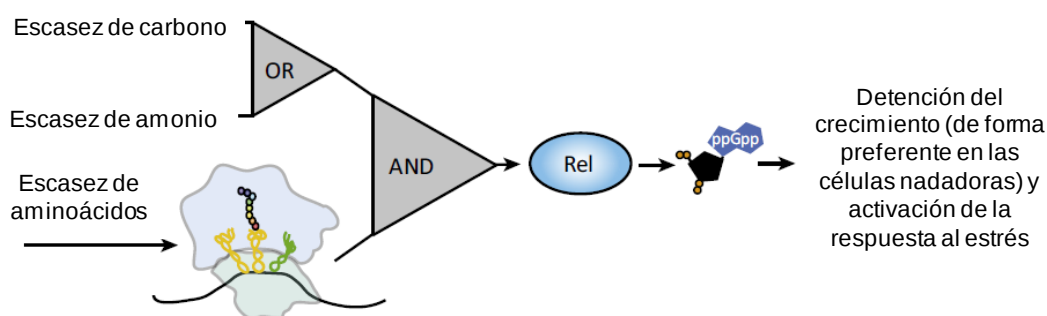


Figura 15. Mecanismos de activación de la “stringent response” en *Caulobacter crescentus*. Tomado de (Boutte & Crosson, 2013).

Mycobacterium tuberculosis, un actinomiceto patógeno, debe sobrevivir en el hospedador en condiciones de falta de nutrientes y limitación de oxígeno, en lo que se conoce como estado de “persistencia”. Dicha adaptación viene mediada por la “stringent response”, cuya activación depende del ppGpp sintetizado por la enzima bifuncional MtRel (Dahl *et al.*, 2005). Una de las señales que provoca la síntesis de ppGpp es el aumento en los niveles de polifosfato (poliP), un polímero inorgánico formado por decenas o cientos de residuos de fosfato unidos por enlaces fosfoanhídridos, que es sintetizado por la enzima Ppk y degradado por Ppx. Estudios realizados en *Mycobacterium smegmatis* (modelo no patógeno de micobacteria) revelan que el sensor de respuesta al estrés, MprB, fosforila al regulador de respuesta, MrpA, utilizando el poliP como donador de fosfato. Una vez fosforilado, MrpA activa la transcripción del factor σ^E , el cuál activa la transcripción de $_{MS}rel$ (Sureka *et al.*, 2007). MrpA fosforilado activa su propia síntesis, generándose un bucle de retroalimentación positiva que, junto a las fluctuaciones en la expresión basal de *ppk*, parecen contribuir a la formación de dos subpoblaciones fenotípicamente distintas. Una primera, en la que los niveles de expresión de $_{MS}rel$ son bajos, que se dirigirá hacia el crecimiento vegetativo, una segunda, en la que los niveles de expresión de $_{MS}rel$ son elevados y

que se dirigirá hacia el estado de persistencia (Sureka *et al.*, 2008) (Figura 16). En las micobacterias, que carecen de DksA, se ha propuesto que CdnL podría jugar un papel similar al de DksA en la “stringent response”, potenciando el efecto del ppGpp y la represión de los promotores de los rRNAs (Stallings *et al.*, 2009). No obstante, estudios posteriores que han coincidido en el tiempo con la realización de esta tesis doctoral, han puesto de manifiesto que, más que un papel en la represión de los rRNAs en condiciones de estrés, CdnL se requiere para su activación (Srivastava *et al.*, 2013).

Mycobacterium tuberculosis

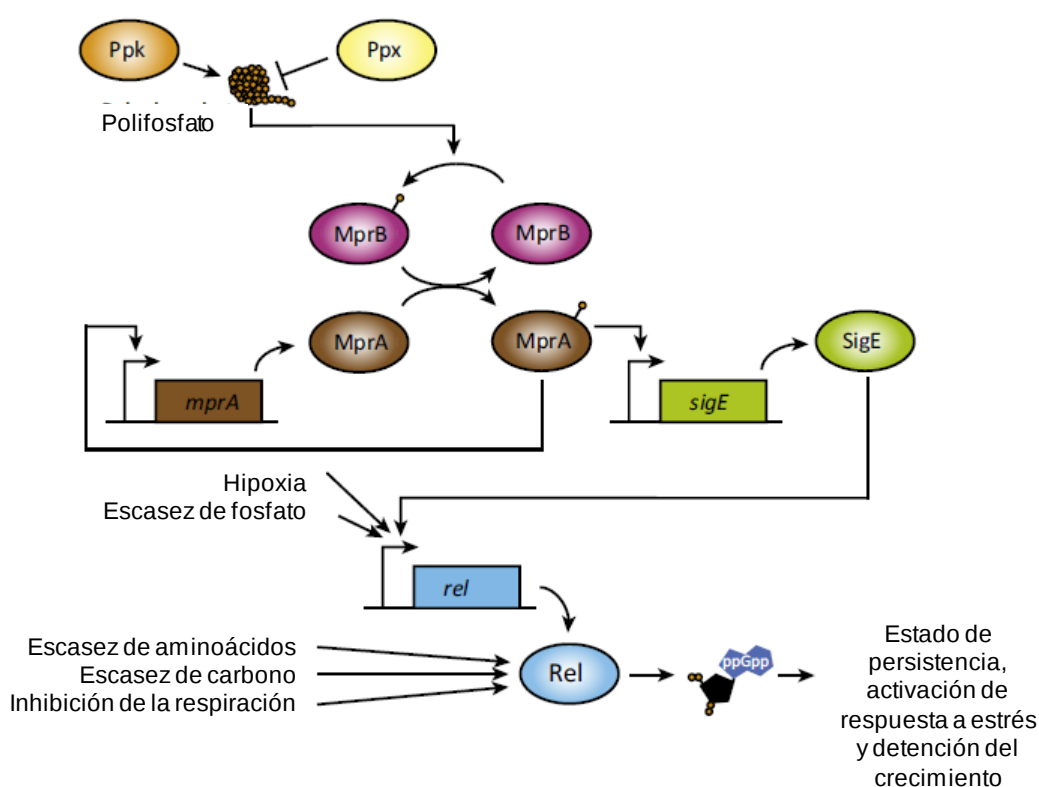


Figura 16. Mecanismos de activación de la “stringent response” en *Mycobacterium tuberculosis*. Tomado de (Boutte & Crosson, 2013).

Los niveles elevados de ppGpp actúan de forma directa e indirecta sobre diferentes procesos celulares (transcripción, traducción y replicación) permitiendo que las células se adapten a las condiciones de estrés. Uno de los cambios más comunes y más estudiados, sobre todo en *E. coli*, es la inmediata represión de la transcripción del RNA ribosómico. El genoma de *E. coli* posee siete operones de rRNA (*rnn*), cada uno de ellos con dos promotores en tándem, *rnnP1* y *rnnP2* (Figura 17). Ambos tipos de promotores contienen hexámeros -10 y -35 muy parecidos a las secuencias consenso reconocidas por el factor mayoritario σ^{70} , pero la longitud del elemento espaciador es

inferior (16 pb) al óptimo propuesto de 17 pb. Lo que confiere su fuerza característica a los promotores P1 durante el crecimiento exponencial es la presencia de dos elementos UP (distal y proximal), a cada uno de los cuales se une un dominio α -CTD (en P2 sólo está presente el elemento proximal) y de varios sitios de unión de la proteína activadora FIS. Aunque en la regulación de ambos promotores intervienen mecanismos similares, durante el crecimiento lento y en fase estacionaria los promotores P2 apenas se reprimen, lo que asegura el mantenimiento de un nivel basal de síntesis de rRNA y, por tanto, de ribosomas. Se ha propuesto que esta diferencia en cuanto a su represión se debe a la presencia del elemento discriminador en los promotores P1 (Dennis *et al.*, 2004; Paul *et al.*, 2004b). Estudios recientes indican que la interacción de la región $\sigma_{1.2}$ con secuencias aguas abajo del elemento -10 en la cadena codificante estabilizan el complejo abierto. Dicha estabilidad es mayor cuando

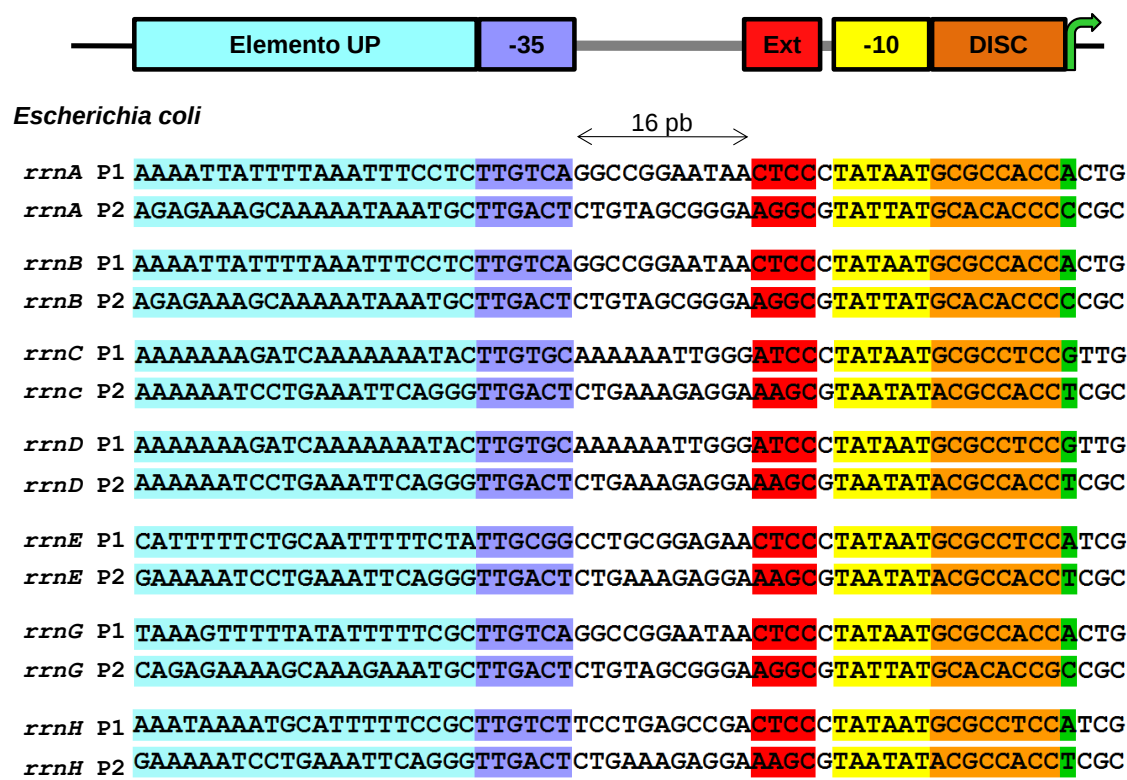


Figura 17. Secuencias promotoras de los operones de RNA ribosómico de *Escherichia coli*. En celeste el elemento UP, en azul la región -35, en rojo la región -10 extendida, en amarillo la región -10, en naranja el elemento discriminador, en verde el inicio de la transcripción.

el nucleótido en la posición -5 es una G y bastante menor cuando es una C (Ruff *et al.*, 2015). La sustitución de una C por una G en la posición -7 (equivalente a -5) del promotor *rrnB* P1 provoca un aumento en el tiempo de vida del complejo abierto así

como un aumento en la interacción con la región $\sigma_{1.2}$, demostrando que la inestabilidad del complejo abierto en los promotores ribosómicos de *E. coli* se debe, al menos en parte, a la débil interacción entre $\sigma_{1.2}$ y la región discriminadora (Haugen *et al.*, 2006; Haugen *et al.*, 2008b). Los promotores ribosómicos son, además, especialmente sensibles a la concentración de NTPs, principalmente a la concentración del primer NTP que se introduce en la cadena o NTP iniciador (iNTP). En *E. coli*, el ppGpp se une a una región cargada de la RNAP situada en el borde de la interfaz entre la subunidad β' y la subunidad ω , provocando cambios alostéricos que desestabilizan el complejo abierto (Ross *et al.*, 2013; Zuo *et al.*, 2013). DksA interacciona con la RNAP, a través del canal secundario, y potencia el efecto del ppGpp, así como la dependencia de la

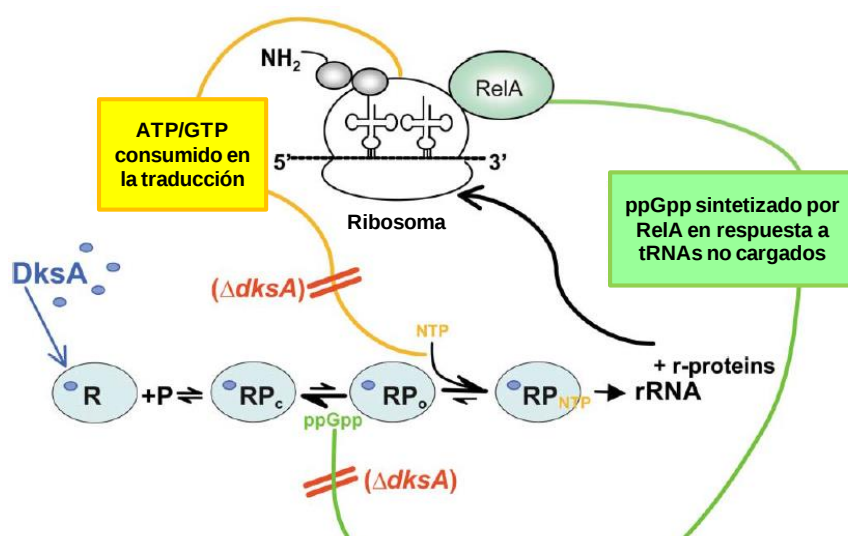


Figura 18. Modelo de acción de DksA de *E. coli* en la regulación de la expresión de rRNA. DksA (bolitas azules) se une a la RNAP (esferas azul claro), disminuyendo el tiempo de vida media del complejo abierto (RP_o), aumentando la concentración de iNTPs (amarillo) necesaria para que tenga lugar el inicio de la transcripción, y amplificando el efecto inhibidor de ppGpp (verde). En un mutante donde se ha deletado *dksA* (en rojo), los promotores de rRNA presentan complejos abiertos cuyos tiempo de vida media son más largos, haciéndolos insensibles (barras dobles rojas) a los cambios en las concentraciones fisiológicas de iNTP y ppGpp.

concentración de NTPs. De esta manera, las tres moléculas actúan conjuntamente reduciendo la ya corta vida media de los complejos abiertos de los promotores ribosómicos, e inhibiendo, por tanto, la síntesis de rRNA cuando se produce la “stringent response” (Paul *et al.*, 2004a) (Figura 18).

En *B. subtilis* y *Staphylococcus aureus*, bacterias pertenecientes al filo *Firmicutes* (y que carecen de la proteína DksA) la represión del inicio de la transcripción de los promotores de rRNA mediada por ppGpp sigue un mecanismo distinto. *B. subtilis* posee 10 operones de rRNA, de los cuales 6 presentan dos

promotores en tándem, *rrn* P1 y *rrn* P2, cuyo inicio de la transcripción coincide con una G en todos los casos (Krasny & Gourse, 2004). Tal como ocurre en *E. coli*, el promotor P1 es el más activo transcripcionalmente durante el crecimiento exponencial de la célula y el que se regula más drásticamente en fase estacionaria. Aunque contienen elementos UP en sus secuencias promotoras, tales elementos no contribuyen de manera significativa a su activación. Además, a diferencia de *E. coli*, la región discriminatoria de estos promotores no es rica en pares G+C, sino en pares A+T. Los estudios realizados en estos promotores indican que el mecanismo de actuación del ppGpp en *B. subtilis* es indirecto, disminuyendo los niveles de GTP, es decir, del NTP iniciador. Esta reducción drástica de los niveles de GTP puede tener lugar tanto de forma directa, mediante su consumo en la síntesis de ppGpp, como de forma indirecta, reduciendo su biosíntesis. Este mecanismo indirecto de regulación ha sido observado también en *S. aureus*, donde no sólo el iNTP sino también los sucesivos nucleótidos hasta la posición +4 son importantes en la transcripción del rRNA. El aumento en los niveles de ppGpp, aunque mediante mecanismos distintos, produce resultados similares en bacterias tan distantes como *E. coli* y *B. subtilis*. No obstante, no todas las respuestas están conservadas. La represión de los promotores *rrn* en respuesta a la falta de carbono en *B. subtilis*, así como en respuesta a la entrada en fase estacionaria en *S. aureus*, sigue un mecanismo independiente de ppGpp (Kastle *et al.*, 2015; Krasny & Gourse, 2004; Liu *et al.*, 2015).

Como se comentó anteriormente, en *C. crescentus* la falta de carbono (o nitrógeno) y aminoácidos activa la síntesis de ppGpp, lo que provoca la activación y represión de diversos genes, típica de la “stringent response”. Sin embargo, las estirpes portadoras de deleciones de *ccr* o *dksA* siguen siendo capaces de reducir el nivel de expresión del rRNA en respuesta a la falta de glucosa, lo que pone de manifiesto un mecanismo de represión de los promotores de rRNA ante la falta de carbono independiente de ppGpp o DksA. Hasta la fecha, se desconocen los factores implicados en dicha regulación (Boutte & Crosson, 2011).

M. xanthus posee 4 operones de rRNA, con un número de promotores en tándem que varía entre 3 y 6. La acumulación de ppGpp durante el complejo proceso de desarrollo multicelular desencadenado por la falta de alimento reduce los niveles de RNA total (Harris *et al.*, 1998). Sin embargo, se desconoce si existen mecanismos implicados en la regulación de la expresión de los rRNA durante la respuesta al estrés

nutricional, o si existe algún tipo de regulación de dichos promotores durante la fase de crecimiento vegetativo.

I.2 *Myxococcus xanthus*

I.2.1 Características generales de las mixobacterias

Las mixobacterias, descritas en 1892 por Roland Thaxter, son bacterias Gram negativas, no patógenas, aerobias, de forma bacilar y de tamaño relativamente grande (0'7-1'2 μm de ancho y 3-12 μm de largo). Aunque las mixobacterias son prácticamente ubicuas en la naturaleza, su hábitat principal es el suelo, donde se alimentan de material en descomposición o de otros microorganismos (Dawid, 2000; Iizuka *et al.*, 1998). La mayor riqueza en número de especies y densidad de población corresponde a hábitats situados entre los trópicos y las zonas templadas (Dawid, 2000), debido a que la mayoría de cepas son típicamente mesófilas. *M. xanthus*, por ejemplo, presenta su tasa máxima de crecimiento cuando se incuba a 34-36 °C. A 40 °C las células se dañan y no crecen, y a 14 °C el crecimiento es exponencial pero muy reducido. En cambio, las mixosporas son completamente estables a 50-60 °C (Janssen *et al.*, 1977).

En cuanto a su clasificación taxonómica, las mixobacterias pertenecen a la división δ de las Proteobacterias, que incluye otros dos grupos de bacterias: las bacterias reductoras de sulfato, como *Desulfovibrio*, y el género *Bdellovibrio* (Shimkets & Woese, 1992). Basándose en sus características morfológicas y fisiológicas (Reichenbach, 1993) y apoyado por el análisis del RNA 16S (Shimkets & Woese, 1992; Sproer *et al.*, 1999), han sido clasificadas en tres subórdenes: *Sorangineae*, *Cystobacterineae* (que incluye *M. xanthus*, la especie más estudiada), y *Nannocystineae*.

Las mixobacterias se caracterizan por un genoma con un alto contenido en G+C (67-71%) e inusualmente grande en relación a los de otros procariotas (9.14 Mb para *M. xanthus* y hasta 13 Mb para alguna especie). El análisis del genoma de *M. xanthus* ha llevado a proponer una expansión genómica a partir de su progenitor ancestral debida, al menos en parte, a una duplicación génica masiva (Goldman *et al.*, 2006; Kaiser & Dworkin, 2008), que afecta específicamente a genes implicados en la señalización intercelular, la percepción sensorial de pequeñas moléculas, y el control integrado de la transcripción. Esta observación sugiere que las duplicaciones génicas y posterior divergencia de los genes duplicados han jugado un papel clave en la

evolución de la compleja red de señalización requerida para el estilo de vida multicelular de las mixobacterias. Por otro lado, la transferencia génica horizontal parece haber contribuido también a la expansión genómica de *M. xanthus*, con la adquisición de un número elevado de genes implicados en la producción de metabolitos secundarios que probablemente son importantes para su comportamiento depredador (Yang & Higgs, 2014).

Inicialmente las mixobacterias fueron consideradas hongos por su capacidad de generar estructuras multicelulares morfológicamente complejas en respuesta al ayuno, comportamiento único en el mundo procariótico. Por ello, este grupo de organismos ha sido objeto de una intensa actividad investigadora. El proceso de desarrollo multicelular requiere una absoluta coordinación, que es lograda gracias a la intensa comunicación, mediante diversas señales, establecida entre las células. Dentro de la célula, estas señales desencadenan una compleja red reguladora y la activación de genes específicos. El resultado final es la diferenciación de las células vegetativas en formas de resistencia llamadas mixosporas, que se organizan en estructuras multicelulares denominadas cuerpos fructíferos (Kaiser, 2008; Kroos, 2007).

Estas interacciones sociales son, además, cruciales para la movilidad y el crecimiento vegetativo, permitiendo a la célula organizarse en distintos patrones espaciales, así como alimentarse de manera cooperativa. Dentro de las mixobacterias, *Myxococcus xanthus* se ha convertido en el modelo de estudio para entender la genética y los mecanismos moleculares implicados en este singular proceso.

I.2.2 Ciclo de vida de *M. xanthus*

Como en todas las mixobacterias, el ciclo de vida de *M. xanthus* comprende dos fases, una fase vegetativa y otra de desarrollo. En ambas fases el comportamiento social característico de este grupo es crucial y, como se ha comentado anteriormente, para que tenga lugar de manera efectiva es necesario que el conjunto de células se muevan de manera coordinada. *M. xanthus*, que carece de flagelos, es capaz de desplazarse mediante dos tipos de movimiento, el social (S), que opera generalmente cuando las células están próximas entre sí, y el aventurero (A), que opera sobre células individuales o sobre grupos de células. Ambos tipos de movimiento, aunque son independientes, actúan de forma sinérgica (Kaiser *et al.*, 2010). Para explicar el movimiento aventurero se han propuesto dos modelos. El primero de ellos asume que

la fuerza motora deriva de la extrusión de mucílago, a través de estructuras embebidas en el polo posterior de la envoltura celular, que al hidratarse propulsaría la célula hacia adelante (Wolgemuth *et al.*, 2002; Yu & Kaiser, 2007). El segundo modelo se basa en la existencia de complejos motores citoplasmáticos anclados a la membrana que contactan con el citoesqueleto dispuesto de forma helicoidal. Estos complejos motores se desplazan sobre el citoesqueleto en dirección contraria al movimiento de la célula, generando en su avance una fuerza igual y opuesta en esta hélice. Se ha observado que al llegar a la zona ventral (región en contacto con el sustrato que se encuentra cubierta de mucílago) estos complejos motores se ralentizan, ya que la capa de mucílago opone mayor resistencia al movimiento. Se genera así un “atasco” temporal de complejos motores que ejercen una fuerza propulsora sobre el mucílago que es transmitida al sustrato (Nan *et al.*, 2013; Nan & Zusman, 2011). Por su parte, en el movimiento social intervienen pili de tipo IV localizados en el polo adelantado (Mignot *et al.*, 2005), fibrillas y el lipopolisacárido de la pared celular (Arnold & Shimkets, 1988; Bowden & Kaplan, 1998; Hartzell *et al.*, 2008; Wall & Kaiser, 1999). La retracción de los pili genera una fuerza de tracción responsable del movimiento celular (Skerker & Berg, 2001; Sun *et al.*, 2000). Ambos tipos de movimiento requieren de MglA, una proteína G de tipo Ras, que determina la polaridad del movimiento (Leonardy *et al.*, 2010; Mauriello, 2010). La localización polar de MglA depende del nucleótido que tenga unido, determinado por MglB, una proteína de tipo GAP (GTP hydrolysis activating protein). MglB es reclutada al polo celular rezagado, por un mecanismo desconocido, donde promueve la actividad GTPasa de MglA, evitando su acumulación en este polo (Bulyha *et al.*, 2011).

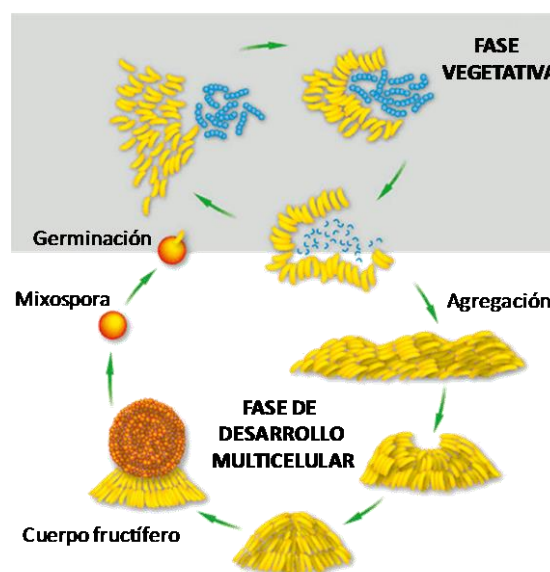


Figura 19. Ciclo de vida de *M. xanthus*

Desde un punto de vista nutricional, *M. xanthus* es una bacteria compleja. Hidroliza proteínas y ácidos nucleicos para obtener aminoácidos esenciales y fosfato, no viéndose favorecido su crecimiento por la presencia de mono- o disacáridos en el medio. Los aminoácidos son utilizados para la glucogenogénesis, mediante la vía de Embden-Meyerhof, y como fuente de energía, al ser convertidos en acetyl-CoA para su posterior entrada en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) (Dworkin, 1962). Durante la fase vegetativa las células se desplazan coordinadamente formando agrupaciones denominadas enjambres. Estos enjambres actúan de forma conjunta liberando exoenzimas (proteasas, nucleasas, lipasas, glucanasas) y antibióticos al medio, que conducen a la lisis y degradación de los microorganismos presentes (presas) que constituirán su fuente de alimentación. El ataque enzimático de manera conjunta es más eficiente, ya que permite alcanzar niveles más altos de enzima y minimizar las pérdidas por difusión (Reichenbach, 1999). Este comportamiento les ha valido el calificativo de microdepredadoras (Reichenbach, 1993; Singh, 1947).

La fase de desarrollo multicelular se inicia cuando estos enjambres de células no encuentran suficientes nutrientes o presas. El crecimiento cesa y las células comienzan a apilarse en centros de agregación, denominados cuerpos fructíferos (Kaiser, 2008; Kroos, 2007; O'Connor & Zusman, 1989; Pathak *et al.*, 2012; Sager & Kaiser, 1993; Sogaard-Andersen, 2004). En los cuerpos fructíferos, la mayoría de las células se diferencian en formas de resistencia, esféricas e inmóviles, que reciben el nombre de mixosporas, mientras que un pequeño grupo de células (aproximadamente un 10%), permanecen indiferenciadas y se disponen formando una mono-capa de células alrededor y entre los cuerpos fructíferos (Dworkin, 1996; White, 1993). Cuando las condiciones del medio vuelven a ser apropiadas, las mixosporas germinan y dan lugar a células vegetativas móviles metabólicamente activas, reanudándose la fase vegetativa (Elías-Arnanz & Murillo, 1991a, b). La formación de mixosporas permite la supervivencia de las células en condiciones adversas, mientras que la agregación en cuerpos fructíferos asegura que el nuevo ciclo de vida vegetativo se inicia con una población en lugar de con una sola célula.

I.2.3 Carotenogénesis en *M. xanthus*

En condiciones de oscuridad, las colonias de *M. xanthus* presentan una coloración amarilla, debido a la síntesis de un pigmento hidrosoluble no carotenoide llamado DKxanteno (Burchard *et al.*, 1977; Burchard & Dworkin, 1966; Meiser *et al.*, 2006). Cuando las colonias crecen en la luz, su coloración se torna roja, por la

producción de pigmentos fotoprotectores de tipo carotenoide (mayoritariamente un éster glicosilado de mixobacton, grandes cantidades de fitoeno y cantidades menores de fitoflueno y otros) (Martínez-Laborda *et al.*, 1990). A lo largo de más de 20 años de estudio, principalmente por el grupo en el que se ha realizado este trabajo, se han identificado un buen número de genes, tanto estructurales como reguladores, implicados en esta respuesta. Dichos genes se encuentran situados en seis loci independientes del genoma de *M. xanthus* (Elías-Arnanz *et al.*, 2008; Elias-Arnanz *et al.*, 2011) los operones *carQRS* y *carDG* los genes reguladores *ihfA* y *carF*, el superoperón *carB-carA* (que agrupa genes estructurales y reguladores) y *crtlB*, el único gen estructural que no se encuentra agrupado en el superoperón *carB-carA*. Un operón clave de esta compleja red reguladora es el operón *carQRS*, cuya transcripción depende de sus propios productos génicos CarQ y CarR. En oscuridad, CarQ, un factor σ -ECF, se encuentra secuestrado en la membrana por su factor anti- σ , CarR. En la luz, CarF, una proteína también de membrana, de alguna manera percibe la señal luminosa (en forma de una especie muy reactiva del oxígeno, el oxígeno singlete, que se genera por fotoexcitación de la protoporfirina IX acumulada en la membrana) y provoca la inactivación de CarR (la presencia de cobre provoca también su inactivación, de forma independiente de la luz) y la liberación de CarQ. Una vez libre, CarQ se une a la RNAP y activa su propio promotor P_{QRS} y el de *crtlB*, P_I . La activación de ambos promotores requiere del complejo CarD/CarG, mencionado anteriormente. La activación de P_{QRS} además requiere la proteína IHF (integration host factor), un factor arquitectónico implicado en varios procesos tales como el empaquetamiento del cromosoma, la recombinación y la regulación transcripcional.

Por su parte, CarS es un antirrepresor que actúa sobre los represores parálogos CarA y CarH (compitiendo con el DNA por la unión a estos represores), determinados por dos genes contiguos situados al final del superoperón *carB-carA*. Como se ha comentado anteriormente, en oscuridad, CarA y CarH se unen a su operador en P_B , el promotor del operón *carB* donde se agrupan el resto de genes estructurales, bloqueando su transcripción. Aunque tanto CarA como CarH se unen a la vitamina B_{12} a través de su dominio C-terminal, sólo CarH depende de ella (en su forma adenosilcobalamina o Ado- B_{12}) para ejercer su actividad represora. Por otro lado, mientras que CarA requiere del antirrepresor CarS para liberarse del DNA en la luz, CarH explota la fotosensibilidad intrínseca de la Ado- B_{12} para responder directamente a la luz y disociarse del DNA (Elías-Arnanz *et al.*, 2008; Elias-Arnanz *et al.*, 2011; Jost *et al.*, 2015; Ortiz-Guerrero *et al.*, 2011).

I.2.4 CarD y CarG de *M. xanthus*

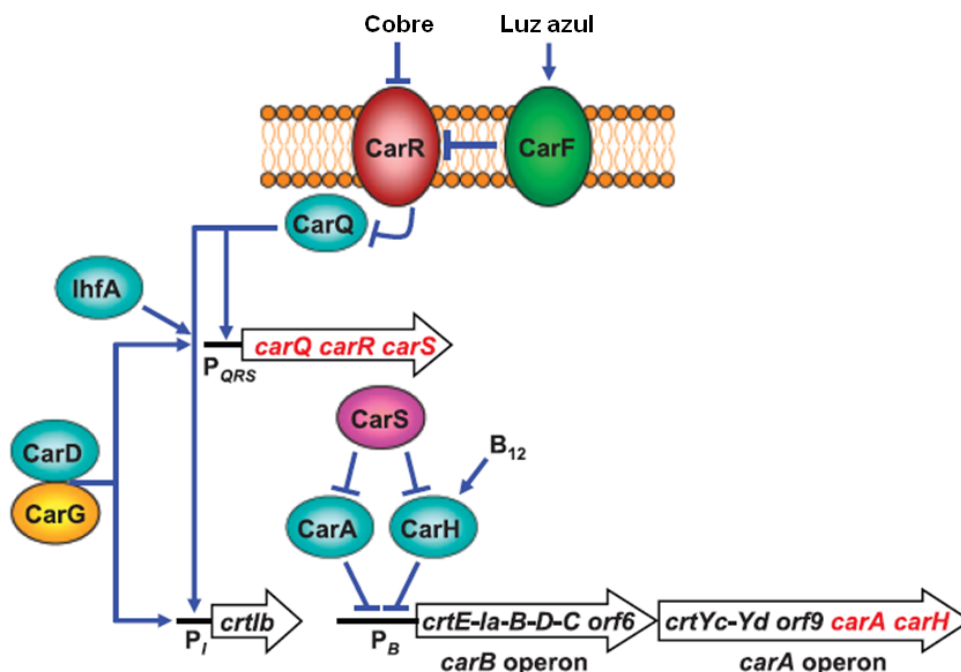


Figura 20. Modelo de la organización y acción de los genes implicados en la respuesta carotenogénica de *M. xanthus* a la luz azul y al cobre. En rojos los genes reguladores, en negro los genes estructurales. Los óvalos indican proteínas. Las flechas negras finas indican acciones positivas sobre promotores, y las líneas truncadas acciones negativas sobre promotores u otras proteínas. Tomado de (Elias-Arnanz *et al.*, 2011).

I.2.4.1 El operón *carD-carG*

El producto génico del gen *carD*, CarD, es necesario para la regulación de casi el 3% de los genes en fase vegetativa (Galbis-Martínez *et al.*, 2004). En la respuesta a la luz se requiere directamente para la activación de los promotores P_{QRS} y P_I , dependientes de CarQ, e indirectamente para la activación de P_B , a través de la acción desrepresora de CarS. Además, es necesario en la etapa temprana de la formación de cuerpos fructíferos (Nicolás, 1995; Nicolás *et al.*, 1994). El gen *carD* se cotranscribe con el gen inmediatamente aguas abajo, *carG*, cuyo producto es absolutamente necesario para la activación de cada uno de los genes dependientes de CarD que han sido examinados hasta el momento (Abellán-Martínez, 2006; Peñalver-Mellado *et al.*, 2006). Como se comentó anteriormente, CarD y CarG interactúan físicamente formando un complejo regulador de la transcripción de acción global. En consonancia con su modo de acción conjunto, en aquellos genomas de mixobacterias en los que está presente *carD* (suborden Cystobacterineae), inmediatamente aguas abajo

también está presente *carG*, mientras que en los genomas en los que no está presente uno de ellos tampoco lo está el otro (Elías-Arnanz *et al.*, 2010).

I.2.4.2 La proteína CarD

CarD, constituida por 316 residuos (34 KDa), forma un dímero en solución. Una de las características más notables de esta proteína es la presencia de un segmento C-terminal de unos 136 residuos que se asemeja a las proteínas eucarióticas HMGA (Figura 21). Se trata de un módulo compuesto por una región muy ácida adyacente a un dominio de unión al DNA formado por cuatro repeticiones denominadas “ganchos AT” (Nicolás *et al.*, 1996; Padmanabhan *et al.*, 2001). Los ganchos AT de CarD están constituidos por una región conservada de cuatro aminoácidos, Arg-Gly-Arg-Pro (RGRP), embebidos en una secuencia rica en residuos básicos y de prolina. CarD de *M. xanthus* (CarD) presenta cuatro ganchos AT, a diferencia de las proteínas HMGA de mamíferos y de la proteína homóloga de CarD de la mixobacteria *Stigmatella aurantiaca* (SaCarD) que poseen solamente tres (Cayuela *et al.*, 2003). Además, la región ácida de las proteínas HMGA eucarióticas se encuentra en el extremo N-terminal de los ganchos AT, y no en el extremo C-terminal, como ocurre en CarD y SaCarD. No obstante, CarD es capaz de reconocer *in vitro* el sitio de unión típico de la proteína HMGA1a humana en el promotor de IFN- β , y la proteína HMGA1a es capaz de unirse al promotor reconocido por P_{QRS} de *M. xanthus*, y de reemplazar funcionalmente al dominio C-terminal de CarD *in vivo* (García-Heras *et al.*, 2009).

Por otra parte, la proteína CarD posee un dominio N-terminal (Figura 21), de unos 180 residuos, ausente en las proteínas HMGA eucarióticas, implicado en la dimerización, la interacción con CarG y con la RNAP (García-Heras *et al.*, 2009; García-Moreno *et al.*, 2010; Peñalver-Mellado *et al.*, 2006). A diferencia del dominio C-terminal, este dominio presenta una estructura secundaria y terciaria bien definida.

Como se comentó en el apartado I.1.3.3, la comparación del dominio N-terminal de CarD con las secuencias en las bases de datos permitió identificar un conjunto de proteínas procarióticas (familia PF02559), la mayoría de función desconocida, de secuencia y tamaño similares a CarDnt (26-35% de identidad y 50-59% de similitud) (Bateman 2002, Cayuela 2003). Aunque estas proteínas se encuentran ampliamente distribuidas entre los procariotas, están ausentes de algunos grupos taxonómicos tales como *Beta-*, *Epsilon-*, *Gammaproteobacteria*, *Chlamydiae* y *Cyanobacteria*. Los miembros de la familia incluyen un dominio de tipo RID (RNAP

interacting domain) similar al dominio de interacción con la RNAP de los factores TRCF (transcription repair coupling factor (Cayuela *et al.*, 2003; Elías-Arnanz *et al.*, 2010; García-Moreno *et al.*, 2010; Stallings *et al.*, 2009).

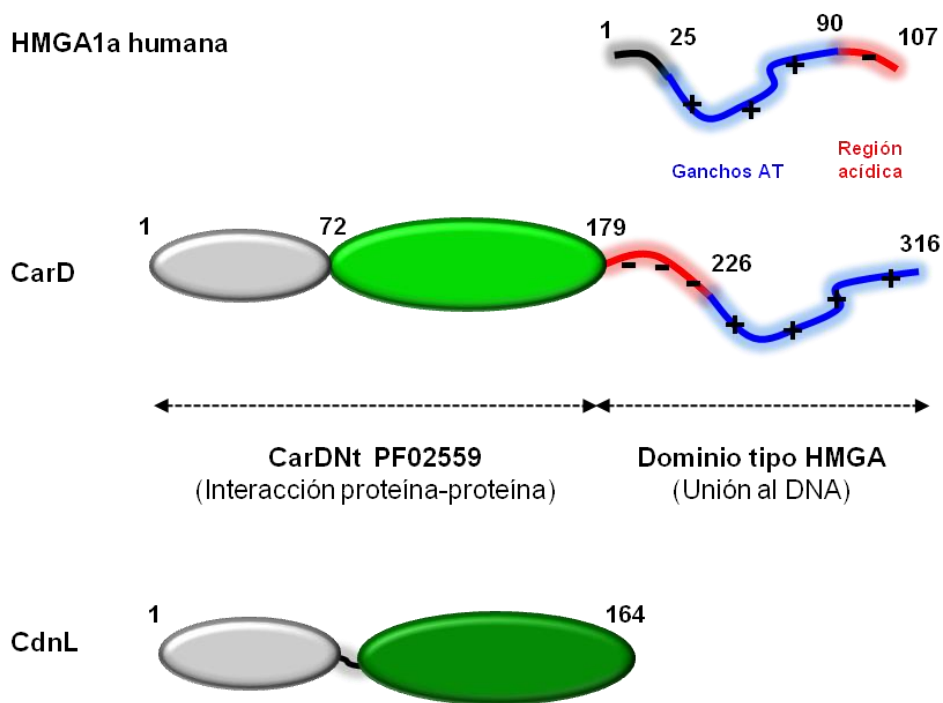


Figura 21. Esquema de los dominios de arquitectura de CarD. El dominio N-terminal, CarDNT, define toda una familia de proteínas (PF02559) que incluye un numeroso grupo de proteínas independientes denominadas CdnL (CarD N-terminus-like). El dominio C-terminal, no estructurado, de CarD es de tipo HMGA, en la parte superior se muestra la proteína HMGA1a humana para su comparación (los residuos básicos del gancho AT se indican con “+”, los residuos ácidos de la región ácida como “-”).

La mixobacteria *Anaeromyxobacter dehalogenans* presenta proteínas homólogas a CarD (AdCarD) y a CarG (AdCarG). AdCarD presenta un extremo N-terminal muy similar al extremo N-terminal de CarD (58% de identidad y 70% de similitud), mientras que su extremo C-terminal muestra tan solo una identidad del 37% (45% de similitud). Al igual que CarD, el extremo C-terminal de AdCarD presenta un tramo ácido precedido de una región básica. Sin embargo, carece de los característicos ganchos AT y, en su lugar, presenta un alto contenido en K/A/P (lisina/alanina/prolina) típico de la región C-terminal (CTR) de la histona H1. A pesar de esta diferencia, quimeras en las que la región HMGA de CarD ha sido sustituida por el dominio tipo histona H1 de AdCarD o por la histona humana H1.2, ambas básicas y

con cierto desorden estructural, son totalmente funcionales en *M. xanthus*. Ese reemplazo funcional no se observa si los ganchos AT se sustituyen por el citocromo C, una proteína básica pero de estructura definida. Estos datos sugieren que el desorden estructural intrínseco proporciona la “maleabilidad” conformacional requerida para la unión de CarD a distintas secuencias diana (García-Heras *et al.*, 2009).

Que las proteínas CarD posean un dominio N-terminal con un origen exclusivamente procariótico y un dominio C-terminal similar a la proteína HMGA o al dominio H1-CTR, ambos eucarióticos, sugiere más de un posible escenario para su origen evolutivo. Dado que la existencia del dominio HMGA se restringe al suborden de mixobacterias al que pertenece *M. xanthus* y *S. aurantiaca*, dicho dominio podría haber surgido de *nov*o en CarD. Sin embargo, su prevalencia en el mundo eucariótico y los precedentes de transferencia génica horizontal en *M. xanthus* hacen más plausible una aparición mediante dicho proceso (Cayuela *et al.*, 2003). Si hubiera sido así, CarD (y SaCarD) habrían surgido por la fusión de un módulo procariótico pre-existente y un dominio de tipo eucariótico. Por otra parte, la presencia en AdCarD de un dominio H1-CTR, en lugar de HMGA, suscita otra posible explicación al origen de este dominio. Varias especies bacterianas, aunque no arqueas, poseen dominios similares a H1-CTR, lo que ha llevado a proponer que el origen de este dominio se remonta a eubacterias y que fueron los eucariotas los que adquirieron este dominio por transferencia génica horizontal (Kasinsky *et al.*, 2001). De esta manera, AdCarD podría haber surgido por la fusión de dos dominios procarióticos. Dado que CarD de *M. xanthus* y AdCarD están íntimamente relacionados, y que la región C-terminal rica en residuos de K/A/P de AdCarD se asemeja a la de CarD, este último podría haber adquirido los “ganchos AT” por convergencia evolutiva a partir de un dominio ancestral de tipo H1, más que por transferencia génica horizontal (Elías-Arnanz *et al.*, 2010; García-Heras *et al.*, 2009). Dicha evolución de los “ganchos AT” debería haber tenido lugar antes de que *M. xanthus* y *S. aurantiaca* se diversificaran, ya que está presente en ambas especies. Parece menos probable que, en dos especies estrechamente relacionadas como son *M. xanthus* y *A. dehalogenans*, tuvieran lugar dos eventos de fusión, ambos implicando al módulo N-terminal de CarD y al dominio de tipo HMGA en el otro (CarD), el dominio de tipo H1 en un caso (AdCarD).

I.2.4.3 CdnL

A la proteína similar a CarDNt de *M. xanthus*, objeto de estudio de esta tesis, la hemos denominado CdnL (por CarDN-terminal like) para distinguirla de CarD. A diferencia de CarD, cuyos ortólogos han sido identificados hasta el momento solo en mixobacterias, los homólogos de CdnL se encuentran ampliamente distribuidos en bacterias, identificándose cada vez más miembros de este gran grupo gracias a la secuenciación masiva de los genomas bacterianos. Los trabajos realizados en nuestro grupo de investigación permitieron describir, en gran medida, las características principales de la proteína CdnL de *M. xanthus* (García-Moreno *et al.*, 2010):

CdnL de *M. xanthus* es una proteína de 164 aminoácidos con un peso molecular de 18.7 KDa, capaz de formar dímeros. Los análisis estructurales revelan dos dominios: un dominio C-terminal, compacto y estructurado, y un dominio N-terminal, sensible a proteólisis enzimática, que parece ser responsable de la dimerización de la proteína (García-Moreno, 2009).

El estudio de complementariedad llevado a cabo con una quimera en la que el dominio N-terminal de CarD (CarDNt) era sustituido por CdnL puso de manifiesto que, pese a la similitud de secuencia de CdnL con CarDNt, CdnL no es funcionalmente equivalente a dicho dominio. Además, dicha quimera, así como la proteína CdnL, fue incapaz de interactuar con CarG. Esta última observación podría explicar la falta de complementación funcional de CdnL, ya que la interacción de CarD con CarG es crucial para su actividad (García-Moreno *et al.*, 2010).

Como primera aproximación para determinar la función de esta proteína, se intentó delecionar el gen *cdnL*, consiguiéndose con éxito sólo en presencia de una copia extra del mismo. Estos datos demostraron que CdnL es esencial para la viabilidad celular en *M. xanthus*. Este carácter esencial se mantiene en la proteína homóloga de *Mycobacterium tuberculosis* (MtCdnL) (Stallings *et al.*, 2009) y de *Borrelia burgdorferi* (Yang *et al.*, 2008) pero no así en la de *Bacillus subtilis* (Kobayashi *et al.*, 2003). Además, el bloqueo temporal de la expresión de *cdnL*, mediante un sistema de expresión condicional basado en la actividad represora (dependiente de vitamina B₁₂) de CarH (García-Moreno *et al.*, 2009), resultó en un fenotipo de células inusualmente alargadas. Sin embargo, su sobreexpresión no pareció causar ningún efecto aparente, ni en la viabilidad ni en la morfología celular. El estudio de la secuencia promotora de *cdnL* (P_{cdnL}) indicó que este promotor es dependiente del

factor mayoritario σ^A , y que su actividad se mantiene constante a lo largo del ciclo celular (García-Moreno *et al.*, 2010).

El dominio RID de TRCF de *E. coli* interacciona con una región situada en el extremo N-terminal de la subunidad β de la RNAP (β RNAP) (Deaconescu *et al.*, 2006). En *M. xanthus*, regiones equivalentes en la subunidad β interaccionan no solo con TRCF-RID, sino también con CdnL y con CarDNt. Estos datos sugieren que *in vivo* las tres proteínas estarían compitiendo por la RNAP y que, probablemente, la existencia de otros niveles de control (afinidad, concentración relativa de cada proteína) proporcionarían la especificidad requerida para ejercer su función. Por otra parte, aunque CdnL y CarDNt conservan la interacción con la β RNAP, CarDNt no suple la falta de CdnL en la célula. Cabe destacar que, pese a carecer de un dominio de unión al DNA, CdnL se encuentra asociado al nucleoide, como se ha podido comprobar mediante su fusión a la proteína verde fluorescente (EGFP). Se ha propuesto, por tanto, que el reclutamiento de CdnL al nucleoide podría estar mediado por su interacción con la RNAP (García-Moreno *et al.*, 2010).

Entre los miembros de la familia CarD_TRCF se observa un considerable grado de similitud, no obstante homólogos de CdnL de *Bdellovibrio bacteriovorus*, *Streptomyces coelicolor*, *Corynebacterium glutamicum* y *Thermus thermophilus*, no complementaron la delección de *cdnL* en *M. xanthus*. Tal observación podría explicarse por falta de conservación evolutiva de la función o, quizás más probable, por la existencia de interacciones específicas de especie (García-Moreno *et al.*, 2010).

Al inicio de esta tesis, el homólogo de CdnL en *M. tuberculosis* (que carece de DksA) había sido descrito como un represor de los promotores ribosómicos, capaz de funcionar como DksA en *E. coli* (que carece de CdnL) (Stallings *et al.*, 2009). Sin embargo, en el transcurso de esta tesis, a MtCdnL se le ha atribuido un papel opuesto en la regulación de los promotores ribosómicos, proponiéndose además como un activador global de la transcripción de promotores dependientes del factor sigma mayoritario (σ^A). (Srivastava *et al.*, 2013).

I.3 Objetivos

El objetivo global de esta tesis doctoral ha sido profundizar en el modo de acción de la proteína CdnL (su representante en *M. xanthus*), y de sus proteínas homólogas mediante los siguientes objetivos específicos:

- Determinar la estructura-función de CdnL
- Identificar los residuos implicados en interacción entre CdnL y la subunidad β de la RNAP, evaluar su relevancia funcional y su conservación evolutiva.
- Comprobar si la ausencia de *cdnL* no es complementada por sus homólogos debido a un defecto en la interacción con la RNAP de *M. xanthus*, es decir, debido a la existencia de interacciones específicas de especie.
- Analizar, una vez obtenida la estructura, los residuos clave en el dominio C-terminal de CdnL.
- Creación de una estirpe que exprese condicionalmente *cdnL* utilizando un sistema de expresión condicional satisfactorio (el sistema del que disponemos actualmente presenta ciertas limitaciones), que permita abordar el estudio funcional de CdnL.
- Determinar si en *M. xanthus*, que presenta tanto CdnL como DksA (siendo ambas proteínas esenciales), CdnL está implicado en la regulación de los rRNA.
- Estudio de su homólogo en *C. crescentus*.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1 Estirpes y plásmidos

II.1.1 Estirpes

II.1.1.1 Estirpes de *M. xanthus*

En la Tabla 1 se recogen las estirpes de *M. xanthus* utilizadas en este trabajo, indicando su fenotipo, genotipo y origen (las generadas en nuestro laboratorio se nombran con las letras MR seguidas de un número de aislamiento; aclaraciones sobre el genotipo de algunas estirpes se incluyen en la sección de Resultados). Dichas estirpes derivan de DK1050, una variante espontánea de DK101 que presenta una coloración amarilla estable en la oscuridad (Ruiz-Vazquez & Murillo, 1984) o, para los experimentos de fructificación, de DK1622 (Kaiser, 1979; Wall & Kaiser, 1999) pues DK1050 contiene la mutación *pilQ1* que afecta a la movilidad social.

Tabla 1. Estirpes de <i>M. xanthus</i> utilizadas en este trabajo.		
Estirpe	Descripción	Fuente o referencia
MR151	Estirpe en la que se ha inactivado <i>carR</i> (<i>carR3</i>). Expresa P_B y P_{QRS} de manera independiente de luz	(1)
MR1467	$\Delta cdnL$ $P_B::cdnL$ $P_C::carH$ $\Delta carA$ $\Delta carH$ (<i>cdnL</i> es reemplazado por un punto de corte XbaI). Tc^R	(2)
MR1482	Derivado de MR1467 con <i>cdnL</i> en el sitio endógeno. Tc^R Km^R	(2)
MR1488	<i>cdnL</i> en el sitio endógeno; $P_{cdnL}::cdnL-egfp$ en el sitio heterólogo. Tc^R	(2)
MR1489	$\Delta cdnL$; $P_{cdnL}::cdnL-egfp$ en el sitio heterólogo. Tc^R	(2)
MR1978	MR1467 con el gen que codifica CdnL(1-54)-TtCdnLCt. Tc^R Km^R Gal^S	Este trabajo
MR2169	<i>dksA</i> en el sitio endógeno; $P_{IPTG}::dksA-P_{R4}::lacI$ (DK1622). Tc^R	Este trabajo

MR2170	$\Delta dksA$; $P_{IPTG}::dksA-P_{R4}::lacI$ (DK1622). Tc^R	Este trabajo
MR2191	$cdnL$ en el sitio endógeno; $P_{IPTG}::cdnL-P_{R4}::lacI$. Tc^R	Este trabajo
MR2192	$\Delta cdnL$; $P_{IPTG}::cdnL-P_{R4}::lacI$. Tc^R	Este trabajo
MR2193	$cdnL$ en el sitio endógeno; $P_{IPTG}::cdnL-P_{R4}::lacI$ (DK1622). Tc^R	Este trabajo
MR2194	$\Delta cdnL$; $P_{IPTG}::cdnL-P_{R4}::lacI$ (DK1622). Tc^R	Este trabajo
MR2404	MR1467 con $cdnL(F36A)$. Tc^R Km^R Gal^S	Este trabajo
MR2405	MR1467 con $cdnL(M49A)$. Tc^R Km^R Gal^S	Este trabajo
MR2406	MR1467 con $cdnL(P51A)$. Tc^R Km^R Gal^S	Este trabajo
MR2407	MR1489 con $cdnL(F36A)$. Tc^R Km^R Gal^S	Este trabajo
MR2408	MR1489 con $cdnL(M49A)$. Tc^R Km^R Gal^S	Este trabajo
MR2409	MR1489 con $cdnL(P51A)$. Tc^R Km^R Gal^S	Este trabajo
MR2413	MR1489 con $cdnL(F125A)$. Tc^R Km^R Gal^S	Este trabajo
MR2414	MR1489 con gen que codifica CdnL(1-54)-TtCdnLCt. Tc^R Km^R Gal^S	Este trabajo

MR2415	MR1467 con <i>cdnL(F125A)</i> . Tc ^R Km ^R Gal ^S	Este trabajo
MR2417	MR1467 con <i>cdnL(W88A)</i> . Tc ^R Km ^R Gal ^S	Este trabajo
MR2418	MR1467 con <i>cdnL(M96A)</i> . Tc ^R Km ^R Gal ^S	Este trabajo
MR2419	MR1467 con <i>cdnL(R128A/K129A)</i> . Tc ^R Km ^R Gal ^S	Este trabajo
MR2420	MR1467 con <i>cdnL(R90A/R91A/R93A)</i> . Tc ^R Km ^R Gal ^S	Este trabajo
MR2422	MR1489 con <i>cdnL(W88A)</i> . Tc ^R Km ^R Gal ^S	Este trabajo
MR2423	MR1489 con <i>cdnL(M96A)</i> . Tc ^R Km ^R Gal ^S	Este trabajo
MR2424	MR1489 con <i>cdnL(R128A/K129A)</i> . Tc ^R Km ^R Gal ^S	Este trabajo
MR2425	MR1489 con <i>cdnL(R90A/R91A/R93A)</i> . Tc ^R Km ^R Gal ^S	Este trabajo

El sitio heterólogo hace referencia al segmento de 1,38 kb, entre la posición 8498672 y 8500048 del genoma. P_C, promotor constitutivo. P_{IPTG}, promotor inducible por IPTG (isopropil-β-tiogalactopiranosido). P_{van}, promotor inducible por vanilato. P_{R4}, cuarto promotor de los cuatro promotores en tándem del operón *rrnD* de *M. xanthus*. Km^R: resistencia a kanamicina. Tc^R: resistencia a oxitetraciclina. Gal^S: sensibilidad a galactosa conferida por el gen *galK*. Todas las estirpes derivan de DK1050, excepto las indicadas con (DK1622).

II.1.1.2 Estirpes de *C. crescentus*

Las estirpes de *C. crescentus* se nombran con letras mayúsculas indicativas del laboratorio en el que fueron obtenidas (ME, Departamento de Genética, Universidad de Murcia; JC, Department of Fundamental Microbiology, Université de Lausanne) seguidas de un número de aislamiento. Todas las estirpes utilizadas en

este trabajo provienen directa o indirectamente de la estirpe CB15N, una estirpe sincronizable derivada de la estirpe silvestre CB15 (Evinger & Agabian, 1977). Las estirpes de *C. crescentus* utilizadas en este trabajo se indican en la Tabla 2.

Tabla 2. Estirpes de <i>C. crescentus</i> utilizadas en este trabajo.		
Estirpe	Descripción	Fuente o referencia
JC735	$P_{cdnL}::lacZ$	CB15N x pRK290 -cdnL-UTR
JC763	$CccdnL, P_{xyI}::flag-CccdnL. Cm^R$	CB15N x pBXMCS-6- flag-cdnL
JC764	$CccdnL, P_{xyI}::flag-CccdnL(DD). Cm^R$	CB15N x pBXMCS-6- flag-cdnL (DD)
ME2	$CccdnL / Cc\Delta cdnL, P_{van}::CccdnL. Tc^R Km^R Sac^S$	CB15N x pMR3552 x pMR3572
ME4	$\Delta_{Cc}cdnL, P_{van}::CccdnL. Tc^R$	Haploide de ME2
ME5	$\Delta_{Cc}cdnL, P_{van}::CccdnL. Tc^R Cm^R$	ME4 x pBVMCS-6
ME8	$CccdnL-flag/\Delta_{Cc}cdnL, P_{van}::CccdnL. Tc^R Cm^R Km^R Sac^S$	ME5 x pMR3845
ME10	$CccdnL(V39A)-flag/\Delta_{Cc}cdnL, P_{van}::CccdnL. Tc^R Cm^R Km^R Sac^S$	ME5 x pMR3918
ME12	$CccdnL(R52A)-flag/\Delta_{Cc}cdnL, P_{van}::CccdnL. Tc^R Cm^R Km^R Sac^S$	ME5 x pMR3920
ME13	$CccdnL(P54A)-flag/\Delta_{Cc}cdnL, P_{van}::CccdnL. Tc^R Cm^R Km^R Sac^S$	ME5 x pMR3921
ME14	$CccdnL/\Delta_{Cc}cdnL, P_{van}::CccdnL-flag. Tc^R Km^R Sac^S$	ME1 x pMR3879
ME15	$CccdnL, P_{van}::CccdnL-flag. Tc^R$	Haploide de ME14
ME16	$\Delta_{Cc}cdnL, P_{van}::CccdnL-flag. Tc^R$	Haploide de ME14

ME17	$\Delta_{Cc}cdnL$, $P_{van::Cc}cdnL$ -flag. Tc ^R Cm ^R	ME16xpBVMCS-6
ME20	$CccdnL(Y127A)$ -flag/ $\Delta_{Cc}cdnL$, $P_{van::Cc}cdnL$. Tc ^R Cm ^R Km ^R Sac ^S	ME5 x pMR4052
ME21	$CccdnL(W90A)$ -flag/ $\Delta_{Cc}cdnL$, $P_{van::Cc}cdnL$. Tc ^R Cm ^R Km ^R Sac ^S	ME5 x pMR4208
ME22	$CccdnL(R92A/R93A)$ -flag/ $\Delta_{Cc}cdnL$, $P_{van::Cc}cdnL$. Tc ^R Cm ^R Km ^R Sac ^S	ME5 x pMR4209
ME23	$CccdnL(R130A)$ -flag/ $\Delta_{Cc}cdnL$, $P_{van::Cc}cdnL$. Tc ^R Cm ^R Km ^R Sac ^S	ME5 x pMR4210
ME24	$CccdnL$, $P_{van::flag-Cc}cdnL$. Km ^R Cm ^R	CB15N x pMR4389 x pBVMCS-6
ME25	$CccdnL$, $P_{van::Cc}cdnL$ -flag. Km ^R Cm ^R	CB15N x pMR4390 x pBVMCS-6
ME26	$CccdnL$, $P_{van::flag-Cc}cdnL(DD)$. Km ^R Cm ^R	CB15N x pMR4396 x pBVMCS-6
ME27	$CccdnL$, $P_{van::flag-Cc}cdnL$, $P_{xyl::clpX^*}$. Km ^R Cm ^R Tc ^R	ME24 x pMO88
ME28	$CccdnL$, $P_{van::Cc}cdnL$ -flag, $P_{xyl::clpX^*}$. Km ^R Cm ^R Tc ^R	ME25 x pMO88
ME29	$CccdnL$, $P_{van::flag-Cc}cdnL(DD)$, $P_{xyl::clpX^*}$. Km ^R Cm ^R Tc ^R	ME26 x pMO88
ME30	$CccdnL/\Delta_{Cc}cdnL$, $P_{van::Cc}cdnL(P54A)$ -flag. Km ^R Sac ^S Tc ^R	ME1 x pMR4410
ME31	$CccdnL/\Delta_{Cc}cdnL$, $P_{van::Cc}cdnL(R92A/R93A)$ -flag. Km ^R Sac ^S Tc ^R	ME1 x pMR4411
ME32	$CccdnL/\Delta_{Cc}cdnL$, $P_{van::Cc}cdnL(R130A)$ -flag. Km ^R Sac ^S Tc ^R	ME1 x pMR4412
ME33	$\Delta_{Cc}cdnL$, $P_{van::Cc}cdnL(P54A)$ -flag. Tc ^R	ME30 haploide

ME34	$\Delta_{Cc}cdnL$, $P_{van}::CccdnL(R92A/R93A)-flag$. Tc^R	ME31 haploid
ME35	$\Delta_{Cc}cdnL$, $P_{van}::CccdnL(R130A)-flag$. Tc^R	ME32 haploid
ME36	$\Delta_{Cc}cdnL$, $P_{van}::CccdnL(P54A)-flag$, $P_{rrnA}::lac$. Tc^R Km^R Cm^R	ME33 x pMR3769 pBVMCS-6
ME38	$\Delta_{Cc}cdnL$, $P_{van}::CccdnL(R130A)-flag$, $P_{rrnA}::lac$. Tc^R Km^R Cm^R	ME35 x pMR3769 pBVMCS-6
ME39	$CccdnL(DD)/\Delta_{Cc}cdnL$, $P_{van}::CccdnL$. Tc^R Cm^R Km^R Sac^S	ME5 x pMR4413
ME40	$\Delta_{Cc}cdnL$, $P_{van}::CccdnL-flag$, $P_{rrnA}::lac$. Tc^R Km^R Cm^R	ME17 x pMR3769
ME41	$CccdnL/\Delta_{Cc}cdnL$, $P_{van}::CccdnL$. Tc^R Cm^R Km^R Sac^S	ME5 x pMR4442
ME42	$\Delta_{Cc}cdnL$, $P_{van}::CccdnL$, $P_{rrnA}::lac$. Tc^R Km^R Cm^R	ME5 x pMR3769

Km^R : resistencia a kanamicina. Tc^R : resistencia a oxitetraciclina. Cm^R : resistencia a cloranfenicol. Sac^S : sensibilidad a sacarosa conferida por el gen *sacB*. P_{van} , promotor inducible por vanilato. P_{xyI} , promotor inducible por xilosa. P_{rrnA} , promotor ribosómico.

II.1.1.3 Estirpes de *E. coli*

La Tabla 3 recoge las estirpes de *E. coli* utilizadas en este trabajo. Las estirpes DH5 α y JM109 son deficientes en recombinación ($RecA^-$), propiedad que favorece la estabilidad de los plásmidos y las convierte en hospedadores adecuados en los experimentos de clonación. La estirpe BL21 (DE3) posee en su cromosoma una copia del gen de la polimerasa de RNA del fago T7 bajo el control del promotor *lacUV5*, activable por IPTG. Es además defectiva para la proteasa *lon* y para la proteasa *ompT* de la membrana externa, características que favorecen la expresión y posterior purificación de proteínas. La estirpe GM119 es defectiva para las metilasas *dam* y *dcm*. La estirpe BTH101 posee el genotipo adecuado para el ensayo del doble híbrido bacteriano (DHB).

Tabla 3. Estirpes de *E. coli* usadas en este trabajo

Estirpe	Origen o fuente
DH5α	(Hanahan, 1983)
BL21 (DE3)	Novagen
GM119	(Arraj & Marinus, 1983)
JM109	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
BTH101	(Karimova <i>et al.</i> , 2000)

II.1.2 Plásmidos

A continuación se detallan los plásmidos usados en este trabajo, indicando sus marcadores de selección, utilidad y origen. Las Tablas 4 y 5 incluyen los plásmidos utilizados en los estudios llevados a cabo en *M. xanthus* y *C. crescentus*, respectivamente.

Tabla 4 : Plásmidos para el estudio de CdnL en *M. xanthus*

Plásmido	Descripción	Fuente o referencia
pET15b	Vector para la sobreexpresión de proteínas con una cola de histidinas en el extremo N-terminal. Amp ^R	Novagen
pKT25	Vector para la expresión de proteínas fusionadas al extremo C-terminal de T25 para el sistema del doble híbrido bacteriano. Km ^R	(1)
pUT18	Vector para la expresión de proteínas fusionadas al extremo N-terminal de T18 para el sistema del doble híbrido bacteriano. Amp ^R	(1)
pUT18C	Vector para la expresión de proteínas fusionadas al extremo C-terminal de T18 para el sistema del doble híbrido bacteriano. Amp ^R	(1)
pMR2873	Vector para la inserción del gen de interés en el sitio	(2)

	endógeno de <i>cdnL</i> para estudios de complementación. Km ^R Gal ^S	
pMR2914	pET15b- <i>cdnL</i>	(2)
pMR2973	pKT25- <i>cdnL</i>	(2)
pMR3040	pET15b- <i>cdnL</i> de <i>T. thermophilus</i> (_{Tt} <i>cdnL</i>)	Este trabajo
pMR3070	pMR2873- <i>cdnL</i>	(2)
pMR3207	pET15b- <i>cdnL</i> Ct	(3)
pMR3260	pET15b- <i>cdnL</i> ₁₋₅₄	Este trabajo
pMR3265	pUT18- <i>cdnL</i>	Este trabajo
pMR3318	pET15b- _{Tt} <i>cdnL</i> Ct	Este trabajo
pMR3331	pMR2873 con la secuencia que codifica la quimera CdnL(1-54)-TtCdnLCt	Este trabajo
pMR3407	pKT25- _{Tt} <i>cdnL</i>	Este trabajo
pMR3408	pKT25 con la secuencia que codifica TtCdnLNt	Este trabajo
pMR3409	pKT25 con la secuencia que codifica CdnLNt	Este trabajo
pMR3410	pKT25 con la secuencia que codifica TRCF ₅₁₄₋₆₄₅ de <i>M. xanthus</i>	(2)
pMR3411	pUT18C con la secuencia que codifica β_{11-133} de <i>T. thermophilus</i> (Tt β_{11-133})	(2)
pMR3412	pUT18C con la secuencia que codifica β_{19-148} de <i>M. xanthus</i>	(2)
pMR3510	pKT25 con <i>cdnL</i> de <i>C. glutamicum</i> (_{Cg} <i>cdnL</i>)	Este trabajo
pMR3511	pKT25 con <i>cdnL</i> de <i>S. coelicolor</i> (_{Sc} <i>cdnL</i>)	Este trabajo
pMR3512	pKT25 con <i>cdnL</i> de <i>B. bacteriovorus</i> (_{Bb} <i>cdnL</i>)	Este trabajo
pMR3585	pUT18C con la secuencia que codifica β_{19-148} (D122A)	Este trabajo

pMR3586	pUT18C con la secuencia que codifica β_{19-148} (V123A)	Este trabajo
pMR3587	pUT18C con la secuencia que codifica β_{19-148} (K124A)	Este trabajo
pMR3588	pUT18C con la secuencia que codifica β_{19-148} (E125A)	Este trabajo
pMR3616	pKT25 con la secuencia que codifica CdnLCt	Este trabajo
pMR3619	pUT18C con la secuencia que codifica CdnLNt	Este trabajo
pMR3622	pKT25- <i>cdnL</i> (M49A)	Este trabajo
pMR3623	pKT25- <i>cdnL</i> (P51A)	Este trabajo
pMR3624	pKT25- <i>cdnL</i> (F36A)	Este trabajo
pMR3671	pMR2873- <i>cdnL</i> (F36A)	Este trabajo
pMR3672	pMR2873- <i>cdnL</i> (M49A)	Este trabajo
pMR3673	pMR2873- <i>cdnL</i> (P51A)	Este trabajo
pMR3711	pUT18- <i>cdnL</i> (F36A)	Este trabajo
pMR3712	pUT18- <i>cdnL</i> (M49A)	Este trabajo
pMR3713	pUT18- <i>cdnL</i> (P51A)	Este trabajo
pMR3727	pUT18C con la secuencia que codifica β_{31-548} de <i>B. bacteriovorus</i> (Bb β_{31-548})	Este trabajo
pMR3728	pUT18C con la secuencia que codifica β_{29-426} de <i>S. coelicolor</i> (Sc β_{29-426})	Este trabajo
pMR3729	pUT18C con la secuencia que codifica β_{32-428} de <i>C. glutamicum</i> (Cg β_{32-428})	Este trabajo
pMR3730	pUT18C con la secuencia que codifica β_{19-537} de <i>M. xanthus</i> (Mx β_{19-537})	Este trabajo
pMR3743	pUT18C con la secuencia que codifica Tt β_{11-133} (L107A)	Este trabajo

pMR3744	pUT18C con la secuencia que codifica Tt β_{11-133} (I108A)	Este trabajo
pMR3745	pUT18C con la secuencia que codifica Tt β_{11-133} (K109A)	Este trabajo
pMR3746	pUT18C con la secuencia que codifica Tt β_{11-133} (E110A)	Este trabajo
pMR3770	pKT25 con la secuencia que codifica TtCdnLNt(Y35A)	Este trabajo
pMR3771	pKT25 con la secuencia que codifica TtCdnLNt(Y48A)	Este trabajo
pMR3772	pKT25 con la secuencia que codifica TtCdnLNt(P50A)	Este trabajo
pMR3879	pUT18C con la secuencia que codifica Tt β_{10-395}	Este trabajo
pMR3819	pET15b-cdnL(F36A)	Este trabajo
pMR4053	pMR2873-cdnL(F125A)	Este trabajo
pMR4068	pKT25-cdnL(F125A)	Este trabajo
pMR4093	pMR2873-cdnL(M96A)	Este trabajo
pMR4095	pMR2873-cdnL(W88A)	Este trabajo
pMR4108	pKT25-cdnL(W88A)	Este trabajo
pMR4110	pKT25-cdnL(M96A)	Este trabajo
pMR4131	pET15b-cdnL(W88A)	Este trabajo
pMR4133	pET15b-cdnL(F125A)	Este trabajo
pMR4159	pMR2873-cdnL(R128A/K129A)	Este trabajo
pMR4160	pMR2873-cdnL(R90A/R91A/R93A)	Este trabajo
pMR4180	pET15b-cdnL(R90A/R91A/R93A)	Este trabajo
pMR4181	pKT25-cdnL(R128A/K129A)	Este trabajo
pMR4182	pKT25-cdnL(R90A/R91A/R93A)	Este trabajo

Tabla 5 : Plásmidos para el estudio de CdnL en <i>C. crescentus</i>		
Plásmido	Descripción	Fuente o referencia
pBVMCS-6	Vector de alto número de copias para la expresión de VanR. Cm ^R	(1)
pBXMCS-6	Vector de alto número de copias para la expresión de genes bajo el promotor de la xilosa (P _{xyl}). Cm ^R	(1)
pJGZ290	pRK290 con el gen <i>lacZ</i> sin promotor.	
pMO88	<i>clpX</i> de <i>C. crescentus</i> con la mutación en el sitio de unión de ATP (<i>clpX</i> [*]) regulado por P _{xyl} .	(2)
pNPTS138	Vector para el intercambio de alelo. Km ^R Sac ^S	(1)
pVGFP-2	Vector integrativo para la expresión de genes bajo el control de P _{van} en <i>C. crescentus</i> . Km ^R	(1)
pVGFP-5	Vector integrativo para la expresión de genes bajo el control de P _{van} en <i>C. crescentus</i> . Tc ^R	(1)
pXGFP-2	Vector usado para la integración de la construcción P _{rrnA::lac} en el sitio heterólogo del cromosoma de <i>C. crescentus</i> . Km ^R	(1)
pMR3552	pNPTS138 con las regiones genómicas que flanquean <i>cdnL</i> de <i>C. crescentus</i> (C _c <i>cdnL</i>) para su delección y análisis de complementación. Km ^R Sac ^S	Este trabajo
pMR3572	pVGFP-5 con C _c <i>cdnL</i> bajo el control de P _{van} . Tc ^R	Este trabajo
pMR3617	pUT18C con la secuencia que codifica RNAP β ₁₆₋₁₄₄ de <i>C. crescentus</i> . Amp ^R	Este trabajo
pMR3618	pUT18C con C _c <i>cdnL</i> . Amp ^R	Este trabajo
pMR3626	pKT25 con C _c <i>cdnL</i> . Km ^R	Este trabajo
pMR3645	pUT18C con la secuencia que codifica RNAP β ₁₆₋₂₁₄ de <i>C. crescentus</i> . Amp ^R	Este trabajo

pMR3680	pUT18C con la secuencia que codifica RNAP $\beta_{16-214-G-G-462-523}$ de <i>C. crescentus</i> . Amp ^R	Este trabajo
pMR3701	pUT18C con la secuencia que codifica RNAP β_{16-523} de <i>C. crescentus</i> . Amp ^R	Este trabajo
pMR3769	pXGFPC-2 con $P_{rrnA}::lac$. Km ^R	Este trabajo
pMR3795	pUT18 con $c_{cc}cdnL$. Amp ^R	Este trabajo
pMR3803	pKT25 con $c_{cc}cdnL(V39A)$. Km ^R	Este trabajo
pMR3804	pKT25 con $c_{cc}cdnL(Y40A)$. Km ^R	Este trabajo
pMR3805	pKT25 con $c_{cc}cdnL(R52A)$. Km ^R	Este trabajo
pMR3806	pKT25 con $c_{cc}cdnL(P54A)$. Km ^R	Este trabajo
pMR3845	Derivado de pMR3552 con $c_{cc}cdnL-flag$. Km ^R Sac ^S .	Este trabajo
pMR3918	Derivado de pMR3552 con $c_{cc}cdnL(V39A)-flag$. Km ^R Sac ^S	Este trabajo
pMR3920	Derivado de pMR3552 con $c_{cc}cdnL(R52A)-flag$. Km ^R Sac ^S	Este trabajo
pMR3921	Derivado de pMR3552 con $c_{cc}cdnL(P54A)-flag$. Km ^R Sac ^S	Este trabajo
pMR4052	Derivado de pMR3552 con $c_{cc}cdnL(Y127A)-flag$. Km ^R Sac ^S	Este trabajo
pMR4069	pKT25 con $c_{cc}cdnL(Y127A)$. Km ^R	Este trabajo
pMR4151	pET15b- $c_{cc}cdnL$. Amp ^R	Este trabajo
pMR4292	pET15b- $c_{cc}cdnL(R92A/R93A)$. Amp ^R	Este trabajo
pMR4293	pET15b- $c_{cc}cdnL(R130A)$. Amp ^R	Este trabajo
pMR4208	pMR3552 con $c_{cc}cdnL(W90A)-flag$. Km ^R Sac ^S	Este trabajo
pMR4209	pMR3552 con $c_{cc}cdnL(R92A/R93A)-flag$. Km ^R Sac ^S	Este trabajo

pMR4210	pMR3552 con <i>cccdnL(R130A)-FLAG</i> . Km ^R Sac ^S	Este trabajo
pMR4389	pVGFPC-2 con <i>flag-cccdnL</i> bajo el control de P _{van} . Km ^R	Este trabajo
pMR4390	pVGFPC-2 con <i>cccdnL-flag</i> bajo el control de P _{van} . Km ^R	Este trabajo
pMR4396	pVGFPC-2 con <i>flag-cccdnL(DD)</i> bajo el control de P _{van} . Km ^R	Este trabajo
pMR4410	pVGFPC-5 con <i>cccdnL(P54A)-flag</i> bajo el control de P _{van} . Tc ^R	Este trabajo
pMR4411	pVGFPC-5 con <i>cccdnL(R92A/R93A)-flag</i> bajo el control de P _{van} . Tc ^R	Este trabajo
pMR4412	pVGFPC-5 con <i>cccdnL(R130A)-flag</i> bajo el control de P _{van} . Tc ^R	Este trabajo
pMR4413	pMR3552 con <i>cccdnL(DD)</i> . Km ^R Sac ^S	Este trabajo
pMR4442	pMR3552 con <i>cccdnL</i> . Km ^R Sac ^S	Este trabajo

(1) (Karimova *et al.*, 2000), (2) (García-Moreno *et al.*, 2010), (3) (Mirassou *et al.*, 2009; Thanbichler *et al.*, 2007)

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados en esta tesis.

Oligonucleótidos o cebadores utilizados en esta tesis			
Nombre	Secuencia (5'-3')	T _m (°C)	Uso
ScdnlLT25Xba	AAATCTAGAGAGACGTTCAAGGTTGGCGAC	57	Doble Híbrido Bacteriano de CdnL de <i>S. coelicolor</i>
ScCdnLT25-Bam	AAAGGATGGAGCGAGCACCTCGTCCCTCA	62	Doble Híbrido Bacteriano de CdnL de <i>S. coelicolor</i>
BbCdnLT25-Xba	AAATCTAGAGATGCAGACGTTTGATGTCGGTG	57	Doble Híbrido Bacteriano de CdnL de <i>B. bacteriovorus</i>
BbCdnLT25-Bam	AAAGGATCCTTAACCCGTGATGCCGAAGATCG	59	Doble Híbrido Bacteriano de CdnL de <i>B. bacteriovorus</i>
CgCdnLT25-Xba	AAATCTAGAGATGGAATTCAGAGTCCGAGATAC	56	Doble Híbrido Bacteriano de CdnL de <i>C. glutamicum</i>
CgCdnLT25-Bam	AAAGGATCCCTAATCTTCGTCGTAAGCTC	58	Doble Híbrido Bacteriano de CdnL de <i>C. glutamicum</i>
cdnLT25Xba	AAATCTAGAGGTGCAGACCAGCTTCAAG	65	Doble Híbrido Bacteriano de CdnL de <i>M. xanthus</i>
CdnLNterBam1	AAAGGATCCTCACTCCTCGCTGATGATCTCCCGG	63	Doble Híbrido Bacteriano de CdnL de <i>M. xanthus</i>
CCcdnLBamDown	AAAGGATCCCGCCTAATCTAGGTTCTGCCAGAGA	61	Deleción <i>cdnL</i> <i>C. crescentus</i> (<i>c_ccdnL</i>)
CCcdnLHindDown	AAAAGCTTGGCCTCGGCGCCGCTGCGGGACGAG	68	Deleción <i>c_ccdnL</i>
CCcdnLEcoRIUp	AAAGAAATTCGTGGCTGAAGATCAACGCCGACTAC	59	Deleción <i>c_ccdnL</i>
CCcdnLBamUp	AAAGGATCCAGACCACTCTTGCTCATGTTCTGTC	61	Deleción <i>c_ccdnL</i>
CCcdnLNdel	AAAAAAACATATGAGCAAGACTGCTTGAATTC	55	Para clonar <i>c_ccdnL</i> bajo el promotor P _{van}
CCcdnLNheI	AAAGCTAGCTTAGCGGGCCTTGACCAGCGAC	62	Para clonar <i>c_ccdnL</i> bajo el promotor P _{van}
ScBeta29-160Xba	AAATCTAGAGAGGAGGCCCTCGAGGTTCCGAAC	62	Doble Híbrido Bacteriano β_{29-426} de <i>S. coelicolor</i>
ScBeta29-426BamI	AAAGGATCCTCACATGAACCTGGACAGCTGGC	61	Doble Híbrido Bacteriano β_{29-426} de <i>S. coelicolor</i>
CgBeta32-161Xba	AAATCTAGAGTCCGACCCCACTTGAGGTGCCCGGG	64	Doble Híbrido Bacteriano β_{32-428} de <i>C. glutamicum</i>
CgBeta32-428BamI	AAAGGATCCTCACATGAACCTGAGACAGCTGGG	59	Doble Híbrido Bacteriano β_{32-428} de <i>C. glutamicum</i>
BbBeta41-170SalI	AAAGTCGACGAAGCAAGTCATTGATATCCAAATTC	56	Doble Híbrido Bacteriano β_{31-548} de <i>B. bacteriovorus</i>
BbBeta41-548KpnI	AAAGGTACCTCACATGAACCTGAGACAACTGGG	58	Doble Híbrido Bacteriano β_{31-548} de <i>B. bacteriovorus</i>
Beta19-148Xba	AAATCTAGAGGCGAAGATCATCGACATTCCTCAATC	58	Doble Híbrido Bacteriano β_{19-537} de <i>M. xanthus</i>
MxBeta19-537BamI	AAAGGATCCTCACATGAACCTGCGACAGCTGGC	61	Doble Híbrido Bacteriano β_{19-537} de <i>M. xanthus</i>
TiBeta10-133Xba	AAATCTAGAGGAGGTTATCCCTTCCACCCC	61	Doble Híbrido Bacteriano β_{10-394} de <i>T. thermophilus</i>
TiBeta394KpnI	AAAGGTACCTCAGAACTGGGAAAGCTGGCTGC	68	Doble Híbrido Bacteriano β_{10-394} de <i>T. thermophilus</i>
CcdnLXba	AAATCTAGAGATGAGCAAGACTGGTCTGGAATTC	57	Doble Híbrido Bacteriano de CdnL de <i>C. crescentus</i>
CcdnLBam	AAAGGATCCTTAGCGGCCCTTGACCAGCGAC	62	Doble Híbrido Bacteriano de CdnL de <i>C. crescentus</i>
cdnLCterXba	AAATCTAGAGGGGTGCGTCTCCGGGAGATC	64	Doble Híbrido Bacteriano de CdnLct de <i>M. xanthus</i>
cdnLCterBam	AAAGGATCCTCAGGCCAGATTGAAGATCTTCTTC	58	Doble Híbrido Bacteriano de CdnLct de <i>M. xanthus</i>
CcBetaXba	AAATCTAGAGGGCGCATTCCTCCGAGGCTGTGC	63	Doble Híbrido Bacteriano $\beta_{16-214/523}$ de <i>C. crescentus</i>
CcBeta214Bam	AAAGGATCCTCAGGTCGTGGCCCGGACGCTTAC	63	Doble Híbrido Bacteriano β_{16-214} de <i>C. crescentus</i>

EMSA, retraso en la movilidad electroforética; ChIP, coimmunoprecipitación de cromatina; qPCR, PCR cuantitativa.

CcBeta523Bam	AAAGGATCCTCACAATGAACGACGCTGCG	61	Doble Híbrido Bacteriano β_{16-523} de <i>C. crescentus</i>
CcBetaFuionF	AAACTGCCGGCCACGACCGCGCGCTCGGTGAG	73	Doble Híbrido Bacteriano $\beta_{16-214-G-523}$ de <i>C. crescentus</i>
CcBetaFuionR	AAACTCACCAGCCGAGCGCGCGCGCTCGTGCCGCGCAG	73	Doble Híbrido Bacteriano $\beta_{16-214-G-523}$ de <i>C. crescentus</i>
CcPromnaF	ATATGGCGCGCCAAACAGCTGATCGCCAAG	61	PCR solapante. Construcción P _{na} :lacZ
CcPromnaR	TATCGGCCTCAGGAAGTTTCTAGCGAAGCGTCTGG	63	PCR solapante. Construcción P _{na} :lacZ
LacZ466F	GCTTCGCTAGAAACTTCTCGAGGCGGCTACTGTC	62	PCR solapante. Construcción P _{na} :lacZ
LacZ4661R	ATATGCTAGCCATTAAAGCGAGTGGCAACA	55	PCR solapante. Construcción P _{na} :lacZ
pP16SlacF	CGAAAGGGAGTTGTCATCG	56	Medir expresión (qPCR) de P _{na} :lacZ en <i>C. crescentus</i>
pP16SlacR	CGTGCATCTGCCAGTTTG	56	Medir expresión (qPCR) de P _{na} :lacZ en <i>C. crescentus</i>
qRuvAF	CGAGTGAGGAAGCCGTAGAG	64	Medir expresión (qPCR) de <i>ruvA</i> en <i>C. crescentus</i>
qRuvAR	GACCTGTTGCACATCGAG	60	Medir expresión (qPCR) de <i>ruvA</i> en <i>C. crescentus</i>
CcBamStopinicio	AAAGGATCCTGATGAGCAAGACTGGTCTGG	58	Reintroducir <i>c_ccdhL</i> en su sitio endógeno
CcddnL CterM2	AAAGGATCCTTATTATCATCATCATCTTTATAATCGGGCGCTTGACCGAGCGAC	65	Reintroducir <i>c_ccdhL-flag</i> en el sitio endógeno
CcddnL M2Nhel	AAAGGATCCTTATTATCATCATCATCTTTATAATCGGGCGCTTGACCGAGCGA	74	Reintroducir <i>c_ccdhL-flag</i> en el sitio endógeno
CdnLF125Afw	GACCTCTCCGCGGAGCGG	68	PCR solapante. Para generar <i>cdhL(F125A)</i>
CdnLF125Aiv	CCGCTCGCGCGGAGAGGTC	68	PCR solapante. Para generar <i>cdhL(F125A)</i>
CdnLM96Afw	CGGGAGTACGCGGAGAAATC	60	PCR solapante. Para generar <i>cdhL(M96A)</i>
CdnLM96Aiv	GATCTTCTCCGCGTACTCCCG	60	PCR solapante. Para generar <i>cdhL(M96A)</i>
CdnLW88Afw	CTCCACGACGCGGAACCGTCG	64	PCR solapante. Para generar <i>cdhL(W88A)</i>
CdnLW88Aiv	CG ACG GTT CGC CGT CGT GGA G	64	PCR solapante. Para generar <i>cdhL(W88A)</i>
CcrnaARet	CGGCCATGGAAGAGTCGATGC	61	EMSA
CcCdnL CterDD	AAAGGATCCTTAGTCGTCCTTGACCGAGCG	65	Introducir <i>c_ccdhL(DD)</i> en su sitio endógeno
PbqPCRfw	CCCGTGCCAGAGAGATG	58	ChIP : promotor P _B de <i>C. crescentus</i>
PbqPCRrv	TTGTACACAGAGGTCCCTCATG	58	ChIP : promotor P _B de <i>C. crescentus</i>
PDqPCRfw	TGCAACCCCGTGACTTT	55	ChIP : promotor P _{Q_{RS}} de <i>C. crescentus</i>
PDqPCRrv	CGCTCGCGCTTCTCAAG	59	ChIP : promotor P _{Q_{RS}} de <i>C. crescentus</i>
qPCRintra1F	GCGGTCACGTCGGTCTTG	57	ChIP : región intergénica (operón <i>carB</i>) de <i>M. xanthus</i>
qPCRintra1R	GCGTTGCCAGCGACGTT	59	ChIP : región intergénica (operón <i>carB</i>) de <i>M. xanthus</i>
qPCRribF	TGGGCGCGCTGAA	54	ChIP : promotores ribosómicos en <i>M. xanthus</i>
qPCRribR	CAGTTCGGCGTCTTCTGTCA	58	ChIP : promotores ribosómicos en <i>M. xanthus</i>
ChlPrnaAF1	TCCACGGCGTCTGTAA	56	ChIP : promotor <i>rrnA</i> de <i>C. crescentus</i>
ChlPrnaAR1	CCCCCTCGCGACAATAAAG	56	ChIP : promotor <i>rrnA</i> de <i>C. crescentus</i>
RTCC3255f	TGCTCGTGGACGTCACAAC	57	ChIP : región intergénica de <i>C. crescentus</i>
RTCC3255f	GGCGCATAGCCGAGAT	57	ChIP : región intergénica de <i>C. crescentus</i>

II.2 Medios de crecimiento

II.2.1 Medios ricos para *M. xanthus*

❖ CTT (Bretscher & Kaiser, 1978)

Bacto-casitona (Difco)	1%
Tampón Tris-HCl (pH 7,6)	10 mM
MgSO ₄	8 mM
Tampón fosfato (pH 7,6)	1 mM

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

Para la preparación de medio sólido se utilizó Bacto-agar Difco (1,5%). Para la preparación de agar de cobertera (CTTSA) se utilizó el mismo agar al 0,75%.

Las soluciones de antibióticos, indicadas a continuación, fueron esterilizadas por filtración a través de un filtro Millipore de 0,22 µm de diámetro de poro y añadidas al medio CT una vez esterilizado y enfriado hasta 50 °C. Las concentraciones utilizadas para esta bacteria fueron las siguientes:

Antibiótico	Stock (concentración y solvente)	Concentración final en medio líquido/sólido
Kanamicina	10 mg/ml en agua	40 µg/ml
Tetraciclina	10 mg/ml en etanol	10 µg/ml

❖ CTT+Gal

CTT más galactosa (Panreac) al 1%. Una vez esterilizado el medio CT y enfriado hasta 50 °C, se añadió la disolución de galactosa, preparada en agua y esterilizada por separado en autoclave.

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

❖ **TPM** (Bretscher & Kaiser, 1978)

Tampón Tris-HCl (pH 7,6) 10 mM

MgSO₄ 8 mM

Tampón fosfato (pH 7,6) 1 mM

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

Para la preparación de medio sólido se utilizó Bacto-agar Difco (1,5%).

II.2.3 Medio rico para *C. crescentus*

❖ **PYE**

Bactopeptona (Difco) 0,2%

Extracto de levadura 0,1%

MgSO₄ 10 mM

CaCl₂ 1 mM

Para medio sólido se añadió Bacto-agar Difco al 1,5%

II.2.4 Medios mínimos para *C. crescentus*

❖ **M2** (Ely, 1991)

Na₂HPO₄ 122 mM

KH₂PO₄ 78 mM

NH₄Cl 187 mM

Una vez autoclavada y enfriada, a esta mezcla de sales se añadieron las siguientes disoluciones ya estériles:

MgSO₄ 0,5 mM

FeSO₄ (10 µM EDTA) 10 µM

CaCl₂ 0,5 mM

❖ **M2G**

M2 más 0,2% de glucosa (Panreac). Las soluciones de glucosa utilizadas fueron preparadas en agua y esterilizadas por filtración a través de un filtro Millipore de 0,22 µm de diámetro de poro.

❖ **M2X**

M2 más 0,3% de xilosa (Sigma). Las soluciones de xilosa utilizadas fueron preparadas en agua y esterilizadas por filtración a través de un filtro Millipore de 0,22 µm de diámetro de poro.

Las soluciones de antibióticos, indicadas a continuación, fueron esterilizadas por filtración a través de un filtro Millipore de 0,22 µm de diámetro de poro y añadidas al medio (PYE o M2G/M2X) una vez esterilizado y enfriado hasta 50 °C. Las concentraciones utilizadas para esta bacteria fueron las siguientes:

Antibiótico	Stock (concentración y solvente)	Concentración final en medio líquido	Concentración final en medio sólido
Kanamicina	10 mg/ml en agua	5 µg/ml	25 µg/ml
Tetraciclina	10 mg/ml en etanol	1 µg/ml	1-2 µg/ml
Cloranfenicol	10 mg/ml en etanol	1 µg/ml	1 µg/ml

II.2.5 Medios ricos para *E. coli*

❖ Luria (LB) (preparado según (Miller, 1972))

Extracto de levadura 0,5%

Bacto-triptona 1%

NaCl 1%

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

Las soluciones de antibióticos, indicadas a continuación, fueron esterilizadas por filtración a través de un filtro Millipore de 0,22 µm de diámetro de poro y añadidas al medio (PYE o M2G/M2X) una vez esterilizado y enfriado hasta 50 °C. Las concentraciones utilizadas para esta bacteria fueron las siguientes:

Antibiótico	Stock (concentración y solvente)	Concentración final en medio líquido/sólido
Kanamicina	10 mg/ml en agua	40 µg/ml
Tetraciclina	10 mg/ml en etanol	10-12 µg/ml
Cloranfenicol	10 mg/ml en etanol	20/30 µg/ml
Ampicilina	100 mg/ml en agua	100 µg/ml

❖ LB+X-Gal

LB más 40 µg/ml de 5-Br-4-Cl-3-indolil-β-D-galactósido (X-Gal) preparado en DMSO.

II.3 Condiciones de cultivo

En general, los cultivos en medio líquido se realizaron mediante inoculación de una colonia en un matraz de 50 ml con 10 ml de medio nutritivo. Para los cultivos a mayor escala, se utilizaron matraces de 250 ml con 50 ml medio nutritivo o de 5 l con 1 l de medio nutritivo. En el caso de volúmenes pequeños (10 ml o 250 ml), la incubación tuvo lugar en un agitador orbital, a 300 rpm y 33 °C para *M. xanthus*, 250 rpm y 30 °C (excepto que se indique lo contrario) para *C. crescentus*, y 250 rpm y 37 °C para *E. coli*. En el caso de los cultivos de 1 l, la inoculación se realizó en un agitador orbital de la marca New Brunswick Scientific, a 150 rpm. La inoculación en medio nutritivo sólido tras la transformación de *M. xanthus* se efectuó con ayuda de 2,5-4 ml de agar de cobertera. Las cajas Petri se incubaron a 33 °C para *M. xanthus*, 30 °C (excepto que se indique lo contrario) para *C. crescentus* o 37 °C para *E. coli*.

II.4 Inducción del desarrollo multicelular de *M. xanthus*

Típicamente, se centrifugó 1 ml de cultivo de *M. xanthus* en fase exponencial de crecimiento durante 2 minutos, a 13 000 rpm y temperatura ambiente. Tras realizar un lavado con TPM para eliminar restos del medio CTT, las células se resuspendieron en un volumen de TPM necesario para dejar el cultivo a una $OD_{550}=6$. Del cultivo concentrado se depositaron gotas de 15 µl sobre cajas de TPM. Una vez que las gotas fueron absorbidas por el agar, las cajas se incubaron a 33 °C durante 2-3 días, y se tomaron fotos con una lupa Zeiss y una cámara ProgRes C3.

II.5 Tampones y soluciones

II.5.1 Electroforesis de DNA

- ❖ **TAE 1X** (Sambrook & Russell, 2001)

40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA (pH 8,0)

- ❖ **TBE 1X** (Sambrook & Russell, 2001)

89 mM Tris-borato, 2 mM EDTA (pH 8,0)

- ❖ **Tampón de carga 1X**

Suministrado por Fermentas

II.5.2 Electroforesis de proteínas

❖ **Tampón de carga/ruptura para geles de poliacrilamida-SDS 1X**

50 mM Tris-HCl (pH 6,8), 10% glicerol, 3% SDS, 3% β-mercaptoetanol, 0,3% azul de bromofenol

❖ **Tampón de electroforesis para geles de poliacrilamida-SDS**

50 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1% SDS

❖ **Solución de tinción Coomassie**

PageBlue Protein Staining Solution de Thermo Scientific

❖ **Geles de poliacrilamida-SDS**

Preparados según Sambrook *et al.*, (1989)

II.5.3 Purificación de proteínas

❖ **Tampón A**

50 mM tampón fosfato, pH 7,5, 2 mM β-mercaptoetanol, 0-1 M NaCl

II.5.4 Detección de proteínas mediante anticuerpos específicos

❖ **Tampón fosfato salino (PBS)**

100 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 140 mM NaCl, 3,3 mM KCl, pH 7,5

❖ **Tampón fosfato salino con Tween (PBS-T)**

PBS, 0.1% Tween 20

❖ **Tampón de equilibrado**

30 mM Glicina, 48 mM Tris, 0.037% SDS, 20% metanol

❖ **Tampón de transferencia I para el ánodo**

0.3 M Tris, 10% metanol, pH 10,4

❖ **Tampón de transferencia II para el ánodo**

25 mM Tris, 10% metanol, pH 10,4

❖ **Tampón de transferencia para el cátodo**

25 mM Tris, 40 mM ácido aminocaprílico, 20% metanol, pH 9,4

II.5.5 Determinación de la actividad β -galactosidasa

❖ **Tampón Z** (Kroos & Kaiser, 1987)

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

II.5.6 Inmunoprecipitación de cromatina

❖ **Solución de lisis A**

20% sacarosa, 50 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris pH 8, lisozima 1 mg/ml.

❖ **Solución de lisis B**

150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM HEPES-KOH pH 7,5, 1% Triton X-100, 0,1% deoxicolato, 0,1% SDS.

❖ **Solución de lavado**

250 mM LiCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 0,5% NP-40, 0,5% deoxicolato.

❖ **TE**

10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA

II.6 Extracción de DNA

Para el aislamiento del DNA cromosómico de *M. xanthus* o *C. crescentus* se utilizó el kit de purificación de DNA genómico de WizardTM (Promega). En algunos casos este aislamiento se llevó a cabo usando la matriz InstaGene de BioRad, siguiendo el protocolo facilitado por esta casa. El aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli* se realizó mediante el uso del kit de purificación de DNA plasmídico *illustra* de GE Healthcare o QIAprepTM Spin Miniprep de QIAGEN.

II.7 Transferencia de DNA

II.7.1 Transformación de *E. coli*

La obtención de células competentes de *E. coli* y su transformación con 1-10 ng de DNA por choque térmico se efectuaron según Sambrook y Russell (2001). Cuando fue preciso obtener un alto número de transformantes, se utilizó la técnica de electroporación (Sambrook y Russell 2001), empleándose cubetas de electroporación de 0,1 cm y los siguientes parámetros: 1,5 kV, 25 μ F y 200 Ω .

II.7.2 Transformación de *M. xanthus*

Se realizó mediante electroporación siguiendo el procedimiento descrito por Kashefi y Hartzell (1995). Para preparar células “electrocompetentes” de *M. xanthus* se centrifugaron ($2', 16.000 \times g$) 3 ml de un cultivo en fase exponencial de crecimiento ($DO_{550} = 0,7-1,1$). El precipitado celular se lavó tres veces con 1,5 ml de agua bidestilada estéril y se resuspendió finalmente en 40 μ l de agua bidestilada. Las células electrocompetentes se mezclaron con el DNA correspondiente (0,5–1 μ g de DNA dializado) y la mezcla, una vez transferida a una cubeta de electroporación de 0,1 cm, se sometió a un pulso eléctrico con el electroporador Bio-Rad Gene Pulser II (0,65 kV, 25 μ F y 400 Ω). Inmediatamente después del pulso eléctrico se añadió 1 ml de CTT a la cubeta, se mezcló bien y se transfirió a un matraz de 50 ml que contenía 5 o 9 ml de CTT. Las células se cultivaron 6 horas o toda la noche, respectivamente, y se sembraron a distintas diluciones en cajas de CTT con el antibiótico al que confiere resistencia el plásmido introducido. Dichas cajas se incubaron a 33 °C hasta que aparecieron los transformantes, normalmente a los 5 días de incubación. Las colonias obtenidas se purificaron en cajas de CTT con el antibiótico correspondiente. En todos los casos, una vez obtenidos los transformantes, se comprobó la correcta integración del plásmido mediante PCR.

II.7.3 Transformación de *C. crescentus*

Se realizó mediante electroporación. Para preparar células “electrocompetentes” de *C. crescentus*, se centrifugaron ($2', 16.000 \times g$) 3 ml de un cultivo en fase exponencial de crecimiento ($DO_{660}=0,6-0,9$). El precipitado celular se lavó tres veces con 1,5 ml de agua bidestilada estéril y se resuspendió finalmente en ~80 μ l de agua bidestilada. La introducción de plásmidos en las células

electrocompetentes se realizó igual que en el apartado **II.7.2**, pero utilizando las siguientes condiciones en el pulso eléctrico: 1,5 kV, 25 μ F y 400 Ω . Inmediatamente después del pulso eléctrico, se añadió 1 ml de PYE a la cubeta, se mezcló bien y se transfirió a un tubo de ensayo que contenía 1 ml de PYE. Las células se cultivaron durante 3 horas y se sembraron distintas cantidades en cajas de PYE con el antibiótico correspondiente. Dichas cajas se incubaron a 30 °C hasta que aparecieron los transformantes, normalmente a los 3 días de incubación. Las colonias obtenidas se purificaron en cajas de PYE con el antibiótico correspondiente. Cuando se transformó con un plásmido integrativo, una vez obtenidos los transformantes, se comprobó su correcta integración mediante PCR.

II.8 Tratamiento enzimático del DNA

Los tratamientos enzimáticos más usuales realizados al DNA fueron:

- a. **Digestión** con enzimas de restricción (GE Healthcare), que se realizó siguiendo las indicaciones del suministrador.
- b. **Desfosforilación** de extremos 5' con la enzima fosfatasa alcalina de camarón o con *rAPid Alkaline Phosphatase* (ambas de Roche) para evitar la "autoligación" de los vectores. Se realizó de acuerdo con las especificaciones del suministrador.
- c. **Ligación** de fragmentos de DNA, que se realizó en tampón de ligación (con ATP a 1 mM), y una unidad de ligasa T4 de Roche o de New England Biolabs. La cantidad de DNA en la mezcla varió según el experimento. Las mezclas de ligación se incubaron a 16 °C durante toda la noche o 25 °C durante 2-3 horas.

II.9 Amplificación de DNA mediante PCR

Se llevó a cabo en un termociclador Eppendorf a partir de 15–30 ng de DNA molde, con 20 pmoles de oligonucleótidos, los cuatro dNTPs (200 μ M cada uno), DMSO (5%, dada la riqueza en pares G+C del DNA de *M. xanthus* y de *C. crescentus*), tampón de reacción y 1,5 U de *Pfu* (Promega), siguiendo las especificaciones del suministrador. En las reacciones con fines diagnósticos se utilizaron bolitas para PCR *PuReTaqTM Ready-To-GoTM* (GE Healthcare), que contienen los dNTPs, la polimerasa de DNA Taq y su tampón de reacción. Los

productos de PCR se purificaron con el kit de Roche *High PureTM PCR Product*. En algunos casos, el producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión (Pronadisa), recortándose la banda de interés y purificándola con el mismo kit *High PureTM PCR Product Purification* de Roche según las especificaciones del fabricante.

II.10 Secuenciación de DNA

Los fragmentos de DNA a secuenciar se amplificaron por PCR o se clonaron en un plásmido. Los productos de PCR se purificaron con el kit *High PureTM PCR Product Purification* de Roche y los plásmidos con el kit *QIAprepTM Spin Miniprep* de QIAGEN, o el kit *illustraTM plasmid Prep Mini Spin* de GE Healthcare. La secuenciación se realizó en el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Murcia.

II.11 Extracción de RNA

II.11.1 Extracción de RNA en *C. crescentus*

Un cultivo de la estirpe deseada de *C. crescentus* se creció en las condiciones de interés hasta una $DO_{660}=0,3-0,4$, se centrifugaron 4-5 ml del cultivo en tubos eppendorf, y el precipitado celular resultante se guardó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para la extracción del RNA se utilizó el Kit *PureLink[®] RNA Mini* de Life Technologies (siguiendo las indicaciones del fabricante), eluyendo en un volumen final de 100 μl . Para eliminar completamente el DNA genómico, los 100 μl de RNA se trataron con *Turbo DNasa* de Ambion durante 4 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (con su tampón correspondiente y con 20 U de *Protector RNase Inhibitor* de Roche). Una vez terminado el tratamiento, se repitió la purificación con el kit *PureLink[®] RNA Mini* para eliminar tanto los restos de DNasa como el tampón, eluyendo en este caso en un volumen final de 30 μl .

II.11.2 Cuantificación de RNA y calidad del RNA

La cuantificación del RNA se realizó mediante medida de la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro *NanoDrop* de Thermo Scientific. La integridad del RNA se determinó sometiendo una alícuota a electroforesis en gel de agarosa al 1%. La presencia de las bandas de los distintos tipos de RNA ribosómicos es un indicador de la integridad del RNA total. Además, las medidas en el *NanoDrop* ofrecen dos parámetros de calidad. Por un lado, el cociente de absorbancia 260/280 indica posibles contaminaciones por proteínas o fenol. Valores en torno a 2 de este cociente indican una alta pureza de la muestra de RNA (valores inferiores indican la presencia

de contaminantes). Por otro lado, el cociente de absorbancia 260/230 permite detectar la presencia de otro tipo de contaminantes que absorben a 230, y valores entre 2-2,2 son signo de una alta pureza de la muestra.

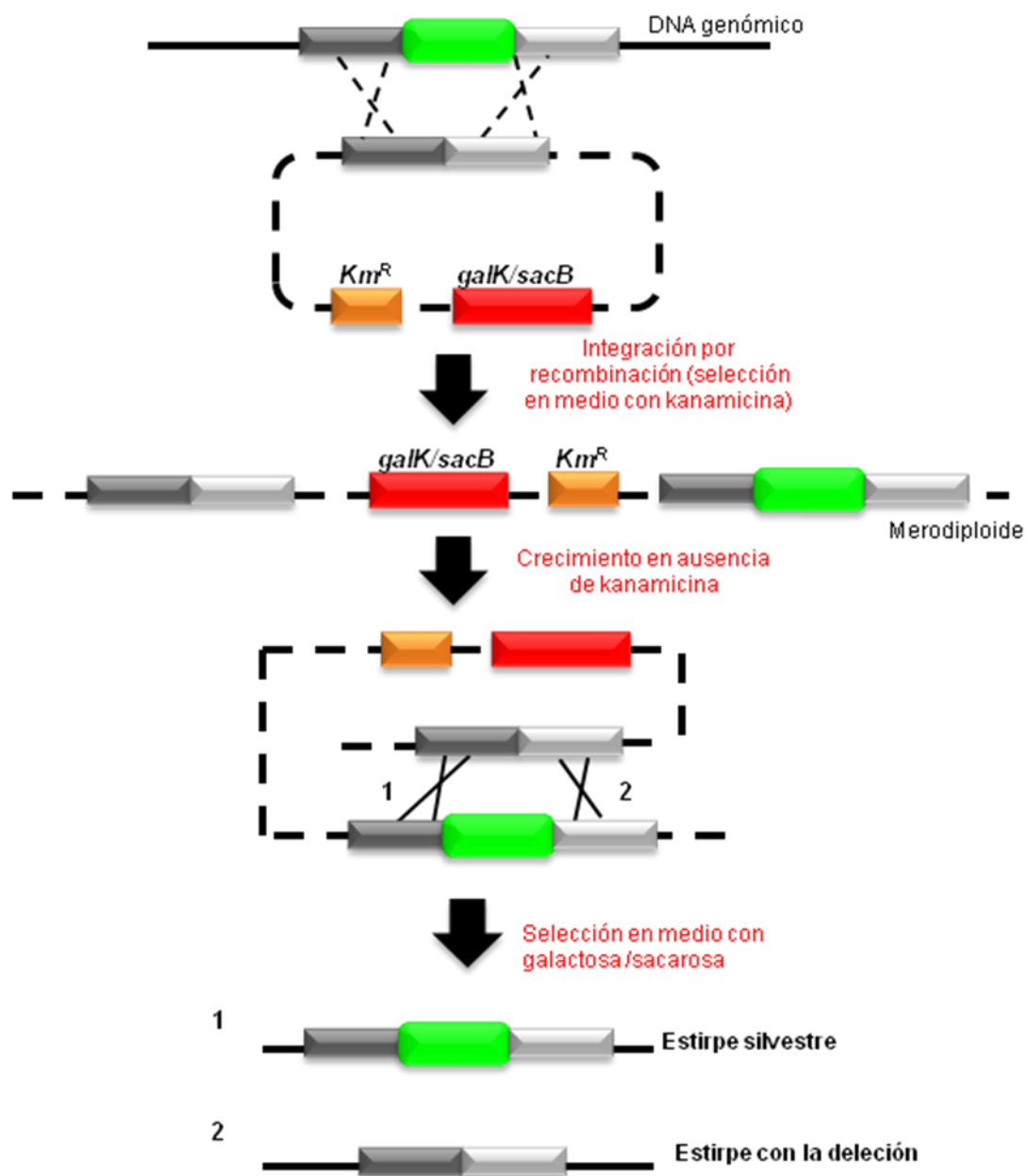


Figura 22. Esquema del proceso de obtención de una estirpe portadora de una delección en *M. xanthus* (*galK*) o *C. crescentus* (*sacB*).

II.12 Procedimientos de mutagénesis

Las mutaciones puntuales en el DNA se obtuvieron mediante síntesis génica (GenScript) o mediante la técnica de extensión de productos de PCR solapantes (Ho *et al.*, 1989), y posterior clonación en el vector necesario. Para la obtención de mutaciones por delección completa de un gen (Figura 22), en primer lugar se amplificaron por PCR las regiones (~1 kb) inmediatamente aguas arriba y aguas abajo del gen correspondiente, y se clonaron en los plásmidos pBJ113 o pBJ114 (se diferencian en la orientación de la región de multiclonación) para *M. xanthus*, o pNTPS138 para *C. crescentus*. La utilidad de este tipo de vectores reside en que, además de contener un marcador que confiere resistencia a kanamicina, incluyen un gen que provoca sensibilidad a galactosa (gen *galk*) o sacarosa (*sacB*), respectivamente. La estirpe silvestre de *M. xanthus* o *C. crescentus* se transformó (electroporación) con el plásmido portador de la delección y varios de los merodiploides Km^R resultantes se crecieron durante varias generaciones en ausencia de kanamicina, para permitir la pérdida del plásmido por recombinación homóloga. Los segregantes haploides resultantes se seleccionaron en cajas de CTT suplementadas con galactosa al 1% (*M. xanthus*) o cajas de PYE suplementadas con sacarosa al 3% (*C. crescentus*). Varias de las colonias crecidas en este medio se sometieron a análisis mediante PCR para diagnosticar la presencia o ausencia de la delección.

II.13 Técnicas electroforéticas

II.13.1 Electroforesis de DNA en gel de agarosa

La separación de fragmentos de DNA se realizó mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa (Pronadisa o Sigma-Aldrich) de distintas concentraciones, preparados en tampón TAE 1X. El DNA se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio o *RealSafe Nucleic Staining Solution* de Promega e iluminación con luz ultravioleta. La purificación de fragmentos de restricción se realizó tras su separación en un gel de agarosa de bajo punto de fusión (Pronadisa). Las porciones de agarosa con el DNA de interés se recortaron del gel con un bisturí y el DNA se purificó con el kit *High Pure™ PCR Product Purification* de Roche.

II.13.2 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS

La separación en función del tamaño de las proteínas presentes en diferentes muestras se realizó mediante electroforesis en geles verticales de poliacrilamida-SDS, utilizando distintos equipos de Bio-Rad e Invitrogen, y siguiendo el método de Laemmli (1970). Los marcadores de tamaño molecular utilizados (*Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder*, Thermo Scientific). Antes de ser cargadas, las muestras se incubaron durante 5-10 minutos a 100 °C. Para depositarlas en los pocillos se utilizó una micropipeta. La electroforesis se realizó a 200 V durante 1-2 horas.

II.13.3 Electroforesis de DNA en gel de acrilamida no desnaturizante

Este tipo de electroforesis permite analizar cambios en la movilidad electroforética que ocurren cuando una proteína se une a un fragmento de DNA. Para la elaboración de un gel de 1,5 mm de grosor y de 50 ml al 4% de poliacrilamida los componentes utilizados fueron los siguientes: 6,6 ml de Acrilamida-bisacrilamida al 30% (BIO-RAD) y 43,4 ml TBE 0,5 X. Tras mezclar estos componentes, se filtró la solución y se añadió persulfato amónico 25% (133 µl) y TEMED (25 µl). Una vez polimerizado, el gel se transfirió a un tanque de electroforesis vertical que contenía tampón TBE 0,5X, se precorrió durante 30 minutos (200 V, 30 mA) y, tras cargar las muestras, se realizó la electroforesis durante 1–2 horas (200V, 30 mA). Las posiciones de las bandas se detectaron, tras secar el gel, mediante autorradiografía en película Biomax MS de Kodak (en general, 1 ó 2 horas de exposición a -70 °C fueron suficientes).

II.13.4 Electroforesis de DNA en gel de acrilamida desnaturizante

Este tipo de electroforesis se utilizó para los ensayos de transcripción *in vitro*. Los componentes y volúmenes utilizados para la elaboración de un gel de 0,2 mm de espesor, al 6%, con 8 M de urea y 60 ml fueron:

Acrilamida-bisacrilamida 19:1 (BIO-RAD)	30 g
Urea	48 g
TBE 10X	10 ml
Agua estéril Milli-Q tratada con DPEC al 0,2%.	hasta 100 ml

Tras mezclar los distintos componentes, se filtró la solución y se añadió persulfato amónico 25% (400 µl) y TEMED (20 µl). El gel se dejó polimerizar durante al

menos 3 horas y se transfirió a un tanque de electroforesis vertical (GIBCO BRL ModelS2 *Sequencing gel electrophoresis apparatus*) que contenía tampón TBE 1X. Antes de cargar las muestras, se realizó una electroforesis a potencia constante de 37 W durante 30-45 minutos y a temperatura ambiente, alcanzando el gel una temperatura de 50-60 °C. La electroforesis de las muestras se realizó a 37 W durante 2'5 horas y a temperatura ambiente. Tras secar el gel, las posiciones de las bandas se detectaron mediante autorradiografía en película X-OMAT™ de Kodak (24-48 horas de exposición a -70 °C).

II.14 Expresión y purificación de proteínas

Para expresar en *E. coli* las proteínas CdnL de *M. xanthus*, y de *C. crescentus* (CcCdnL), así como sus versiones mutadas, se utilizó el sistema pET de Novagen. Los genes *cdnLy_{cc}cdnL*, obtenidos por PCR, se clonaron en los puntos *NdeI-BamHI* del vector pET15b y los plásmidos resultantes (Tablas 4 y 5) se introdujeron en la estirpe de *E. coli* BL21 (DE3). Antes de proceder a la purificación de las proteínas, se realizaron pruebas a pequeña escala de cada una de las estirpes resultantes para establecer las condiciones óptimas de expresión y solubilidad.

Para purificar las proteínas citadas, se partió de 1 litro de cultivo de cada una de las estirpes ($OD_{600}=0,6$) inducido con 1 mM de IPTG durante toda la noche, a 25 °C. Las células se recogieron por centrifugación en rotor JLA-9.1000 Beckman a 7.500xg durante 10 minutos a 4 °C y el precipitado celular se almacenó a -70 °C. Antes de su uso, se descongeló a 4 °C y se resuspendió en 30 ml de tampón A con 150-300 mM NaCl, 50 mM tampón fosfato, 2 mM β -mercaptoetanol, 1 mM de benzamidina, 1 tableta de *cOmplete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets* (Roche) y 1mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), a pH 7,5. La rotura celular se realizó por tratamiento con ultrasonido con un sonicador automático Labsonic (B. Braun) (pruebas de expresión y solubilidad) o en la prensa French (purificación). El extracto celular se centrifugó (20.000xg, 45 minutos) separándose así la parte soluble de la insoluble. La proteína se purificó a partir de la fracción soluble mediante cromatografía de afinidad utilizando columnas conteniendo la resina TALON™ *metal affinity* (CLONTECH), que consiste en pequeñas bolitas de sefarosa recubiertas de cobalto. Tras pasar la fracción soluble del extracto celular por la columna, se realizaron varios lavados con tampón A. La elución se realizó a pH neutro con imidazol 150 mM. Las fracciones obtenidas se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 15% con SDS (SDS-PAGE) y aquellas que contenían >95 de la proteína a purificar, a juzgar por su

aspecto en estos geles, se dializaron (*Spectra/Pro Molecular porous MWCO 3500 de Spectrum^R*) frente a tampón A 100 mM NaCl para eliminar el imidazol y se pasaron por una columna de fosfocelulosa para eliminar impurezas (*His₆-CdnL* no se une a la columna, *His₆-CcCdnL* sí se une).

Cuando fue necesario utilizar las proteínas sin la cola de 6 histidinas, una vez realizada la elución de las proteínas con imidazol a pH neutro y la diálisis en tampón A 100 mM de NaCl, la cola de histidinas fue eliminada mediante digestión con trombina (1:1000) incubando la muestra durante 16 horas a 4 °C. Para detener la reacción se añadió PMSF y benzamidina, ambos a una concentración de 1 mM. Posteriormente, las proteínas se pasaron por una columna de fosfocelulosa para eliminar la trombina y otras impurezas. Las colas de histidinas se eliminaron dializando una vez más en tampón A, 100-150 mM NaCl. Cuando fue necesario, las muestras de proteínas se concentraron con tubos Amicon Ultra (MWCO 3500 Da). Para eliminar las impurezas que aún pudieran quedarse realizó una cromatografía de exclusión de tamaño (Superdex-200, a temperatura ambiente y equilibrando la columna con tampón A, 150mM NaCl). Por último, se concentraron y se guardaron a -70 °C con 50% glicerol.

II.15 Detección de proteínas mediante anticuerpos específicos

La obtención de extractos de células vegetativas de *M. xanthus* para la detección de proteínas con anticuerpos específicos se realizó incubando el cultivo hasta una OD₅₅₀ ~0,7. Las células presentes en 1 ml del cultivo se recogieron por centrifugación y se conservaron a -80 °C. El precipitado celular se descongeló a 4 °C, se resuspendió en 300 µl de una solución que contenía tampón Z, la mezcla de inhibidores de proteasas a 1X (*cOmpleteTM, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets* de Roche), 1mM de PMSF y 1 mM de benzamidina, y se lisó mediante tratamiento con Cloroformo/SDS (Griffith & Wolf, 2002). Se midió la concentración de proteínas en el sobrenadante mediante el “Método Bradford” (Bradford, 1976) y se cargaron de 1 a 6 µg de proteína total (10-20 µl de solución) por carril.

De manera similar, los extractos celulares de *C. crescentus* se obtuvieron a partir de 1 ml de cultivo centrifugado y mantenido a -80 °C hasta su utilización. El precipitado se descongeló a 4 °C y se resuspendió en tampón de lisis (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM HEPES-KOH pH 7,5, 1% Triton X-100, 0,1% deoxicolato, 0,1% SDS) con los mismos inhibidores de proteasas indicados antes para *M. xanthus*. La

cantidad de proteína total en el extracto se midió igualmente mediante el “Método Bradford”.

Las proteínas separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS se detectaron con anticuerpos específicos mediante la técnica de *Western* (Towbin *et al.*, 1979; Burnette, 1981). Para ello, se transfirieron a una membrana de PVDF (*Inmobilon-P* de Millipore™) mediante un sistema semiseco, utilizando el equipo *Semi-Dry Electroblothing Unit* de Sigma o el sistema *Trans-Blot® Turbo™ Blotting System* de Biorad. Para seguir la transferencia visualmente, se utilizaron los marcadores de tamaño molecular coloreados *Recombinant Proteins Molecular Weight Markers Full-range Rainbow* (Amersham Biosciences). La transferencia se realizó durante 30 minutos a 225 mA (*Semi-Dry Electroblothing Unit*) o a 25V y 1,0 A (*Trans-Blot® Turbo™ Blotting System*).

Una vez realizada la transferencia, la membrana se sumergió durante 1-2 horas en tampón PBS-T con 5% de leche desnatada como agente bloqueante (PBS-TB). A continuación, se realizaron 3 lavados de 5-15 minutos en tampón PBS-T. Después, la membrana se incubó durante ~16 horas en presencia de 5-10 µl del anticuerpo primario diluido en 20 ml de PBS-TB. Tras eliminar el exceso de anticuerpo, aplicando tres nuevos lavados con PBS-T, la membrana se incubó durante una hora en una dilución 1:1.000 del anticuerpo secundario (conjugado a peroxidasa de rábano) en 20 ml de PBS-TB. El exceso de anticuerpo secundario se eliminó mediante tres lavados con PBS-T. Los lavados y las incubaciones con los anticuerpos se llevaron a cabo con agitación suave y constante, y a temperatura ambiente para periodos cortos (1-2 horas) ó 4 °C para periodos largos (~16 horas). Para el revelado se utilizó el sistema *ECL Prime* (GE Healthcare). Tras añadir el reactivo que contiene el sustrato quimioluminiscente para la peroxidasa conjugada al anticuerpo, la membrana se expuso a una película *Amersham Hyperfilm™ ECL* (GE Healthcare) durante un período de tiempo variable entre 1 y 5 minutos.

II.16 Ensayos de cuantificación relativa mediante RT-PCR en tiempo real

El RNA de la estirpe objeto de estudio se obtuvo según el protocolo descrito en el apartado II.10.1. Para obtener el cDNA se incubaron 2 µg de RNA, 2'5 µg de hexanucleótidos aleatorios y DMSO al 5% durante 10 minutos a 65 °C. Se completó el volumen hasta 13 µl con agua MiliQ tratada con DPEC al 0,2% y, transcurrida la incubación, se añadió tampón de la transcriptasa inversa (1X), dNTPs a una concentración final de 1 mM cada uno (*PCR nucleotide mix* Roche), 20 U de *Protector RNase Inhibitor* Roche y 10 U de *Transcriptor Reverse Transcriptase* de Roche. La mezcla (20 µl) se mantuvo 10 minutos a 25 °C, 30 minutos a 55 °C y finalmente 5 minutos a 85 °C. Puesto que la reacción de retrotranscripción es lineal, el rendimiento fue de 2 µg de cDNA total.

Los oligonucleótidos para la detección de RNAs mensajeros específicos se diseñaron usando Primer3Plus (programa con licencia GNU) (Untergasser *et al.*, 2007), siguiendo las opciones estándar que ofrece el programa. Las reacciones de amplificación y detección se llevaron a cabo en el termociclador StepOne™ de Applied Biosystems, con capacidad para placas de 48 pocillos (*MicroAmp® Optical 48-Well Reaction Plate*). La detección del “amplicón” se realizó con el fluoróforo SYBR® Green I, una molécula que emite fluorescencia al unirse a DNA de doble cadena. La reacción de amplificación contenía: 10 µl de *Power SYBR® Green PCR Master Mix and RT-PCR* de Applied Biosystems o *iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix* de BIO-RAD, 2 µl de cDNA (concentración variable de 100 ng a 0,01 ng), oligonucleótidos a una concentración final entre 50 y 300 nM (la más usual fue 100 nM) y agua hasta un volumen final de 20 µl. Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: 10 minutos a 95 °C para activar la *AmpliTaq Gold® DNA polymerase* o la *iTaq™ DNA polymerase* (contenida en la *Master Mix*) y a continuación 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C.

Para elegir qué método de cuantificación relativa debía usarse, se comprobó la eficiencia de amplificación de cada uno de los amplicones generados con cada pareja de oligonucleótidos. Para ello se construyó una recta patrón de amplificación realizando diluciones seriadas del cDNA (factor 1:10) y depositando las siguientes cantidades (ng) en los pocillos de las placas: 100, 10, 1, 0,1, 0,01 (cada reacción se llevó a cabo por triplicado). Tras la reacción de amplificación, se representó en el eje de abscisas la cantidad de cDNA y en el eje de ordenadas los valores de Ct (ciclo de

amplificación en el que la fluorescencia captada por el detector supera la línea basal durante la fase exponencial de amplificación). Los valores de Ct que se consideran adecuados son los comprendidos entre 10 y 35, ya que fuera de este intervalo la variabilidad de los resultados es muy alta. Una vez representados los datos, se calcula el factor de ajuste de los mismos a la recta obtenida, R^2 , que debe estar entre 0,0978 y 0,099 para que el ajuste sea bueno. Finalmente, se calcula la eficiencia de la amplificación (E), usando para ello la fórmula siguiente:

$$E = (10^{(-1/\text{pendiente})} - 1) \times 100$$

En las muestras con una concentración de mensajero especialmente baja, el factor aplicado en las diluciones seriadas fue 1:2, si bien se mantuvo la cantidad de 100 ng de cDNA como primer punto de la recta patrón.

Independientemente del método de cuantificación relativa utilizado, se requiere un gen de referencia (control endógeno) cuya expresión sea constante a lo largo del ciclo celular, para normalizar el nivel de expresión de las muestras de cada ensayo. En este trabajo se utilizó el gen *ruvA*, que mostró una eficiencia superior al 98%.

Una vez realizados todos los análisis previos, se dispusieron en los pocillos las distintas muestras. Para cada una de ellas se midió tanto el gen problema como el gen endógeno, ambos por triplicado. Seguidamente se procedió al análisis de los datos. En todos los casos analizados en esta tesis el valor de eficiencia estuvo entre el 95% y 100%, lo cual permitió realizar la cuantificación relativa con el método $\Delta\Delta Ct$ (Pfaffl, 2001). Para ello se usaron las siguientes fórmulas:

-Normalización de la muestra problema:

$$Ct \text{ gen diana} - Ct \text{ gen endógeno} = \Delta Ct$$

-Normalización de la muestra control:

$$Ct \text{ gen diana} - Ct \text{ gen endógeno} = \Delta Ct$$

-Diferencia entre problema y control:

$$\Delta Ct \text{ muestra problema} - \Delta Ct \text{ muestra control} = \Delta\Delta Ct$$

-Variación de la expresión: $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Al usar un fluoróforo de unión inespecífica al DNA hubo que realizar dos comprobaciones. Por un lado, para confirmar que no se producía amplificación inespecífica, se sometió a electroforesis una alícuota de 12 μl del producto de PCR en

un gel (al 4%) de agarosa NuSieve 3:1 agarosa normal (Pronadisa) en presencia de 0,5 µg/ml bromuro de etidio, comprobándose la aparición de una única banda amplificada. Por otro lado, se realizó una curva de disociación del producto de PCR para comprobar si aparecía más de un pico, que indicaría la amplificación de más de un fragmento o la hibridación entre los cebadores. Esta curva se realizó en el mismo termociclador que la reacción de amplificación utilizando un programa estándar.

II.17 Ensayo de doble híbrido bacteriano (DHB)

El sistema de doble híbrido bacteriano en *E. coli* (*BATCH*, *Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid System*, de Euromedex), que permite estudiar la interacción entre dos proteínas, se basa en el dominio catalítico de la ciclasa de adenilato de *Bordetella pertussis* (Figura 23). Dicha enzima consta de dos fragmentos complementarios, T25 y T18, inactivos cuando están físicamente separados pero activos cuando se fusionan a polipéptidos que interaccionan físicamente, interacción que puede seguirse mediante la activación del gen chivato *lacZ* y la consiguiente producción de la enzima β-

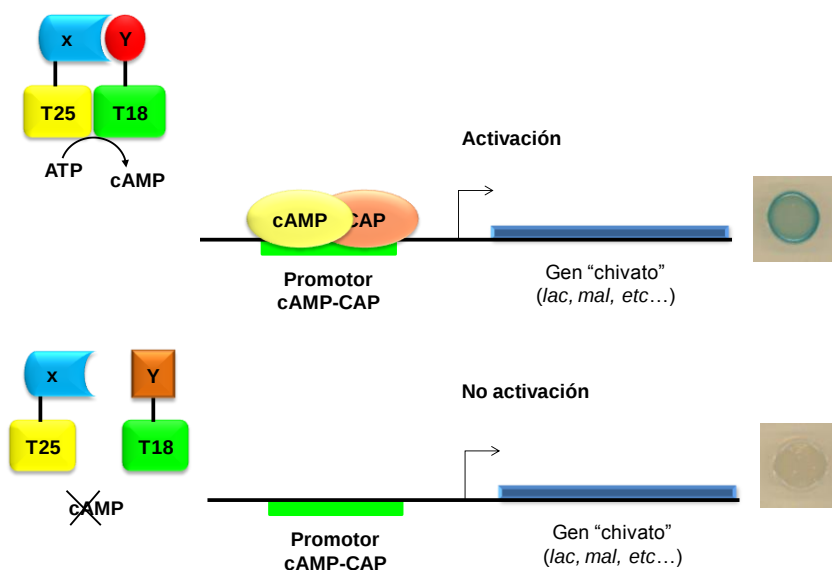


Figura 23. Esquema del sistema del doble híbrido bacteriano. Complejo activo debido a la interacción física de las proteínas hipotéticas X e Y, unidas traduccionalmente a los fragmentos T25 y T18 (arriba), y los fragmentos T25 y T18 inactivos por separado (abajo).

galactosidasa. Dicha actividad enzimática puede ser analizada tanto cualitativamente (en placas con X-Gal, un sustrato cromogénico de la β-galactosidasa) como cuantitativamente siguiendo el protocolo descrito en el apartado siguiente. Este sistema permite la fusión de las proteínas de interés tanto al extremo C-terminal

(plásmidos pKT25 y pUT18C) como al extremo N-terminal (plásmidos pKNT25 y pUT18) de estos dos fragmentos.

II.18 Expresión de β -galactosidasa

La actividad β -galactosidasa de una estirpe (de *C. crescentus* o *E. coli*) se estimó cualitativamente mediante crecimiento en cajas del medio adecuado suplementado con X-Gal (40 μ g/ml). Las colonias adquieren una coloración azul cuya intensidad depende de la actividad β -galactosidasa de la estirpe.

II.18.1 Expresión de β -galactosidasa en *C. crescentus*

Para cuantificar la actividad β -galactosidasa específica de una estirpe de *C. crescentus*, ésta se inoculó en medio líquido PYE más el antibiótico correspondiente. Cuando el cultivo crecido en las condiciones requeridas para el estudio alcanzó la densidad celular deseada, se tomaron muestras de 1 ml que se centrifugaron, se resuspendieron en tampón Z y se almacenaron a -70 °C hasta el momento de su análisis. Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente justo antes de ser analizadas y se colocaron sobre hielo picado. La rotura de las células se realizó mediante tratamiento con SDS/cloroformo (Griffith & Wolf, 2002). El ensayo de actividad β -galactosidasa se realizó a 33 °C según (Miller, 1972), empleando 5-50 μ l del extracto celular. La concentración de proteínas se midió según (Lowry *et al.*, 1951). Salvo que se indique lo contrario, la actividad β -galactosidasa específica se expresa en nanomoles de o-nitrofenol (generado por rotura enzimática del sustrato ONPG) producidos por minuto y miligramo de proteína, de acuerdo con la ecuación:

$$Actividad\ específica = \frac{213 \times A_{420}}{t \times ml \times (mg/ml)}$$

donde 213 es el coeficiente de extinción del σ -nitrofenol y convierte la densidad óptica medida a 420 nm en los ensayos de actividad en nanomoles de σ -nitrofenol producidos; *ml* es el volumen del extracto utilizado en la determinación de la actividad; *mg/ml* es la concentración de proteínas de la muestra; y *t* representa el tiempo de incubación en minutos a 33 °C antes de detener la reacción.

II.18.2 Expresión de β -galactosidasa en *E. coli*

Para medir la activación del gen chivato *lacZ* en el sistema del doble híbrido bacteriano, la estirpe de interés se inoculó en medio rico LB más el/los antibiótico/s correspondiente/s y se incubó a 30 °C durante toda la noche. El cultivo se diluyó 20 veces en el mismo medio y se añadió IPTG hasta 0,5 mM para inducir la expresión de las proteínas híbridas. Este cultivo se dejó en el incubador a 30 °C hasta que alcanzó la fase estacionaria (aproximadamente 16 horas). La toma de muestras y el análisis cuantitativo de la actividad β -galactosidasa se realizaron siguiendo el mismo procedimiento descrito para *C. crescentus*.

II.19 Ensayos de cambio en la movilidad electroforética

Los ensayos de cambio en la movilidad electroforética se realizaron usando como sondas fragmentos de DNA de entre 130 y 350 pb con las regiones de interés, indicadas más adelante en el texto. Los distintos fragmentos se obtuvieron por PCR empleando un oligonucleótido marcado previamente en su extremo 5' con [γ^{32} P]ATP y quinasa de polinucleótido de T4 de Amersham Biosciences. Tras la amplificación, la radiactividad no incorporada se eliminó mediante centrifugación en columna de Sephadex G-25 (*DNA grade*, Amersham Biosciences) y el fragmento se purificó con el kit *High PureTM PCR Product Amplification* (Roche).

La reacción de unión se realizó en un volumen de 20 μ l que contenía 1-3 pM del fragmento de DNA marcado (~6.000 cpm) y las cantidades necesarias de las proteínas, en un tampón de reacción que contenía ~ 80 mM KCl, 25 mM Tris pH 8, 1 mM DTT, 10 mM $MgCl_2$, 50 ng/ μ l de BSA (albúmina de suero bovino) y glicerol al 10%, con o sin 1 μ g de poli[dG-dC] o poli[dI-dC], como competidor no específico. Las muestras fueron incubadas durante 30 minutos a 37 °C. Tras dicha incubación, cuando fue necesario, se añadió 1 μ g de heparina y se incubó 5 minutos a 37 °C, las muestras se sometieron entonces a electroforesis en un gel de acrilamida no desnaturizante al 4% a 10 °C durante 40-50 minutos.

II.19.1 Transcripción *in vitro*

Esta reacción se realizó en un volumen de 30 μ l (en agua Milli-Q tratada con 0,2 % de DEPC) con los siguientes componentes:

DTT	1 mM
BSA	50 ng/μl
Glicerol	10 %
Inhibidor de RNasa	20 unidades
Fragmento de DNA molde	0,5 nM
RNAP de <i>M. xanthus</i>	130 nM

Antes de iniciar la reacción, esta mezcla se incubó durante 30 minutos a 37 °C y, cuando fue necesario, con CdnL (o sus versiones mutadas). A continuación se añadió 1,5 μl de heparina a 1 mg/ml, permaneciendo otros 5 minutos a 37 °C. La transcripción se inició por la adición de ATP, UTP y GTP (400 μM, concentración final de cada uno), CTP (20 μM) y [$\alpha^{32}\text{P}$]CTP (0,42 μM). Las muestras se incubaron otros 15 minutos a 37 °C y la reacción se detuvo añadiendo 50 μl de 15 mM EDTA. Se realizaron dos precipitaciones consecutivas con acetato/etanol para eliminar los nucleótidos radiactivos no incorporados, y los productos precipitados se sometieron a electroforesis en un gel de acrilamida desnaturalizante al 6 %.

II.20 Inmunoprecipitación de cromatina

A 50 ml de cultivo crecido hasta mitad de la fase logarítmica ($\text{D.O}_{550} \sim 0,6-0,8$ para *M. xanthus* y $\text{D.O}_{660} \sim 0,4-0,6$ para *C. crescentus*) en CTT (*M. xanthus*) o M2G (*C. crescentus*), se agregó formaldehído (Merck) a una concentración final del 1% y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación suave, para fijar las interacciones proteína-DNA y proteína-proteína. Para interrumpir la reacción se añadieron 2,5 ml de glicina a 2,1 M y se incubó 5 minutos más. Las células fueron entonces centrifugadas (8.000 rpm 10 minutos) y el precipitado celular se lavó 3 veces con PBS (Sigma) en frío y se congeló a -80 °C hasta su uso. Dicho precipitado fue descongelado (sobre hielo picado) y resuspendido en 200 μl de solución de lisis A (con lisozima a 1 mg/ml), incubado 30 minutos a 37 °C e inmediatamente enfriado en hielo. Se añadieron 800 μl de solución de lisis B con cocktail inhibidor de proteasas *cOmplete™*, *EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets* de Roche. 300 μl de la muestra lisada se sonicaron durante 12 ciclos (30 segundos de sonicación y 30

segundos de descanso) en un *Bioruptor®Plus UCD-300* de Diagenode para obtener fragmentos de DNA de un tamaño de ~0,5 Kb. La muestra se centrifugó 5 minutos a 13.000 rpm, el sobrenadante fue transferido a un tubo limpio que se centrifugó nuevamente 5 minutos a 13.000 rpm. Del sobrenadante obtenido de esta última centrifugación, se tomaron 20 µl como muestra sin inmunoprecipitar o “input” y el resto (~280 µl) se añadió a 30 µl de bolitas magnéticas *Dynabeads® Protein A* de Life Technologies sobre las que previamente había sido inmovilizado el anticuerpo contra la proteína de interés: para proteínas etiquetadas con el epítipo FLAG se utilizó el anticuerpo monoclonal ANTI-FLAG® M2 (F3165) de Sigma-Aldrich, para la subunidad β de la RNAP el anticuerpo monoclonal (8RB13) de ThermoFisher, para la subunidad σ^{70}/σ^A de la RNAP el anticuerpo monoclonal (2G10) de ThermoFisher. Para la inmovilización del anticuerpo, 30 µl de bolitas magnéticas se lavaron dos veces con 1 ml de PBS + 5 mg/ml de BSA, tras lo cual se resuspendieron (PBS + BSA) en el volumen inicial de 30 µl y se incubaron con 2,5 µl de anticuerpo durante 4 horas a 4 °C en rotación. Antes de ser añadidas a la muestra, se lavaron nuevamente dos veces con 1 ml de PBS + 5 mg/ml de BSA y se resuspendieron en el volumen inicial. La muestra junto al anticuerpo inmovilizado a las bolitas fue incubada toda la noche a 4 °C rotando. Las bolitas fueron entonces lavadas dos veces con 1 ml de solución de lisis B, dos veces con 1 ml de solución de lisis B con 0,5 mM NaCl, dos veces con 1 ml de solución de lavado, y un último lavado con 1 ml de TE. Las bolitas se resuspendieron en 60 µl de TE + 1% SDS y se incubaron 10 minutos a 65 °C para liberar la muestra de las bolitas. Se tomaron 40 µl que contenían el DNA unido a la proteína/s de interés y se les añadió 40 µl de TE + 1% SDS y 2,4 µl de proteinasa K (20 µg/ µl). Esta mezcla fue incubada a 42 °C durante 2 horas con el objetivo de degradar las proteínas unidas al DNA y que dificultarían los análisis posteriores, seguido de 65 °C durante 6 horas para eliminar el entrecruzamiento del DNA (consigo mismo y con las proteínas que no hayan sido degradadas por el tratamiento anterior). Por último, el DNA fue aislado con el kit *High Pure™ PCR Product Amplification* (Roche). El mismo proceso se llevó a cabo para el “input”. El DNA fue cuantificado mediante PCR cuantitativa (qPCR) a partir de curvas patrón realizadas con diluciones seriadas del “input” y cebadores que amplifican las regiones de interés. El enriquecimiento para cada promotor fue expresado como el ratio entre la cantidad de DNA para un promotor determinado y la cantidad para una región intragénica (control negativo) en relación a la cantidad de DNA inicial representada por la cantidad de DNA del “input”.

II.21 Observación de células al microscopio óptico

A 100 μ l del cultivo de la estirpe de *C. crescentus* de interés a $D.O_{660}=0,3-0,8$ crecidas según las condiciones de estudio (con o sin vanilato, a 30 °C o a 25 °C), se le añadió el colorante fluorescente 4'-6-diamino-2-fenilindol (DAPI, excitación máxima a 350 nm y emisión máxima a 461 nm) hasta una concentración final de 1 ng/ μ l para teñir el DNA. La observación microscópica se realizó con una muestra de 1-5 μ l de dicha suspensión celular inmovilizada en una fina capa de agarosa al 1 % (Pronadisa) preparada en medio M2. Las imágenes fueron obtenidas con una cámara digital Hamamatsu ORCA-ER, usando un microscopio Nikon Eclipse 80i equipado con un objetivo 100X Nikon Plan Apo VC DIC (*Differential Interference Contrast*). Las mejores imágenes fueron procesadas con MetaMorph 4.5 (Universal Imaging Group) y con Photoshop 6.0 (Adobe Systems)

III. RESULTADOS

III.1 Análisis de la estructura-función de CdnL de *M. xanthus*

(El material incluido en este apartado deriva del artículo publicado en PLoS One. October 2014, Volume 9, Issue 10, e108946; y del artículo publicado en *Journal of Biomolecular NMR*. August 2012, Volume 53, Issue 4, pp 355-363. Los estudios estructurales se realizaron en colaboración con la Dra. María Ángeles Jiménez López y su estudiante de doctorado Yasmina Mirassou del grupo de RMN en el Departamento Química Física Biológica, Instituto de Química-Física “Rocasolano”, CSIC, Madrid).

Tal como se comentó en la Introducción, el trabajo realizado con *M. xanthus* en el laboratorio en el que se ha llevado a cabo esta tesis había determinado que, pese a carecer de un dominio de unión al DNA, CdnL se localiza asociado al DNA cromosómico, probablemente por medio de su interacción con la RNAP (García-Moreno, 2009; García-Moreno *et al.*, 2010). Además, mediante el uso de un sistema de expresión condicional (activado por luz y reprimido por B₁₂) se pudo demostrar que CdnL es una proteína esencial necesaria para la viabilidad celular, y que su ausencia provoca defectos en el crecimiento y una morfología celular mucho más alargada de lo normal (García-Moreno *et al.*, 2010; García-Moreno *et al.*, 2009). Esta asociación indirecta con el DNA, su interacción con la RNAP, y el fenotipo aberrante asociado a su ausencia, sugerían que la función esencial de CdnL debía estar relacionada con la transcripción, afectando de manera directa o indirecta a la división celular. Por otra parte, se había observado que aunque el dominio N-terminal de CarD (CarDNt) y CdnL son similares e interaccionan con el mismo subdominio de la subunidad β de la polimerasa de RNA (β RNAP), CarDNt no puede reemplazar funcionalmente a CdnL (García-Moreno *et al.*, 2010).

Aunque existen homólogos de CdnL en muchas especies bacterianas, son muy pocas aquellas en las que se ha abordado el estudio de su función. Previo a esta tesis, y en paralelo a los datos obtenidos sobre CdnL en *M. xanthus* por nuestro grupo de investigación, otro trabajo demostró que la proteína homóloga de *Mycobacterium tuberculosis* (MtCdnL) es también esencial (Stallings *et al.*, 2009). En dicho trabajo se concluyó además que MtCdnL actuaba reprimiendo la expresión de los promotores ribosómicos durante la respuesta general al estrés nutricional o “stringent response”. En *E. coli*, que carece de CdnL y en la que se ha estudiado ampliamente la “stringent response”, este papel lo ejerce la proteína DksA. Puesto que *M. tuberculosis* carece de

DksA, se propuso que MtCdnL y las proteínas homólogas en general estarían implicadas en la “stringent response”, actuando de forma similar a como lo hace DksA. Esta propuesta entraba en contradicción con la observación en nuestro laboratorio de que en *M. xanthus*, que presenta tanto CdnL como DksA, ambas proteínas son esenciales para la viabilidad celular (Abellán-Martínez, 2006; García-Moreno *et al.*, 2010; García-Moreno *et al.*, 2009), lo que indicaba que, al menos en este organismo, no ejercen la misma función. Posteriormente, y durante el transcurso de esta tesis, el mismo grupo implicado en el trabajo con *M. tuberculosis* atribuyó a MtCdnL un papel en la activación de los promotores de los rRNAs (Srivastava *et al.*, 2013), contrario al propuesto originalmente.

El objetivo de esta tesis ha sido continuar con el trabajo sobre CdnL de *M. xanthus* iniciado en nuestro grupo de investigación para profundizar en su modo de acción, e investigar su posible implicación en la regulación de los rRNA.

III.1.1 Arquitectura de dominios de CdnL e interacciones

Los programas informáticos predicen estructuras secundarias similares para CdnL y TtCdnL (el homólogo de CdnL en *Thermus thermophilus*), con una parte

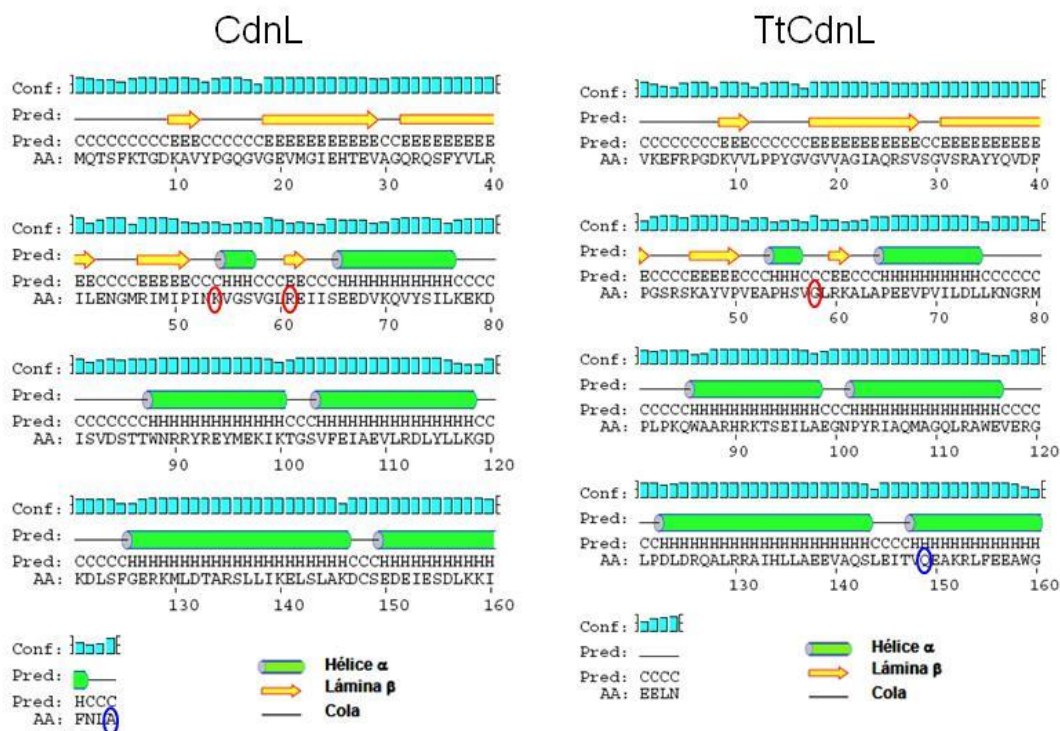


Figura 24. Predicción de la estructura secundaria de CdnL y TtCdnL usando PSIPRED Protein Structure Prediction, y dominios proteicos. El primer residuo del dominio C-terminal estable a proteólisis se indica rodeado por una línea roja (en CdnL se identificaron dos posibles sitios) y el último rodeado por una línea azul.

N-terminal de unos 60 residuos formada por cinco láminas β y una pequeña hélice, y una parte C-terminal formada por cinco hélices α (Figura 24). En consonancia con la similitud entre las dos proteínas homólogas, los ensayos de proteólisis limitada produjeron en ambos casos un segmento estable correspondiente a los ~100-110 residuos del segmento C-terminal o Ct (Figuras 24, 25A; (García-Moreno, 2009)). Estos resultados sugieren una estructura terciaria de la región Ct en CdnL y TtCdnL más compacta que la de su región N-terminal. En comparación, los estudios previos con CarD no mostraron ningún dominio estable equivalente a aquellos en CdnL o TtCdnL (Padmanabhan *et al.*, 2001), lo que apunta a que CdnL y CarDNT podrían adoptar estructuras distintas.

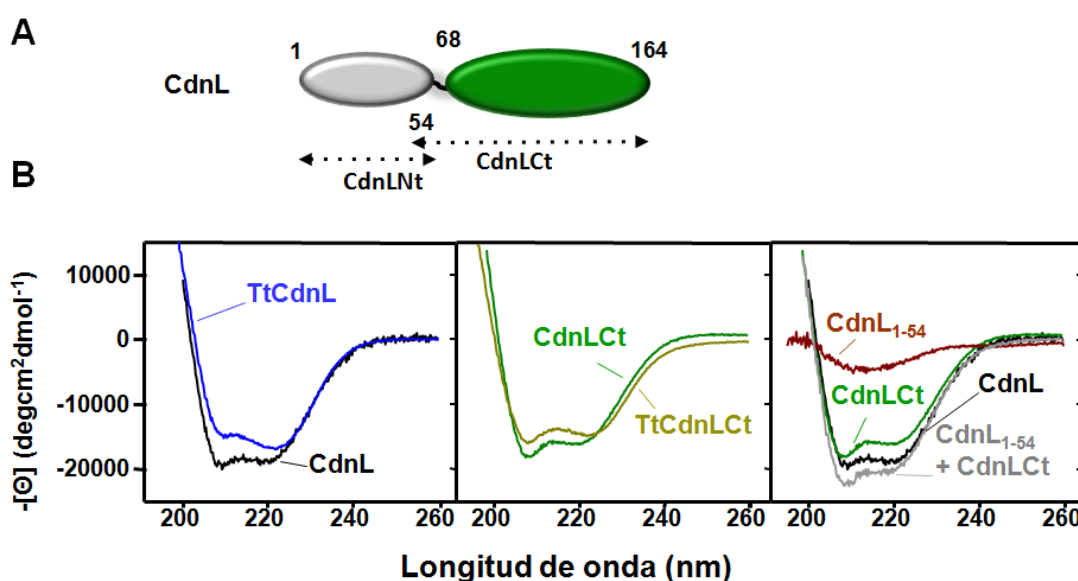


Figura 25. Análisis de dominios de CdnL. A) Arquitectura de dominios de CdnL. **B)** Análisis de la estructura secundaria mediante dicromismo circular de CdnL, y TtCdnL, y sus fragmentos. El descenso de la señal entorno a 220 nm es proporcional a la cantidad de hélices α en la estructura global de la molécula.

El análisis mediante dicromismo circular (DC) reveló un contenido en hélices similar para CdnL (50 %) y TtCdnL (45 %), y para CdnLCt (43 %) y TtCdnLCt (38%) (Figura 25B). Además, el espectro obtenido mediante DC de CdnL coincide con la suma de aquellos obtenidos para CdnLCt y CdnL₁₋₅₄ (región N-terminal susceptible a proteólisis). En conjunto, los datos obtenidos mediante proteólisis limitada así como mediante DC indican que CdnL y TtCdnL poseen estructuras secundarias similares, y que las láminas β y las hélices α predichas corresponderían, respectivamente, a la región N-terminal susceptible a proteólisis y a la región C-terminal resistente a proteólisis. No obstante, a pesar de la similitud de secuencia y de estructura secun-

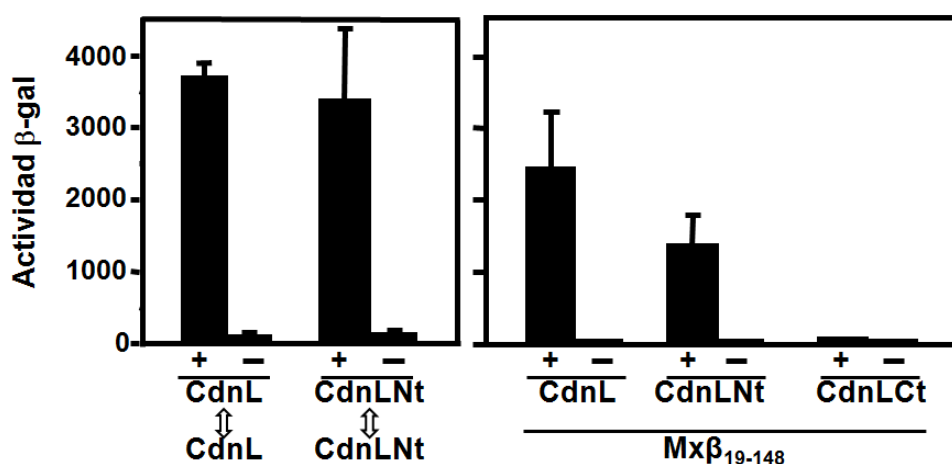


Figura 26. Análisis cuantitativo de la interacción de CdnL, o sus dominios, consigo mismo y con la RNAP. La estirpe BTH101 de *E. coli* fue transformada con plásmidos derivados de pKT25 y pUT18 portadores del gen *cdnL* o de la secuencia que codifica CdnLNt (panel de la izquierda); o con pUT18C con la secuencia que codifica Mxβ₁₉₋₁₄₈ y pKT25 con *cdnL* o los fragmentos indicados (panel de la derecha). Como control negativo se usó pKT25 sin inserto ("–").

daria, TtCdnL es incapaz de complementar la falta de CdnL en *M. xanthus* (García-Moreno *et al.*, 2010)

Datos previos parecían indicar la existencia de monómeros y dímeros de CdnL en solución (Mirassou *et al.*, 2013; Mirassou *et al.*, 2009). Esta interacción de CdnL consigo mismo se observó también en los ensayos de doble híbrido bacteriano (DHB) (Figura 26). Este comportamiento de CdnL complicó el análisis por RMN (resonancia magnética nuclear) de la proteína completa por lo que se examinaron sus dominios por separado. En un primer intento se utilizó como dominio N-terminal la región susceptible a proteólisis, que comprende los residuos 1-54, pero su baja expresión y la mala calidad de los espectros de RMN nos llevó a analizar un fragmento algo más largo (residuos 1-68) que sí mostró un buen comportamiento y al que, de aquí en adelante, nos referiremos como CdnLNt. El análisis mediante exclusión de tamaño de CdnLNt reveló un peso molecular aparente de 12±1 kDa, mayor que el calculado para el monómero (7,8 kDa), lo que sugería que este dominio N-terminal interacciona consigo mismo. El análisis mediante DHB confirmó dicha interacción (Figura 26) y, además, permitió demostrar que dicho segmento, y no CdnLCt, interacciona con la región de la βRNAP comprendida entre el residuo 19 y el 148 (Mxβ₁₉₋₁₄₈) (Figura 26). Por lo tanto, CdnLNt media tanto la interacción de CdnL consigo mismo como con la βRNAP.

III.1.2 Estructura tridimensional de CdnL determinada por RMN

Se determinó la estructura de CdnLNt y CdnLCt por separado mediante RMN, y los datos obtenidos de ambos dominios se usaron para facilitar el análisis de la proteína completa (Figura 27; para los detalles sobre los datos de RMN pueden consultarse las referencias (Gallego-García *et al.*, 2012; Gallego-García *et al.*, 2014)).

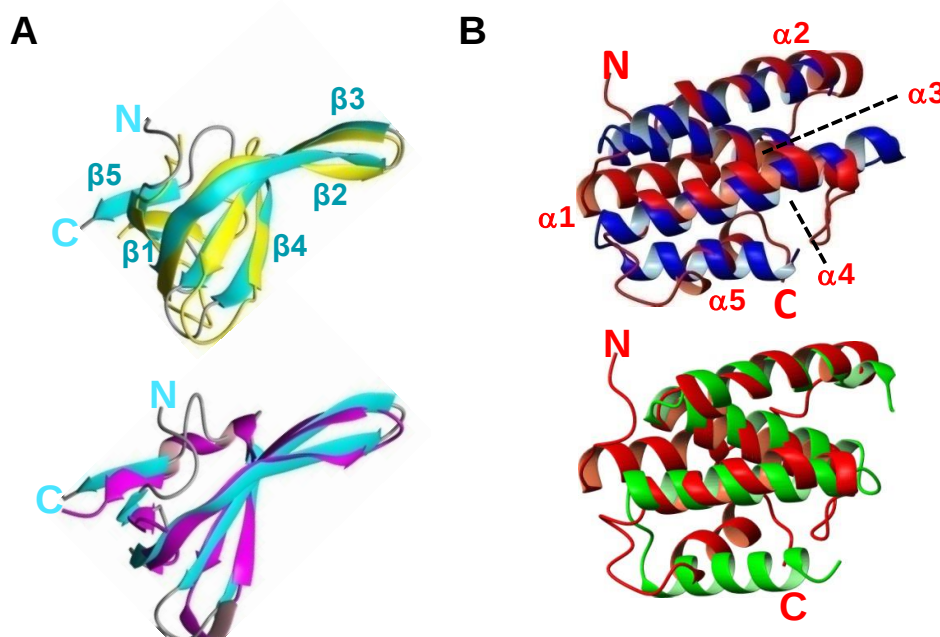


Figura 27. Estructura de los dominios de CdnL y comparación con homólogos estructurales. **A)** Superposición del esqueleto de CdnLNt (azul) con: (arriba) TtCdnLNt (dorado); (abajo) EcTRCF-RID (magenta). **B)** Superposición del esqueleto de CdnLCt (rojo) con el dominio TPR de: (arriba) la proteína de unión a FK506 (azul); (abajo) CadC_{pd} (verde). Las estructuras fueron generadas con MOLMOL.

III.1.2.1 El dominio N-terminal de CdnL

CdnLNt adopta una estructura tipo Tudor, de sándwich β retorcido, que contiene cinco láminas β antiparalelas, $\beta 5$ - $\beta 1$ - $\beta 2$ - $\beta 3$ - $\beta 4$, con una hélice 3_{10} entre $\beta 4$ y $\beta 5$ (Figuras 27A, 28), muy similar a la estructura del dominio N-terminal de TtCdnLNt determinada en paralelo por RMN (Figura 27A). Dichas estructuras se asemejan mucho a la determinada previamente para el dominio RID de interacción con la RNAP de los factores TRCF (Figura 27A; Arkov & Ramos, 2010; Ponting, 1997; Westblade *et al.*, 2010), y a las del dominio correspondiente en las estructuras de TtCdnL y MtCdnL determinadas por cristalografía durante el desarrollo de esta tesis (Gallego-García *et al.*, 2012; Gallego-García *et al.*, 2014; Gulten & Sacchettini, 2013; Srivastava *et al.*, 2013).

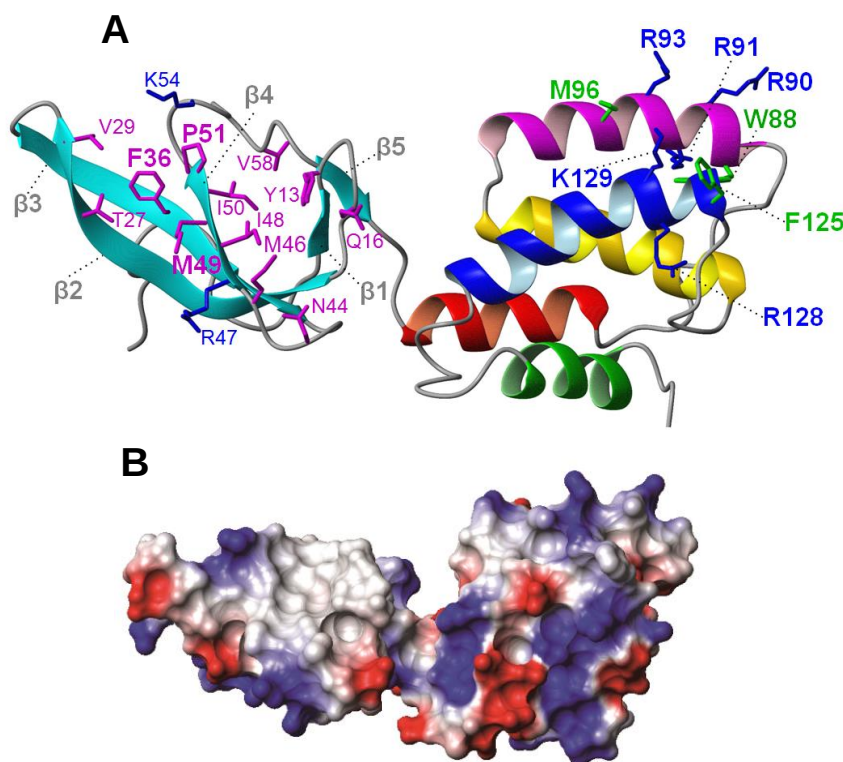


Figura 28. Estructura de CdnL. (A) Diagrama de cintas para la estructura promedio de la proteína. Se muestran las cadenas laterales de los residuos en el dominio N-terminal que interactúan con la β RNAP, y los residuos que forman la superficie básica-hidrofóbica en el dominio C-terminal. Los residuos marcados en mayor tamaño y en negrita fueron analizados mediante mutagénesis dirigida en este estudio. Las láminas β están coloreadas en celeste, y las cinco hélices α en rojo (α 1), magenta (α 2), amarillo (α 3), azul (α 4), y en verde (α 5). (B) Representación de las superficies electrostáticas.

III.1.2.2 El dominio C-terminal de CdnL

La estructura de CdnLCt es compacta, con cinco hélices α (que abarcan los residuos 66-76, 85-98, 104-118, 126-146, y 151-160, numerados como en la proteína nativa) en disposición antiparalela (Figuras 27B, 28). Además de las interacciones características de las hélices α , se pudieron detectar varias interacciones de tipo puente salino (E66–K70 en α 1; R91–E94, E97–K100 en α 2; E109–R112 en α 3; K146–E150 en α 4; D156–K159 en α 5). La hélice α 3 se encuentra prácticamente en su totalidad sepultada, y solamente el residuo 118 es accesible al solvente. Una de las caras de α 3 está empaquetada contra la horquilla helicoidal formada por α 1- α 2, y la otra contra α 4- α 5. Una serie de residuos conservados con grupos no polares como cadena lateral forman una “cremallera de leucina” interna en el segmento α 3- α 4, descrita en primer lugar en la secuencia de CarD (Nicolás *et al.*, 1996; Padmanabhan *et al.*, 2001), y que actualmente se sabe que participa en las interacciones entre hélices para su

empaquetamiento (Gulten & Sacchettini, 2013). Una característica estructural llamativa del dominio CdnLCt, globalmente ácido (pI teórica= 4.99), es una superficie expuesta al solvente formada por residuos no polares (W88, Y92, M96, y F125) rodeada de residuos básicos (Figura 28).

La búsqueda de homólogos estructurales mediante el programa DALI, además de encontrar como “hits” las estructuras de TtCdnL y MtCdnL mencionadas, asocia la estructura de CdnLCt con el módulo TPR (del inglés tetratricopeptide repeat) de la proteína de unión a FK506, FKBP51 (Z-score=5.3; rmsd=3.4 Å, 82 residuos alineados, 12% de identidad de secuencia) (Sinars *et al.*, 2003). La proteína procariota más similar fue CadC_{pd} de *E. coli* (Z-score=4.6; rmsd=5.8 Å, 74 residuos alineados, 5% de identidad de secuencia). Las hélices $\alpha 2$ - $\alpha 4$ de CdnLCt se superponen a las hélices $\alpha 2$ - $\alpha 4$ de las seis hélices del dominio TPR de FKBP51 y a $\alpha 4$ - $\alpha 6$ de las 11 hélices de CadC_{pd} (Figura 27B). Típicamente, los dominios TPR median la interacción proteína-proteína, estando constituidos por entre 3 y 16 repeticiones en tándem (aunque se han descrito ejemplos con sólo una o dos en tándem, o incluso con repeticiones dispersas) de un motivo estructural de unos 34 residuos, con una secuencia degenerada, que forma dos hélices α antiparalelas, de una longitud de 12-15 residuos, cruzadas entre sí formando un ángulo $\sim 24^\circ$ y conectadas por un giro (Blatch & Lassle, 1999; D'Andrea & Regan, 2003; Zeytuni & Zarivach, 2012).

III.1.2.3 Comparación de la estructura de CdnL determinada por RMN con la de sus homólogos TtCdnL y MtCdnL determinadas por cristalografía

Como se ha comentado, las estructuras de los dominios aislados de CdnL determinadas por RMN se asemejan bastante a las de los dominios correspondientes en las estructuras determinadas por cristalografía de TtCdnL (Srivastava *et al.*, 2013), y de MtCdnL en forma de dímero (Kaur *et al.*, 2014) o en complejo 1:1 con la β RNAP (Gulten & Sacchettini, 2013). Sin embargo, cuando se comparan las estructuras de las proteínas homólogas completas la coincidencia es menor (rmsd ≥ 8 Å), incluso para las dos formas de MtCdnL publicadas, ya que los dos dominios en cada estructura adoptan orientaciones relativas distintas (Figura 29). Esta discrepancia podría deberse a que la unión entre ambos dominios es flexible, consistente con la estructura de CdnL determinada por nuestro grupo de investigación y la estructura de MtCdnL (Gulten & Sacchettini, 2013; Kaur *et al.*, 2014), y en contraposición a la orientación fija entre ambos subdominios propuesta para TtCdnL (Srivastava *et al.*, 2013). Nuestra observación de que CdnL interacciona consigo mismo vía CdnLNt se ve reflejada en la

observación de una forma dimérica de MtCdnL, que se produce por el intercambio de la lámina $\beta 1$ del dominio N-terminal (Kaur *et al.*, 2014). Sin embargo, curiosamente, MtCdnL aparece como un monómero en el complejo con la β RNAP (Gulten & Sacchettini, 2013). Un rasgo llamativo común a todas las estructuras es la superficie no polar mencionada anteriormente, que se encuentra expuesta al solvente.

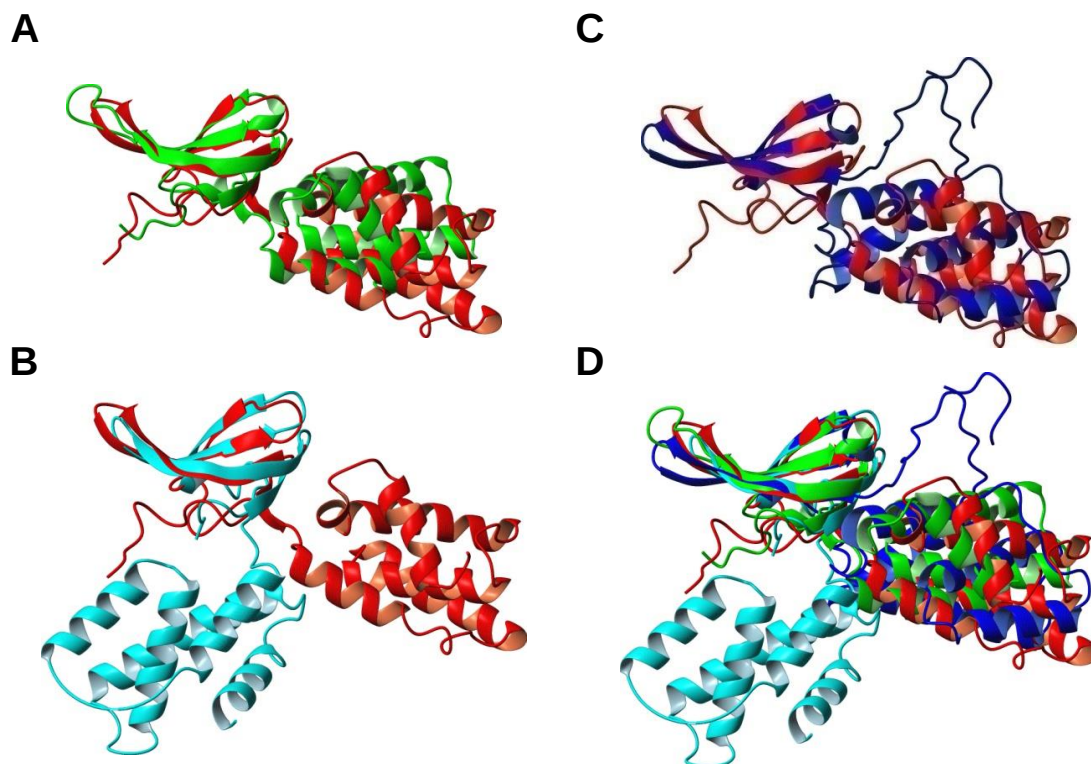


Figura 29. Comparación de las estructuras de CdnL, TtCdnL y MtCdnL. Superposición del esqueleto de CdnL determinado por RMN (rojo) con las estructuras cristalizadas de: **A)** TtCdnL (verde); **B)** una unidad del dímero en intercambio de MtCdnL (celeste); **C)** MtCdnL en complejo con la β RNAP (azul); **D)** las cuatro estructuras. La superposición generada fue optimizada para el dominio N-terminal de cada estructura.

III.1.3 Conservación de los contactos proteína-proteína entre CdnL y la β RNAP

Dado que en *M. xanthus* TRCF, CarDnt y CdnL interaccionan con el mismo dominio de la subunidad β de la RNAP (García-Moreno *et al.*, 2010), entender los detalles moleculares de estas interacciones podría proporcionar una idea de las relaciones existentes entre ellos y de sus diferencias funcionales. Asimismo, su estudio en otras especies permitiría establecer el grado de conservación de dichos contactos.

III.1.3.1 Interacción CdnL- β RNAP en *T. thermophilus*

TtCdnLNt y el dominio RID de los factores TRCF presentan un alto grado de similitud estructural (Figura 30). Además, las cadenas laterales de los residuos de TRCF-RID que interaccionan con β RNAP (en el complejo entre ambas proteínas) y los residuos equivalentes de TtCdnLNt presentan una disposición similar cuando se superponen ambas estructuras (Figura 30B).

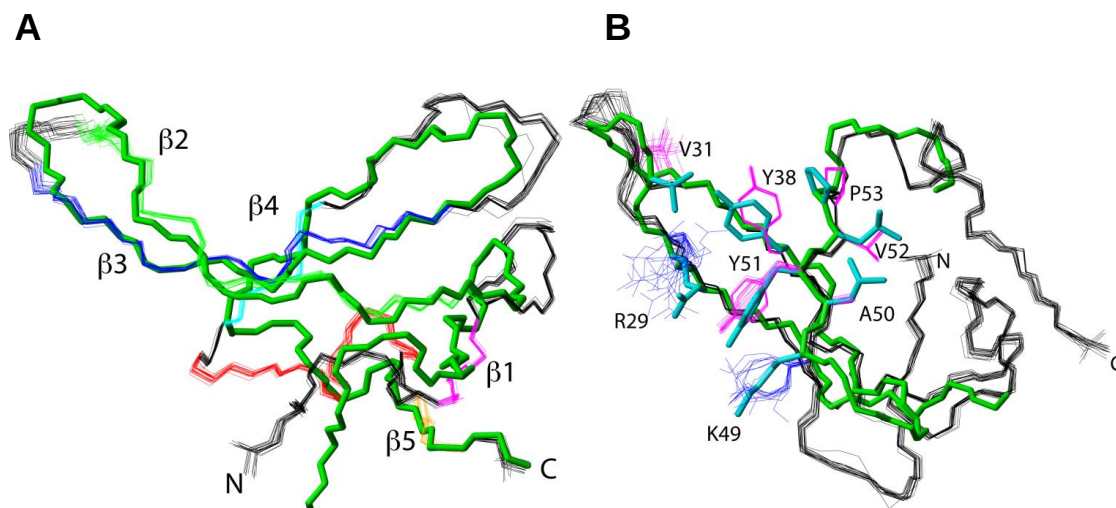


Figura 30. Comparación de TtCdnLNt con el dominio RID de factores TRCF. **A)** Superposición de la estructura de TtCdnLNt con la estructura cristalizada de TRCF-RID de *E. coli* (en verde). **B)** Superposición de la estructura de TtCdnLNt con la estructura cristalizada de TRCF-RID de *T. thermophilus* en complejo con β RNAP (en verde); las cadenas laterales de los residuos que interaccionan con la β RNAP se muestran en azul. Los residuos que ocupan posiciones equivalentes en TtCdnLNt se representan en celeste si tienen carga positiva (R29, K49) o en magenta si no tienen carga (Y38, V31, A50, Y51, V52, P53).

Por ello, nos propusimos analizar si las regiones específicas de contacto entre TRCF-RID y la RNAP estaban conservadas en la interacción entre TtCdnL y la RNAP. Se había observado previamente, en experimentos de DHB realizados en nuestro laboratorio y otros trabajos (Stallings *et al.*, 2009), que la versión silvestre de TtCdnLNt interacciona con el fragmento de la β RNAP que abarca los residuos 11-133 (Tt β_{11-133}). Mediante DHB se analizó la interacción de Tt β_{11-133} con versiones de TtCdnLNt en las que los residuos Y38, Y51 y P53 habían sido mutados a Ala. Estos tres residuos fueron elegidos por ser equivalentes, respectivamente, a los residuos Y350, Y362 y P364 de TtTRCF-RID (Figura 32) que contactan con la β RNAP según la estructura del complejo (Westblade *et al.*, 2010). Además, las cadenas laterales de Y38 y de Y51 (no polares/aromáticas), y la de P53, se encuentran bastante expuestas al solvente (ASA de 42, 45 y 38%, respectivamente, comparado con 42, 44 y 54% de los residuos Y350,

Y362 y P364, en TtTRCF-RID), como se espera de residuos implicados en establecer contactos proteína-proteína. Por ello, es improbable que contribuyan al mantenimiento de la estructura de TtCdnLNt y que su mutación a Ala altere la estabilidad de la proteína o su plegamiento. Como puede verse en la Figura 31, la interacción de las tres versiones mutadas de TtCdnLNt se vió afectada negativamente, siendo prácticamente indetectable para las mutaciones Y38A e Y51A. Estos datos indican que la superficie y los residuos empleados por TtCdnLNt para contactar con la β RNAP son equivalentes a aquellos en TtTRCF-RID.

Entre los residuos de Tt β_{11-133} que contactan con TtTRCF-RID se incluyen los residuos L107, I108, K109, y E110, muy conservados entre las β RNAP (Figura 34A). Dichos residuos pueden ser sustituidos por una Ala dando lugar a una versión mutada estable y correctamente plegada (Deaconescu *et al.*, 2006; Westblade *et al.*, 2010). Por tanto, se analizó mediante DHB, la interacción de TtCdnLNt silvestre con las siguientes versiones mutadas de Tt β_{11-133} : L107A, I108A, K109A, y E110A (Figura 31). Todas las versiones mutadas de Tt β_{11-133} , con la excepción de K109A, provocaron una reducción significativa de la interacción con TtCdnLNt. En el complejo formado por TRCFRID/ β RNAP, K109 está implicado en contactos de tipo van der Waal's pero no en puentes de hidrógeno o interacciones de carga (Deaconescu *et al.*, 2006; Westblade *et al.*, 2010), por lo que probablemente su cambio a Ala no provoque ninguna alteración en dicho tipo de contactos. En conjunto, estos datos sugieren que la misma superficie y residuos equivalentes en TtCdnLNt y TtTRCF-RID interaccionan con la misma región de la β RNAP de *T. thermophilus*.

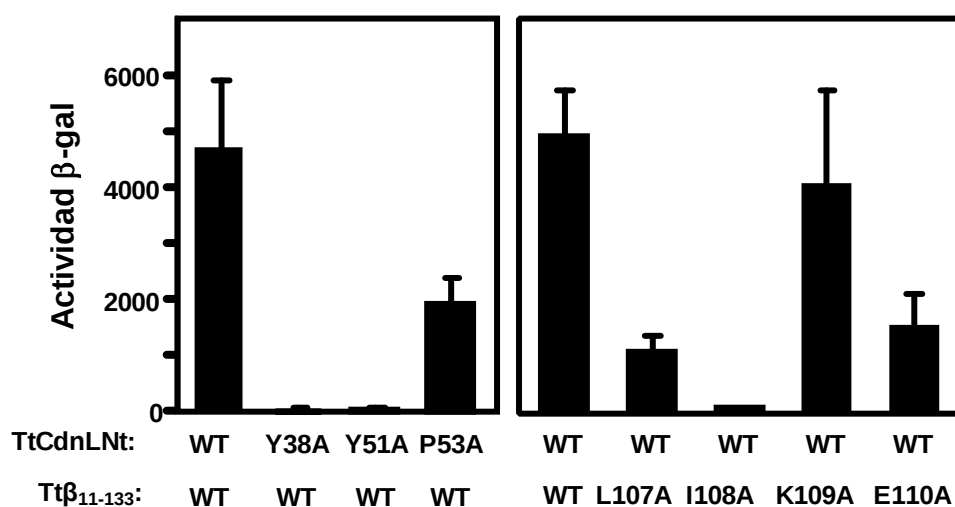


Figura 31. Análisis de la interacción entre las proteínas CdnL y β RNAP de *Thermus thermophilus* mediante el sistema del doble-híbrido. Efecto de las mutaciones en TtCdnLNt en la interacción con la versión silvestre de Tt β_{11-133} (panel de la izquierda). Efecto de las mutaciones en Tt β_{11-133} en la interacción con la versión silvestre de TtCdnLNt (panel de la derecha).

III.1.3.2 Interacción CdnL- β RNAP en *M. xanthus*

Se había demostrado previamente, mediante DHB, que la proteína CdnL completa interacciona con el fragmento Mx β_{19-148} de la β RNAP (García-Moreno *et al.*, 2010). En este trabajo se ha demostrado que dicha interacción ocurre a través del dominio N-terminal de CdnL (Figura 26). Dado que CdnLNt presenta una estructura muy similar a TtCdnLNt y TtTRCF-RID investigamos si en la interacción entre CdnLNt y Mx β_{19-148} participan residuos equivalentes a los descritos para las interacciones entre TtCdnLNt o TtTRCF-RID y la β RNAP correspondiente. Para ello, se mutaron a Ala los residuos

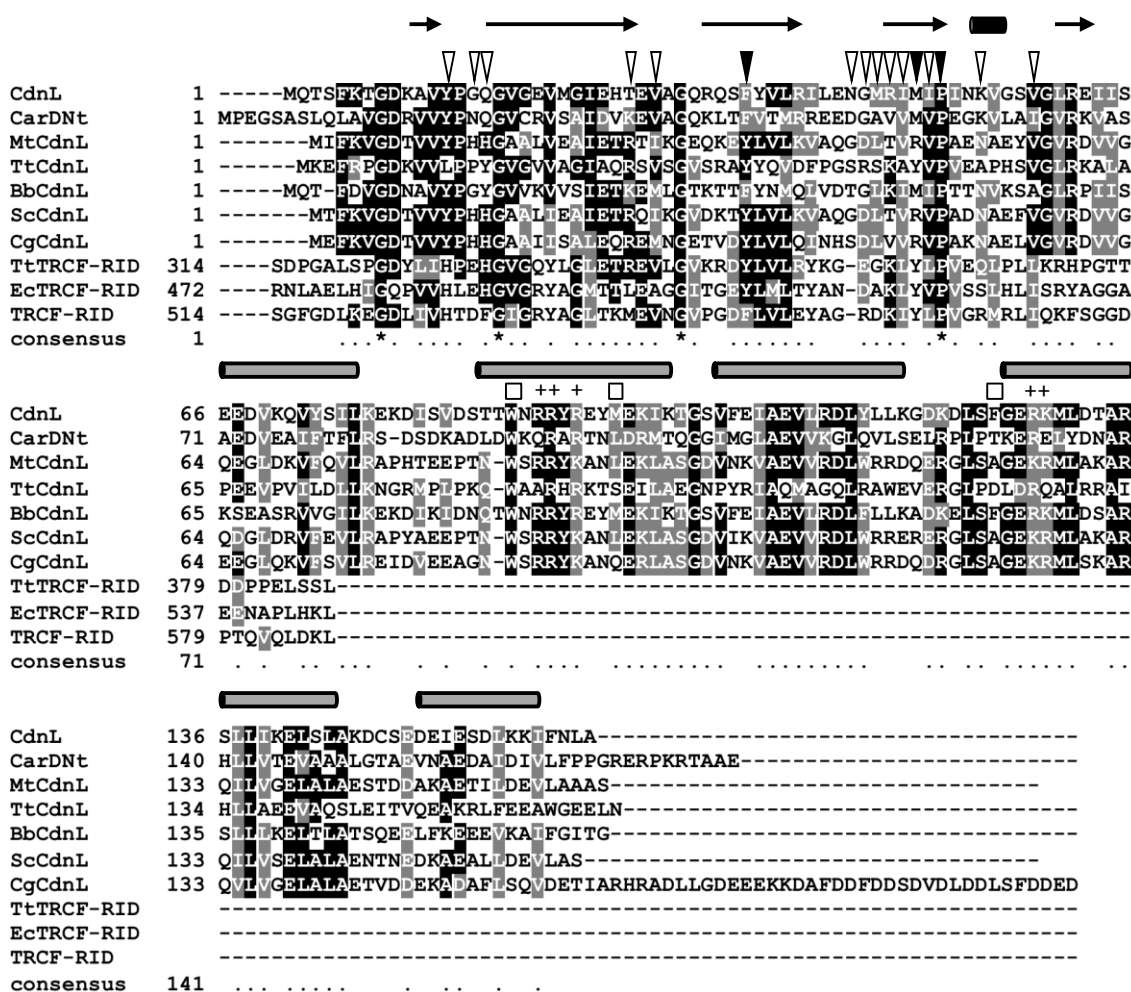


Figura 32. Alineamiento de secuencia de CdnL y varias proteínas o dominios proteicos homólogos. Los prefijos Mt, Tt, Bb, Sc, y Ec hacen referencia a las proteínas de *M. tuberculosis*, *T. thermophilus*, *B. bacteriovorus*, *S. coelicolor*, *C. glutamicum*, y *E. coli*; las proteínas sin prefijos corresponden a *M. xanthus*. Los residuos están sombreados en negro si son idénticos o en gris si son similares en la mayoría de las secuencias. Los asteriscos en la línea consenso inferior indican secuencias conservadas en todas las alineaciones. Las puntas de flecha marcan los residuos que contactan con la β RNAP según las estructuras de TtTRCF-RID o MtCdnL. Las puntas de flecha negras, los cuadrados blancos y "+" marcan residuos de CdnL que han sido analizados mediante mutagénesis dirigida en esta tesis. Los elementos de la estructura secundaria de CdnL determinados por RMN se muestran sobre la secuencia (flechas: láminas β ; varillas grises: hélices α ; pequeña varilla negra: hélice 3_{10}).

F36, M49 y P51, equivalentes a los tres residuos que contactan con la β RNAP mutados en TtCdnLNt (Figura 32). En la estructura de CdnL los tres residuos están expuestos al solvente ($ASA \geq 28\%$; Figura 33A) por lo que, dado su carácter no polar, sería energéticamente favorable ocultar sus cadenas laterales mediante la formación de complejos. En el análisis mediante DHB, los mutantes de CdnL fueron capaces de interactuar consigo mismos, indicando que se expresan de manera estable y se pliegan correctamente (Figura 33B). Sin embargo, como ocurrió previamente con las mutaciones equivalentes en TtCdnL, todos ellos se mostraron alterados en la interacción con Mx β_{19-148} (Figura 33C).

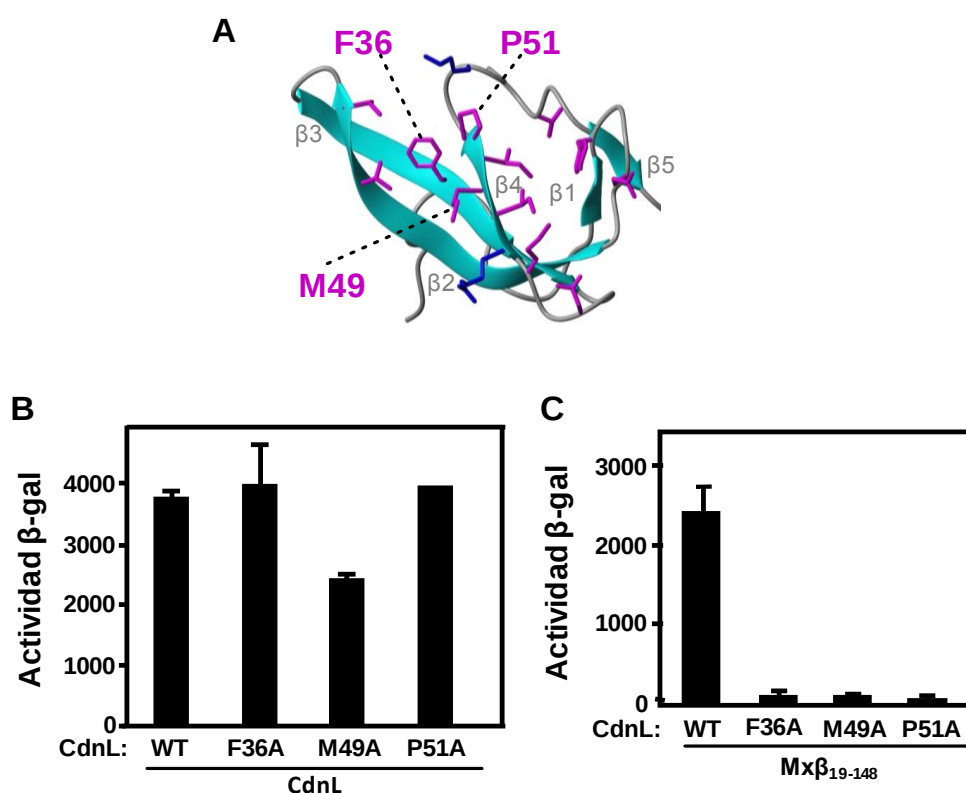


Figura 33. Efecto de mutaciones en CdnL sobre la interacción con β RNAP. A) Estructura de CdnLNt en la que se muestran los residuos cuyas cadenas laterales podrían contactar con la β RNAP, resaltando los tres residuos mutados. B) DHB en el que se muestra que las versiones mutadas de CdnL (F36A, M49A, P51A) interactúan consigo mismas; la estirpe BTH101 se transformó con pKT25 y pUT18 que portan la versión silvestre (WT) o mutada de *cdnL*. C) Análisis mediante DHB de la interacción de CdnL F36A, M49A, o P51A (en pKT25) con Mx β_{19-148} (en pUT18C).

Por otro lado, para comprobar si los residuos de β RNAP implicados en la interacción con CdnL coinciden con aquellos observados para la interacción entre β RNAP y TtCdnL, se mutaron a Ala cada uno de los residuos conservados del segmento D122-V123-K124-E125 de Mx β_{19-148} , equivalentes a los mutados en Tt β_{11-133}

(Figura 34A). El análisis mediante DHB indicó que las mutaciones V123A o E125A, pero no D122A o K124A, reducen significativamente la interacción con CdnL (Figura 34B). El análisis por DHB de la interacción de TRCF-RID de *M. xanthus* con dichas versiones mutadas de Mx β_{19-148} produjo resultados muy similares, lo que indica que TRCF-RID contacta con la misma región de la β RNAP que CdnL (Figura 34C). De los cuatro residuos analizados en β RNAP, la mutación de dos de ellos (V123 y E125 en Mx β_{19-148} ; I108 y E110 en Tt β_{11-133} ; I147 y S149 en Mt β_{19-148} , (Weiss *et al.*, 2012)) afecta significativamente a la interacción con CdnL en todos los casos estudiados. En conjunto, los resultados sugieren que, más allá de las variaciones específicas de especie en algunos contactos, la interacción entre CdnL y la β RNAP está mediada por segmentos y superficies conservadas.

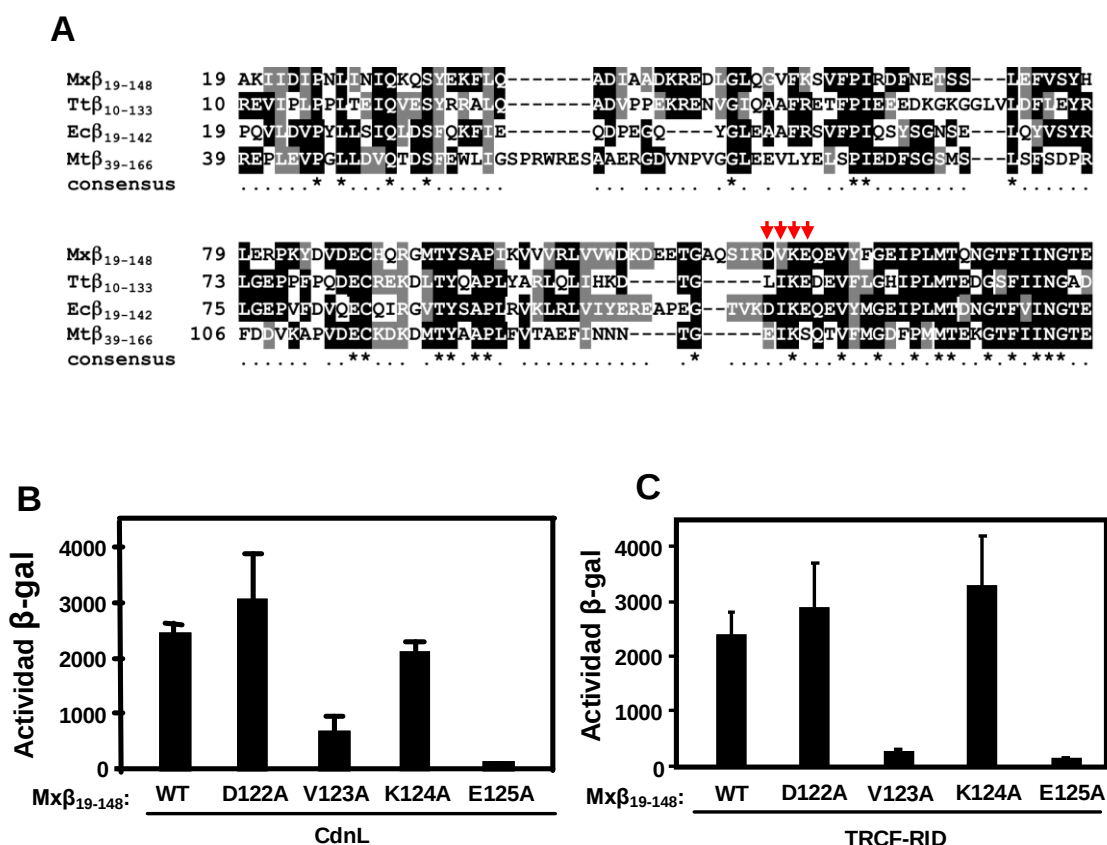


Figura 34. Efecto de mutaciones en β RNAP sobre la interacción con CdnL o TRCF-RID. **A)** Alineamiento de secuencia del segmento de la β RNAP de *M. xanthus*, Mx β_{19-148} , y sus equivalentes en *T. thermophilus*, Tt β_{10-133} , en *E. coli*, Ec β_{19-142} , y en *M. tuberculosis*, Mt β_{39-166} . Los residuos están sombreados en negro si son idénticos, o en gris si son similares, en al menos dos de las secuencias alineadas. Los asteriscos en la línea consenso inferior indican residuos idénticos en las cuatro alineaciones. Las flechas rojas marcan los residuos de β RNAP analizados por mutagénesis dirigida en esta tesis. **B)** Análisis mediante DHB de la interacción de Mx β_{19-148} (WT) o sus versiones mutadas (en pUT18C) con la versión silvestre de CdnL (en pKT25). **C)** Análisis mediante DHB de la interacción de Mx β_{19-148} (WT) o sus versiones mutadas (en pUT18C) con la versión silvestre de TRCF-RID (residuos 514-645) de *M. xanthus* (en pKT25).

III.1.4 Efecto de la pérdida de la interacción CdnL-RNAP *in vivo* en *M. xanthus*

Una vez identificados ciertos residuos de CdnL implicados en la interacción con la β RNAP, se estudió si la falta de interacción con la RNAP afectaba a la función esencial de CdnL en *M. xanthus*. Para ello, se recurrió a la misma estrategia empleada previamente para evaluar la complementación funcional de CdnL por sus homólogos (García-Moreno *et al.*, 2010). En primer lugar, los alelos mutantes se clonaron en el plásmido pMR2873, que contiene la delección de *cdnL* ($\Delta cdnL$) flanqueada por $\sim 0,75$ kb del DNA genómico adyacente a cada extremo del gen. Los plásmidos resultantes se introdujeron en MR1467, una estirpe portadora del alelo $\Delta cdnL$ en el sitio natural del cromosoma y de una copia extra de *cdnL* en un sitio heterólogo bajo el control del promotor P_B , activo en la luz y reprimido en oscuridad y presencia de B_{12} (Figura 35A). Los transformantes resultantes de la integración por recombinación homóloga en el *locus* endógeno de *cdnL* se obtuvieron en condiciones permisivas (luz) y, para analizar el efecto de las mutaciones, se incubaron en condiciones restrictivas (oscuridad y B_{12}). En ausencia de expresión de la copia silvestre de *cdnL*, las estirpes con las versiones mutadas de CdnL F36A, M49A o P51A mostraron un crecimiento defectuoso, siendo el fenotipo provocado por el alelo F36A tan drástico como el de la delección de *cdnL* (Figura 35B). Para descartar que el efecto observado se debiera a que las mutaciones analizadas generan inestabilidad de la proteína en *M. xanthus*, se realizaron ensayos de Western. Dichos ensayos se llevaron a cabo con estirpes que expresaban en el sitio nativo cada una de las versiones mutadas y en el sitio heterólogo CdnL-eGFP (CdnL fusionada a la proteína verde fluorescente) bajo el control de su propio promotor (García-Moreno *et al.*, 2010). Al ser funcional y presentar un tamaño mayor que CdnL, CdnL-eGFP puede distinguirse de las versiones mutadas usando anticuerpos anti-CdnL y sirve para garantizar el crecimiento a la vez que como control de carga. En los ensayos de Western, las estirpes portadoras de las versiones mutadas mostraron la banda correspondiente a CdnL-eGFP y la banda de menor tamaño correspondiente a CdnL mutado, a niveles comparables a los de la estirpe con CdnL silvestre, confirmando que el defecto observado en el crecimiento no puede achacarse a que las versiones mutadas sean inestables (Figura 35B). En el trabajo realizado en paralelo con MtCdnL por otro grupo, la mutación sólo del residuo R47 (equivalente a M49 en CdnL de *M. xanthus*, Figura 32) no produjo un defecto en la viabilidad celular de *M. tuberculosis* pero, combinada con la mutación del residuo R25 (T27 en CdnL),

afectó a la interacción con la RNAP y resultó letal (Weiss *et al.*, 2012). Estos resultados permiten concluir que la interacción con la RNAP es crítica para la función de CdnL.

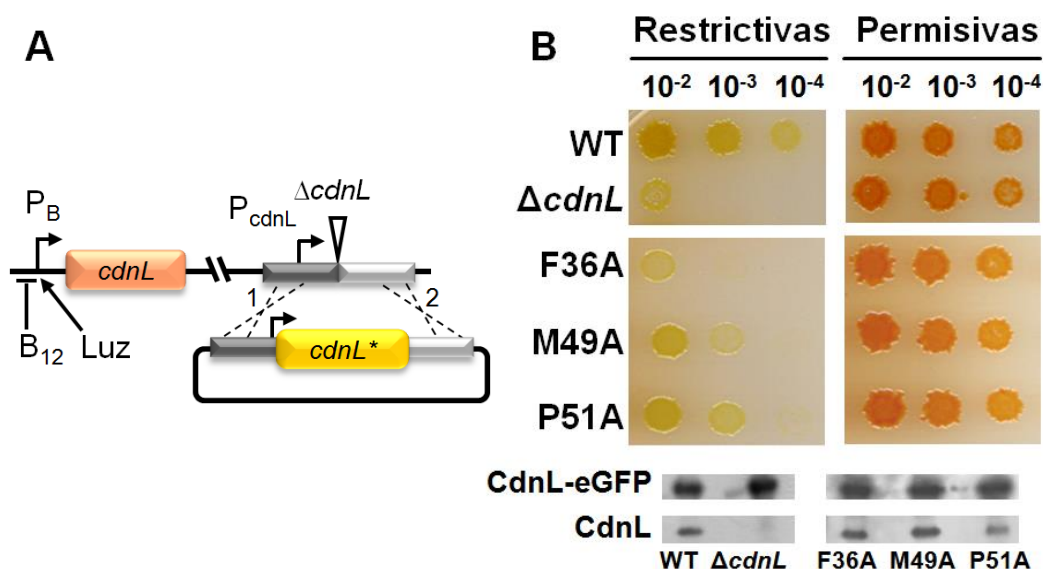


Figura 35. Fenotipo asociado a la falta de interacción de CdnL con la RNAP. A) Esquema de la estrategia empleada para analizar la complementación de *cdnL* en *M. xanthus*. Los alelos de *cdnL* objeto de estudio (*cdnL**, en amarillo) se introdujeron en el plásmido pMR2873 bajo el control del promotor P_{cdnL} , y flanqueados por secuencias del DNA genómico aguas arriba (gris oscuro) y aguas abajo (gris claro) de *cdnL*. Con los plásmidos obtenidos se transformó la estirpe MR1467, portadora de la delección de *cdnL* en el sitio nativo ($\Delta cdnL$) y con una copia de *cdnL* (en naranja) en un sitio heterólogo bajo el control del promotor fotoinducible P_B (expresada en luz y reprimida en oscuridad en presencia de B_{12}). **B)** Análisis de complementación en *M. xanthus* con los mutantes de CdnL F36A, M49A, y P51A. Se depositaron gotas de 5 μ l de cultivo líquido, crecido en condiciones permisivas (D.O₅₅₀~1) y diluido según se indica en la figura, en placas de CTT con o sin B_{12} . Las placas se incubaron durante 2 días a 33 °C bajo condiciones restrictivas (oscuridad y B_{12}) o permisivas (luz; además de inducir la expresión del alelo correspondiente de CdnL, la luz induce la síntesis de carotenos y de ahí, la coloración roja). “WT” es el control positivo derivado de introducir *cdnL* silvestre en pMR2873, y “ $\Delta cdnL$ ” es la estirpe recipiente MR1467. En la parte inferior de la figura se muestran los resultados del análisis de la estabilidad de los mutantes mediante Western con anticuerpos policlonales anti-CdnL (se utilizaron para ello extractos celulares de *M. xanthus* de estirpes que expresan CdnL-eGFP y las distintas variantes de CdnL, como se describe en el texto).

Dada la importancia de la interacción entre CdnL y la β RNAP, la falta de complementación en *M. xanthus* de TtCdnL o de otros homólogos de CdnL tales como BbCdnL (*B. bacteriovorus*), CgCdnL (*C. glutamicum*), o ScCdnL (*S. coelicolor*) observada en un trabajo previo (García-Moreno *et al.*, 2010) podría deberse a que dichos homólogos no son capaces de interaccionar con la β RNAP de *M. xanthus*. Mientras que *B. bacteriovorus* es una δ -proteobacteria como *M. xanthus*, *T. thermophilus* pertenece al grupo de los Deinococos-Thermus, y *C. glutamicum* y

S. coelicolor son actinobacterias como *M. tuberculosis*. Las proteínas CdnL de estas especies comparten con su homóloga en *M. xanthus* una identidad de secuencia del 28 % (TtCdnL) al 60 % (BbCdnL) y conservan muchos de los residuos implicados en el contacto con la β RNAP (Figura 32). En primer lugar se comprobó que BbCdnL, CgCdnL y ScCdnL interaccionan con sus respectivas β RNAP (Figura 36A), tal como lo hacen CdnL, TtCdnL y MtCdnL. En estos ensayos de DHB, al igual que en los ensayos con MtCdnL (Weiss *et al.*, 2012), hubo que utilizar un fragmento más largo de β RNAP, de unos ~500 residuos (correspondiente al dominio “ β lobe”, (Westblade *et al.*, 2010), para observar la interacción con los homólogos a CdnL. Por ello, para analizar la interacción con la β RNAP de *M. xanthus* en estos casos se utilizó el fragmento equivalente más largo Mx β_{19-537} . Como puede observarse en la Figura 36B, ninguno de los cuatro homólogos de CdnL analizados mostró interacción con Mx β_{19-537} . Así pues, aunque la interacción CdnL-RNAP y las superficies de contacto implicadas se mantienen en especies bacterianas de diversos grupos taxonómicos, existe la suficiente divergencia como para que el reconocimiento entre ambas proteínas sea específico de especie.

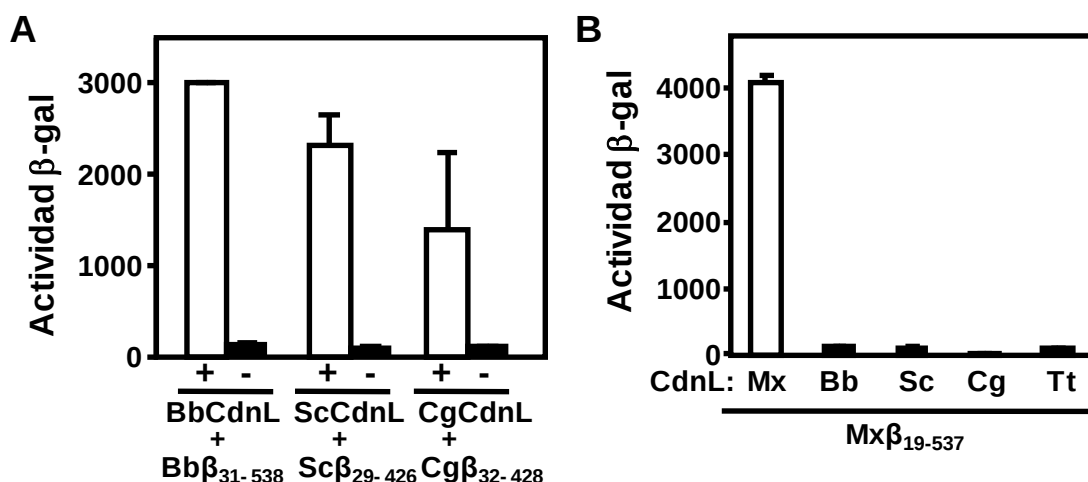


Figura 36. Interacción de los homólogos de CdnL con sus respectivas β RNAP y con la β RNAP de *M. xanthus*. **A)** Análisis mediante DHB de la interacción de BbCdnL, ScCdnL, y CgCdnL con los fragmentos Bb β_{31-538} , Sc β_{29-426} , Cg β_{32-428} , respectivamente. “+” bajo las barras indica que ambos miembros de la pareja están presentes, mientras que “-” es el control negativo (sin el homólogo de CdnL). La interacción de TtCdnL con la β RNAP de *T. thermophilus* se muestra en la Figura 32. **B)** Análisis mediante DHB de la interacción de BbCdnL, ScCdnL, CgCdnL, o TtCdnL con Mx β_{19-537} .

III.1.5 CdnLct ejerce un papel específico y crucial en la función de CdnL

La interacción con la RNAP, aunque esencial, no basta para que CdnL ejerza su función. Así, a pesar del parecido entre CdnL y CardNt, y de que ambos

interaccionan con la RNAP, CarDnt no puede reemplazar funcionalmente a CdnL en *M. xanthus*. Tampoco puede sustituirse CdnL por la proteína quimérica formada por el segmento N-terminal de CdnL y el segmento C-terminal de CdnL de *T. thermophilus* (García-Moreno, 2009). Estos datos apuntan a que la parte C-terminal de CdnL, CdnLCt, juega también un papel crucial y específico. Su similitud estructural con los módulos tipo TPR mencionada anteriormente sugiere que podría mediar una interacción proteína-proteína, pero hasta ahora no se ha podido encontrar ninguna proteína que interaccione con CdnLCt. Cabe resaltar que la región equivalente en CarDnt, curiosamente, interacciona con CarG (Bernal-Bernal *et al.*, 2015; García-Heras *et al.*, 2009; Peñalver-Mellado *et al.*, 2006). Para profundizar en la función de CdnLCt partimos de los datos estructurales, centrándonos en la zona mencionada anteriormente que está constituida por residuos no polares rodeados de residuos básicos, todos ellos expuestos al solvente (Figura 33A), y que se encuentra conservada en otros homólogos (Figura 32).

III.1.5.1 Efecto *in vivo* de las mutaciones en CdnLCt

Para determinar la importancia de la región básica-hidrofóbica se mutaron a Ala los residuos no polares W88 (muy conservado), M96 (menos conservado), y F125 (el menos conservado pero el más expuesto al solvente) o simultáneamente dos (R128/K129) o tres (R90/R91/R93) residuos básicos de dicha región. Los alelos mutantes se introdujeron en la estirpe MR1467, siguiendo la misma estrategia descrita en el apartado III.1.4. El análisis de DHB confirmó que las versiones mutadas de CdnL continuaban interaccionando con Mx β_{19-148} , como cabría esperar, y los experimentos de Western (siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado III.1.4) mostraron que se expresan de manera estable en *M. xanthus* (Figura 37B y C). Cuando se analizó el efecto de las mutaciones en *M. xanthus*, sólo los cambios F125A y R90A/R91A/R93A provocaron un defecto apreciable en el crecimiento bajo condiciones restrictivas, siendo el fenotipo del triple mutante casi tan severo como el de la estirpe con la delección de *cdnL* (Figura 37D). La falta de efecto de la mutación en el residuo W88 (altamente conservado) en *M. xanthus* contrasta con las observaciones en MtCdnL y TtCdnL donde mutaciones equivalentes perjudican notablemente la función (Gulten & Sacchettini, 2013; Srivastava *et al.*, 2013). En conjunto, los datos revelan que el tramo de residuos básicos en el dominio C-terminal de CdnL es crucial para su función esencial en *M. xanthus*.

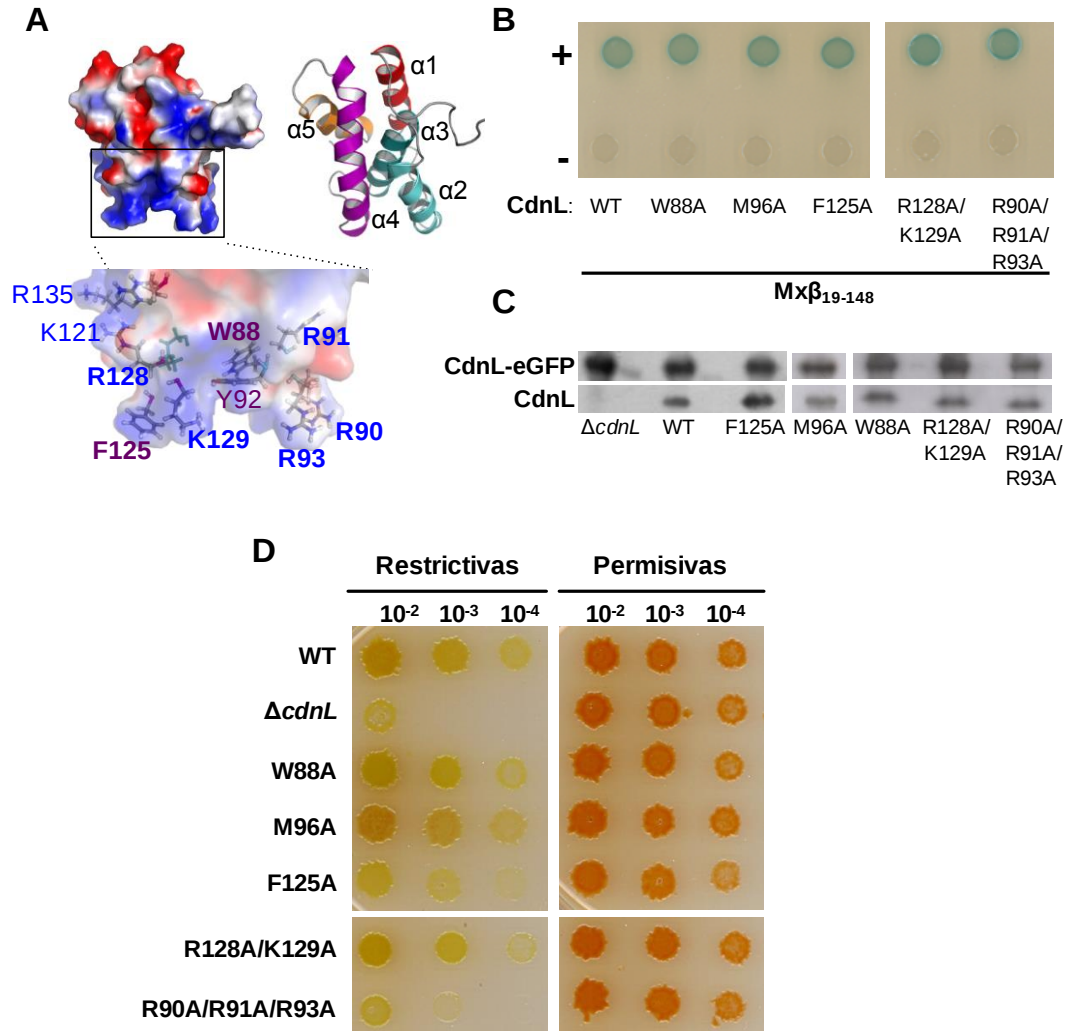


Figura 37. Consecuencias *in vivo* de la mutación de los residuos de la superficie básica-hidrofóbica expuesta al solvente de CdnLct. **A)** Superficie electrostática (izquierda) y diagrama de cintas (derecha, cada hélice está coloreada de un color diferente) generado usando PyMOL. La ampliación muestra las cadenas laterales de la región no polar y de los residuos básicos que componen la superficie básica-hidrofóbica. **B)** Interacción mediante DHB de las versiones mutadas de CdnL (en pKT25) con Mxβ₁₉₋₁₄₈ (en pUT18C). Como control negativo ("-") se utilizó pKT25 sin inserto. **C)** Western Blots (utilizando anticuerpos policlonales anti-CdnL) de extractos celulares de estirpes de *M. xanthus* que expresan CdnL-eGFP y cada uno de los mutantes de CdnL indicados, como se describe en el texto. **D)** Análisis de complementación en *M. xanthus* de las versiones mutadas de CdnL indicadas comparadas con CdnL silvestre o con ΔcdnL, empleando la misma estrategia y protocolo que en la Figura 35.

III.1.5.2 CdnLCt no se une al DNA *in vitro*

Con frecuencia, las regiones básicas pueden intervenir en la unión al DNA. De hecho, MtCdnL parece unirse de manera débil y no específica al DNA a través de su dominio C-terminal (Gulten & Sacchettini, 2013; Srivastava *et al.*, 2013), y las mutaciones en los residuos básicos correspondientes reducen la unión al DNA, siendo los residuos equivalentes a R90/R91/R93 los que mayor efecto producen (Bernal-Bernal *et al.*, 2015; Gulten & Sacchettini, 2013; Srivastava *et al.*, 2013). Para determinar si CdnL se une también al DNA se realizaron ensayos de retraso en la movilidad electroforética (EMSA) con la proteína completa y sus dominios. Como se observa en la Figura 38, ni CdnL ni CdnLNt o CdnLCt fueron capaces de unirse al DNA *in vitro*, incluso a concentraciones altas (10-38 μ M), independientemente de la longitud de la sonda usada para el experimento, o de la presencia o ausencia de competidores inespecíficos del DNA. Cabe destacar que CarDNt tampoco se unió al DNA, a diferencia de la proteína CarD completa, que se une al surco menor del DNA en tramos ricos en pares AT a través de su dominio de tipo HMGA (descrito en detalle en el apartado I.2.4). Así pues, CdnL parece diferir de su homólogo en cuanto que, al menos en las condiciones ensayadas, carece de la capacidad de unirse por sí sola al DNA. Que las mutaciones de los residuos básicos R90/R91/R93 tengan, no obstante, un fuerte efecto perjudicial para el crecimiento *in vivo* sugiere que el papel crucial del dominio CdnLCt no está relacionado con la unión directa al DNA.

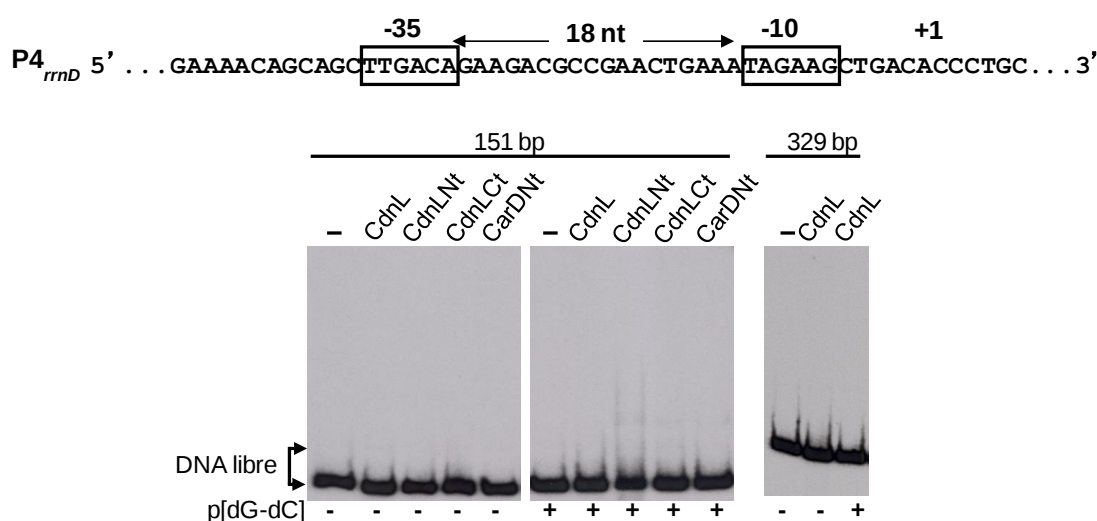


Figura 38. CdnL no interacciona con el DNA. Ensayos de retraso en la movilidad electroforética con CdnL, sus dominios, o CarDNt, a una concentración de 10 μ M. Como sondas se utilizaron fragmentos de DNA marcados radioactivamente, de 151 pb o 329 pb, que contenían el promotor ribosómico P4_{rndD}. Las reacciones se realizaron en ausencia o presencia del competidor poli[dG-dC].

III.1.6 CdnL, a diferencia de DksA, no está implicado en la respuesta al estrés nutricional en *M. xanthus*

Como se comentó anteriormente, en un trabajo inicial con MtCdnL se concluyó que actuaba reprimiendo la expresión de los promotores ribosómicos durante la respuesta general al estrés nutricional o “stringent response” (Stallings *et al.*, 2009). En dicho trabajo se propuso también que MtCdnL realizaba dicha función reguladora actuando como la proteína DksA de *E. coli*. Esta propuesta resultaba contradictoria con nuestra observación de que, al menos en *M. xanthus*, CdnL y DksA no son funcionalmente equivalentes, pues ambas proteínas son esenciales para la viabilidad celular (Abellán-Martínez, 2006; García-Moreno *et al.*, 2010; García-Moreno *et al.*, 2009). Por ello, procedimos a estudiar si CdnL y/o DksA se requieren para la respuesta al estrés nutricional en *M. xanthus*, que provoca la formación de los cuerpos fructíferos.

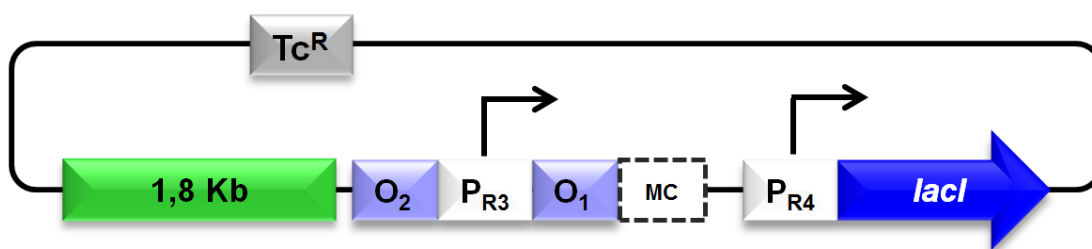


Figura 39. Esquema del plásmido pMR3487. O₁ y O₂, regiones operadoras *lacO* a las que se une el represor LacI; P_{R3} y P_{R4}, tercer y cuarto promotor en tándem, respectivamente, de la región promotora de *rrnD*; 1,38 kb, fragmento de DNA de *M. xanthus* para la integración del plásmido en el sitio heterólogo; Tc^R, resistencia a tetraciclina; MC, secuencia de multiclonación. En ausencia de IPTG, el represor LacI se une a las secuencias operadoras (O₁ y O₂) e impide la expresión del gen clonado aguas abajo del promotor P_{R3}. En presencia de IPTG, LacI se inactiva y el promotor P_{R3} se expresa.

Dado su carácter esencial en *M. xanthus*, para abordar su estudio fue necesario disponer de un sistema de expresión condicional que funcionase satisfactoriamente tanto en el crecimiento vegetativo como en el desarrollo. Cuando se inició este trabajo, el único sistema de expresión condicional disponible (desarrollado en nuestro laboratorio) era un sistema en el que los genes no se expresan (condiciones restrictivas) en la oscuridad y presencia de B₁₂, y sí lo hacen (condiciones permisivas) en la luz. El uso de este sistema nos permitió demostrar que *cdnL* y *dksA* son genes esenciales (García-Moreno *et al.*, 2010; García-Moreno *et al.*, 2009) y realizar los estudios de complementación descritos en los apartados anteriores. Sin embargo, debido a que dicho sistema requiere el uso de luz para la activación de la

expresión génica y la luz impide la correcta formación de los cuerpos fructíferos (Li *et al.*, 1992), procedimos a desarrollar dos nuevos sistemas de expresión condicional en *M. xanthus*, cuyo inductor no tuviera efectos adversos sobre la fructificación u otros procesos celulares. Uno de los sistemas desarrollados depende de IPTG y el otro de vanilato (Iniesta *et al.*, 2012). Para evaluar el posible papel de CdnL y/o DksA en la respuesta a la falta de nutrientes utilizamos el sistema basado en IPTG, tras comprobar que la presencia de IPTG *per se* no tiene ningún efecto sobre el proceso de desarrollo multicelular.

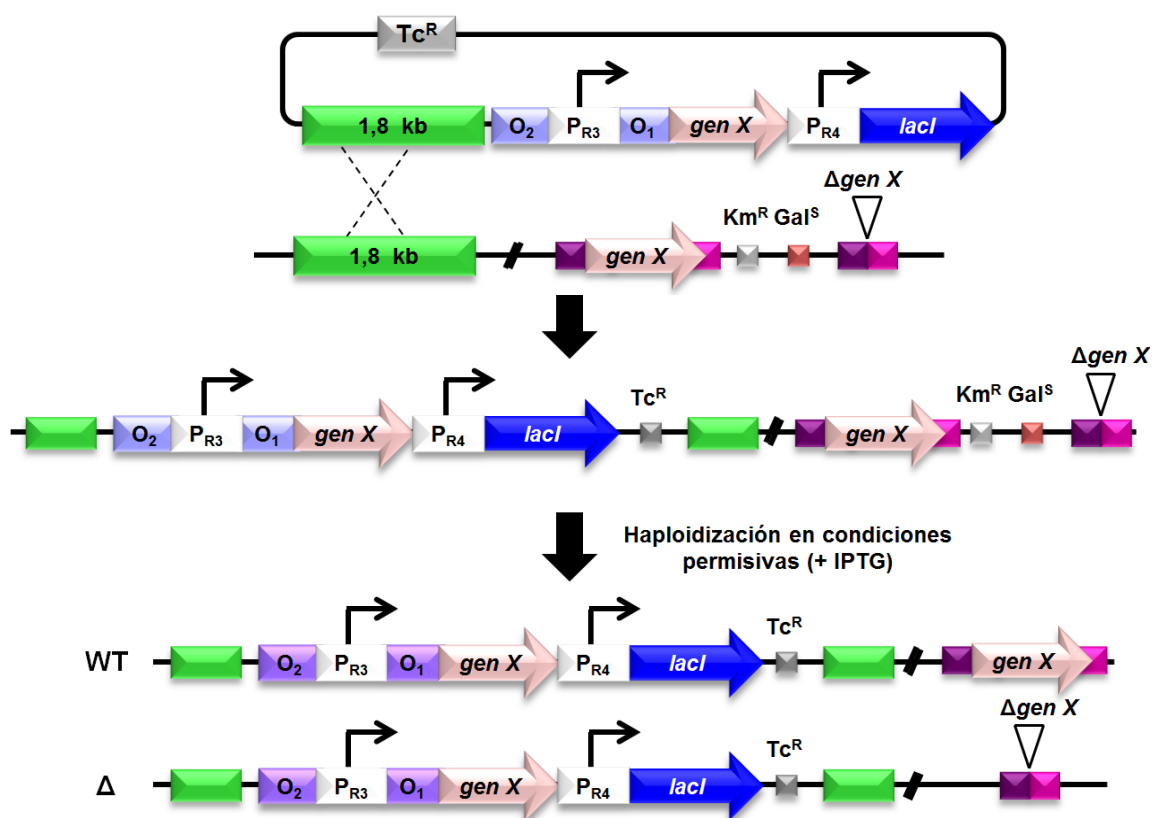


Figura 40. Estrategia para la expresión condicional de *cdnL* o *dksA* (*gen X*) en el sistema inducible por IPTG. Tc^R, resistencia a tetraciclina; Km^R, resistencia a kanamicina; Gal^S, sensibilidad a galactosa; WT y Δ estirpe con la versión silvestre o deletionada del gen, respectivamente, en su localización cromosómica original.

Para ello, los genes *cdnL* y *dksA* se clonaron en el plásmido pMR3487 (Figura 39), generándose los plásmidos pMR3596 y pMR3556, respectivamente. Los merodiploides *cdnL*/Δ*cdnL* y *dksA*/Δ*dksA* (ambas estirpes resistentes a kanamicina y sensibles a galactosa, y derivadas de la estirpe silvestre capaz de fructificar DK1622) se transformaron con los plásmidos pMR3596 y pMR3556, respectivamente. Las estirpes resultantes se crecieron varias generaciones con 1 mM de IPTG y sin

kanamicina para permitir la haploidización, y se sembraron en placas de CTT con 1 mM de IPTG y 1% de galactosa para seleccionar a las células resistentes a galactosa por haber perdido el plásmido junto con el gen *galK* (que determina sensibilidad a galactosa, Gal^S) por recombinación homóloga (Figura 40). Las colonias haploides se analizaron por PCR para determinar la presencia del alelo silvestre (estirpes *cdnL*/*P*_{IPTG}::*cdnL* y *dksA*/*P*_{IPTG}::*dksA*, que se usaron como control) o delecionado (estirpes Δ *cdnL*/*P*_{IPTG}::*cdnL* y Δ *dksA*/*P*_{IPTG}::*dksA*).

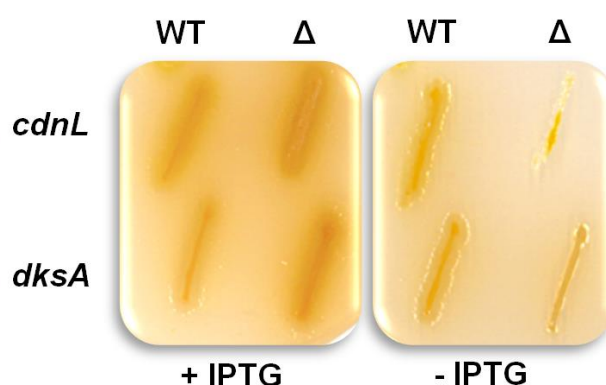


Figura 41. Crecimiento en placa de las estirpes que expresan condicionalmente *cdnL* o *dksA*. WT: estirpe *cdnL*/*P*_{IPTG}::*cdnL* o *dksA*/*P*_{IPTG}::*dksA*; Δ : estirpe Δ *cdnL*/*P*_{IPTG}::*cdnL* o Δ *dksA*/*P*_{IPTG}::*dksA*.

Una vez obtenidas las estirpes haploides se comprobó que, en condiciones restrictivas (ausencia de IPTG), las estirpes Δ *cdnL*/*P*_{IPTG}::*cdnL* y Δ *dksA*/*P*_{IPTG}::*dksA* mostraban el mismo fenotipo de falta de crecimiento (Figura 41) y de morfología celular aberrante (datos no mostrados) observado previamente con el sistema de expresión condicional basado en la luz. Para investigar la posible implicación de *cdnL* y/o *dksA* en la respuesta a la escasez de nutrientes, las estirpes Δ *cdnL*/*P*_{IPTG}::*cdnL* y Δ *dksA*/*P*_{IPTG}::*dksA* (y, como control, las estirpes *cdnL*/*P*_{IPTG}::*cdnL* y *dksA*/*P*_{IPTG}::*dksA*) se crecieron en condiciones permisivas y tras los lavados para eliminar los nutrientes, se concentraron y se depositaron gotas en placas de medio de fructificación TPM conteniendo o no 1 mM IPTG. En estas condiciones, la estirpe silvestre comienza a formar agregados en torno a las 12 horas y a las 48 horas muestra ya los característicos cuerpos fructíferos. Como se puede observar en la Figura 42, mientras que la falta de CdnL no provocó ningún efecto sobre el desarrollo multicelular, la falta de DksA impidió la formación de los cuerpos fructíferos, lo que sugiere que DksA, pero no CdnL, se requiere para la respuesta a la escasez de nutrientes en *M. xanthus*.

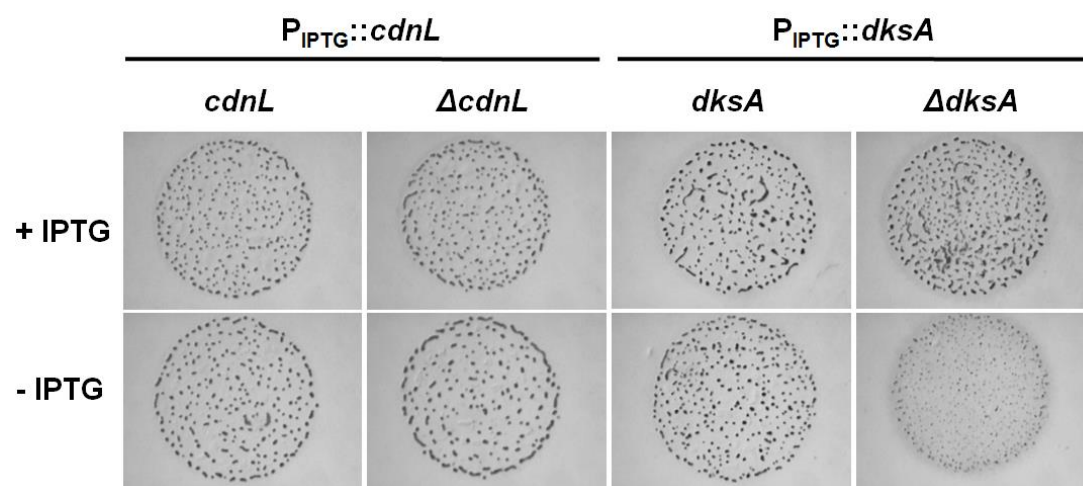


Figura 42. Efecto sobre el desarrollo multicelular de la falta de *cdnL* o *dksA*. Las estirpes se crecieron en 10 ml de CTT bajo condiciones permisivas hasta $D.O_{550} \sim 0.7$. 2 ml de estos cultivos se lavaron con TM para eliminar los nutrientes, se concentraron en un volumen final de $\sim 150 \mu l$ y se depositaron gotas de $10 \mu l$ sin diluir o diluidas 1:2 y 1:4, en placas de TPM con y sin 1 mM IPTG. Las placas se incubaron a $33^\circ C$ y se tomaron fotos a las 24, 48 y 72 horas. Las imágenes corresponden a los agregados formados tras 48 horas de incubación (dilución 1:2).

III.1.7 CdnL estabiliza la unión de la RNAP y promueve la transcripción de los promotores dependientes de σ^A

Como se ha comentado anteriormente, MtCdnL se describió inicialmente como un represor de los promotores ribosómicos (rRNA) (Stallings *et al.*, 2009). Sin embargo, en un trabajo publicado durante la realización de esta tesis se propuso que más bien funciona como un activador de dichos promotores, estimulando la formación del complejo abierto de transcripción (RP_o) (Srivastava *et al.*, 2013). Curiosamente, un estudio reciente de nuestro grupo, desarrollado también durante la realización de esta tesis, puso de manifiesto que CarD se requiere para la activación de varios promotores dependientes de factores σ -ECF, pero no para la expresión de los promotores de rRNA, que dependen del factor σ mayoritario σ^A (Abellón-Ruiz *et al.*, 2014). Para ahondar en la función de CdnL en *M. xanthus* comprobamos, por tanto, si CdnL está implicado en la expresión de los promotores de los rRNA.

III.1.7.1 Estudio de la asociación de CdnL a $P_{4_{rrnD}}$ y P_B *in vivo* mediante inmunoprecipitación de cromatina

Para abordar el posible papel regulador de CdnL nos centramos en $P_{4_{rrnD}}$, el primero de los cuatro promotores en tándem del operón *rrnD* y el mejor estudiado por el grupo. Con fines comparativos, en paralelo se analizó también el efecto de CdnL sobre la expresión de P_B , un promotor fotoinducible dependiente de σ^A cuya regulación

ha sido muy bien caracterizada por nuestro grupo (López-Rubio *et al.*, 2002; López-Rubio *et al.*, 2004; Pérez-Marín *et al.*, 2008). Como puede observarse en la Figura 43A, P4_{rrnD} y P_B presentan una región -35 idéntica (TTGACA) y un espaciador de la misma longitud (18 pb), pero difieren en la secuencia de la región -10 (TAGAAG en P4_{rrnD} y TACCTC en P_B).

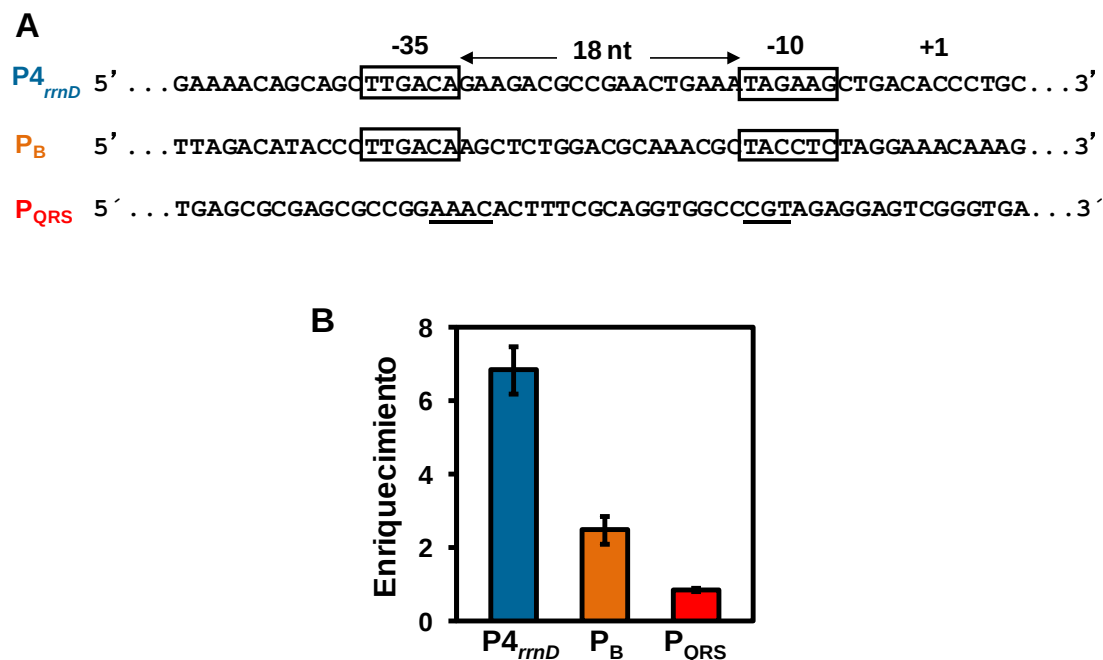


Figura 43. Asociación de CdnL con los promotores dependientes de σ^A . **A)** Secuencias de los promotores dependientes de σ^A P4_{rrnD} y P_B, indicando los elementos -35 y -10 (en cajas), y el inicio de la transcripción (+1). Se indica también el promotor P_{QRS} dependiente del factor σ -ECF CarQ, con los motivos conservados en las regiones -35 y -10 subrayados. **B)** Análisis mediante ChIP-qPCR del enriquecimiento de CdnL en P4_{rrnD}, P_B y P_{QRS} en *M. xanthus* (con respecto a la región intragénica del primer gen del operón *carB*).

En primer lugar, procedimos a analizar si CdnL se asocia con P4_{rrnD} y/o P_B *in vivo* mediante la técnica de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), que permite detectar la unión directa o indirecta de una proteína al DNA. Como control, se analizó también la asociación de CdnL con el promotor fotoinducible P_{QRS}, que depende del factor σ -ECF CarQ y del complejo CarD-CarG, como se comentó en la Introducción. Para inducir la expresión de P_B y de P_{QRS} en lugar de la luz se utilizó un fondo genético mutante para *carR* (mutación *carR3*), en el que ambos promotores se expresan de manera constitutiva. La inmunoprecipitación de CdnL se realizó con anticuerpos policlonales anti-CdnL ya disponibles en el laboratorio. En relación a una región intergénica control a la que no se espera que se una CdnL (primer *orf* del operón *carB*; Tabla 6), se observó un enriquecimiento significativo en P4_{rrnD} y también, aunque en

menor grado, en P_B . Por el contrario y, como se esperaba, no se observó asociación de CdnL con P_{QRS} (Figura 43B).

III.1.7.2 Análisis del efecto de CdnL sobre la unión del holoenzima RNAP- σ^A a $P4_{rrnD}$ y P_B *in vitro* mediante retraso en la movilidad electroforética

Una vez demostrado que CdnL se asocia *in vivo* con al menos dos promotores dependientes del factor σ^A , $P4_{rrnD}$ y P_B , procedimos a estudiar el efecto *in vitro* de CdnL sobre la formación de los complejos de transcripción abiertos (RP_o) en dichos promotores. En primer lugar, mediante experimentos de retraso en la movilidad electroforética (EMSA), se comparó la unión de la holoenzima RNAP- σ^A a fragmentos de DNA que contenían $P4_{rrnD}$ (151 pb) o P_B (130 pb), en ausencia o presencia de

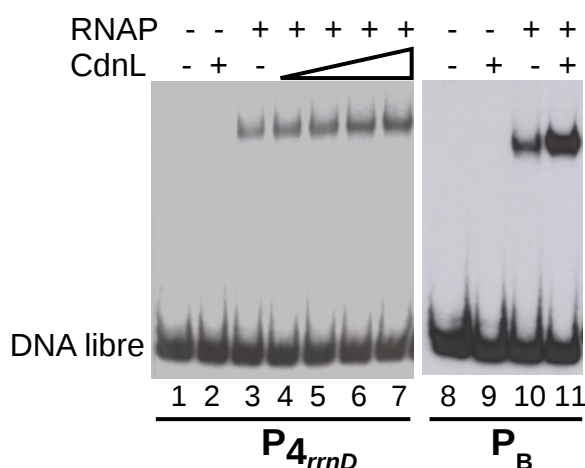


Figura 44. Efecto de CdnL sobre la unión de la holoenzima RNAP- σ^A a las sondas $P4_{rrnD}$ (151 pb) y P_B (130 pb) en ausencia de heparina. Todas las reacciones contenían poli[dG-dC] como competidor inespecífico. Donde se indica (signo +), las reacciones contenían también: RNAP (130 nM); CdnL (0.1, 1, 10 y 38 μ M en los carriles 4-7, respectivamente, y 10 μ M en el carril 11). Las reacciones se incubaron durante 30 minutos a 37 °C. Que la movilidad del complejo formado por la RNAP no varíe en presencia de CdnL probablemente se debe al pequeño tamaño de CdnL, en comparación con el de la RNAP.

CdnL. Como puede observarse en la Figura 44, la banda retrasada por la RNAP- σ^A tanto en $P4_{rrnD}$ como en P_B resultó más intensa si además estaba presente CdnL. La heparina es un competidor muy fuerte del DNA que provoca la disociación de los complejos de transcripción cerrados y de los complejos abiertos inestables. Cuando se añadió heparina a la reacción tras la formación de los complejos abiertos, la banda retrasada por la RNAP- σ^A en $P4_{rrnD}$ sólo se observó en presencia de CdnL. Por el contrario, en P_B se observó banda retrasada tanto en ausencia de CdnL (consistente con nuestros estudios previos;(López-Rubio *et al.*, 2004)) como en su presencia,

siendo en este caso algo más intensa (Figura 45). Estos datos indican que CdnL tiene un efecto estabilizador en la formación de los complejos abiertos y que dicho efecto es más acusado en $P4_{rrnD}$ que en P_B , probablemente porque los RP_O de los promotores de rRNA se disocian rápidamente y tienen una vida media corta ((Haugen *et al.*, 2008a); véase apartado I.1.4). El efecto de CdnL no se observó cuando se utilizaron cualquiera de sus dos dominios por separado, o CdnLnt, lo que indica que sólo la proteína completa es capaz de estabilizar la formación del RP_O (Figura 45).

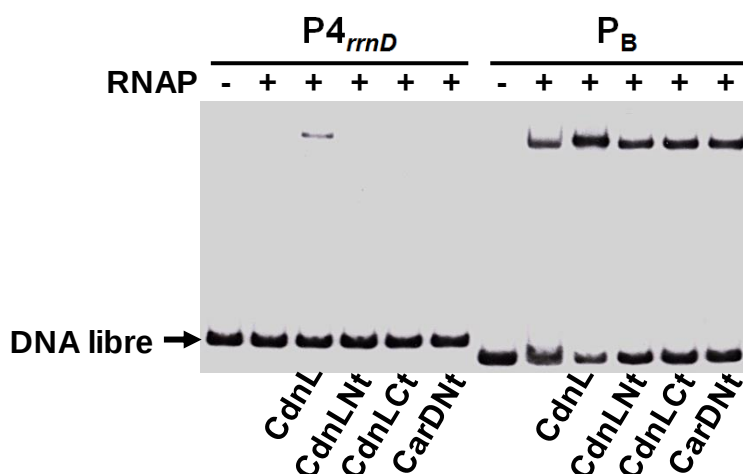


Figura 45. CdnL favorece la formación del RP_O . EMSA con la holoenzima RNAP- σ^A (130 nM), sola o en presencia de 10 μ M de CdnL, CdnLnt, CdnLct, o CdnLnt, y las sondas de DNA $P4_{rrnD}$ (151 pb) y P_B (130 pb). Tras la incubación de 30 minutos a 37 °C se añadió 1 μ g de heparina para eliminar los complejos RNAP-DNA inestables y dejar solo los complejos de transcripción abiertos (RP_O). No se percibió ninguna alteración en la migración del complejo causada por la unión de CdnL a la RNAP, posiblemente debido a que el tamaño de CdnL es considerablemente menor que el de la RNAP. Todas las mezclas de reacción se realizaron en presencia de poli[dG-dC].

Para analizar si el efecto observado *in vitro* requiere la interacción de CdnL con la RNAP se realizaron ensayos similares con la versión de CdnL portadora de la mutación F36A que, como se mostró anteriormente, anula la interacción con la RNAP (Figura 33) y provoca la falta de función *in vivo* (Figura 34). También, para evaluar el papel del dominio CdnLct en la estabilización de los RP_O , se realizaron ensayos con varios mutantes en dicho dominio: el triple mutante R90A/R91A/R93A, que provoca una pérdida de función *in vivo* similar a la delección de *cdnL*; y los mutantes sencillos F125A y W88A, que causan un efecto leve o ningún efecto aparente *in vivo*, respectivamente. Como puede apreciarse en la Figura 46, se observó una correlación muy buena entre los efectos de las mutaciones sobre la viabilidad celular observados previamente y los ensayos de unión de la RNAP- σ^A a $P4_{rrnD}$ *in vitro*. Así pues, los dos

mutantes menos efectivos en la estabilización del RP_O en $P4_{rrnD}$ fueron F36A y R90A/R91A/R93A. También fueron estos dos mutantes los más afectados en el ensayo con P_B , aunque las diferencias en este caso fueron menos aparentes, dado que el requerimiento de CdnL para la formación del RP_O es menor en P_B que en $P4_{rrnD}$.

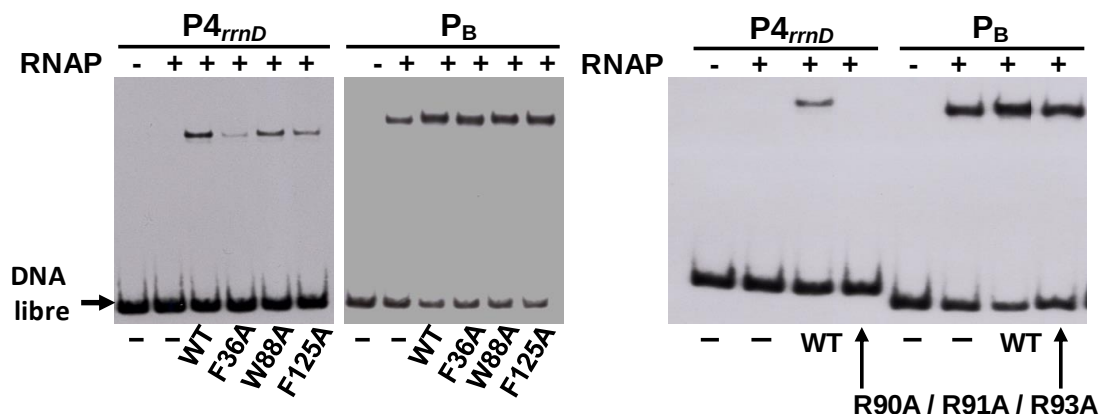


Figura 46. Efecto de las versiones mutadas de CdnL en la estabilización del RP_O . EMSA con la holoenzima RNAP- σ^A (130 nM) sola o en presencia de 10 μ M de CdnL o sus versiones mutadas, usando las sondas de DNA $P4_{rrnD}$ (151 pb) y P_B (130 pb). Tras la incubación de 30 minutos a 37 °C, se añadió 1 μ g de heparina para eliminar los complejos RNAP-DNA inestables y dejar solo los complejos de transcripción abiertos (RP_O). Todas las mezclas de reacción se realizaron en presencia de poli[dG-dC].

III.1.7.3 Ensayos de transcripción *in vitro*

La formación del RP_O y su estabilización son un paso crucial del proceso de transcripción, especialmente en los promotores de los rRNA (apartado I.1.4). Por ello, procedimos a analizar el efecto de CdnL y de sus versiones mutadas sobre la transcripción *in vitro* a partir de $P4_{rrnD}$. En estos ensayos se añadió heparina como competidor y se utilizó un fragmento de 329 pb que incluye $P4_{rrnD}$ y que se espera genere un transcrito de ~258 nucleótidos. Los resultados obtenidos (Figura 47) correlacionaron bien con los obtenidos mediante EMSA. Así pues, la banda correspondiente al transcrito observada en presencia de la proteína silvestre desapareció en las reacciones que contenían las versiones mutadas F36A o R90A/R91A/R93A. Por otro lado, la mutación F125A produjo también un descenso en la cantidad de transcrito, aunque menos acusado, mientras que la mutación W88A apenas tuvo efecto.

En conjunto, los datos *in vitro* indican que CdnL, al igual que su homólogo en micobacterias, se requiere para la formación y estabilización de los RP_O en promotores

dependientes del factor σ^A y, en particular, en los que dirigen la expresión de los rRNA. Los datos indican, además, que para que CdnL ejerza dicha función se requiere tanto la interacción con la RNAP mediada por su dominio N-terminal como los residuos básicos de la región básica-hidrofóbica del dominio C-terminal. El comportamiento prácticamente silvestre del mutante de CdnL (W88A) en el residuo de triptófano conservado en el dominio C-terminal contrasta con el defecto en la estabilización de RP_0 y en la transcripción observado para su equivalente en MtCdnL (Srivastava *et al.*, 2013), lo que apunta a ciertas diferencias en el modo de acción de ambas proteínas homólogas.

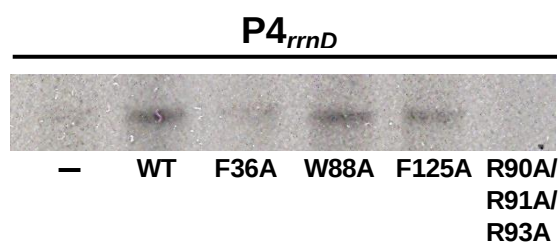


Figura 47 Efecto de las versiones mutadas de CdnL en la expresión de $P4_{rrnD}$ *in vitro*. Transcripción *in vitro* de $P4_{rrnD}$, con la holoenzima RNAP- σ^A sola o en presencia de 10 μ M de CdnL o sus versiones mutadas, con heparina como competidor.

III.2 Caracterización funcional del homólogo de CdnL en *C. crescentus*

Hasta la fecha son muy pocas las especies en las que se ha estudiado la función de CdnL. Los trabajos realizados en paralelo en *M. xanthus*, una delta-proteobacteria, y en *M. tuberculosis*, una actinobacteria, han revelado similitudes en las proteínas CdnL de ambas especies en cuanto a su papel esencial para la viabilidad celular y su acción sobre los promotores de los rRNA. Sin embargo, en *B. subtilis*, una bacteria que pertenece al phylum Firmicutes, CdnL no es una proteína esencial ni se une a la RNAP para regular la transcripción del rRNA (Kobayashi *et al.*, 2003; Rabatinova *et al.*, 2013). De hecho, muchos otros miembros del phylum Firmicutes carecen de CdnL. Se ha descrito que los factores transcripcionales y los reguladores globales están sujetos a una mayor plasticidad evolutiva con respecto a otro tipo de factores (Dufour & Donohue, 2012; Perez & Groisman, 2009). Se consideró, por tanto, de interés abordar el estudio de CdnL en otras especies bacterianas para evaluar el grado de conservación evolutiva de su función, y mejorar el conocimiento de la relación estructura-función para las proteínas de esta amplia familia. Así pues,

emprendimos el estudio de la proteína CdnL de *C. crescentus*, una alfa proteobacteria, Gram negativa, de vida libre, que se encuentra principalmente en aguas limpias, y cuyo ciclo de vida ha sido ampliamente estudiado. *C. crescentus* resultó interesante para el estudio de CdnL no solo por presentar un estilo de vida que difiere significativamente del de *M. xanthus* y *M. tuberculosis* sino también porque posee tanto CdnL como DksA, pero esta última, a diferencia de lo que ocurre en *M. xanthus*, no es esencial (Mohr *et al.*, 1998).

III.2.1 Análisis del contexto genómico y de la estructura primaria de CdnL de *C. crescentus* (CcCdnL)

La conservación del entorno de un gen en el genoma puede proporcionar una pista sobre la función de dicho gen. La sintenia, al igual que las interacciones proteína-

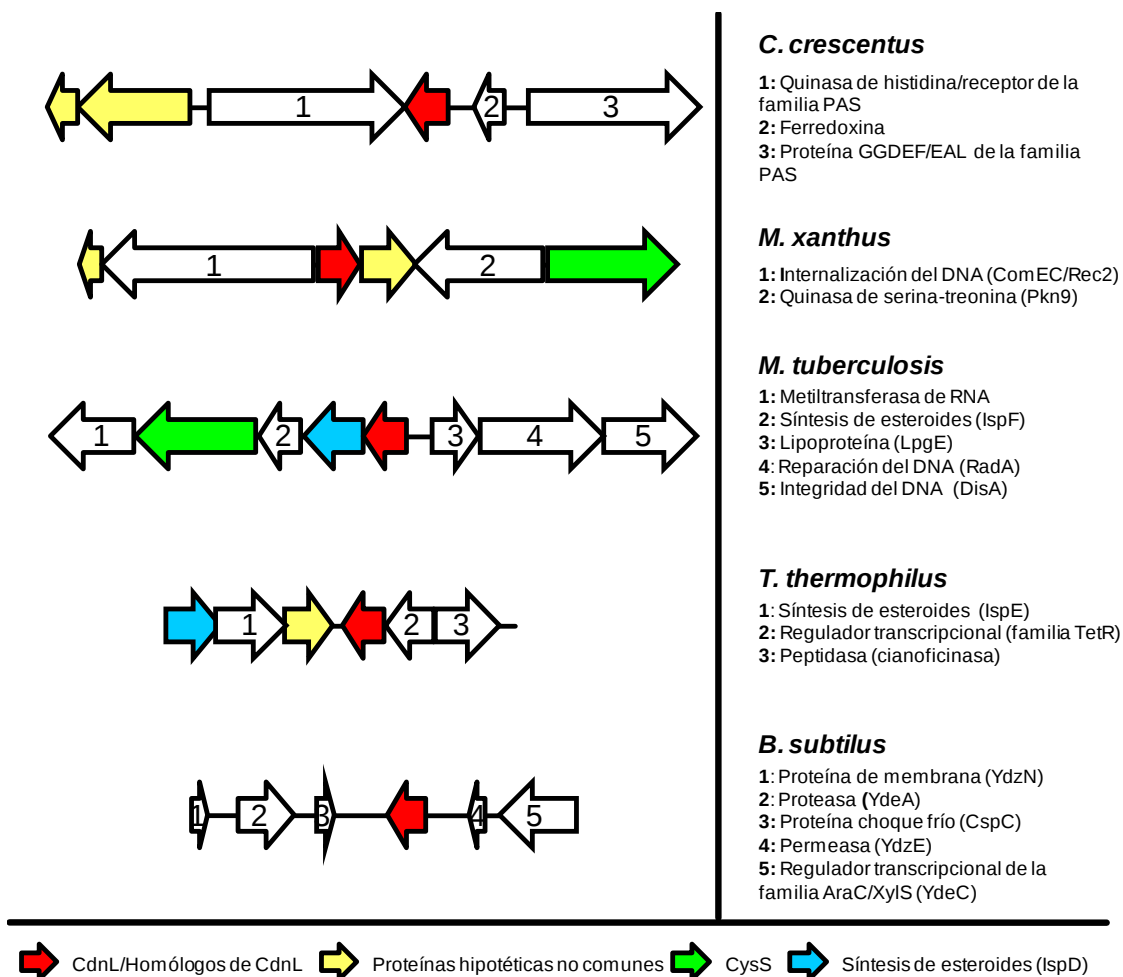


Figura 48. Contexto genómico de C_c cdnL, M_x cdnL, M_t cdnL, T_t cdnL, B_s cdnL (*ydeB*). En la parte derecha se indican las proteínas cifradas por cada gen en las distintas especies bacterianas.

proteína o el acoplamiento transcripcional/traducciona, con frecuencia sugieren relación funcional entre los productos génicos (Huynen & Snel, 2000). Sin embargo, la comparación del entorno genómico de *CcCdnL* y de los homólogos estudiados en otras

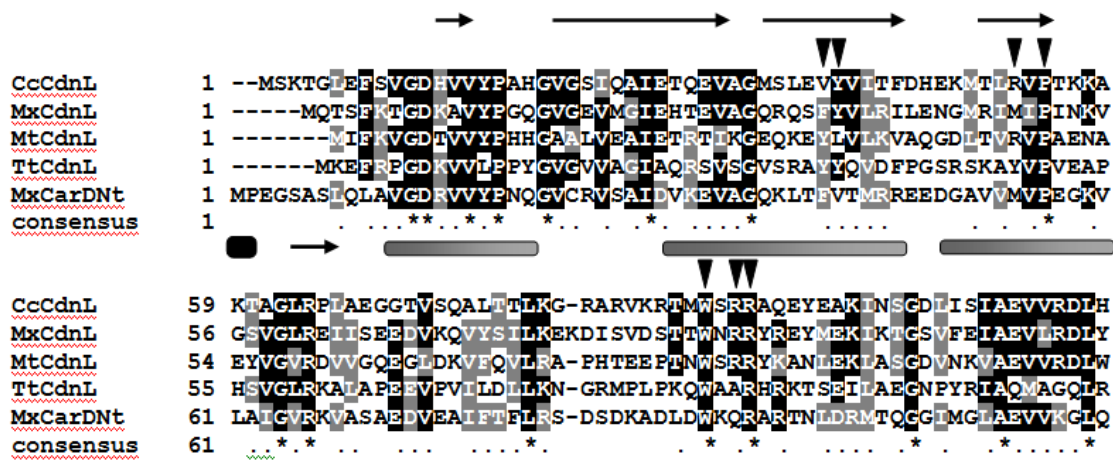


Figura 49. Alineamiento de secuencia de CcCdnL, MxCdnL, MtCdnL, TtCdnL, y MxCarDnt. Los residuos están sombreados en negro si son idénticos o en gris si son similares en la mayoría de las secuencias. Los asteriscos en la línea consenso indican secuencias conservadas en todas las alineaciones. Las cabezas de flecha negras indican residuos de CcCdnL que han sido analizados mediante mutagénesis dirigida en esta tesis. Los elementos de la estructura secundaria de MxCdnL se muestran sobre la secuencia (flechas: láminas β ; varillas grises: hélices α ; y la pequeña varilla negra la hélice 3_{10}).

bacterias no resultó muy informativo por la falta de una conservación clara de los genes alrededor de *cdnL* (Figura 48). En relación con el resto de homólogos estudiados, CcCdnL muestra una identidad del 26-34 % (41-51 % de similitud), y es básico como TtCdnL, en lugar de ácido como MxCdnL (en este apartado, para evitar confusión, nos referiremos a CdnL de *M. xanthus* como MxCdnL) o MtCdnL (Figura 49; Tabla 7). El programa PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) predice para CcCdnL una distribución de elementos de estructura secundaria muy similar a la observada previamente para MxCdnL, con una parte N-terminal (~60 residuos) formada por cinco láminas β , y una parte C-terminal formada por cinco hélices α (comparar Figura 24 con Figura 50). La parte N-terminal de CcCdnL tiene un 32-39 % de identidad con respecto a sus homólogos y es ácida como MxCdnL y otros homólogos (excepto en TtCdnL), mientras que la parte C-terminal, con un 22-31 % de identidad con respecto al resto, es marcadamente básica, como TtCdnL (Tabla 7). Así pues, según el criterio que se utilice, CcCdnL se parece más a unos homólogos o a otros.

Tabla 7. Análisis comparativo de los homólogos de CcCdnL

Proteína	Tamaño completo		Dominio N-terminal ^a		Dominio C-terminal ^a	
	Tamaño (nº residuos)	pI ^c	Tamaño (nº residuos)	pI ^c	Tamaño (nº residuos)	pI ^c
	(% Iden./Sim.) ^b		(% Iden./Sim.) ^b		(% Iden./Sim.) ^b	
CcCdnL	167 (100 / 100)	8.86	1-71 (100 / 100)	6.2 5	72-167 (100 / 100)	9.51
MxCdnL	164 (32 / 49)	5.39	1-68 (35 / 43)	5.2 2	69-164 (30 / 53)	5.55
MtCdnL	162 (34 / 51)	5.49	1-66 (38 / 55)	5.1 9	67-162 (31 / 48)	5.88
TtCdnL	164 (26 / 41)	8.92	1-67 (32 / 46)	9.5 2	68-164 (22 / 38)	6.16
BsCdnL	153 (30 / 53)	6.92	1-65 (39 / 62)	4.8 4	66-153 (31 / 59)	9.19
MxCarDNt	179 (28 / 43)	5.21	1-72 (35 / 43)	5.2 8	73-179 (24 / 39)	5.18

^a Basado en en análisis estructural de MxCdN (apartado III.1). ^b Identidad/similitud de secuencia (en %) en relación a CcCdN. ^c pI teórico calculado en base a la secuencia (<http://web.expasy.org/protparam/>).

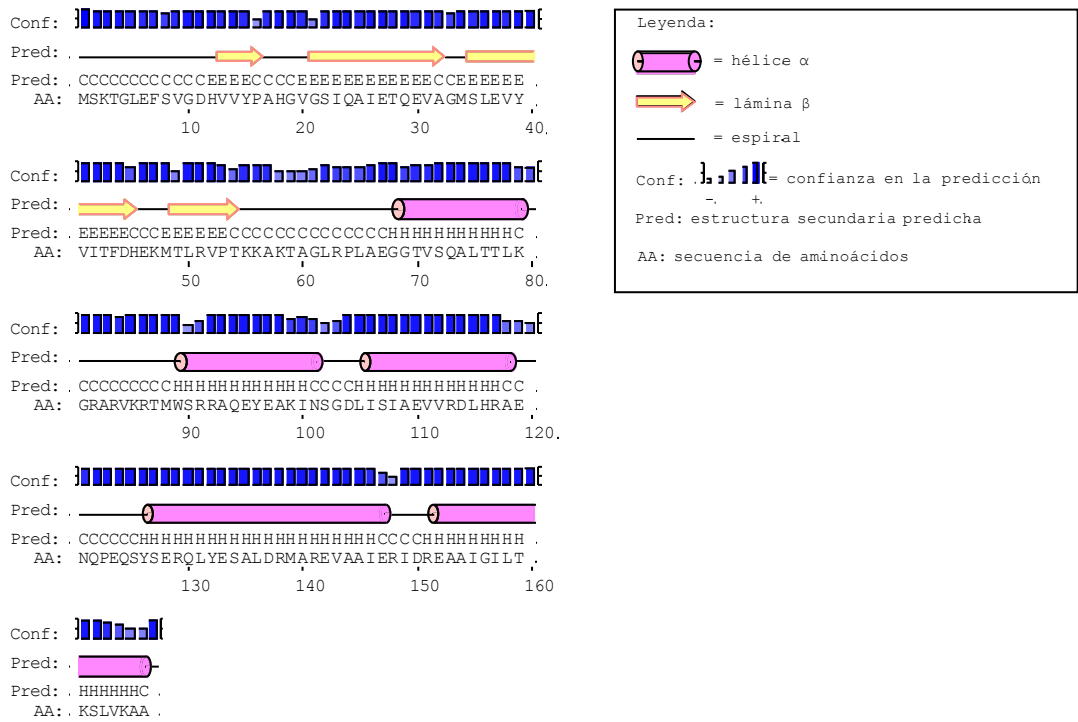


Figura 50. Predicción de la estructura secundaria de CcCdnL usando *PSIPRED Protein Structure Prediction*

III.2.2 CcCdnL es esencial para el crecimiento y la viabilidad celular en *C. crescentus*

Entre la lista de posibles genes esenciales identificados en un estudio de carácter global basado en la inserción de un transposón a lo largo de todo el genoma de *C. crescentus* se encontraba *cccdnL* (Christen *et al.*, 2011). Para estudiar el efecto de la delección de *cdnL* y descartar posibles efectos polares derivados de la inserción del transposón, se procedió a generar una estirpe portadora de una delección completa y en fase de *cccdnL* (Δ_{cccdnL}) mediante la estrategia descrita en el apartado II.12 de Materiales y Métodos. Para ello, en primer lugar se construyó el plásmido pMR3552 que contiene segmentos de ~500 pb aguas arriba y aguas abajo de *cccdnL* y que permite reemplazarlo por un punto de corte BamHI. La imposibilidad de obtener células con el alelo delecionado sugirió que *cccdnL* es, en efecto, un gen esencial. Esta conclusión se vió reforzada por el hecho de que, en presencia de una segunda copia en el sitio heterólogo expresada bajo el control del promotor inducible por vanilato, P_{van} (estirpe ME2, Tabla 2), sí pudo deleccionarse *cccdnL* en su sitio nativo. Sin embargo, puesto que las colonias con la delección crecían tanto en condiciones permisivas (presencia de vanilato) como en condiciones restrictivas (ausencia de vanilato), en el sistema de expresión condicional utilizado debía existir cierto “escape” de la represión por VanR. Para asegurar niveles máximos de represión se probó a aumentar la expresión de *vanR* mediante la introducción de un plásmido multicopia (pBVMCS-6) que portaba dicho gen (Thanbichler *et al.*, 2007). La estirpe resultante (ME5, Tabla 2, figura 53) mostró una tasa de crecimiento y una morfología celular normales en

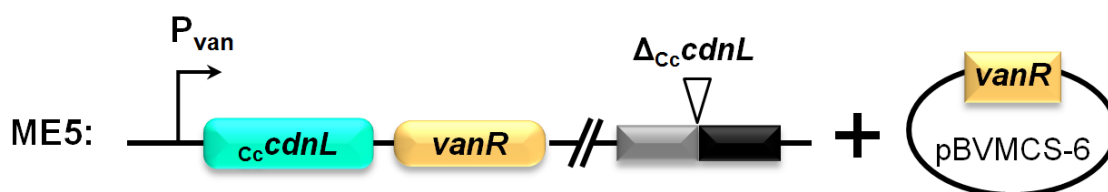


Figura 51. Esquema de la estirpe ME5. Los rectángulos gris y negro muestran las regiones adyacentes aguas arriba y aguas abajo del gen *cccdnL*, la cabeza de flecha blanca indica la sustitución de *cccdnL* por un punto de corte BamHI. En celeste, la copia extra de *cccdnL* bajo el promotor inducible por vanilato. La presencia del plásmido multicopia (pBVMCS-6) que expresa *vanR* (amarillo) permite una regulación más fina del promotor P_{van} .

condiciones permisivas (0.5 mM de vanilato), pero apenas creció en condiciones restrictivas (Figura 52A), mostrando las células una morfología elongada y filamentosa (algunas alcanzaron una longitud hasta 10 veces mayor que la de las células

silvestres, Figura 52B). Un análisis del nucleóide mediante tinción con DAPI (fluorescente) reveló una distribución anómala y desigual del material genético en las células crecidas en condiciones restrictivas, en comparación con la distribución uniforme de las células crecidas en condiciones permisivas. En conjunto, estos datos *in vivo* corroboran que CcCdnL es esencial en *C. crescentus* e indican que su ausencia, al igual que ocurre en *M. xanthus*, provoca defectos en la división celular.

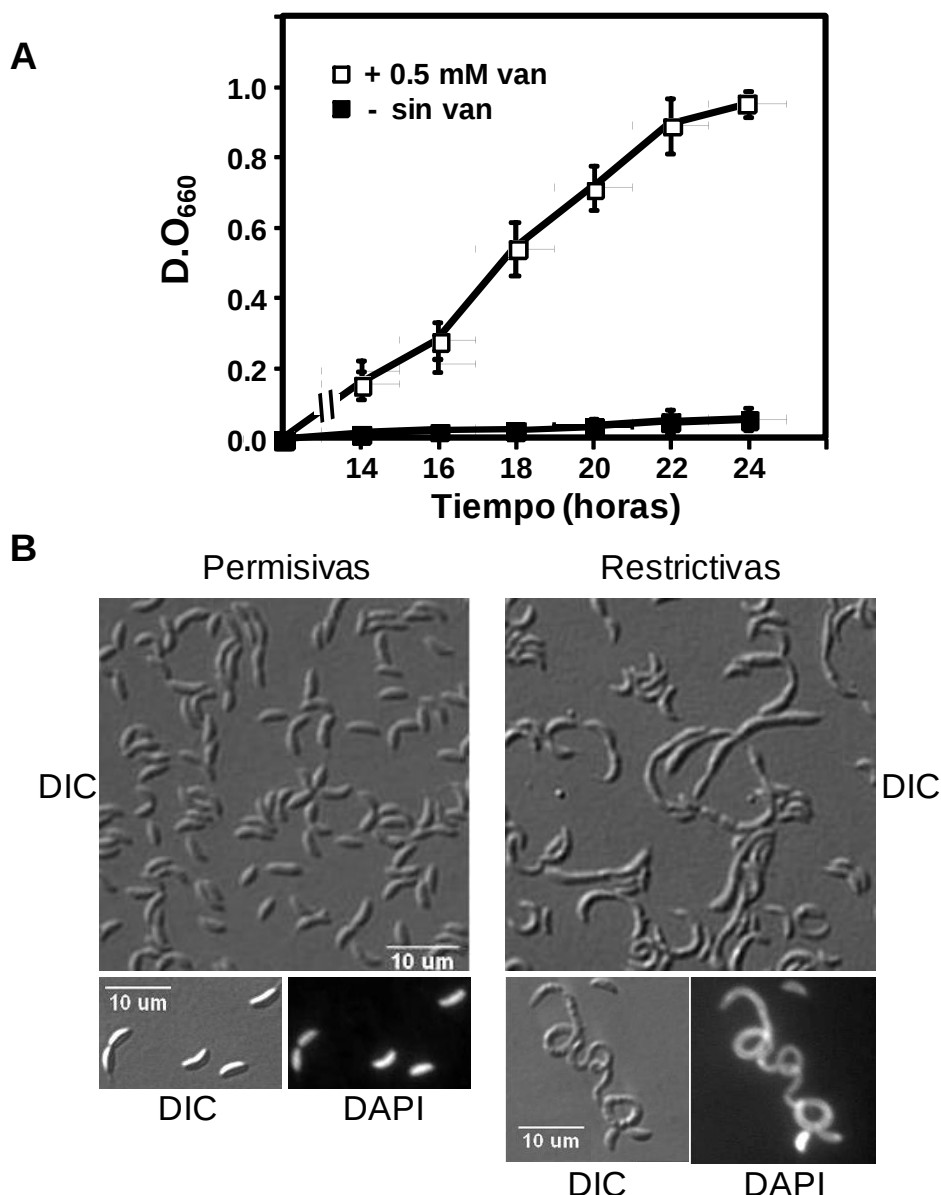


Figura 52. Fenotipo asociado a la falta de *CcCdnL*. **A)** Curva de crecimiento de la estirpe ME5 (Figura 26) bajo condiciones permisivas (0.5 mM vanilato, cuadrados blancos) o restrictivas (sin vanilato, cuadrados negros). Una colonia fue inoculada en 10 ml de PYE con 0.5 mM de vanilato y crecida toda la noche a 30 °C ($D.O_{660} \sim 0.8$), tras lo cual las células (1.5 ml) fueron lavadas dos veces con PYE sin vanilato y resuspendidas en el mismo volumen de PYE. 100 μ l de cultivo lavado se pasó a 10 ml de PYE, con o sin 0.5 mM de vanilato. El crecimiento fue monitorizado a los tiempos indicados. **B)** Observación al microscopio de las células que expresan condicionalmente *CcCdnL* (empleando el mismo protocolo que en A). DIC (del inglés differential interference contrast) y DAPI (tinción del DNA).

III.2.3 El gen *cccdnL* se expresa constitutivamente *in vivo*

Para estudiar el patrón de expresión de *cccdnL*, el gen chivato *lacZ* se fusionó aguas abajo de un fragmento de ~500 pb que contenía la región intergénica de 352 pb aguas arriba de *cccdnL*, en la que se espera se encuentre el promotor (Figura 53A).

A

TCCCCGCGACGATTTCTCAAGCCCAGAGCGTGACCGCTCGCGAAAGCTTGGCGGCGTCTCT
TTGCGCGCCAGGACGCAACCCTTTCATAGGGCTTAATTTTATGCTATTGCTTTCGACGACGT
GACAGCCGCGCTCGTTTCGCGACGGTCCGTCTTGTGCAAGAAGCCGTTTCAGAAAACCCATTT
GAACCGGCCCCGCGATCGAAGGCGAAGGGTGTCTTAGAGGTCTATTCCAAATCCTGACAGG
CGTGGCCCCGCGTTCCGTATTCCGCGGAGCGGGAACCTGTCGCTTTTGGTTTGGGAATGATG
ACGGCGTTCGGACCCCGAGGGTCCGTATTGAAGAGGACGAACATG

B

GGCGGGTTTCGGCCGCTCGGTTTCGTCACGGCTGACGGACGACAGATGGCGAGGCCGAAA
GCTGGGGAAATCCCGCCGGCACTTCGCGCTTTCGAGCGCGGCGACTTGATCGTTGCCGTG
CAGCAAAATTATTGATTTCCGCTCTTTTTTGTGATAGTTTTCATACACTGATCCACAGAGG
GTGCTTTTTCGCGCGCCGAAAACCAGCACGAAAGCACACGATCTCCACCGCGCGGCACCTTT
TGAGATATGCAACGGCCCCGTTGCTTGTGACTGCGCCATAAGAGCTTGTTTTCGCTTTCGTT
GGAGGACCAGGTGGACCCACCCGGCGGTATCTCCGTCTATCCCGGGCCTGACTGACCCGG
CCCCGGCCCCCTGTGAGGGCCGGGTGCGCACTAGGGAGTGTTTGAAACGAATG

Figura 53. Región promotora de *cccdnL* y *smcdnL*. **A)** Secuencia aguas arriba de *cccdnL* de *C. crescentus* (352 pb): sombreado en negra, las regiones -35 y -10; sombreado en gris, el inicio de la transcripción; recuadrado, el ATG de inicio de *cccdnL*. **B)** Secuencia aguas arriba de *smcdnL* de *S. meliloti* (409 pb), como en (A).

La elevada actividad β -galactosidasa observada durante la fase exponencial y estacionaria de crecimiento (Figura 54) indica que *cccdnL* se expresa de manera constitutiva, probablemente a partir de un promotor dependiente del factor σ mayoritario σ^A , al igual que *mxcdnL* y *mtcdnL* (Cortes *et al.*, 2013; García-Moreno *et al.*, 2010). Un estudio de cartografía global de sitios de inicio de la transcripción (TSS) en *C. crescentus*, realizado durante el transcurso de esta tesis, identificó un posible sitio de inicio de la transcripción para *cccdnL*, 233 nt aguas arriba del inicio de la traducción, que se encuentra incluido en el segmento promotor indicado en la Figura 53A. En dicho segmento se observa también una posible región promotora TTCATAG-x₁₂-GCTATTGT, que guarda cierto parecido con la secuencia consenso de reconocimiento

para el factor σ mayoritario σ^{73} de *C. crescentus* (5'-TTGaCg(c/g)-x₁₁₋₁₄-GCtAxA(a/t)C-3') (Malakooti & Ely, 1995; Thanbichler *et al.*, 2007).

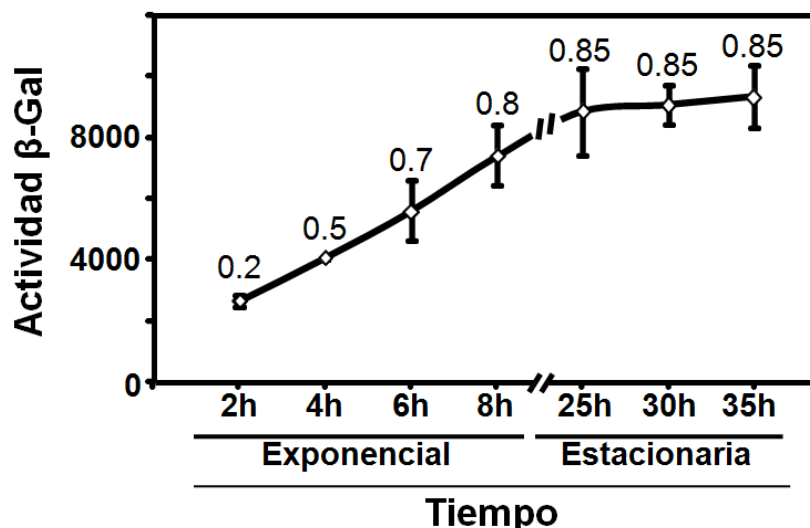


Figura 54. Actividad promotora de *cccdnL*. Actividad β -galactosidasa específica a distintos tiempos durante la fase exponencial y estacionaria. Sobre el trazado de la gráfica se indica la D.O. de los cultivos en el momento en que se extrajeron las muestras para la medida de la actividad

La región 5' no traducida (5'UTR) de *cccdnL*, de 233 nt, es mucho mayor que los 36 nt correspondientes a dicha región para *mxcdnL* o los 21 nt para *mccdnL* (Cortes *et al.*, 2013; García-Moreno *et al.*, 2010). Curiosamente, la región 5'UTR del promotor de *cdnL* de *Sinorhizobium meliloti* (Figura 53B), una alfaproteobacteria como *C. crescentus*, también es inusualmente larga (266 nt) y contiene, además del promotor dependiente de σ^A , promotores alternativos dependientes de los factores σ activados por choque térmico σ^{H1}/σ^{H2} (Barnett *et al.*, 2012; Schluter *et al.*, 2013). En general, las 5'UTR largas suelen estar asociadas con alguna función reguladora. Para comprobar si, como ocurre en *S. meliloti*, la longitud inusual de la 5'UTR de *cccdnL* tenía relación con una regulación por choque térmico, se comparó la actividad de la fusión *P_{cccdnL}::lacZ* a la temperatura normal de crecimiento (30 °C) frente a la observada a 40 °C (choque térmico). No se detectaron diferencias significativas en la expresión a estas dos temperaturas, ni en la fase temprana o media de crecimiento exponencial ni en la fase estacionaria (Figura 55), lo que sugiere que la mayor longitud de la región 5'UTR en *C. crescentus* no está relacionada con una regulación por choque térmico.

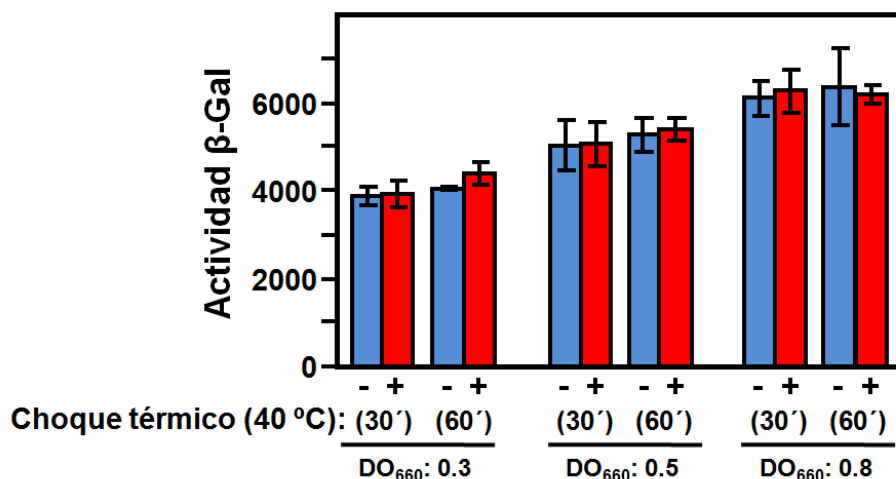


Figura 55. Actividad promotora de *CccdnL* a 30 o 40 °C. Actividad β-galactosidasa específica durante la fase temprana ($DO_{660} \sim 0.3$) y media ($DO_{660} \sim 0.5$) de crecimiento exponencial y en la fase estacionaria ($DO_{660} \sim 0.8$), tras 30 y 60 minutos a 30 °C (temperatura normal de crecimiento, barras azules) o a 40 °C (choque térmico, barras rojas).

III.2.4 CcCdnL está sujeta a degradación por ClpXP

Los dos últimos aminoácidos en la secuencia de CcCdnL son dos alaninas (AA) (Figura 49). Este motivo AA suele encontrarse en aquellas proteínas que son sustrato de ClpXP, una proteasa dependiente de ATP que es esencial en *C. crescentus* y que actúa sobre varias proteínas implicadas en la replicación, el ciclo celular o el desarrollo (Bhat *et al.*, 2013). Nos propusimos, por tanto, examinar la estabilidad de CcCdnL *in vivo* y determinar si es sustrato o no de ClpXP. Para ello, fusionamos el epítipo FLAG a CcCdnL para su análisis por Western usando anticuerpos anti-FLAG. Ya que la etiqueta podría enmascarar la señal terminal de reconocimiento para la proteólisis, se analizaron versiones que portaban la etiqueta tanto en su extremo N-terminal como en su extremo C-terminal. Solo pudo obtenerse la estirpe que expresaba, como única copia, CcCdnL etiquetada en su extremo C-terminal (CcCdnL-FLAG), lo que sugería que la etiqueta en el extremo N-terminal afectaba a la función *in vivo* (la fusión de etiquetas al extremo N-terminal de MxCdnL también interfiere con su función). Por ello, los estudios de estabilidad de la versión etiquetada FLAG-CcCdnL hubo que realizarlos expresando dicha fusión bajo el control del promotor P_{van} en una estirpe portadora de una copia de *CccdnL* en su sitio nativo (Figura 57A). Además, en dicha estirpe se introdujo el plásmido pM088, que contiene el alelo mutante *clpX** bajo el promotor inducible por xilosa. Ello permite expresar condicionalmente el mutante dominante negativo de ClpX, ClpX*, que al estar alterado en su sitio de unión a ATP anula la actividad catalítica del complejo ClpXP. De este modo, se puede estudiar el efecto de

ClpXP en la estabilidad de CcCdnL sin necesidad de deletar los genes correspondientes que, como se ha mencionado anteriormente, son esenciales (Potocka *et al.*, 2002).

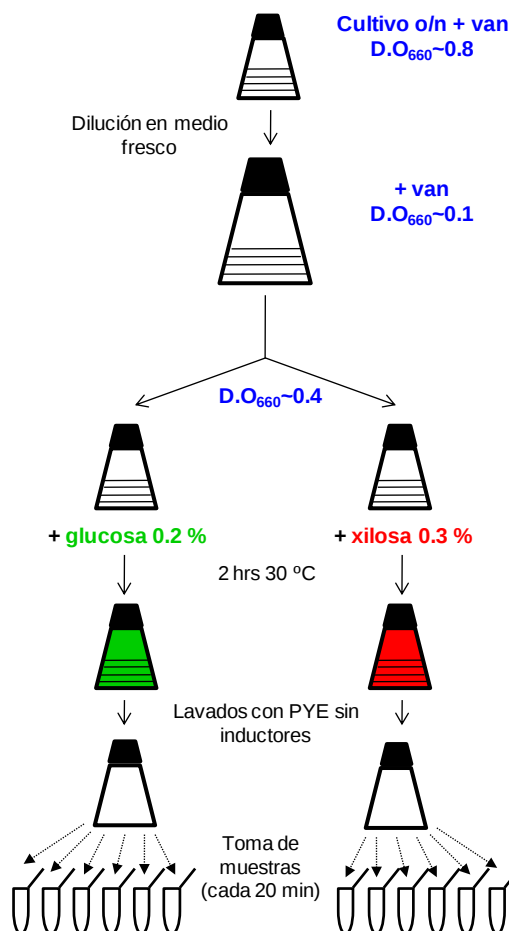


Figura 56. Protocolo utilizado para el ensayo de la estabilidad de CcCdnL. Las estirpes con $P_{van}\text{-flag-CcCdnL}$, $P_{van}\text{-CcCdnL-flag}$ o $P_{van}\text{-flag-CcCdnL(DD)}$ y con el plásmido pM088 ($P_{xii}\text{-clpX}^*$) crecieron toda la noche en medio PYE con vanilato 0.5 mM (rayas), tras lo cual fueron diluidas a $D.O_{660}=0.1$ en 20 ml del mismo medio. Cuando alcanzaron una $D.O_{660}=0.4$ el cultivo se dividió en dos cultivos de 10 ml, a uno se le añadió glucosa al 0.2 % (no induce la expresión de *clpX**, verde) y al otro xilosa al 0.3 % (induce la expresión de *clpX**, rojo) y se dejó creciendo durante 2 hrs. A continuación, las células se lavaron con PYE sin inductores (blanco), y se resuspendieron en 10 ml de medio fresco. Se tomaron alícuotas cada 20 minutos para su posterior análisis por Western.

En el ensayo de degradación mediante Western siguiendo el protocolo descrito en la Figura 56, FLAG-CcCdnL desapareció tras 60 minutos (tiempo de vida media de 32 ± 11 min) en ausencia de ClpX* pero pudo detectarse incluso después de 100 minutos cuando se expresó ClpX* (vida media de 47 ± 3 min, Figura 57). Además, la versión de FLAG-CcCdnL en la que el motivo AA se había sustituido por dos aspartatos, FLAG-CcCdnL(DD) fue considerablemente más estable *in vivo*, como

también lo fue CcCdnL-FLAG, con un aumento de la vida media de unas 10 veces en relación a la proteína silvestre, independientemente de la presencia o no de ClpX* efecto, diana de ClpXP y que el motivo AA C-terminal es un determinante importante.

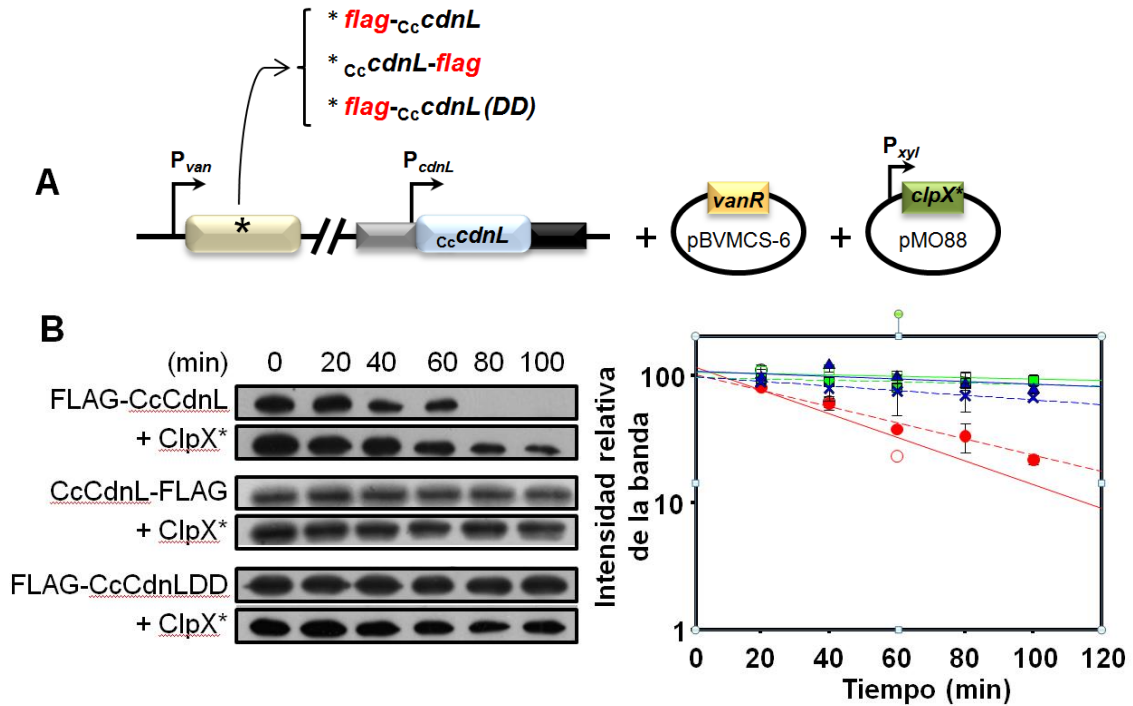


Figura 57. Estabilidad de CcCdnL y dependencia de ClpXP en *C. crescentus*.
A) Esquema de la estirpe que expresa *flag*-CcCdnL, CcCdnL-*flag* o *flag*-CcCdnL(DD).
B) Estabilidad de FLAG-CcCdnL, CcCdnL-FLAG y FLAG-CcCdnL(DD) *in vivo*. Estirpes de *C. crescentus* portadoras de los plásmidos pBVMCS-6 y pMO88, y que expresaban P_{van} -*flag*-CcCdnL, P_{van} -*flag*-CcCdnL(DD) o P_{van} -CcCdnL-*flag* se crecieron en medio PYE como se indica en la figura 58 y se analizaron mediante Western usando anticuerpos anti-FLAG (izquierda). A la derecha, gráfica semi-logarítmica de las intensidades relativas de las bandas a lo largo del tiempo (media de tres réplicas independientes y su error estándar). Las líneas corresponden al ajuste exponencial de los datos de las estirpes que expresan FLAG-CcCdnL (rojo), CcCdnL-FLAG (verde), o FLAG-CcCdnL(DD) (azul); línea continua: -ClpX*; línea discontinua: +ClpX*.

El aumento en la estabilidad de FLAG-CcCdnL(DD) o CcCdnL-FLAG conlleva a un aumento *in vivo* de la cantidad de CcCdnL que podría tener algún efecto en el crecimiento celular. Para analizarlo, se generaron estirpes (ME8, ME39, ME41, respectivamente, Figura 58A) que expresaban constitutivamente CcCdnL-FLAG, CcCdnL(DD) y CcCdnL (como control) bajo el control del propio promotor de CcCdnL, y que eran portadoras de una copia de P_{van} -CcCdnL en el sitio heterólogo, para su expresión condicional. En condiciones restrictivas, el crecimiento tanto en placa como en líquido de las estirpes que expresaban CcCdnL(DD) o CcCdnL-FLAG fue similar al observado en el control silvestre (Figura 58B, C). Así pues, aunque CcCdnL está

sujeta a proteólisis mediada por ClpXP, la acumulación intracelular de CcCdnL, ya sea por mutación o por inaccesibilidad del motivo C-terminal, no repercute negativamente en el crecimiento y la viabilidad de *C. crescentus*.

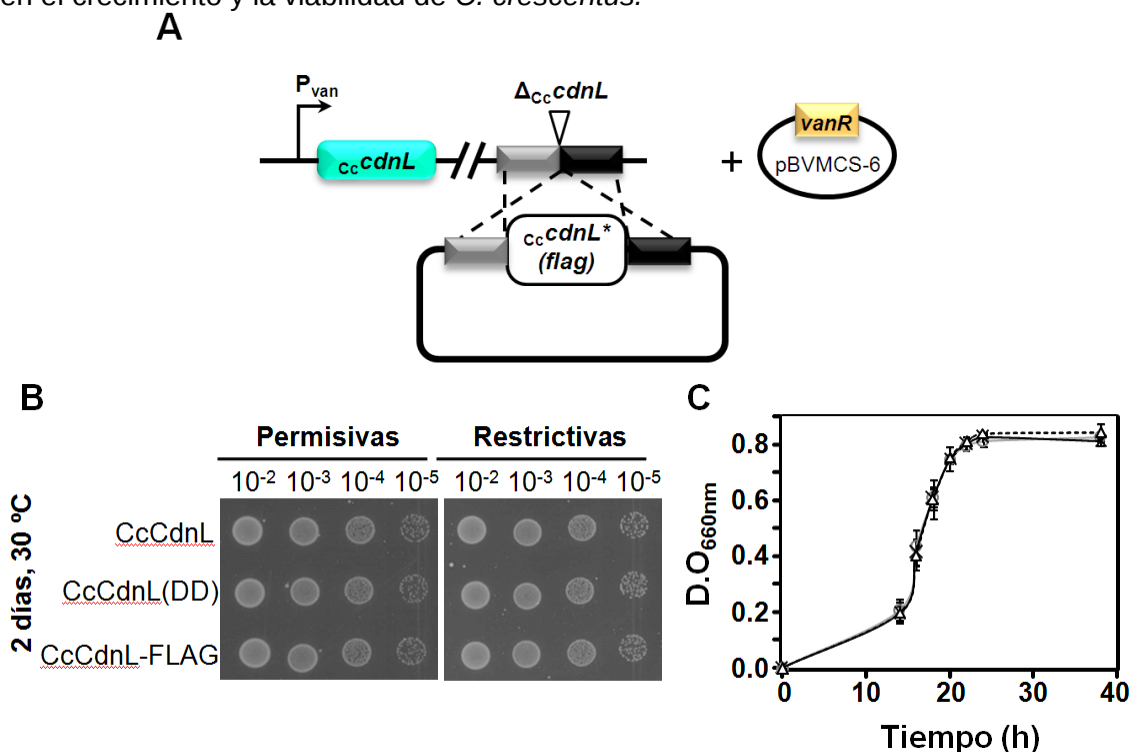


Figura 58. Efecto de CcCdnL(DD) y CcCdnL-FLAG sobre la viabilidad y el crecimiento.

A) Estrategia seguida para introducir alelos de *ccc*dnL en el sitio endógeno. Los alelos de *ccc*dnL objeto de estudio (*ccc*dnL*, en blanco), algunos de los cuales codificaban CcCdnL-FLAG o versiones de ésta, se clonaron en el punto de corte BamHI del plásmido pMR3552, flanqueado por la secuencia de DNA aguas arriba (gris) y aguas abajo (negro) de *ccc*dnL en el genoma. Con los plásmidos obtenidos se transformó la estirpe ME5, portadora de la delección de *ccc*dnL (Δ *ccc*dnL) y de una copia de *ccc*dnL (en celeste) en un sitio heterólogo expresada bajo el control del promotor inducible por vanilato P_{van} . **B)** Crecimiento en placa: gotas (8 μ l D.O₆₆₀~0.5) de diluciones seriadas de cultivos que expresan CcCdnL (control positivo), CcCdnL(DD) y CcCdnL-FLAG. Las placas se incubaron 2 días a 30 °C, en condiciones permisivas (con vanilato) o restrictivas (sin vanilato). **C)** Crecimiento en cultivo líquido a 30 °C y sin vanilato de las estirpes que expresan CcCdnL (*), CcCdnL(DD) (o), o CcCdnL-FLAG (Δ).

III.2.5 Análisis de la interacción de CcCdnL con la subunidad β de la RNAP, consigo misma y con el DNA

Como se ha comentado anteriormente, todos los homólogos de CdnL estudiados hasta el momento, con la excepción de BsCdnL de *B. subtilis* (Rabatinova *et al.*, 2013), interaccionan con la β RNAP. La interacción está mediada por una superficie expuesta al solvente en el extremo N-terminal del dominio β 1 de la β RNAP y por el dominio N-terminal de CdnL (~70 residuos). Para determinar si CcCdnL conserva la capacidad de interaccionar con la β RNAP utilizamos el análisis mediante DHB. En los ensayos de interacción entre MxCdnL o TtCdnL y sus respectivas β RNAP

bastó con un fragmento de ~120 residuos del extremo N-terminal de β RNAP, correspondiente al subdominio β 1a, para detectar la interacción (Figuras 31 y 33). En dicho subdominio recaen las mutaciones que afectan a la interacción de β RNAP con los factores TRCF (Deaconescu *et al.*, 2006; Smith & Savery, 2005), con MxCdnL (Figura 34) o con MtCdnL (Weiss *et al.*, 2012) pero, por separado, puede que no se pliegue correctamente (Westblade *et al.*, 2010). Probablemente por ello, en los ensayos con BbCdnL, ScCdnL, CgCdnL y MtCdnL (Figura 36; (Weiss *et al.*, 2012)) hubo que utilizar un fragmento más largo, de unos ~500 residuos, correspondiente al dominio β 1 completo (que incluye los subdominios β 1a y β 1b) para observar la interacción. Así pues, para analizar la posible interacción de CcCdnL con la β RNAP se realizaron construcciones tanto con el fragmento corto (β_{16-214}) como con el fragmento largo (β_{16-523}). Además, se probó la interacción con una construcción, $\beta_{(16-214-G-G-462-523)}$, en la que los dos subdominios de β RNAP se unieron por un conector de dos glicinas, pues en un estudio previo se había demostrado que una fusión equivalente de la β RNAP de *Thermus aquaticus* se plegaba correctamente y era capaz de interaccionar *in vitro* con TRCF-RID (Westblade *et al.*, 2010). Al igual que con algunos de los homólogos mencionados anteriormente, en el análisis mediante DHB no se detectó actividad β -galactosidasa cuando se utilizó el fragmento corto β_{16-214} de la β RNAP pero sí cuando se utilizó el fragmento más largo β_{16-523} (Figura 59A). Además, también se observó actividad β -galactosidasa, aunque a niveles inferiores, en las células que expresaban tanto CcCdnL como el fragmento $\beta_{(16-214-G-G-462-523)}$. Estos resultados indican que, como la mayoría de los homólogos estudiados hasta la fecha, CcCdnL mantiene la interacción con el dominio β 1 de la β RNAP.

Como se comentó anteriormente, los estudios estructurales con MxCdnL sugerían una mezcla de monómeros y dímeros en solución (Mirassou *et al.*, 2013; Mirassou *et al.*, 2009), y uno de los estudios estructurales con MtCdnL propuso una arquitectura homodimérica para dicha proteína (Kaur *et al.*, 2014). Además, en el caso de MxCdnL, la interacción consigo mismo se pudo observar también en los ensayos de DHB. Por ello, se utilizó el mismo método para analizar si CcCdnL es capaz de interaccionar consigo mismo. Los niveles elevados de actividad β -galactosidasa observados para las células que expresaban las proteínas de fusión T25-CcCdnL y CcCdnL-T18, comparados con los de las células que expresaban solo CcCdnL-T18, indican que CcCdnL interacciona consigo mismo (Figura 59B).

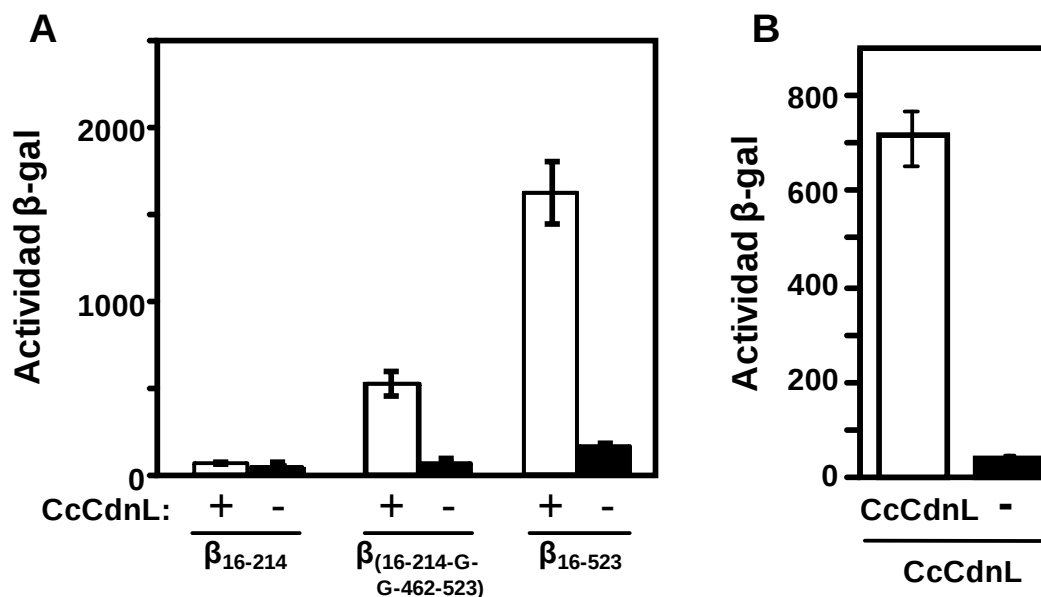


Figura 59. Interacción de CcCdnL con la β RNAP y consigo mismo. **A)** Análisis mediante DHB de la interacción de CcCdnL en pKT25 con la β RNAP de *C. crescentus* (fragmentos β_{16-214} , $\beta_{16-214-G-G-462-523}$ y β_{16-523} , como se indica en la figura) en pUT18C. **B)** Análisis mediante DHB de la interacción de CcCdnL consigo mismo (pKT25-*cccdnL* con *cccdnL*-pUT18). Tanto en **A** como en **B** se usó como control negativo pKT25 sin inserto.

En los ensayos de EMSA *in vitro*, MxCdnL no fue capaz de unirse al DNA independientemente de la presencia o no de DNA competidor, y de la concentración de proteína o longitud de la sonda utilizadas (apartado III.1.5.2). Por el contrario, en ensayos similares con altas concentraciones (μ M) de MtCdnL sí se observó una interacción, aunque débil e inespecífica, con el DNA que se ha atribuido al residuo de Trp conservado y la región básica que lo rodea situados en el dominio C-terminal (Garner *et al.*, 2014; Gulten & Sacchettini, 2013; Srivastava *et al.*, 2013). Como TtCdnL, y a diferencia de otros homólogos estudiados incluyendo MxCdnL y MtCdnL, CcCdnL es una proteína globalmente básica que podría, *a priori*, unirse al DNA y a otros polianiones (Tabla 7). Para los ensayos de EMSA con CcCdnL se utilizó un fragmento de DNA, que incluía la región promotora del rRNA, de un tamaño similar (350 pb) al empleado para MxCdnL y MtCdnL. Que en los experimentos de EMSA con CcCdnL realizados en ausencia de competidor inespecífico (poli[dG-dC] o poli[dI-dC]) se observase precipitación de la sonda en el pocillo, al igual que sucedió previamente con TtCdnL, apunta a una interacción inespecífica con el DNA. Así, cuando los experimentos se realizaron en presencia de competidor y a altas concentraciones de proteína (5-10 μ M) se pudo discernir una unión débil al DNA para CcCdnL, similar a la observada para TtCdnL, que no se apreció con MxCdnL (utilizado como control negativo). No obstante, la mayor parte de la sonda permaneció como DNA libre y la

pequeña fracción de sonda unida no dio lugar a la aparición de bandas concretas sino a un retraso difuso (Figura 60A). La leve unión observada disminuyó o desapareció cuando en los ensayos se utilizaron versiones de CcCdnL mutadas en los mencionados residuos básicos, R92A/R93A y R130A (Figura 60B). Parece, por tanto, que CcCdnL es capaz de unirse de manera débil al DNA y que en esa unión participan los residuos básicos del dominio C-terminal.

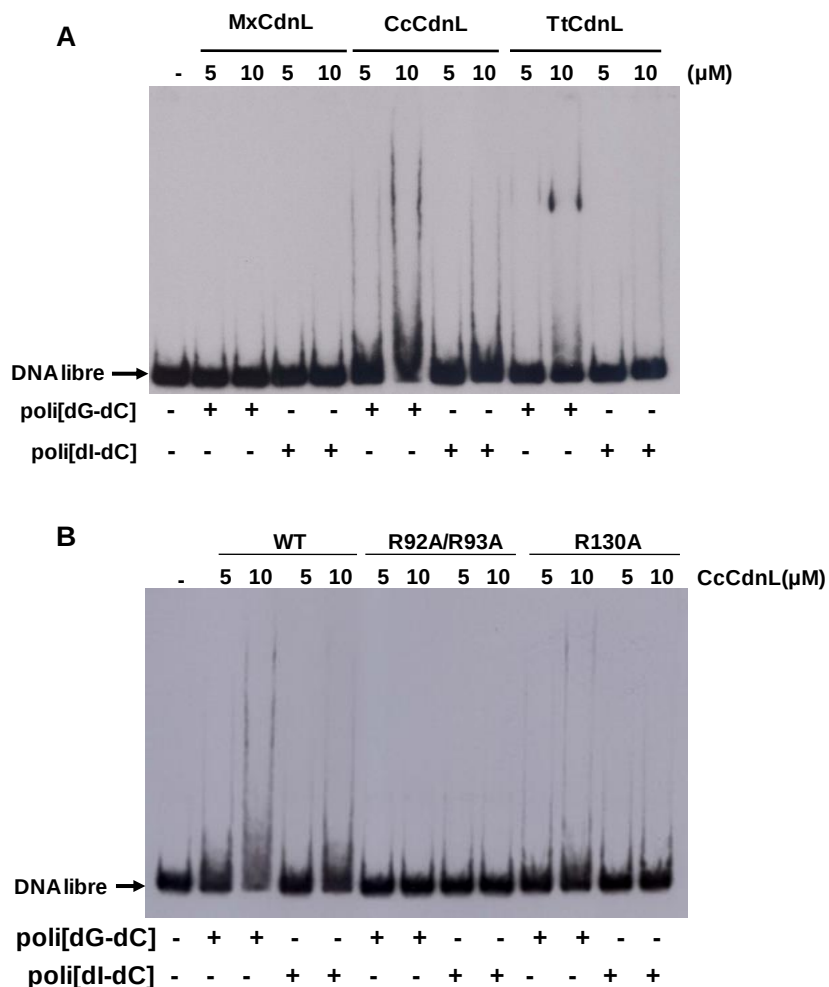


Figura 60. Interacción de CcCdnL con el DNA. **A)** EMSA para comparar la unión de MxCdnL, CcCdnL y TtCdnL al DNA (fragmento de 350 pb que incluye la región promotora de *rrnA* de *C. crescentus*). **B)** EMSA con versiones de CcCdnL mutadas en residuos básicos (R92A/R93A y R130A) del dominio C-terminal. **A** y **B** se indica la presencia o no del competidor inespecífico poly[dG-dC] o poly[dI-dC].

III.2.6 CcCdnL se une *in vivo* a la región promotora del rRNA y activa su transcripción

Como se ha comentado anteriormente, MxCdnL y MtCdnL se requieren para la expresión de los promotores de los rRNA, una función que muy probablemente está relacionada con su carácter esencial para la viabilidad celular. Además, acorde con un papel directo en la regulación de la transcripción de dichos promotores, ambas proteínas aparecen localizadas *in vivo* en los promotores de los rRNA (Figura 43; (Srivastava *et al.*, 2013)). CcCdnL también es esencial y, como MxCdnL y MtCdnL, interacciona con la β RNAP. Nos propusimos, por tanto, estudiar su posible papel en la regulación de los promotores de los rRNA. Para ello, en primer lugar se realizaron ensayos de ChIP (siguiendo el protocolo descrito en el apartado II.21) para analizar el posible enriquecimiento de CcCdnL en la región promotora de uno de los dos operones de rRNA que posee *C. crescentus* (P_{rmA}), en relación con una secuencia intragénica del gen CCNA_03364 (activado en respuesta a estrés por metales y dependiente del factor σ^F). Dado que carecíamos de anticuerpos anti-CcCdnL, los ensayos se realizaron con una estirpe (ME17) que expresa CcCdnL-FLAG, la forma funcional de CcCdnL etiquetada en su extremo C-terminal (Tabla 2; Figura 61A). El análisis cuantitativo (por PCR cuantitativa o qPCR) de los experimentos de ChIP reveló que, al igual que el factor σ^{73} y la subunidad β de la RNAP (utilizados como control positivo), CcCdnL se localiza preferentemente en P_{rmA} (Figura 61B).

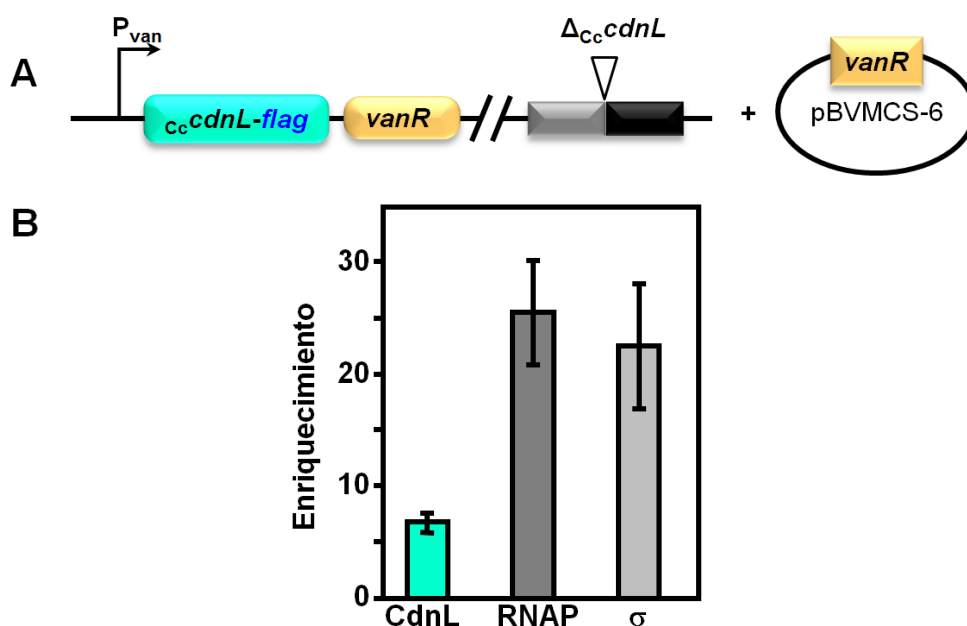


Figura 61. A) Esquema de la estirpe ME17. B) Análisis de la asociación *in vivo* de CcCdnL a la región promotora P_{rmA} mediante ChIP-qPCR

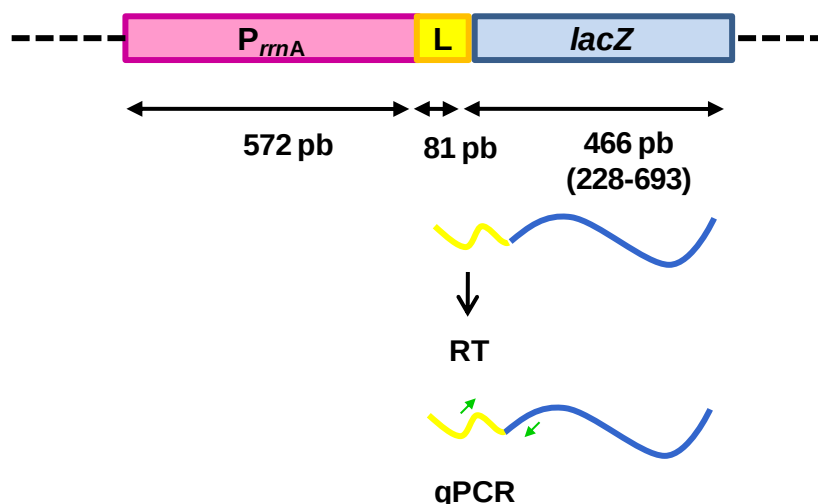


Figura 62. Estrategia para medir la expresión de la región promotora P_{rna} . En rosa la región promotora de P_{rna} , en amarillo las 81 pb de la región líder, en azul el fragmento del gen $lacZ$ unido a la región líder. La hebra amarilla-azul: el transcrito que sería retrotranscrito a cDNA y cuantificado por qPCR; flechas verdes: cebadores empleados en la qPCR (Tabla 6). Estrategia basada en la empleada por Boutte & Crosson, 2011.

Para examinar si CcCdnL afecta a la transcripción de P_{rna} *in vivo* se partió de la estirpe de *C. crescentus* que expresa $cccdnL$ bajo el control del promotor inducible por vanilato P_{van} (estirpe ME5, Figura 51) y que permitía, por tanto, controlar la cantidad de proteína disponible en la célula. Con el fin de analizar la actividad de solo uno de los dos operones de rRNA de *C. crescentus* mediante qPCR, a la estirpe ME5 se le introdujo un plásmido que contenía el promotor P_{rna} y 81 pb de su región líder seguida de un segmento del gen chivato $lacZ$ (nucleótidos 228-693) (Figura 62), generando la estirpe ME42. Como control endógeno para la cuantificación se utilizó el gen $ruvA$, que codifica una helicasa de DNA cuya expresión se mantiene constante y no varía ante la falta de glucosa. El diseño experimental utilizado se basó en un estudio previo encaminado a estudiar los factores implicados en el control transcripcional de la producción de rRNA en *C. crescentus* (Boutte & Crosson, 2011). En dicho estudio se había demostrado que la transcripción del rRNA en *C. crescentus* se reduce drásticamente ante la falta de glucosa de una manera que es independiente de DksA y dependiente de un factor desconocido. Para estudiar el posible papel de CcCdnL en la regulación de la expresión de los rRNA (cuando se iniciaron estos experimentos, todavía se contemplaba la posibilidad de que CdnL funcionase como un represor de la transcripción del rRNA) se realizó el siguiente experimento (véase Figura 63).

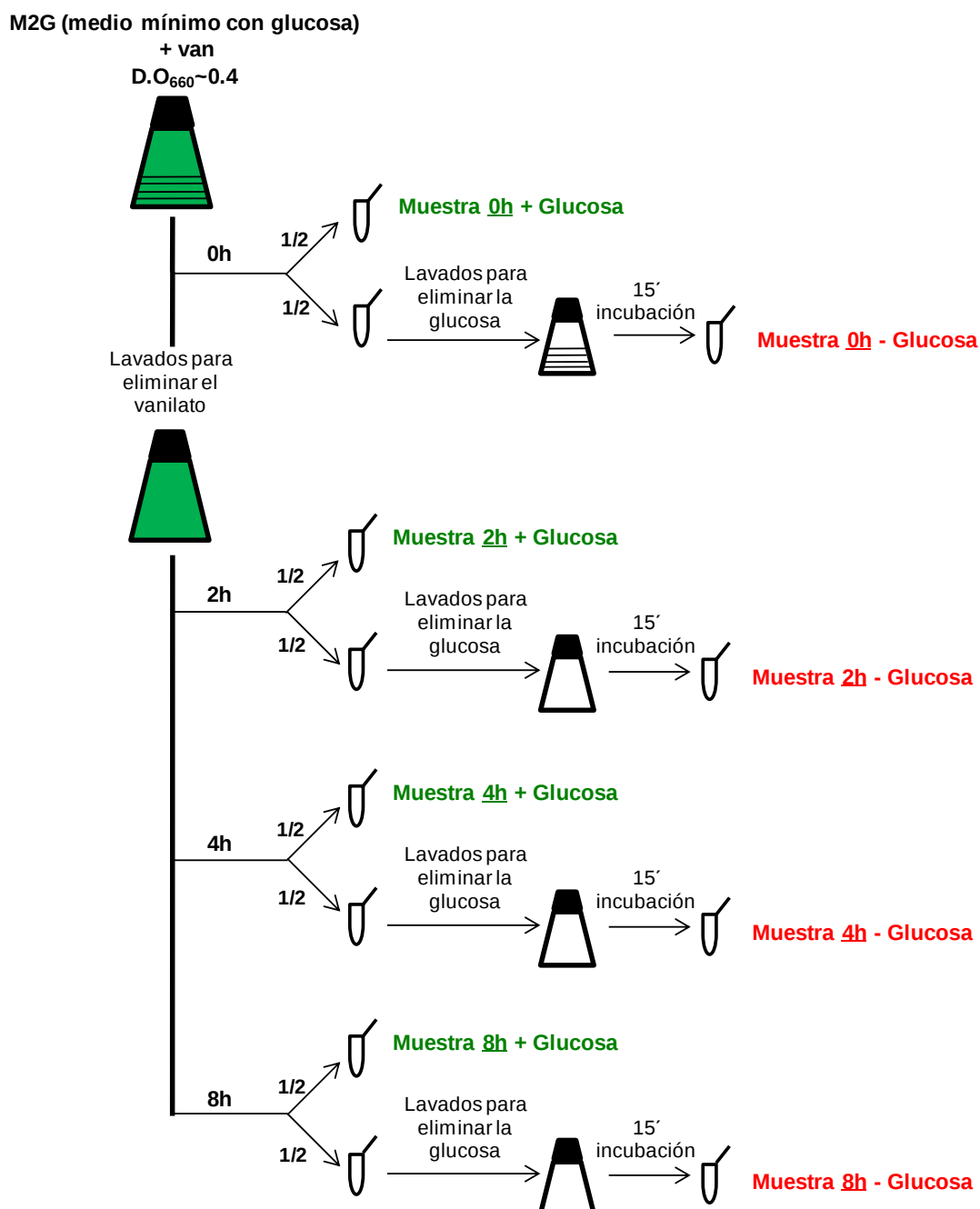


Figura 63. Protocolo seguido para determinar el efecto de CcCdnL sobre la actividad promotora de P_{rrnA} *in vivo*. La estirpe ME42 que expresa $CcCdnL$ bajo el promotor inducible por vanilato (o ME40 con $CcCdnL$ -flag) se creció en M2G con vanilato hasta D.O₆₆₀~0.4, y entonces se tomó una muestra inicial, la mitad de la cual no fue tratada y la otra mitad fue lavada y resuspendida en medio sin glucosa e incubada en agitación a 30 °C durante 15 minutos. El resto del cultivo fue transferido a medio fresco sin vanilato para impedir la expresión de $CcCdnL$ (o $CcCdnL$ -flag) y se tomaron muestras a las 2, 4 y 8 horas. En cada punto, de nuevo, la mitad de la muestra fue lavada y resuspendida en medio sin glucosa e incubada en agitación

La estirpe ME42 se creció en presencia de vanilato hasta mitad de la fase exponencial, tras lo cual se eliminó el vanilato para detener la expresión de $CcCdnL$. Justo antes de eliminar el vanilato ($t=0$) y a distintos tiempos (2, 4, 8 horas) tras su eliminación, se

tomó una muestra del cultivo. La mitad de dicha muestra se utilizó para medir la expresión del promotor del operón *rrnA* “con glucosa”, y la otra se lavó, se incubó sin glucosa durante 15 minutos, y se utilizó para comparar la expresión del promotor “sin glucosa”. En las muestras que permanecieron en glucosa se observó una clara disminución de los niveles de expresión a medida que aumentó el tiempo transcurrido en condiciones restrictivas (sin vanilato), lo que apunta a un papel positivo de CcCdnL en la expresión del rRNA (Figura 64A), similar al descrito para MxCdnL (apartado III.1.7) y para MtCdnL (Srivastava *et al.*, 2013) (tras descartar el papel represor propuesto inicialmente;(Stallings *et al.*, 2009)). La incubación durante 15 minutos en ausencia de glucosa provocó una bajada significativa de la expresión, no solo en condiciones en las que CcCdnL debe estar presente (justo antes de eliminar el vanilato, t=0), sino también cuando se espera que los niveles de CcCdnL sean despreciables, tras 2, 4 u 8 horas sin vanilato (Figura 64A). En principio, estos datos

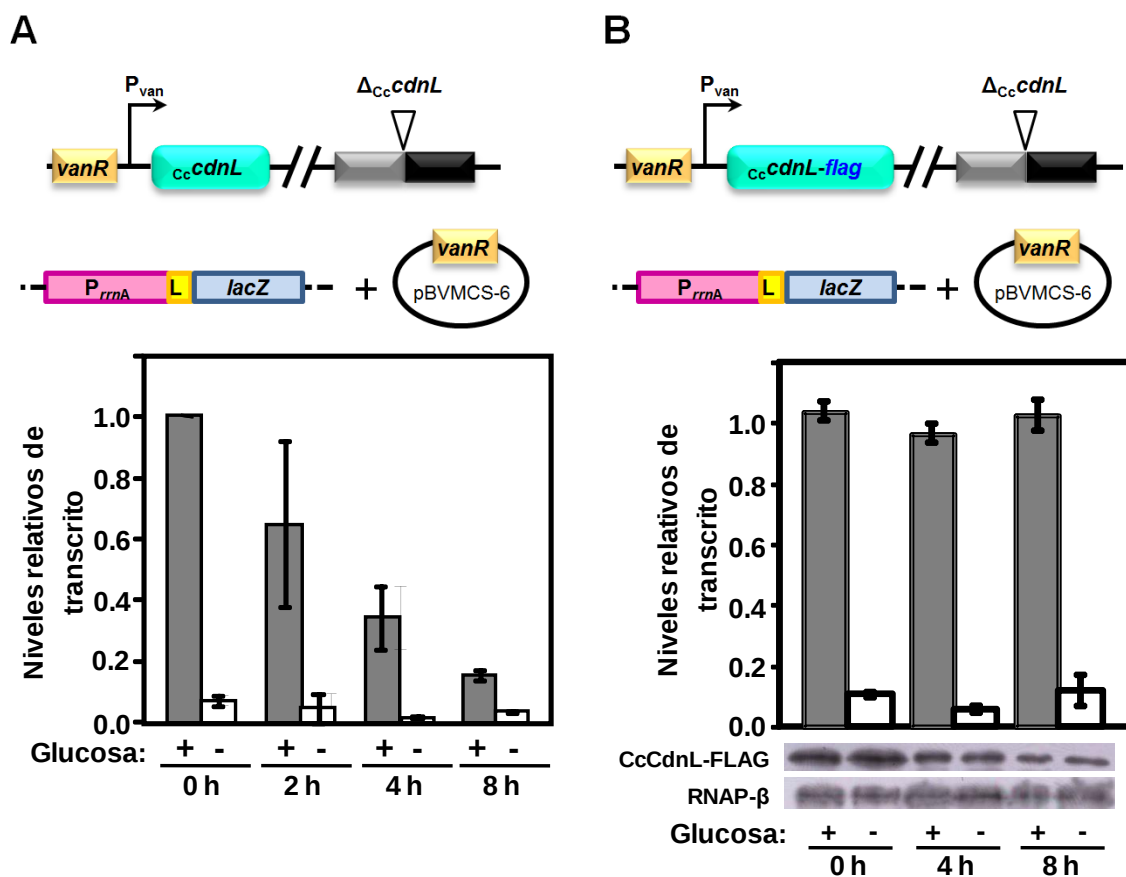


Figura 64. Efecto de la falta de CcCdnL en la actividad promotora de *P_{rrnA}* in vivo. **A)** La estirpe ME42, que expresa *CcCdnL* bajo el promotor inducible por vanilato (esquema simplificado de la estirpe en la parte superior), se creció en M2G con vanilato hasta D.O₆₆₀=0.4, y siguiendo el protocolo indicado en la Fig. *38 se tomaron muestras a los tiempos indicados para medir la actividad transcripcional de *P_{rrnA}*. **B)** Igual que A, pero con la estirpe ME40, que expresa *CcCdnL-flag* (esquema simplificado de la estirpe en la parte superior). Debajo de cada barra de medidas se indica el análisis por Western de las muestras usando anticuerpos anti-FLAG para detectar CcCdnL, y anti-βRNAP como control de carga.

sugerirían que CcCdnL no es el factor responsable de la respuesta a la falta de glucosa, a menos que en dichas condiciones la proteína sea mucho más inestable. Por ello, repetimos el análisis anterior, pero esta vez usando como fondo genético la estirpe ME17, que expresa CcCdnL-FLAG en lugar de CcCdnL. Esta versión etiquetada nos permite monitorizar los niveles de la proteína mediante ensayos de Western y, además, como se mostró anteriormente, es funcional y más estable que la versión nativa *in vivo* (apartado III.2.4). A la estirpe ME17 se le introdujo el mismo plásmido para medir los niveles de expresión del operon *rrnA*, generando la estirpe ME40. A diferencia de ME42, en este caso no se observó la disminución progresiva de los niveles relativos de transcrito en condiciones restrictivas y presencia de glucosa (Figura 64B). Esta diferencia probablemente radica en la mayor estabilidad de CcCdnL-FLAG, que pudo detectarse incluso tras 8 horas de incubación en ausencia de vanilato (Figura 64B). En medio sin glucosa, por el contrario, siguió observándose la reducción drástica de los niveles relativos de transcrito a todos los tiempos, aún cuando los niveles de CcCdnL-FLAG observados fueron similares con y sin glucosa (Figura 64B). En conjunto, estos datos indican que CcCdnL se requiere para que se produzca la transcripción del rRNA pero no para que se regule negativamente su expresión ante la falta de glucosa.

III.2.7 Las mutaciones que afectan a la función de CcCdnL son sensibles a frío

Una vez establecido que CcCdnL conserva la interacción con la β RNAP y su acción positiva sobre la transcripción del rRNA, estudiamos el efecto de mutaciones tanto en el dominio N-terminal de interacción con la RNAP, como en el dominio C-terminal, de función aún por esclarecer y al que se la ha atribuido un papel en la interacción con el DNA.

III.2.7.1 Mutaciones en el dominio N-terminal de CcCdnL

En primer lugar examinamos las mutaciones en los residuos situados en el dominio N-terminal, V39, R52, y P54, equivalentes a aquellos mutados en MxCdnL, TtCdnL y MtCdnL por su posible implicación en la interacción con β RNAP (apartado III.1.3). En el análisis por DHB, la interacción con Cc β 16-523 se redujo drásticamente cuando se mutaron en CcCdnL los residuos V39 o P54, pero no R52 (Figura 65). De ello se deduce que CcCdnL conserva al menos dos de los contactos con la RNAP esperados. Cada uno de estos tres alelos mutantes de CcCdnL se introdujeron en C.

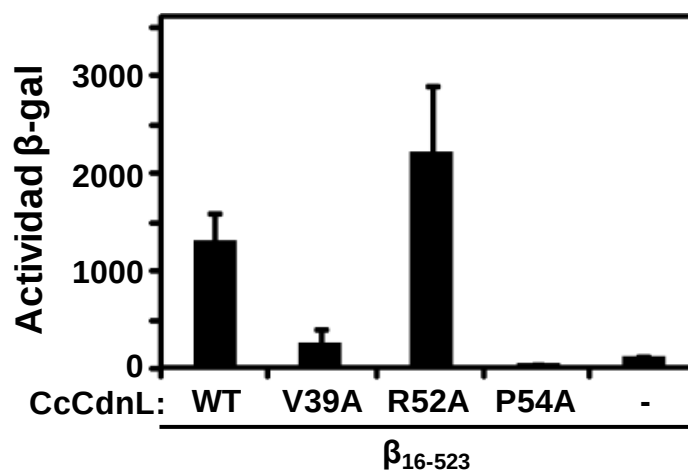


Figura 65. Análisis de la interacción de las versiones mutadas de CcCdnL V39A, R52A, y P54A (en pKT25) con el fragmento de la βRNAP de *C. crescentus* Ccβ₁₆₋₅₂₃ (en pUT18C). Como control negativo se utilizó pKT25 vacío.

crescentus para su análisis funcional. Siguiendo la misma estrategia anterior (apartado III.2.4, Figura 58), los alelos que expresaban las versiones mutantes de CcCdnL fusionadas en su extremo carboxilo al epítipo FLAG se clonaron en el punto de corte BamHI del plásmido pMR3552, para su posterior integración en el sitio endógeno por recombinación homóloga. Con dichos plásmidos se transformó la estirpe ME5 y los transformantes obtenidos se seleccionaron en medio PYE con vanilato (condiciones permisivas), en el que se expresa tanto la versión silvestre de CcCdnL como la versión mutada CcCdnL-FLAG. Para estudiar el efecto de las mutaciones sobre el crecimiento, las estirpes se crecieron en medio PYE sin vanilato (condiciones restrictivas), en el que solo se expresa la versión mutada. Sorprendentemente, cuando se analizó el crecimiento en condiciones restrictivas a 30 °C, la temperatura habitual de incubación, no solo el mutante R52A, sino también los mutantes V39A y P54A (afectados en la interacción con la RNAP), crecieron con normalidad (Figura 66). Estos resultados contrastan con la falta de función observada para los mutantes equivalentes en *M. xanthus* (apartado III.1.4), o en *M. tuberculosis* (aunque no en *M. smegmatis*, pese a ser también una micobacteria) (Weiss *et al.*, 2012).

Es conocido que, en ocasiones, las mutaciones pueden presentar sensibilidad a la temperatura. Por ello, decidimos analizar el fenotipo de los mutantes a 25 °C, una temperatura de incubación inferior a la utilizada habitualmente. Como se observa en la Figura 68, mientras que la estirpe con la versión silvestre o el mutante R52A, capaces de interactuar con la RNAP, mostraron un crecimiento similar en condiciones permisivas y restrictivas, los dos mutantes afectados en la interacción con la RNAP, V39A y P54A, a 25 °C sí mostraron una reducción significativa del crecimiento en

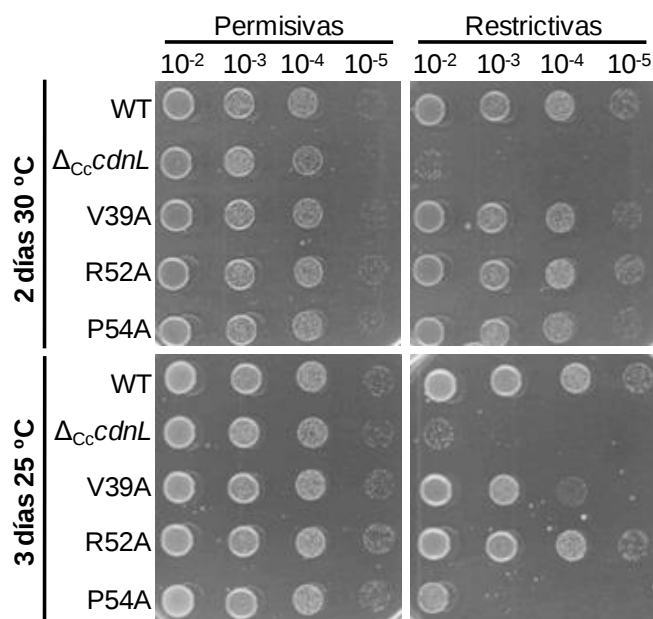


Figura 66. Análisis de complementación en *C. crescentus* con las versiones mutadas de CcCdnL V39A, R52A, y P54A (etiquetadas con el epítipo FLAG). Se depositaron gotas de 8 μ l de cultivo ($D.O_{660} \sim 0.5$), tras realizar las diluciones indicadas, sobre medio con o sin vanilato (condiciones permisivas y restrictivas, respectivamente).

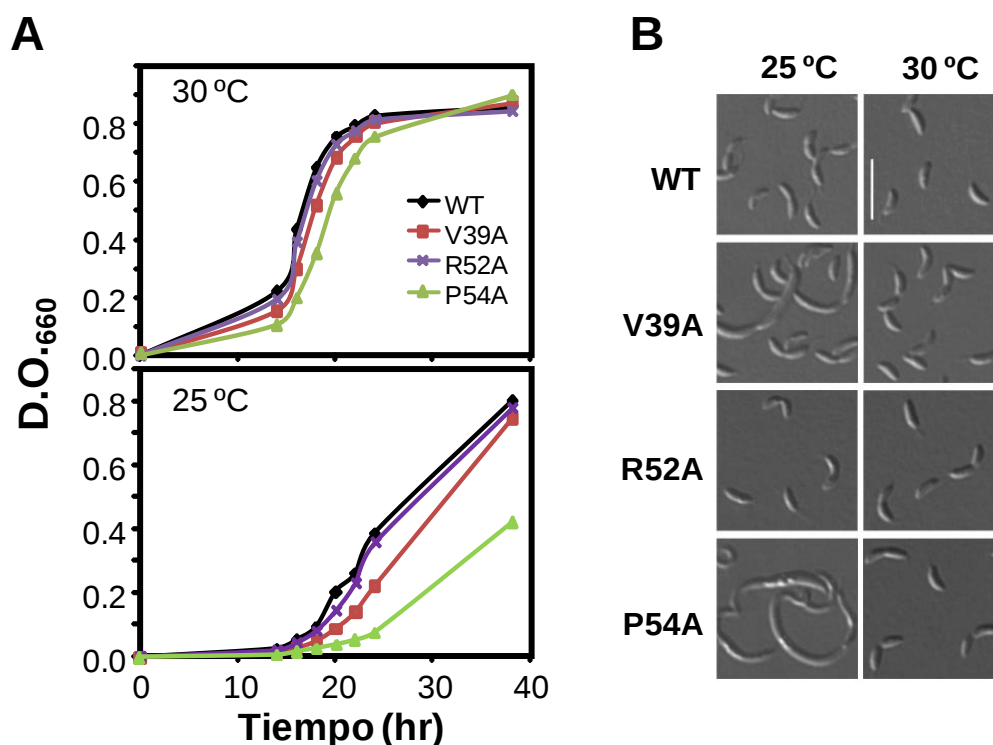


Figura 67. **A)** Curvas de crecimiento (medio líquido y sin vanilato) de las estirpes de *C. crescentus* que expresan la versión silvestre (WT) de CcCdnL-FLAG y las versiones mutadas en el dominio N-terminal bajo su propio promotor. Los correspondientes símbolos y colores se muestran en la figura. **B)** Morfología celular examinada al microscopio (DIC) de la estirpe silvestre y de los mutantes indicados, crecidos a 30 °C y 25 °C sin vanilato (condiciones restrictivas en las que solo se expresa la versión de *cccdnL-flag* introducida en el sitio endógeno). Marcador de escala (barra blanca): 10 μ m.

condiciones restrictivas, más acusada para el mutante P54A que también es el más afectado en la interacción con la RNAP en el doble-híbrido. Al igual que en medio sólido, en medio líquido a 25 °C fueron los mutantes V39A y, sobretodo P54A, los que mostraron un crecimiento más lento (Figura 67A), y una morfología celular aberrante (similar a la observada previamente para la estirpe $\Delta_{Cc}cdnL$), que no se observó cuando se crecieron a 30 °C (Figura 67B). El análisis mediante Western con extractos celulares de estos mutantes puso de manifiesto que las proteínas eran igualmente estables a ambas temperaturas *in vivo* (Figura 68). Así pues, el efecto de las mutaciones V39A y P54A no puede achacarse a una mayor inestabilidad proteica a 25 °C sino más bien a una bajada de la actividad

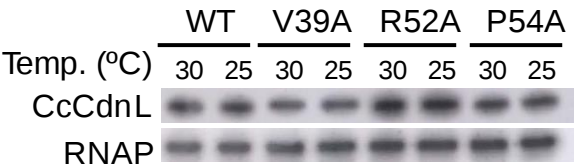


Figura 68. Análisis mediante Western de la estabilidad de los mutantes de CcCdnL (con la etiqueta FLAG) a 30 °C y 25 °C. Se analizaron extractos celulares con anti-FLAG (arriba), y con anticuerpos policlonales anti-RNAP (abajo) como control de carga.

III.2.7.2 Las mutaciones que afectan a la función de CcCdnL son sensibles a frío

A continuación, examinamos el efecto de las mutaciones en residuos específicos del dominio C-terminal, no implicados en la interacción con la RNAP. Se realizaron las

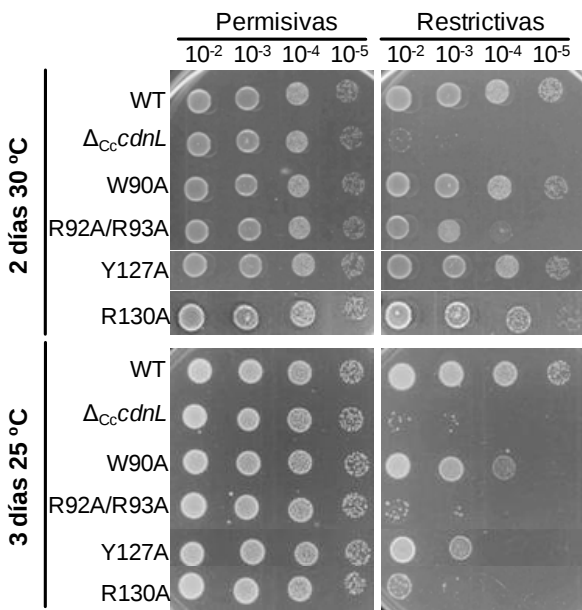


Figura 69. Análisis de complementación en *C. crescentus* con las versiones mutadas en el dominio C-terminal de CcCdnL indicadas (etiquetadas con el epítipo FLAG). Se depositaron gotas de 8 µl de cultivo (D.O₆₆₀~0.5), tras realizar las diluciones indicadas, sobre medio con o sin vanilato (condiciones permisivas y restrictivas, respectivamente).

mutaciones W90A, R92A/R93A, Y127A, y R130A, en residuos cuyas mutaciones causan una pérdida parcial o total de la función en al menos uno de los otros homólogos de CdnL estudiados (Figura 49). En las estructuras disponibles, estos residuos forman parte de una superficie expuesta al solvente constituida por residuos hidrofóbicos rodeados por residuos básicos, cuya función concreta sigue sin conocerse (apartado III.1.2.2). Para evaluar el efecto de las mutaciones se siguió la misma estrategia descrita para los mutantes en el dominio N-terminal. Cuando se analizó el crecimiento a 30 °C bajo condiciones restrictivas, solo se observó un defecto en el crecimiento para el mutante R92A/R93A (apartado III.2.4), que a 25 °C fue tan drástico como el de la estirpe $\Delta_{cc}cdnL$ (Figura 69). Por otro lado, el mutante Y127A y, más claro aún, el mutante R130A, a 25 °C sí presentaron una reducción en el crecimiento. El mutante con un fenotipo menos acusado fue precisamente el W90A

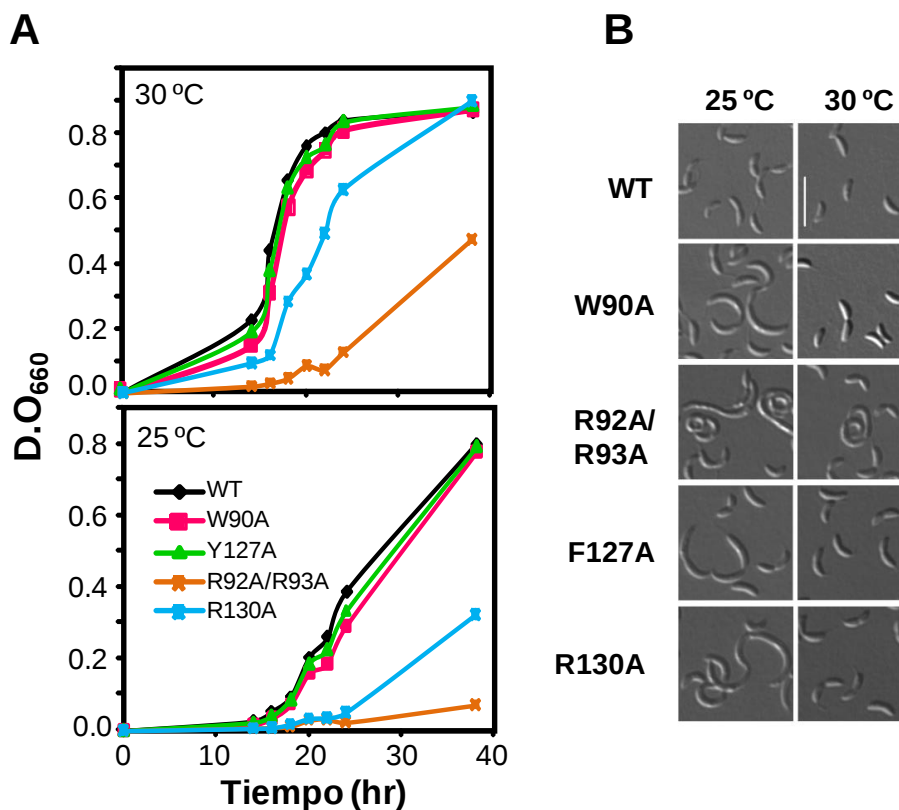


Figura 70. A) Curvas de crecimiento (medio líquido y sin vanilato) de las estirpes de *C. crescentus* que expresan la versión silvestre (WT) de CcCdnL-FLAG y las versiones mutadas en el dominio C-terminal. Los correspondientes símbolos y colores se muestran en la figura. **B)** Morfología celular examinada al microscopio (DIC) de la estirpe silvestre y de los mutantes de CcCdnL indicados, crecidos a 30 °C y 25 °C sin vanilato (condiciones restrictivas en las que solo se expresa la versión de *cccdnL-flag* introducida en el sitio endógeno). Marcador de escala (harrya blanca): 10 μm.



Figura 71. Análisis mediante Western de la estabilidad de los mutantes de CcCdnL (con la etiqueta FLAG M2) a 30 °C y 25 °C. Se analizaron extractos celulares con anti-FLAG (arriba) y con anticuerpos policlonales anti-RNAP (abajo) como control de carga.

(Figura 69), que afecta al residuo de Trp muy conservado, cuya mutación tampoco tuvo un efecto notable en *M. xanthus* (apartado III.1.5.1), pero sí en *M. tuberculosis* (Garner *et al.*, 2014). Los resultados en medio sólido se correspondieron bien con los observados en medio líquido (Figura 70A), y con el análisis al microscopio de la morfología celular (Figura 70B), siendo el doble mutante R92A/R93A, seguido del mutante sencillo R130A, los que mostraron un fenotipo más acusado. Nuevamente, la estabilidad de las versiones mutadas fue similar a 30 y 25 °C (Figura 71), por lo que la observada criosensibilidad de las mutaciones debe tener su origen en un defecto en la actividad, a baja temperatura, de las proteínas mutadas. Dicha sensibilidad al frío, al menos para el mutante R130A, estuvo acompañada de una reducción en los niveles de expresión del promotor ribosómico P_{rrnA} , que fueron significativamente más bajos a 25 °C que a 30 °C (Figura 72).

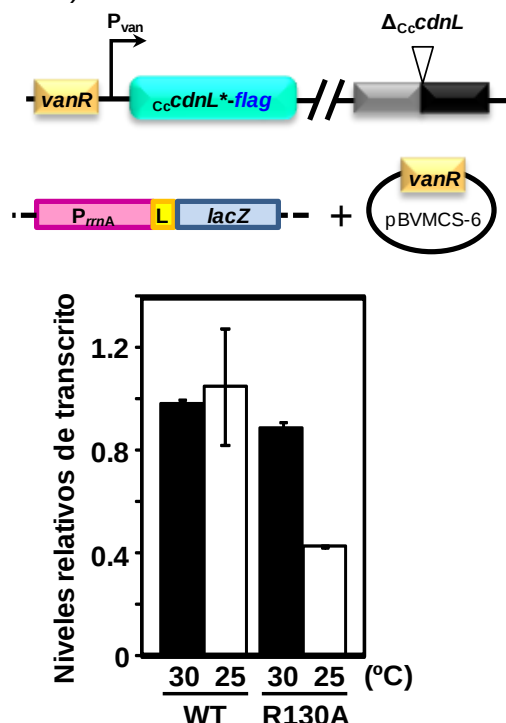


Figura 72. Análisis de la actividad promotora de P_{rrnA} en los mutantes de CcCdnL-FLAG P54A o R130A, a 30°C y 25 °C, en relación al silvestre (WT). Las células crecieron en M2G con vanilato toda la noche a 30 °C, entonces fueron diluidas a $D.O_{660}=0.1$ en medio fresco con vanilato, la mitad creció a 30 °C y la otra mitad a 25 °C hasta una $D.O_{660}$ de 0.3-0.4. El RNA fue cuantificado por qRT-PCR. * $CcCdnL(P54A)-flag/CcCdnL(R130A)-flag$

IV. DISCUSIÓN

IV.1 CdnL de *M. xanthus*

La proteína objeto de estudio en esta tesis, CdnL, es una de las pocas proteínas de la familia definida por el dominio N-terminal de CarD (CarDNT) que han sido caracterizadas hasta la fecha. Mientras que CarD (y, por tanto, CarDNT) está presente sólo en un subgrupo de mixobacterias y puede delecionarse sin afectar al crecimiento, CdnL está ampliamente extendido en bacterias (Bae *et al.*, 2015; García-Moreno, 2009) y, con la excepción de *B. subtilis* (Kobayashi *et al.*, 2003), es esencial para la viabilidad celular en las pocas especies en las que se ha estudiado (*M. xanthus*, *M. tuberculosis/smegmatis*, *B. burgdorferi* y *C. crescentus*; (Christen *et al.*, 2011; García-Moreno *et al.*, 2010; Stallings *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2008)). Los trabajos realizados en los últimos años con CdnL, MtCdnL, TtCdnL y CcCdnL están permitiendo esclarecer las bases moleculares de su función esencial y de su modo de acción. Además, los estudios con CarD realizados en paralelo por nuestro grupo están permitiendo obtener una mejor comprensión de las diferencias en el mecanismo de acción de CdnL y CarD, que comparten ciertas capacidades (interacción con β RNAP y regulación de la expresión génica) pero difieren en otras, tales como los promotores específicos que son diana de sus acciones reguladoras.

IV.1.1 Arquitectura de dominios de CdnL en *M. xanthus*

La estructura en solución de CdnL, determinada en colaboración con la Dra. María Ángeles Jiménez López (IQFR-CSIC), junto con el análisis funcional acompañado de un análisis mutacional exhaustivo, han permitido obtener información del papel celular y del modo de acción de esta proteína esencial para el crecimiento y la viabilidad en *M. xanthus*. CdnL presenta una arquitectura de dos dominios: un dominio N-terminal (CdnLNT) susceptible de degradación por subtilisina, capaz de interaccionar con la subunidad β de la RNAP, y un dominio C-terminal (CdnLCt) compacto, resistente a la subtilisina, y de función aún por esclarecer. La estructura de CdnLNT se asemeja mucho a la del dominio equivalente (TtCdnLNT) de la proteína homóloga de *T. thermophilus* determinada también por nosotros en paralelo. En ambos casos, dicho dominio adopta una conformación de tipo Tudor, con cinco láminas β antiparalelas, muy similar a la del dominio de interacción con la RNAP de los factores TRCF, y a la del dominio equivalente en la estructura cristalográfica de TtCdnL y MtCdnL, que fueron determinadas durante la realización de esta tesis (Gulten & Sacchettini, 2013; Kaur *et al.*, 2014). Este tipo de dominio también está presente en

alguna otra proteína bacteriana que se asocia con la RNAP, como es el factor de elongación de la transcripción NusG o RapA, implicado en el reciclaje de la RNAP en las múltiples rondas de transcripción, lo que sugiere que podría tratarse de un dominio general de interacción con la RNAP bacteriana. Por su parte, el módulo C-terminal, cuya estructura también se encuentra conservada entre los homólogos estudiados, está formado por cinco hélices α en una disposición que recuerda al denominado dominio TPR, normalmente implicado en las interacciones proteína-proteína. Aunque hasta el momento no se ha identificado ninguna proteína que interaccione con CdnLct en *M. xanthus*, cabe notar que el módulo equivalente en CarDNt interacciona con CarG (Bernal-Bernal *et al.*, 2015; García-Heras *et al.*, 2009; Peñalver-Mellado *et al.*, 2006). En este dominio C-terminal, que globalmente suele ser ácido, destacan una serie de residuos no polares rodeados de residuos básicos, todos ellos expuestos al solvente, que están conservados en sus homólogos, incluido CarDNt.

La estructura de los dominios N- y C-terminal de CdnL determinados por RMN coinciden bien con la estructura cristalográfica de sus homólogos. Sin embargo, llama la atención la considerable variación en la orientación relativa de los dos dominios en las distintas estructuras, incluso entre las dos estructuras publicadas de MtCdnL (Gulten & Sacchettini, 2013; Kaur *et al.*, 2014; Srivastava *et al.*, 2013). Una posible explicación es que estos dos dominios se encuentren unidos de manera flexible, como sugieren tanto los datos para CdnL obtenidos en esta tesis como los determinados para MtCdnL (Gulten & Sacchettini, 2013; Kaur *et al.*, 2014), y no de manera rígida, como se ha propuesto para TtCdnL (Srivastava *et al.*, 2013). Una conformación flexible del dominio N-terminal explicaría su susceptibilidad a ser degradado por proteólisis en CdnL o TtCdnL, y el intercambio de la lámina β 1 del dominio N-terminal observado en la formación del dímero de MtCdnL (Kaur *et al.*, 2014), el cual se muestra como monómero en complejo con la RNAP (Gulten & Sacchettini, 2013). Este intercambio monómero-dímero también ha sido observado en solución para CdnL (Mirassou *et al.*, 2013; Mirassou *et al.*, 2009), que interacciona consigo misma a través de su dominio N-terminal. Es posible que dicha flexibilidad de movimiento entre ambos dominios sea importante para la función de CdnL. De hecho, en la estructura reciente de TtCdnL con el complejo abierto de la RNAP (Bae *et al.*, 2015), la orientación relativa de los dos dominios aparece ligeramente alterada, con el dominio TtCdnLct rotado $\sim 11^\circ$ en relación al dominio N-terminal, para permitir la interacción con el DNA.

IV.1.2 Interacción de CdnL con la RNAP: importancia y conservación evolutiva

A partir de los datos estructurales obtenidos en esta tesis para CdnL y TtCdnLNt, y en base a la estructura del complejo formado por el dominio RID de TRCF de *T. thermophilus* y la β RNAP, se mutaron residuos en CdnL y TtCdnLNt, por un lado, y en la β RNAP de *M. xanthus* y *T. thermophilus*, por otro, candidatos a estar implicados en la interacción entre CdnL y β RNAP. Los datos indican que, salvo sutiles diferencias entre las proteínas de ambas bacterias, las superficies de contacto entre CdnL y la β RNAP están conservadas entre estas bacterias relativamente alejadas filogenéticamente (véase apartado III.1.3). Los resultados obtenidos muestran, además, que la interacción de CdnL con la β RNAP es indispensable para su función en *M. xanthus*, ya que mutaciones de un solo residuo en CdnL, como F36A, M49A, o P51A, que anulan dicha interacción, comprometen la viabilidad celular (véase apartado III.1.4). Lo mismo ocurre en micobacterias, en las que también se ha estudiado la función de CdnL *in vivo* (Weiss *et al.*, 2012). Curiosamente, aunque las mutaciones en residuos equivalentes de CarDNt (F41, M54, P56) también afectan a la interacción con la β RNAP, dichas mutaciones apenas tienen efecto *in vivo*, lo que indica que la interacción con la β RNAP, aunque se mantiene en CarD, no juega un papel importante para su función (Bernal-Bernal *et al.*, 2015). Ello probablemente esté relacionado con que CarD se una directamente al DNA a través de su dominio HMGA (en el promotor fotoinducible P_{QRS}, CarD se une a dos ristas de pares AT centradas en las posiciones -75 y -65; (García-Heras *et al.*, 2013; Padmanabhan *et al.*, 2001), mientras que CdnL deba ser reclutada al DNA por su interacción con la RNAP para ejercer su función reguladora (García-Moreno *et al.*, 2010).

Por otro lado, las mutaciones en la β RNAP que afectan a la interacción con CdnL también anulan la interacción con TRCF-RID (Figura 36) y con CarDNt (Bernal-Bernal *et al.*, 2015), lo que implica nuevamente que las superficies de contacto están conservadas. Por ello, en bacterias como *M. xanthus*, en la que están presentes las tres proteínas (TRCF, CdnL, y CarD), debe existir una competición por la interacción con la β RNAP que vendría determinada, entre otros factores, por los niveles intracelulares de las tres proteínas y sus afinidades relativas por la β RNAP. Hemos demostrado que otras proteínas homólogas de CdnL (BbCdnL, ScCdnL y CgCdnL) son capaces también de interaccionar con sus respectivas β RNAP. Sin embargo, ninguno de los homólogos estudiados, incluido el de *T. thermophilus*, son capaces de

reconocer la β RNAP de *M. xanthus* o de complementar la falta de función de CdnL (García-Moreno *et al.*, 2010). Estos resultados indican que aunque la interacción CdnL-RNAP se conserva en la mayoría de las especies bacterianas estudiadas, deben haber ocurrido pequeños ajustes a lo largo de la evolución, propios de cada especie, que impiden la interacción cruzada.

IV.1.3 El dominio C-terminal de CdnL es esencial para su función

El dominio CdnLNt, en el que reside la capacidad de interaccionar con la β RNAP, es esencial pero insuficiente para la función de CdnL, ya que existen también determinantes específicos y cruciales en el dominio C-terminal. Así pues, la función de CdnL no puede ser reemplazada por CarDNt, pese a que éste es capaz de interaccionar con la misma región de la RNAP, ni por una versión de CdnL que mantiene su dominio de interacción con la RNAP pero cuyo módulo C-terminal se ha sustituido por el de TtCdnL (García-Moreno, 2009). Además, nuestros análisis han revelado que el tramo básico R90-R91-R93 del dominio C-terminal, que forma parte de la superficie básica-no polar mencionada anteriormente, es crucial para la función de CdnL *in vivo*. Así pues, la mutación de los residuos R90-R91-R93, aunque no afectó a la interacción con la RNAP, provocó un fenotipo similar al de la estirpe Δ *cdnL*, mientras que la mutación de los residuos R128-R129, de esta zona no tuvo efecto aparente (Figura 39). Ambos segmentos básicos están conservados en MtCdnL (en TtCdnL, el residuo equivalente a R90 es una A y el equivalente a R129 una Q). Se ha sugerido que esta superficie básica está implicada en la unión débil e inespecífica al DNA pues su mutación en MtCdnL elimina dicha unión *in vitro* (Gulten & Sacchettini, 2013) e *in vivo* provoca una reducción en el crecimiento (Garner *et al.*, 2014). Sin embargo, la mutación del segmento R90-R91-R93 también afecta drásticamente al crecimiento de *M. xanthus*, sin que se haya podido observar la unión de CdnL al DNA *in vitro*, por lo que el papel crucial de dichos residuos en la función de CdnL está aún por determinar. Cabe resaltar que en CarDNt, que tampoco es capaz de unirse al DNA, la mutación de los residuos K93-R95-R97, equivalentes a R90-R91-R93 en CdnL, provoca una pérdida de función similar a la de la delección de *carD*, sin afectar a la interacción con CarG (Bernal-Bernal *et al.*, 2015). Cualquiera que sea el papel de este segmento básico parece estar conservado tanto en CdnL como en CarD.

La organización bimodular de CdnL y CarDNt, la similitud estructural entre sus módulos N-terminales y la conservación de la interacción con la RNAP, así como la

presencia en sus módulos C-terminales de un segmento básico funcionalmente importante para ambas, apoyan la propuesta (véase apartado **I.2.4.2**) de que CdnL y CarD (CarDnt) tienen un origen evolutivo común. Además, ambas proteínas están implicadas en la activación de la expresión génica dependiente de factores σ distintos pero relacionados filogenéticamente (pertenecientes a la familia σ^{70}).

IV.1.4 CdnL no está implicado en el desarrollo multicelular

Una de las propiedades más llamativas de las mixobacterias es su comportamiento social, que se pone de manifiesto mediante la formación de cuerpos fructíferos en respuesta a la falta de nutrientes (en particular, de aminoácidos). Aunque se han identificado muchos factores implicados en el proceso de desarrollo multicelular, no se ha prestado tanta atención a los factores responsables de disparar la señal de alarma, y a cómo dicha señal regula los primeros eventos durante la respuesta a la falta de alimento. Como en *E. coli*, el estrés nutricional provoca en *M. xanthus* el aumento de los niveles de ppGpp, una molécula que actúa como alarmona interaccionando con la RNAP para que se reduzca la tasa de transcripción de los rRNA, entre otros genes. Para ello, al menos en *E. coli*, el ppGpp actúa de manera sinérgica junto a la proteína DksA, que también interacciona con la RNAP y, en conjunto, desestabilizan los complejos abiertos de transcripción (Lennon *et al.*, 2012; Paul *et al.*, 2005; Ross *et al.*, 2013; Zuo *et al.*, 2013). Un trabajo inicial con *M. tuberculosis/smegmatis*, que carece de DksA, propuso que *MtcdnL*, cuya expresión aumenta unas 20 veces ante la falta de nutrientes, estaba implicado en la respuesta al estrés nutricional (Stallings *et al.*, 2009). En dicho estudio, y en base a que la falta de MtCdnL parecía ir acompañada de un incremento en la expresión de los promotores de los rRNA, se postuló que MtCdnL participaba en la inhibición de la expresión de los promotores ribosómicos, del mismo modo que DksA en *E. coli*.

La presencia tanto de CdnL como de DksA en *M. xanthus* nos llevó a estudiar el posible papel de los dos factores en el proceso de desarrollo multicelular. Si bien la falta de CdnL no tuvo ningún efecto sobre dicho proceso, la falta de DksA eliminó completamente la capacidad de fructificar. Como en *E. coli*, la proteína DksA de *M. xanthus* interacciona con la RNAP (García-Moreno *et al.*, 2009). Es probable, por tanto, que DksA colabore con la alarmona ppGpp para modular la acción de la RNAP y establecer el programa de expresión génica necesario para que se inicie la respuesta a la falta de nutrientes. Cabe esperar que entre los promotores sujetos a regulación

por ppGpp y DksA se encuentren los promotores de los rRNA, cuya expresión es probable que disminuya durante el desarrollo multicelular. Los estudios en curso en nuestro grupo contribuirán a esclarecer el papel de DksA en el desarrollo y en la regulación de la transcripción en *M. xanthus* en general (los estudios transcriptómicos ya realizados indican múltiples cambios en el patrón de expresión génica asociados a la falta de DksA).

Mientras que los resultados de esta tesis indican que CdnL no se requiere para la fructificación, la falta de CarD impide el desarrollo multicelular y la expresión de varios marcadores que se activan durante dicho proceso (Elías-Arnanz *et al.*, 2010; Nicolás *et al.*, 1996). Además, mientras que la expresión de CdnL no varía durante el desarrollo, la de CarD se activa transitoriamente durante las primeras etapas del proceso (García-Moreno *et al.*, 2009; Nicolás *et al.*, 1996). Así, en lo que se refiere a la respuesta al estrés nutricional, es CarD, más que CdnL, la que se comporta como MtCdnL, al mostrar una expresión incrementada en respuesta a la falta de nutrientes y una implicación en dicho proceso.

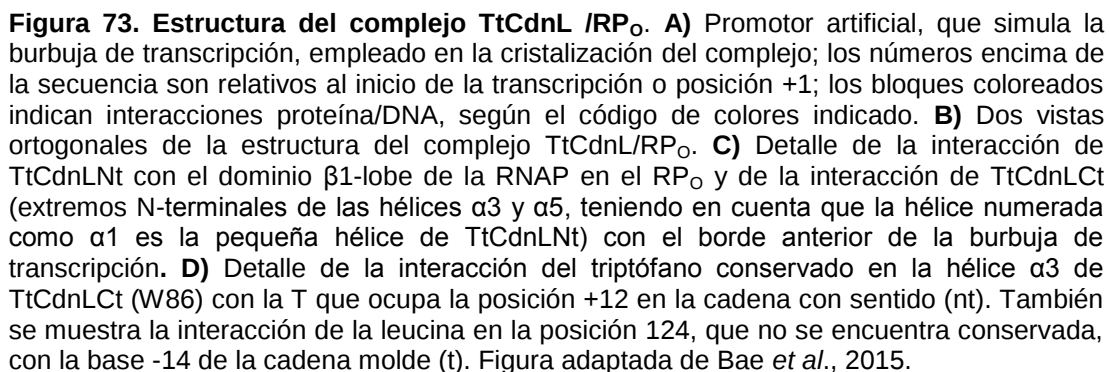
IV.1.5 Función reguladora de CdnL

Como se mencionó en la Introducción, el inicio de la transcripción es la etapa del proceso que con más frecuencia está sujeta a regulación. Los factores transcripcionales que controlan dicha etapa pueden hacerlo modulando cualquiera de los pasos, ya sea el reconocimiento inicial de las secuencias promotoras, el paso de complejo cerrado (RPc) a complejo abierto (RPo), o el escape de la RNAP del promotor. Gran parte de la información disponible sobre el proceso de transcripción y su control deriva de los estudios realizados durante años con *E. coli* y su RNAP, que se han considerado arquetipos de lo que ocurriría en otros sistemas. Sin embargo, de los trabajos más recientes con otros sistemas modelo, entre ellos *M. xanthus*, está emergiendo la idea de que el paradigma establecido a partir de los estudios en *E. coli* quizás se corresponda más con la excepción que con la regla (Davis *et al.*, 2015). Los resultados con CdnL, MtCdnL y TtCdnL apuntan a que se trata de un nuevo tipo de activador global, cuyo modo de acción revela diferencias intrínsecas entre la RNAP de *E. coli*, que carece de CdnL, y la de muchas otras especies bacterianas en las que sí se encuentra CdnL (Davis *et al.*, 2015).

En micobacterias, CdnL presenta un patrón de localización *in vivo* coincidente con la del factor σ^A , lo que sugiere una acción reguladora global sobre los promotores

dependientes del factor σ mayoritario σ^A (Srivastava *et al.*, 2013). Estos resultados están en consonancia con nuestros datos transcriptómicos en curso, que ponen de manifiesto numerosos cambios en el patrón de expresión génica asociados a la falta de CdnL en *M. xanthus*, y con la localización *in vivo* de CdnL en los dos promotores dependientes de σ^A que han sido probados, el promotor P_B y el promotor ribosómico $P4_{rmd}$. Estos resultados contrastan, sin embargo, con la acción reguladora de CarD, que más bien parece estar relacionada con los promotores dependientes de los múltiples factores σ -ECF que existen en *M. xanthus* (Abellón-Ruiz *et al.*, 2014). Es probable que la adquisición por CarD del dominio HMGA de unión al DNA, y de su capacidad de unirse a CarG a través de CarDnt, que aún mantiene algunos de los rasgos de CdnL, hayan permitido la diversificación funcional entre CdnL y CarD.

Aunque inicialmente se describió como un regulador negativo de la transcripción de los rRNA (Stallings *et al.*, 2009), posteriormente se demostró que MtCdnL es necesario para que se active la expresión de los promotores de los rRNA, un papel que lleva a cabo mediante la estabilización de los complejos RP_O formados por la RNAP- σ^A (Davis *et al.*, 2015; Rammohan *et al.*, 2015; Srivastava *et al.*, 2013). Al igual que MtCdnL, CdnL estimula *in vitro* la formación de los RP_O en los dos promotores dependientes de σ^A probados, especialmente en el promotor ribosómico $P4_{rmd}$. Al menos en micobacterias, la acción estimuladora de MtCdnL sobre el inicio de la transcripción parece estar relacionada con el hecho de que los RP_O formados en los promotores por su RNAP- σ^A son intrínsecamente inestables, cuando se comparan con los formados por la RNAP de *E. coli* (Davis *et al.*, 2015; Rammohan *et al.*, 2015). El modelo que se baraja es que CdnL establece interacciones favorables con el borde anterior de la burbuja de transcripción (la zona del promotor, en torno a la región -10, donde se separan las dos cadenas) en el complejo RP_O , y la estabiliza para impedir su colapso y el regreso al complejo cerrado RP_C . En base a la estructura de TtCdnL se ha propuesto que, una vez unido a través de su módulo N-terminal al dominio $\beta 1$ de la β RNAP, el W conservado del dominio C-terminal (W86 en TtCdnL) estaría en disposición de interactuar con el DNA alrededor de la posición -12 del promotor, justo aguas arriba de la burbuja de transcripción, que suele abarcar desde la posición -11 hasta la +4 (Srivastava *et al.*, 2013). Los datos recientes de la estructura de TtCdnL unida al complejo RP_O apoyan dicho modelo y apuntan a que ejerce su acción sin alterar alostéricamente la estructura de la burbuja de transcripción o las interacciones entre la RNAP y el promotor (Bae *et al.*, 2015). En el complejo, TtCdnL aparece



El W86, conservado en más del 95% de los homólogos (incluido MtCdnL, CdnL y CcCdnL), se sitúa entre las dos cadenas del promotor, como una cuña que mantiene las dos cadenas separadas y que, por tanto, aumenta la vida media del RP_O (Figura 73). Además, la cadena lateral del residuo de triptófano interacciona con la T de la cadena con sentido que ocupa la posición -12 (T_{-12}) y que forma parte del par de bases justo inmediatamente aguas arriba de la burbuja. Puesto que el efecto activador de TtCdnL sobre la transcripción *in vitro* disminuye notablemente al mutar tanto el residuo de triptófano como la base T_{-12} , los autores concluyen que la interacción entre el W86 y dicha base es importante para la función de TtCdnL (Bae *et al.*, 2015). Estos resultados son consistentes con un estudio cinético reciente en el que se demuestra que MtCdnL estabiliza el RP_O aumentando la tasa de isomerización del complejo cerrado al complejo abierto, y disminuyendo la tasa de colapso de la burbuja de transcripción, sin afectar a la tasa de formación del complejo cerrado (Rammohan *et al.*, 2015).

Curiosamente, la mutación del residuo conservado de triptófano en CdnL (o en CarDnt) no afecta significativamente a su función en *M. xanthus* ni a la estabilización del RP_O en el promotor $P4_{mD}$ *in vitro*, a pesar de que la base en la posición -12 de la cadena con sentido también es una T en $P4_{mD}$. Estos resultados sugieren ciertas diferencias en cuanto al modo de acción concreto de los homólogos, que cabe esperar se pongan de manifiesto en la estructura del complejo entre CdnL y la RNAP de *M. xanthus* que pretendemos obtener, en colaboración con el Dr. Fernández Tornero (CIB, CSIC). Dicha estructura permitirá esclarecer también el papel de los residuos básicos que rodean al mencionado triptófano, a los cuales no se hace mención en Bae *et al.* (2015) pero cuya mutación afecta a la función de MtCdnL (Garner *et al.*, 2014; Rammohan *et al.*, 2015) y, de manera drástica, a la de CdnL y CcCdnL. Cabe resaltar que dicha mutación de los residuos básicos también anula la función de CarD, a pesar de las diferencias en la secuencia de las regiones -10 de los promotores dependientes de CdnL (y el factor σ^A) y los dependientes de CarD (y los factores σ -ECF) (véase Figura 43). Ello sugeriría un papel de dichos residuos en una interacción electrostática, más que con el DNA, con algún elemento del holoenzima común a los dos tipos de complejos de transcripción, los dependientes de σ^A y los dependientes de los factores σ -ECF.

De tratarse del propio factor σ , cabría esperar que dicha interacción ocurriese con el dominio σ_2 , que en ambos tipos de factores σ es el que contacta con la región -

10. Sin embargo, de los modelos estructurales de TtCdnL y TtCdnL-RP_O no se deduce ninguna interacción proteína-proteína significativa entre TtCdnL y el factor σ^A en el RP_O (Bae *et al.*, 2015) aunque, según la estructura de CdnL determinada por nosotros y la de MtCdnL (Gulten & Sacchettini, 2013; Kaur *et al.*, 2014), la orientación relativa de un dominio respecto al otro podría ser flexible. Además, otro modelo estructural basado en la estructura dimérica de MtCdnL indica que, acoplando una de las unidades de este dímero sobre el holoenzima RNAP- σ^A , la otra unidad del dímero estaría próxima al factor σ^A y, por tanto, podría ser capaz de interaccionar con él (Kaur *et al.*, 2014). Tal interacción podría explicar que la acción de CdnL sea específica de los promotores dependientes de σ^A y la de CarD de los dependientes de los factores σ -ECF. Aunque en los ensayos de doble-híbrido no pudimos detectar ninguna interacción entre CdnL y σ^A (o sus dominios por separado; datos no mostrados), o entre CarD y el factor σ -ECF CarQ (García-Heras *et al.*, 2013), no se puede descartar que tal interacción ocurra en el contexto del complejo RP_O. En este sentido, cabe mencionar un par de factores transcripcionales bacterianos, RbpA y Crl, que, como CdnL, no se unen directamente al DNA e interaccionan con la RNAP. RbpA es una pequeña proteína que se encuentra solo en actinobacterias y que es esencial en micobacterias, y Crl se ha descrito hasta el momento solo en γ -proteobacterias y no es esencial. Aunque RbpA y Crl no muestran similitud de secuencia, ambos interaccionan con el núcleo de la RNAP así como con el dominio σ_2 de sus respectivos factores σ (σ^A y σ^B para RbpA; σ^S para Crl) (Banta *et al.*, 2014; Banta *et al.*, 2013; Bortoluzzi *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2014; Hubin *et al.*, 2015; Tabib-Salazar *et al.*, 2013), lo que apunta a que podrían desempeñar papeles análogos en el inicio de la transcripción. Curiosamente, RbpA estimula la transcripción de, entre otros, los promotores de los rRNA en micobacterias, al igual que MtCdnL. Resulta interesante, por tanto, que coexistan las dos proteínas, ambas esenciales, desempeñando tareas similares en los promotores de los rRNA. El modelado estructural sugiere que las interacciones de MtCdnL y RbpA con el RP_O son compatibles, pues interaccionarían por caras opuestas del DNA (Hubin *et al.*, 2015).

Aunque se desconoce el modo de acción concreto de RbpA y Crl, se ha propuesto que la doble interacción de estas dos proteínas con el núcleo de la RNAP y con el factor σ les permitiría actuar como un puente que facilitaría el ensamblaje de la RNAP sobre el promotor y los posteriores pasos en el inicio de la transcripción, incluidos la unión al promotor y la formación del complejo abierto y su estabilización. Es posible que CdnL, como RbpA y Crl, además de unirse al núcleo de la RNAP (en este caso, a β RNAP por su dominio N-terminal), gracias a la unión flexible entre

ambos dominios y a través de su dominio C-terminal, establezca contactos adicionales con elementos del complejo de transcripción, tales como el dominio σ_2 .

El análisis de las secuencias de los cuatro operones de rRNAs presentes en el genoma de *M. xanthus* (*rrnA*, *rrnB*, *rrnC*, y *rrnD*) nos ha permitido identificar múltiples posibles promotores en tándem, con regiones -35 y -10 casi idénticas, en cada uno de ellos (Figura 74): seis en *rrnA*, cuatro en *rrnB* y *rrnD*, y tres en *rrnC* (que numeramos P1, P2, etc., del más alejado al más próximo a los genes de los rRNA). En el trabajo

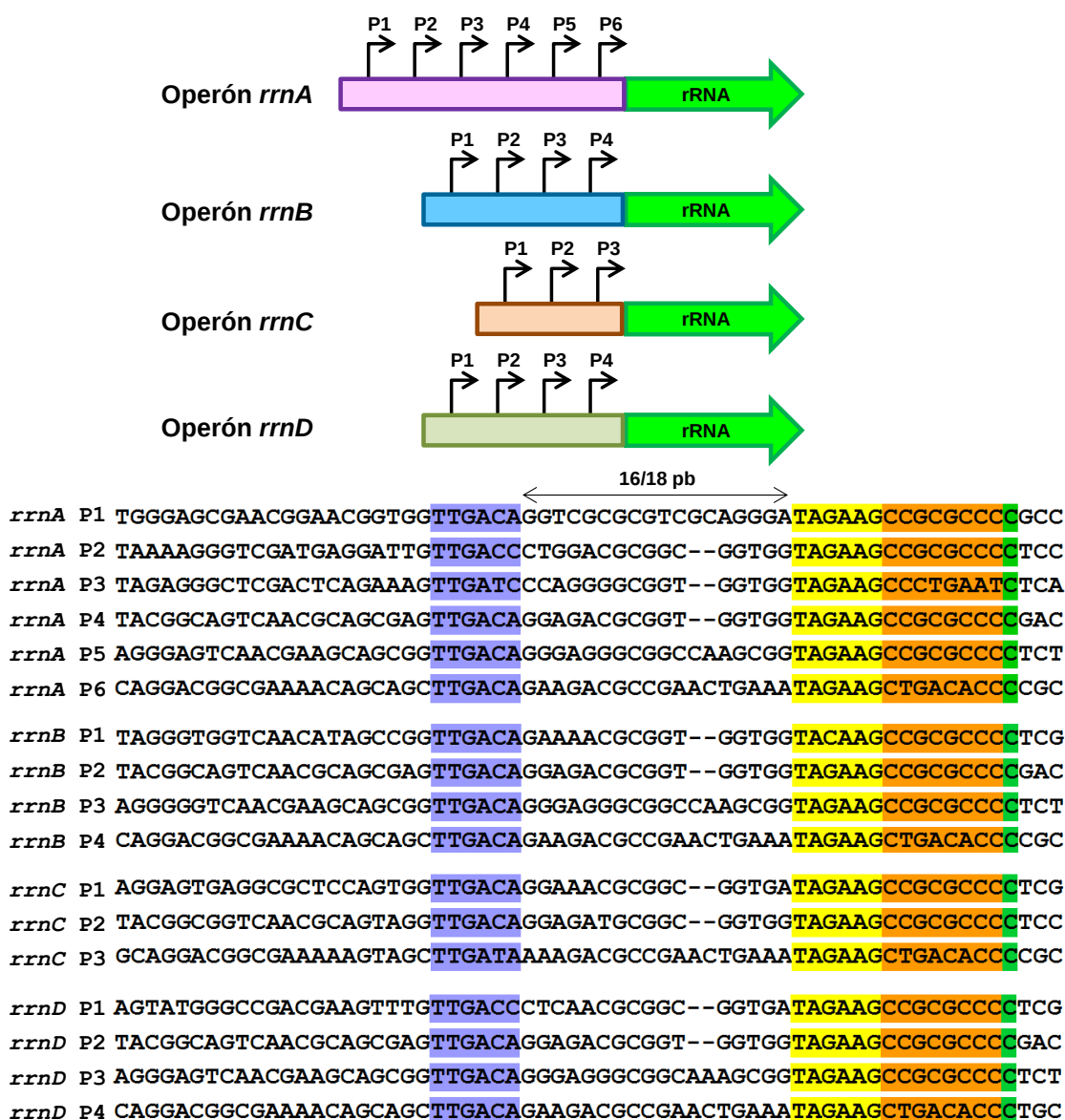


Figura 74. Posibles promotores de los operones de rRNA en *Myxococcus xanthus*. En la parte superior de la figura se muestra la disposición de los distintos promotores. En la parte inferior se muestra el alineamiento de los promotores de los distintos operones (en azul, la posible región -35; en amarillo, la posible región -10; en naranja, el posible elemento discriminador; en verde, el posible inicio de la transcripción).

presentado en esta tesis sobre el efecto de CdnL en la regulación de la expresión de los rRNA nos hemos centrado en el que denominamos promotor P4 del operón *rrnD* ($P4_{rrnD}$). Al menos en dicho operón, nuestros resultados (no mostrados) indican que el promotor $P4_{rrnD}$ es notablemente más fuerte que los otros tres. Llama la atención que los promotores más cercanos a los genes de los rRNAs de los cuatro operones ($P6_{rrmA}$, $P4_{rrnB}$, $P3_{rrnC}$ y $P4_{rrnD}$) se asemejan más entre sí, en la longitud del espaciador y en las secuencias justo aguas arriba y aguas abajo de la región -10, que a los promotores de sus respectivos operones (Figura 74). Cabe esperar que los estudios en curso permitan discernir si dichas diferencias en secuencia están relacionadas con las diferencias observadas en la actividad promotora y con la acción reguladora de CdnL. Dichos estudios permitirán evaluar también si las conclusiones extraídas a partir del análisis de los promotores del operón *rrnD* son extrapolables a los promotores de los otros tres operones.

IV.2 CdnL de *C. crescentus*

IV.2.1 Conservación de la función de CdnL en *C. crescentus*

La validación experimental de la función de diferentes proteínas anotadas como miembros de una misma familia es necesaria no solo para profundizar en las relaciones estructura-función sino también porque existen numerosos ejemplos de proteínas aparentemente relacionadas, en base a su similitud de secuencia, que difieren en su función. Así, como se ha comentado ya, CarD y CdnL coexisten en *M. xanthus* y pertenecen a la misma familia pero, pese a compartir varios dominios estructurales e interacciones, su función es distinta. Por otro lado, la proteína homóloga a CdnL en *B. subtilis*, que pertenece al phylum Firmicutes (muchos de cuyos miembros carecen de CdnL), no es esencial (Kobayashi *et al.*, 2003) y tampoco parece ser capaz de interactuar con la RNAP o de estabilizar la formación del RP_o en los promotores del rRNA (Rabatinova *et al.*, 2013). En alfa-proteobacterias, una amplia clase de bacterias con estilos de vida muy diversos, todas las especies cuyo genoma se ha secuenciado presentan un homólogo de CdnL. Sin embargo, hasta la realización de esta tesis ninguno de ellos había sido caracterizado. Por ello, nos centramos en el estudio del homólogo en la alfa-proteobacteria modelo *C. crescentus*, que resultó ser esencial como en la mayoría de las especies estudiadas.

IV.2.2 Regulación de la expresión de CdnL en *C. crescentus*

Consistente con su función esencial para el crecimiento, *cccdnL* se expresa constitutivamente tanto durante la fase exponencial como estacionaria. También se expresan constitutivamente *mxcdnL* y *mtcdnL*, a partir de un promotor dependiente del factor σ mayoritario σ^A (Cortes *et al.*, 2013; García-Moreno *et al.*, 2010). El aumento en la expresión de *mtcdnL* al inicio de la fase de ayuno (o en respuesta a otros estreses) (Stallings *et al.*, 2009) no se ha observado con *mxcdnL* ni en la fase temprana ni tardía del ayuno (García-Moreno *et al.*, 2010). Por otra parte, las bajas temperaturas parecen inducir la expresión de los promotores de *bscdnL* y de *cdnL* de *B. burgdorferi*, que están pendientes de ser caracterizados (Budde *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2008). Los datos obtenidos de los análisis de tipo global (5' RACE) para identificar sitios de inicio de la transcripción y posibles promotores en *C. crescentus* (Zhou *et al.*, 2015) y *S. meliloti* (Schluter *et al.*, 2013), otra alfa-proteobacteria, incluyen a *cdnL* entre los genes expresados a partir de promotores dependientes del factor σ mayoritario (σ^{73}). En ambas alfa-proteobacterias, llama la atención la longitud de la región 5'UTR, superior a 200 pb, frente al pequeño tamaño de dicha región en *mxcdnL* o *mtcdnL*. Como es habitual en las secuencias 5'UTR largas, es posible predecir estructuras secundarias en las 5'UTR de *cccdnL* o *smcdnL* que podrían contener elementos reguladores, tales como los que se han mostrado para los promotores de choque térmico (σ^H) de *S. meliloti* (Barnett *et al.*, 2012; Schluter *et al.*, 2013). En nuestros análisis no se observaron cambios apreciables en la expresión de *cccdnL* al someter las células a choque térmico (40 °C), quizás por la falta de un promotor dependiente de σ^H , o por la existencia de mecanismos compensatorios como la propia activación del factor σ^{73} provocada por el choque térmico y/o la capacidad de σ^H y σ^{73} de actuar sobre un mismo promotor (da Silva *et al.*, 2003; da Silva Neto *et al.*, 2013; Jonas *et al.*, 2013). Aunque, por el momento, desconocemos si la región 5'UTR juega algún papel en la expresión de *cccdnL*, al menos en las condiciones ensayadas no hemos podido observar una expresión regulada.

Además de al nivel transcripcional, la actividad de una proteína se puede controlar modulando su degradación. Nuestros datos sugieren que CcCdnL es sustrato de la proteasa ClpXP. Como en muchas otras proteínas cuya degradación depende de ClpXP, CcCdnL tiene un motivo AA en su extremo C-terminal que, cuando se muta o se enmascara con una etiqueta, mejora notablemente la estabilidad de la proteína *in vivo*. Que el motivo AA se encuentre en la mayoría de los CdnL de otras

alfaproteobacterias, tales como *Rhodobacterales* y *Rhodospirillales*, y también en *Caulobacterales*, sugiere que la regulación de los niveles de proteína por ClpXP es un hecho generalizado en los miembros de esta familia. Desconocemos si CdnL está sujeto a una regulación similar, pues apenas se han realizado estudios sobre la degradación de proteínas dependiente de proteasas ClpP en *M. xanthus*. En principio, que su secuencia C-terminal sea FNLA apunta a que no sería sustrato de ClpXP, aunque no se puede descartar completamente porque ClpXP muestra cierta tolerancia en el reconocimiento del motivo C-terminal. De hecho, MtCdnL, cuya secuencia C-terminal es AAAS es también diana de degradación de ClpXP que, al igual que en *C. crescentus*, es una proteasa esencial en *M. tuberculosis* (Raju *et al.*, 2014). Así pues, el mecanismo de regulación de los niveles de CdnL por degradación parece estar conservado más allá de *Caulobacterales*, lo que sugeriría que la regulación de los niveles de CdnL y, por tanto, de su actividad *in vivo*, es importante. Sorprende, por ello, que la desregulación de la degradación de CcCdnL por ClpXP y su consiguiente acumulación intracelular no afecte adversamente al crecimiento ni a la viabilidad celular en *C. crescentus*. Tampoco tuvo ningún efecto aparente la desregulación de la degradación de MtCdnL por ClpXP, el cual está presente a altos niveles intracelulares en *M. tuberculosis* (Raju *et al.*, 2014; Rammohan *et al.*, 2015), o la sobreexpresión de CdnL en *M. xanthus* (García-Moreno *et al.*, 2010). Así, por el momento, desconocemos el significado biológico de la regulación de la tasa de recambio de CdnL mediada por ClpXP.

IV.2.3 Implicación de CcCdnL en la regulación de la expresión del rRNA

Basado en estudios previos (Boutte & Crosson, 2011), el análisis de la implicación de CcCdnL sobre la expresión del rRNA se llevó a cabo sobre uno de los dos operones presentes en *C. crescentus*, el operón *rrnA*. Los únicos datos disponibles al inicio de esta tesis indicaban que el operón *rrnA* contenía un único promotor, seguido de una secuencia líder larga (Amemiya, 1989). El análisis global por 5' RACE realizado recientemente en *C. crescentus* describe, además del promotor propuesto por Amemiya (P1), otros cuatro promotores más en el operón *rrnA* (P2, P3, P4 y P5), mientras que al operón *rrnB* se le atribuye un único promotor (P2) (Zhou *et al.*, 2015). Sin embargo, la comparación manual de las secuencias 5' UTR de ambos operones permite localizar también un total de cinco posibles promotores en tándem para el operón *rrnB*, siendo P3, P4 y P5 muy similares a aquellos descritos para *rrnA* (Figura 75).

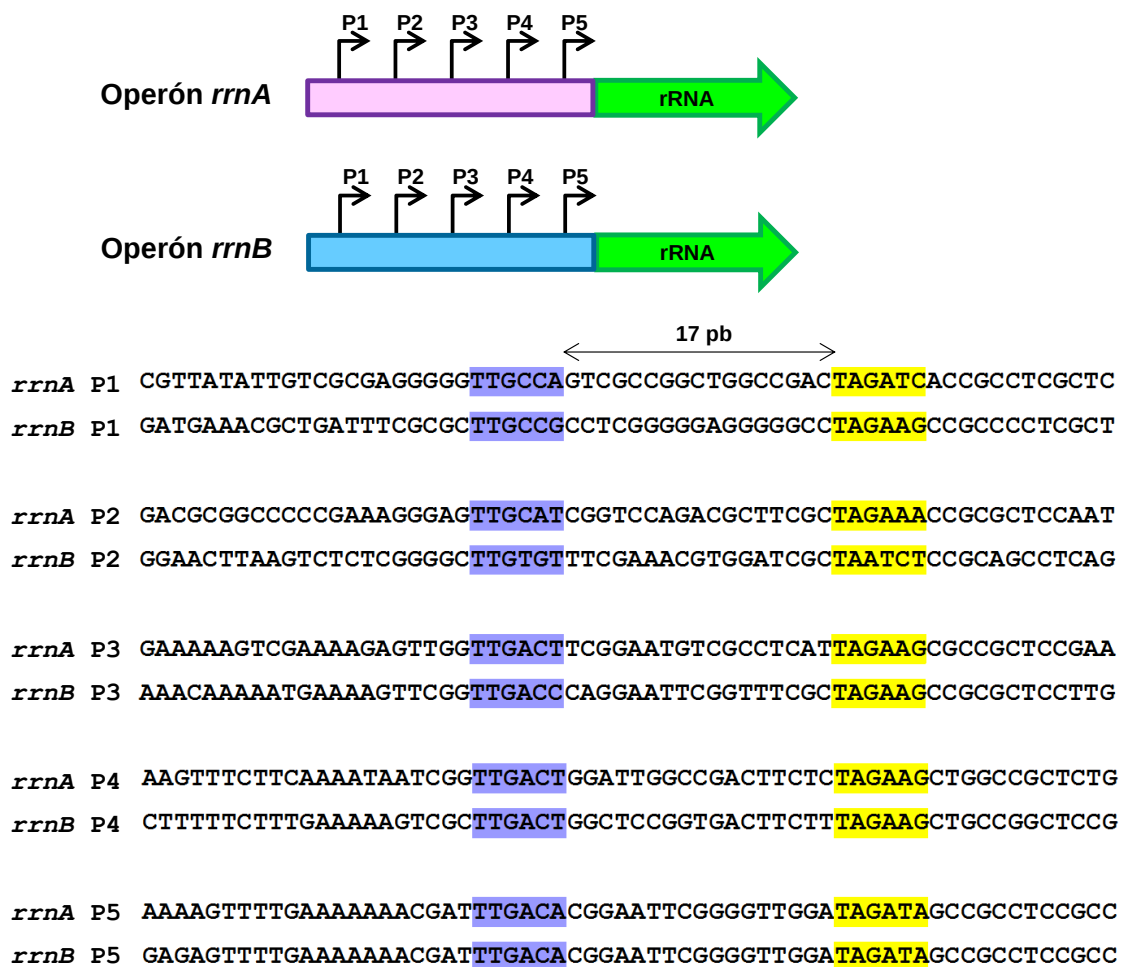


Figura 75. Posibles secuencias promotoras de los operones de rRNA de *C. crescentus*. En la parte superior de la figura se muestra la disposición de los distintos promotores. En la parte inferior se muestra el alineamiento de los promotores P1-P5 de los dos operones (en azul, posible región -35; en amarillo, posible región -10).

Estos datos indican que, como ocurre en *M. xanthus* (con hasta seis promotores en tándem) o *M. tuberculosis* (con tres promotores), la disposición de varios (más de dos) promotores en tándem, probablemente para aumentar o regular más finamente la cantidad de rRNA, es una estrategia compartida por diversas bacterias. De estos cinco promotores en tándem propuestos, los estudios realizados en esta tesis, al igual que otros realizados previamente (Boutte & Crosson, 2011), se centran en los promotores P1 y P2 del operón *rrnA*, cuya expresión depende de CcCdnL y está regulada por los niveles de glucosa. En principio, un mecanismo eficaz para lograr el rápido descenso en los niveles de rRNA *in vivo* sería la degradación de CcCdnL. Sin embargo, puesto que la reducción en la transcripción del rRNA persiste cuando la proteólisis mediada por ClpXP se ve impedida, debe existir otro mecanismo aún sin identificar. Curiosamente, DksA de *E. coli* también es sustrato de ClpXP (Flynn

et al., 2003) pero, sin embargo, se mantiene estable a altos niveles durante todas las fases de crecimiento (Chandrangsu *et al.*, 2011). Aunque la estabilización y el aumento de un regulador negativo como DksA podría, de nuevo, utilizarse para inhibir rápidamente la transcripción del rRNA en condiciones de ayuno, realmente se consigue controlando los niveles de pequeños cofactores tales como el ppGpp y los NTPs (Chandrangsu *et al.*, 2011).

Es probable que, al igual que P1 y P2, la activación de los promotores P3, P4 y P5 del operón *rrnA* (de ser validados experimentalmente) dependa de CcCdnL y esté regulada por los niveles de glucosa. Es probable también que ocurra lo mismo con los promotores del operón *rrnB*, muy similares en secuencia a los del operón *rrnA*. Quizás, como ocurre en *M. xanthus* y en *E. coli*, los distintos promotores varíen en su fuerza y en el grado de regulación.

IV.2.4 Las mutaciones que afectan a la función de CcCdnL son sensibles a frío

Un aspecto a destacar de los estudios llevados a cabo con *C. crescentus* en esta tesis ha sido la observación de que la mayoría de los mutantes de CcCdnL analizados solo exhiben el fenotipo deletéreo a una temperatura inferior a la utilizada normalmente en el laboratorio para su crecimiento. Dicha criosensibilidad se manifiesta tanto para las mutaciones en la región N-terminal, que impiden la interacción con la RNAP, como para las localizadas en la región C-terminal, que no afectan a dicha interacción. Es probable que CcCdnL, como MxCdnL y MtCdnL, funcione estabilizando la formación del RP_O en los promotores dependientes del factor σ primario σ^A , tales como los promotores del rRNA, en los cuales se localiza *in vivo*, y que la criosensibilidad de los mutantes esté relacionada con el efecto de la temperatura sobre la formación del RP_O. Al menos *in vitro*, el RP_O se forma con mayor eficacia a altas temperaturas (que favorecen la formación de la burbuja) que a bajas temperaturas (Ruff *et al.*, 2015; Saecker *et al.*, 2011). Por otro lado, aunque no se ha descrito un efecto de la temperatura sobre el fenotipo de los mutantes de MtCdnL *in vivo* (tampoco lo hemos observado en *M. xanthus*), el efecto de MtCdnL y CdnL *in vitro* es más patente a temperaturas altas que bajas. Así pues, un estudio cinético reciente realizado con MtCdnL muestra que su efecto estabilizador de la formación del RP_O *in vitro* ocurre de manera mucho más eficaz a 25 °C, que a baja (10 °C) o alta (37 °C) temperatura (Rammohan *et al.*, 2015). La interpretación de estos resultados es que, a

10 °C, la apertura de la doble hélice está comprometida y la presencia de MtCdnL no basta para desplazar el equilibrio hacia la formación del RP_O . A 37 °C, el RP_O por sí mismo se forma con mayor facilidad y el requerimiento de CdnL es menos apreciable. A 25 °C, hay mayor equilibrio entre el RP_C y el RP_O , y es cuando la presencia de MtCdnL marca la diferencia, desplazando el equilibrio hacia la formación del RP_O . En dicho estudio se ha observado también que los mutantes de MtCdnL en el dominio N-terminal, deficientes en la interacción con la RNAP, están afectados incluso en el reclutamiento inicial de la RNAP para formar el RP_C . Y que los mutantes en el dominio C-terminal (capaces de interaccionar con la RNAP) se parecen al silvestre en su asociación con el RP_O o el RP_C , pero son defectivos en la aceleración de la apertura del DNA o inhibición del colapso de la burbuja de transcripción y, por tanto, no estabilizan el RP_O (Rammohan *et al.*, 2015).

Que las mutaciones en CcCdnL muestren sensibilidad a la temperatura *in vivo*, y las mutaciones similares en MxCdnL y MtCdnL afecten a la función incluso a temperaturas normales de crecimiento, sugiere un mayor umbral de inactivación de estas mutaciones en CcCdnL. Quizás, ello se deba a diferencias intrínsecas entre sus homólogos y CcCdnL, que probablemente ha evolucionado para adaptarse al particular nicho oligotrófico de *C. crescentus*. Cabe también la posibilidad de que los complejos RP_O formados por la RNAP de *C. crescentus* sean intrínsecamente más estables que los de *M. xanthus* o *M. tuberculosis* a las temperaturas que normalmente se utilizan para su crecimiento, de tal manera que el defecto provocado por las mutaciones puntuales en CcCdnL se ponga de manifiesto solo a temperaturas más bajas, en las que la estabilidad del RP_O se vea reducida. Sería necesario purificar la RNAP de *C. crescentus* para realizar un análisis comparativo del efecto de la temperatura *in vitro* sobre la estabilidad de los RP_O formados por las distintas RNAP.

Como se ha comentado anteriormente, *B. subtilis* presenta una RNAP que forma complejos RP_O inestables (Whipple & Sonenshein, 1992) y, sin embargo, CdnL no parece unirse a la RNAP, ni regular la transcripción del rRNA, ni ser esencial (Kobayashi *et al.*, 2003; Rabatinova *et al.*, 2013). Quizás, como ocurre con *C. crescentus*, los resultados negativos estén relacionados con un efecto de la temperatura, que no se ha estudiado en *B. subtilis*. No obstante, y consistente con su posible dispensabilidad, muchos miembros de la familia Firmicutes, el filo al que pertenece *B. subtilis*, carecen de CdnL.

V. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten establecer las siguientes conclusiones:

1. Las estructuras determinadas por RMN para el dominio N-terminal de CdnL (CdnLNT) y TtCdnL (TtCdnLNT) son muy parecidas y se asemejan a la estructura de los dominios Tudor, compuestos por un sándwich β retorcido con cinco láminas β antiparalelas, $\beta 5$ - $\beta 1$ - $\beta 2$ - $\beta 3$ - $\beta 4$, y una hélice 3_{10} entre $\beta 4$ y $\beta 5$. Dicho dominio está implicado en la interacción con la subunidad β (dominio “ $\beta 1$ - lobe”) de la polimerasa de RNA (RNAP).
2. El dominio C-terminal de CdnL (CdnLCT) está formado por cinco hélices α en disposición antiparalela, una estructura similar a los dominios TPR de interacción proteína-proteína. Una característica notable de este dominio, globalmente ácido, es una superficie expuesta al solvente formada por residuos no polares (W88, Y92, M96, y F125) rodeada de residuos básicos (R90, R91, R93, R128, K129).
3. El análisis mutacional realizado pone de manifiesto que la interacción de CdnLNT y TtCdnLNT con la β RNAP está mediada por segmentos y superficies conservadas. Además, dicho análisis indica que, en *M. xanthus*, las mutaciones en CdnL que eliminan la interacción con la β RNAP provocan una pérdida de función, que se traduce en una falta de crecimiento.
4. Los homólogos de CdnL de *T. thermophilus*, *B. bacteriovorus*, *C. glutamicum*, y *S. coelicolor* interaccionan con el dominio $\beta 1$ de sus respectivas RNAP pero no con el de la β RNAP de *M. xanthus*. Estos datos son consistentes con la incapacidad de dichos homólogos de complementar la ausencia de CdnL en *M. xanthus*, y con una interacción CdnL-RNAP específica de especie.
5. La mutación triple de los residuos básicos R90, R91 y R93 de la región básica-hidrofóbica de CdnLCT provoca un defecto severo en la función de CdnL en *M. xanthus*. Sin embargo, la mutación del residuo conservado de triptófano (W88), no tiene un efecto aparente, a diferencia de lo que ocurre con la mutación equivalente en TtCdnL y MtCdnL.
6. Ni CdnL, ni sus dominios por separado (CdnLNT o CdnLCT), interaccionan con el DNA *in vitro*, característica que lo diferencia de sus homólogos TtCdnL y MtCdnL.
7. DksA, pero no CdnL, está implicado en la respuesta al estrés nutricional en *M. xanthus*.

8. *In vivo*, CdnL se asocia con el promotor P_{4rrnD} y, en menor grado, con P_B , ambos dependientes del factor σ^A . *In vitro*, la proteína CdnL completa, pero no sus dominios aislados (ni el dominio N-terminal de CarD), estabiliza la formación del complejo abierto, RP_o , en P_{4rrnD} y, en menor grado, en P_B .
9. Tanto las mutaciones en CdnLNt que eliminan la interacción con la RNAP como aquellas en la región básica-hidrofóbica del dominio CdnLNt que provocan la pérdida de función *in vivo* afectan negativamente a la estabilización del complejo abierto *in vitro*.
10. La proteína homóloga a CdnL en *C. crescentus*, CcCdnL, es esencial para el crecimiento y la viabilidad celular, al igual que sus homólogos en *M. xanthus*, *M. tuberculosis*, y *B. burgdorferi*, pero no en *B. subtilis*.
11. CcCdnL, cuya expresión no parece estar regulada al nivel de la transcripción, es sustrato de la proteasa ClpX. Sin embargo, la falta de dicha degradación por ClpX, aunque conlleva un aumento significativo de la estabilidad de CcCdnL, no produce un fenotipo aparente en *C. crescentus*.
12. CcCdnL interacciona consigo mismo y con el dominio $\beta 1$ de la RNAP de *C. crescentus*, tal como se observa en *M. xanthus* y en *M. tuberculosis*. Los residuos implicados en el contacto CcCdnL-Cc β RNAP están conservados en *C. crescentus*.
13. Como MtCdnL y, a diferencia de CdnL, CcCdnL interacciona débilmente con el DNA *in vitro*.
14. CcCdnL, al igual que CdnL y MtCdnL, se asocia *in vivo* al promotor del rRNA y activa su transcripción, pero la disminución rápida de la expresión del rRNA en respuesta a la falta de glucosa es independiente de CcCdnL.
15. Varias de las mutaciones analizadas en CcCdnL que afectan a su función exhiben sensibilidad al frío *in vivo*, en contraste a las mutaciones equivalentes en sus homólogos estudiados, ya sea por diferencias intrínsecas entre los distintos homólogos, o por diferencias en la estabilidad intrínseca de los RP_o formados por las distintas RNAP.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Abellán-Martínez, M. (2006).** Expresión del locus *ddvA* de *Myxococcus xanthus* y su dependencia de los genes *carD*, *sud-2* y *sud-5*. Tesis Doctoral, Universidad de Murcia.
- Abellón-Ruiz, J., Bernal-Bernal, D., Abellan, M., Fontes, M., Padmanabhan, S., Murillo, F.J., & Elías-Arnanz, M. (2014).** The CarD/CarG regulatory complex is required for the action of several members of the large set of *Myxococcus xanthus* extracytoplasmic function sigma factors. *Environ Microbiol* **16**: 2475-2490.
- Aberg, A., Fernandez-Vazquez, J., Cabrer-Panes, J.D., Sanchez, A., & Balsalobre, C. (2009).** Similar and divergent effects of ppGpp and DksA deficiencies on transcription in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **191**: 3226-3236.
- Adhya, S. (1989).** Multipartite genetic control elements: communication by DNA loop. *Annu Rev Genet* **23**: 227-250.
- Agirrezabala, X., Fernandez, I.S., Kelley, A.C., Carton, D.G., Ramakrishnan, V., & Valle, M. (2013).** The ribosome triggers the stringent response by RelA via a highly distorted tRNA. *EMBO Rep* **14**: 811-816.
- Aki, T., Choy, H.E., & Adhya, S. (1996).** Histone-like protein HU as a specific transcriptional regulator: co-factor role in repression of gal transcription by GAL repressor. *Genes Cells* **1**: 179-188.
- Amemiya, K. (1989).** Conserved sequence elements upstream and downstream from the transcription initiation site of the *Caulobacter crescentus* *rrnA* gene cluster. *J Mol Biol* **210**: 245-254.
- Arkov, A.L., & Ramos, A. (2010).** Building RNA-protein granules: insight from the germline. *Trends Cell Biol* **20**: 482-490.
- Arnold, J.W., & Shimkets, L.J. (1988).** Cell surface properties correlated with cohesion in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **170**: 5771-5777.
- Arnqvist, A., Olsen, A., Pfeifer, J., Russell, D.G., & Normark, S. (1992).** The Crl protein activates cryptic genes for curli formation and fibronectin binding in *Escherichia coli* HB101. *Mol Microbiol* **6**: 2443-2452.
- Arraj, J.A., & Marinus, M.G. (1983).** Phenotypic reversal in *dam* mutants of *Escherichia coli* K-12 by a recombinant plasmid containing the *dam*⁺ gene. *J bacteriol* **153**: 562-565.
- Atkinson, G.C., Tenson, T., & Hauryliuk, V. (2011).** The RelA/SpoT homolog (RSH) superfamily: distribution and functional evolution of ppGpp synthetases and hydrolases across the tree of life. *PLoS One* **6**: e23479.
- Bae, B., Chen, J., Davis, E., Leon, K., Darst, S.A., & Campbell, E.A. (2015).** CarD uses a minor groove wedge mechanism to stabilize the RNA polymerase open promoter complex. *Elife* **4**.
- Banta, A.B., Cuff, M.E., Lin, H., Myers, A.R., Ross, W., Joachimiak, A., & Gourse, R.L. (2014).** Structure of the RNA polymerase assembly factor Crl and identification of its interaction surface with σ^S . *J Bacteriol* **196**: 3279-3288.

- Banta, A.B., Chumanov, R.S., Yuan, A.H., Lin, H., Campbell, E.A., Burgess, R.R., & Gourse, R.L. (2013).** Key features of σ^S required for specific recognition by Crl, a transcription factor promoting assembly of RNA polymerase holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 15955-15960.
- Barne, K.A., Bown, J.A., Busby, S.J., & Minchin, S.D. (1997).** Region 2.5 of the *Escherichia coli* RNA polymerase σ^{70} subunit is responsible for the recognition of the 'extended-10' motif at promoters. *EMBO J* **16**: 4034-4040.
- Barnett, M.J., Bittner, A.N., Toman, C.J., Oke, V., & Long, S.R. (2012).** Dual RpoH sigma factors and transcriptional plasticity in a symbiotic bacterium. *J Bacteriol* **194**: 4983-4994.
- Battesti, A., & Bouveret, E. (2006).** Acyl carrier protein/SpoT interaction, the switch linking SpoT-dependent stress response to fatty acid metabolism. *Mol Microbiol* **62**: 1048-1063.
- Bernal-Bernal, D., Gallego-García, A., García-Martínez, G., García-Heras, F., Jiménez, M.A., Padmanabhan, S., & Elías-Arnanz, M. (2015).** Structure-function dissection of *Myxococcus xanthus* CarD N-terminal domain, a defining member of the CarD_CdnL_TRCF family of RNA polymerase interacting proteins. *PLoS One* **10**: e0121322.
- Bhat, N.H., Vass, R.H., Stoddard, P.R., Shin, D.K., & Chien, P. (2013).** Identification of ClpP substrates in *Caulobacter crescentus* reveals a role for regulated proteolysis in bacterial development. *Mol Microbiol* **88**: 1083-1092.
- Blatch, G.L., & Lassle, M. (1999).** The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays* **21**: 932-939.
- Bortoluzzi, A., Muskett, F.W., Waters, L.C., Addis, P.W., Rieck, B., Munder, T., Schleier, S., Forti, F., Ghisotti, D., Carr, M.D., et al. (2013).** *Mycobacterium tuberculosis* RNA polymerase-binding protein A (RbpA) and its interactions with sigma factors. *J Biol Chem* **288**: 14438-14450.
- Borukhov, S., & Nudler, E. (2003).** RNA polymerase holoenzyme: structure, function and biological implications. *Curr Opin Microbiol* **6**: 93-100.
- Bougdoor, A., Lelong, C., & Geiselman, J. (2004).** Crl, a low temperature-induced protein in *Escherichia coli* that binds directly to the stationary phase sigma subunit of RNA polymerase. *J Biol Chem* **279**: 19540-19550.
- Boutte, C.C., & Crosson, S. (2011).** The complex logic of stringent response regulation in *Caulobacter crescentus*: starvation signalling in an oligotrophic environment. *Mol Microbiol* **80**: 695-714.
- Boutte, C.C., & Crosson, S. (2013).** Bacterial lifestyle shapes stringent response activation. *Trends Microbiol* **21**: 174-180.
- Boutte, C.C., Henry, J.T., & Crosson, S. (2012).** ppGpp and polyphosphate modulate cell cycle progression in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* **194**: 28-35.

- Bowden, M.G., & Kaplan, H.B. (1998).** The *Myxococcus xanthus* lipopolysaccharide O-antigen is required for social motility and multicellular development. *Mol Microbiol* **30**: 275-284.
- Bradford, M.M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Brennan, R.G., & Matthews, B.W. (1989).** The helix-turn-helix DNA binding motif. *J Biol Chem* **264**: 1903-1906.
- Bretscher, A.P., & Kaiser, D. (1978).** Nutrition of *Myxococcus xanthus*, a fruiting myxobacterium. *J Bacteriol* **133**: 763-768.
- Brown, D.R., Barton, G., Pan, Z., Buck, M., & Wigneshweraraj, S. (2014).** Nitrogen stress response and stringent response are coupled in *Escherichia coli*. *Nat Commun* **5**: 4115.
- Browning, D.F., & Busby, S.J. (2004).** The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat Rev Microbiol* **2**: 57-65.
- Budde, I., Steil, L., Scharf, C., Volker, U., & Bremer, E. (2006).** Adaptation of *Bacillus subtilis* to growth at low temperature: a combined transcriptomic and proteomic appraisal. *Microbiol* **152**: 831-853.
- Bulyha, I., Hot, E., Huntley, S., & Sogaard-Andersen, L. (2011).** GTPases in bacterial cell polarity and signalling. *Curr Opin Microbiol* **14**: 726-733.
- Burchard, R.P., Burchard, A.C., & Parish, J.H. (1977).** Pigmentation phenotype instability in *Myxococcus xanthus*. *Can J Microbiol* **23**: 1657-1662.
- Burchard, R.P., & Dworkin, M. (1966).** Light-induced lysis and carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **91**: 535-545.
- Busby, S., & Ebright, R.H. (1997).** Transcription activation at class II CAP-dependent promoters. *Mol Microbiol* **23**: 853-859.
- Campbell, E.A., Muzzin, O., Chlenov, M., Sun, J.L., Olson, C.A., Weinman, O., Trester-Zedlitz, M.L., & Darst, S.A. (2002).** Structure of the bacterial RNA polymerase promoter specificity sigma subunit. *Mol Cell* **9**: 527-539.
- Cayuela, M.L., Elías-Arnanz, M., Peñalver-Mellado, M., Padmanabhan, S., & Murillo, F.J. (2003).** The *Stigmatella aurantiaca* homolog of *Myxococcus xanthus* high-mobility-group A-type transcription factor CarD: insights into the functional modules of CarD and their distribution in bacteria. *J Bacteriol* **185**: 3527-3537.
- Cortes, T., Schubert, O.T., Rose, G., Arnvig, K.B., Comas, I., Aebersold, R., & Young, D.B. (2013).** Genome-wide mapping of transcriptional start sites defines an extensive leaderless transcriptome in *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Rep* **5**: 1121-1131.
- Crawford, E.W., Jr., & Shimkets, L.J. (2000).** The stringent response in *Myxococcus xanthus* is regulated by SocE and the CsgA C-signaling protein. *Genes Dev* **14**: 483-492.

- Chandrangsu, P., Lemke, J.J., & Gourse, R.L. (2011).** The *dksA* promoter is negatively feedback regulated by DksA and ppGpp. *Mol Microbiol* **80**: 1337-1348.
- Christen, B., Abeliuk, E., Collier, J.M., Kalogeraki, V.S., Passarelli, B., Collier, J.A., Fero, M.J., McAdams, H.H., & Shapiro, L. (2011).** The essential genome of a bacterium. *Mol Syst Biol* **7**: 528.
- D'Andrea, L.D., & Regan, L. (2003).** TPR proteins: the versatile helix. *Trends Biochem Sci* **28**: 655-662.
- da Silva, A.C., Simao, R.C., Susin, M.F., Baldini, R.L., Avedissian, M., & Gomes, S.L. (2003).** Downregulation of the heat shock response is independent of DnaK and σ^{32} levels in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol* **49**: 541-553.
- da Silva Neto, J.F., Lourenco, R.F., & Marques, M.V. (2013).** Global transcriptional response of *Caulobacter crescentus* to iron availability. *BMC Genomics* **14**: 549.
- Dahl, J.L., Arora, K., Boshoff, H.I., Whiteford, D.C., Pacheco, S.A., Walsh, O.J., Lau-Bonilla, D., Davis, W.B., & Garza, A.G. (2005).** The *relA* homolog of *Mycobacterium smegmatis* affects cell appearance, viability, and gene expression. *J Bacteriol* **187**: 2439-2447.
- Daniels, D., Zuber, P., & Losick, R. (1990).** Two amino acids in an RNA polymerase sigma factor involved in the recognition of adjacent base pairs in the -10 region of a cognate promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 8075-8079.
- Davis, E., Chen, J., Leon, K., Darst, S.A., & Campbell, E.A. (2015).** Mycobacterial RNA polymerase forms unstable open promoter complexes that are stabilized by CarD. *Nucleic Acids Res* **43**: 433-445.
- Dawid, W. (2000).** Biology and global distribution of myxobacteria in soils. *FEMS Microbiol Rev* **24**: 403-427.
- Deaconescu, A.M., Chambers, A.L., Smith, A.J., Nickels, B.E., Hochschild, A., Savery, N.J., & Darst, S.A. (2006).** Structural basis for bacterial transcription-coupled DNA repair. *Cell* **124**: 507-520.
- Deaconescu, A.M., Savery, N., & Darst, S.A. (2007).** The bacterial transcription repair coupling factor. *Curr Opin Struct Biol* **17**: 96-102.
- Dennis, P.P., Ehrenberg, M., & Bremer, H. (2004).** Control of rRNA synthesis in *Escherichia coli*: a systems biology approach. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 639-668.
- Dombroski, A.J., Walter, W.A., & Gross, C.A. (1993).** Amino-terminal amino acids modulate sigma-factor DNA-binding activity. *Genes Dev* **7**: 2446-2455.
- Dombroski, A.J., Walter, W.A., Record, M.T., Jr., Siegele, D.A., & Gross, C.A. (1992).** Polypeptides containing highly conserved regions of transcription initiation factor σ^{70} exhibit specificity of binding to promoter DNA. *Cell* **70**: 501-512.
- Dufour, Y.S., & Donohue, T.J. (2012).** Signal correlations in ecological niches can shape the organization and evolution of bacterial gene regulatory networks. *Adv Microb Physiol* **61**: 1-36.

- Dworkin, M. (1962).** Nutritional requirements for vegetative growth of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **84**: 250-257.
- Dworkin, M. (1996).** Recent advances in the social and developmental biology of the myxobacteria. *Microbiol Rev* **60**: 70-102.
- Ebright, R.H. (2000).** RNA polymerase: structural similarities between bacterial RNA polymerase and eukaryotic RNA polymerase II. *J Mol Biol* **304**: 687-698.
- Elías-Arnanz, M., Fontes, M., & Padmanabhan, S. (2008).** Carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: a complex Regulatory Network. *ASM Press*: 211-225.
- Elías-Arnanz, M., & Murillo, F.J. (1991a).** Induction of germination in *Myxococcus xanthus* fruiting bodies spores. *J Gen Microbiol* **137**: 381-388.
- Elías-Arnanz, M., & Murillo, F.J. (1991b).** Mutations affecting germination in *Myxococcus xanthus* *J Gen Microbiol* **137**: 389-397.
- Elias-Arnanz, M., Padmanabhan, S., & Murillo, F.J. (2011).** Light-dependent gene regulation in nonphototrophic bacteria. *Curr Opin Microbiol* **14**: 128-135.
- Elías-Arnanz, M., Padmanabhan, S., & Murillo, F.J. (2010).** The regulatory action of the myxobacterial CarD/CarG complex: a bacterial enhanceosome? *FEMS Microbiol Rev* **34**: 764-778.
- Ely, B. (1991).** Genetics of *Caulobacter crescentus*. *Methods Enzymol* **204**: 372-384.
- Evinger, M., & Agabian, N. (1977).** Envelope-associated nucleoid from *Caulobacter crescentus* stalked and swarmer cells. *J Bacteriol* **132**: 294-301.
- Feklistov, A. (2013).** RNA polymerase: in search of promoters. *Ann N Y Acad Sci* **1293**: 25-32.
- Flynn, J.M., Neher, S.B., Kim, Y.I., Sauer, R.T., & Baker, T.A. (2003).** Proteomic discovery of cellular substrates of the ClpXP protease reveals five classes of ClpX-recognition signals. *Mol Cell* **11**: 671-683.
- Furman, R., Tsodikov, O.V., Wolf, Y.I., & Artsimovitch, I. (2013).** An insertion in the catalytic trigger loop gates the secondary channel of RNA polymerase. *J Mol Biol* **425**: 82-93.
- Galbis-Martínez, M., Fontes, M., & Murillo, F.J. (2004).** The high-mobility group A-type protein CarD of the bacterium *Myxococcus xanthus* as a transcription factor for several distinct vegetative genes. *Genetics* **167**: 1585-1595.
- Gallego-García, A., Mirassou, Y., Elías-Arnanz, M., Padmanabhan, S., & Jiménez, M.A. (2012).** NMR structure note: N-terminal domain of *Thermus thermophilus* CdnL. *J Biomol NMR* **53**: 355-363.
- Gallego-García, A., Mirassou, Y., García-Moreno, D., Elías-Arnanz, M., Jiménez, M.A., & Padmanabhan, S. (2014).** Structural insights into RNA polymerase recognition and essential function of *Myxococcus xanthus* CdnL. *PLoS One* **9**: e108946.

García-Heras, F., Abellon-Ruiz, J., Murillo, F.J., Padmanabhan, S., & Elias-Arnanz, M. (2013). High-mobility-group a-like CarD binds to a DNA site optimized for affinity and position and to RNA polymerase to regulate a light-inducible promoter in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **195**: 378-388.

García-Heras, F., Padmanabhan, S., Murillo, F.J., & Elías-Arnanz, M. (2009). Functional equivalence of HMGA- and histone H1-like domains in a bacterial transcriptional factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 13546-13551.

García-Moreno, D. (2009). *cdnL*, un gen esencial en *Myxococcus xanthus*. *Tesis Doctoral, Universidad de Murcia*.

García-Moreno, D., Abellón-Ruiz, J., García-Heras, F., Murillo, F.J., Padmanabhan, S., & Elías-Arnanz, M. (2010). CdnL, a member of the large CarD-like family of bacterial proteins, is vital for *Myxococcus xanthus* and differs functionally from the global transcriptional regulator CarD. *Nucleic Acids Res* **38**: 4586-4598.

García-Moreno, D., Polanco, M.C., Navarro-Aviles, G., Murillo, F.J., Padmanabhan, S., & Elías-Arnanz, M. (2009). A vitamin B12-based system for conditional expression reveals *dksA* to be an essential gene in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **191**: 3108-3119.

Garner, A.L., Weiss, L.A., Manzano, A.R., Galburt, E.A., & Stallings, C.L. (2014). CarD integrates three functional modules to promote efficient transcription, antibiotic tolerance, and pathogenesis in mycobacteria. *Mol Microbiol* **93**: 682-697.

Goldman, B.S., Nierman, W.C., Kaiser, D., Slater, S.C., Durkin, A.S., Eisen, J.A., Ronning, C.M., Barbazuk, W.B., Blanchard, M., Field, C., et al. (2006). Evolution of sensory complexity recorded in a myxobacterial genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 15200-15205.

Gribskov, M., & Burgess, R.R. (1983). Overexpression and purification of the sigma subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Gene* **26**: 109-118.

Gribskov, M., & Burgess, R.R. (1986). Sigma factors from *E. coli*, *B. subtilis*, phage SP01, and phage T4 are homologous proteins. *Nucleic Acids Res* **14**: 6745-6763.

Gries, T.J., Kontur, W.S., Capp, M.W., Saecker, R.M., & Record, M.T. (2010). One-step DNA melting in the RNA polymerase cleft opens the initiation bubble to form an unstable open complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 10418-10423.

Griffith, K.L., & Wolf, R.E., Jr. (2002). Measuring beta-galactosidase activity in bacteria: cell growth, permeabilization, and enzyme assays in 96-well arrays. *Biochem Biophys Res Commun* **290**: 397-402.

Gruber, T.M., & Gross, C.A. (2003). Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu Rev Microbiol* **57**: 441-466.

Gulten, G., & Sacchettini, J.C. (2013). Structure of the Mtb CarD/RNAP beta-lobes complex reveals the molecular basis of interaction and presents a distinct DNA-binding domain for Mtb CarD. *Structure* **21**: 1859-1869.

- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580.
- Harris, B.Z., Kaiser, D., & Singer, M. (1998).** The guanosine nucleotide (p)ppGpp initiates development and A-factor production in *Myxococcus xanthus*. *Genes Dev* **12**: 1022-1035.
- Hartzell, P.L., Shi, W., & Youderian, P. (2008).** Gliding motility of *Myxococcus xanthus*. *ASM Press*: 103-122.
- Haugen, S.P., Berkmen, M.B., Ross, W., Gaal, T., Ward, C., & Gourse, R.L. (2006).** rRNA promoter regulation by nonoptimal binding of sigma region 1.2: an additional recognition element for RNA polymerase. *Cell* **125**: 1069-1082.
- Haugen, S.P., Ross, W., & Gourse, R.L. (2008a).** Advances in bacterial promoter recognition and its control by factors that do not bind DNA. *Nat Rev Microbiol* **6**: 507-519.
- Haugen, S.P., Ross, W., Manrique, M., & Gourse, R.L. (2008b).** Fine structure of the promoter-sigma region 1.2 interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 3292-3297.
- Heldwein, E.E., & Brennan, R.G. (2001).** Crystal structure of the transcription activator BmrR bound to DNA and a drug. *Nature* **409**: 378-382.
- Helmann, J.D. (2002).** The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Adv Microb Physiol* **46**: 47-110.
- Helmann, J.D., & Chamberlin, M.J. (1988).** Structure and function of bacterial sigma factors. *Annu Rev Biochem* **57**: 839-872.
- Hernandez, V.J., & Cashel, M. (1995).** Changes in conserved region 3 of *Escherichia coli* σ^{70} mediate ppGpp-dependent functions in vivo. *J Mol Biol* **252**: 536-549.
- Hirata, A., Klein, B.J., & Murakami, K.S. (2008).** The X-ray crystal structure of RNA polymerase from Archaea. *Nature* **451**: 851-854.
- Hook-Barnard, I.G., & Hinton, D.M. (2007).** Transcription initiation by mix and match elements: flexibility for polymerase binding to bacterial promoters. *Gene Regul Syst Bio* **1**: 275-293.
- Hu, Y., Morichaud, Z., Chen, S., Leonetti, J.P., & Brodolin, K. (2012).** *Mycobacterium tuberculosis* RbpA protein is a new type of transcriptional activator that stabilizes the sigma A-containing RNA polymerase holoenzyme. *Nucleic Acids Res* **40**: 6547-6557.
- Hu, Y., Morichaud, Z., Perumal, A.S., Roquet-Baneres, F., & Brodolin, K. (2014).** *Mycobacterium* RbpA cooperates with the stress-response sigmaB subunit of RNA polymerase in promoter DNA unwinding. *Nucleic Acids Res* **42**: 10399-10408.
- Hubin, E.A., Tabib-Salazar, A., Humphreyb, L.J., Flack, J.E., Olinares, P.D.B., Darst, S.A., Campbell, E.A., & Paget, M.S. (2015).** Structural, functional, and genetic analyses of the actinobacterial transcription factor RbpA. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

- Huynen, M.A., & Snel, B. (2000).** Gene and context: integrative approaches to genome analysis. *Adv Protein Chem* **54**: 345-379.
- Iizuka, T., Jojima, Y., Fudou, R., & Yamanaka, S. (1998).** Isolation of myxobacteria from the marine environment. *FEMS Microbiol Lett* **169**: 317-322.
- Iniesta, A.A., Garcia-Heras, F., Abellon-Ruiz, J., Gallego-Garcia, A., & Elias-Arnanz, M. (2012).** Two systems for conditional gene expression in *Myxococcus xanthus* inducible by isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside or vanillate. *J Bacteriol* **194**: 5875-5885.
- Jain, D., Nickels, B.E., Sun, L., Hochschild, A., & Darst, S.A. (2004).** Structure of a ternary transcription activation complex. *Mol Cell* **13**: 45-53.
- Janssen, G.R., Wireman, J.W., & Dworkin, M. (1977).** Effect of temperature on the growth of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **130**: 561-562.
- Jonas, K., Liu, J., Chien, P., & Laub, M.T. (2013).** Proteotoxic stress induces a cell-cycle arrest by stimulating Lon to degrade the replication initiator DnaA. *Cell* **154**: 623-636.
- Joo, D.M., Nolte, A., Calendar, R., Zhou, Y.N., & Jin, D.J. (1998).** Multiple regions on the *Escherichia coli* heat shock transcription factor σ^{32} determine core RNA polymerase binding specificity. *J Bacteriol* **180**: 1095-1102.
- Jost, M., Fernandez-Zapata, J., Polanco, M.C., Ortiz-Guerrero, J.M., Chen, P.Y., Kang, G., Padmanabhan, S., Elias-Arnanz, M., & Drennan, C.L. (2015).** Structural basis for gene regulation by a B12-dependent photoreceptor. *Nature* **526**: 536-541.
- Juang, Y.L., & Helmann, J.D. (1994).** A promoter melting region in the primary sigma factor of *Bacillus subtilis*. Identification of functionally important aromatic amino acids. *J Mol Biol* **235**: 1470-1488.
- Jung, Y.G., & Lee, Y. (1997).** *Escherichia coli* *rnpB* promoter mutants altered in stringent response. *Biochem Biophys Res Commun*. **230**: 582-586.
- Kahn, D., & Ditta, G. (1991).** Modular structure of FixJ: homology of the transcriptional activator domain with the -35 binding domain of sigma factors. *Mol Microbiol* **5**: 987-997.
- Kaiser, D. (1979).** Social gliding is correlated with the presence of pili in *Myxococcus xanthus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 5952-5956.
- Kaiser, D. (2004).** Signaling in myxobacteria. *Annu Rev Microbiol* **58**: 75-98.
- Kaiser, D. (2008).** *Myxococcus*-from single-cell polarity to complex multicellular patterns. *Annu Rev Genet* **42**: 109-130.
- Kaiser, D., & Dworkin, M. (2008).** From glycerol to the genome. *ASM Press*: 257-284.
- Kaiser, D., Robinson, M., & Kroos, L. (2010).** Myxobacteria, polarity, and multicellular morphogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**: a000380.

- Kang, P.J., & Craig, E.A. (1990).** Identification and characterization of a new *Escherichia coli* gene that is a dosage-dependent suppressor of a *dnaK* deletion mutation. *J Bacteriol* **172**: 2055-2064.
- Kaplan, H.B., & Plamann, L. (1996).** A *Myxococcus xanthus* cell density-sensing system required for multicellular development. *FEMS Microbiol Lett* **139**: 89-95.
- Karimova, G., Ullmann, A., & Ladant, D. (2000).** A bacterial two-hybrid system that exploits a cAMP signaling cascade in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* **328**: 59-73.
- Kashefi, K., & Hartzell, P.L. (1995).** Genetic suppression and phenotypic masking of a *Myxococcus xanthus* *frzF*- defect. *Mol Microbiol* **15**: 483-494.
- Kasinsky, H.E., Lewis, J.D., Dacks, J.B., & Ausio, J. (2001).** Origin of H1 linker histones. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **15**: 34-42.
- Kastle, B., Geiger, T., Gratani, F.L., Reisinger, R., Goerke, C., Borisova, M., Mayer, C., & Wolz, C. (2015).** rRNA regulation during growth and under stringent conditions in *Staphylococcus aureus*. *Environ Microbiol*. DOI: 10.1111/1462-2920.12867
- Kaur, G., Dutta, D., & Thakur, K.G. (2014).** Crystal structure of Mycobacterium tuberculosis CarD, an essential RNA polymerase binding protein, reveals a quasidomain-swapped dimeric structural architecture. *Proteins* **82**: 879-884.
- Kobayashi, K., Ehrlich, S.D., Albertini, A., Amati, G., Andersen, K.K., Arnaud, M., Asai, K., Ashikaga, S., Aymerich, S., Bessieres, P., et al. (2003).** Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 4678-4683.
- Konovalova, A., Lobach, S., & Sogaard-Andersen, L. (2012).** A RelA-dependent two-tiered regulated proteolysis cascade controls synthesis of a contact-dependent intercellular signal in *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* **84**: 260-275.
- Konovalova, A., Sogaard-Andersen, L., & Kroos, L. (2014).** Regulated proteolysis in bacterial development. *FEMS Microbiol Rev* **38**: 493-522.
- Krasny, L., & Gourse, R.L. (2004).** An alternative strategy for bacterial ribosome synthesis: *Bacillus subtilis* rRNA transcription regulation. *EMBO J* **23**: 4473-4483.
- Kroos, L. (2007).** The *Bacillus* and *Myxococcus* developmental networks and their transcriptional regulators. *Annu Rev Genet* **41**: 13-39.
- Kroos, L., & Kaiser, D. (1987).** Expression of many developmentally regulated genes in *Myxococcus* depends on a sequence of cell interactions. *Genes Dev* **1**: 840-854.
- Kulbachinskiy, A., & Mustaev, A. (2006).** Region 3.2 of the sigma subunit contributes to the binding of the 3'-initiating nucleotide in the RNA polymerase active center and facilitates promoter clearance during initiation. *J Biol Chem* **281**: 18273-18276.
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lamond, A.I., & Travers, A.A. (1985).** Stringe control of bacterial transcription. *Cell* **41**: 6-8.

- Lawson, C.L., Swigon, D., Murakami, K.S., Darst, S.A., Berman, H.M., & Ebright, R.H. (2004).** Catabolite activator protein: DNA binding and transcription activation. *Curr Opin Struct Biol* **14**: 10-20.
- Lee, D.J., Minchin, S.D., & Busby, S.J. (2012a).** Activating transcription in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **66**: 125-152.
- Lee, J.H., Lennon, C.W., Ross, W., & Gourse, R.L. (2012b).** Role of the coiled-coil tip of *Escherichia coli* DksA in promoter control. *J Mol Biol* **416**: 503-517.
- Lemke, J.J., Sanchez-Vazquez, P., Burgos, H.L., Hedberg, G., Ross, W., & Gourse, R.L. (2011).** Direct regulation of *Escherichia coli* ribosomal protein promoters by the transcription factors ppGpp and DksA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 5712-5717.
- Lennon, C.W., Lemmer, K.C., Irons, J.L., Sellman, M.I., Donohue, T.J., Gourse, R.L., & Ross, W. (2014).** A *Rhodobacter sphaeroides* protein mechanistically similar to *Escherichia coli* DksA regulates photosynthetic growth. *MBio* **5**: e01105-01114.
- Lennon, C.W., Ross, W., Martin-Tumasz, S., Touloukhonov, I., Vrentas, C.E., Rutherford, S.T., Lee, J.H., Butcher, S.E., & Gourse, R.L. (2012).** Direct interactions between the coiled-coil tip of DksA and the trigger loop of RNA polymerase mediate transcriptional regulation. *Genes Dev* **26**: 2634-2646.
- Leon, E., Navarro-Aviles, G., Santiveri, C.M., Flores-Flores, C., Rico, M., Gonzalez, C., Murillo, F.J., Elias-Arnanz, M., Jimenez, M.A., & Padmanabhan, S. (2010).** A bacterial antirepressor with SH3 domain topology mimics operator DNA in sequestering the repressor DNA recognition helix. *Nucleic Acids Res* **38**: 5226-5241.
- Leonardy, S., Miertzschke, M., Bulyha, I., Sperling, E., Wittinghofer, A., & Sogaard-Andersen, L. (2010).** Regulation of dynamic polarity switching in bacteria by a Ras-like G-protein and its cognate GAP. *EMBO J* **29**: 2276-2289.
- Lesley, J.A., & Shapiro, L. (2008).** SpoT regulates DnaA stability and initiation of DNA replication in carbon-starved *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* **190**: 6867-6880.
- Lesley, S.A., & Burgess, R.R. (1989).** Characterization of the *Escherichia coli* transcription factor σ^{70} : localization of a region involved in the interaction with core RNA polymerase. *Biochemistry* **28**: 7728-7734.
- Li, M., McClure, W.R., & Susskind, M.M. (1997).** Changing the mechanism of transcriptional activation by phage lambda repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 3691-3696.
- Li, M., Moyle, H., & Susskind, M.M. (1994).** Target of the transcriptional activation function of phage lambda cl protein. *Science* **263**: 75-77.
- Li, S., Lee, B.U., & Shimkets, L.J. (1992).** *csgA* expression entrains *Myxococcus xanthus* development. *Genes Dev* **6**: 401-410.
- Liu, K., Bittner, A.N., & Wang, J.D. (2015).** Diversity in (p)ppGpp metabolism and effectors. *Curr Opin Microbiol* **24**: 72-79.

- Lonetto, M., Gribskov, M., & Gross, C.A. (1992).** The σ^{70} family: sequence conservation and evolutionary relationships. *J Bacteriol* **174**: 3843-3849.
- López-Rubio, J.J., Elías-Arnanz, M., Padmanabhan, S., & Murillo, F.J. (2002).** A repressor-antirepressor pair links two loci controlling light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*. *J Biol Chem* **277**: 7262-7270.
- López-Rubio, J.J., Padmanabhan, S., Lazaro, J.M., Salas, M., Murillo, F.J., & Elías-Arnanz, M. (2004).** Operator design and mechanism for CarA repressor-mediated down-regulation of the photoinducible *carB* operon in *Myxococcus xanthus*. *J Biol Chem* **279**: 28945-28953.
- Lowe, P.A., Hager, D.A., & Burgess, R.R. (1979).** Purification and properties of the sigma subunit of *Escherichia coli* DNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem* **193**: 265-275.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J. (1951).** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275.
- Malakooti, J., & Ely, B. (1995).** Principal sigma subunit of the *Caulobacter crescentus* RNA polymerase. *J Bacteriol* **177**: 6854-6860.
- Manoil, C., & Kaiser, D. (1980a).** Accumulation of guanosine tetraphosphate and guanosine pentaphosphate in *Myxococcus xanthus* during starvation and myxospore formation. *J Bacteriol* **141**: 297-304.
- Manoil, C., & Kaiser, D. (1980b).** Guanosine pentaphosphate and guanosine tetraphosphate accumulation and induction of *Myxococcus xanthus* fruiting body development. *J Bacteriol* **141**: 305-315.
- Martínez-Laborda, A., Balsalobre, J.M., Fontes, M., & Murillo, F.J. (1990).** Accumulation of carotenoids in structural and regulatory mutants of the bacterium *Myxococcus xanthus*. *Mol Gen Genet* **223**: 205-210.
- Mauriello, E.M. (2010).** Cell polarity/motility in bacteria: closer to eukaryotes than expected? *EMBO J* **29**: 2258-2259.
- McLeod, S.M., & Johnson, R.C. (2001).** Control of transcription by nucleoid proteins. *Curr Opin Microbiol* **4**: 152-159.
- Meiser, P., Bode, H.B., & Muller, R. (2006).** The unique DKxanthene secondary metabolite family from the myxobacterium *Myxococcus xanthus* is required for developmental sporulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 19128-19133.
- Mignot, T., Merlie, J.P., Jr., & Zusman, D.R. (2005).** Regulated pole-to-pole oscillations of a bacterial gliding motility protein. *Science* **310**: 855-857.
- Miller, J. (1972). Experiments in molecular genetics (Nueva York: Cold Spring Harbour Laboratory Press).
- Mirassou, Y., Elias-Arnanz, M., Padmanabhan, S., & Jimenez, M.A. (2013).** ^1H , ^{13}C and ^{15}N assignments of CdnL, an essential protein in *Myxococcus xanthus*. *Biomol NMR Assign* **7**: 51-55.

- Mirassou, Y., Garcia-Moreno, D., Santiveri, C.M., Santoro, J., Elias-Arnanz, M., Padmanabhan, S., & Jimenez, M.A. (2009).** ^1H , ^{13}C and ^{15}N backbone and side chain resonance assignments of the C-terminal domain of CdnL from *Myxococcus xanthus*. *Biomol NMR Assign* **3**: 9-12.
- Mohr, C.D., MacKichan, J.K., & Shapiro, L. (1998).** A membrane-associated protein, FliX, is required for an early step in *Caulobacter* flagellar assembly. *J Bacteriol* **180**: 2175-2185.
- Müller-Hill, B. (1998).** Some repressors of bacterial transcription. *Curr Opin Microbiol* **1**: 145-151.
- Murakami, K.S. (2013).** X-ray crystal structure of *Escherichia coli* RNA polymerase σ^{70} holoenzyme. *J Biol Chem* **288**: 9126-9134.
- Murakami, K.S., Masuda, S., & Darst, S.A. (2002).** Structural basis of transcription initiation: RNA polymerase holoenzyme at 4 Å resolution. *Science* **296**: 1280-1284.
- Nan, B., Bandaria, J.N., Moghtaderi, A., Sun, I.H., Yildiz, A., & Zusman, D.R. (2013).** Flagella stator homologs function as motors for myxobacterial gliding motility by moving in helical trajectories. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: E1508-1513.
- Nan, B., & Zusman, D.R. (2011).** Uncovering the mystery of gliding motility in the myxobacteria. *Annu Rev Genet* **45**: 21-39.
- Newell, K.V., Thomas, D.P., Brekasis, D., & Paget, M.S. (2006).** The RNA polymerase-binding protein RbpA confers basal levels of rifampicin resistance on *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* **60**: 687-696.
- Nicolás, F.J. (1995).** Un gen de *Myxococcus xanthus*, *carD*, que regula la carotenogénesis y controla el proceso de desarrollo multicelular. *Tesis Doctoral, Universidad de Murcia*.
- Nicolás, F.J., Cayuela, M.L., Martínez-Argudo, I.M., Ruiz-Vázquez, R.M., & Murillo, F.J. (1996).** High mobility group I(Y)-like DNA-binding domains on a bacterial transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 6881-6885.
- Nicolás, F.J., Ruiz-Vázquez, R.M., & Murillo, F.J. (1994).** A genetic link between light response and multicellular development in the bacterium *Myxococcus xanthus*. *Genes Dev* **8**: 2375-2387.
- O'Connor, K.A., & Zusman, D.R. (1989).** Patterns of cellular interactions during fruiting-body formation in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **171**: 6013-6024.
- Ortiz-Guerrero, J.M. (2013).** Papel de la vitamina B12 en la actividad de una familia de factores transcripcionales con una singular arquitectura de dominios. *Tesis Doctoral, Universidad de Murcia*.
- Ortiz-Guerrero, J.M., Polanco, M.C., Murillo, F.J., Padmanabhan, S., & Elías-Arnanz, M. (2011).** Light-dependent gene regulation by a coenzyme B12-based photoreceptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 7565-7570.

- Padmanabhan, S., Elías-Arnanz, M., Carpio, E., Aparicio, P., & Murillo, F.J. (2001).** Domain architecture of a high mobility group A-type bacterial transcriptional factor. *J Biol Chem* **276**: 41566-41575.
- Pathak, D.T., Wei, X., & Wall, D. (2012).** Myxobacterial tools for social interactions. *Res Microbiol* **163**: 579-591.
- Paul, B.J., Barker, M.M., Ross, W., Schneider, D.A., Webb, C., Foster, J.W., & Gourse, R.L. (2004a).** DksA: a critical component of the transcription initiation machinery that potentiates the regulation of rRNA promoters by ppGpp and the initiating NTP. *Cell* **118**: 311-322.
- Paul, B.J., Berkmen, M.B., & Gourse, R.L. (2005).** DksA potentiates direct activation of amino acid promoters by ppGpp. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 7823-7828.
- Paul, B.J., Ross, W., Gaal, T., & Gourse, R.L. (2004b).** rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet* **38**: 749-770.
- Pemberton, I.K., Muskhelishvili, G., Travers, A.A., & Buckle, M. (2000).** The G+C-rich discriminator region of the tyrT promoter antagonises the formation of stable preinitiation complexes. *J Mol Biol* **299**: 859-864.
- Peñalver-Mellado, M., García-Heras, F., Padmanabhan, S., García-Moreno, D., Murillo, F.J., & Elías-Arnanz, M. (2006).** Recruitment of a novel zinc-bound transcriptional factor by a bacterial HMGA-type protein is required for regulating multiple processes in *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* **61**: 910-926.
- Perederina, A., Svetlov, V., Vassilyeva, M.N., Tahirov, T.H., Yokoyama, S., Artsimovitch, I., & Vassilyev, D.G. (2004).** Regulation through the secondary channel--structural framework for ppGpp-DksA synergism during transcription. *Cell* **118**: 297-309.
- Pérez-Marín, M.C., Padmanabhan, S., Polanco, M.C., Murillo, F.J., & Elías-Arnanz, M. (2008).** Vitamin B12 partners the CarH repressor to downregulate a photoinducible promoter in *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* **67**: 804-819.
- Perez, J.C., & Groisman, E.A. (2009).** Evolution of transcriptional regulatory circuits in bacteria. *Cell* **138**: 233-244.
- Pfaffl, M.W. (2001).** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45.
- Ponting, C.P. (1997).** Tudor domains in proteins that interact with RNA. *Trends Biochem Sci* **22**: 51-52.
- Potocka, I., Thein, M., M, O.S., Jenal, U., & Alley, M.R. (2002).** Degradation of a *Caulobacter* soluble cytoplasmic chemoreceptor is ClpX dependent. *J Bacteriol* **184**: 6635-6641.
- Pratt, L.A., & Silhavy, T.J. (1998).** Crl stimulates RpoS activity during stationary phase. *Mol Microbiol* **29**: 1225-1236.
- Rabatinova, A., Sanderova, H., Jirat Matejckova, J., Korelusova, J., Sojka, L., Barvik, I., Papouskova, V., Sklenar, V., Zidek, L., & Krasny, L. (2013).** The σ

subunit of RNA polymerase is required for rapid changes in gene expression and competitive fitness of the cell. *J Bacteriol* **195**: 2603-2611.

Raju, R.M., Jedrychowski, M.P., Wei, J.R., Pinkham, J.T., Park, A.S., O'Brien, K., Rehren, G., Schnappinger, D., Gygi, S.P., & Rubin, E.J. (2014). Post-translational regulation via Clp protease is critical for survival of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* **10**: e1003994.

Rammohan, J., Ruiz Manzano, A., Garner, A.L., Stallings, C.L., & Galburt, E.A. (2015). CarD stabilizes mycobacterial open complexes via a two-tiered kinetic mechanism. *Nucleic Acids Res* **43**: 3272-3285.

Reichenbach, H. (1993). Biology of the Myxobacteria: ecology and taxonomy. ASM Press.

Reichenbach, H. (1999). The ecology of the myxobacteria. *Environ Microbiol* **1**: 15-21.

Robbe-Saule, V., Lopes, M.D., Kolb, A., & Norel, F. (2007). Physiological effects of Crl in *Salmonella* are modulated by σ^S level and promoter specificity. *J Bacteriol* **189**: 2976-2987.

Rolbetzki, A., Ammon, M., Jakovljevic, V., Konovalova, A., & Sogaard-Andersen, L. (2008). Regulated secretion of a protease activates intercellular signaling during fruiting body formation in *M. xanthus*. *Dev Cell* **15**: 627-634.

Ross, W., Ernst, A., & Gourse, R.L. (2001). Fine structure of *E. coli* RNA polymerase-promoter interactions: alpha subunit binding to the UP element minor groove. *Genes Dev* **15**: 491-506.

Ross, W., Schneider, D.A., Paul, B.J., Mertens, A., & Gourse, R.L. (2003). An intersubunit contact stimulating transcription initiation by *E. coli* RNA polymerase: interaction of the alpha C-terminal domain and sigma region 4. *Genes Dev* **17**: 1293-1307.

Ross, W., Vrentas, C.E., Sanchez-Vazquez, P., Gaal, T., & Gourse, R.L. (2013). The magic spot: a ppGpp binding site on *E. coli* RNA polymerase responsible for regulation of transcription initiation. *Mol Cell* **50**: 420-429.

Ruff, E.F., Drennan, A.C., Capp, M.W., Poulos, M.A., Artsimovitch, I., & Record, M.T., Jr. (2015). *E. coli* RNA Polymerase Determinants of Open Complex Lifetime and Structure. *J Mol Biol* **427**: 2435-2450.

Ruiz-Vazquez, R., & Murillo, F.J. (1984). Abnormal motility and fruiting behavior of *Myxococcus xanthus* bacteriophage-resistant strains induced by a clear-plaque mutant of bacteriophage Mx8. *J Bacteriol* **160**: 818-821.

Saecker, R.M., Record, M.T., Jr., & Dehaseth, P.L. (2011). Mechanism of bacterial transcription initiation: RNA polymerase-promoter binding, isomerization to initiation-competent open complexes, and initiation of RNA synthesis. *J Mol Biol* **412**: 754-771.

Sager, B., & Kaiser, D. (1993). Two cell-density domains within the *Myxococcus xanthus* fruiting body. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 3690-3694.

- Sambrook, G., Fritsch, E.F., & Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning: a laboratory manual. (Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sambrook, J., & Russell, D.W. (2001).** Molecular cloning: a laboratory manual (Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sanderson, A., Mitchell, J.E., Minchin, S.D., & Busby, S.J. (2003).** Substitutions in the *Escherichia coli* RNA polymerase sigma70 factor that affect recognition of extended -10 elements at promoters. *FEBS Lett* **544**: 199-205.
- Schluter, J.P., Reinkensmeier, J., Barnett, M.J., Lang, C., Krol, E., Giegerich, R., Long, S.R., & Becker, A. (2013).** Global mapping of transcription start sites and promoter motifs in the symbiotic alpha-proteobacterium *Sinorhizobium meliloti* 1021. *BMC Genomics* **14**: 156.
- Schwartz, E.C., Shekhtman, A., Dutta, K., Pratt, M.R., Cowburn, D., Darst, S., & Muir, T.W. (2008).** A full-length group 1 bacterial sigma factor adopts a compact structure incompatible with DNA binding. *Chem Biol* **15**: 1091-1103.
- Selby, C.P., & Sancar, A. (1995).** Structure and function of transcription-repair coupling factor. I. Structural domains and binding properties. *J Biol Chem* **270**: 4882-4889.
- Severinov, K., Fenyö, D., Severinova, E., Mustaev, A., Chait, B.T., Goldfarb, A., & Darst, S.A. (1994).** The σ subunit conserved region 3 is part of "5'-face" of active center of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J Biol Chem* **269**: 20826-20828.
- Severinova, E., Severinov, K., Fenyö, D., Marr, M., Brody, E.N., Roberts, J.W., Chait, B.T., & Darst, S.A. (1996).** Domain organization of the *Escherichia coli* RNA polymerase σ^{70} subunit. *J Mol Biol.* **263**: 637-647.
- Sharp, M.M., Chan, C.L., Lu, C.Z., Marr, M.T., Nechaev, S., Merritt, E.W., Severinov, K., Roberts, J.W., & Gross, C.A. (1999).** The interface of sigma with core RNA polymerase is extensive, conserved, and functionally specialized. *Genes Dev* **13**: 3015-3026.
- Shimkets, L., & Woese, C.R. (1992).** A phylogenetic analysis of the myxobacteria: basis for their classification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 9459-9463.
- Shin, M., Kang, S., Hyun, S.J., Fujita, N., Ishihama, A., Valentin-Hansen, P., & Choy, H.E. (2001).** Repression of deoP2 in *Escherichia coli* by CytR: conversion of a transcription activator into a repressor. *EMBO J* **20**: 5392-5399.
- Siegele, D.A., Hu, J.C., Walter, W.A., & Gross, C.A. (1989).** Altered promoter recognition by mutant forms of the σ^{70} subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J Mol Biol* **206**: 591-603.
- Sinars, C.R., Cheung-Flynn, J., Rimerman, R.A., Scammell, J.G., Smith, D.F., & Clardy, J. (2003).** Structure of the large FK506-binding protein FKBP51, an Hsp90-binding protein and a component of steroid receptor complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 868-873.
- Singh, B.N. (1947).** Myxobacteria in soils and composts; their distribution, number and lytic action on bacteria. *J Gen Microbiol* **1**: 1-10.

- Skerker, J.M., & Berg, H.C. (2001).** Direct observation of extension and retraction of type IV pili. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 6901-6904.
- Smith, A.J., & Savery, N.J. (2005).** RNA polymerase mutants defective in the initiation of transcription-coupled DNA repair. *Nucleic Acids Res* **33**: 755-764.
- Sogaard-Andersen, L. (2004).** Cell polarity, intercellular signalling and morphogenetic cell movements in *Myxococcus xanthus*. *Curr Opin Microbiol* **7**: 587-593.
- Souza, B.M., Castro, T.L., Carvalho, R.D., Seyffert, N., Silva, A., Miyoshi, A., & Azevedo, V. (2014).** sigma(ECF) factors of gram-positive bacteria: a focus on *Bacillus subtilis* and the CMNR group. *Virulence* **5**: 587-600.
- Spira, B., Silberstein, N., & Yagil, E. (1995).** Guanosine 3',5'-bispyrophosphate (ppGpp) synthesis in cells of *Escherichia coli* starved for Pi. *J Bacteriol* **177**: 4053-4058.
- Sproer, C., Reichenbach, H., & Stackebrandt, E. (1999).** The correlation between morphological and phylogenetic classification of mycobacteria. *Int J Syst Bacteriol* **49 Pt 3**: 1255-1262.
- Srivastava, D.B., Leon, K., Osmundson, J., Garner, A.L., Weiss, L.A., Westblade, L.F., Glickman, M.S., Landick, R., Darst, S.A., Stallings, C.L., et al. (2013).** Structure and function of CarD, an essential mycobacterial transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 12619-12624.
- Stallings, C.L., Stephanou, N.C., Chu, L., Hochschild, A., Nickels, B.E., & Glickman, M.S. (2009).** CarD is an essential regulator of rRNA transcription required for *Mycobacterium tuberculosis* persistence. *Cell* **138**: 146-159.
- Stragier, P., Parsot, C., & Bouvier, J. (1985).** Two functional domains conserved in major and alternate bacterial sigma factors. *FEBS Lett* **187**: 11-15.
- Sun, H., Zusman, D.R., & Shi, W. (2000).** Type IV pilus of *Myxococcus xanthus* is a motility apparatus controlled by the frz chemosensory system. *Curr Biol* **10**: 1143-1146.
- Sureka, K., Dey, S., Datta, P., Singh, A.K., Dasgupta, A., Rodrigue, S., Basu, J., & Kundu, M. (2007).** Polyphosphate kinase is involved in stress-induced *mprAB-sigE-rel* signalling in mycobacteria. *Mol Microbiol* **65**: 261-276.
- Sureka, K., Ghosh, B., Dasgupta, A., Basu, J., Kundu, M., & Bose, I. (2008).** Positive feedback and noise activate the stringent response regulator *rel* in mycobacteria. *PLoS One* **3**: e1771.
- Tabib-Salazar, A., Liu, B., Doughty, P., Lewis, R.A., Ghosh, S., Parsy, M.L., Simpson, P.J., O'Dwyer, K., Matthews, S.J., & Paget, M.S. (2013).** The actinobacterial transcription factor RbpA binds to the principal sigma subunit of RNA polymerase. *Nucleic Acids Res* **41**: 5679-5691.
- Tatti, K.M., Jones, C.H., & Moran, C.P., Jr. (1991).** Genetic evidence for interaction of σ^E with the *spoIIID* promoter in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **173**: 7828-7833.

- Thanbichler, M., Iniesta, A.A., & Shapiro, L. (2007).** A comprehensive set of plasmids for vanillate- and xylose-inducible gene expression in *Caulobacter crescentus*. *Nucleic Acids Res* **35**: e137.
- Travers, A.A. (1980).** Promoter sequence for stringent control of bacterial ribonucleic acid synthesis. *J Bacteriol* **141**: 973-976.
- Typas, A., Barembruch, C., Possling, A., & Hengge, R. (2007).** Stationary phase reorganisation of the *Escherichia coli* transcription machinery by Crl protein, a fine-tuner of sigmas activity and levels. *EMBO J* **26**: 1569-1578.
- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., & Leunissen, J.A. (2007).** Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res* **35**: W71-74.
- Vassilyev, D.G., Sekine, S., Laptenko, O., Lee, J., Vassilyeva, M.N., Borukhov, S., & Yokoyama, S. (2002).** Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 Å resolution. *Nature* **417**: 712-719.
- Vinella, D., Albrecht, C., Cashel, M., & D'Ari, R. (2005).** Iron limitation induces SpoT-dependent accumulation of ppGpp in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **56**: 958-970.
- Waldburger, C., Gardella, T., Wong, R., & Susskind, M.M. (1990).** Changes in conserved region 2 of *Escherichia coli* σ^{70} affecting promoter recognition. *J Mol Biol* **215**: 267-276.
- Wall, D., & Kaiser, D. (1999).** Type IV pili and cell motility. *Mol Microbiol* **32**: 1-10.
- Weiss, L.A., Harrison, P.G., Nickels, B.E., Glickman, M.S., Campbell, E.A., Darst, S.A., & Stallings, C.L. (2012).** Interaction of CarD with RNA polymerase mediates *Mycobacterium tuberculosis* viability, rifampin resistance, and pathogenesis. *J Bacteriol* **194**: 5621-5631.
- Werner, F., & Grohmann, D. (2011).** Evolution of multisubunit RNA polymerases in the three domains of life. *Nat Rev Microbiol* **9**: 85-98.
- Westblade, L.F., Campbell, E.A., Pukhrambam, C., Padovan, J.C., Nickels, B.E., Lamour, V., & Darst, S.A. (2010).** Structural basis for the bacterial transcription-repair coupling factor/RNA polymerase interaction. *Nucleic Acids Res* **38**: 8357-8369.
- Whipple, F.W., & Sonenshein, A.L. (1992).** Mechanism of initiation of transcription by *Bacillus subtilis* RNA polymerase at several promoters. *J Mol Biol* **223**: 399-414.
- White, D. (1993).** Myxospore and fruiting body morphogenesis. In *Myxobacteria II*, M.D.D. Kaiser, ed. (ASM Press), pp. 307-332.
- Wilson, C., & Dombroski, A.J. (1997).** Region 1 of σ^{70} is required for efficient isomerization and initiation of transcription by *Escherichia coli* RNA polymerase. *J Mol Biol* **267**: 60-74.
- Wolgemuth, C., Hoiczky, E., Kaiser, D., & Oster, G. (2002).** How myxobacteria glide. *Curr Biol* **12**: 369-377.

- Yang, X.F., Goldberg, M.S., He, M., Xu, H., Blevins, J.S., & Norgard, M.V. (2008).** Differential expression of a putative CarD-like transcriptional regulator, LtpA, in *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* **76**: 4439-4444.
- Yang, Z., & Higgs, P.I. (2014).** Myxobacteria. Genomics, Cellular and Molecular Biology. *Caister Academic Press*.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., & Messing, J. (1985).** Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.
- Yu, R., & Kaiser, D. (2007).** Gliding motility and polarized slime secretion. *Mol Microbiol* **63**: 454-467.
- Zaychikov, E., Martin, E., Denissova, L., Kozlov, M., Markovtsov, V., Kashlev, M., Heumann, H., Nikiforov, V., Goldfarb, A., & Mustaev, A. (1996).** Mapping of catalytic residues in the RNA polymerase active center. *Science* **273**: 107-109.
- Zeytuni, N., & Zarivach, R. (2012).** Structural and functional discussion of the tetra-trico-peptide repeat, a protein interaction module. *Structure* **20**: 397-405.
- Zhang, G., Campbell, E.A., Minakhin, L., Richter, C., Severinov, K., & Darst, S.A. (1999).** Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Cell* **98**: 811-824.
- Zhang, Y., Feng, Y., Chatterjee, S., Tuske, S., Ho, M.X., Arnold, E., & Ebright, R.H. (2012).** Structural basis of transcription initiation. *Science* **338**: 1076-1080.
- Zhou, B., Schrader, J.M., Kalogeraki, V.S., Abeliuk, E., Dinh, C.B., Pham, J.Q., Cui, Z.Z., Dill, D.L., McAdams, H.H., & Shapiro, L. (2015).** The global regulatory architecture of transcription during the *Caulobacter* cell cycle. *PLoS Genet* **11**: e1004831.
- Zhou, Y.N., Walter, W.A., & Gross, C.A. (1992).** A mutant σ^{32} with a small deletion in conserved region 3 of sigma has reduced affinity for core RNA polymerase. *J Bacteriol* **174**: 5005-5012.
- Zuber, P., Healy, J., Carter, H.L., 3rd, Cutting, S., Moran, C.P., Jr., & Losick, R. (1989).** Mutation changing the specificity of an RNA polymerase sigma factor. *J Mol Biol* **206**: 605-614.
- Zuo, Y., Wang, Y., & Steitz, T.A. (2013).** The mechanism of *E. coli* RNA polymerase regulation by ppGpp is suggested by the structure of their complex. *Mol Cell* **50**: 430-436.