



UNIVERSIDAD DE MURCIA
FACULTAD DE BIOLOGÍA

**Papel de la Vitamina B₁₂ en la Actividad de
una Familia de Factores Transcripcionales
con una Singular Arquitectura de Dominios**

D. Juan Manuel Ortiz Guerrero

2013

“La ciencia se compone de errores, que a su vez, son los pasos hacia la verdad.”

Julio Verne

A los que creen en mí y a nadie más

AGRADECIMIENTOS

Aun a riesgo de tropezar y de olvidar algún nombre o de escribir más de la cuenta voy a esforzarme en recordar a todas las personas que, tanto de forma obvia y directa, como de forma poco patente, pero no menos importante, han contribuido a que hoy esté escribiendo estos agradecimientos como guinda final de mi tesis doctoral. Advierto que no podré evitar ponerme algo sentimental, así que a aquellos que no soportan semejantes curserías les recomiendo pasar estas dos páginas de largo y comenzar con la Introducción directamente.

Quiero expresar mi agradecimiento, en primer lugar, a mis directores Padhu y Montse: grandes mentes pensantes, trabajadores y científicos, que me han dado la oportunidad de realizar este trabajo y de los que siempre me quedará algo por aprender. Estoy también muy agradecido a mis compañeros de departamento. A Javi por su honestidad y divertido, aunque afilado, sarcasmo. A Paco Murillo por su genio e inteligente vitalidad. A José Antonio por sus reprimendas, que me han hecho una persona un poco más organizada en el laboratorio. A Carmen por ser tan servicial y detallista. A Paquito por saber meterse conmigo de una forma tan elegante y que siempre me ha hecho reír. A Yogui por sus cotilleos y conversaciones mañaneras y por su humildad y sencillez. A María Jesús por ser tan atenta, amable y encantadora. A Marisa por ser la luz de este departamento y por su sonrisa imborrable y sincera que nos alegra a todos.

En especial, agradezco a Aranza, Diego, Dani, Pepe, Trung, Nazaria, Lici, Sonia y Sergio ser mis compañeros de "comida" con los que he mantenido, y espero seguir manteniendo, las más interesantes y absurdas conversaciones. A Aranza por ser una compañera y amiga excepcional que llegó y le dio un poco de alegría al laboratorio cuando yo todavía estaba solico. A Diego por ser el eficiente mediador entre los postres de su madre/novia y mi paladar y por ir mostrando poco a poco ese atisbo de "malignidad" en su aparente timidez. A Dani le agradezco muchas cosas, entre otras (y porque no soy rencoroso), ser un digno rival o, mejor dicho, el vencedor por antonomasia en nuestros duelos gastronómicos. Solo un órgano de tu cuerpo (hasta donde yo sé) supera en tamaño a tu estómago: el corazón. A Pepe estoy también más que agradecido por sus conocimientos "plantológicos", sus paseos en parajes naturales de la Región (a los que espero poder asistir con más frecuencia a partir de ahora) y por ser tan campechano y tener una sonrisa perenne como las acículas del pino carrasco. Trung, muchas gracias por traer ese soplo de aire fresco y exótico que necesitaba nuestro departamento, por mostrarte siempre tan alegre, a pesar de estar tan lejos de los tuyos y de nuestras diferencias culturales y por desmontar mis conocimientos sobre la alcohol deshidrogenasa en la cena de Navidad. A Nazaria, por esa personalidad tan salada que le caracteriza. A Lici por ser tan divertidamente agorero. A Sonia por ser tan inteligente, positiva y buena científica y por sacar tan buen provecho de los productos que el mar nos ofrece. A Sergio por soportar mi parloteo cansino durante años y por ser la máquina de matar que mejor me cae.... después de Dexter Morgan, por supuesto. También estoy agradecido al resto de miembros del ala B: Sebi, Curro, Victoriano, Rosa, Santiago, Adrián y Ana por siempre estar dispuestos a echar una mano cuando hace falta.

No pueden faltar en estos agradecimientos mis amigos más cercanos. Antonio por ser tan sumamente "picón" y el que más menea el grupo y mete caña por el Whatsapp. Gracias a ti la mano me tiembla cada vez que miro el móvil. A Miguel le agradezco ser una especie de profeta en tierra de herejes en lo que a cinematografía se refiere, ser tan detallista y sensible y tener esa facilidad para chincar de una forma tan elegante como certera. A Josele le agradezco ser ya un doctor en el arte de la vida y que pronto

será un farmacéutico excepcional. A David (más conocido como el Cata) le quiero dar la gracias por saber graznar y relinchar, por todo lo que me ha divertido su talento para la autopercusión y por introducir mi nombre en todas las canciones que llegan a sus oídos. A Saura le doy las gracias por su habilidad para contar casi cualquier cosa de un modo sumamente trivial y desternillantemente cómico, por su capacidad innata para la optimización de cualquier recurso y por ser uno de los mayores creadores de expresiones, palabras y motes que jamás se han visto por estas tierras. Además, compite cada vez con más éxito por el protagonismo en las canciones del Cata. A Jaime, inteligente y apasionado doctor, le agradezco tener ese carisma tan especial que lo caracteriza y que une a nuestro grupo cada vez que viene a Murcia; también por contagiarme de su irrefrenable ansia de aprender y por impulsarme a amar a la biología cada día más. Sumo este agradecimiento a José María y Ana, una versión cuerda y docta de Don Quijote y Sacho Panza en sus formas de mirar al mundo, tan irreconciliables, como complementarias y que tantos ratos agradables me han hecho pasar. A José Juan por su honestidad, integridad y comprensión y por ser un verdadero amigo. Hay un dicho que refiere así: "*A real friend stabs you in the front*" [Un verdadero amigo te apuñala por delante]. Esa frase te define perfectamente. A las Anas, Pozo y Pagán por arrastrarme (con no mucho esfuerzo) a salir de mis agobios y ver la luz del Sol o, más bien la de la Luna y por haber sido amigas tan cercanas e infalibles desde los inicios de la carrera. Al resto de mis biólogas Clara, María de Bullas, Eli, M^a del Mar, Cristina, María Nicolás, Ana Tapi, Ana Cutillas y, también a Rodri. Cuando estoy con vosotras (y con Rodri) me lo paso genial y me alegráis la semana, el mes y hasta la vida. Entre los biólogos se merecen una mención aparte Santiago y Fernando, personas muy especiales, diamantes en bruto por descubrir. Gracias por ser tan grandes. También a Perico, que fue biólogo durante un periodo breve pero intenso de su vida y que sin duda ha dejado huella. A José Antonio, a Mario y a Jorge les agradezco hacerme sentir tan a gusto. Nuestras quedadas son de lo más agradable y especial y siempre una liberación de la rutina. Saber que estáis ahí me hace sentir menos indefenso ante la vida. A los húngaros Juanjo, Aniuska, Pepe y Anna por formar parte de un momento tan liberador y enriquecedor de mi existencia que nunca olvidaré.

He dejado para el final de estos agradecimientos; no siendo por ello lo menos importante, a mi familia. A mis primos por ser, no solo familia, sino también grandes amigos. En especial a Andrés, la persona con la que tengo las conversaciones más trascendentales que un mortal puede tener, por ser tan noble y quererme tanto. También a Mari Carmen, una ciudadana del mundo, sin duda, con miles de recursos y ases en la manga, emocional y visceral y excepcional a la hora de animarme y enseñarme a quererme a mí mismo. A mis cuñaos Marco Antonio y Alfredo, por ser como hermanos para mí. A mis hermanos: Esther, por ser tan soñadora y bondadosa; Cristina, por su transparencia y realismo sinceros y valiosos y; Vicente, por su inteligencia viva, su capacidad para soportar lo "cansino" que soy y por ser siempre mi hermano pequeñín. A papá y mamá, por enseñarme de una forma tan cariñosa el valor del trabajo duro, ser tan auténticos, tan honrados, tan íntegros y mantener siempre los pies en la tierra por sus hijos. Os quiero.

Muchas gracias a todos, por ser la sal de mi vida y haber estado a mi lado estos cuatro años, haciéndolos, sin duda, mucho más ricos y a mí un poco más sabio.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1 Características generales de las Mixobacterias.....	3
I.2 Carotenogénesis en <i>M. xanthus</i> y su regulación por luz azul.....	5
I.2.1 Carotenoides	5
I.2.2 Biosíntesis de carotenoides en <i>M. xanthus</i>	6
I.2.3 Genética molecular de la carotenogénesis	7
I.2.4 Genes estructurales	8
I.2.5 Genes reguladores.....	9
Modelo de regulación.....	14
I.3 Proteínas tipo CarA/CarH: una familia de proteínas con una asociación novedosa de dominios.....	15
I.4 Las cobalaminas	23
I.4.1 Estructura de las cobalaminas	23
I.4.2 Origen ancestral de las cobalaminas y distribución en la naturaleza	26
I.5 Enzimas dependientes de cobalaminas	27
I.5.1 Las metiltransferasas.....	28
I.5.2 Las isomerasas.....	31
I.6 Regulación de la expresión génica por cobalaminas	34
I.7 Fotorreceptores bacterianos	40
I.8 Objetivos.....	45
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
II.1 Estirpes y plásmidos.....	49
II.1.1 Estirpes	49
II.1.2 Plásmidos	51
II.1.3 Oligonucleótidos	53
II.2 Medios de crecimiento.....	55
II.2.2 Medios ricos para <i>E. coli</i>	56
II.3 Condiciones de cultivo	57
II.4 Tampones y soluciones.....	58
II.4.1 Preparación de DNA plasmídico	58
II.4.2 Electroforesis de DNA	58

II.4.3 Electroforesis de proteínas	58
II.4.4 Purificación de proteínas.....	59
II.4.6 Determinación de la actividad β -galactosidasa	59
II.5 Extracción de DNA	59
II.6 Transferencia del DNA	60
II.6.1 Transformación de <i>E. coli</i>	60
II.6.2 Transformación de <i>M. xanthus</i>	60
II.7 Tratamiento enzimático del DNA.....	61
II.8 Amplificación de DNA por PCR	61
II.9 Mutagénesis dirigida.....	62
II.10 Obtención de genes quiméricos	63
II.11 Secuenciación del DNA	63
II.12 Técnicas electroforéticas.....	64
II.12.1 Electroforesis de DNA en gel de agarosa	64
II.12.2 Electroforesis de DNA en gel de poliacrilamida no desnaturizante	64
II.12.3 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS	65
II.13 Expresión y purificación de proteínas	65
II.13.1 Purificación proteínas fusionadas a cola de histidinas.....	65
II.13.2. Expresión y purificación de proteínas mediante el sistema IMPACT-CN ..	66
II.14 Ensayos de cambio en la movilidad electroforética (EMSA).....	67
II.15. Ensayos de protección frente a digestión por DNasa I	68
II.16 Expresión del gen <i>lacZ</i> en <i>M. xanthus</i>	69
II.17. Cromatografía de filtración en gel.....	70
III. RESULTADOS.....	71
III. 1 Caracterización de CarA y CarH.....	73
III.1.1 La dependencia de B ₁₂ reside en un módulo autónomo	74
III.1.2 La presencia de AdoB₁₂ promueve la unión de QTt1 y QTt2 al DNA operador <i>in vitro</i>.....	78
III.1.3 La AdoB₁₂ es esencial para la represión de P_B mediada por CarH <i>in vivo</i>	82
III.1.4 La oligomerización de CarH y TtCarH, pero no la de CarA, requieren B ₁₂ ..	86
III.1.5 La luz impide la oligomerización y la unión al DNA dependientes de AdoB ₁₂	95
III.1.6 El complejo AdoB ₁₂ -CarH proporciona una ruta fotosensora independiente de CarS para la regulación de la carotenogénesis en <i>M. xanthus</i>	99
III.2 Caracterización de TtCarH.....	101

III.2.1 La AdoB ₁₂ potencia específicamente la unión de TtCarH a la región intergénica <i>crtB-TtcarH in vitro</i>	103
III.2.2 Identificación del operador de TtCarH	105
III.2.4 Análisis de la reversibilidad de la acción fotosensora mediada por AdoB ₁₂	110
IV. DISCUSIÓN	115
IV.1 Mecanismo de acción molecular de CarH y su dependencia de B₁₂	117
IV.1.1 La actividad dependiente de B ₁₂ reside en el dominio C-terminal de CarH	118
IV.1.2 Acción de las cobalaminas sobre CarH	123
IV.1.3 Papel de la B ₁₂ como grupo cromóforo	126
IV.1.4 Modelo de regulación del promotor P _B por CarA/CarS y CarH/AdoB ₁₂	130
IV.2 Conservación evolutiva del mecanismo de regulación basado en AdoB₁₂	133
IV.2.1 Mecanismo de acción de TtCarH en <i>Thermus thermophilus</i>	138
IV.2.2 Dominios independientes de unión a B ₁₂	141
V. CONCLUSIONES	145
VI. BIBLIOGRAFÍA	151

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>M. xanthus</i>	4
Figura 2. Ruta de síntesis de carotenoides en <i>M. xanthus</i>	7
Figura 3. Estirpes de <i>M. xanthus</i> Car ⁻ y Car ^C	8
Figura 4. El superoperón carB-carA de <i>M. xanthus</i>	9
Figura 7. Dominios N-terminal de CarA y CarH, y el antirrepresor CarS.....	17
Figura 8. Alineamiento del dominio de unión a cobalamina de las sintetasa de metionina.....	18
Figura 9. Alineamiento entre la secuencia de aminoácidos de CarA, CarH y trece proteínas que presentan la misma asociación de dominios.....	21
Figura 10. Esquema de la estructura de general de las cobalaminas.....	24
Figura 11. Síntesis de adenosilcobalamina a partir de cianocobalamina.....	25
Figura 12. Relación entre las rutas de síntesis del grupo hemo, sirohemo, la clorofila y la AdoB ₁₂	26
Figura 13. Moléculas de uroporfirinógeno III y de precorrina-4B.....	27
Figura 14. Reacciones catalizadas por la sintetasa de metionina.....	28
Figura 15. Dominio de unión a B ₁₂ de la sintetasa de metionina.....	29
Figura 16. Conformaciones de las cobalaminas: "base-on", "base-off" y "base-off his-on".....	30
Figura 17. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos especialmente conservados en los dominios de unión a B ₁₂ de distintas proteínas.....	31
Figura 18. Esquema del mecanismo de acción de las isomerasas.....	32
Figura 19. Reacción catalizada por la mutasa de glutamato.....	33
Figura 20. Estructura tridimensional de la mutasa de glutamato de <i>Clostridium cochlearium</i> y diagrama topológico de la estructura de la metil malonil-CoA mutasa humana.....	34
Figura 21. Control de la expresión génica por ribointerruptores dependientes de B ₁₂	36

Figura 22. Estructura secundaria de los ribointerruptores de B ₁₂	37
Figura 23. Estructura terciaria de <i>env8AqB₁₂</i> y de <i>Tte</i>	38
Figura 24. Irradiancia solar desde 1 nm hasta 100 µm.....	40
Figura 25. Representación de la estructura tridimensional de los 6 tipos de fotorreceptores bacterianos conocidos.....	42
Figura 26. Arquitectura modular de los fotorreceptores bacterianos y rutas reguladas por luz.....	43
Figura 27. Circuito de regulación de <i>E. coli</i> inducido por luz dependiente de YcgE/YcgF.....	44
Figura 31. Mutagénesis dirigida mediante extensión de productos de PCR solapantes.....	62
Figura 32. Obtención de genes quiméricos por extensión de productos de PCR solapantes.....	63
Figura 33. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de CarA, CarH y TtCarH.....	74
Figura 34. Esquema de CarA y CarH, y de las quimeras Q1 y Q2.....	75
Figura 35. Representación esquemática del plásmido utilizado para la clonación de los genes quiméricos y su introducción en <i>M. xanthus</i>	75
Figura 36. Fenotipos de la estirpe silvestre, de los mutantes $\Delta carA$ $\Delta carH$ y $\Delta carA$, y de las estirpes portadoras de CarH, Q1 y Q2 en fondo genético $\Delta carA$ $\Delta carH$	76
Figura 37. Esquema de la arquitectura de dominios de CarA y CarH, de la proteína homóloga de <i>T. thermophilus</i> , y de la quimeras QTt1 y QTt2.....	77
Figura 38. Fenotipos de la estirpe silvestre, de los mutantes $\Delta carA$ $\Delta carH$ y $\Delta carA$, y de las estirpes portadoras de QTt1 y QTt2 en fondo genético $\Delta carA$ $\Delta carH$	78
Figura 39. Ensayo de EMSA con el fragmento de 130 pb a concentraciones crecientes de CarA.....	79
Figura 40. EMSA con QTt1 y QTt2 en ausencia de cobalaminas.....	80
Figura 41. Efecto de las diferentes cobalaminas en la unión de QTt1 y QTt2 al DNA <i>in vitro</i>	80
Figura 42. Efecto de la hemina en la unión de QTt1 y QTt2 al DNA <i>in vitro</i>	81
Figura 43. Efecto de las cobalaminas en la unión de CarA al DNA <i>in vitro</i>	81
Figura 44. Efecto de la presencia de AdoB ₁₂ en la unión de QTt1 y QTt2 al DNA <i>in vitro</i>	82

Figura 45. Alineamiento de la secuencia de PduO de <i>M. xanthus</i> con su homólogo en humanos y <i>E. coli</i>	83
Figura 46. Fenotipo de la estirpe $\Delta carA \Delta pduO$ en presencia de diferentes cobalaminas.....	84
Figura 47. Esquema de la introducción de la sonda <i>lacZ</i> en <i>carB</i> (Ω MR418) en la estirpe $\Delta carA \Delta pduO$	85
Figura 48. Protocolo utilizado para los ensayos de expresión de la sonda <i>lacZ</i> en <i>carB</i> y medidas de la expresión de dicha sonda <i>lacZ</i> en las estirpes $\Delta carA$ y $\Delta carA \Delta pduO$	86
Figura 49. Esquema del sistema del doble híbrido bacteriano.....	87
Figura 50. Análisis cualitativo de la interacción de CarA, CarH y sus variantes mutadas en la histidina del motivo de unión a B_{12} mediante DHB.....	88
Figura 51. Análisis cuantitativo de la interacción de CarA, CarH y sus variantes mutadas en la histidina del motivo de unión a B_{12} mediante el sistema del DHB.....	89
Figura 52. Efecto de las mutaciones CarH (E191D) y CarH(E191Q).....	90
Figura 53. Análisis cualitativo mediante DHB de la interacción consigo mismas de las versiones de CarHCt con las mutaciones E191D y E191Q.....	91
Figura 54. Análisis cuantitativo de la interacción consigo mismo de TtCarHCt y de su variante mutada en la H177 mediante el sistema del DHB.....	91
Figura 55. Análisis por cromatografía de exclusión de tamaño de los perfiles de elución de TtCarHCt, QTt2, TtCarHCt* y CarACt, en ausencia y presencia de cobalaminas.....	93
Figura 56. Análisis por entrecruzamiento químico de la interacción consigo mismo de TtCarHCt dependiente de AdoB ₁₂	94
Figura 57. ITC con 18 μ M de TtCarHCt titulado con 78 μ M de AdoB ₁₂	95
Figura 58. Espectro de absorción de la AdoB ₁₂	95
Figura 59. Efecto de la luz en la oligomerización de CarA y CarH.....	96
Figura 60. Análisis del efecto de la luz sobre TtCarHCt y QTt2 unidas a AdoB ₁₂ mediante cromatografía de exclusión de tamaño.....	97
Figura 61. Efecto de la luz en la unión de QTt1 y QTt2 al DNA <i>in vitro</i>	98
Figura 63. Efecto de la intensidad de la luz a distintas longitudes de onda en la unión de QTt2 al DNA <i>in vitro</i>	98
Figura 64. Comparación de los efectos de CarS y de la luz sobre la unión al DNA de QTt1 y QTt2.....	99

Figura 65. La iluminación con luz blanca, pero no con luz roja, elimina la represión dependiente de B ₁₂ y mediada por CarH <i>in vivo</i> aun en ausencia de CarS.....	100
Figura 66. La luz elimina, en ausencia de CarS, la represión mediada por CarH <i>in vivo</i>	100
Figura 67. Efecto de la luz roja en la expresión de <i>carB</i>	101
Figura 68. Contexto genómico de <i>TtcarH</i> en el megaplásmido pTT27 de <i>T. thermophilus</i>	102
Figura 69. Efecto de la AdoB ₁₂ en la unión de TtCarH a la región intergénica <i>crtB-TtcarH</i> .EMSA.....	103
Figura 70. Efecto de la AdoB ₁₂ en la unión de TtCarH a la región intergénica <i>crtB-TtcarH</i> . Protección de digestión frente a DNasa I.....	104
Figura 71. Efecto de la luz de diferentes longitudes de onda en la unión dependiente de AdoB ₁₂ de TtCarH a la región intergénica <i>crtB-TtcarH</i>	105
Figura 72. Fragmentos de DNA utilizados en EMSA para delimitar el operador de TtCarH, y su representación esquemática.....	106
Figura 73. Efecto de la mutación de pl o pll sobre la unión de TtCarH al DNA.....	107
Figura 74. Efecto de la eliminación completa o parcial de pl, acompañada o no de mutación en pll.....	108
Figura 75. Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la delimitación del sitio mínimo de unión de TtCarH.....	110
Figura 76. Ensayos de cromatografía de exclusión de tamaño con TtCarH en presencia de AdoB ₁₂ y OHB ₁₂	111
Figura 77. Estudio de la capacidad de recuperación de TtCarH-AdoB ₁₂ tras su iluminación.....	112
Figura 78. Efecto de la adición de AdoB ₁₂ al complejo TtCarH-OHB ₁₂	112
Figura 79. Análisis del efecto de la luz mediante espectrometría de masas.....	113
Figura 80. Comparación de los dominios implicados en la unión a cobalaminas de la mutasa de glutamato.....	120
Figura 81. Residuos en la cara superior e inferior del cofactor MeB ₁₂ en la sintetasa de metionina y alineamiento de secuencias de los dominios C-terminales de CarA, CarH, TtCarH, y los dominios de unión a cobalamina de las sintetasas de metionina de <i>E. coli</i> y <i>M. xanthus</i>	122
Figura 82. Modelo de regulación del promotor P _B por CarA/CarS y por CarH/AdoB ₁₂	131
Figura 83. Modelo de regulación de la carotenogénesis con los dos mecanismos posibles para la captación de la luz en <i>M. xanthus</i>	132

Figura 84. Alineamiento de secuencias de MXAN_0232 y los dominios C-terminales de CarH, y TtCarH.....	142
--	-----

Figura 85. Contexto genómico de MXAN_0232 y de sus homólogos en <i>Myxococcus fulvus</i> , <i>Corallococcus coralloides</i> y <i>Stigmatella aurantiaca</i>	143
--	-----

TABLAS

Tabla 1. Módulos fotorreceptores bacterianos.....	41
--	----

Tabla 2. Estirpes utilizadas en este estudio.....	50
--	----

Tabla 3. Estirpes de <i>E. coli</i> utilizadas en este trabajo.....	51
--	----

Tabla 4. Plásmidos utilizados en este trabajo.....	52
---	----

Tabla 5. Oligonucleótidos empleados en este trabajo.....	54
---	----

Tabla 6. Proteínas tipo CarA/CarH en diferentes especies bacterianas.....	134
--	-----

Tabla 7. Mixobacterias que presentan proteínas tipo CarA/CarH.....	138
---	-----

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Características generales de las Mixobacterias

Las mixobacterias, descritas en 1892 por Roland Thaxter, son bacterias Gram negativas, aerobias, de forma bacilar y de tamaño relativamente grande (0,7–1,2 μm de ancho y 3–12 μm de largo). Ampliamente distribuidas en la naturaleza, generalmente habitan sobre suelos ricos en materia orgánica y con vida microbiana general, aunque también se encuentran presentes sobre arena o superficies rocosas (Dawid 2000), en aguas dulces, e incluso en ambientes marinos (Lizuka *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. Por ejemplo, *Myxococcus xanthus*, objeto de estudio en este trabajo, presenta su tasa máxima de crecimiento a 34–36° C.

Una característica de las mixobacterias, que ha estimulado una intensa actividad investigadora sobre este grupo de organismos, es su ciclo de vida complejo que comprende dos fases, una vegetativa y otra de desarrollo multicelular (Figura 1) (Kaiser y Dworkin 2008). En ambas fases, las mixobacterias manifiestan un comportamiento social o cooperativo que resulta beneficioso para el conjunto e implica la existencia de mecanismos de comunicación intercelular. Durante el ciclo vegetativo, aunque las células individuales se mueven con cierta autonomía mediante un mecanismo de deslizamiento en el que no participan flagelos, el conjunto se desplaza de forma coordinada (Kaiser y Dworkin 2008). Los estudios realizados con *M. xanthus* han puesto de manifiesto que el movimiento de células individuales (aventurero) y el movimiento de las células en grupo (social) dependen de dos sistemas genéticos independientes denominados A y S, respectivamente (Ueki y Inouye 2006; Kaiser *et al.* 2010). El movimiento aventurero parece estar asociado a la extrusión de mucílago (Wolgemuth *et al.* 2002; Youderian *et al.* 2003) y a adhesiones focales de la célula en las que participa la proteína AglZ (Mignot *et al.* 2007), mientras que en el movimiento social intervienen pili de tipo IV, fibrillas y el lipopolisacárido de la pared celular (Arnold y Shimkets 1988; Wall y Kaiser 1999; Kaiser 2000; Kaiser *et al.* 2010).

Cuando los nutrientes escasean, el ciclo vegetativo se interrumpe y las mixobacterias llevan a cabo un complejo proceso de desarrollo multicelular único en el mundo procariótico (Figura 1). Dicho proceso depende del intercambio entre células de varias señales que desencadenan una compleja red de acciones reguladoras intracelulares y una activación programada de genes específicos. El resultado final es la formación de estructuras multicelulares denominadas cuerpos fructíferos donde las células vegetativas se diferencian en formas de resistencia denominadas mixosporas,

que se mantienen metabólicamente inactivas hasta que las condiciones del medio vuelven a ser adecuadas (Kroos 2007; Kaiser 2008; Kaiser *et al.* 2010; Pathak *et al.* 2012).

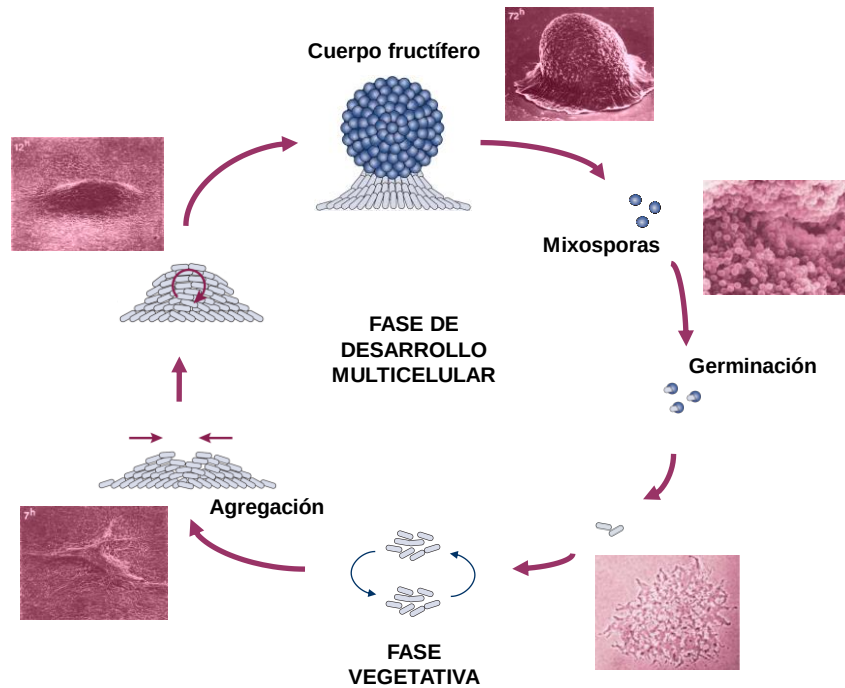


Figura 1. Ciclo de vida de *M. xanthus*

El comportamiento social de las mixobacterias juega también un papel importante en su modo de alimentación, ya que se nutren a partir de otros microorganismos de su entorno, a los que degradan secretando una batería de enzimas al exterior. Desde un punto de vista nutricional, *M. xanthus* es una bacteria compleja. Los aminoácidos constituyen una excelente fuente de carbono y energía, pero también el acetato, glicerol, varios intermediarios del ciclo de Krebs y, especialmente, el piruvato. La leucina, isoleucina, valina y, en ausencia de la vitamina B₁₂, la metionina, son esenciales para el crecimiento vegetativo aunque otras fuentes de carbono, energía y nitrógeno estén presentes en el medio. En cambio, ni las hexosas, ni las pentosas, ni los polisacáridos son utilizados por la bacteria (Bretscher y Kaiser 1978). Que la metionina sea un aminoácido esencial solo en ausencia de B₁₂ se debe a la presencia de una sintetasa de metionina endógena (codificada por el gen situado en el locus *YP_630206*) cuya actividad depende de la vitamina. Dado que *M. xanthus* es incapaz de sintetizar cobalaminas *de novo* (al carecer de la mayoría de los genes implicados en esta ruta bioquímica), es imprescindible la captación exógena de éstas para que la bacteria pueda sintetizar metionina.

I.2 Carotenogénesis en *M. xanthus* y su regulación por luz azul

En el hábitat natural de *M. xanthus*, el suelo, las células quedan fácilmente expuestas a la luz. La radiación luminosa genera agentes oxidantes que pueden reaccionar con lípidos de membrana, proteínas o ácidos nucleicos, dañando los componentes celulares. *M. xanthus* responde a la luz azul con la producción de carotenoides, moléculas fotoprotectoras que evitan la lisis celular (Burchard y Dworkin 1966; Galbis-Martínez *et al.* 2012).

I.2.1 Carotenoides

Los carotenoides constituyen uno de los grupos de pigmentos más extendidos en la naturaleza. Están presentes en todos los organismos fotosintéticos, siendo responsables de la mayoría de los colores, del amarillo claro al rojo oscuro, de flores y frutos. También los producen ciertos hongos y bacterias no fotosintéticas, entre las que se incluye *M. xanthus*. Además, pueden encontrarse en distintos grupos de animales que, aunque no los sintetizan, acumulan y transforman los que incorporan en la dieta (Bonifacio *et al.* 2012).

En los organismos fotosintéticos, los carotenoides se encuentran asociados, junto con bacterioclorofilas y clorofilas, a proteínas de membrana (Britton 1993; Kühlbrandt *et al.* 1994). Forman parte de los complejos antena y actúan como pigmentos accesorios de la fotosíntesis. En los organismos no fotosintéticos, los carotenoides están unidos a la membrana celular, a proteínas del citoplasma o a otras estructuras citoplasmáticas como cristales y fibrillas (Goodwin 1980; Britton 1983; Deruère *et al.* 1994; Takaichi 2011). Tanto en organismos fotosintéticos como no fotosintéticos, los carotenoides actúan como agentes fotoprotectores neutralizando ciertos compuestos fotoactivables, tales como las porfirinas (Dirks *et al.* 1980; Cogdell 1988), o especies moleculares de alta energía y gran poder oxidante (como el oxígeno singlete) que se originan cuando las moléculas fotoexcitadas reaccionan con el oxígeno (Di Mascio *et al.* 1989).

La estructura básica de los carotenoides está constituida por un esqueleto hidrocarbonado de 40 átomos de carbono. Se distinguen dos tipos de carotenoides: los carotenos, que no contienen oxígeno, y las xantofilas, que contienen radicales oxigenados. La estructura de ambos está a menudo modificada por deshidrogenaciones, ciclaciones y adición de diversos grupos funcionales. El estado de isomerización y el número de dobles enlaces conjugados de la estructura básica

determinan las propiedades de absorción de cada carotenoide. Los resultados de las investigaciones sobre estructura, propiedades, aplicaciones, regulación y biosíntesis de carotenoides son objeto de revisiones frecuentes (Armstrong y Hearst 1996; Maresca *et al.* 2008; Sandmann 2009; Tian y Hua 2010).

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

La coloración de las colonias y los cuerpos fructíferos de las mixobacterias se debe en gran parte a la presencia de pigmentos carotenoides (Burchard y Dworkin 1966). La purificación y caracterización químico-física de los carotenoides de distintas especies de mixobacterias (Kleinig y Reichenbach 1969; Kleinig *et al.* 1970; Reichenbach y Kleinig 1971; 1972) ha revelado que contienen mezclas de diferentes carotenoides, aunque la mayoría de ellos se encuentra en cantidades mínimas. En condiciones de iluminación, *M. xanthus* acumula mayoritariamente un éster glicosilado de mixobacton, grandes cantidades de fitoeno y cantidades menores de fitoflueno y otros (Martínez-Laborda *et al.* 1990). El color amarillo de las colonias o cultivos de *M. xanthus* incubados en la oscuridad se debe, sin embargo, a la síntesis de un pigmento hidrosoluble no carotenoide (Meiser *et al.* 2006).

Los primeros pasos de la ruta de síntesis de carotenoides en *M. xanthus* son similares a los de otros organismos carotenogénicos. El precursor común es una molécula de cinco átomos de carbono, el isopentenil pirofosfato (IPP), que al condensarse con su isómero, el dimetil alil pirofosfato (DMAPP), da lugar al geranil pirofosfato (GPP), de 10 átomos de carbono. La condensación sucesiva de GPP con dos moléculas de IPP origina, en primer lugar, farnesil pirofosfato (FPP) y, finalmente, geranil geranil pirofosfato (GGPP), de 20 átomos de carbono. La condensación de dos moléculas de GGPP da lugar al fitoeno, de 40 átomos de carbono, que es el primer caroteno no coloreado de la ruta (Elías-Arnanz *et al.* 2008) (véase Figura 2).

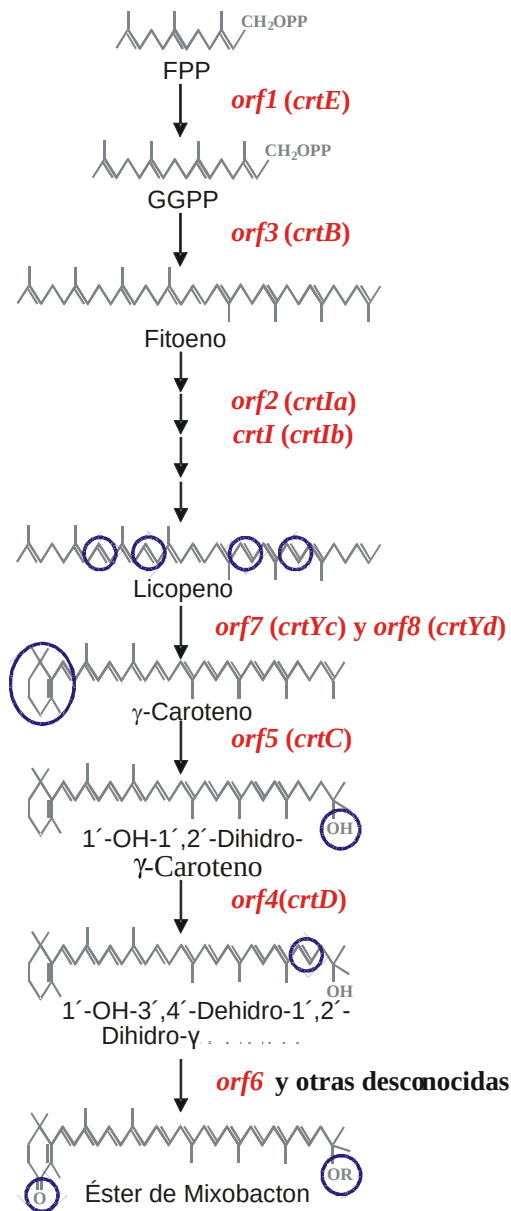


Figura 2. Ruta de síntesis de carotenoides en *M. xanthus* y asignación de funciones a los genes *car* estructurales (*crtIb* y *orfs* del operón *carB-carA*). Los círculos azules indican las sucesivas reacciones generadas a partir de fitoeno. R representa una molécula de azúcar esterificada.

I.2.3 Genética molecular de la carotenogénesis

La producción de carotenoides en *M. xanthus* es absolutamente dependiente de estimulación externa, incrementándose notablemente si las células alcanzan la fase estacionaria. Especialmente estudiada ha sido la estimulación por luz azul, descrita inicialmente por Burchard y Dworkin, 1966. Posteriormente, se descubrió que la presencia de cobre en el medio estimula la síntesis de carotenoides en la oscuridad (Moraleta-Muñoz *et al.* 2005). El cambio de color, del amarillo al rojo, asociado a la

acumulación de carotenoides permite seguir visualmente el proceso y ha facilitado enormemente la identificación de mutantes, ya sea de fenotipo negativo (Car^-), o constitutivo (Car^C) (Figura 3).



Figura 3. Estirpes de *M. xanthus* Car^- (amarilla, crecida en la luz) y Car^C (roja, crecida en oscuridad)

El estudio de dichos mutantes ha permitido identificar tanto genes estructurales como genes reguladores implicados en la respuesta a la luz azul, que se encuentran situados en seis loci independientes del genoma de *M. xanthus*: el operón regulador *carQRS*, el superoperón *carB-carA* (que agrupa genes estructurales y reguladores), el gen estructural *crtIb*, el operón regulador *carDG* y los genes reguladores *ihfA* y *carF*. Al análisis genético ha seguido en los últimos años un intenso análisis bioquímico. De ambas aproximaciones se deriva el modelo general de acción génica que se presenta más adelante, en la Figura 6.

1.2.4 Genes estructurales

El único gen estructural conocido que no se encuentra agrupado en el superoperón *carB-carA* es el gen *crtIb*, identificado por una inserción del transposón Tn5-*lac* que producía fenotipo Car^- (Balsalobre *et al.* 1987). Estudios posteriores han llevado a concluir que *crtIb* participa en la deshidrogenación del fitoeno (Martínez-Laborda *et al.* 1990; Fontes *et al.* 1993; Iniesta *et al.* 2007).

Los ocho genes estructurales restantes conocidos se encuentran agrupados en el locus *carB-carA* (Figura 4). Seis de ellos (*crtE*, *crtIa*, *crtB*, *crtD*, *crtC* y *orf6*) constituyen un operón denominado *carB*, que se transcribe a partir de un único promotor fotoinducible (P_B), cuya regulación por *carH* y B_{12} ha sido objeto de estudio

en este trabajo. Los otros dos genes (*crtYc* y *crtYd*) forman parte de un operón contiguo denominado *carA*, que se transcribe en la misma dirección pero de forma independiente de luz y a partir de un promotor situado en la región estructural de *orf6* (P_A). No obstante, en condiciones de iluminación, la expresión del operón *carA* sufre un incremento debido a la transcripción procedente del promotor P_B (Ruiz-Vázquez *et al.* 1993; Botella *et al.* 1995; Botella 1996). Las distancias intergénicas entre los genes estructurales resultan ser muy pequeñas o nulas, lo cual sugiere la existencia de algún tipo de acoplamiento traduccional entre ellos.

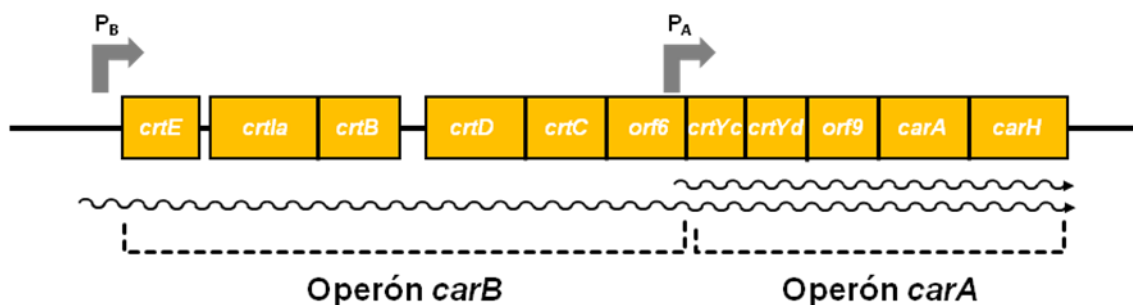


Figura 4. El superoperón *carB-carA* de *M. xanthus*. Se representan los *orfs* (1–11) deducidos del análisis de la secuencia, la posición (demostrada experimentalmente) de los promotores P_B y P_A y los mensajeros que desde ellos se producen.

El análisis de los carotenos acumulados por varios mutantes y la similitud de secuencia con genes conocidos de otros organismos, así como su expresión heteróloga, han permitido asignar funciones enzimáticas concretas a la mayoría de productos génicos de los genes estructurales del superoperón *carB-carA* (revisado en Elías-Arnanz *et al.* 2008) (Figura 2).

I.2.5 Genes reguladores

A continuación, se describen con cierto detalle los genes reguladores identificados hasta la fecha por su papel en la respuesta a la luz. Los genes directamente implicados en la regulación del operón *carB*, objeto de estudio de este trabajo, se detallan en una sección aparte.

El **operón *carQRS*** consta de tres genes acoplados traduccionalmente, *carQ*, *carR* y *carS*, cuya transcripción depende de un único promotor regulado por la luz a través de los propios productos génicos CarQ y CarR. Mutaciones de falta de función en el gen ***carQ*** producen fenotipo Car⁻ e impiden la activación por la luz de su propio

promotor (P_{QRS}), de los promotores del operón *carB* (P_B) y del gen *crtIb* (P_I) (Martínez-Laborda y Murillo 1989; Fontes *et al.* 1993). El fenotipo Car^- se debe a que CarQ es un factor σ , de los denominados ECF (*extracytoplasmic function*), que se requiere directamente para la expresión de P_{QRS} y P_I (Lonetto *et al.* 1994; Gorham *et al.* 1996; Browning *et al.* 2003).

El gen ***carR*** fue definido originalmente por varias mutaciones ligadas que producían fenotipo Car^C (Martínez-Laborda *et al.* 1986). La proteína CarR, que se sitúa en la membrana, actúa como regulador negativo de todo el sistema en la oscuridad, interaccionando físicamente con CarQ y secuestrándola en la membrana (Gorham *et al.* 1996; Browning *et al.* 2003; Galbis-Martínez *et al.* 2008). CarR es, por tanto, un factor anti-sigma. La iluminación con luz azul suprime la acción anti-sigma de CarR, liberándose CarQ y activándose la transcripción de los promotores regulados por éste (Gorham *et al.* 1996).

Un factor clave para la inactivación de CarR por la luz es el producto del gen ***carF***, la primera proteína conocida en la cascada reguladora. Las mutaciones en *carF* bloquean la activación de los tres promotores inducibles por la luz: P_{QRS} , P_I y P_B (Fontes *et al.* 2003). Los estudios genéticos, junto con las pruebas de que CarF se sitúa en la membrana interna e interacciona físicamente con CarR (Galbis-Martínez *et al.* 2008) demuestran que CarF se comporta como un factor anti-anti-sigma. Recientemente, se ha demostrado que CarF, que no muestra similitud con ningún fotorreceptor conocido, no responde directamente al estímulo luminoso. Más bien parece que CarF funciona como un "detector" de la presencia de oxígeno singlete (1O_2), una especie del oxígeno muy reactiva y dañina que se produce por la fotoexcitación de la protoporfirina IX (PPIX) acumulada en la membrana interna de *M. xanthus* (Galbis-Martínez *et al.* 2012). Una vez detectada la presencia de 1O_2 , y de alguna manera todavía por determinar, CarF transmitiría la señal a CarR, provocando su inactivación y la liberación de CarQ. CarF es similar a una familia de proteínas llamadas Kua, de función desconocida, y que se encuentran ampliamente distribuidas en organismos eucarióticos (Fontes *et al.* 2003; Galbis-Martínez 2005). En los segmentos citoplasmáticos de CarF se distinguen 12 histidinas, 8 de las cuales están conservadas en las proteínas Kua. Al menos 5 de estas 8 histidinas son esenciales para la función de CarF (Fontes *et al.* 2003; Galbis-Martínez *et al.* 2008). La distribución de varias de las histidinas es similar a la encontrada en las desaturasas e hidroxilasas de ácidos grasos, en las que constituyen un grupo de unión a hierro implicado en la interacción con O_2 y su activación para oxidar al sustrato (Shanklin *et al.* 1997; Fontes *et al.* 2003; Gao *et al.* 2009), lo que sugiere que CarF podría presentar también un grupo de hierro.

En la respuesta de *M. xanthus* a la luz participan también otras proteínas, cuya acción reguladora tiene carácter global: la proteína IhfA, homóloga a la cadena α del IHF (*integration host factor*) de *E. coli* (Moreno *et al.* 2001), y las proteínas CarD y CarG. Dichas proteínas se expresan de forma independiente de la luz y probablemente funcionan como factores arquitectónicos modulando la conformación del DNA y/o la formación de complejos nucleoproteicos específicos implicados en distintas operaciones sobre el DNA. La mutación *ihfA* provoca una disminución drástica en la producción de carotenoides, bloqueando la activación de P_{QRS} por la luz, y por tanto e indirectamente, la expresión de *crtIb* (Moreno *et al.* 2001). Además, la mutación *ihfA* bloquea la expresión del operón *carA*, cuyo promotor es dependiente del factor σ^{54} (Botella 1996; Moreno 1997). Es probable que, como ocurre con las proteínas IHF de otros organismos, IhfA actúe provocando una curvatura en el DNA que favorezca el contacto entre la polimerasa de RNA y proteínas activadoras específicas.

Los genes *carD* y *carG* forman parte del **operón *carDG***. Sus productos génicos, CarD y CarG, actúan de manera conjunta en la activación de varios promotores (Peñalver-Mellado 2005; Peñalver-Mellado *et al.* 2006; Elías-Arnanz *et al.* 2010). En la respuesta a la luz, CarD es directamente necesario para la activación de P_{QRS} y P_I , afectando solo indirectamente a la activación de P_B (Nicolás *et al.* 1994; Nicolás 1995). CarD y sus homólogos son las únicas proteínas procarióticas conocidas con un dominio de unión al DNA típico de los factores arquitectónicos eucarióticos de la familia HMGA (*high mobility group A*). Este dominio consta de una región ácida ligada a varias copias (cuatro en CarD) de un motivo de unión al DNA conocido como «gancho AT» (Nicolás *et al.* 1996). A través del dominio HMGA, en el extremo C-terminal, CarD se une a una región específica, rica en pares AT, situada aguas arriba de la región -35 del promotor P_{QRS} y que resulta esencial para que dicho promotor sea activado por la luz (Nicolás *et al.* 1996; Padmanabhan *et al.* 2001; García-Heras *et al.* 2012). Se ha demostrado que el dominio de unión al DNA de CarD puede ser reemplazado por otros dominios básicos e intrínsecamente desestructurados (como los presentes en la HMGA1a, en la histona H1 o en el homólogo de CarD de *Anaeromyxobacter dehalogenans*) sin que ello afecte significativamente a ninguno de los procesos regulados por CarD (García-Heras *et al.* 2009). En CarD, pero no en las proteínas HMGA, el dominio de unión al DNA va precedido de un dominio N-terminal que es esencial para su función y que tiene un origen puramente procariótico (Cayuela *et al.* 2003). El dominio N-terminal está implicado en la interacción de CarD consigo misma, y con CarG y la polimerasa de RNA (Padmanabhan *et al.* 2001; Peñalver-Mellado *et al.* 2006; García-Heras *et al.* 2009; Elías-Arnanz *et al.* 2010; García-Moreno

et al. 2010; García-Heras *et al.* 2012). CarG, por otro lado, es una proteína de unión a zinc que se requiere en todos los procesos en los que participa CarD, pero no se une directamente al DNA. Su función en el complejo podría ser la de interactuar con otras proteínas, ya sean factores reguladores específicos o componentes de la maquinaria basal de transcripción (Peñalver-Mellado *et al.* 2006; Elías-Arnanz *et al.* 2010).

Regulación del operón *carB*

La identificación de dos loci no ligados cuyas mutaciones afectaban a la expresión de P_B , pero no a la de P_I (tampoco a la de P_{QRS}), puso de manifiesto que el mecanismo responsable de la fotoinducción del operón *carB* debía ser distinto del ya descrito para el gen estructural *crtIb*. Uno de los dos loci resultó ser ***carS***, el tercer gen del operón *carQRS*. La primera mutación en *carS*, *carS1*, se identificó por producir expresión constitutiva del operón *carB* (Balsalobre 1989). La mutación *carS1* es, sin embargo, una mutación de ganancia de función (que da lugar a una versión truncada de CarS), ya que la falta de función de *carS* bloquea la fotoinducción de P_B (McGowan *et al.* 1993). CarS es, por tanto, un regulador positivo del promotor P_B . La proteína CarS es pequeña, ácida, y no presenta homología global con ninguna proteína depositada en los bancos de datos.

El segundo locus implicado en la regulación de P_B se identificó por una mutación generada con luz ultravioleta, *carA1*, que provocaba fenotipo Car^C incluso en una estirpe portadora de una delección del operón *carQRS* (Martínez-Laborda *et al.* 1986; Martínez-Laborda y Murillo 1989; McGowan *et al.* 1993; Botella *et al.* 1995). Los estudios posteriores revelaron que el fenotipo Car^C se debe al efecto de la mutación sobre el gen *carA*, cuyo producto actúa como un regulador negativo de P_B en la oscuridad (Botella *et al.* 1995; Cervantes y Murillo 2002). El análisis de la secuencia de CarA puso de manifiesto una arquitectura de dominios que hasta entonces no se había descrito en ninguna proteína: un dominio N-terminal de unión al DNA similar al de las proteínas MerR, asociado a un dominio C-terminal con un motivo de unión a cobalaminas (Botella *et al.* 1995; Cervantes y Murillo 2002). Los estudios *in vivo* e *in vitro* han confirmado que CarA es capaz de unirse al DNA y a cobalaminas aunque, sorprendentemente, su función represora es independiente de su unión a cobalaminas. Se ha demostrado que CarA se une en forma de dímero, primero a un sitio palindrómico de alta afinidad (pI), y después cooperativamente a un segundo sitio palindrómico de baja afinidad (pII), que solapa con la región -35 del promotor P_B .

(véase Figura 5), impidiendo así la unión de la polimerasa de RNA (López-Rubio *et al.* 2002; López-Rubio *et al.* 2004; Pérez-Marín *et al.* 2004).

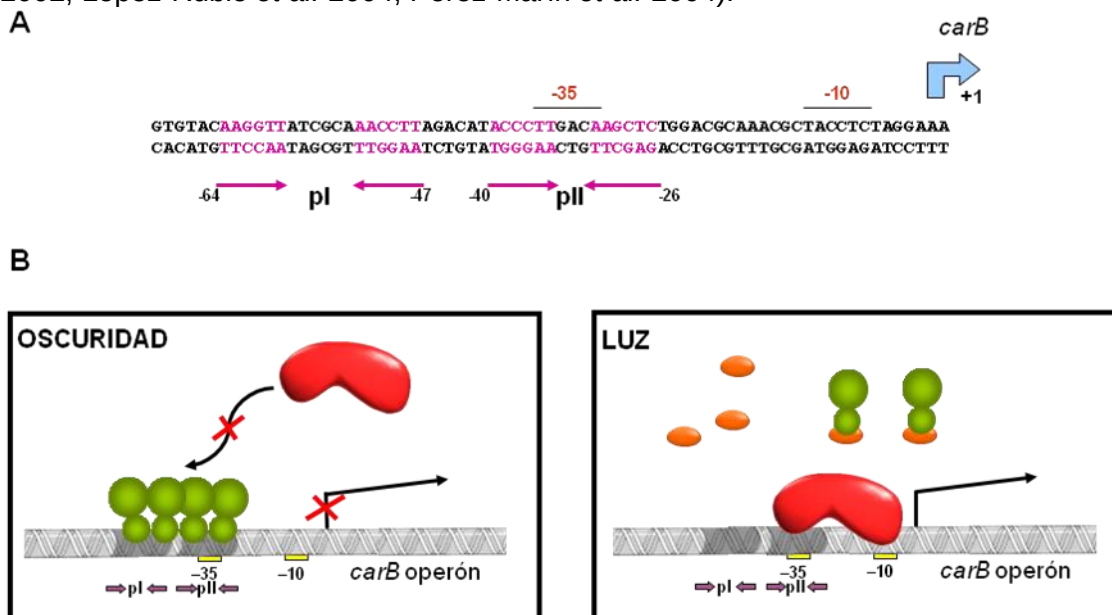


Figura 5. Esquema de la región operadora de CarA (A) y modelo de regulación de P_B por CarA y CarS (B). En A, las flechas y las letras coloreadas en rosa indican los dos palíndromes, pI y pII, a los que se une CarA. En B, la polimerasa de RNA aparece representada en color rojo, CarA en verde y CarS en naranja.

La proteína CarS, que se produce exclusivamente en la luz, se une a la región N-terminal de CarA, desestabilizando los complejos CarA-DNA y permitiendo el acceso de la polimerasa de RNA y, por tanto, la expresión del operón *carB* (López-Rubio *et al.* 2002; López-Rubio *et al.* 2004; López-Rubio 2005) (Figura 5B).

Un resultado sorprendente en su momento fue la observación de que la adición de vitamina B_{12} al medio suprimía el fenotipo constitutivo para la carotenogénesis de la estirpe portadora de la delección de *carA*. Curiosamente, para que el efecto de la vitamina tuviese lugar era necesario que estuviese intacto el operador de CarA en P_B . Los estudios genéticos demostraron que el factor responsable de la respuesta dependiente de B_{12} era el producto del gen inmediatamente aguas abajo de *carA*, al que se denominó *carH* (Pérez-Marín *et al.* 2008). Los genes *carA* y *carH* determinan proteínas muy parecidas entre sí (35% de identidad), que muestran la misma arquitectura de dominios. Sin embargo, a pesar de la similitud entre ambas proteínas, solo CarH depende de la vitamina para su acción represora. Entender la base molecular de la diferencia entre CarA y CarH, y desvelar de qué modo la vitamina B_{12} modula la acción reguladora de CarH han sido los principales objetivos de este trabajo.

Modelo de regulación

Los datos obtenidos hasta la fecha permiten proponer el siguiente modelo de acción génica para la respuesta a la luz azul en *M. xanthus* (Figura 6). En la oscuridad, se produciría una expresión basal de los genes del operón *carQRS*, de tal manera que la proteína CarR, actuando como un factor anti- σ , mantendría secuestrada en la membrana a la proteína CarQ (un factor σ^{ECF}), impidiendo así la activación de *carQRS* y *crtIb*. Por su parte, CarA, y/o CarH en presencia de B₁₂, regularía negativamente la expresión del operón *carB* mediante su unión a P_B y el bloqueo de la unión de la polimerasa de RNA al promotor. La producción de oxígeno singlete por fotoexcitación de la protoporfirina IX en la membrana sería la señal que dispararía la síntesis de carotenoides, en un proceso que requiere la participación del factor anti-anti- σ CarF. De alguna manera todavía por determinar, la proteína CarF provocaría la inactivación de CarR, con la que interacciona físicamente. CarQ quedaría entonces libre para activar, con ayuda de CarD y CarG, a los promotores P_{QRS} y P_I. La activación de P_{QRS} requeriría también la participación de la proteína IhfA. La proteína CarS competiría con el DNA por la unión a CarA, anulando así el efecto negativo de CarA/CarH-B₁₂ sobre P_B y permitiendo la activación de dicho promotor. La expresión de los genes estructurales del operón *carB* y del gen *crtIb* llevaría a la síntesis de carotenoides.

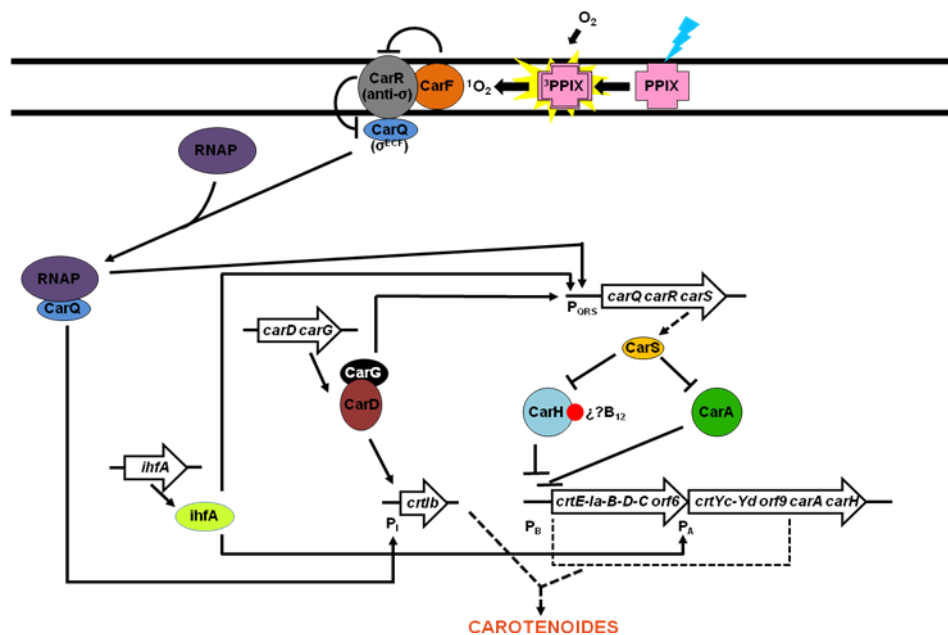


Figura 6. Modelo de regulación de la respuesta a la luz azul en *M. xanthus*

I.3 Proteínas tipo CarA/CarH: una familia de proteínas con una asociación novedosa de dominios

Como se comentó anteriormente, CarA y CarH fueron las primeras proteínas reguladoras descritas con un dominio de unión a cobalaminas (Cervantes y Murillo 2002). En ambas proteínas, dicho dominio se encuentra asociado a un dominio N-terminal que se asemeja al dominio de unión al DNA de los factores de transcripción de la familia MerR (Botella *et al.* 1995; Heldwein y Brennan 2001; Cervantes y Murillo 2002; Newberry y Brennan 2004). En la Figura 7A se muestra un alineamiento entre el dominio N-terminal de CarA y CarH y el dominio de unión al DNA de varias proteínas de la familia MerR. Los ensayos realizados en nuestro laboratorio han permitido demostrar que los dominios N-terminal de CarA y de CarH funcionan como regiones de unión no solo al DNA sino también a CarS (Pérez-Marín *et al.* 2004; López-Rubio 2005; Pérez-Marín *et al.* 2008). Además, los estudios estructurales y funcionales realizados con el dominio N-terminal de CarA han puesto de manifiesto que dicho dominio adopta la topología en hélice-giro-hélice «alada» característica del motivo de unión al DNA de los reguladores MerR (Navarro-Avilés *et al.* 2007) (Figura 7B). CarS, que muestra un plegamiento de tipo barril con 5 hebras β antiparalelas (Figura 7C), similar a los dominios SH3 de interacción proteína-proteína típicamente eucarióticos, presenta un bolsillo hidrofóbico delineado por residuos acídicos que imita la estructura y distribución de cargas del DNA operador y en el que encaja la hélice $\alpha 2$ de CarA implicada en el reconocimiento del DNA (León *et al.* 2010). El uso de un mismo elemento, la hélice $\alpha 2$, para el reconocimiento del DNA y de CarS por CarA, unido al hecho de que CarS imita la estructura del DNA, proporcionan una explicación molecular detallada sobre el mecanismo de represión-antirrepresión que controla la expresión del operón *carB*.

La señal de identidad de CarA y CarH es la presencia de un dominio C-terminal con un motivo de unión a cobalaminas presente en varias enzimas que utilizan tales compuestos como cofactor (Cervantes y Murillo 2002). Los programas de predicción de estructura sugieren una organización en dos subdominios para esta región de CarA y CarH, similar a la determinada para el dominio de unión a cobalaminas de la sintetasa de metionina de *E. coli* (Figura 8; véase Apartado I.5). Con algunos cambios conservativos, en la región C-terminal de CarA y CarH se observa también el motivo consenso de unión a cobalaminas [DxHxxG-(41)-SxL-(26-28)-GG, donde x representa cualquier aminoácido] (Drennan *et al.* 1994a; Ludwig *et al.* 1996). Se ha demostrado que CarA es capaz de unirse *in vitro* a cobalaminas a través de su dominio C-terminal,

aunque no requiere su presencia para unirse eficazmente al DNA (López-Rubio *et al.* 2002; López-Rubio *et al.* 2004). Además, las versiones de CarA mutadas en el motivo de unión a cobalaminas, que muestran un defecto en su unión a la vitamina *in vitro*, se comportan normalmente *in vivo*, lo que indica que CarA no depende de su unión a la vitamina para ejercer su función reguladora (Pérez-Marín *et al.* 2008). No obstante, el dominio C-terminal de CarA favorece la unión al DNA *in vitro* y es imprescindible *in vivo*, ya que la expresión a niveles fisiológicos del dominio N-terminal no es suficiente para restaurar el fenotipo silvestre para la carotenogénesis (Pérez-Marín *et al.* 2004). Los ensayos de doble híbrido han puesto de manifiesto que el dominio C-terminal media la interacción de CarA consigo misma y que dicha interacción no se ve alterada por la mutación del motivo de unión a cobalaminas (Pérez-Marín *et al.* 2008). Estos hechos demuestran que la oligomerización de CarA, aunque independiente de B₁₂, es imprescindible para su función represora *in vivo*. La imposibilidad de purificar CarH en su forma nativa ha impedido demostrar experimentalmente *in vitro* su unión a cobalaminas. No obstante, la observación de que mutaciones en el motivo de unión a cobalaminas eliminan la represión de P_B dependiente de B₁₂ sugiere que, como predicen los análisis de su secuencia, CarH es un regulador transcripcional que se une a cobalaminas (Pérez-Marín *et al.* 2008).

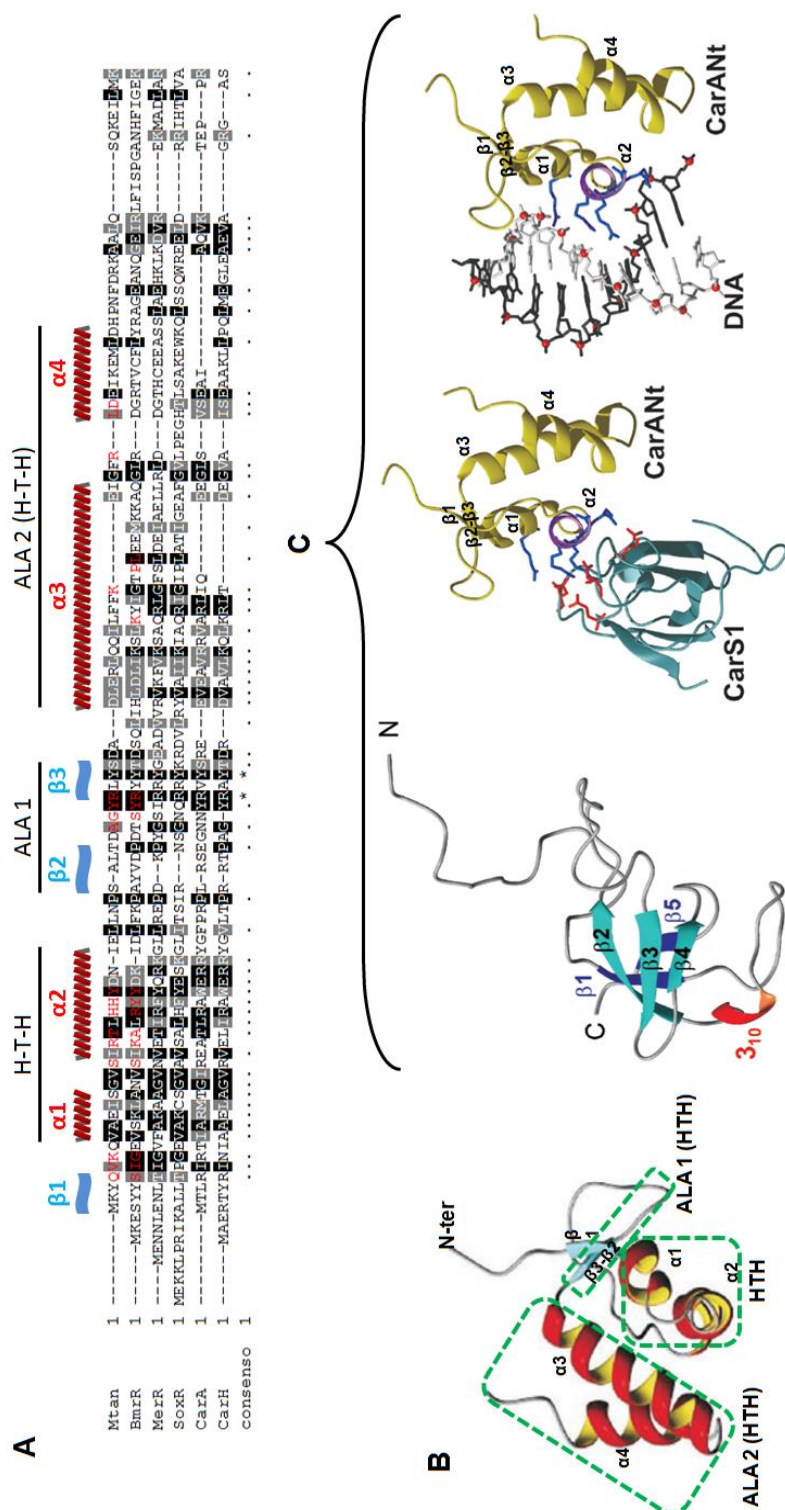


Figura 7. Dominios N-terminal de CarA y CarH, y el antirrepositor CarS

A) Alineamiento del dominio de unión a DNA de varias proteínas de la familia MerR: MtaN (LJBG_A) y BmrR(BA423495.1) de *B. subtilis*, MerR (ADC80844.1) y SoxR (AAB31680.1) de *E. coli* y la región amino de CarA (CAA79964.1) y CarH (CAA79965.2). Sobre las secuencias se indican con una onda azul las láminas- β y con una hélice roja las hélices- α de las proteínas MtaN y BmrR de *B. subtilis*, de acuerdo con datos cristalográficos que se corresponden con las predicciones para las otras proteínas. También se indican los componentes del dominio de unión al DNA: el motivo hélice-giro-hélice (H-T-H) y las dos alas. Los aminoácidos implicados en la interacción con el DNA, según datos cristalográficos, están marcados en rojo sobre la secuencia de MtaN y BmrR. En la última línea ("consenso") se indican las posiciones conservadas (.) o idénticas (*)

B) Estructura del dominio N-terminal de CarA obtenida por resonancia magnética nuclear (RMN) (Navarro-Avilés et al. 2007).

C) A la izquierda: estructura de CarS obtenida por RMN. En el centro y a la derecha: modelo de unión del dominio N-terminal de CarA a CarS y al DNA, respectivamente. La hélice $\alpha 2$ está vista de frente y representada en color morado (León et al. 2010)

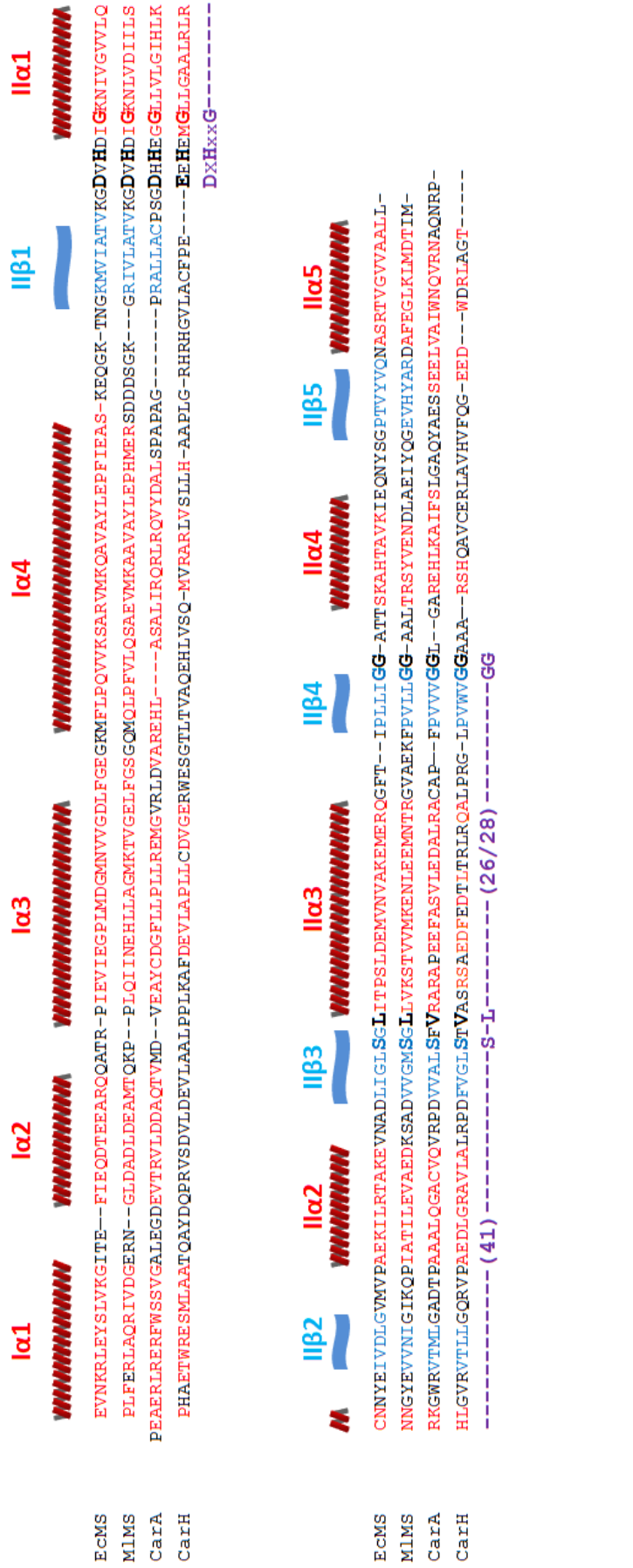


Figura 8. Alineamiento del dominio de unión a cobalamina de las sintetetas de metionina de *E. coli* y *Mycobacterium leprae* con la región carboxilo de CarA y CarH. Sobre las secuencias se indican en rojo las hélices α , y en azul las láminas- β , de la proteína de *E. coli*, de acuerdo con datos cristalográficos. Los mismos colores se emplean para las otras proteínas que adoptan la conformación correspondiente, de acuerdo con predicciones teóricas. Abajo, se indica el motivo consenso para el subdominio II.

Hasta hace aproximadamente siete años, CarA y CarH eran las únicas proteínas conocidas con la asociación singular de dominios descrita. Sin embargo, el análisis comparativo de la secuencia de CarA con los bancos de datos, muy engrosados en los últimos años por la secuenciación masiva de genomas, ha revelado la existencia de proteínas hipotéticas parecidas a CarA y CarH en al menos 123 especies bacterianas distintas de *M. xanthus*. De todas ellas solo 11 especies pertenecen, como *M. xanthus*, al grupo de las δ -proteobacterias y solo en mixobacterias se observan especies con dos copias parálogas, una de las cuales se asemeja más a CarA y la otra a CarH. En la Figura 9 se muestra el alineamiento entre las proteínas CarA y CarH y proteínas similares de tres especies de mixobacterias (*Myxococcus fulvus*, *Corallococcus coralloides* y *Stigmatella aurantiaca*), de otras δ -proteobacterias (*Bdellovibrio bacteriovorus*) y de bacterias de otros grupos taxonómicos (*Thermus thermophilus*, *Heliobacterium modesticaldum*, *Dermacoccus* sp., *Exiguobacterium sibiricum*, *Chloroflexus aurantium*, *Nocardia farcinica* y *Dechloromonas aromatica*). En el extremo N-terminal destaca un bloque de residuos muy conservado que forma parte del motivo hélice-giro-hélice característico de los factores de la familia MerR, y en el que, según datos estructurales, se localizan varios residuos implicados en el contacto con el DNA (Heldwein y Brennan 2001; Navarro-Avilés *et al.* 2007). Cabe esperar que, como en CarA y CarH, tal región N-terminal corresponda al dominio de unión al DNA de estas proteínas. En líneas generales, en el extremo C-terminal se aprecian las características típicas del dominio de unión a B₁₂ observado en CarA, CarH y en las enzimas que usan B₁₂ como cofactor. Solo se observan algunos cambios conservativos y otros que afectan a la distancia entre los tres pequeños tramos conservados del motivo de unión a B₁₂.

			HTH	ALA 1
CarA	1	MT-----	LRIRTIARMTGIREATLRAWERRYGFPRPLRSEGNMYRVYS	
CarH	1	MA--ER-----T--	YRIHIAAELAGVRVELIRAWERRYGVLTPTRRTP-AGYRAYT	
CcCarA	1	MS-----	LRIRTIARLTGIREATLRAWERRHGFPRPERSE--NNYRVYS	
CcCarH	1	MA--ER-----T--	YRIHIAAELSGVRVELIRAWERRYGVLEPERTP-AGYRVYT	
MfCarA	1	MT-----	LRIRTIARLTGIREATLRAWERRYGFPRPLRSEGNMYRVYS	
MfCarH	1	MA--ER-----T--	YRIHIAAELAGVRVELIRAWERRYGVLTPTRRTP-AGYRVYT	
TtCarH	1	MTS-----	SGVYTIAEVEAMTGLSAEVLQWERYGFEPKPRTP--GGHRLYS	
HmCarA	1	MSTKDH-----G---F--	YNIKAVEKMTGVAAGTLRVWEHRYQVIQPDNRK-AGYRVYS	
DcCarA	1	MS--TH--VE--G-----	LQIGELAERVGVSTHTLRAWERRYGILKPSRTT-CGYRVYS	
SaCarA	1	MA--ER-----T--	YRIHIAAELSGVSPELIRAWERRYGVPRPLRTP-AGYRVYT	
ExCarA	1	M---DR-----G---K--	YNIKAVAALVGLNPTTIRAWERRYQVLDPRSE-SGHRIYS	
CaCarA	1	MA--PQHFLSQFSDKPR--	YNTKAVAQETGVPADTFRAWERRYGVPRPQRTPE--GGHRLYS	
BbCarA	1	MI--NM-VISD-A---L--	LDIDQVNQLTGLSQATLRNWEKRYGFEPKQORSE--GGHRLYH	
NfCarA	1	MP--AV-PVPPSGAS-G--	YPVRAVAERLGVPTATLRSWNRRYGIQVQVQDRP--GSHRLYT	
DaCarA	1	MN--TP-----S--	ENIAAVERDTGLSKDVLRMWERYGFVPPERDL-NGERVYP	
cons	1	*	 *	 *

		ALA 2	lα1
CarA	44	REEVEAVRVARLIQEEGLSVSEATA-----QVKTEPPREQ--PEAERL--	
CarH	46	DRDVAVLKQKKRLT-DEGVAISEAAK-LLPQLMEGLEAEVAGRGASQDAR--PHAETW--	
CcCarA	43	RDEVEAVRVARLM-EEGLSVSEATA-----QVRDEPRTVI--PPEARH--	
CcCarH	46	DRDVALLRRTKALT-DEGVAISEAAK-LVPQLRAELDAVSSPPAEHPEARIGTQPETW--	
MfCarA	44	REEVAAVRVARLIQEEGLSVSEATA-----QVKATPPREQ--PEAERL--	
MfCarH	46	DRDVAVLKQKKRLT-DEGVAISEAAK-LLPQLMAGLDAEAAAARGGRPDAR--THAETW--	
TtCarH	47	AEDVEALTKTKRWL-EEGATPKAAIR-----RYLAQEVN-----PEDL--	
HmCarA	49	QEDVQTQWLAAQV-KNGVTIGQAVKMLHQKDVLRPISPLVDTGKDALGE-----L	
DcCarA	48	ELDVRVRSVAVLGLR-EQGVSIIEAAR-----RVNANVVAQIPAGR-RIDAAAI--	
SaCarA	46	EQDVALLRRTKQLV-GEGMSIREAAA-WASREVEHVQVPPVLAEGGTSR----TEEW--	
ExCarA	46	DNDVAKLRWIVDKQ-KEGLSVSKAIQ-LYEMPVNRTVEP-IDYGI----E-----L	
CaCarA	56	ERDIATIRWLDRDT-AEGLTISQAIA-LM---IEGSDTSLSWLNTAVDTE----PHTWER	
BbCarA	51	VEEVQKIREVVSVC-KNGIKILEAIE-RVLKGTSPVSDTAVAIQPTSPV-FVEPLNE-G	
NfCarA	54	ETDIALLRMLLELI-RAGVSPSRAAA-----TARGPAPAPG-----D	
DaCarA	46	ADQVDRRLRLKRLM-DQG---HRPGK-LIATPAEELTALAPRRARASESI--PTGEGE-D	
cons	61	 *	 *

CarA	86	-RERFWSSVGALEGDEVTRVLDDAQTVMQVVEAYCDGFLPLPLREMGV-----RLDVAREH
CarH	100	-RESMLAATQAYDQPRVSDVLDEVLAALPPLKAFDEVLAAPLLCDVGERWESCTLTVAQEH
CcCarA	84	-LERFWAAMVLDSEGADAALSAVQVGLGATTYCDTILIPLLREMAS-----RLDVAREH
CcCarH	102	-RAAVLAAAEAYDQPRVARVLDEVLTALPPLKAFEDVLVPVQREVGDWRHACTLTVAQEH
MfCarA	86	-GERFWSAVTLEGDEVTRVLDDAQTVMQVVEAYCDGFLPLPLREMGV-----RLDVAREH
MfCarH	100	-RESLLAAQAYDQPRVSDVLDEVLAALPPLKAFDDVLAPLLCDVGEHWACALTVAQEH
TtCarH	84	-GTGLLEALLRGDLGAEALFRRGLRFWGPEGVLEHLLPLVLREVGEAWHRCETGVAAEH
HmCarA	99	-HRRIVLALDDYDEQKASAMEEALSLFSMERVAVELILPILQELGERWARRELTVAHEH
DcCarA	94	-VYEMHRAVDREDEFALSAALDRLLSSHRLEALRDGLMPETVQLGGRWERGEVSVAREH
SaCarA	98	-REAVLAAAEARYDQTRVSOVLDEVLAALPPLKAFDEVLAAPVQRAVGDRWHACTLTVAQEH
ExCarA	90	-RDQIFEALTNFEERHAHDIMNKAFMSFSDKVIQDIVGPLLHEIGMRWEKCTITIAHEH
CaCarA	107	-MQARMIAALTDFDATRAEQILGEAFALYPLEDVFLKLTQFAMVEIGEOWHACRLSVTAEH
BbCarA	107	-ISOVLKALYKYDMDLAEQYLSRLGMRSETDLLEMVYPKLLMKVGEDWENSRLNTAQEH
NfCarA	90	-RGPLLAFAFALDTATVTAHLDAHLRAFGVVDTWETLCRAFAFADIVARQAGEGCIDVEH
DaCarA	98	-LTDLLALTKQHDAAGYQQAMQORLARQGLQRFVQDTVSPLTHQVGEAWEDGSFEVFEEH
cons	121	 *

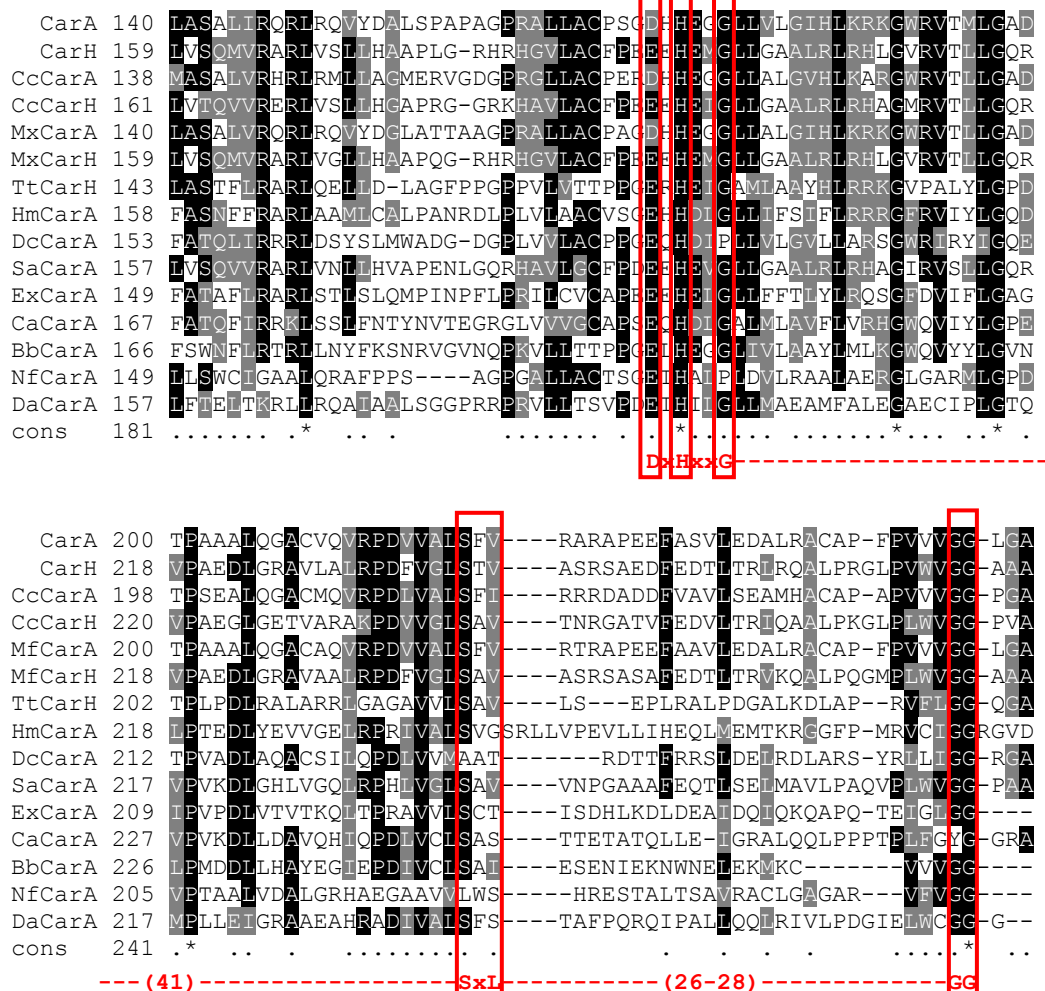


Figura 9. Alineamiento entre la secuencia de aminoácidos de CarA, CarH y trece proteínas que presentan la misma asociación de dominios: Cc (*Corallococcus coralloides*), Mf (*Myxococcus fulvus*), Tt (*Thermus thermophilus*), Hm (*Heliobacterium modesticaldum*), Dc (*Dermacoccus* sp.), Sa (*Stigmatella aurantiaca*), Ex (*Exiguobacterium sibiricum*), Ca (*Chloroflexus aurantium*), Bb (*Bdellovibrio bacteriovorus*), Nf (*Nocardia farcinica*) y Da (*Dechloromonas aromatica*). En la última línea se indican las posiciones conservadas (.) o idénticas (*). En la región N-terminal, sobre la secuencia, se indica el motivo hélice-giro-hélice (H-T-H) y las dos alas del dominio de unión al DNA de las proteínas de tipo MerR. En la región C-terminal, sobre la secuencia, se marca el inicio del dominio de unión a cobalamina (Iα1). En la última línea se indica el motivo consenso para el subdominio II del dominio de unión a cobalamina.

Hasta la fecha, solo se han estudiado las proteínas homólogas a CarA/CarH de las bacterias *T. thermophilus* y *S. coelicolor*, que muestran síntesis de carotenoides regulada por luz, como *M. xanthus*. Aunque originalmente la síntesis de carotenos se consideró constitutiva en *T. thermophilus* (Hoshino *et al.* 1993), posteriormente se ha descrito que se trata de un proceso estimulable por luz (Takano *et al.* 2011). También se ha demostrado que la síntesis de carotenos en *S. coelicolor* ocurre de forma fotoinducible, y que los genes carotenogénicos se encuentran agrupados en dos operones, *crtEIBV* y *crtYTU* (Takano *et al.* 2005; Takano *et al.* 2006). Al igual que en *M. xanthus*, la expresión de dichos genes depende de un factor sigma de tipo ECF, aquí denominado LitS. No se ha identificado, sin embargo, un factor anti-sigma que cumpla una función análoga a la de la proteína CarR de *M. xanthus*. La proteína de "tipo CarA/H" de *S. coelicolor*, LitR, también parece estar implicada en la regulación por la luz de la síntesis de carotenoides. Datos genéticos iniciales llevaron a proponer que, a diferencia de CarA y CarH, LitR es un regulador positivo necesario para la fotoinducción del promotor de *litS* (P_{litS}), aunque dicha capacidad activadora no pudo reproducirse en ensayos de transcripción *in vitro* utilizando el promotor de *litS* y polimerasa de RNA reconstituida con el factor σ^{LitS} (Takano *et al.* 2005). Ensayos posteriores, sin embargo, llevaron a sugerir que LitR ejerce una acción represora sobre P_{litS} en la oscuridad: mientras que la expresión heteróloga de *litS* y *litR* en *Streptomyces griseus* provoca la expresión fotoinducible del promotor del operón *crtYTU* (P_{crtY}), la delección de *litR* del plásmido de expresión provoca la expresión constitutiva de P_{crtY} (Takano *et al.* 2006). No obstante, aún no se ha podido demostrar *in vitro* la unión de LitR al promotor P_{litS} que, por cierto, contiene un palíndromo interrumpido, como ocurre en P_B (Takano *et al.* 2005; Takano *et al.* 2006). Como se había especulado para CarA (Cervantes y Murillo 2002), se ha propuesto que la captación de la señal luminosa por la vitamina B₁₂ podría modular la acción de LitR, tal vez provocando un cambio conformacional en dicho factor que permita la expresión de *litS* (Takano *et al.* 2006).

Estudios recientes con *Thermus thermophilus* han demostrado que la proteína homóloga a CarA/CarH presente en esta bacteria regula negativamente la síntesis de carotenoides en la oscuridad y lo hace de una manera dependiente de B₁₂ (Takano *et al.* 2011). Dado que su comportamiento, como se demuestra en este estudio, se asemeja al descrito previamente para CarH en *M. xanthus*, hemos adoptado el término "TtCarH" para referirnos a dicha proteína. Parte de los objetivos de este trabajo ha sido determinar el modo de acción molecular de TtCarH y su modulación por B₁₂.

I.4 Las cobalaminas

Las cobalaminas (con un P_m de 1355,38 a 1580 g/mol) son las biomoléculas no poliméricas más grandes y complejas que se conocen. Están constituidas por un anillo corrínico, relacionado estructural y químicamente con el grupo hemo y la clorofila. La más conocida de las cobalaminas es la vitamina B₁₂, que fue descrita por primera vez en 1925 como el "factor anti-anemia perniciosa" (Minot y Murphy 1926; Whipple y Rabscheitt-Robbins 1926). Su posterior aislamiento por parte de Smith y Folkers en 1948 permitió a los afectados por esta enfermedad un cambio drástico en su tratamiento que pasó de la ingestión de varios gramos de hígado crudo, a la de unos pocos microgramos de un compuesto rojo y cristalino (Rickes *et al.* 1948; Smith 1948). La resolución de la estructura de la vitamina (Hodgkin *et al.* 1956) y una intensa colaboración entre los laboratorios de Woodward y Eschenmoser culminó en la síntesis total del cofactor (Stevens 1982). El papel biológico de la B₁₂ fue desentrañado al descubrirse que la adenosilcobalamina (AdoB₁₂), uno de los derivados de la vitamina, es el cofactor de la enzima glutamato mutasa (Barker *et al.* 1958). A este descubrimiento siguió, varios años más tarde, el de otra alquilcobalamina biológicamente activa, la metilcobalamina (MeB₁₂) (Guest *et al.* 1962). En general, el papel biológico de las cobalaminas es el de cofactores enzimáticos (Banerjee y Ragsdale 2003), aunque también se ha descrito su papel regulador en los denominados ribointerruptores (Bastet *et al.* 2011), como se menciona en el Apartado I.6.

I.4.1 Estructura de las cobalaminas

La estructura de las cobalaminas es bastante compleja. El anillo corrínico presenta radicales laterales de metilo, acetamida y propionamida y un átomo de cobalto central unido a cuatro de sus nitrógenos por sendos enlaces covalentes. Al cobalto se unen, en la parte superior e inferior de la corrina, dos "sustituyentes axiales" perpendiculares al plano del anillo (Figura 10). El sustituyente axial inferior o Coa de las cobalaminas es el nucleótido 3' fosforribosil-dimetilbencimidazol (3'PRDmb), que además se une a una de las propionamidas laterales del anillo formando un bucle denominado "bucle nucleotídico". El 3'PRDmb está constituido por una ribosa fosforilada en su posición 3' (no en la 5' como la mayoría de los nucleótidos) y por dimetilbencimidazol (Dmb), base nitrogenada procedente de la riboflavina. El carbono 5' de la ribosa se une al nitrógeno 5 del Dmb y su fosfato 3 al radical propionil del anillo

D de la corrina. A su vez, el nitrógeno 7 del Dmb enlaza con la parte inferior del cobalto cerrando así el "bucle nucleotídico" (Roth *et al.* 1996).

La estructura descrita hasta ahora recibe el nombre de cobalamina. Existen diferentes tipos de cobalaminas según el sustituyente axial superior o $\text{Co}\beta$, que puede ser un grupo adenosilo, en el caso de la adenosilcobalamina o coenzima B_{12} (AdoB_{12}); un metilo, en la metilcobalamina (MeB_{12}); un ciano, en la cianocobalamina o vitamina B_{12} (CNB_{12}); un OH en la hidroxocobalamina (OHB_{12}); una molécula de H_2O en la acuocobalamina (AqB_{12}) o un H en la pseudocoenzima B_{12} (Lenhert y Hodgkin 1961; Lenhert 1968; Rossi *et al.* 1985) (véase Figura 10). Estos sustituyentes se unen al anillo corrínico a través de un enlace cobalto-carbono, que constituye uno de los pocos ejemplos de enlaces metal-carbono conocidos en la naturaleza (Lenhert y Hodgkin 1961). Una característica de este enlace, que ha resultado relevante para este estudio, es su fotosensibilidad. En presencia de luz, se produce una ruptura extremadamente rápida del enlace y la consiguiente pérdida del ligando superior (Bond *et al.* 1972).

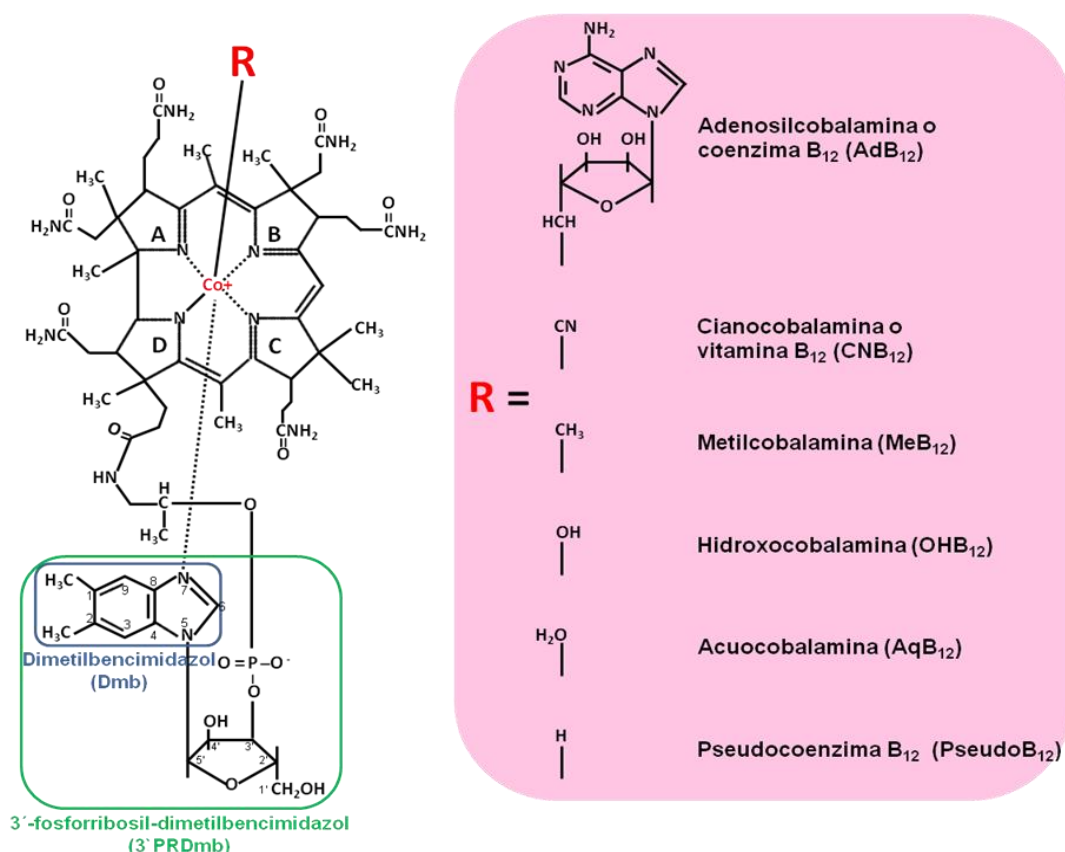


Figura 10. Esquema de la estructura de general de las cobalaminas (izquierda) y tipos posibles de cobalaminas (derecha) en función del grupo químico (R) que actúa como ligando superior del cobalto.

La CNB_{12} no es una cobalamina natural, pero puede ser transformada por las bacterias, una vez eliminado el grupo ciano por una decianasa (Figura 11), a

cualquiera de las dos formas que actúan como cofactores enzimáticos, la AdoB₁₂ y la MeB₁₂ (Roth *et al.* 1996). Para la conversión a AdoB₁₂ se requiere la participación de las adenosiltransferasas de ATP:corrinoideas (ATR) que catalizan la transferencia de un radical adenosilo al cobalto de una cob(I)alamina (anillo corrinoide sin sustituyente Co β y en un estado de oxidación +1) para dar AdoB₁₂ (Figura 11). Existen tres tipos de enzimas ATR: las CobA, EutT y PduO (Johnson *et al.* 2001; Yamanishi *et al.* 2005; Mera y Escalante-Semerena 2010). La síntesis de MeB₁₂ a partir de cob(II)alamina es llevada a cabo por las propias enzimas que la utilizan como cofactor, las metiltransferasas, que usan la MeB₁₂ como donadora de metilo y catalizan posteriormente su regeneración (Koutmos *et al.* 2009).

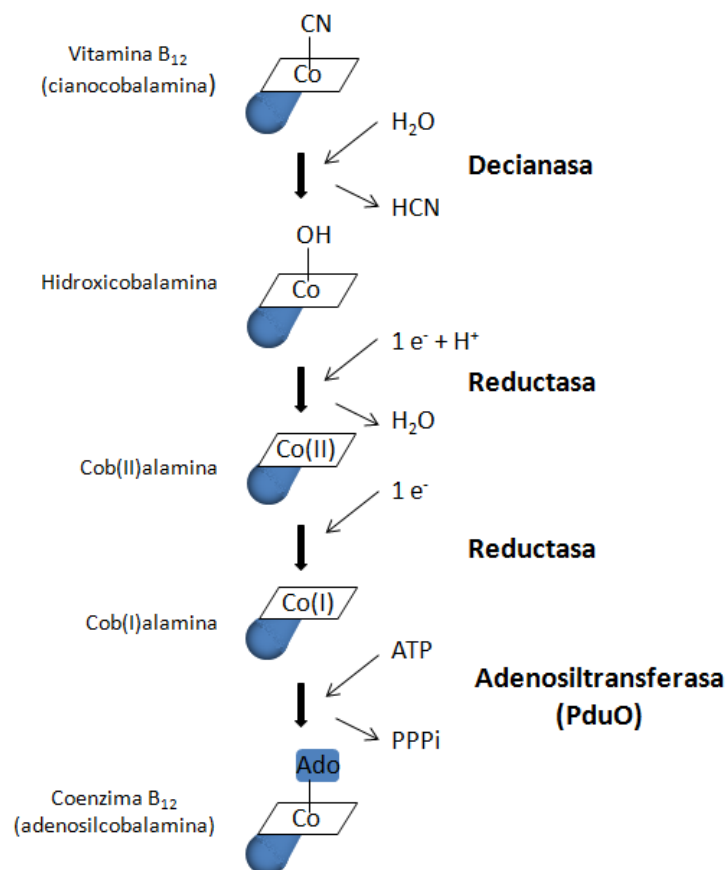


Figura 11. Síntesis de adenosilcobalamina a partir de cianocobalamina (Johnson *et al.* 2001). La estructura planar representa el anillo tetracorrínico de la cobalamina y el cono azul en la parte inferior el dimetilbenzimidazol. En el primer paso de la reacción, una decianasa retira el grupo ciano (CN) de la cianocobalamina (CNB₁₂) y lo sustituye por un hidroxilo (OH) tomado de una molécula de agua, dando lugar a hidroxocobalamina (OHB₁₂). A continuación, ésta sufre una reacción de reducción y deshidratación catalizada por una reductasa, generando cob(II)alamina que será de nuevo reducida a cob(I)alamina. En el último paso, una adenosiltransferasa transfiere un grupo adenosilo, tomado de un ATP, a la cobi(II)alamina para dar adenosilcobalamina (AdoB₁₂).

I.4.2 Origen ancestral de las cobalaminas y distribución en la naturaleza

Existen varios autores que apoyan el origen prebiótico de las cobalaminas y su importancia catalítica en el "mundo de RNA". En consonancia con esta hipótesis, la síntesis de B₁₂ en algunas bacterias comienza con una molécula de aminoacil-tRNA (Roth *et al.* 1996). Además, como se detalla más adelante (Apartado I.6), las cobalaminas controlan la expresión de los genes implicados en su biosíntesis y transporte a través de un mecanismo ancestral de regulación de la expresión génica, basado en un elemento de RNA conocido como ribointerruptor.

Se han identificado dos rutas de biosíntesis de cobalaminas, una dependiente de oxígeno y la otra inhibida por él, en las que participan más de 20 genes. Una diferencia notable entre ambas rutas es el momento de inserción del cobalto, que ocurre al principio en la ruta anaeróbica y al final en la aeróbica (Roth *et al.* 1996). Las rutas de síntesis de cobalamina, del grupo hemo, del F430 (grupo prostético de la reductasa de metil-coenzima M), de la clorofila y del sirohemo (grupo prostético de varias enzimas implicadas en la reducción del azufre y del nitrógeno) comparten pasos, por lo que parece probable que todas provengan de una ruta ancestral diseñada en un principio para la síntesis de B₁₂, cuya evolución refleja la propia evolución del metabolismo energético (Figura 12).

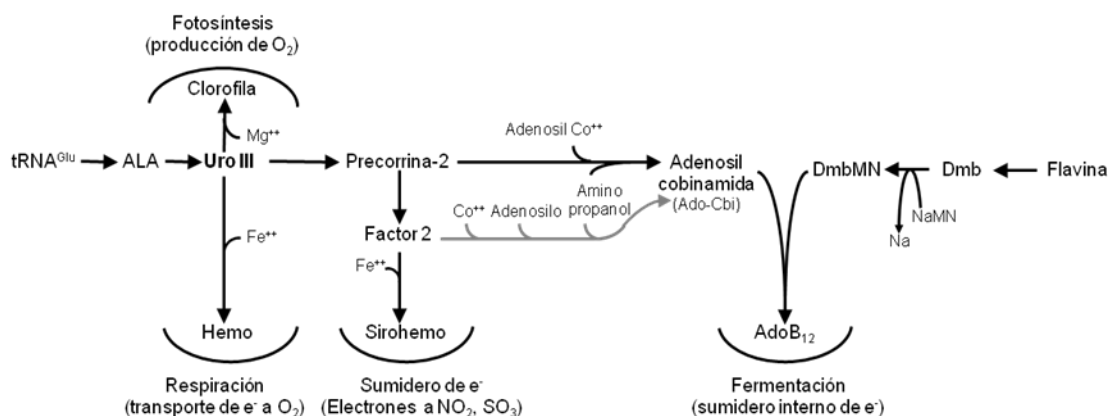


Figura 12. Relación entre las rutas de síntesis del grupo hemo, sirohemo, la clorofila y la AdoB₁₂ (tomado de Roth *et al.*, 1996).

Esta hipótesis se ve también apoyada por la estructura del uroporfirinógeno III, precursor común del hemo, sirohemo, clorofila y cobalamina. El uroporfirinógeno III es asimétrico, ya que uno de sus anillos de porfirina está invertido con respecto a los demás (señalado con una flecha roja en la Figura 13, izquierda). Dicha inversión podría ser importante en la eliminación de carbono (contracción del anillo) que ocurre durante la síntesis de cobalaminas (Figura 13 derecha). Esta estructura sugiere que la

ruta se desarrolló inicialmente para la síntesis de B₁₂ y más tarde se añadieron las ramas que dieron lugar al sirohemo, hemo y clorofila (Roth *et al.* 1996).

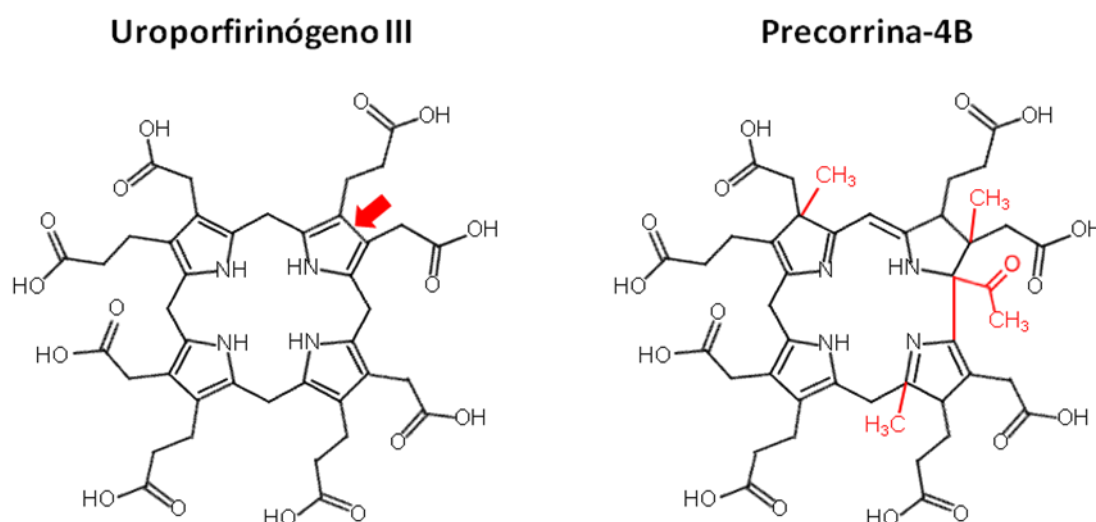


Figura 13. Izquierda: Molécula de uroporfirinógeno III, precursor del grupo hemo, sirohemo, clorofila y cobalaminas. El anillo invertido con respecto a los demás, que rompe la simetría de la molécula, está señalado con una flecha roja. Derecha: Molécula de precorrina-4B, primer compuesto intermediario de la ruta de síntesis de la AdoB₁₂ que presenta la contracción del anillo tetrapirrólico, necesaria para formar el anillo corrínico, y una serie de cambios adicionales marcados en rojo.

En cuanto a su distribución entre los seres vivos, cabe destacar que la síntesis de B₁₂ está restringida a algunas bacterias y arqueas. Varios animales (incluyendo los humanos) y protistas la requieren, pero no la sintetizan (Roth *et al.* 1996; Warren *et al.* 2002; Croft *et al.* 2005; Taga *et al.* 2007; Zhang *et al.* 2009), y las plantas y los hongos no sintetizan ni utilizan B₁₂ en su metabolismo (Roth *et al.* 1996).

I.5 Enzimas dependientes de cobalaminas

La primera proteína descubierta de unión a B₁₂ fue la mutasa de glutamato de *Clostridium tetanomorphum*, que utiliza la AdoB₁₂ como cofactor (Barker *et al.* 1958). Hoy se conocen tres subfamilias de enzimas asociadas a cobalaminas: las metiltransferasas, dependientes de MeB₁₂; las isomerasas, dependientes de AdoB₁₂, y las deshalogenasas. Por carecer del motivo de unión a cobalaminas propio de las isomerasas tipo I y metiltransferasas, que es el que está presente en CarA y CarH, los detalles estructurales y mecanismos de reacción de las deshalogenasas no serán tratados en este trabajo. En *M. xanthus*, además de la metiltransferasa ya mencionada,

existe una ribonucleósido reductasa dependiente de B₁₂ (locus YP_631136.1) y una mutasa de metilmalonil-CoA (YP_630484.1-YP_630485.1).

I.5.1 Las metiltransferasas

Las metiltransferasas catalizan la transferencia de un grupo metilo mediante la ruptura heterolítica del enlace metil-cobalto de la MeB₁₂, su cofactor. Dicha ruptura deja dos electrones en el cobalto para formar cob(I)alamina y un carbocatión metilo listo para ser transferido. Las metiltransferasas juegan un importante papel en el metabolismo aminoacídico de muchos organismos (incluido el hombre) y también en el metabolismo de compuestos de un único carbono y en la fijación de CO₂ en microorganismos anaeróbicos (Banerjee y Ragsdale 2003).

Uno de los ejemplos más estudiados de este tipo de enzimas es el de la sintetasa de metionina de *E. coli*. Esta enzima cataliza la transferencia del grupo metilo de la MeB₁₂ a la homocisteína para dar metionina y cob(I)alamina. La cob(I)alamina tomará después otro grupo metilo del metiltetrahidrofolato (CH₃-H₄folato) para generar de nuevo MeB₁₂ con liberación de H₄ folato (Banerjee y Matthews 1990; Banerjee *et al.* 1990a) (Figura 14).

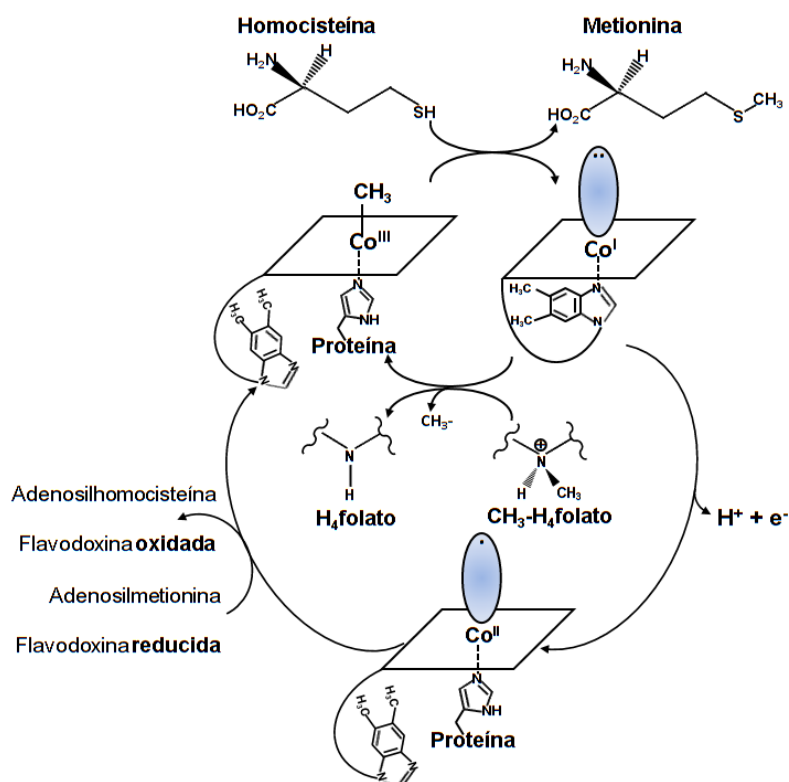


Figura 14. Reacciones catalizadas por la sintetasa de metionina. Se representa el estado de oxidación del Co, así como su relación con la histidina 759 de la sintetasa de metionina.

Para que tenga lugar este ciclo completo de reacciones, se forma un complejo ternario entre la enzima y los dos sustratos. Durante el intercambio cíclico, la cob(I)alamina es ocasionalmente oxidada (a veces como reacción a la luz) a la forma inactiva cob(II)alamina. Su vuelta al ciclo catalítico normal se realiza mediante una metilación reductiva en la que se requiere adenosilmetionina como donador de metilo y un electrón aportado por una flavodoxina (Mangum y Scrimgeour 1962; Fujii y Huennekens 1974; Banerjee *et al.* 1990b).

La sintetasa de metionina de *E. coli*, con un tamaño de 136 kDa, está compuesta por cuatro dominios o regiones: una región de unión a homocisteína (38 kDa), una región de unión a CH₃-H₄ folato (33 kDa), una región de unión a cobalamina (27 kDa) y, por último, un dominio de activación (38 kDa) (Ludwig y Matthews 1997). La región de unión a cobalaminas será descrita en mayor profundidad en este apartado debido a su similitud con el dominio C-terminal de CarA y CarH, objeto de estudio del presente trabajo. En las enzimas dependientes de metilcobalamina, esta región está compuesta por dos subdominios: el I y el II (Drennan *et al.* 1994a). El subdominio I (extremo amino) presenta una topología de tipo *helix bundle* (haz de hélices) formada por dos pares de hélices α antiparalelas (Figura 15). Tras él, un largo bucle conduce al dominio II (carboxilo), llamado también barril α/β , parecido al plegamiento Rossmann de unión a nucleótidos, compuesto por 6 hélices α y 5 láminas β paralelas distribuidas como se muestra en la Figura 15.

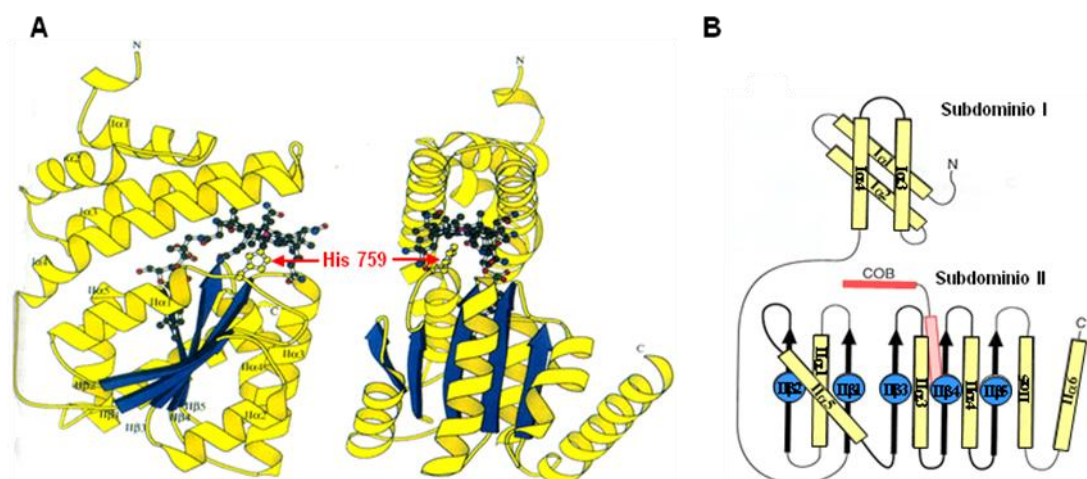


Figura 15. A) Dominio de unión a B₁₂ de la sintetasa de metionina (dos orientaciones rotadas 90° entre sí). Se observan el subdominio I (parte superior) y el subdominio II (parte inferior), con la metilcobalamina entre ambos. Se muestra la His759 de la sintetasa de metionina y el desplazamiento del Dmb al bolsillo del dominio II. B) Diagrama topológico del dominio de unión a B₁₂. COB: metilcobalamina.

El subdominio II, pero no el subdominio I, se encuentra también en las mutasas dependientes de AdoB_{12} . La unión de la MeB_{12} a la sintetasa de metionina causa un cambio conformacional complejo en la MeB_{12} que consiste en el desplazamiento del Dmb del cobalto al que está unido, su inserción en un bolsillo y su reemplazamiento por una histidina del dominio α/β de la enzima. Esta conformación se denomina "base-off his-on" (Figura 16) y depende de un motivo conservado de unión a cobalaminas que se muestra en la Figura 17.

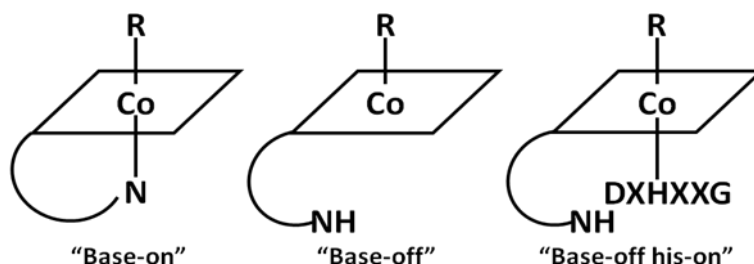


Figura 16. Las distintas conformaciones de las cobalaminas: "base-on", "base-off" y "base-off his-on".

La corrina se sitúa entre los subdominios I y II, a la manera de un sándwich, interactuando su parte inferior con los bucles que unen las hélices y láminas del dominio α/β . La cola nucleotídica penetra en un profundo bolsillo formado por las láminas $\text{II}\beta 3$ y $\text{II}\beta 4$ y la hélice $\text{II}\alpha 3$ (Drennan *et al.* 1994a). El subdominio α -helicoidal actúa como una caperuza protectora de la parte superior de la corrina, en concreto del grupo metilo, aislándolo del disolvente. Esto implica que debe producirse un desplazamiento del haz de hélices para permitir el acceso de los sustratos durante el ciclo catalítico y la reacción de reactivación (Drennan *et al.* 1994a; Ludwig y Matthews 1997). Dicho desplazamiento no encontraría mucha oposición en los pocos puentes de hidrógeno existentes entre los subdominios I y II, ni en el largo bucle que los conecta. Esta estructura se conserva en todas las enzimas dependientes de MeB_{12} conocidas. Un estudio comparativo de los dominios de unión a B_{12} da como resultado el motivo mostrado en la Figura 17, donde aparecen alineadas las secuencias que constituyen dicho motivo en las sintetisas de metionina de *E. coli*, *Mycobacterium leprae* y *M. xanthus*. La secuencia conservada pertenece al dominio α/β y se encuentra también en enzimas dependientes de AdoB_{12} , tales como la metilmalonil-CoA mutasa humana y la glutamato mutasa de *Clostridium tetanomorphum* (Figura 17). La presencia de este motivo se considera una marca identificativa del modo de unión a cobalamina "base-off his-on", en el que el Dmb es desplazado por la histidina.

MxMS	96 DVHDIG	143 GLSGLLVKS	172 V G GA
EcMS	757 DVHDIG	802 GLSGLITPS	829 I G GA
MlMS	729 DVHDIG	775 GMSGLLVKS	803 L G GA
HsMM	617 DGHDRG	662 GVSTLAAGH	690 C G GV
CtGM	14 DCHAVG	59 CVSSLYGQG	87 V G GN
Consenso	DxHxxG-----41-----SxL-----26/28-----GG		

Figura 17. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos especialmente conservados en los dominios de unión a B₁₂ de distintas proteínas. MxMS: sintetasa de metionina de *M. xanthus*; EcMS: sintetasa de metionina de *E. coli*; MlMS: sintetasa de metionina de *Mycobacterium leprae*; HsMM: metilmalonil-CoA mutasa de *Homo sapiens*; CtGM: glutamato mutasa de *Clostridium tetanomorphum*. Las dos últimas son dependientes de AdoB₁₂.

Cuatro de los siete aminoácidos conservados, las tres glicinas y la serina, se encuentran en la “entrada” del bolsillo en el que se aloja la cola nucleotídica. La histidina es la que establece el enlace con el cobalto, desplazando al DMB. La leucina se coloca junto a tal histidina, y el aspártico establece con ésta un puente de hidrógeno de gran importancia en el mecanismo de reacción de la enzima (Drennan *et al.* 1994a).

El aspártico también se une mediante otro puente de hidrógeno a un residuo de serina, conservado en las metiltransferasas, pero no en las mutasas, que se encuentra en una posición más exterior. Así, estos tres residuos His-Asp-Ser (conocidos como tríada-ligando) forman un “canal” para la transferencia de protones entre el disolvente y la histidina. La protonación y desprotonación del par His-Asp modula la estabilidad y reactividad de la cobalamina en la sintetasa de metionina, influyendo en la fuerza del enlace N-Co y promoviendo la formación y ruptura heterolítica del enlace C-Co que resultan críticas para la actividad de esta enzima. Diferentes estudios de fotoestabilidad y reactividad de la enzima silvestre y de varios mutantes en alguno de estos residuos confirman la importancia del papel de la tríada-ligando (Amaratunga *et al.* 1996; Jarrett *et al.* 1996).

I.5.2 Las isomerasas

Las isomerasas constituyen la familia más numerosa de enzimas dependientes de B₁₂ en bacterias, en las que juegan un importante papel en los procesos fermentativos (mutasa de glutamato, mutasa de metilmalonil-CoA) y en la conversión de los ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos (reductasa de ribonucleótidos), un proceso necesario para la síntesis de DNA (Banerjee y Ragsdale 2003). La única enzima dependiente de AdoB₁₂ que está presente tanto en bacterias como en mamíferos es la mutasa de metilmalonil-CoA, que en humanos participa en la

degradación de ácidos grasos. Desde un punto de vista enzimático, las isomerasas catalizan el intercambio de un hidrógeno y otro sustituyente entre dos carbonos contiguos a través del mecanismo reflejado en la Figura 18. Para llevar a cabo esta reacción, promueven la homólisis del cofactor AdoB_{12} , quedando uno de los electrones del enlace C-Co unido al radical 5' adenosilo y el otro al cobalto del anillo corrínico. Esta fisión homolítica es una reacción inusual cuyo mecanismo no se conoce en profundidad, aunque sí se sabe que la enzima acelera la velocidad de la reacción unas 10^{12} veces (Padmakumar *et al.* 1997; Marsh y Ballou 1998). La fotólisis de la AdoB_{12} , que también da lugar a un radical 5'-desoxiadenosilo y cob(II)alamina, ha servido como modelo para el estudio de la hidrólisis enzimática de AdoB_{12} (Schwartz y Frey 2007). Las isomerasas dependientes de B_{12} se dividen en dos subclases: las de tipo I y las de tipo II. En las primeras, el Dmb de la AdoB_{12} es desplazado del cobalto del anillo corrínico por una histidina del motivo de unión a cobalaminas, del tipo DXHXXG, adoptando la conformación "base-off his-on" (Mancia *et al.* 1996), tal y como ocurre con la sintetasa de metionina de *E. coli*. En las de tipo II, carentes del motivo de unión a cobalaminas descrito (Shibata *et al.* 1999), el Dmb permanece unido al cobalto en una conformación denominada "base-on" (Figura 16). Tanto en las de tipo I como en las de tipo II el mecanismo básico de reacción es el que se refleja en la Figura 18 (Marsh y Drennan 2001).

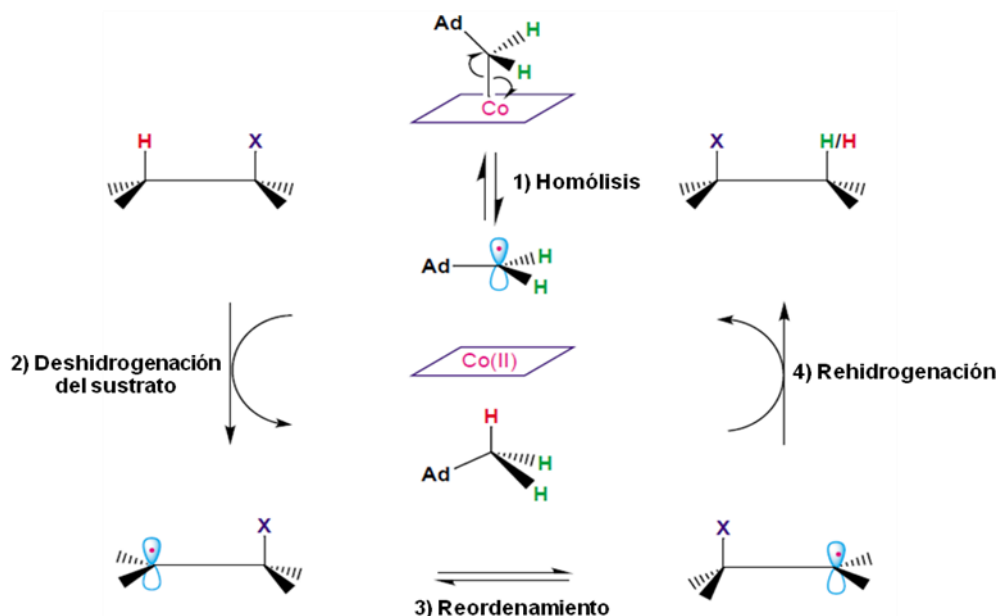


Figura 18. Esquema del mecanismo de acción de las isomerasas (Marsh y Drennan 2001).

Las mutasas de glutamato y las de metilmalonil-CoA constituyen ejemplos de isomerasas tipo I. La mutasa de glutamato de *Clostridium tetanomorphum*, que fue la primera proteína de unión a B_{12} descubierta y una de las mejor caracterizadas (Barker

et al. 1958), cataliza la interconversión reversible de (S)-glutamato a (2S, 3S)-3-metilaspartato (Figura 19).

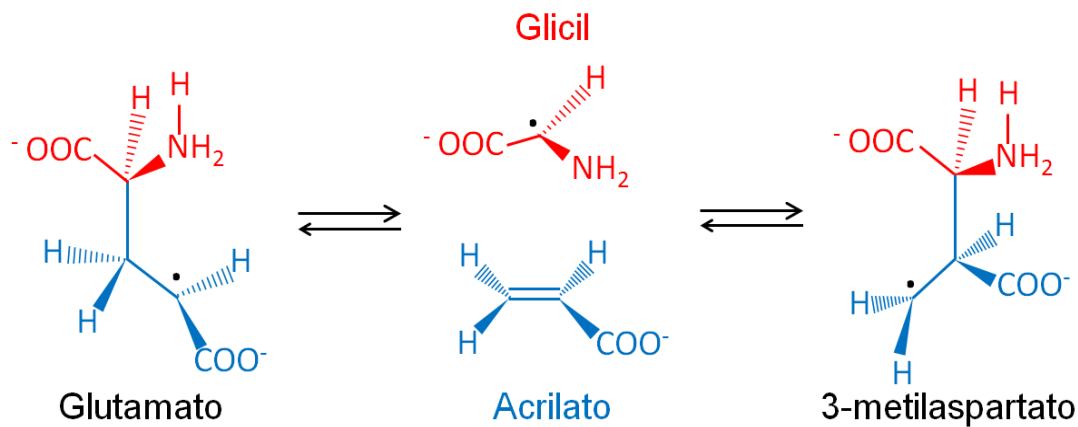


Figura 19. Reacción catalizada por la mutasa de glutamato.

En general, las isomerasas dependientes de B_{12} guardan una gran similitud estructural. Todas ellas, con excepción de la reductasa de ribonucleótidos, presentan un dominio tipo barril TIM, en lugar del subdominio I α -helicoidal propio de la sintetasa de metionina. El plegamiento tipo barril TIM está constituido por 8 hélices α , que forman su superficie interna, alternadas con 8 láminas β paralelas, que forman la superficie externa del barril. Además, al igual que la sintetasa de metionina, las isomerasas tipo I muestran un dominio α/β , similar al dominio Rossmann, donde se encuentra, situado en un bucle flexible, el motivo de unión a cobalaminas (Banerjee y Ragsdale 2003). En la Figura 20A se muestra la estructura tridimensional de la mutasa de glutamato de *Clostridium cochlearium*, un heterotetrámero constituido por dos subunidades ϵ (de ~55 kDa) y dos σ (de ~15kDa), y una molécula de B_{12} unida a cada interfase $\epsilon\sigma$. En la holoenzima, la subunidad σ es la responsable de la unión al cofactor y la ϵ la que contiene el sitio activo. Tras la unión de la cobalamina, el cobalto de ésta interacciona con la histidina del motivo de unión a cobalaminas de la subunidad σ provocando el desplazamiento del Dmb, que queda enterrado en un bolsillo hidrofóbico elongado del dominio Rossmann, de manera similar a lo que ocurre con la sintetasa de metionina (Marsh 2000). La subunidad ϵ presenta la estructura en barril TIM $(\alpha/\beta)_8$ y su extremo C-terminal se asienta sobre la cara superior de la $AdoB_{12}$ por lo que, además de contener el sitio activo de la enzima, contribuye a la unión del coenzima. La mayor parte de los contactos se establecen entre las cadenas laterales de la propionamida del coenzima y las amidas de la cadena principal de los bucles que conectan los

diferentes elementos del barril (Marsh 2000). En la Figura 20B puede observarse un esquema de la metilmalonil-CoA mutasa humana (Thoma y Leadlay 1996), un homodímero cuya estructura ha sido modelada a partir de la estructura cristalográfica determinada para la subunidad catalítica (α) de la metilmalonil-CoA mutasa heterodimérica de *Propionobacterium shermanii* (ambas proteínas muestran un 65% de identidad). En ella se aprecia el dominio N-terminal con estructura en barril TIM (α/β)₈ y el dominio Rossmann C-terminal, unidos por una región conectora larga.

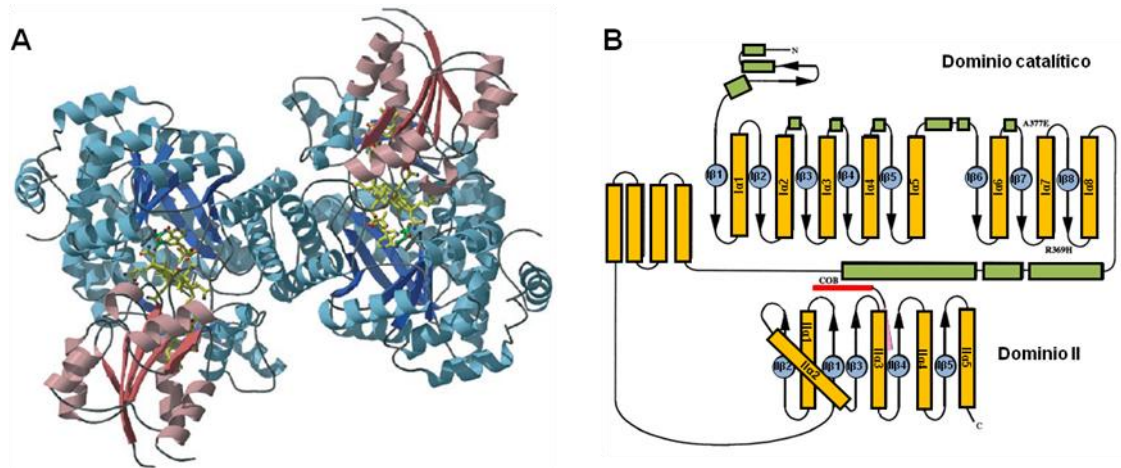


Figura 20. A) Estructura tridimensional de la mutasa de glutamato de *Clostridium cochlearium* obtenida por difracción de rayos X (Gruber y Kratky 2002). Las dos subunidades ϵ están representadas de color azul claro, las dos σ de rosa, las dos moléculas AdoB₁₂ de amarillo-verdoso y el sustrato de verde oscuro. **B) Diagrama topológico de la estructura de la metil malonil-CoA mutasa humana** (Thoma y Leadlay 1996)(en el esquema aparece una molécula de cobalamina sin su ligando superior, ausente en la estructura determinada).

I.6 Regulación de la expresión génica por cobalaminas

Las cobalaminas no solo actúan como cofactores de diversas enzimas, sino que además pueden modular la expresión génica. El principal mecanismo por el que ejercen tal acción reguladora es a través de los denominados ribointerruptores (del inglés, *riboswitches*). Se trata de dominios estructurados de RNA que normalmente se encuentran en la región 5' no traducida (5' UTR) de ciertos mRNA y que modulan la expresión de diversos genes metabólicos a través de su unión específica a distintos ligandos (vitaminas, aminoácidos, purinas, metales o tRNA) o por detección de ciertos parámetros físico-químicos (temperatura o pH). Aunque la regulación mediada por ribointerruptores es un mecanismo que opera principalmente en bacterias, se han descrito también posibles casos en arqueobacterias (Miranda-Ríos *et al.* 2001;

Rodionov *et al.* 2002; Winkler *et al.* 2002) y eucariotas (Kubodera *et al.* 2003; Sudarsan *et al.* 2003; Vitreschak *et al.* 2004; Cheah *et al.* 2007).

Los ribointerruptores están compuestos por dos dominios estructural y funcionalmente distintos. El primero de ellos, denominado aptámero, contiene una secuencia conservada que reconoce el metabolito diana con una especificidad elevada. El segundo, denominado plataforma de expresión, se encuentra situado inmediatamente aguas abajo del aptámero. Tras la unión aptámero-metabolito, sufre un cambio conformacional que regula la expresión del gen u operón adyacente, ya sea al nivel transcripcional (controlando la elongación del mRNA) (Barrick y Breaker 2007) y/o post-transcripcional, controlando el inicio de la traducción (Fuchs *et al.* 2007), el procesamiento del RNA (en eucariotas)(Kubodera *et al.* 2003; Bocobza *et al.* 2007; Croft *et al.* 2007; Cheah *et al.* 2007; Wachter *et al.* 2007) o su estabilidad (Winkler *et al.* 2004).

Los ribointerruptores dependientes de B₁₂ son los más abundantes en la naturaleza y generalmente se utilizan para inhibir, en presencia del ligando, la síntesis de proteínas relacionadas con su propio metabolismo o transporte. No obstante, es posible que la B₁₂ también regule la síntesis de algunas proteínas que no muestran una relación, al menos obvia, con las cobalaminas (Rodionov *et al.* 2003). El estudio comparativo de secuencias situadas aguas arriba de genes implicados en el transporte y síntesis de cobalaminas en 107 genomas bacterianos permitió identificar cerca de 200 posibles ribointerruptores dependientes de B₁₂ distribuidos entre 67 especies distintas, que presentan desde 1 hasta 14 elementos por genoma (Vitreschak *et al.* 2003). Tal estudio reveló la existencia de secuencias muy conservadas, y permitió proponer la estructura secundaria que formaría el aptámero del ribointerruptor dependiente de B₁₂, y dos modelos de regulación basados en la formación de estructuras alternativas de RNA. En el primero de ellos, la unión de la AdoB₁₂ a su secuencia de reconocimiento provoca un cambio conformacional en el mRNA que conduce a la formación de un terminador de la transcripción intrínseco (una horquilla de RNA seguida de seis o más residuos de uracilo). La transcripción quedaría así abortada antes de que se sintetice la parte codificadora del mRNA (Figura 21 A). Estudios recientes (Fox *et al.* 2009; Baker y Perego 2011) han confirmado que ciertos ribointerruptores dependientes de B₁₂ modulan la expresión génica mediante este mecanismo. En el segundo modo de regulación, la unión de AdoB₁₂ a la citada secuencia consenso provocaría la formación de una horquilla en el mRNA que secuestra el sitio de unión al ribosoma (RBS). Se impide así la formación del complejo ribosoma-mRNA y, por tanto, el inicio de la traducción (Figura 21 B). Se ha descrito también la existencia de un elemento de tipo

intensificador que actuaría en ausencia de B_{12} , desplegando la horquilla que secuestra el RBS (Ravnum y Andersson 1997).

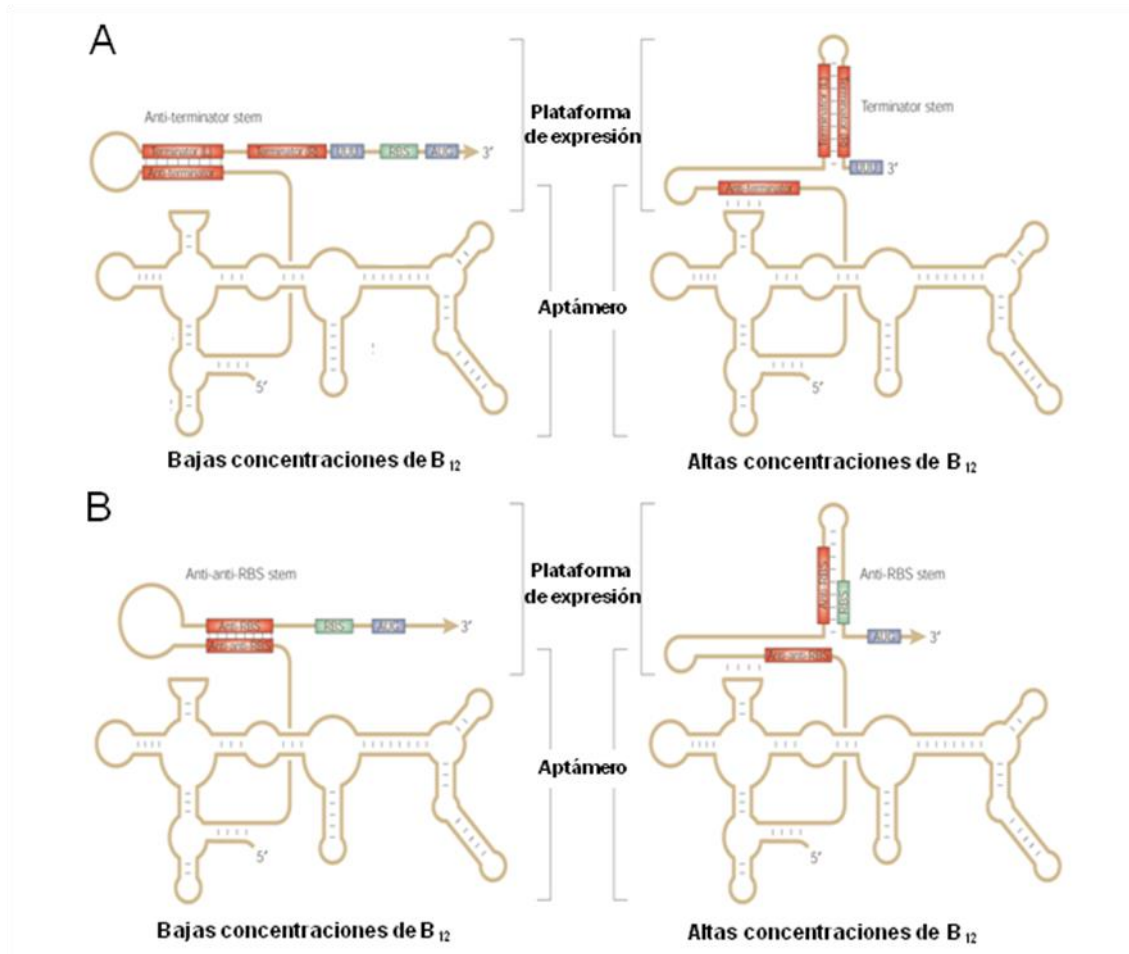


Figura 21. Control de la expresión génica por ribointerruptores dependientes de B_{12} . A) Control de la transcripción. B) Control de la traducción. Tomado de Mandal y Breaker, 2004.

Los casos de regulación por ribointerruptores dependientes de B_{12} mejor estudiados son los que se encuentran en el operón *cob* de *Salmonella typhimurium* (con genes codificantes de enzimas relacionadas con la síntesis de cobalamina), y en el gen *btuB* de *E. coli* y *S. typhimurium* (que codifica el transportador de B_{12}) (Nahvi et al. 2002; Nahvi A et al. 2004).

La estructura secundaria de los ribointerruptores de B_{12} que deriva de los estudios más recientes se muestra en la Figura 22. Aunque se ha propuesto que todos los ribointerruptores de B_{12} se unen a $AdoB_{12}$, el trabajo de Johnson et al., 2012 ha revelado que algunos ribointerruptores reconocen MeB_{12} y acuocobalamina (AqB_{12} , la forma fotolisada de $AdoB_{12}$) con una afinidad mucho mayor que $AdoB_{12}$. La prevalencia de los ribointerruptores de AqB_{12} en bacterias marinas probablemente

refleja una adaptación del RNA al ambiente marino, en el que el reservorio de cobalaminas libres se espera que sea mayoritariamente AqB₁₂.

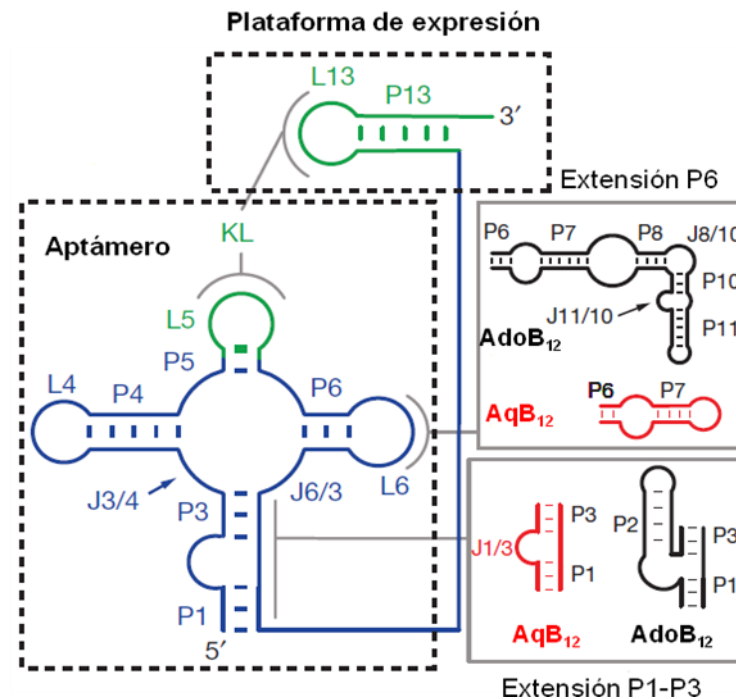


Figura 22. Estructura secundaria de los ribointerruptores de B₁₂. Se refleja la parte conservada en todos ellos (azul), la interacción entre bucles o KL (verde), y las extensiones periféricas que confieren la especificidad por un tipo concreto de cobalamina. Típicamente, en los ribointerruptores de B₁₂ que regulan la traducción, el lazo L13 contiene el sitio de unión al ribosoma (Johnson *et al.* 2012).

Recientemente se ha determinado la estructura terciaria de tres ribointerruptores dependientes de cobalaminas (Johnson *et al.* 2012; Peselis y Serganov 2012). La importancia de estos trabajos radica en que muestran, por primera vez, cómo el ligando modula la comunicación entre la plataforma de expresión y el aptámero para el control de la expresión génica. En concreto, el estudio realizado por Johnson *et al.*, 2012 presenta la estructura terciaria completa de dos ribointerruptores (Figura 23), uno de ellos perteneciente a una muestra metagenómica de océano (env8) y el otro a *Thermoanaerobacter tengcongensis* (Tte), que aparecen asociados a AqB₁₂ y AdoB₁₂, respectivamente. Aunque ambos ribointerruptores presentan un núcleo de unión a cobalamina común, utilizan extensiones periféricas específicas para el reconocimiento de cobalaminas diferentes. Además, se ha demostrado que existe una interacción entre el bucle L5 (del aptámero) y el L13 (de la plataforma de expresión), que da lugar a una zona de contacto (*kissing loop* o KL, cuya formación se ve fuertemente favorecida por la presencia de cobalaminas. La estructura terciaria de ambos ribointerruptores está integrada por dos apilamientos coaxiales, uno formado

por P1-P3-P6 y el otro por P4-P5-P13. El reconocimiento de la cobalamina ocurre mediante complementariedad entre la forma del ligando y del RNA, con una escasa participación de los enlaces por puentes de hidrógeno. En ambos ribointerruptores, la cobalamina se encuentra entre el surco menor del apilamiento coaxial P3-P6 y la hélice del KL formada por el apareamiento de L5 y L13. La cara inferior del anillo corrínico interacciona con el KL estableciendo contactos dependientes de la estructura más que de la secuencia nucleotídica. El Dmb y el aminopropilo que lo conecta al anillo corrínico interaccionan con el esqueleto de ribosas fosfato de L5 y L13 principalmente por medio de fuerzas de van der Waals. La zona de contacto KL-cobalamina es casi idéntica en los dos ribointerruptores a pesar de la baja similitud de secuencias en L5 y L13, lo que indica que existe un reconocimiento estructural entre el KL y la B₁₂.

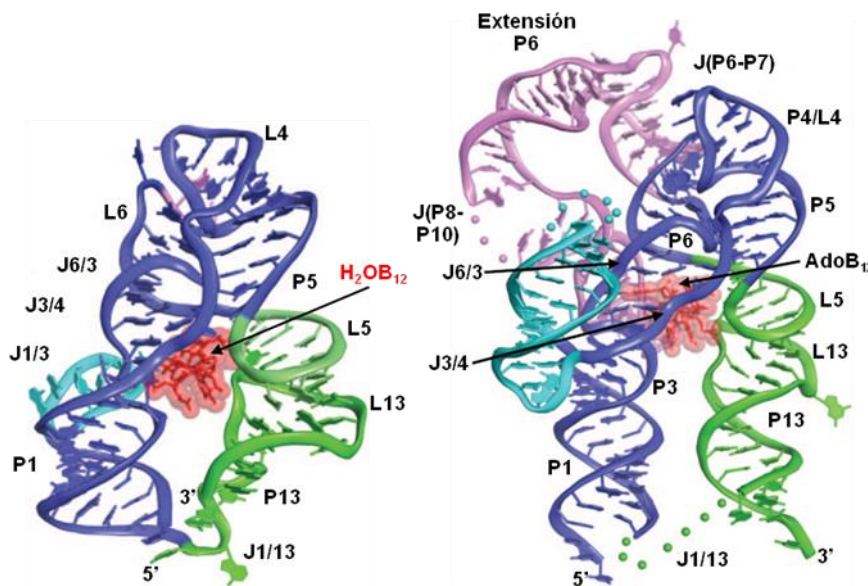


Figura 23. Estructura terciaria de env8AqB₁₂ (izquierda) y de Tte (derecha) unidos, respectivamente, a AqB₁₂ y AdoB₁₂ (rojo) (Johnson *et al.* 2012). En azul está representado el nodo central, en verde el KL y las expansiones de P6 en violeta. Las regiones desordenadas de Tte, J1/13 y J(P8-P10), están representadas por esferas.

Además, sorprendentemente, el mencionado trabajo revela que el ribointerruptor env8, con un bucle P6 no extendido, presenta 500 veces más afinidad por acuacobalamina (AqB₁₂) y MeB₁₂ que por AdoB₁₂. La afinidad preferente por uno u otro tipo de cobalamina se consigue gracias a diferencias conformacionales en J6/3 originadas por variaciones en las hélices P3, P4, P5 y P6.

Se ha descrito que la actividad de la sintetasa de metionina humana muestra un incremento notable en medio suplementado con su propio cofactor B₁₂ (Mangum *et al.* 1969), un efecto que ocurre a nivel traduccional y depende de un elemento sensible

al cofactor localizado en la región 5'UTR del mRNA diana (Oltean y Banerjee 2003). Dicho efecto positivo se debe a que la vitamina promueve la traducción al provocar que el mRNA pase de la fracción ribonucleoproteica inactiva a la fracción polisomal. El elemento de respuesta a B₁₂ identificado previamente se corresponde con un sitio interno de entrada del ribosoma que, a diferencia de los ribointerruptores, no se une directamente al cofactor (Oltean y Banerjee 2005), sino que más bien parece requerir un mediador proteico cuya identidad se desconoce por el momento.

Además de los mecanismos ya mencionados, se conoce un caso de regulación por B₁₂ en *S. typhimurium*, relacionado con la utilización de la etanolamina como fuente de carbono y nitrógeno. Los genes que determinan la síntesis de las enzimas requeridas para su utilización se encuentran agrupados en el operón *eut*, cuya expresión depende de etanolamina y B₁₂ (Roof y Roth 1989). La etanolamina es degradada a acetaldehído y amonio por la acción de la enzima amonioliasa, que utiliza AdoB₁₂ como cofactor. Dado que dicho cofactor puede o no estar presente, parece lógico que la transcripción de los genes necesarios para la utilización de la etanolamina esté sujeta a regulación positiva por B₁₂. Los datos genéticos sugieren que la regulación concertada por etanolamina y B₁₂ está mediada por el producto del gen *eutR*. Se ha especulado que la interacción física entre EutR y sus dos cofactores provocaría un cambio conformacional en la proteína que conduciría a la activación del operón *eut* (Roof y Roth 1992). Sin embargo, aunque EutR posee un dominio de unión al DNA de tipo hélice-giro-hélice, carece de un dominio canónico de unión a B₁₂. Así pues, es todavía una incógnita cómo dicho cofactor modula la acción de EutR.

Los resultados de un estudio con *Enterococcus faecalis* (Fox *et al.* 2009) sugieren que *S. typhimurium* podría utilizar un sistema de regulación mixto, en el que EutR mediaría la respuesta a etanolamina y un ribointerruptor, aún por identificar, la respuesta a B₁₂. Así, en *E. faecalis*, que carece de EutR, la expresión del operón *eut* está controlada por un ribointerruptor dependiente de AdoB₁₂ y un sistema de dos componentes constituido por las proteínas EutW (quinasa de histidina) y EutV (regulador de respuesta con un dominio de unión a RNA). La unión de la AdoB₁₂ al ribointerruptor impide la formación de un terminador intrínseco de la transcripción, mientras que la etanolamina promueve la autofosforilación de EutW y la consiguiente fosforilación de EutV, lo que influye en su capacidad de unión al RNA y, por tanto, en la estabilidad del terminador intrínseco de la transcripción.

Hay que destacar que, hasta la realización de este trabajo, no se había descrito ningún caso de regulación de la expresión génica por B₁₂ mediado por una proteína reguladora que dependa directamente de cobalaminas.

I.7 Fotorreceptores bacterianos

La luz solar, que engloba desde la radiación electromagnética de alta energía a las ondas de radio de baja energía, pasando por la luz visible (Figura 24), es un factor ambiental prácticamente ubicuo. Sirve como fuente de energía directa para los organismos fotoautótrofos y fotoheterótrofos, pero también constituye, para gran parte de los organismos no fotosintéticos, una importante señal que regula diversos procesos biológicos. No obstante, como ya se ha comentado anteriormente, la luz también genera agentes oxidantes (debido principalmente al efecto fotosensibilizador de tetrapirroles y derivados de flavinas) que pueden reaccionar con lípidos de membrana, proteínas o ácidos nucleicos, dañando los componentes celulares.

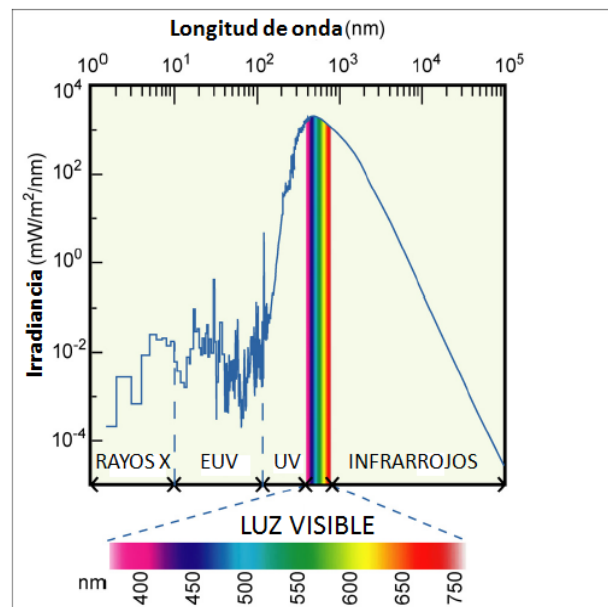


Figura 24. Irradiancia solar desde 1 nm hasta 100 μ m, con la región visible del espectro (380-750 nm) resaltada. EUV: Ultravioleta extremo. UV: ultravioleta (Purcell y Crosson 2008)

Tanto en los organismos eucarióticos como en los procarióticos, la capacidad de percibir la luz suele estar mediada por proteínas fotorreceptoras resultantes de la asociación de ciertos dominios proteicos con moléculas fotosensibles específicas o cromóforos. Los cromóforos constituyen un grupo reducido de moléculas no proteicas, de variada naturaleza química y pequeño tamaño. Al absorber luz de una determinada longitud de onda, los cromóforos pasan de un estado basal a un estado excitado, en el que pueden permanecer <1 a $>10^4$ segundos, antes de regresar al estado basal. Hasta el hallazgo en este trabajo de que la vitamina B₁₂ puede actuar como cromóforo, eran cinco los cromóforos (FMN, FAD, ácido p-cumarínico, retinal y bilina) y seis los módulos proteicos con capacidad fotorreceptora conocidos en bacterias, ninguno de

los cuales se encuentra presente en *M. xanthus* (Tabla 1; Figura 25): (a) los dominios **LOV** (light, oxygen and voltage), **BLUF** (blue-light sensing using FAD), **PYP** (photoactive yellow protein), y **criptocromo/fotoliasa**, que absorben luz azul mediante su asociación con FMN, FAD, ácido p-cumarínico, y FAD, respectivamente; (b) las **proteorodopsinas**, que absorben luz azul o verde, mediante su asociación con el retinal; (c) los **bacteriofitocromos**, que absorben luz roja, mediante su asociación con bilina (van der Horst et al. 2007; Purcell y Crosson 2008; Gomelsky y Hoff 2011).

Tabla 1. Módulos fotorreceptores bacterianos (Purcell y Crosson 2008).

Módulo	Cromóforo	Luz absorbida
LOV (Light, Oxygen and Voltage)	FMN (Flavin mononucleótido)	Azul
BLUF (Blue-Light sensing Using FAD)	FAD (Flavin adenosin dinucleótido)	Azul
PYP (Photoactive Yellow Protein)	Ácido p-cumarínico	Azul
Criptocromo/ fotoliasa	FAD	Azul
Proteorodopsinas	Retinal	Azul/Verde
Bacteriofitocromos	Bilinas/Tetrapirroles lineales	Rojo/Rojo lejano

Mientras que la actividad de proteorodopsinas, bacteriofitocromos y PYP depende de la isomerización de sus respectivos cromóforos, la de criptocromos, dominios LOV y BLUF está basada en la fotoquímica de las flavinas, que participan en una reacción de transferencia de electrones (BLUF y criptocromos) o en la formación de un aducto con un residuo de cisteína (LOV) (Figura 25).

Cinco de los seis tipos de fotorreceptores bacterianos se identificaron por primera vez en bacterias fototróficas. Este hecho se debe a que, durante años, los trabajos sobre fotobiología bacteriana se centraron en el estudio de los organismos fototróficos, bajo la suposición errónea de que las bacterias no fotosintéticas eran insensibles a la luz. El descubrimiento de bacteriofitocromos en *Deinococcus radiodurans* y *Pseudomonas aeruginosa*, y de un fotorreceptor tipo LOV en *Bacillus subtilis* cambió la percepción de que los fotorreceptores eran exclusivos de las bacterias fototróficas (Davis et al. 1999; Losi et al. 2002).

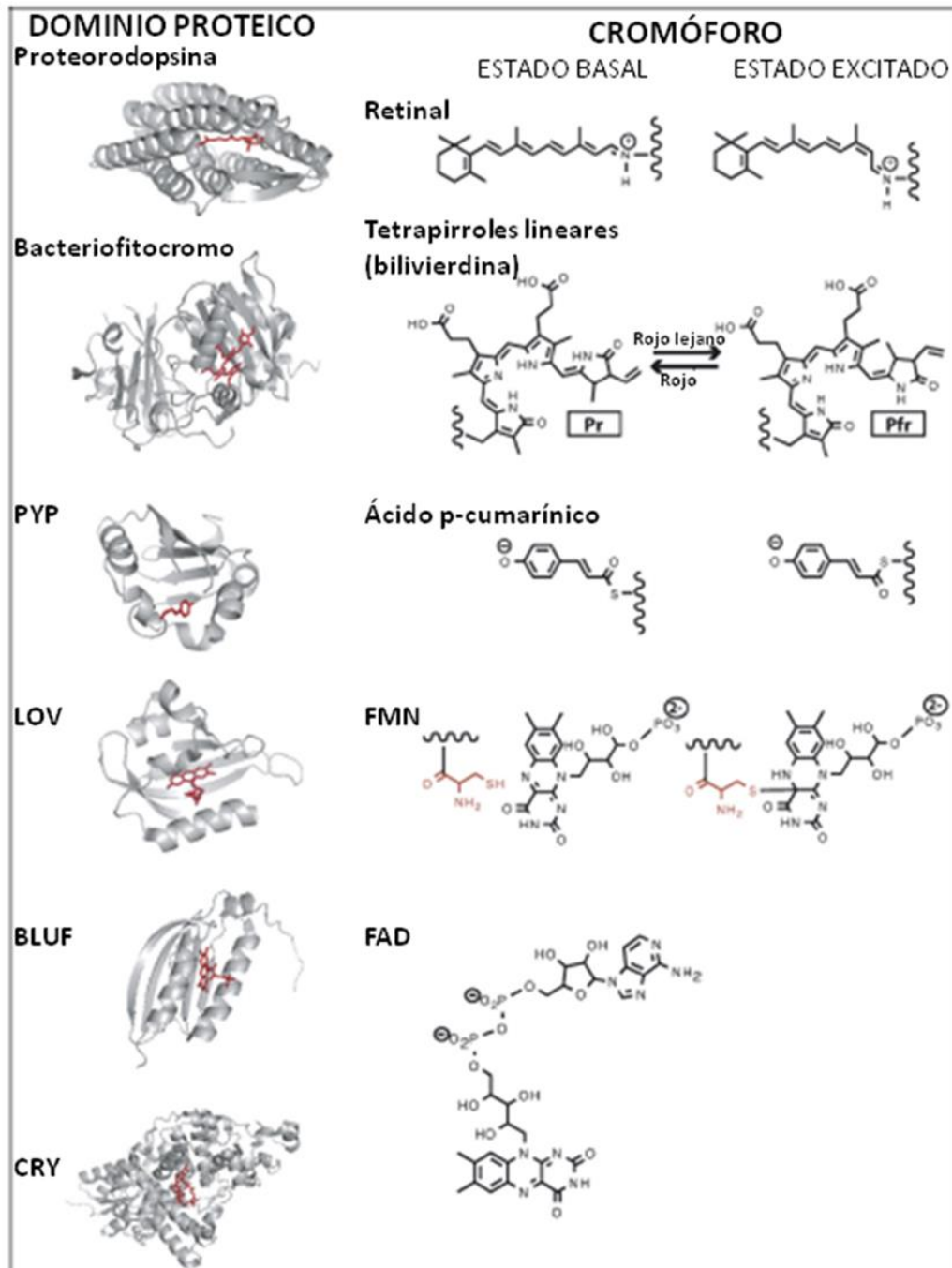


Figura 25. Representación de la estructura tridimensional de los 6 tipos de fotorreceptores bacterianos conocidos (hasta la realización de este trabajo) con sus respectivos grupos cromóforos (tomado de Purcell y Crosson, 2008). En las estructuras proteicas (izquierda), los cromóforos aparecen representados en rojo. A la derecha, se indican las transiciones estructurales y enlaces covalentes inducidos en dichas moléculas por la luz (la transferencia de electrones no se representa); para el cromóforo FMN del dominio LOV, aparece coloreada en rojo la cisteína conservada, que forma un enlace covalente con el carbono 4a del anillo de flavina. Las líneas en espiral representan el esqueleto proteico al que se une el cromóforo.

En los últimos años, el análisis bioinformático de cientos de genomas bacterianos secuenciados ha puesto de manifiesto la existencia de posibles fotorreceptores en

más de un 25% de las especies analizadas, siendo los bacteriofitocromos los más abundantes y encontrándose en muchas de ellas más de uno de los seis tipos de fotorreceptores conocidos (van der Horst *et al.* 2007; Losi y Gärtner 2008). Otro aspecto que deriva de estos estudios es el reconocimiento de la naturaleza modular de las proteínas fotorreceptoras que, además del dominio fotorreceptor, suelen contener dominios reguladores, probablemente implicados en el control por la luz de una respuesta celular concreta (Figura 26). Además, un mismo tipo de dominio fotorreceptor puede encontrarse asociado a distintos módulos reguladores (quinasas, fosfatasas, ciclasas de adenilato, etc.), lo que sugiere que los mecanismos moleculares implicados son muy diversos (Losi y Gärtner 2008; Gomelsky y Hoff 2011).

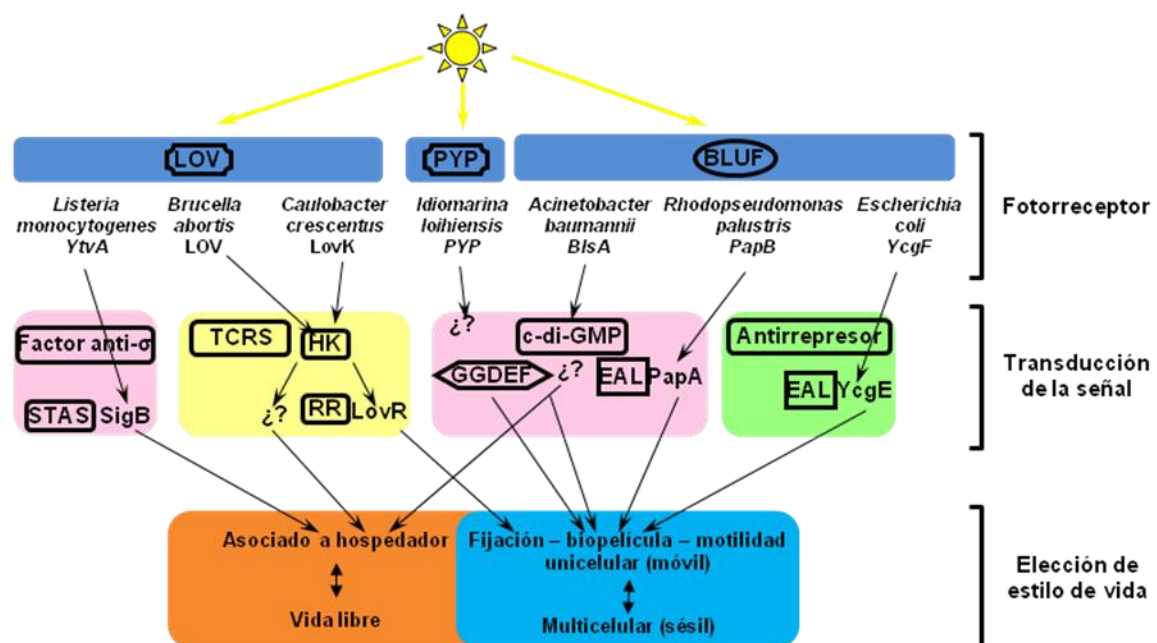


Figura 26. Esquema que ilustra la arquitectura modular de los fotorreceptores bacterianos y algunas de las rutas que permiten a las bacterias utilizar la luz para regular la decisión sobre su estilo de vida. TCRS: sistema de dos componentes; HK: quinasas de histidinas; RR: regulador de respuesta; EAL y GGDEF: proteínas implicadas en la síntesis e hidrólisis, respectivamente, de c-di-GMP; STAS: *Sulfate Transporter and Anti-Sigma factor antagonist* (tomado de Gomelsky *et al.*, 2011).

La síntesis de pigmentos fotoprotectores (como en *M. xanthus*), la virulencia (Purcell y Crosson 2008), la adhesión celular (Herrou y Crosson 2011), la fototaxia (Ng *et al.* 2003) y el desarrollo son procesos que pueden estar controlados por la luz en bacterias no fototróficas. Así, se ha propuesto que la luz podría ser un factor clave en la regulación de la decisión entre un estilo de vida libre o asociado al hospedador, en el caso de ciertas bacterias patogénicas, o entre un estado móvil, unicelular y un estilo de vida multicelular, sésil, en el caso de bacterias que pueden formar biopelículas (Figura 26; Gomelsky y Hoff, 2011). La activación por luz azul de la maduración de las

biopelículas formadas por *E. coli* en medio acuático constituye uno de los ejemplos mejor estudiados al nivel molecular. Dicha respuesta a la luz está mediada por YcgF, una proteína sensora con un dominio BLUF N-terminal unido a un dominio EAL típico de fosfodiesterasas de c-di-GMP pero que en YcgF carece de dicha actividad. Más bien, YcgF funciona como un antirrepresor dependiente de luz azul, cuyo dominio EAL se une al dominio N-terminal tipo MerR del represor transcripcional YcgE, impidiendo su unión al operador y permitiendo la expresión de sus genes diana (Tschowri *et al.* 2009). Se desconoce si el dominio C-terminal de YcgE, esencial para su función, actúa como un dominio de unión a ligando, como ocurre en la mayoría de proteínas MerR.

La acción de YcgF sobre YcgE es reminiscente de la acción de CarS sobre CarA y CarH en *M. xanthus*. No obstante, a diferencia de CarS, la unión de YcgF a YcgE depende de luz. Aunque YcgF puede unirse a YcgE en ausencia de DNA, se requiere la luz para que el complejo DNA-YcgE sea desestabilizado por el antirrepresor (Figura 27).

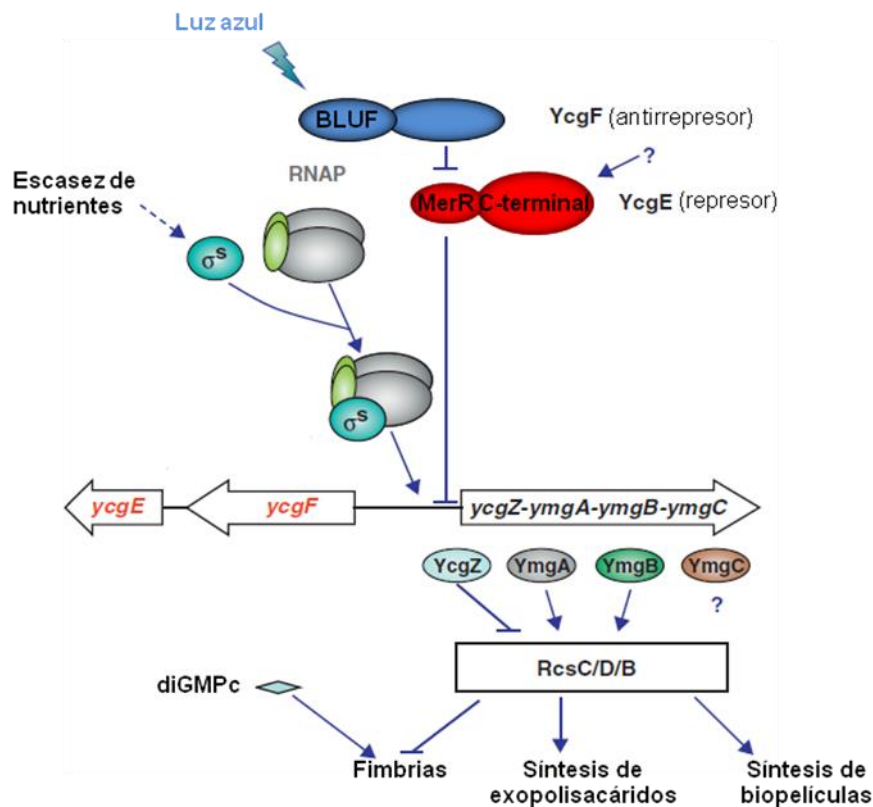


Figura 27. Circuito de regulación de *E. coli* inducido por luz dependiente de YcgE/YcgF. La absorción de luz azul en el dominio BLUF de la proteína YcgF promueve su interacción con el dominio tipo MerR del represor YcgE. Esto impide la unión de YcgE al DNA y permite la expresión de sus genes diana, muchos de ellos dependientes de σ^S (Elías-Arnanz *et al.* 2011).

Es probable que la luz provoque cambios conformacionales en YcgF (Hasegawa *et al.* 2006; Nakasone *et al.* 2007; Schroeder *et al.* 2008) que le permitan

unirse con mayor afinidad a YcgE y competir mejor con el operador (Tschowri *et al.* 2009). El estudio transcripcional a nivel genómico sitúa a la pareja reguladora YcgE-YcgF dentro de la respuesta general a estrés dependiente de σ^S , controlando directamente la expresión de proteínas reguladoras de pequeño tamaño (78-126 residuos), varias de ellas implicadas en la formación de biopelículas y fimbrias mediante el sistema Rcs de señalización por fosforilación. Por tanto, el par YcgE-YcgF funciona como un regulador global crucial en una compleja red genética que conecta la formación de biopelículas y la respuesta a la luz.

I.8 Objetivos.

1. Entender la base molecular de la diferencia entre CarA y CarH en cuanto a su dependencia de B₁₂ para mediar la represión del promotor P_B en *M. xanthus*.
2. Determinar qué forma específica de cobalamina está implicada en la regulación de P_B por CarH.
3. Averiguar si existe algún vínculo entre la vitamina y la capacidad de responder a la luz en *M. xanthus*.
4. Estudiar la posible conservación evolutiva del mecanismo de regulación basado en B₁₂ descrito en este trabajo.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1 Estirpes y plásmidos

II.1.1 Estirpes

II.1.1.1 Estirpes de *M. xanthus*

Las estirpes de *M. xanthus* se nombran con letras mayúsculas indicativas del laboratorio en el que fueron obtenidas (MR, Departamento de Genética, Universidad de Murcia; DK, Department of Biochemistry, Stanford University) seguidas de un número de aislamiento. En este trabajo se han utilizado estirpes de *M. xanthus* que derivan directa o indirectamente de DK101, cepa silvestre que presenta variación de fase en la pigmentación de las colonias (en la oscuridad pueden ser amarillas o morenas) y activación por la luz de la síntesis de carotenoides. La estirpe DK1050 es una variante espontánea de DK101 que no presenta variación de fase o varía con frecuencia muy baja (Ruiz-Vázquez y Murillo 1984). La homogeneidad de coloración de sus colonias (amarillas en oscuridad) la hace especialmente útil para el análisis genético de la carotenogénesis. Por ello, en este trabajo se ha utilizado como la estirpe silvestre para la carotenogénesis.

Para indicar los distintos fenotipos asociados a la carotenogénesis se ha utilizado la siguiente terminología: 1) Car⁺, fenotipo silvestre para la inducción por la luz de la síntesis de carotenoides; 2) Car⁻, fenotipo debido a mutaciones en genes que participan en dicho proceso (mutaciones *car*) y que provocan ausencia de carotenoides coloreados en cualquier situación; 3) Car^C, fenotipo debido a mutaciones que provocan la síntesis constitutiva de carotenos (independiente de luz); 4) Car⁽⁺⁾, fenotipo silvestre para la carotenogénesis en presencia de cobalaminas.

La Tabla 2 recoge las estirpes de *M. xanthus* utilizadas en este trabajo, indicando su fenotipo, genotipo y origen (aclaraciones sobre el genotipo de algunas estirpes se incluyen en la sección de *Resultados*).

Tabla 2. Estirpes utilizadas en este estudio.

Estirpe	Fenotipo	Genotipo	Fuente o referencia
DK1050	Car ⁺	Silvestre	(Ruiz-Vázquez y Murillo 1984)
MR418	Car ⁻ Tc ^R LacZ ^I	<i>carB::Tn5-lac-132</i> (inserción del transposón [QMR401:: Tn5-lac])	(Cervantes y Murillo 2002)
MR844	Car ⁽⁺⁾	$\Delta carA$	(Cervantes y Murillo 2002)
MR848	Car ⁺	$\Delta carH$	(Cervantes y Murillo 2002)
MR1716	Car ^C	$\Delta carA \Delta carH$	(Pérez-Marín <i>et al.</i> 2008)
MR1728	Car ⁽⁺⁾ Km ^R	$\Delta carA \Delta carH$; P _C :: <i>carH</i>	(Pérez-Marín <i>et al.</i> 2008)
MR1744	Car ⁻ Tc ^R LacZ ⁽⁺⁾	$\Delta carA carB::Tn5-lac-132$	(Pérez-Marín <i>et al.</i> 2008)
MR1776	Car ⁻	$\Delta carS$	(León <i>et al.</i> 2010)
MR1777	Car ⁽⁺⁾	$\Delta carS \Delta carA$	Este trabajo
MR1778	Car ^C	$\Delta carS \Delta carA \Delta carH$	Este trabajo
MR1780	Car ⁻ Tc ^R LacZ ⁻	$\Delta carS carB::Tn5-lac-132$	Este trabajo
MR1781	Car ⁻ Tc ^R LacZ ⁽⁺⁾	$\Delta carS \Delta carA carB::Tn5-lac-132$	Este trabajo
MR1782	Car ⁻ Tc ^R LacZ ^C	$\Delta carS \Delta carA \Delta carH carB::Tn5-lac-132$	Este trabajo
MR1793	Car ⁻	$\Delta carS \Delta carH$	Este trabajo
MR1794	Car ⁻ Tc ^R LacZ ⁻	$\Delta carS \Delta carH carB::Tn5-lac-132$	Este trabajo
MR2063	Car ⁽⁺⁾ Km ^R	$\Delta carA \Delta carH$; P _C ::q1[<i>carA</i> (1-79)/ <i>carH</i> (94-299)]	Este trabajo
MR2064	Car ⁽⁺⁾ Km ^R	$\Delta carA \Delta carH$; P _C ::q2[<i>carA</i> (1-74)/ <i>carH</i> (73-299)]	Este trabajo
MR2071	Car ⁽⁺⁾ Km ^R	$\Delta carA \Delta carH$; P _C ::qTt1[<i>carA</i> (1-79)/ <i>TtcarH</i> (80-285)]	Este trabajo
MR2072	Car ⁽⁺⁾ Km ^R	$\Delta carA \Delta carH$; P _C ::qTt2[<i>carH</i> (1-93)/ <i>TtcarH</i> (80-285)]	Este trabajo
MR2075	Car ^C	$\Delta carA \Delta pduO$	Este trabajo
MR2076	Car ⁻ Tet ^R LacZ ^C	$\Delta carA \Delta pduO carB::Tn5-lac-132$	Este trabajo
MR2077	Car ⁽⁺⁾ Km ^R	$\Delta carA \Delta carH$; P _C :: <i>carH</i> [E191D]	Este trabajo
MR2078	Car ^C Km ^R	$\Delta carA \Delta carH$; P _C :: <i>carH</i> [E191Q]	Este trabajo
MR2087	Car ^C Km ^R	$\Delta carA \Delta carH$; P _C ::qTt2*[<i>carH</i> (1-93)/ <i>TtcarH</i> (80-285) (H177A)]	Este trabajo
MR2088	Car ⁽⁺⁾ Km ^R	$\Delta carS \Delta carA \Delta carH$; P _C ::qTt1[<i>carA</i> (1-79)/ <i>TtcarH</i> (80-285)]	Este trabajo
MR2089	Car ⁽⁺⁾ Km ^R	$\Delta carS \Delta carA \Delta carH$; P _C ::qTt2[<i>carH</i> (1-93)/ <i>TtcarH</i> (80-285)]	Este trabajo

Car⁺: fenotipo silvestre para la carotenogénesis inducida por luz; Car⁻: ausencia de carotenogénesis inducida por luz; Car⁽⁺⁾: fenotipo silvestre para la carotenogénesis en presencia de cobalaminas. Km^R: resistencia a kanamicina. Tc^R: resistencia a tetraciclina. P_C: promotor constitutivo que consiste en uno de los promotores ribosómicos de *M. xanthus* (P₃). LacZ^I: síntesis de β-galactosidasa inducida por luz; LacZ^C: síntesis constitutiva de β-galactosidasa; LacZ⁽⁺⁾: síntesis de β-galactosidasa reprimida en oscuridad en presencia de cobalaminas e inducida por luz; LacZ⁻: bajos niveles de actividad β-galactosidasa.

II.1.1.2 Estirpes de *E. coli*

Las estirpes de *E. coli* utilizadas fueron DH5α (Hanahan 1983), BL21 (λDE3) (Novagen), JM109 (Yanisch-Perron *et al.* 1985) y BTH101 (Karimova *et al.* 2000). DH5α 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. Además, permiten utilizar el sistema de escrutinio “blanco-

azul” para la detección de las colonias portadoras de plásmidos recombinantes. La estirpe BL21 (λ DE 3) posee en su cromosoma una copia del gen de la polimerasa de RNA del fago T7 ubicado bajo el control del promotor *lacUV5*, activable por el análogo de la lactosa IPTG (isopropil β -D-tiogalactósido). 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 BTH101 carece de actividad adenilato ciclasa al presentar una mutación en el gen *cya*, lo que la hace apropiada para los ensayos de doble híbrido bacteriano.

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

Estirpe	Genotipo	Fuente referencia
DH5 α	ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacU169</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>hsdR17</i> <i>supE44</i> <i>thi-1</i> <i>gyrA</i> <i>relA1</i>	(Hanahan 1983)
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS_B</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>) <i>gal</i> <i>dcm</i> con DE3, un profago λ que lleva el gen de la T7 RNA polimerasa	Novagen
JM109	<i>e14</i> -(McrA ⁻) <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>hsdR17</i> (<i>r_K⁻ m_K⁺</i>) <i>supE44</i> <i>relA1</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) [F ⁻ <i>traD36</i> <i>proAB</i> <i>lacIqZ</i> Δ M15]	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> 1985)
BTH101	F ⁻ <i>cya99I</i> <i>alaD139</i> <i>galE15</i> <i>galK16</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>hsdR2</i> <i>mcrA1</i> <i>mcrB1</i>	(Karimova <i>et al.</i> 2000)

II.1.2 Plásmidos

La Tabla 4 recoge los plásmidos utilizados en este trabajo, indicando sus marcadores seleccionables, utilidad y origen.

Tabla 4. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Resistencia	Descripción	Fuente o referencia
pET15b	Km ^R	Vector para sobreexpresión de proteínas fusionadas a His ₆	Novagen
pKT25	Km ^R	Vector para la sobreexpresión de proteínas fusionadas por su extremo C-terminal al fragmento T25 de la ciclasa de adenilato (CyaA)	(Karimova <i>et al.</i> 2000)
pKT25Zip	Km ^R	GCN4 zipper control positivo para los ensayos de doble híbrido	(Karimova <i>et al.</i> 2000)
pMR2828	Km ^R	Vector con <i>carH</i> (<i>Nter</i>) bajo el control transcripcional de un promotor constitutivo (P _C)	(Pérez-Marín <i>et al.</i> 2008)
pMR2830	Km ^R	Vector con <i>carH</i> expresado bajo P _C	(Pérez-Marín <i>et al.</i> 2008)
pMR2838	Km ^R	Vector con <i>carA</i> expresado bajo P _C	(Pérez-Marín <i>et al.</i> 2008)
pMR3014	Amp ^R	Vector de sobreexpresión de His ₆ -TtCarH	Este trabajo
pMR3184	Km ^R Gal ^S	Vector con el alelo Δ <i>carS</i>	(León <i>et al.</i> 2010)
pMR3334	Km ^R	Contiene el gen para la quimera Q1 [CarA(1-79) + CarH(94-299)] expresado bajo el control de P _C	Este trabajo
pMR3335	Km ^R	Contiene el gen para la quimera Q2 [CarA(1-74)+ CarH(73-299)] expresado bajo el control de P _C	Este trabajo
pMR3363	Km ^R	Contiene el gen para la quimera QTt2 [CarH(1-93) + TtCarH(76-285)] expresado bajo el control de P _C	Este trabajo
pMR3366	Amp ^R	Vector para la sobreexpresión de His ₆ -QTt2	Este trabajo

II. Materiales y métodos

pMR3370	Km ^R	Contiene el gen para la quimera QTt1 [CarA(1-79) + TtCarH(76-285)] expresado bajo el control de P _C	Este trabajo
pMR3371	Amp ^R	Vector para la sobreexpresión de His ₆ -QTt1	Este trabajo
pMR3375	Amp ^R	pUT18C- <i>carH</i> (73-299)	Este trabajo
pMR3376	Km ^R	pKT25- <i>carH</i> (73-299)	Este trabajo
pMR3381	Amp ^R	pUT18C- <i>carA</i> (75-288)	Este trabajo
pMR3382	Km ^R	pKT25- <i>carA</i> (75-288)	Este trabajo
pMR3390	Amp ^R	pUT18C- <i>carA</i> (75-288) (H175A)	Este trabajo
pMR3391	Km ^R	pKT25- <i>carA</i> (75-288) (H175A)	Este trabajo
pMR3392	Amp ^R	pUT18C- <i>carH</i> (73-299) (H193A)	Este trabajo
pMR3393	Km ^R	pKT25- <i>carH</i> (73-299) (H193A)	Este trabajo
pMR3394	Amp ^R	pUT18C- <i>TtcarH</i> (76-285)	Este trabajo
pMR3395	Km ^R	pKT25- <i>TtcarH</i> (76-285)	Este trabajo
pMR3425	Km ^R Gal ^S	Vector con el alelo $\Delta pduO$ para la construcción de una estirpe $\Delta pduO$	Este trabajo
pMR3451	Amp ^R	Vector para la sobreexpresión de CarA fusionada a inteína	Este trabajo
pMR3469	Amp ^R	Vector para la sobreexpresión de QTt1 fusionada a inteína	Este trabajo
pMR3470	Amp ^R	Vector para la sobreexpresión de QTt2 fusionada a inteína	Este trabajo
pMR3471	Amp ^R	Vector para la sobreexpresión de TtCarHCt (TtCarH (80-285)) fusionada a inteína	Este trabajo
pMR3472	Km ^R	Contiene el gen codificante de CarH*[E191D] bajo el control de P _C	Este trabajo
pMR3473	Km ^R	Contiene el gen para CarH*[E191Q] bajo el control de P _C	Este trabajo
pMR3516	Amp ^R	pUT18C- <i>TtcarH</i> (76-285) (H177A)	Este trabajo
pMR3517	Km ^R	pKT25- <i>TtcarH</i> (76-285) (H177A)	Este trabajo
pMR3522	Amp ^R	Vector para la sobreexpresión de CarAct (CarA (80-288)) fusionada a inteína	Este trabajo
pMR3536	Amp ^R	Vector para la sobreexpresión de TtCarHCt (H177A) fusionada a inteína	Este trabajo
pMR3567	Km ^R	Vector con la región de 177 pb que contiene el operador de TtcarH (<i>OpTtCH</i>)	Este trabajo
pMR3589	Amp ^R	pUT18C- <i>carH</i> *[E191Q]	Este trabajo
pMR3615	Km ^R	pKT25- <i>carH</i> *[E191Q]	Este trabajo
pMR3625	Km ^R	Contiene el gen para la quimera QTt2[H177]: CarH(1-93) + TtCarH[H177A] (76-285) expresado bajo el control de P _C	Este trabajo
pMR3662	Km ^R	Vector con la región de 177 pb que contiene OpTtCH mutado en su sitio pII	Este trabajo
pMR3700	Km ^R	Vector con la región de 177 pb que contiene OpTtCH mutado en su sitio pl	Este trabajo
pTYB12	Amp ^R	Vector para la sobreexpresión de proteínas fusionadas a inteína	New England Biolabs
pUT18C	Amp ^R	Vector para la fusión de proteínas al fragmento T18 de CyaA a través del extremo C-terminal	(Karimova <i>et al.</i> 2000)
pUT18CZip	Amp ^R	GCN4 zipper control positivo para los ensayos de doble híbrido	(Karimova <i>et al.</i> 2000)

Se indican las características más relevantes (Km^R y Amp^R: genes de resistencia a los antibióticos kanamicina y ampicilina, respectivamente; Gal^S: sensibilidad a galactosa conferida por el gen *galK*; *lacZ*: gen de la β -galactosidasa).

II.1.3 Oligonucleótidos

Oligonucleótidos utilizados en este trabajo (Tabla 5)

Tabla 5. Oligonucleótidos empleados en este trabajo

Nombre	Secuencia (5' -> 3')	T _m (°C)	Uso
10-Nter KpnI	AAAGGTACCATGACGTTGGCATCCGCCACCATC	71,9	Clonación de <i>carA</i>
Orf10-EcoRI-R	AAAGAAATTCCTACGGGGATTCTGAGCGTTGCG	70,7	Clonación de <i>carA</i>
11-Nter KpnI	AAAGGTACCATGGCTGAGCGCACCTATCGAATC	54	Clonación de <i>carH</i>
Orf11-EcoRI-R	AAAGAAATTCCTACGTTACCCGCGAGCGGTCCACAG	58	Clonación de <i>carH</i>
QuimAH1L	CGCCACGCTCTCGCATGCGGCTGCTCAGCGGCGGCTCCG	75	Obtención del gen quimérico <i>q1</i>
QuimAH1R	CCGCATCGGGAGAGCTGGCGGGAG	73	Obtención del gen quimérico <i>q1</i>
QuimAH2L	AGCCCTCCATCAACTGAGGCTCCGTCTTACCTGGCGGATG	75	Obtención del gen quimérico <i>q2</i>
QuimAH2R	CCTCAGTTGATGGAGGGGCTGGAG	67,8	Obtención del gen quimérico <i>q2</i>
TtCABamHI	GGATCCTCATATCGCCTCTTTTCCG	60	Clonación de <i>TtcarH</i> en pET-15b para su posterior sobreexpresión y purificación
QuimTt1L	GTCTCGGGGGCGACCTCCTGCTGCTCAGCGGGGCTCCG	>75	Obtención del gen quimérico <i>qTt1</i>
QuimTt1R	CAGGAGGTGCGCCCGGAGGAC	69,6	Obtención de los genes quiméricos <i>qTt1</i> y <i>qTt2</i>
QuimTt2L	GTCTCGGGGGCGACCTCCTGCCGGCGTCTGCTGGCTGGCAC	>75	Obtención del gen quimérico <i>qTt2</i>
TtCAEcoRI	AAAGAAATTCATATCGCCTCTTTTCCGGC	72	Obtención de los genes quiméricos <i>qTt1</i> y <i>qTt2</i>
PduOdel1	AAAGGTACCGGGTCTGTAGCCTTCGAGCGTG	64	Delección del gen <i>pduO</i>
PduOdel2	AAAAGAAATTCGCCCCGGCTTCTAACGGTGCCTGG	63	Delección del gen <i>pduO</i>
PduOdel3	AAAAGAAATTCAGTCGGACGCGGCTCGTGAACG	61	Delección del gen <i>pduO</i>
PduOdel4	AAAAAGCTTCCCAACGCATACACGGCGTTGCGG	62	Delección del gen <i>pduO</i>
11E191D1	GCTTCCGGAAGACGAGCAGAGATG	58	Mutagénesis dirigida de <i>carH</i> (E191D)
11E191D2	CATCTCGTCTGCTCTTCCGGAAAGC	68	Mutagénesis dirigida de <i>carH</i> (E191D)
11E191Q1	GCTTCCGGAACAGGAGCAGCAGATG	58	Mutagénesis dirigida de <i>carH</i> (E191Q)
11E191Q2	CATCTCGTCTCTCTGTTCCGGAAAGC	58	Mutagénesis dirigida de <i>carH</i> (E191Q)
prTtCA-PstI-R	AAACTGCAGGCTTTCCAGTCGGGCTCCATAC	61	Clonación de un fragmento de 177 pb que contiene OpTtCH
prTtCA-EcoRI-L	AAAAGAAATTCGTATGGCTTCCACCTCGGC	58	Clonación de un fragmento de 177 pb que OpTtCH
MUTPI-1	GCCCCGCTACAGGGCGCAGCCATGTACAAAAGC	67	Generación de una versión de OpTtCH mutada en pl
MUTPI-2	CGGGCGGATGTCCCGCGTCCGGTACATGTTTTTCG	67	Generación de una versión de OpTtCH mutada en pl
MUTPII-1	GAGATGTACAAGGCCCTTGACAAGGGTTATACATTGC	59	Generación de una versión de OpTtCH mutada en plI
MUTPII-2	GCAATGTATAACCCCTTGCAAGGCCCTTGATCATCTC	59	Generación de una versión de OpTtCH mutada en plI

DELPI	CGCAGAGATGTACAAAAGCTTGAC	70	Amplificación de la segunda mitad de la región pl y de la región pll completa de OpTtCH.
DELTOPI	ACAAAAGCTTGTACAAAACCTATACATTGC	51	Amplificación de la región pll de OpTtCH.
DELTOPI/UTPII	ACAAGGCCCTTGACAAGGGTTATACATTGC	55	Amplificación de la versión mutada de la región pll de OpTtCH.
CrisTtCarH-R2	CTCCGACAGAGATGTACAAAAGCTTGACAAAACCTATACATTGC	61	Ensayos de cambio de movilidad electroforética para la determinación de la secuencia mínima de OpTtCH reconocida por TtCarH.
CrisTtCarH-L2	GCAATGTATAGGTTTTGTCAAAGCTTTTGTACATCTCTGCGGAG	61	Ensayos de cambio de movilidad electroforética para la determinación de la secuencia mínima de OpTtCH reconocida por TtCarH.
CrisTtCH-R2(-3)	CGCAGAGATGTACAAAAGCTTGACAAAACCTATACATTGC	59	Ensayos de cambio de movilidad electroforética para la determinación de la secuencia mínima de OpTtCH reconocida por TtCarH.
CrisTtCH-L2(-3)	GCAATGTATAGGTTTTGTCAAAGCTTTTGTACATCTCTGCG	59	Ensayos de cambio de movilidad electroforética para la determinación de la secuencia mínima de OpTtCH reconocida por TtCarH.
Cris-37mer-R	CGCAGAGATGTACAAAAGCTTGACAAAACCTATACAT	57	Ensayos de cambio de movilidad electroforética para la determinación de la secuencia mínima de OpTtCH reconocida por TtCarH.
Cris-37mer-L	ATGTATAGGTTTTGTCAAAGCTTTTGTACATCTCTGCG	57	Ensayos de cambio de movilidad electroforética para la determinación de la secuencia mínima de OpTtCH reconocida por TtCarH.
Cris-33mer-R	ATGTACAAAAGCTTGACAAAACCTATACATTGC	53	Ensayos de cambio de movilidad electroforética para la determinación de la secuencia mínima de OpTtCH reconocida por TtCarH.
Cris-33mer-L	GCAATGTATAGGTTTTGTCAAAGCTTTTGTACAT	53	Ensayos de cambio de movilidad electroforética para la determinación de la secuencia mínima de OpTtCH reconocida por TtCarH.
Cris-30mer-R	ATGTACAAAAGCTTGACAAAACCTATACAT	50	Ensayos de cambio de movilidad electroforética para la determinación de la secuencia mínima de OpTtCH reconocida por TtCarH.
Cris-30mer-L	ATGTATAGGTTTTGTCAAAGCTTTTGTACAT	50	Ensayos de cambio de movilidad electroforética para la determinación de la secuencia mínima de OpTtCH reconocida por TtCarH.
ProB-BamHI	AAAGGATCCCTCGGATCCACGCCCTTCATGAG	62	Clonación de P _B
ProB-KpnI	AAAGGTACCTCCTCCGAAGAACCCGTTCC	59	Clonación de P _B
prRNA-1-BamHI	AAAGGATCCGGACGAGTCGAGGGAGTCAACG	62	Clonación de P _C
prRNA-2-KpnI	AAAGGTACCGCTCCGCTGATTTCTCCAGAGG	63	Clonación de P _C
prTTCA-XbaI-L	AAATCTAGAGTCATGGCTTCCACCTCGGC	58	Clonación de TtcarH

II.2 Medios de crecimiento

II.2.1 Medios ricos para *M. xanthus*

CTT (Bretscher y Kaiser 1978)

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

CTT Gen

CTT más 10 µg/ml de gentamicina.

CTT Km

CTT más 40 µg/ml de kanamicina.

CTT Tc

CTT más 10 µg/ml de oxitetraciclina.

CTT Km Tc

CTT más 20 µg/ml de kanamicina más 2,5 µg/ml de oxitetraciclina.

CTT X-Gal

CTT más 40 µg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido (X-Gal). La disolución de X-Gal se preparó a una concentración de 20 mg/ml en dimetil-formamida y se conservó protegida de la luz a - 20°C.

CTT CNB₁₂

CTT con 1 µg/ml de cianocobalamina.

CTT AdoB₁₂

CTT con 1 µg/ml de adenosilcobalamina.

CTT MeB₁₂

CTT con 1 µg/ml de metilcobalamina.

CTT X-Gal CNB₁₂/AdoB₁₂/MeB₁₂

CTT más 40 µg/ml de X-Gal y 1 µg/ml de cianocobalamina, adenosilcobalamina o metilcobalamina respectivamente.

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 %.

Los medios a los cuales se les adiciona antibiótico (gentamicina, kanamicina u oxitetraciclina), X-Gal y/o cobalamina se esterilizan previamente en autoclave y se dejan enfriar hasta 50 °C, añadiendo posteriormente una disolución del compuesto requerido hasta la concentración adecuada.

Las soluciones de los antibióticos, X-Gal o cobalaminas se preparan en agua (excepto la de oxitetraciclina que se prepara en HCl 0,1 N) y son esterilizadas por filtración a través de un filtro Millipore de 0,22 µm de diámetro de poro y almacenados a una temperatura entre -20 °C y 4 °C. Al medio al cual se le añadió oxitetraciclina se le adicionó un volumen igual de una solución de NaOH 0,1 N. La disolución y posteriores manipulaciones de las cobalaminas se llevó a cabo en condiciones de baja iluminación y en viales recubiertos con papel de aluminio para protegerlas de la exposición a la luz y evitar así su fotólisis.

II.2.2 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.

LBKm

LB más 40 µg/ml de kanamicina.

LBamp

LB más 100 µg/ml de ampicilina.

LBX-Gal

LB más 40 µg/ml de 5-Bromo-4-Cloro-3-indolil-β-D-galactósido (X-Gal).

LB CNB₁₂

El LB con 1 µg/ml de cianocobalamina.

LB X-Gal CNB₁₂

LB más 40 µg/ml de X-Gal y 1 µg/ml de cianocobalamina.

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

La adición de antibiótico (ampicilina o kanamicina) o X-Gal a los medios, así como la preparación de disoluciones de estos compuestos se realizó como se ha indicado previamente en el Apartado II.2.1.

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 5 litros con 1 l de medio nutritivo. La incubación tuvo lugar, salvo indicación en otro sentido, en un agitador orbital *Innova^R 43* de New Brunswick a 300 rpm y 33 °C para *M. xanthus* y 250 rpm y 37 °C para *E. coli*. La inoculación de *M. xanthus* en medio nutritivo sólido se efectuó con ayuda de 2.5-4 ml de agar de cobertera. Las cajas de Petri se incubaron a 33 °C (*M. xanthus*) o 37 °C (*E. coli*).

El crecimiento, salvo que se especifique lo contrario, tuvo lugar en condiciones de oscuridad. Cuando fue necesario, los cultivos en medio líquido o en cajas de Petri se iluminaron con tres tubos fluorescentes de luz blanca de 18-W a una intensidad aproximada de 10 W/m². Para la iluminación con luz roja (a aproximadamente 12 W/m²), las células se expusieron a la luz de cuatro lámparas incandescentes de 100-W pasada por un filtro *Supergel* rojo número 26 (Rosco). Las intensidades de la luz se estimaron usando un medidor de potencia óptico 1815-C con un detector 818-SL (Newport).

II.4 Tampones y soluciones

II.4.1 Preparación de DNA plasmídico

TE (pH 7,0)	• 10 mM Tris-HCl (pH 7,0) • 1 mM EDTA (pH 8,0)
-------------	---

II.4.2 Electroforesis de DNA

TAE 1X (Sambrook y Russell 2001)	• 40 mM Tris-acetato • 1 mM EDTA (pH 8,0)
TBE 1X (Sambrook y Russell 2001)	• 45 mM Tris-borato • 1 mM EDTA (pH 8,0)

II.4.3 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 Coomassie	• 1% Azul de Coomassie Brilliant R-250 (Serva) • 10% metanol
Solución de tinción	• 2% Solución Coomassie • 10% etanol • 5% ácido acético
Solución de destinción	• 10% Etanol • 5% ácido acético
Geles de poliacrilamida-SDS	Preparados según Sambrook y Russell, 2001

II.4.4 Purificación de proteínas

Tampón A (proteínas fusionadas a His ₆)	• 50 mM Tris, pH 7,5, 1 mM EDTA.
Tampón B (proteínas fusionadas a inteína)	• 50 mM de solución NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 7,5 • 0,5-1M NaCl, • 1 mM β-mercaptoetanol, • 1 mM PMSF, 1 mM benzamidina • 100 µl de inhibidores de proteasas <i>Protease Inhibitor Cocktail for Mammalian Tissues</i> de Sigma, <i>Complete Protease Inhibitor Cocktail</i> de Roche

El tampón A suplementado con NaCl se nombra A-X, siendo X la concentración molar de NaCl.

II.4.6 Determinación de la actividad β-galactosidasa

Tampón Z (Kroos <i>et al.</i> , 1986)	• 40 mM NaH₂PO₄, • 60 mM Na₂HPO₄, • 10 mM KCl, • 1 mM MgSO₄
Solución agarosa-X-Gal	• 0,5 M Tampón fosfato potásico pH 7,0 • 6% dimetilformamida • 0,1% SDS • 0,1–0,5 mg/ml X-Gal • 7 mM β-mercaptoetanol • 5 mg/ml agarosa de bajo punto de fusión

II.5 Extracción de DNA

Para el aislamiento del DNA cromosómico de *M. xanthus* se utilizó el kit de purificación de DNA genómico de *Wizard*TM (Promega). El aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli* se realizó mediante el uso del kit de purificación de DNA plasmídico *Illustra*TM de GE Healthcare.

II.6 Transferencia del DNA

II.6.1 Transformación de *E. coli*

La obtención de células competentes de *E. coli* y su transformación se efectuaron según Sambrook y Russell, 2001. La cantidad de DNA utilizada en la transformación varió entre 1 ng y 10 ng. Cuando fue preciso obtener un alto número de transformantes, se utilizó la técnica de electroporación, según Sambrook y Russell, 2001. La electroporación se llevó a cabo con cubetas de electroporación de 0,1 cm y aplicando los siguientes parámetros: 1,7 kV, 25 μ F y 400 Ω .

II.6.2 Transformación de *M. xanthus*

Para la introducción de DNA exógeno en células de *M. xanthus* se utilizó la electroporación. Para preparar células «electrocompetentes» de *M. xanthus* se centrifugaron (2', 16000×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.

La introducción de plásmidos en *M. xanthus* se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Kashefi y Hartzell, 1995. Las células «electrocompetentes» de *M. xanthus* 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. Las condiciones utilizadas fueron 0,65 kV, 25 μ F y 400 Ω . Inmediatamente después de electroporar se añadió 1 ml de CTT a la cubeta, se mezcló bien y se 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 aislaron en cajas de CTT con el antibiótico correspondiente antes de su utilización.

II.7 Tratamiento enzimático del DNA

Los tratamientos enzimáticos más usuales realizados al DNA fueron:

- Digestión** con enzimas de restricción (GE Healthcare), que se realizó siguiendo las indicaciones del suministrador.
- Desfosforilación** de extremos 5' con la enzima fosfatasa alcalina de camarón (Roche) para evitar la autoligación de los vectores. Todos los tratamientos se realizaron de acuerdo con las especificaciones del suministrador.
- Ligación** de fragmentos de DNA, que se realizó en tampón de ligación más ATP (1 mM), y una unidad de ligasa T4 (Roche). La cantidad de DNA en la mezcla varió según el experimento. Las mezclas de ligación se incubaron a 16 °C durante toda la noche.

II.8 Amplificación de DNA por PCR

Las reacciones de amplificación de DNA por PCR se llevaron a cabo a partir de 15–30 ng de DNA molde, con 20 pmoles de oligonucleótidos, y una mezcla de los cuatro dNTPs a una concentración de 200 µM cada uno. A todas las reacciones de amplificación se les añadió DMSO, a una concentración final del 5 %, dada la riqueza en pares G + C del DNA de *M. xanthus*. La reacción se llevó a cabo con 1,5 unidades de la polimerasa de DNA *Pfu* (Promega).

La reacción se realizó en un termociclador *Mastercycler Personal* de Eppendorf sometiendo las muestras a un programa que varió según el tamaño del DNA a amplificar y la temperatura de fusión (T_m) de los oligonucleótidos. El primer paso siempre fue una desnaturalización a 95 °C durante 2 minutos, seguido de un número variable de ciclos (25 a 35), cada uno de ellos con un paso de desnaturalización (95 °C, 30 segundos), hibridación (45–65 °C, 30 segundos) y polimerización (72 °C, 1–4 minutos). Tras el último ciclo, se sometieron las muestras a un último paso de polimerización (72 °C, 5 minutos). Los productos de PCR se purificaron con el kit *High PureTM PCR Product Purification Kit* de Roche.

II.9 Mutagénesis dirigida

Para la introducción de mutaciones específicas en el DNA se utilizó la técnica de extensión de productos de PCR solapantes (Ho *et al.* 1989). En un primer paso, se obtienen dos productos de PCR (AB y CD) portadores de la mutación deseada en uno de sus extremos y solapantes para la región mutada. En un segundo paso, los fragmentos AB y CD, previa purificación mediante electroforesis en gel de agarosa, se mezclan en cantidades equimoleculares y se someten a una reacción de extensión y amplificación en presencia de los oligonucleótidos correspondientes a los extremos no solapantes (Figura 31). El producto resultante contiene la mutación de interés. La presencia del cambio deseado y la ausencia de mutaciones adicionales que pudieran haberse incorporado durante el proceso de amplificación se verificó mediante secuenciación del DNA.

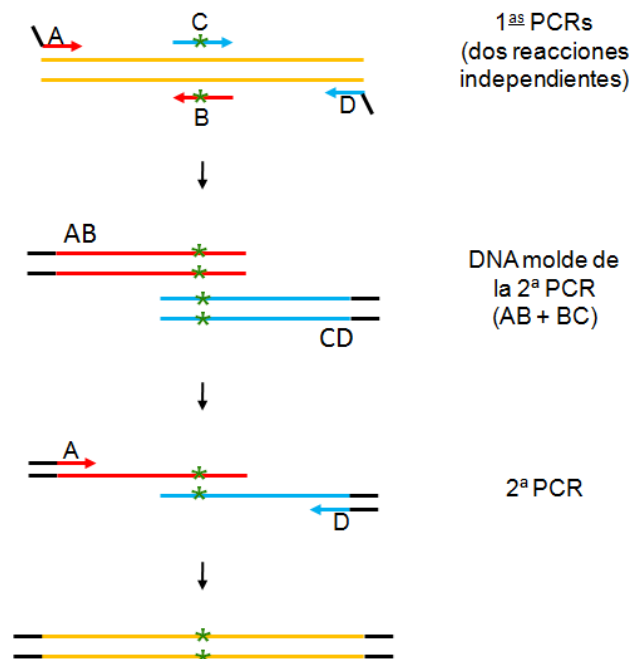


Figura 31. Mutagénesis dirigida mediante extensión de productos de PCR solapantes. Las líneas amarillas paralelas representan el gen original; las flechas rojas los oligonucleótidos A y B, las flechas azules los oligonucleótidos C y D. Los extremos de color negro son las secuencias que contienen los puntos de corte para enzimas de restricción para la posterior clonación del producto resultante. Las líneas rojas y azules paralelas con extremos negros son los productos AB y CD respectivamente, provenientes de las dos primeras reacciones de PCR independientes. Los asteriscos verdes representan las bases que difieren de la secuencia del gen original.

II.10 Obtención de genes quiméricos

La obtención de genes quiméricos se llevó a cabo mediante la técnica de extensión de productos de PCR solapantes (Ho *et al.* 1989) explicada en el apartado anterior y adaptada para el objetivo en cuestión, tal como se ilustra en la Figura 32. Las características de los genes quiméricos obtenidos en este trabajo se detallan en los apartados II.1.1.1 y II.1.2.

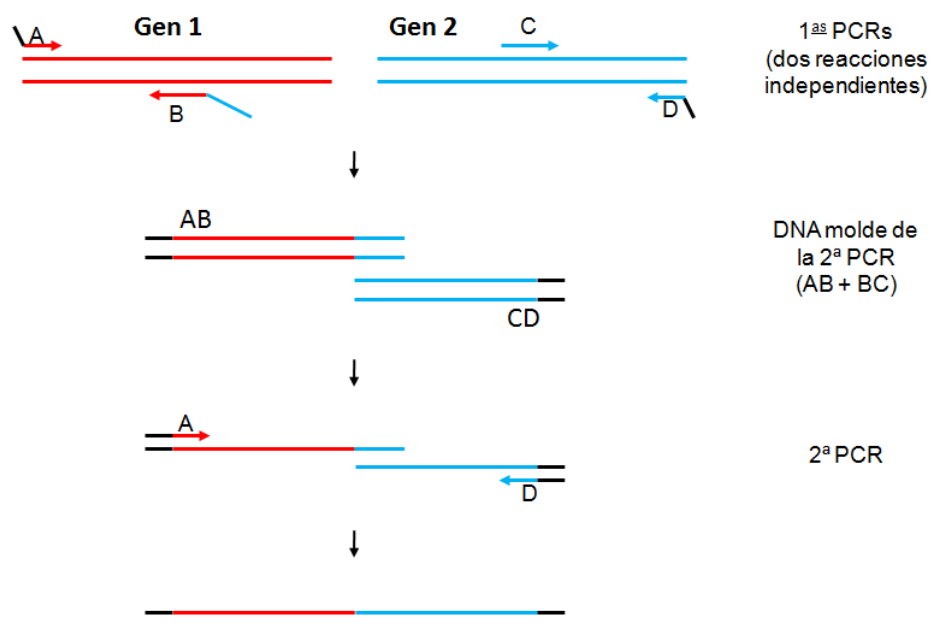


Figura 32. Obtención de genes quiméricos por extensión de productos de PCR solapantes. En líneas de color rojo y azul se representan las secuencias correspondientes a los genes 1 y 2, respectivamente. Los extremos de color negro son las secuencias que contienen los puntos de corte para enzimas de restricción para la posterior clonación del producto resultante.

II.11 Secuenciación del 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 Pure™ PCR Product Purification Kit* de Roche y los plásmidos con el kit de *Minipreps* de *ABI Prism™* de Perkin Elmer. La secuenciación se realizó en el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Murcia (SACE).

II.12 Técnicas electroforéticas

II.12.1 Electroforesis de DNA en gel de agarosa

La separación de fragmentos de DNA se realizó mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa (Pronadisa) de distintas concentraciones, preparados en tampón TAE 1X. El DNA se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio 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 Kit* de Roche.

II.12.2 Electroforesis de DNA en gel de poliacrilamida no desnaturalizante

Este tipo de electroforesis se utilizó para analizar los 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 6 u 8 % de poliacrilamida los componentes utilizados fueron los siguientes:

	Cantidad	
	Gel al 6%	Gel al 8%
Acrilamida:Bisacrilamida 37,5:1 (Fluka)	3 g	4 g
TBE 0,5X	50 ml	
Persulfato amónico 25%	0,133 ml	
TEMED	0,025 ml	

Tras su polimerización, el gel se transfirió a un tanque de electroforesis vertical que contenía tampón TBE 0,5X. Antes de cargar las muestras, el gel se precurrió durante 30 minutos, a un voltaje de 200 V, 30 mA. La electroforesis de las muestras se realizó a un voltaje constante de 200 V durante 1–2 horas. Las posiciones de las bandas se detectaron, tras secar el gel, mediante autorradiografía en película Biomax MS de Kodak (en general, 2 horas de exposición a -70°C fueron suficientes).

II.12.3 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS

La separación de las proteínas presentes en una muestra en función de su tamaño se realizó mediante electroforesis en geles verticales de poliacrilamida-SDS utilizando el equipo Mini-PROTEAN 2 (Bio-Rad) para geles de 0,75 mm de grosor y siguiendo el método de Laemmli, 1970. Los marcadores de tamaño molecular utilizados (*PageRuler Plus Prestained Protein Ladder 10 to 250 kDa*) fueron suministrados por Thermo Scientific. Antes de cargar, las muestras conteniendo tampón de carga se incubaron durante 5 minutos a 100 °C. Para depositarlas en los pocillos se utilizó una microjeringuilla (Hamilton). La electroforesis se realizó a 200 V durante 60 minutos.

II.13 Expresión y purificación de proteínas

II.13.1 Purificación proteínas fusionadas a cola de histidinas

Para la expresión de la proteína TtCarH, CarHCt, QTt1 y QTt2 en *E. coli* se utilizó el sistema pET de Novagen. Los plásmidos pMR3014 (pET15b-TtcarH), pMR3471 (pET15b-TtcarHCt), pMR3371 (pET15b-qTt1), pMR3366 (pET15b-qTt2) se introdujeron en la estirpe BL21(λDE3). Antes de proceder a la purificación de la proteína, se analizó su solubilidad realizando pruebas a pequeña escala con varias colonias transformantes. Para efectuar la purificación, dos colonias de la estirpe transformada se picaron e inocularon en 10 ml de medio líquido LBamp. El cultivo se incubó en agitación a 37 °C y al alcanzar una DO600 = 0,6 se diluyó 1:100 en 10 ml (pruebas de expresión y solubilidad) o en 1 l (purificación) de medio LBamp fresco. Una vez diluido se incubó a 37 °C en agitación. Cuando los cultivos alcanzaron nuevamente una DO600 = 0.6 se añadió IPTG (que quedó a una concentración de 80-100 mM) para estimular la expresión del gen correspondiente y se incubaron toda una noche en agitación a 25 °C. A la mañana siguiente, el precipitado celular se separó por centrifugación en rotor JLA-9.1000 Beckman a 7500 g durante 10 minutos y se almacenó -70 °C. Tras la posterior descongelación a 4 °C, el pellet se resuspendió en tampón A que contenía los inhibidores de proteasas fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y benzamidina, ambos a una concentración de 1 mM. La rotura celular fue realizada por tratamiento con ultrasonido con un sonicador automático Labsonic (B. Braun), aplicando tiempos de sonicación suficientes para conseguir la rotura de la práctica totalidad de las células, detectada por observación microscópica (pruebas de

expresión y solubilidad) o en la prensa French (purificación). El extracto celular se centrifugó (20000 g, 45 minutos) separándose así la parte soluble de la insoluble. La proteína se purificó mediante cromatografía de afinidad utilizando columnas conteniendo la resina TALONTM *metal affinity* (CLONTECH), que consiste en pequeñas bolitas de sefarosa recubiertas de cobalto. La fracción soluble del extracto celular se pasó por la columna, que posteriormente fue sometida a varios lavados con tampón A. Se eluyó a pH neutro con imidazol. Las fracciones obtenidas se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 15% con SDS (SDS-PAGE) y aquellas que contenían >95% H₆-TtCarH, a juzgar por su aspecto en geles de poliacrilamida-SDS, se dializaron con membranas de diálisis *Spectra/Pro Molecularporous MWCO 3500* de Spectrum^R. Una vez dializadas, se reunieron y sometieron a un último paso de purificación en una columna de intercambio iónico MonoS, se concentraron y se guardaron a -70 °C con 50% glicerol.

II.13.2. Expresión y purificación de proteínas mediante el sistema IMPACT-CN

El proceso de purificación de CarA, CarACt (dominio C-terminal de CarA), QTt1, QTt2, TtCarHCt (dominio C-terminal de TtCarH), y TtCarHCt [H177A] se llevó a cabo mediante el sistema IMPACT-CN de New England Biolabs. Para la expresión de las proteínas en *E. coli* se clonaron los genes correspondientes en el vector pTYB12. Los plásmidos resultantes: pMR3451 (pTYB12-*carA*), pMR3522 (pTYB12-*carACt*), pMR3469 (pTYB12-*qTt1*), pMR3470 (pTYB12-*qTt2*), pMR3471 (pTYB12-*TtcarHCt*), pMR3536 (pTYB12-*TtcarHCt* [H177A]), se introdujeron en la estirpe BL21 (λDE3). Antes de proceder a la purificación de la proteína, se realizaron pruebas a pequeña escala con varias colonias transformantes para establecer las condiciones óptimas de expresión y solubilidad. En estos ensayos se observó que las proteínas eran parcialmente solubles solo si se realizaba la sobre-expresión a una temperatura de 18 °C durante aproximadamente 20 horas. Para purificar la proteína, se inocularon 10 ml de LB suplementado con ampicilina con células de la estirpe transformada y se incubaron a 37 °C hasta que el cultivo alcanzó una DO₆₀₀= 0,6. En ese momento, se transfirieron los 10 ml de cultivo a 1 litro de medio LBamp fresco y se incubó a 37 °C hasta alcanzar una DO₆₀₀= 0,6. A continuación, se aclimató el cultivo a 18 °C, manteniéndolo en agitación a esa temperatura durante una hora, y tras ello se indujo la expresión de la proteína con 1mM de isopropil β-D-tiogalactósido (IPTG) durante 20

horas de crecimiento a 18 °C. Las células se recogieron por centrifugación y el precipitado celular se almacenó a -70 °C hasta su utilización.

En la purificación a partir de la fracción soluble todos los pasos que se describen a continuación se realizaron a 4 °C, a menos que se indique lo contrario. El precipitado se descongeló a 4 °C y se resuspendió en 20 ml de tampón B con 500 mM NaCl. Las células, siempre en hielo, se lisaron en una prensa French. El material insoluble se eliminó por centrifugación durante 20 minutos a 13.000 x g, a 4 °C. La fracción soluble se sometió a continuación a una cromatografía de afinidad empleando una resina de quitina-agarosa, previamente equilibrada con 30 ml de tampón de lavado (20 Tris-HCl, pH 8.5, 500 mM NaCl). Tras el paso por la columna, ésta se lavó con 10 volúmenes de tampón B con 1M NaCl para eliminar proteínas unidas inespecíficamente a la resina. A continuación, se añadió a la columna un volumen tal de tampón B (con 500 mM NaCl y 50 mM DTT) que rellenase toda la columna. En ese momento, se interrumpió el flujo y se incubó sin agitación a 16 °C durante 20 h. Tras ese tiempo, se volvió a permitir el flujo, recogándose el eluido que contenía la proteína separada del dominio inteína, que queda unido a la columna. Finalmente se realizó un último paso de purificación por HPLC mediante una columna de intercambio iónico MonoS y/o una columna de exclusión de tamaño Superdex 200. Las fracciones que contenían >95% de la proteínas purificada, a juzgar por el aspecto en geles de poliacrilamida-SDS, se reunieron, se concentraron, y se guardaron a -70 °C con 50% glicerol.

II.14 Ensayos de cambio en la movilidad electroforética (EMSA)

Los fragmentos de DNA de 130 pb (región promotora de *carB*) o de 177 pb (región promotora de *TtcarH*) utilizados en los ensayos de cambio en la movilidad electroforética (EMSA) se obtuvieron mediante amplificación por PCR. Uno de los oligonucleótidos usados en la reacción de PCR se marcó previamente en su extremo 5' con [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP y T4 polinucleótido quinasa (GE Healthcare). Tras la amplificación, el [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP no incorporado se eliminó mediante centrifugación en columna de Sephadex G-25 (DNA Grade, GE Healthcare) y el fragmento de DNA se purificó con el kit *High Pure PCR Product Purification* (Roche). Cuando en los ensayos de EMSA se utilizaron oligonucleótidos, tras el marcaje de uno o de ambos oligonucleótidos complementarios, éstos se hibridaron entre sí. Para ello se preparó una mezcla equimolecular de los dos oligonucleótidos y se introdujo en agua hirviendo durante 2 minutos. A continuación, la

mezcla, aún sumergida en el agua en ebullición, se dejó enfriar lentamente hasta 4 °C durante toda la noche. Una vez hibridados los oligonucleótidos, la mezcla se pasó por una columna de Sephadex G-25.

La reacción de unión se realizó en un volumen de 20 µl que contenía ~1 nM del fragmento de DNA marcado (~13000 cpm), distintas cantidades de proteína y 1 µg de DNA de salmón en un tampón de reacción que contenía 100 mM KCl, 15 mM HEPES, (4 mM Tris pH 7,9, 1 mM DTT, glicerol 10% y 200 ng/µl BSA) suplementado o no con cobalaminas.

Las distintas reacciones se incubaron durante 30 minutos a 30 °C y, salvo que se indique lo contrario, en oscuridad. Las muestras sometidas a iluminación se expusieron de 15 a 300 segundos, a intensidades entre 1 y 10 W/m² y a 405, 465, 520 o 660 nm de longitud de onda con matrices de bombillas LED distribuidas sobre una plataforma de 5 cm x 5 cm en un formato 12x12, con iluminación regulable (fabricadas por Cetoni GmbH). Antes de la adquisición de las matrices LED, las muestras fueron iluminadas con un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse 80i a longitudes de onda centradas en 360 nm (12 W/m²), 438 nm (15 W/m²) y 540 nm (11 W/m²) utilizando los bloques de filtros UV-2E/C, CFP y G-2E/C, respectivamente. Las intensidades luminosas se estimaron utilizando un potenciómetro óptico 1815-C equipado con un detector 818-SL (Newport) en ambos casos.

Tras la incubación, las muestras se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida no desnaturizante a una concentración entre el 6 y el 8%.

II.15. Ensayos de protección frente a digestión por DNasa I

La reacción de unión se realizó en un volumen de 20 µl y en las mismas condiciones descritas para el EMSA, pero usando mayor cantidad de DNA marcado (~45.000 cpm). Tras la incubación de las reacciones a 37 °C, se añadieron 5 unidades de DNasa I (Takara), que se dejó actuar durante 2 minutos a 37 °C antes de detener la reacción a 4 °C con 1 µl de 0,5 M EDTA. Finalmente, el DNA se precipitó con etanol y posteriormente se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante al 6%.

En los ensayos realizados con TtCarH, QTt1 y QTt2 se comparó el patrón de protección en las distintas calles con y sin las proteínas correspondientes y en presencia o ausencia de cobalaminas (a concentración molar cinco veces superior a la de proteína). Las reacciones tuvieron lugar en condiciones de baja intensidad lumínica para evitar la fotólisis de las cobalaminas. Las posiciones de las bandas se detectaron,

tras secar el gel, mediante autorradiografía en película Biomax MS de Kodak (en general, 1 día de exposición a -70°C fue suficiente).

Las reacciones de secuenciación química G + A y C + T utilizadas como marcadores en los experimentos de protección frente a la digestión con DNasa I se realizaron según el método de Maxam y Gilbert (Ausubel *et al.* 1988).

II.16 Expresión del gen *lacZ* en *M. xanthus*

La determinación de la actividad β -galactosidasa en *M. xanthus* se llevó a cabo inicialmente de modo cualitativo y, posteriormente, de modo cuantitativo. Para la determinación cualitativa, tras el crecimiento durante 24–48 horas a 33°C en medio sólido CTT Xgal o CTT Xgal CNB₁₂ y en las condiciones de iluminación deseadas, se observó la intensidad de la coloración azul de las colonias.

Para la determinación de la actividad β -galactosidasa específica de una estirpe, se inoculó ésta en medio líquido CTT más el antibiótico y/o cobalamina correspondiente. Las condiciones concretas de incubación se especifican en cada caso. Cuando el cultivo alcanzó la densidad celular deseada, se tomó una muestra. Para ello, se centrifugó 1–1,5 ml de cultivo, las células se resuspendieron en tampón Z y se almacenaron a -70°C . Antes de realizar el ensayo, las muestras se descongelaron en agua a temperatura ambiente. La rotura de las células se realizó mediante tratamiento con SDS/cloroformo (Griffith y Wolf 2002). El ensayo de actividad β -galactosidasa se realizó según Miller, 1972, empleando 50–75 μl del extracto celular. La concentración de proteínas se midió según Lowry *et al.*, 1951. La actividad específica de β -galactosidasa se expresa en nanomoles de o-nitrofenol (generado por la rotura enzimática del sustrato ONPG) producidos por minuto y miligramo de proteína. 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:

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

donde 213 es el coeficiente de extinción del o-nitrofenol y convierte la densidad óptica medida a 420 nm en los ensayos de actividad en nanomoles de o-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. Las medidas se realizaron en un lector de microplacas de 96 pocillos *Spectra max 340 PC 384* de Molecular Devices^R

II.17. Cromatografía de filtración en gel

La cromatografía de filtración en gel se realizó con un equipo de HPLC AKTA y una columna de Superdex200 (GE Life Sciences), para la separación por exclusión de tamaños, equilibrada con una solución de 150 mM NaCl, 50 mM tampón fosfato, pH 7.5, y 2 mM de β -mercaptoetanol. La columna se calibró con los siguientes estándares (Sigma-Aldrich): aprotinina (6.5 kDa), citocromo C (12.4 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), BSA (66 kDa), alcohol deshidrogenasa de levadura (150 kDa), β -amilasa (200 kDa), azul dextrano (2 MDa, para determinar el volumen de vacío V_0), y vitamina B₁₂ (1.35 kDa, para estimar el volumen total). La curva de calibración obtenida fue: $\log M_r = 7.885 - 0.221V_e$, donde M_r es el peso molecular aparente y V_e es el volumen de elución. La proteína (100 μ L; 45-165 μ M), pura o incubada con cobalaminas a una concentración molar 5 veces superior durante al menos 15 min en oscuridad, se inyectó en la columna o fue sometida a iluminación antes de la inyección. Las muestras de proteínas iluminadas se irradiaron durante 5 minutos en tubos de 1,5 ml con luz blanca (12 W/m²) o roja (13 W/m²), o con luz de longitudes de onda centradas en 360 nm (12 W/m²), 438 nm (15 W/m²) y 540 nm (11 W/m²) utilizando un microscopio de epifluorescencia o con longitudes de onda de 405, 465, 520 o 660 nm a intensidades entre 1 y 10 W/m² usando bombillas LED (véase apartado II.14).

El seguimiento de la tasa de elución (0.4 mL/min) se realizó midiendo la absorbancia a 280, 361 y 522 nm. Los M_r correspondientes a los picos obtenidos se determinaron a partir de su V_e . La identidad de las proteínas en los picos de elución se comprobó por SDS/PAGE. El M_r y el error utilizados corresponden, respectivamente, a la media de un mínimo de tres medidas independientes y al SEM (Standard Error of the Mean). La concentración de proteína en los picos fue estimada por el ensayo de BioRad y la de AdoB₁₂ por absorbancia a 522 nm.

III. RESULTADOS

III. 1 Caracterización de CarA y CarH

Como se mencionó en la *Introducción*, la mayoría de los genes estructurales implicados en la carotenogénesis se agrupan en el operón *carB*, cuya expresión es fotoinducible. El promotor de *carB* (P_B) está regulado negativamente en oscuridad por CarA (McGowan *et al.* 1993; López-Rubio *et al.* 2002; Pérez-Marín *et al.* 2004; Navarro-Avilés *et al.* 2007; León *et al.* 2010) y CarH (Pérez-Marín *et al.* 2008), y se activa en luz por la acción antagonista de CarS (Whitworth y Hodgson 2001; López-Rubio *et al.* 2002). Tanto CarA como CarH presentan un dominio N-terminal de unión al DNA similar al de las proteínas tipo MerR, con un plegamiento denominado "winged helix" constituido por un motivo "hélice-giro-hélice" seguido de dos alas (Navarro-Avilés *et al.* 2007). La señal de identidad de ambas proteínas es la presencia de un dominio C-terminal con un motivo de unión a B_{12} que, hasta el descubrimiento de CarA y CarH, solo se había observado en enzimas que utilizan la vitamina como cofactor, tales como la sintetasa de metionina de *E. coli* (Cervantes y Murillo 2002; López-Rubio *et al.* 2002; Pérez-Marín *et al.* 2008).

Varios estudios previos del grupo han permitido descifrar el modo de acción molecular del represor CarA y de su antirrepresor CarS (López-Rubio *et al.* 2002; López-Rubio *et al.* 2004; Pérez-Marín *et al.* 2004; Navarro-Avilés *et al.* 2007). Así, se ha demostrado que CarA se une *in vitro* a un operador bipartito en P_B y que dicha unión bloquea la entrada de la polimerasa de RNA al promotor. CarS, que adopta una estructura similar al operador, es capaz de unirse a la hélice de reconocimiento del DNA situada en el dominio N-terminal de CarA, y provocar el desmantelamiento de los complejos CarA-DNA (Figura 5). Aunque *in vitro* CarA se une a B_{12} , como cabría esperar de la presencia de un motivo de unión a cobalaminas en su dominio C-terminal, ni *in vivo* ni *in vitro* se requiere la vitamina para que ocurra la represión de P_B por CarA o la antirrepresión por CarS (Pérez-Marín *et al.* 2008).

Inicialmente, la función represora de CarH pasó desapercibida ya que su delección no da lugar a ningún fenotipo apreciable si CarA está presente (Cervantes y Murillo 2002). Fue el hallazgo inesperado de que una estirpe portadora de una delección de *carA* recuperaba el fenotipo silvestre en presencia de B_{12} lo que llevó al descubrimiento de CarH que, como CarA, es capaz de reprimir P_B , pero lo hace de manera dependiente de B_{12} (Pérez-Marín *et al.* 2008). Entender la base molecular de la diferencia entre CarA y CarH en cuanto a su dependencia de B_{12} , determinar qué forma de la vitamina está implicada y averiguar si existe algún vínculo entre la vitamina y la respuesta a la luz han sido los objetivos principales de este trabajo.

III.1.1 La dependencia de B₁₂ reside en un módulo autónomo

Una primera aproximación para abordar el estudio de la diferencia funcional entre CarA y CarH consistió en sustituir el dominio C-terminal de CarA por el de CarH, ambos con un motivo de unión a B₁₂, y analizar el comportamiento de la proteína resultante en cuanto a su dependencia o no de B₁₂. En la Figura 33 se muestra el alineamiento de las secuencias de CarA y CarH (también se incluye la proteína homóloga de *T. thermophilus*, TtCarH; véase más adelante), con los dominios N y C-terminales y la región conectora demarcados.

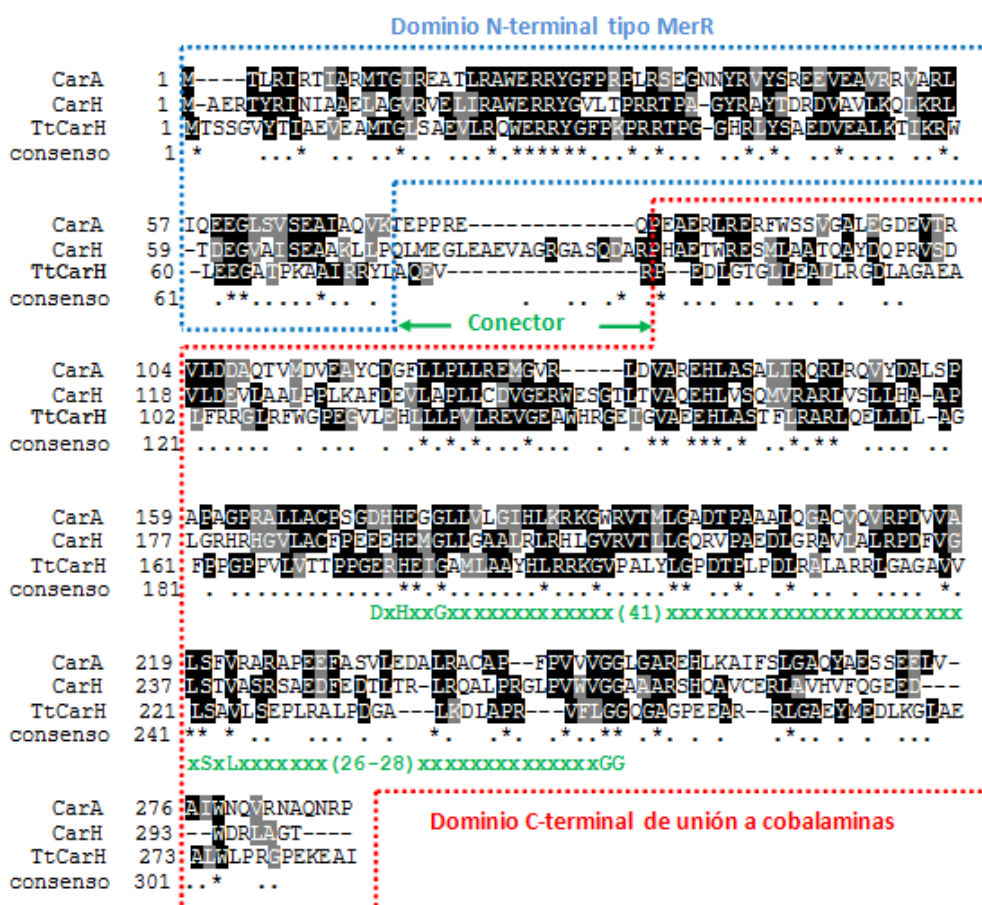


Figura 33. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de CarA, CarH y TtCarH. Los residuos idénticos están sombreados en negro y los que son similares en al menos dos secuencias alineadas en gris. En la línea denominada "consenso" se marcan con un asterisco los residuos conservados en las tres secuencias y con un punto los presentes en dos de ellas. La línea discontinua azul bordea el segmento que corresponde al dominio N-terminal y la roja el segmento del dominio C-terminal. En la región C-terminal se señalan en verde los aminoácidos de la secuencia consenso de unión a cobalaminas. La región conectora está marcada por dos flechas opuestas de color verde.

Para ello, se generaron los genes quiméricos, *q1* y *q2*, mediante el método de la PCR solapante (véase Apartado II.10). Los productos génicos correspondientes, Q1 y Q2,

estarían compuestos por el dominio N-terminal de CarA, unido al dominio C-terminal de CarH por el conector de CarA (Q1) o por el de CarH (Q2), que es más largo (Figura 34).

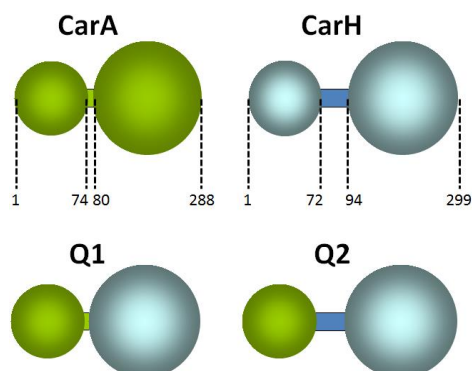


Figura 34. Esquema de CarA y CarH, y de las quimeras Q1 y Q2. Los dominios N- (de menor tamaño y a la izquierda) y C-terminales (más grandes y a la derecha) se representan como esferas, y que aparecen unidas por las regiones conectoras. En las quimeras, los colores asignados a los dominios se corresponden con los de las proteínas de origen.

Ambos genes se clonaron, para su expresión constitutiva, aguas abajo de P_3 , uno de los promotores ribosómicos en tándem de *M. xanthus*, ya utilizado previamente para expresar *carA* o *carH* y complementar su falta de función en *M. xanthus* (Pérez-Marín et al. 2008). El vector de clonación utilizado incluye además un gen marcador de resistencia a kanamicina (Km^R), un origen de replicación de *E. coli* y una región de 1,38 kb (comprendida entre las posiciones 8498672 y 8500048 del genoma de *M. xanthus*), que carece de actividad promotora, para la integración cromosómica por recombinación homóloga (Figura 35). Los plásmidos resultantes de la clonación se introdujeron, por electroporación y selección del carácter Km^R , en la estirpe $\Delta carA \Delta carH$ (MR1716), para evitar así que la función de las proteínas quiméricas pudiera quedar enmascarada por la de las proteínas endógenas CarA y CarH.

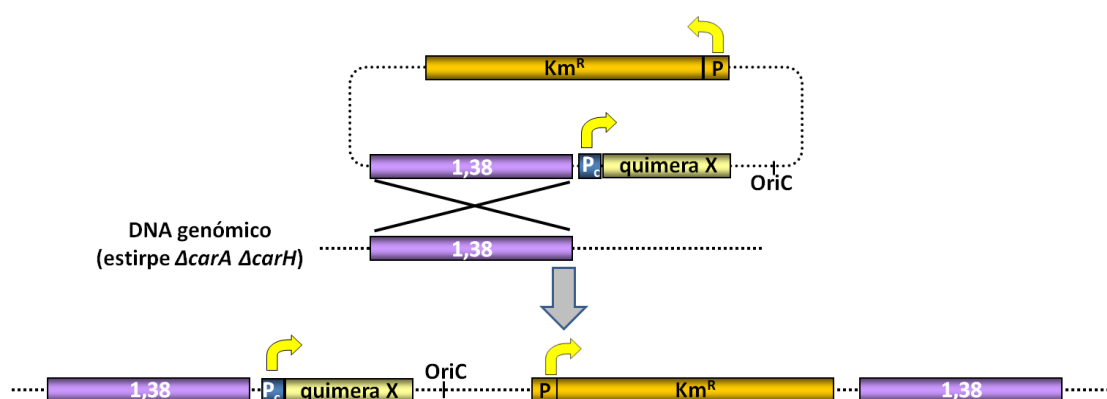


Figura 35. Representación esquemática del plásmido utilizado para la clonación de los genes quiméricos y su introducción en *M. xanthus*. P_C : promotor constitutivo (P_3). 1,38: región de 1.38 kb para la integración genómica del plásmido. P , Km^R : gen de resistencia a kanamicina con su promotor. $OriC$: origen de replicación para *E. coli*.

La incapacidad de *M. xanthus* de sintetizar B₁₂ ha facilitado los estudios sobre la dependencia o no de B₁₂, pues basta con suplementar o no el medio de cultivo con cianocobalamina (CNB₁₂) para realizar dichos análisis. Aunque se desconocen los detalles moleculares sobre cómo ocurre en *M. xanthus*, dicha cobalamina debe ser transportada al interior celular y transformada a cualquiera de las dos formas metabólicamente activas de la vitamina, MeB₁₂ o AdoB₁₂. Así, una vez obtenidos los electroporantes que expresan las quimeras Q1 o Q2 en fondo genético $\Delta carA \Delta carH$, se estudió su fenotipo tras 48 horas de incubación en presencia o ausencia de luz en medios suplementados o no con CNB₁₂ (según lo indicado en II.2). Como se muestra en la Figura 36, la estirpe $\Delta carA \Delta carH$, incapaz de reprimir P_B, muestra una coloración naranja en la oscuridad haya o no B₁₂ en el medio, debido a la expresión constitutiva del operón *carB*. En la luz, su coloración se vuelve roja debido a la expresión a niveles altos no solo de *carB* sino también de *crtIb*. Las estirpes que expresan las proteínas Q1 y Q2 mostraron el mismo fenotipo que la estirpe $\Delta carA$, presentando una coloración naranja en oscuridad y ausencia de la vitamina, que pasó a amarillo en presencia de B₁₂, y a rojo en la luz tanto en ausencia como en presencia de B₁₂ (Figura 36). Que la represión de la carotenogénesis por las quimeras Q1 y Q2 requiera B₁₂ permite concluir que la dependencia de B₁₂ reside en el dominio C-terminal de CarH. Así, basta con reemplazar el dominio C-terminal de CarA por el de CarH, vaya o no acompañado de la región conectora de CarH, para que la función de CarA sea dependiente de B₁₂.

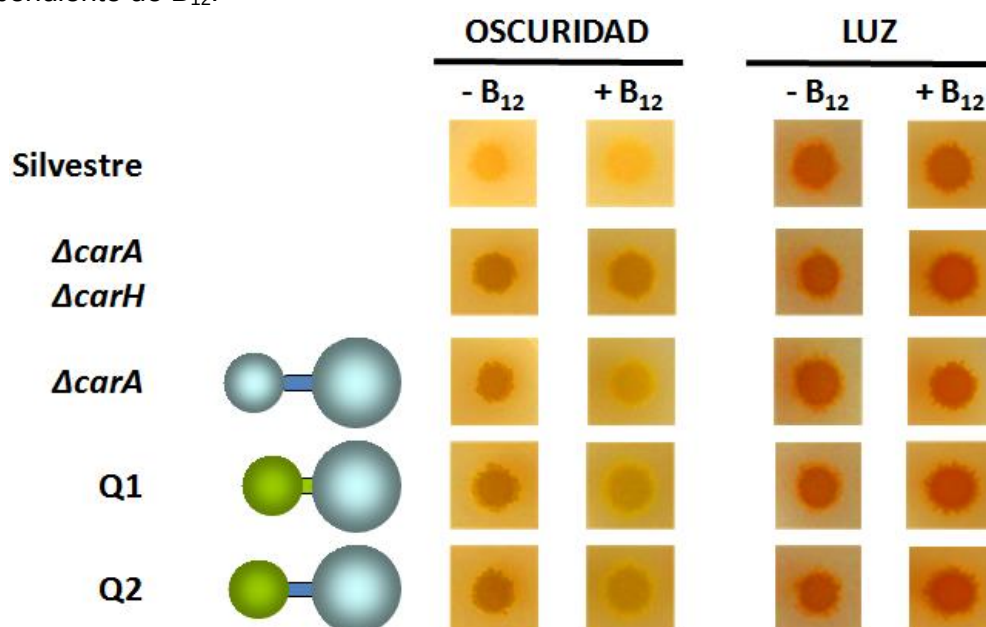


Figura 36. Fenotipos de la estirpe silvestre, de los mutantes $\Delta carA \Delta carH$ y $\Delta carA$, y de las estirpes portadoras de CarH, Q1 y Q2 en fondo genético $\Delta carA \Delta carH$. Las diferentes proteínas se representan con sus dominios (el N-terminal a la izquierda) unidos por la región conectora, correspondiendo el color verde a regiones procedentes de CarA y el azul a CarH. Gotas de 5 μ l de cultivos de las diferentes estirpes mostradas se depositaron en medio suplementado o no con 1 μ M de CNB₁₂ y se incubaron en oscuridad o luz.

Una vez establecido que la dependencia de B₁₂ reside en el módulo C-terminal de CarH nos propusimos estudiar la base molecular de dicha dependencia mediante ensayos *in vitro*, utilizando para ello la proteína purificada. Previamente, se habían expresado en forma soluble y purificado con éxito CarA, los dominios N- y C-terminal de CarA (CarANt y CarACt, respectivamente) y el dominio N-terminal de CarH (CarHNt). Sin embargo, los diversos intentos de obtener la proteína CarH o su dominio C-terminal (CarHCt) en forma soluble y activa resultaron infructuosos, lo que ha impedido el análisis directo de su dependencia de B₁₂ *in vitro*.

Como se mencionó anteriormente, existe una proteína homóloga a CarA/CarH en *T. thermophilus*. Las proteínas de los organismos termófilos suelen ser solubles, de fácil purificación y asequibles para los estudios bioquímicos y estructurales. Si la proteína de *T. thermophilus* resultase, como CarH, dependiente de B₁₂, su estudio podría ayudar a descifrar la base molecular de dicho comportamiento. En estudios previos del grupo no se observó complementación de la falta de *carA* ni de *carH* cuando se introdujo el gen homólogo en *M. xanthus*. Dado que los genomas de *M. xanthus* y *T. thermophilus* tienen contenidos parecidos de GC (69-70%) y es, por tanto, probable que tengan un uso de codones similar, cabe pensar que la falta de complementación no se deba a una falta de expresión del gen homólogo en *M. xanthus*, sino más bien a un problema de reconocimiento de la secuencia operadora de P_B por la proteína de *T. thermophilus*. Por ello, en este trabajo se construyeron dos quimeras, QTt1 y QTt2, que presentan el dominio C-terminal de la proteína de *T. thermophilus* fusionado a CarANt y CarHNt, respectivamente, manteniendo las regiones conectoras propias de cada dominio N-terminal (Figura 37).

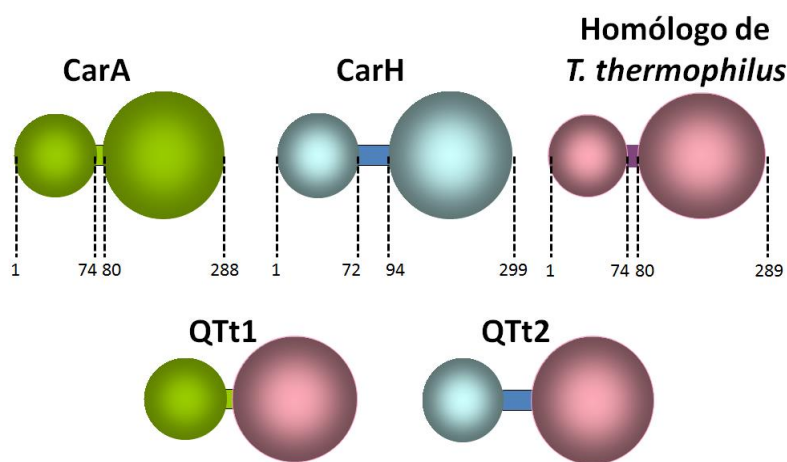


Figura 37. Esquema de la arquitectura de dominios de CarA y CarH, de la proteína homóloga de *T. thermophilus*, y de las quimeras QTt1 y QTt2. Los dominios N- (de menor tamaño y a la izquierda) y C-terminales (más grandes y a la derecha) se representan como esferas, unidas por las regiones conectoras. Los colores de cada parte de las proteínas quiméricas coinciden con los de sus proteínas de origen.

Los genes quiméricos se clonaron en el plásmido descrito anteriormente (Figura 35) y se introdujeron por electroporación en la estirpe $\Delta carA \Delta carH$. El color

aranja mostrado por las estirpes que expresan QTt1 y QTt2 en medio sin B₁₂ y oscuridad se tornó amarillo en presencia de B₁₂, lo que demuestra que las dos quimeras son capaces de funcionar como CarH (Figura 38). Por tanto, el dominio C-terminal de la proteína homóloga de *T. thermophilus*, ya sea unido al dominio de unión al DNA de CarA o de CarH, confiere la misma actividad dependiente de B₁₂ *in vivo* que el propio CarHct. Debido a que su comportamiento se asemeja más al de CarH que al de CarA, hemos denominado TtCarH al homólogo de *T. thermophilus*.

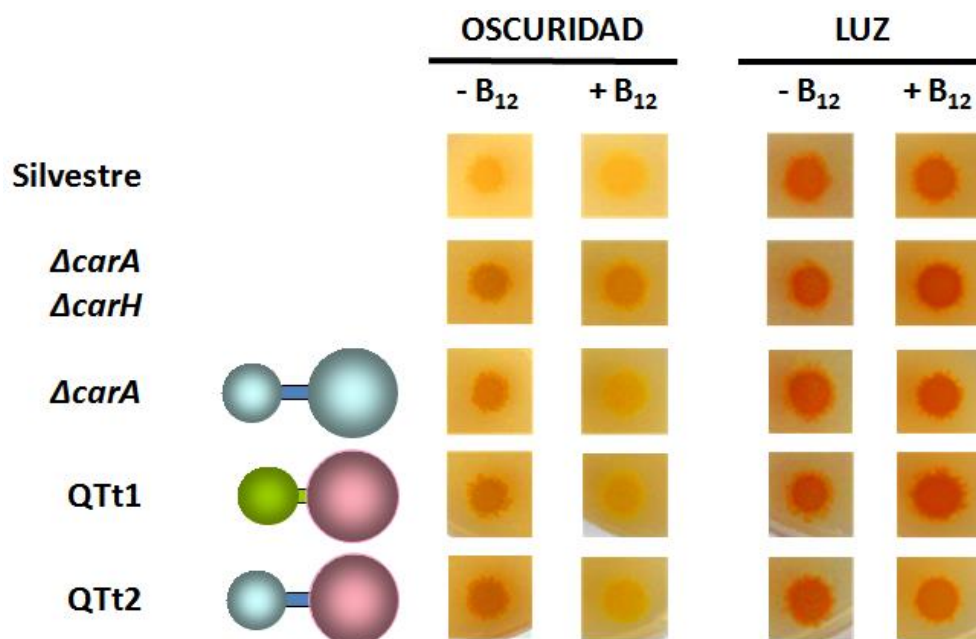


Figura 38. Fenotipos de la estirpe silvestre, de los mutantes $\Delta carA$ $\Delta carH$ y $\Delta carA$, y de las estirpes portadoras de QTt1 y QTt2 en fondo genético $\Delta carA$ $\Delta carH$. Las diferentes proteínas se representan con sus dominios en forma de esferas (correspondiendo la más pequeña al dominio N-terminal) unidas por las regiones conectoras. Las partes de las proteínas procedentes de CarA, CarH y TtCarH se muestran en color verde, azul y morado, respectivamente. Gotas de 5 μ l de cultivos de las diferentes estirpes mostradas se depositaron en medio suplementado o no con 1 μ M de CNB₁₂ y se incubaron en oscuridad o luz.

Una vez establecido que QTt1 y QTt2 se comportan como CarH, se procedió a la expresión de las dos quimeras en un sistema heterólogo para su posterior purificación (Apartado II.13), que fue relativamente sencilla, pues se expresaron en forma soluble. Con las proteínas quiméricas purificadas se realizaron ensayos de unión al operador de P_B *in vitro* en ausencia y presencia de diferentes formas de cobalamina. En estudios previos se había determinado que CarA se une cooperativamente al operador: primero a un sitio palindrómico de alta afinidad (pI) situado aguas arriba de P_B, y luego a otro sitio de baja afinidad (pII) que solapa con la región - 35 de P_B para bloquear el acceso a la polimerasa de RNA (López-Rubio *et al.* 2004). Ambos sitios se encuentran incluidos en un fragmento de 130 pb que se ha venido utilizando para estudiar la unión de CarA al DNA. En los ensayos de cambio en

la movilidad electroforética (EMSA), la unión cooperativa de CarA a su operador se manifiesta por la rápida conversión de una banda retrasada inferior, que representa la formación del denominado complejo I (CI), en otra banda superior (complejo II o CII), a medida que aumenta la concentración de CarA (Figura 39).

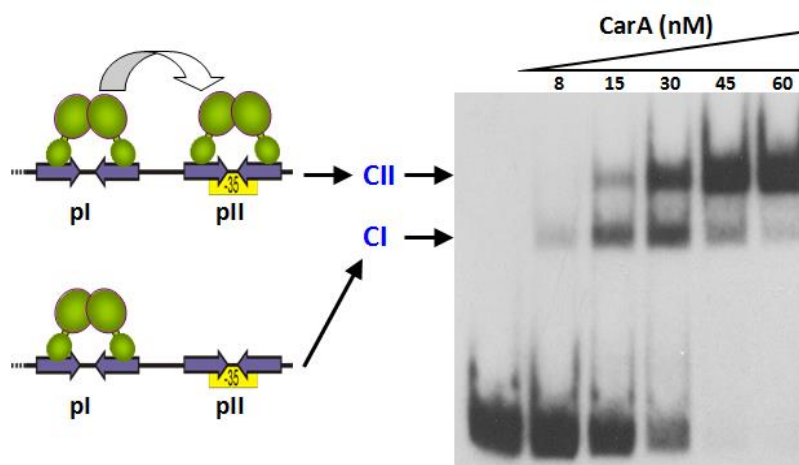


Figura 39. Ensayo de EMSA con el fragmento de 130 pb a concentraciones crecientes de CarA (derecha). A la izquierda, se representa la unión de CarA a los palíndromos pI y pII del operador de P_B para formar los complejos CI y CII.

Cuando se analizó la unión de QTt1 al fragmento de 130 pb mediante EMSA se observó que, a pesar de tener el mismo dominio de unión al DNA que CarA, QTt1 se unía al operador con una afinidad considerablemente inferior (Figura 40). Así, incluso a una concentración 15 veces superior a la utilizada con CarA, solo se observó la formación de dos bandas difusas en lugar de la única banda, de movilidad inferior y bien definida, que aparece con CarA. Esta diferencia, que debe residir en los diferentes dominios C-terminales de ambas proteínas, probablemente refleja que QTt1 no se une de forma cooperativa al operador de P_B en las condiciones ensayadas. Aún más baja fue la afinidad de QTt2 por el operador, que mostró una unión al DNA apenas perceptible incluso a altas concentraciones de proteína (Figura 40). Que QTt2 se una con menor afinidad al operador que QTt1 es probable que se deba a las diferencias de afinidad de sus respectivos dominios de unión al DNA, pues CarHnt presenta una afinidad intrínseca por el operador significativamente inferior a la de CarAnt (Pérez-Marín *et al.* 2008).

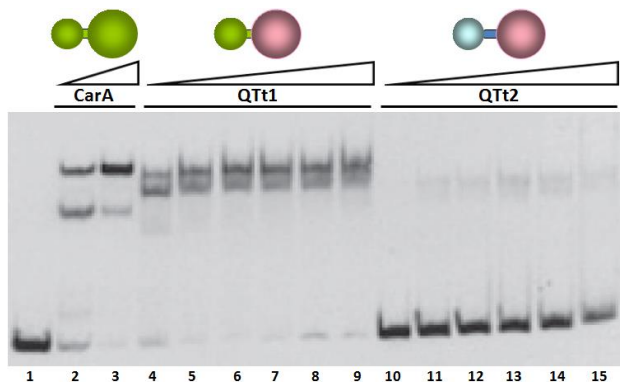


Figura 40. EMSA con QTt1 y QTt2 en ausencia de cobalaminas. Calle 1: DNA libre (fragmento de 130 pb); calle 2 y 3: DNA + CarA a 20 y 40 nM, respectivamente; calle 4 a 9: DNA + QTt1 a 30, 60, 110, 220, 450 y 900 nM, respectivamente; calle 10 a 15: DNA + QTt2 a 30, 60, 110, 220, 450 y 900 nM, respectivamente.

Puesto que en los estudios *in vivo* tanto QTt1 como QTt2 requirieron B₁₂ para reprimir P_B, a continuación se comprobó si alguna de las formas de la cobalamina afectaba a su interacción con el DNA *in vitro*. Dado que las cobalaminas son fotosensibles (Bond CM *et al.* 1972; Chen y Chance 1990; Schwartz y Frey 2007), estos ensayos se realizaron en condiciones de baja iluminación. Ni la MeB₁₂, ni la CNB₁₂ afectaron a la afinidad de QTt1 o QTt2 por su operador (Figura 41). Tampoco la hemina que es capaz de unirse al motivo de unión a cobalaminas de ciertas proteínas implicadas en la detección de luz y de los niveles redox (Han Y. *et al.* 2007; Moskvina *et al.* 2007; Moskvina *et al.* 2010), tuvo ningún efecto sobre la unión de QTt1 o QTt2 al operador (Figura 42).

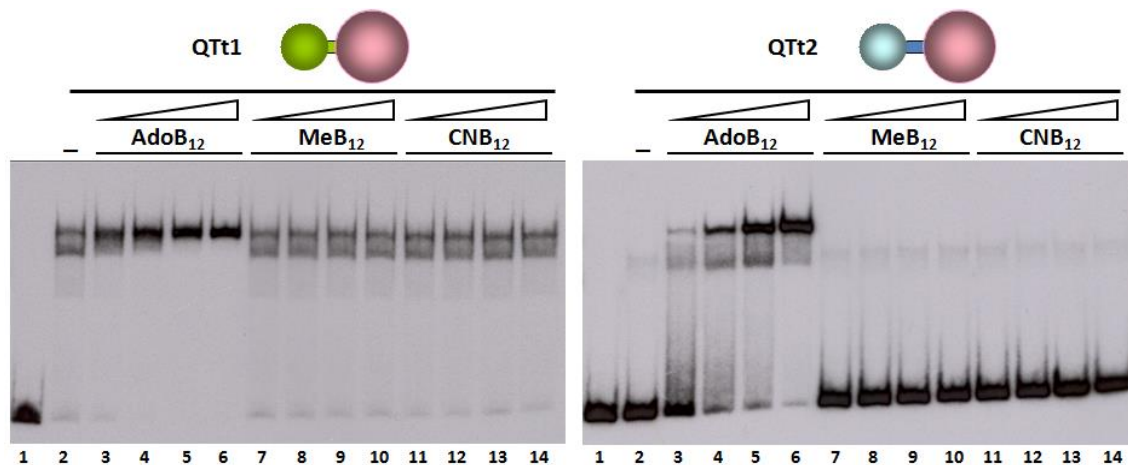


Figura 41. Efecto de las diferentes cobalaminas en la unión de QTt1 y QTt2 al DNA *in vitro*. Ensayos de cambio en la movilidad electroforética con QTt1 (izquierda) y QTt2 (derecha) (20 nM). Calle 1: DNA libre (fragmento de 130 pb); calle 2: DNA + QTt1/QTt2; calle 3 a 6: DNA + QTt1/QTt2 + AdoB₁₂ a 16, 31, 63 y 125 nM respectivamente; calle 7 a 10: DNA + QTt1/QTt2 + MeB₁₂ a 16, 31, 63 y 125 nM respectivamente; calle 11 a 14: DNA + QTt1/QTt2 + CNB₁₂ a 16, 31, 63 y 125 nM respectivamente.

Por el contrario, la presencia de AdoB₁₂ en la reacción tuvo un efecto notable en la unión de QTt1 y, aún todavía más llamativo, de QTt2, al operador de P_B. Así, en presencia de AdoB₁₂ se observó un único complejo, bien definido, y de movilidad

similar a la del complejo CII formado por CarA, quedando una cantidad apenas apreciable de DNA libre (Figura 41). Como cabía esperar de los resultados obtenidos *in vivo*, la unión de CarA al DNA *in vitro* no se vio afectada por la presencia de ninguna de las tres formas de cobalamina (Figura 43).

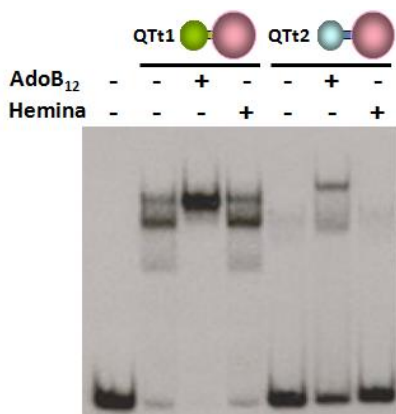


Figura 42. Efecto de la hemina en la unión de Qtt1 y Qtt2 al DNA *in vitro*. EMSA con el fragmento de 130 pb y Qtt1 o Qtt2 (25 nM) en oscuridad y en presencia o ausencia de 100 nM de AdoB₁₂ o hemina.

En los ensayos de protección frente a digestión por DNasa I (Apartado II.15), CarA protege de la digestión una región del operador que se extiende desde la posición -19 hasta la -70 respecto del sitio de inicio de la transcripción (López-Rubio *et al.* 2004). Además, aparecen dos hipersensibilidades, en las posiciones -55 y -77, que reflejan posibles distorsiones del DNA ocasionadas por la unión de la proteína (Craig *et al.* 1995).

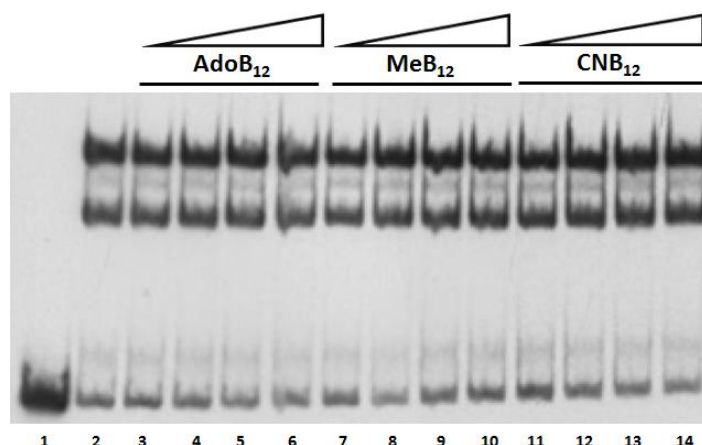


Figura 43. Efecto de las cobalaminas en la unión de CarA al DNA *in vitro*. EMSA realizado con CarA (20 nM). Calle 1: DNA libre (fragmento de 130 pb); calle 2: DNA + CarA; calles 3 a 6: DNA + CarA + AdoB₁₂ a una concentración de 16, 31, 63 y 125 nM, respectivamente; calles 7 a 10: DNA + CarA + MeB₁₂ a una concentración de 16, 31, 63 y 125 nM, respectivamente; calles 11 a 14: DNA + CarA + CNB₁₂ a una concentración de 16, 31, 63 y 125 nM, respectivamente.

Para determinar si el patrón de unión de Qtt1 y Qtt2 al fragmento de 130 pb se asemeja al establecido previamente para CarA, se realizaron ensayos de protección frente a la digestión con DNasa I. Como se observa en la Figura 44, la presencia de AdoB₁₂ favoreció la aparición de una región protegida por Qtt1, que presentó un patrón idéntico al observado para CarA tanto en su extensión como en la aparición de dos sitios hipersensibles, en las posiciones -55 y -63. En presencia de

QTt2 y AdoB₁₂ se observó un patrón de digestión similar al producido por CarA y QTt1, salvo por la presencia de dos sitios hipersensibles adicionales, en las posiciones -34 y -45, que reflejan posibles diferencias de unión al DNA entre CarANT (en QTt1) y CarHnt (en QTt2) (Figura 44). En conjunto, todos estos datos demuestran que la AdoB₁₂ promueve la unión de QTt1 y QTt2 *in vitro* al mismo operador que CarA.

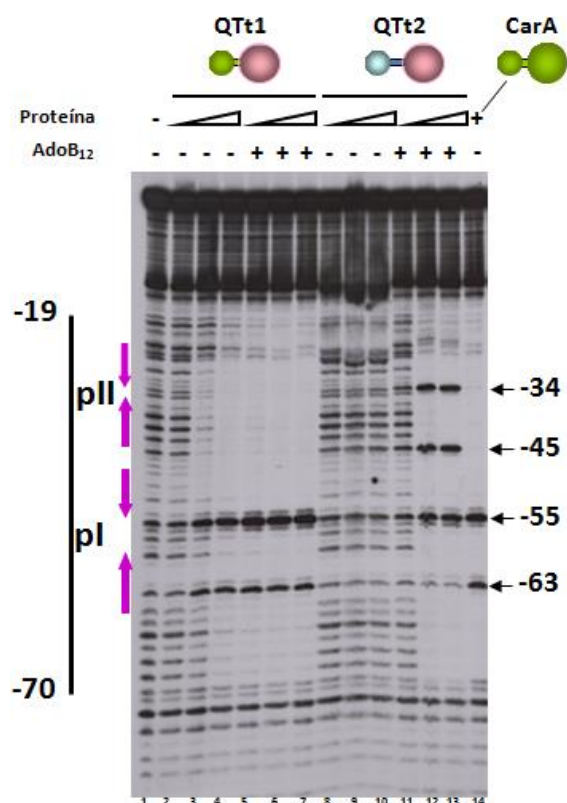


Figura 44. Efecto de la presencia de AdoB₁₂ en la unión de QTt1 y QTt2 al DNA *in vitro*. Ensayo de protección frente a la digestión por DNasa I con el fragmento de DNA de 130 pb y QTt1 o QTt2 en presencia o ausencia de AdoB₁₂. La proteína fue añadida a concentraciones crecientes, de izquierda a derecha: 16, 31, 63 y 125 nM; la AdoB₁₂ se añadió a una concentración 5 veces superior a la de la proteína.

III.1.3 La AdoB₁₂ es esencial para la represión de P_B mediada por CarH *in vivo*

Si la AdoB₁₂ es la forma de la vitamina utilizada por CarH *in vivo*, como sugieren los estudios *in vitro* descritos en el apartado anterior con las quimeras portadoras del dominio C-terminal de TtCarH, el bloqueo de la síntesis de AdoB₁₂ debería eliminar la represión del operón *carB* por CarH. Aunque *M. xanthus* carece de las enzimas necesarias para la síntesis *de novo* de cobalaminas, sí posee un gen que determina una enzima ATR (ATP:corrinoide adenosiltransferasa) de tipo *pduO* (locus YP_634078.1), homólogo del gen *pduO* de *Salmonella* y de otros organismos, incluyendo los humanos (Figura 45). Como se mencionó en la *Introducción*, estas enzimas están implicadas en la síntesis de AdoB₁₂ a partir de otras formas de cobalamina presentes en el medio, tales como la CNB₁₂ (Johnson *et al.* 2001; Yamanishi *et al.* 2005; Mera y Escalante-Semerena 2010). La eliminación de la actividad ATR debería, por tanto, ir asociada a la imposibilidad de sintetizar AdoB₁₂ a

partir de la CNB₁₂ suministrada en el medio de cultivo. Por ello, se generó una delección completa y en fase del gen *pduO* en un fondo genético $\Delta carA$ (evitando así que la actividad de CarH fuera enmascarada por CarA). A pesar de la presencia de CarH, la estirpe carente de *carA* y *pduO* (MR2075) mostró color naranja en oscuridad (y, por tanto, expresión constitutiva de *carB*) tanto en ausencia como en presencia de CNB₁₂ (o MeB₁₂) en el medio, lo que demuestra que la AdoB₁₂ es la forma de la vitamina requerida por CarH para reprimir P_B *in vivo* (Figura 46). Tampoco se observó represión de P_B en medio suplementado con AdoB₁₂, sugiriendo que dicha cobalamina debe perder el grupo adenosilo, bien durante el transporte al interior de la célula, bien una vez dentro y no es, por tanto, capaz de rescatar la falta de actividad ATR.

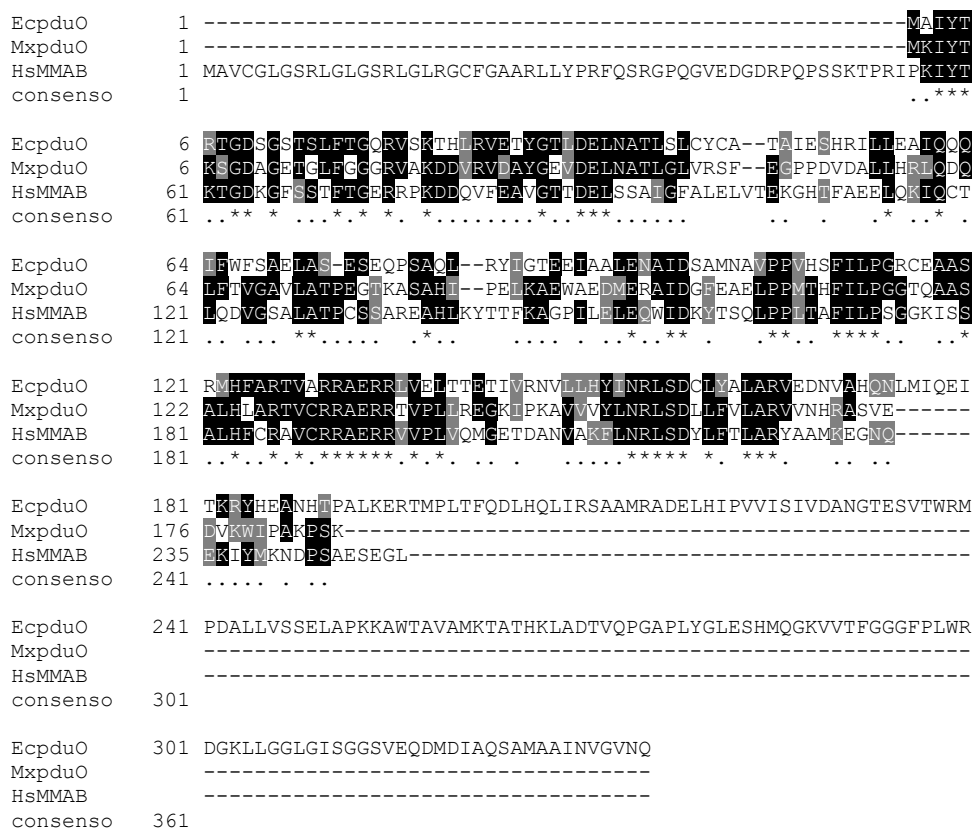


Figura 45. Alineamiento de la secuencia de PduO de *M. xanthus* (MxPduO) con su homólogo en humanos (HsMMAB) y *E. coli* (EcPduO). Los códigos de acceso de NCBI para las proteínas de *E. coli*, *M. xanthus* y *Homo sapiens* son CAJ87624, ABF90014, y NP_443077, respectivamente. Los residuos idénticos están sombreados en negro y los similares en al menos dos de las secuencias en gris. Aquellos que se conservan en las tres secuencias están marcados con un asterisco en la línea "consenso". El dominio N-terminal de aproximadamente 185 residuos de la PduO de *E. coli*, de mayor tamaño, es suficiente para su actividad ATR (Johnson *et al.* 2004). Este dominio es similar en secuencia a la proteína humana, más pequeña, cuya actividad ATR se ha demostrado *in vitro* (Leal *et al.* 2004) y a la de *M. xanthus*.

Para comparar los niveles de expresión de *carB* en la estirpe $\Delta carA \Delta pduO$ en ausencia y presencia de B_{12} , se midió la actividad de P_B *in vivo* mediante la introducción del gen chivato *lacZ* en *carB*. Para ello, se purificó DNA genómico de MR1742, una estirpe de *M. xanthus* con una inserción del transposón Tn5-*lac*-132 (portador de una sonda *lacZ* y un gen de resistencia a la tetraciclina) al principio del operón *carB* (la denominada inserción $\Omega MR418$) en fondo $\Delta carA \Delta carH$. En dicha estirpe, la expresión del gen chivato *lacZ* se encuentra bajo el control del promotor P_B . El DNA genómico se utilizó para electroporar la estirpe portadora de la doble delección $\Delta carA \Delta pduO$, y en medio selectivo con tetraciclina se seleccionaron los transformantes (Figura 47). Las colonias resultantes de la integración de la sonda por recombinación homóloga en *carB* son Car^- , ya que el operón queda interrumpido tras la integración del transposón.

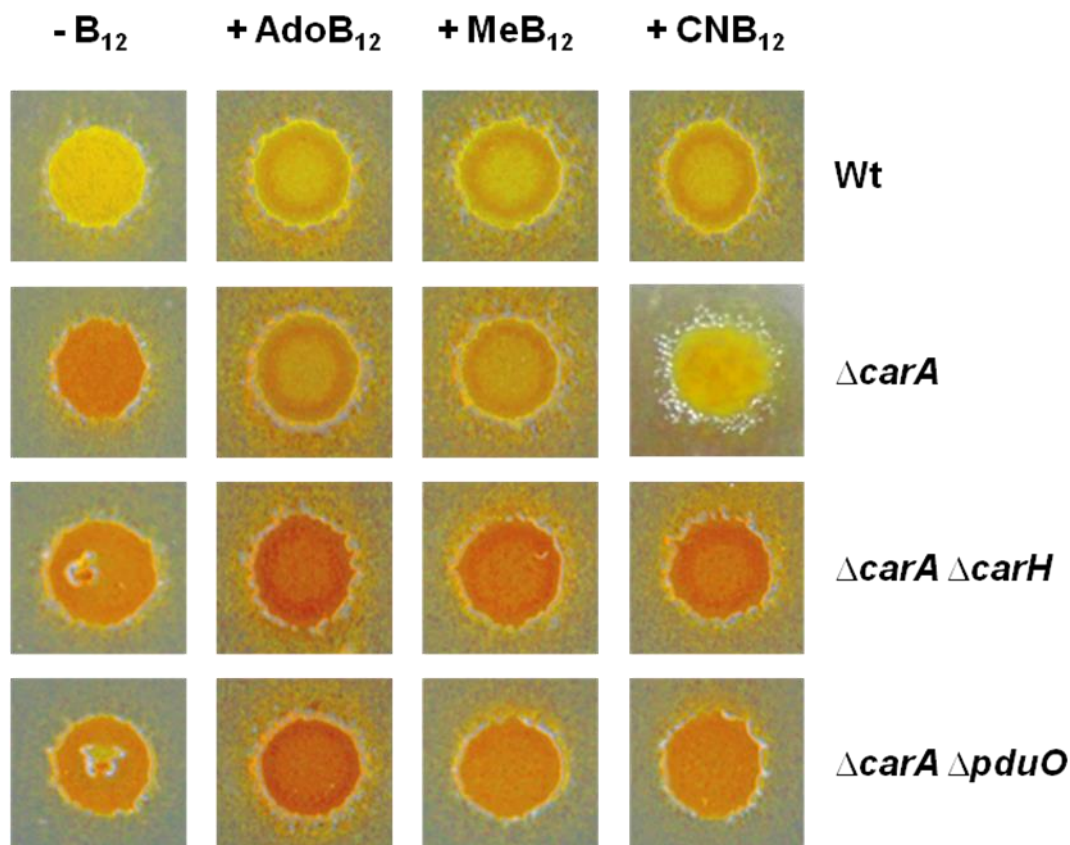


Figura 46. Fenotipo de la estirpe $\Delta carA \Delta pduO$ en presencia de diferentes cobalaminas. Gotas de 5 μ l de cultivos de las diferentes estirpes mostradas se depositaron en medio suplementado o no con 1 μ M de las cobalaminas indicadas y se incubaron en oscuridad.

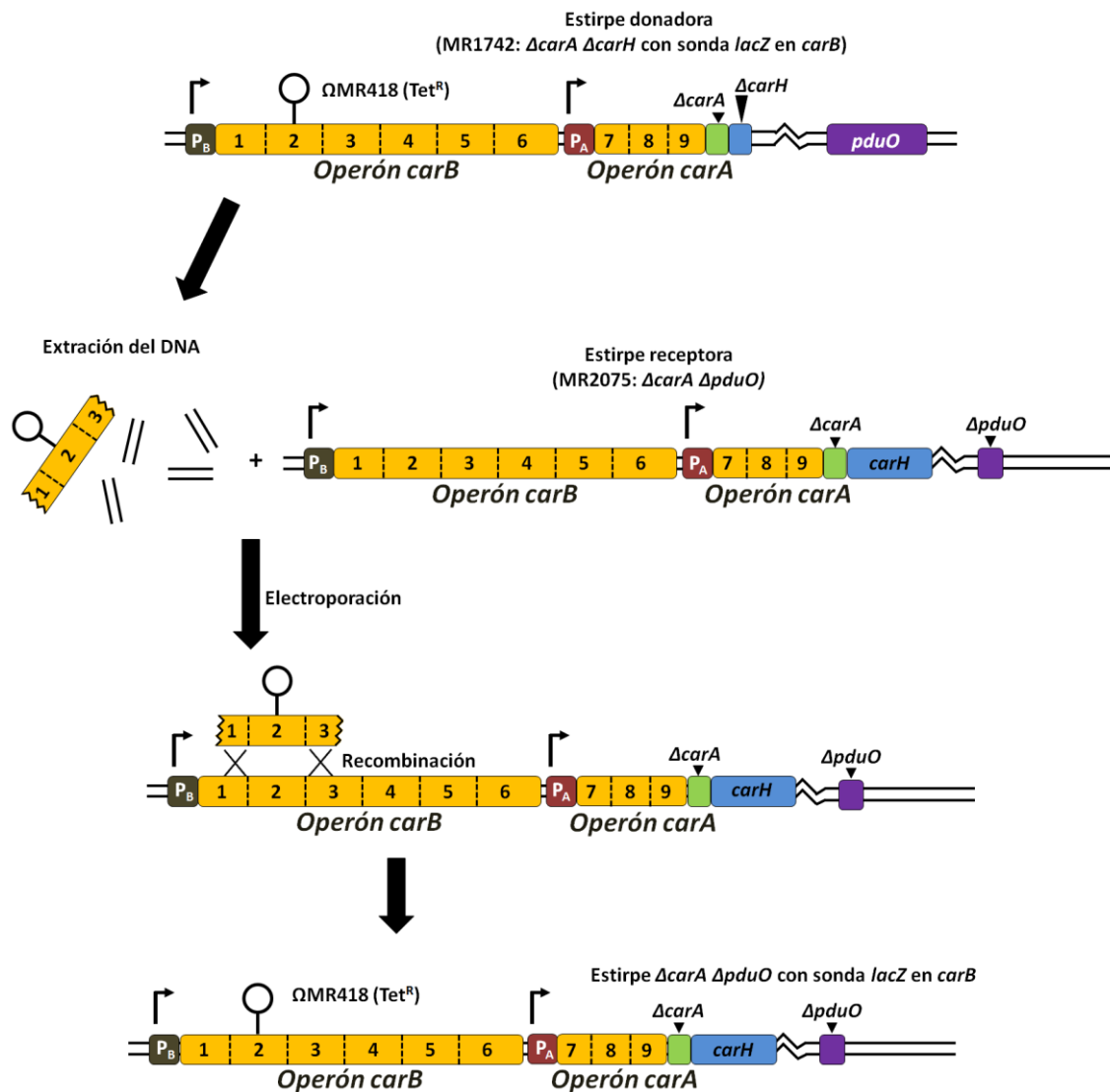


Figura 47. Esquema de la introducción de la sonda *lacZ* en *carB* (ΩMR418) en la estirpe $\Delta carA \Delta pduO$. Los números 1 a 6 designan los ORFs del operón *carB* y 7 a 9 los del operón *carA*. Las flechas que forman un ángulo recto marcan la posición de los promotores P_B y P_A y su dirección de transcripción, los triángulos negros invertidos los genes deletados.

La incubación de los cultivos para la toma de muestras y la posterior medida de la actividad se realizó tal y como se indica en la Figura 48A. Al contrario de lo que ocurre con la estirpe control $\Delta carA$, en la que la expresión de la sonda *lacZ* en *carB* se ve reprimida en presencia de B_{12} , la estirpe portadora de la doble delección $\Delta carA \Delta pduO$ presentó niveles elevados de actividad β -galactosidasa tanto en presencia como en ausencia de B_{12} (Figura 48B). Estos resultados permiten concluir que CarH es incapaz de reprimir la expresión de P_B si no se genera $AdoB_{12}$ *in vivo*.

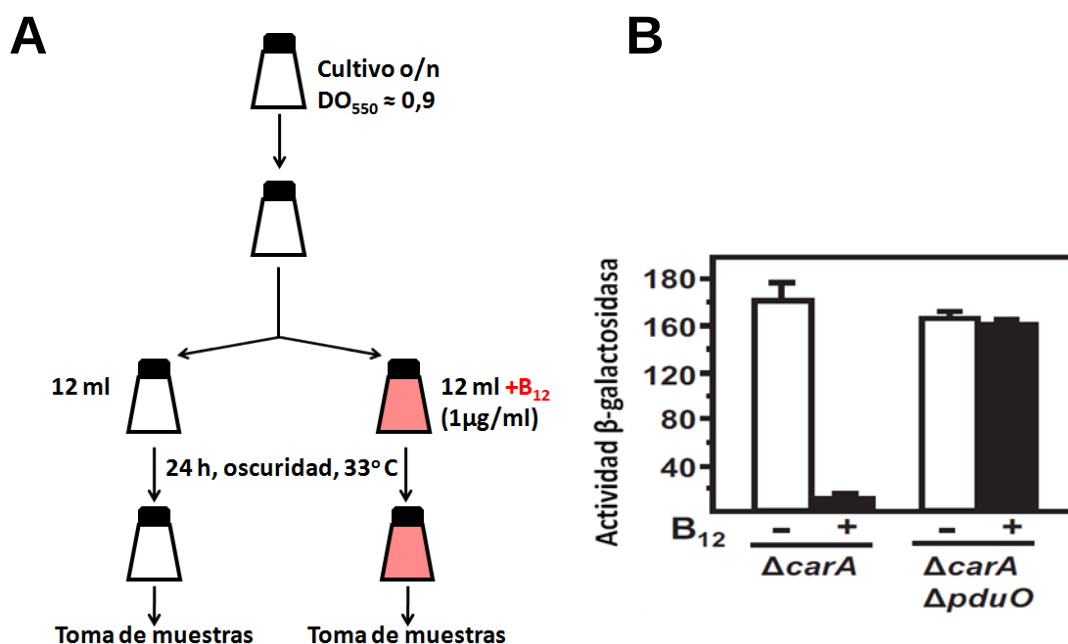


Figura 48. A. Esquema del protocolo utilizado para los ensayos de expresión de la sonda *lacZ* en *carB* y B. medidas de la expresión de dicha sonda *lacZ* en las estirpes $\Delta carA$ (MR844) y $\Delta carA \Delta pduO$ (MR2075). Se muestra la media de tres medidas independientes; las barras de error corresponden al SEM (Standard Error of the Mean).

III.1.4 La oligomerización de CarH y TtCarH, pero no la de CarA, requieren B₁₂

Los resultados de apartados previos demuestran que la AdoB₁₂ promueve *in vitro* la unión de las quimeras QTt1 y QTt2 al operador de P_B, e *in vivo* la represión de *carB* mediada por CarH. Quedaba pendiente averiguar de qué manera exactamente la presencia de AdoB₁₂ modula la función represora de CarH. Estudios anteriores utilizando la técnica del doble híbrido de levaduras habían demostrado que CarA (López-Rubio *et al.* 2002) oligomeriza a través de su dominio C-terminal y que dicha oligomerización es crucial para la unión eficiente de CarA al DNA *in vitro* y la represión de P_B *in vivo* (Pérez-Marín *et al.* 2004; Pérez-Marín *et al.* 2008). Sin embargo, las versiones de CarA mutadas en residuos clave del dominio de unión a cobalaminas mantenían su capacidad de reprimir la expresión de *carB* y de oligomerizar *in vivo* (Pérez-Marín *et al.* 2008), indicando que la interacción de CarA consigo misma ocurre de manera independiente de B₁₂.

Dado que la oligomerización es importante para que CarA se una al DNA y ejerza su acción represora, en este trabajo se estudió la posibilidad de que la AdoB₁₂ actúe favoreciendo la oligomerización de CarH, utilizando para ello ensayos de interacción proteína-proteína *in vivo* e *in vitro*. En este caso, y dado que

Saccharomyces cerevisiae no utiliza las cobalaminas para su crecimiento (Hansen *et al.* 1997), el sistema del doble híbrido de levaduras se sustituyó por el sistema del doble híbrido bacteriano (DHB) en *E. coli* (Karimova *et al.* 1998; Karimova *et al.* 2000). Aunque *E. coli* es incapaz de sintetizar B₁₂ *de novo*, puede generar AdoB₁₂ a partir de la CNB₁₂ suplementada exógenamente (Roth *et al.* 1996; Zhang *et al.* 2009). El sistema de DHB utilizado se basa en la complementación funcional del dominio catalítico de la ciclasa de adenilato, cifrada en el gen *cyaA* de *Bordetella pertussis* (Hewlett y Wolff 1976; Glaser *et al.* 1988; Mock y Ullmann 1993). Dicho dominio catalítico consiste en dos fragmentos complementarios, llamados T18 y T25, que no son activos si están físicamente separados. Cuando estos dos fragmentos se fusionan a polipéptidos que interaccionan entre sí, la interacción de las dos proteínas híbridas restaura la actividad de síntesis de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP), que se une a la proteína activadora de los genes catabólicos (CAP) (Figura 49). El complejo cAMP/CAP es un activador de la transcripción de los operones *lac* y *mal*, implicados en el catabolismo de la lactosa y maltosa, respectivamente. De esta manera, la bacteria es capaz de utilizar lactosa o maltosa como única fuente de carbono, fenotipo que puede visualizarse fácilmente en medio MacConkey suplementado con maltosa (Miller 1992), o en medio LB suplementado con X-gal, gracias al gen *lacZ* endógeno, que permite también realizar medidas cuantitativas del grado de interacción. La cepa de *E. coli* que se emplea como huésped en estos ensayos (BTH101) carece, lógicamente, de la proteína CyaA endógena. Los plásmidos utilizados fueron pKT25 y pUT18C, que permiten generar fusiones traduccionales al extremo carboxilo de los fragmentos T25 y T18 de CyaA, respectivamente.

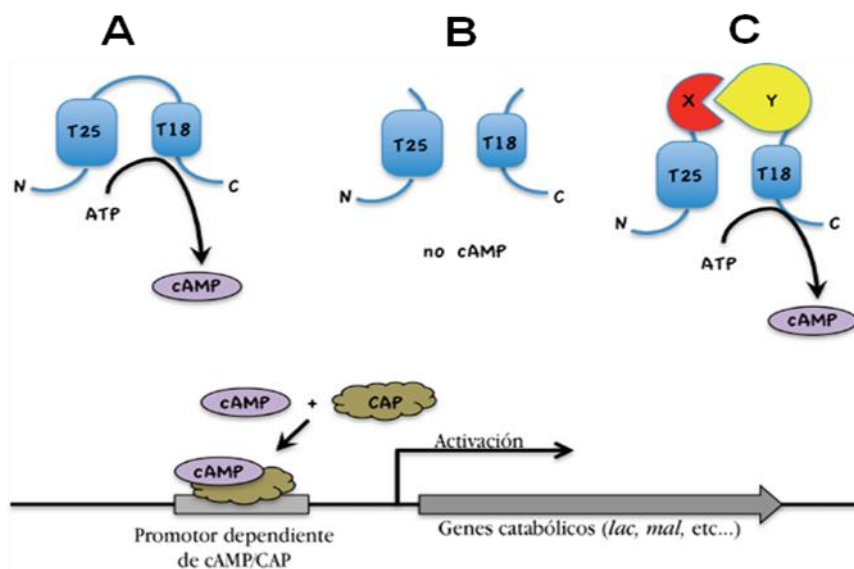


Figura 49. Esquema del sistema del doble híbrido bacteriano. Se representa el dominio catalítico completo de CyaA (A), los fragmentos T25 y T18, inactivos por separado (B), y un complejo activo debido a la interacción física de las proteínas hipotéticas X e Y, unidas traduccionalmente a T25 y T18, respectivamente (C).

Una vez clonada la parte de *carH* que cifra el dominio C-terminal, *carHCt*, en los plásmidos pKT25 y pUT18C (y la equivalente de *carA*, *carACt*, como control) se procedió a analizar si la presencia de B₁₂ en el medio producía algún efecto sobre la capacidad de CarHCt de interaccionar consigo mismo. Para ello, la estirpe BTH101 se transformó simultáneamente con los plásmidos pKT25-*carHCt* y pUT18C-*carHCt*, por un lado, y con los plásmidos pKT25-*carACt* y pUT18C-*carACt*, por otro. Como controles negativos se utilizaron células transformadas solo con uno de los plásmidos quiméricos. El análisis cualitativo en cajas con X-gal puso de manifiesto que, a diferencia de CarACt, CarHCt solo interacciona consigo mismo si la vitamina está presente (Figura 50). La misma conclusión se extrajo del análisis cuantitativo de actividad específica β-galactosidasa (realizado según el protocolo descrito en la Figura 51A), pues las células que expresaban T25-CarHCt y T18-CarHCt no mostraron actividad en ausencia de la vitamina pero sí en su presencia (Figura 51B).

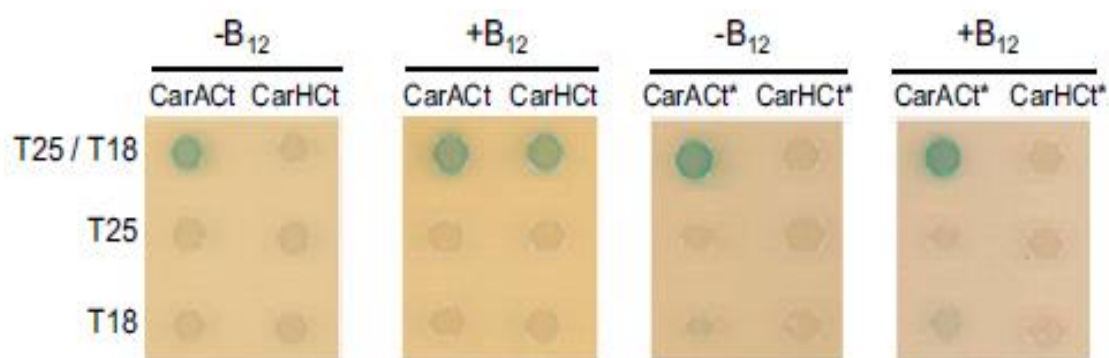


Figura 50. Análisis cualitativo de la interacción de CarA, CarH y sus variantes mutadas en la histidina del motivo de unión a B₁₂ mediante DHB. Las células expresan el dominio C-terminal indicado fusionado a T25 y T18, o a solo uno de ellos (controles negativos). Se depositaron gotas de 5 µl en medio con X-gal suplementado o no con 1 µM CNB₁₂ y las placas se incubaron durante 12 horas a 37 °C. La incubación se realizó en oscuridad, en placas con X-gal suplementadas o no con 1 µM CNB₁₂.

Mientras que la mutación (a alanina) de la histidina del motivo de unión a B₁₂, H175, que resulta clave para la unión del cofactor, no tuvo ningún efecto sobre la capacidad de CarACT de interaccionar consigo mismo; la mutación del residuo equivalente (H193A) en CarH eliminó la interacción dependiente de B₁₂ de CarHCt (Figuras 50 y 51B). Cabe pensar, por tanto, que la vitamina ejerce su acción sobre CarH promoviendo su oligomerización y, con ello, su unión al DNA.

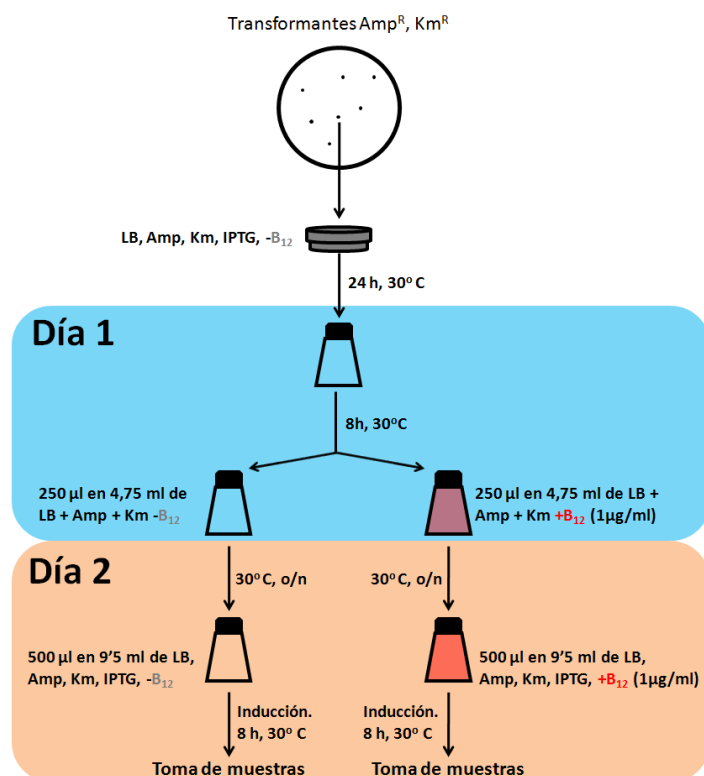
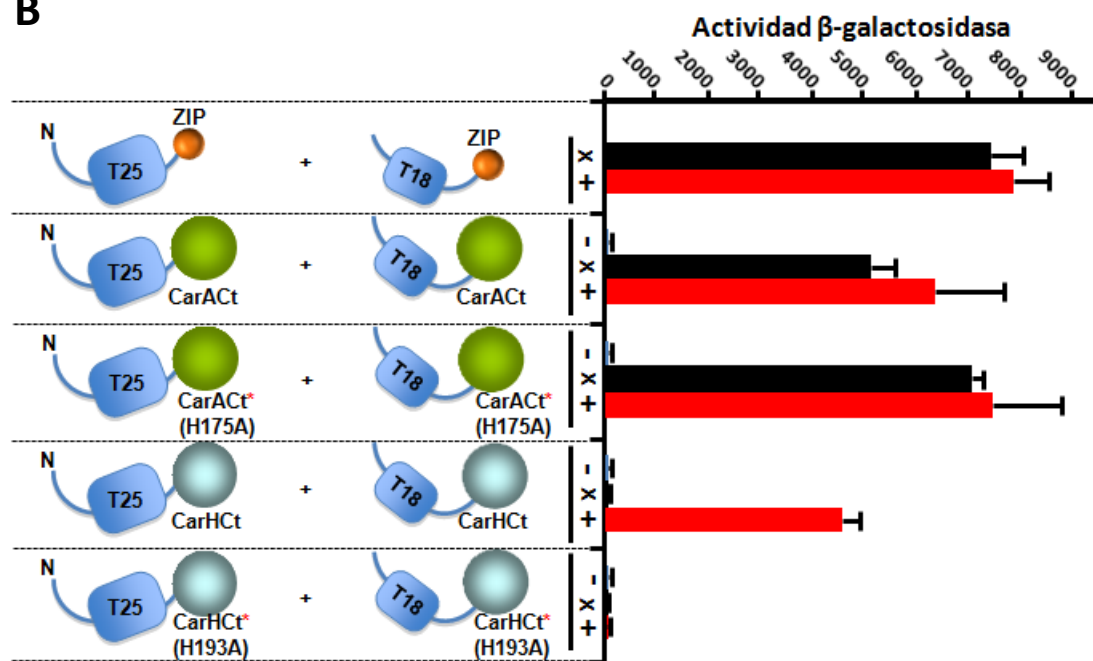
A**B**

Figura 51. Análisis cuantitativo de la interacción de CarA, CarH y sus variantes mutadas en la histidina del motivo de unión a B₁₂ mediante el sistema del DHB. En A, esquema del protocolo utilizado. La presencia de IPTG es necesaria para inducir la expresión de las proteínas de fusión. En B, los valores se corresponden con la media de tres medidas independientes de actividad β-galactosidasa específica y las barras de error con el SEM (Standard Error of the Mean). Como control positivo se utilizaron células que expresan la cremallera de leucina del factor GCN4 (ZIP) fusionada a T25 y T18. -, control negativo: células que expresan solo una proteína de fusión (barras azules). Las células que expresan ambas proteínas de fusión en ausencia (x, barras grises) o presencia (+, barras negras) de 1 µM CNB₁₂.

A excepción de CarA y CcCarA (homólogo de *Corallococcus coralloides*), que contienen un aspártico en la primera posición de la secuencia consenso de unión a B₁₂, otras proteínas similares, incluyendo la propia CarH y TtCarH, contienen glutámico en dicha posición (Figura 9). Dado que CarH y TtCarH, que presentan E, son dependientes de B₁₂ y CarA, que presenta D, es independiente de la vitamina, se consideró la posibilidad de que este residuo fuera responsable de las diferencias entre estas proteínas en lo que respecta a la dependencia de B₁₂. Para comprobar esta hipótesis se generaron las mutaciones *carH(E191D)* y *carH(E191Q)*, y se estudió su efecto tanto en la carotenogénesis (en fondo genético $\Delta carA \Delta carH$) como en el sistema del DHB. La estirpe que expresaba CarH(E191Q) mostró una síntesis de carotenos constitutiva (Figura 52), consistente con la incapacidad de CarHct(E191Q) de oligomerizar, haya o no B₁₂ en el medio (Figura 53). Por el contrario, la estirpe de *M. xanthus* portadora de la mutación CarH(E191D) mostró la represión de la carotenogénesis dependiente de B₁₂ en oscuridad típica de CarH (Figura 52), que está de acuerdo con la oligomerización dependiente de B₁₂ observada para CarHct(E191D) en el sistema del DHB (Figura 53). A la luz de estos resultados, cabe descartar que la diferencia entre el comportamiento de CarH y CarA resida en el cambio de E por D en sus respectivos motivos de unión a B₁₂. No obstante, la pérdida de función de CarH asociada al cambio de E, de carácter ácido, por Q, básico, refleja que dicho residuo es importante para que la vitamina promueva la oligomerización de CarHct.

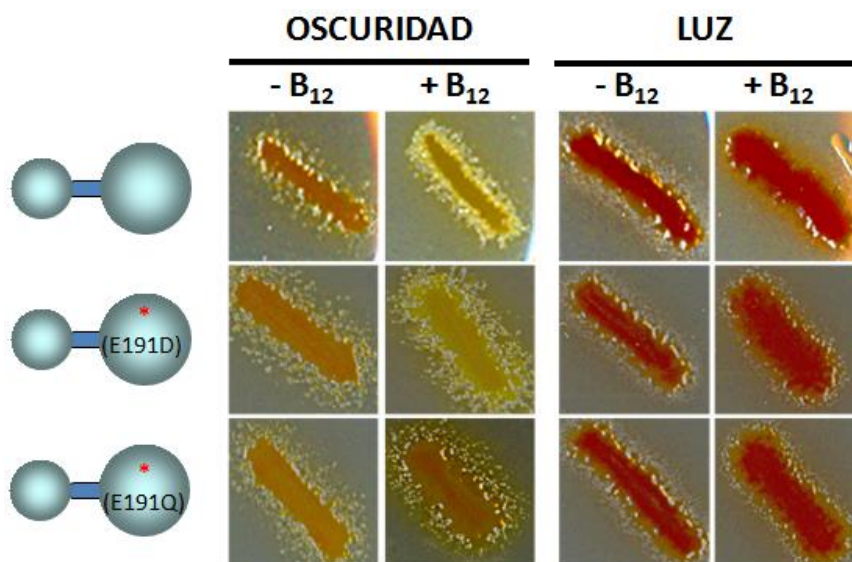


Figura 52. Efecto de las mutaciones CarH (E191D) y CarH(E191Q). (A) A la izquierda de la figura se representan las diferentes versiones de CarH con dos esferas azules, una de menor (N-terminal) y otra de mayor tamaño (C-terminal) conectadas por un cilindro central (región conectora). Los asteriscos de color rojo marcan la presencia de un cambio de aminoácido descrito justo debajo entre paréntesis.

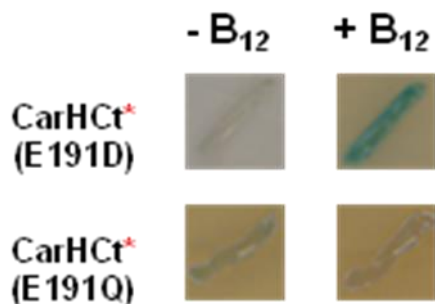


Figura 53. Análisis cualitativo mediante DHB de la interacción consigo mismas de las versiones de CarHCt con las mutaciones E191D y E191Q. Las células expresan el dominio C-terminal indicado, fusionado a T25 y T18, y fueron incubadas en presencia o ausencia de CNB₁₂ a 1 μ M.

Dado que el dominio C-terminal de TtCarH, TtCarHCt, es capaz de sustituir funcionalmente a CarHCt, se realizaron también ensayos de interacción proteína-proteína para examinar el posible efecto de la vitamina B₁₂ en la oligomerización de TtCarH. Al igual que con CarHCt, para los ensayos de interacción *in vivo* se utilizó la técnica del DHB (utilizando el mismo protocolo descrito para CarHCt). Para ello, se generaron plásmidos derivados de pKT25 y pUT18C que expresaban TtCarHCt o su versión mutada en la histidina del motivo de unión a B₁₂ (H177A) fusionados al extremo C-terminal del fragmento T25 y T18. Los resultados de estos ensayos demostraron que TtCarHCt solo interacciona consigo misma en presencia de B₁₂ siempre y cuando esté intacto el motivo de unión a cobalaminas (Figura 54). Esto sugiere que, como ocurre en CarH, la oligomerización de TtCarH depende de su unión a B₁₂.

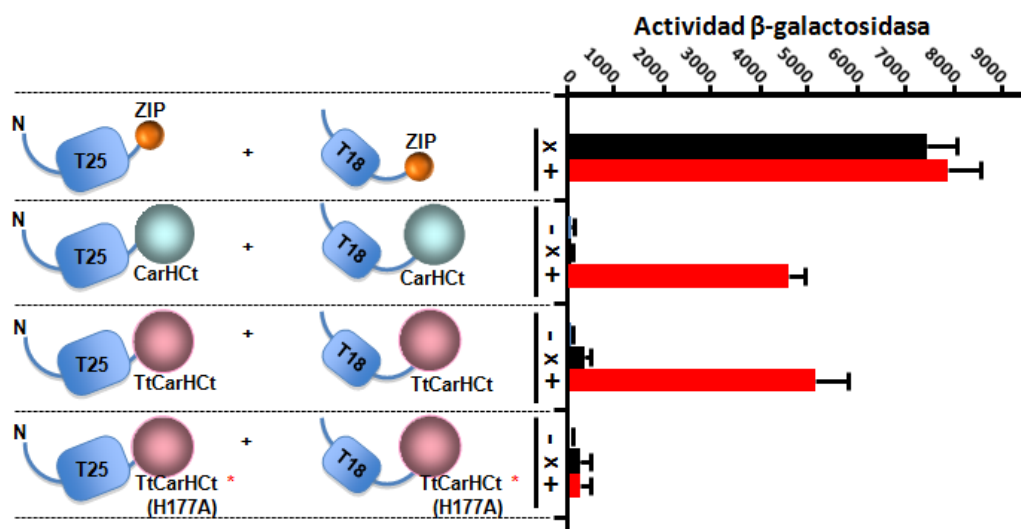


Figura 54. Análisis cuantitativo de la interacción consigo mismo de TtCarHCt y de su variante mutada en la H177 mediante el sistema del DHB. Las células expresan el dominio C-terminal indicado fusionado a T25 y T18, o a solo uno de ellos (controles negativos). La actividad es la media de tres medidas independientes de la expresión del gen chivato *lacZ* y las barras de error corresponden al SEM (Standard Error of the Mean). Como control positivo se utilizaron células que expresan la cremallera de leucina del factor GCN4 (ZIP) fusionada a T25 y T18. -, control negativo: células que expresan solo una proteína de fusión (barras azules) Las células del ensayo expresan ambas proteínas de fusión en ausencia (x, barras grises) o presencia (+, barras negras) de 1 μ M CNB₁₂.

Para averiguar qué estado oligomérico se ve favorecido en presencia de AdoB₁₂, así como la estequiometría de la unión, se utilizaron las preparaciones purificadas de CarACT (como control), y de TtCarHCt o de la quimera QTt2, en ensayos de cromatografía de exclusión de tamaño en condiciones de baja iluminación (para evitar la fotólisis de las cobalaminas). TtCarHCt eluyó con un peso molecular aparente (M_r) de $24,4 \pm 0,7$ kDa, cercano a los 22,6 kDa calculados para un monómero, tanto en ausencia de B₁₂, como en presencia de CNB₁₂ o MeB₁₂ (Figura 55A, panel superior). Por el contrario, la presencia de AdoB₁₂ provocó un desplazamiento llamativo en el pico de elución, que ahora correspondía a un M_r de $99,2 \pm 2$ kDa, indicativo de la formación de un tetrámero (Figura 55A, panel superior). La comparación del patrón de absorbancia a 280 nm (λ a la que absorben las proteínas; Figura 55A, panel superior) y a 361 nm (λ a la que absorben las cobalaminas; Figura 55A, panel inferior) puso de manifiesto que la CNB₁₂ o MeB₁₂, como la AdoB₁₂, sí se unen a TtCarHCt (pues en ambos casos se observó una coincidencia entre los picos de elución detectados a 280 y 361 nm), aunque son incapaces de promover su oligomerización. El análisis del pico de elución de TtCarHCt en presencia de AdoB₁₂ reveló un espectro de absorción muy similar al de AdoB₁₂ libre (Figura 55B) y la estimación del contenido en proteína y AdoB₁₂ del pico indicó una estequiometría 1:1.

Al igual que TtCarHCt, la quimera QTt2 eluyó como un monómero en ausencia de cobalaminas o en presencia de CNB₁₂ o MeB₁₂, pero como un tetrámero en presencia de AdoB₁₂ (Figura 55C). La mutación de la histidina del motivo de unión a B₁₂ en TtCarHCt, que en el sistema del DHB provocó una pérdida de la interacción dependiente de B₁₂, en los ensayos de cromatografía eliminó la tetramerización dependiente de AdoB₁₂ (Figura 56D, panel inferior). Por último, y en consonancia con los resultados del sistema del DHB, la presencia de cualquiera de las formas de cobalamina probadas no tuvo efecto alguno sobre la oligomerización de CarACT, que eluyó como un dímero tanto en ausencia como en presencia de cobalaminas ($M_r = 41,3 \pm 1$ kDa; siendo el valor calculado para un monómero 22,9 kDa; Figura 55D, panel superior).

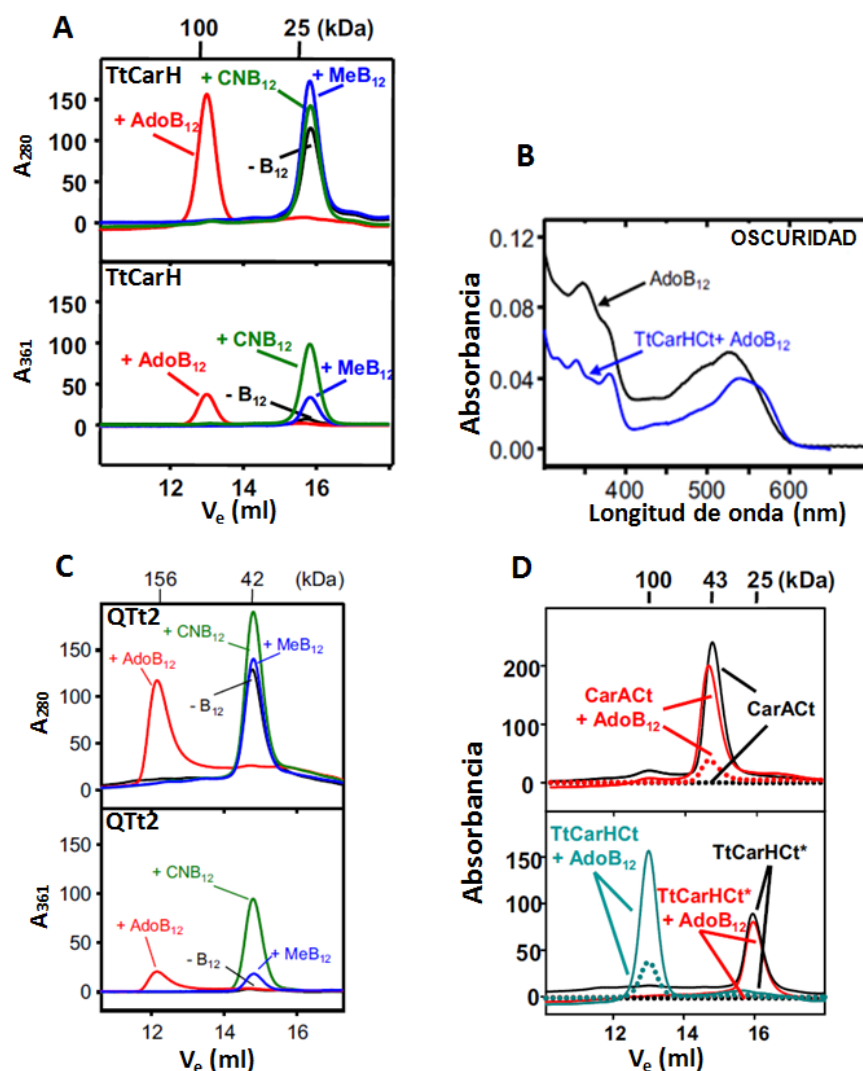


Figura 55. Análisis por cromatografía de exclusión de tamaño de los perfiles de elución de TtCarHct, Qtt2, TtCarHct* y CarAct, en ausencia y presencia de cobalaminas. Los Mr (en kDa) correspondientes al punto máximo de cada pico se indican en la parte superior de cada gráfica. En todos los casos se utilizó una columna analítica de filtración en gel Superdex200 en condiciones de oscuridad. A. Perfiles de elución de TtCarHct sola (curva negra) o en presencia de un exceso de cinco veces de AdoB₁₂ (curva roja), CNB₁₂ (curva verde) o MeB₁₂ (curva azul), obtenidos por absorbancia a 280 nm (panel superior) o 361 nm (panel inferior). B. Espectro de absorción en la zona visible de una preparación de AdoB₁₂ (trazo negro) y del pico de elución de la muestra de TtCarHct + AdoB₁₂ (trazo azul). C. Perfiles de elución de Qtt2 en ausencia (curva negra) o presencia de un exceso de cinco veces de AdoB₁₂ (curva roja), CNB₁₂ (curva verde) o MeB₁₂ (curva azul) obtenidos por absorbancia a 280 nm (panel superior) o 361 nm (panel inferior). D. Perfiles de elución de CarAct (panel superior) o de la versión de TtCarHct mutada en la H177 (TtCarHct*) (panel inferior), en presencia (curva roja) o ausencia (curva negra) de un exceso de cinco veces de AdoB₁₂, obtenidos por absorbancia a 280 nm (línea continua) o a 361 nm (línea discontinua). Como control, se muestran también los perfiles de elución de TtCarHct en presencia de AdoB₁₂ medidos a 280 nm y 361 nm (líneas azules continuas y discontinuas, respectivamente).

Que la presencia de AdoB₁₂ promueve la tetramerización de TtCarH se comprobó también mediante ensayos de entrecruzamiento químico utilizando DSP (Ditiobis[succinimidilpropionato]) como agente entrecruzador. Así pues, solo se

observó la banda correspondiente a un tetrámero de TtCarHCt en presencia de AdoB₁₂ (Figura 56). Cabe pensar que el incremento también de las formas diméricas en presencia de AdoB₁₂ se deba a que es más probable entrecruzar dos subunidades que cuatro.

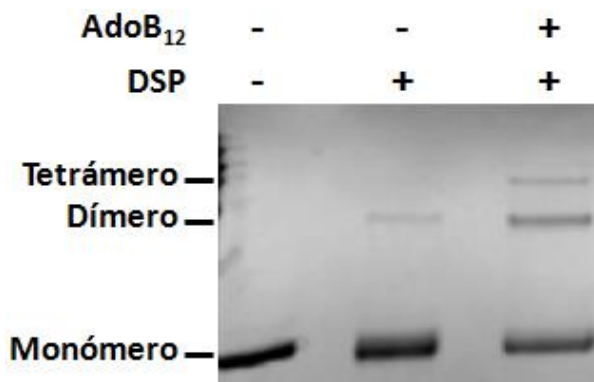


Figura 56. Análisis por entrecruzamiento químico de la interacción consigo mismo de TtCarHCt dependiente de AdoB₁₂. DSP: Ditiobis(succinimidilpropionato).

En estudios llevados a cabo recientemente, en colaboración con el grupo dirigido por el Prof. José García de la Torre (Departamento de Química Física, Univ. de Murcia), se ha podido confirmar todos los resultados de la cromatografía de exclusión de tamaño mediante ultracentrifugación analítica utilizando la proteína TtCarH (datos no mostrados).

Para obtener una descripción más detallada de la unión entre TtCarHCt y las cobalaminas se utilizó calorimetría isotérmica de titulación (ITC). Esta técnica permite detectar cambios de calor asociados a la unión y proporciona información sobre los parámetros termodinámicos que caracterizan dicha unión. Mientras que en la titulación de TtCarHCt con CNB₁₂ o MeB₁₂ a 25°C no se detectaron cambios de calor, en las mismas condiciones sí se observó absorción de calor con AdoB₁₂. Estos datos de ITC, ajustados a un modelo de un único sitio de unión, permitieron calcular una entalpía (ΔH) de $15,2 \pm 0,9$ kcal/mol, una entropía de ($T\Delta S$) de $23,5 \pm 1,4$ kcal/mol y una constante de equilibrio (K_d) de 832 ± 240 nM. Sin embargo, se subestimó la estequiometría (N), con un valor de $0,34 \pm 0,10$ (Figura 57), posiblemente porque el modelo de un único sitio de unión no considera los efectos cooperativos de la tetramerización dependiente de AdoB₁₂. Aunque, será necesario realizar una interpretación más realista de estas complejas interacciones en el futuro, estos resultados revelan que existe una unión fuerte y favorecida entrópicamente entre AdoB₁₂ y TtCarH.

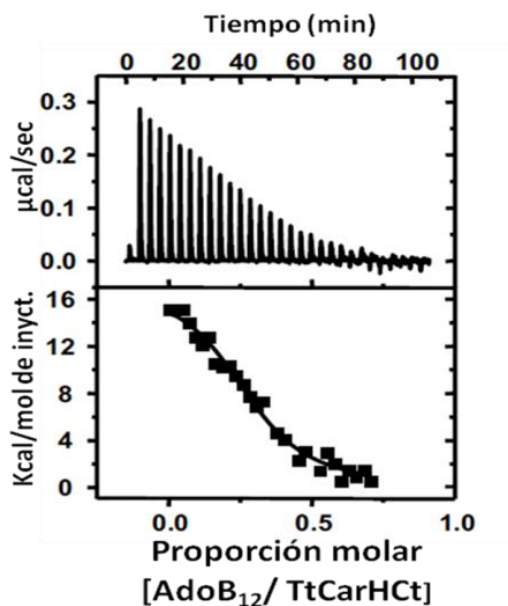


Figura 57. ITC con 18 μM de TtCarHCt titulado con 78 μM de AdoB₁₂ a 25 °C. Panel superior: cambio de calor con cada inyección. Panel inferior: Calor integrado normalizado y corregido para el calor de la dilución frente a la proporción molar. La línea que mejor se ajusta a los datos corresponde con el modelo de un único sitio de unión.

El conjunto de los resultados presentados en este apartado permiten concluir que la unión específica de AdoB₁₂ promueve la oligomerización del dominio C-terminal de CarH o TtCarH, pero no de CarA, lo que aporta una posible explicación molecular a la dependencia funcional de B₁₂ mostrada por CarH, QTt1 y QTt2.

III.1.5 La luz impide la oligomerización y la unión al DNA dependientes de AdoB₁₂

Es sabido que la AdoB₁₂, que absorbe luz en el rango UV y visible del espectro, presentando máximos de absorción a λ de 260, 376 y 522 nm (Figura 58), sufre una lisis muy rápida del enlace Co-C en presencia de luz (Bond *et al.* 1972; Chen y Chance 1990; Schwartz y Frey 2007). Por ello, para evitar la fotólisis de la AdoB₁₂, en los experimentos ya mencionados se evitó la exposición de las muestras a la luz.

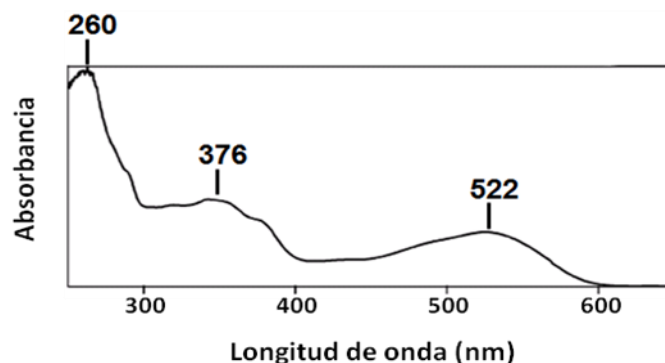


Figura 58. Espectro de absorción de la AdoB₁₂.

No obstante, y dada la implicación de la AdoB₁₂ en la respuesta celular a la luz, a continuación se estudió la posibilidad de que la fotosensibilidad intrínseca de la AdoB₁₂ tuviese una relevancia fisiológica directa. Por este motivo, se comprobó si la luz afecta a la oligomerización dependiente de AdoB₁₂, la unión al DNA *in vitro*, y la represión de P_B *in vivo*. En el análisis mediante el sistema del DHB se observó que la oligomerización de CarHCt observada en oscuridad y en la presencia de B₁₂, se perdía en la luz, mientras que la oligomerización de CarACt, que no depende de B₁₂, no se veía afectada por la iluminación (Figura 59).

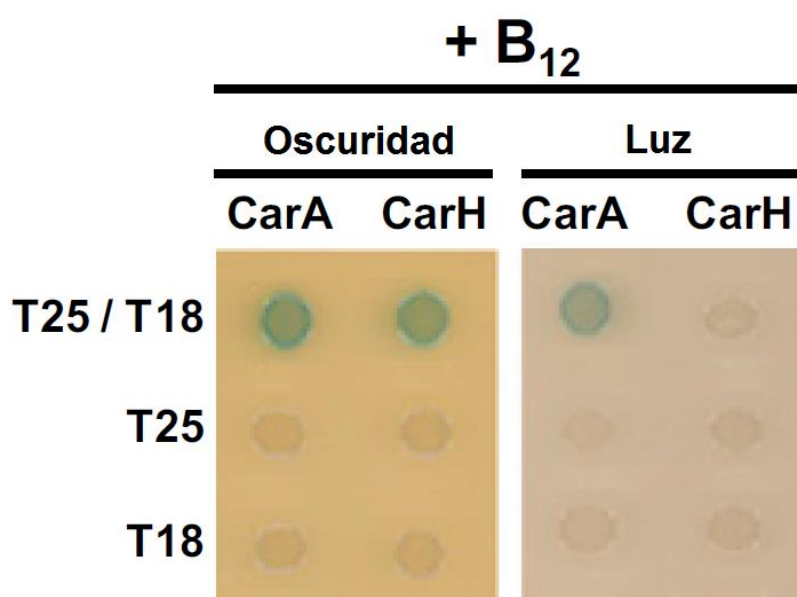


Figura 59. Efecto de la luz en la oligomerización de CarA y CarH. Ensayo de DHB en placa con los dominios C-terminales de CarA y de CarH en presencia de CNB₁₂ tanto en oscuridad como en luz. Las células expresan el dominio indicado fusionado a T25 y a T18 (T25/T18) o a solo uno de ellos en los controles negativos (T25 o T18 en la figura). La incubación se realizó en placas de LB con X-gal.

En los experimentos de cromatografía de exclusión molecular, tanto TtCarHCt como QTt2 unidas a AdoB₁₂ y expuestas a luz (blanca o de longitudes de onda en torno a 360, 438 o 540 nm, que se corresponden con los picos de absorción máxima de la AdoB₁₂) eluyeron como monómeros en vez de tetrámeros (Figura 60A). Además, el espectro de absorción del pico de elución presentó un máximo de absorción a 358 nm (Figura 60B), que es característico de la hidroxocobalamina (OHB₁₂) que resulta de la fotólisis aeróbica de AdoB₁₂ (Schwartz y Frey 2007). En el ensayo de ITC no se detectó cambio de calor en la titulación de una preparación de TtCarHCt con AdoB₁₂ si previamente había sido expuesta a la luz (datos no mostrados).

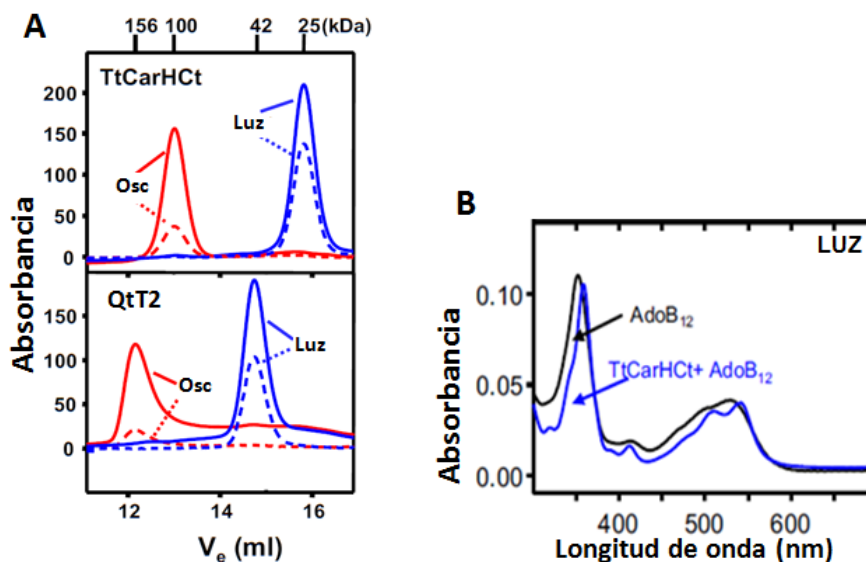


Figura 60. Análisis del efecto de la luz sobre TtCarHCt y QtT2 unidas a AdoB₁₂ mediante cromatografía de exclusión de tamaño. Para realizar este ensayo se utilizó una columna analítica de filtración en gel Superdex200. Las masas moleculares (en kDa) para el máximo de cada pico aparecen indicadas en la parte superior de cada gráfica. A. Perfiles de elución de TtCarHCt (panel superior) y QtT2 (panel inferior) obtenidos por absorbancia a 280 nm (línea continua) o a 361 nm (línea discontinua). Ambas proteínas, a una concentración 45 μ M y en presencia de un exceso de cinco veces de AdoB₁₂, fueron incubadas en oscuridad (curva roja) o iluminadas durante 5 minutos (curva azul) antes de la cromatografía. B. Espectro de absorción en la zona visible de una preparación de AdoB₁₂ (trazo negro) y del pico de elución de la muestra de TtCarHCt + AdoB₁₂ (trazo azul) sometidas a iluminación.

En los ensayos de EMSA tanto QtT1 como QtT2, en presencia de AdoB₁₂ y expuestas a luz de 360, 438 o 540 nm de longitud de onda, dieron lugar a la formación de un complejo similar al observado en ausencia de AdoB₁₂ (para QtT1) o prácticamente inapreciable (para QtT2), en lugar del complejo retrasado y bien definido formado en oscuridad (Figura 61).

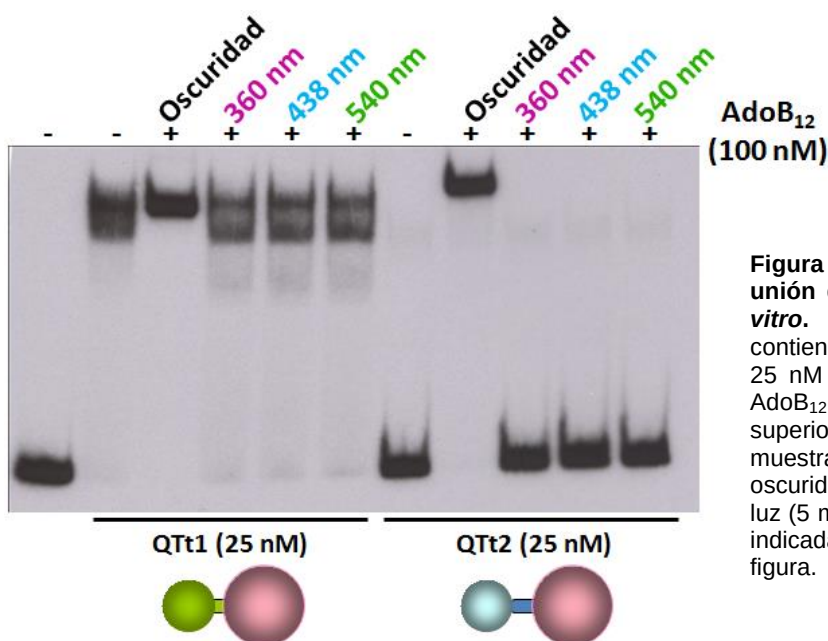


Figura 61. Efecto de la luz en la unión de QtT1 y QtT2 al DNA *in vitro*. EMSA con muestras que contienen el fragmento de 130 pb y 25 nM de QtT1 o QtT2 con o sin AdoB₁₂ a una molaridad 5 veces superior a la de la proteína. Estas muestras fueron incubadas en oscuridad (35 min) o irradiadas con luz (5 min) a las longitudes de onda indicadas en la parte superior de la figura.

Sin embargo, la iluminación con luz roja (que se encuentra fuera del rango de absorción de la AdoB₁₂) no tuvo ningún efecto sobre la unión de QTt1 o QTt2 al DNA (Figura 62). Se puede, por tanto, concluir que la luz de un amplio espectro de longitudes de onda (UV, azul y verde, pero no roja) impide la oligomerización y unión al DNA dependiente de AdoB₁₂.

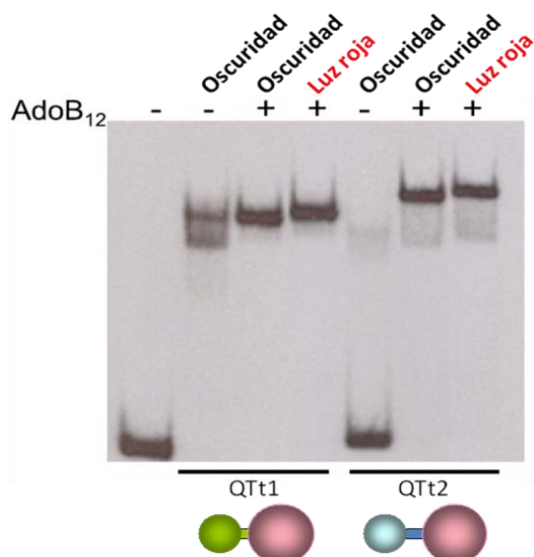


Figura 62. Efecto de la luz roja en la unión de QTt1 y QTt2 al DNA *in vitro*. EMSA con 400 nM de TtCarH con y sin AdoB₁₂ a una molaridad cinco veces superior. Las muestras se incubaron en oscuridad (35 min) o fueron expuestas a la luz (5 min) después de 30 minutos de incubación en oscuridad. En la primera calle se cargó solamente la sonda (fragmento de 130 pb).

De las longitudes de onda examinadas, la de 520 nm (luz verde) es la que parece tener mayor efecto, pues provocó un desmantelamiento del complejo retrasado formado por QTt2 en oscuridad incluso a 1 W/m² de intensidad (Figura 63).

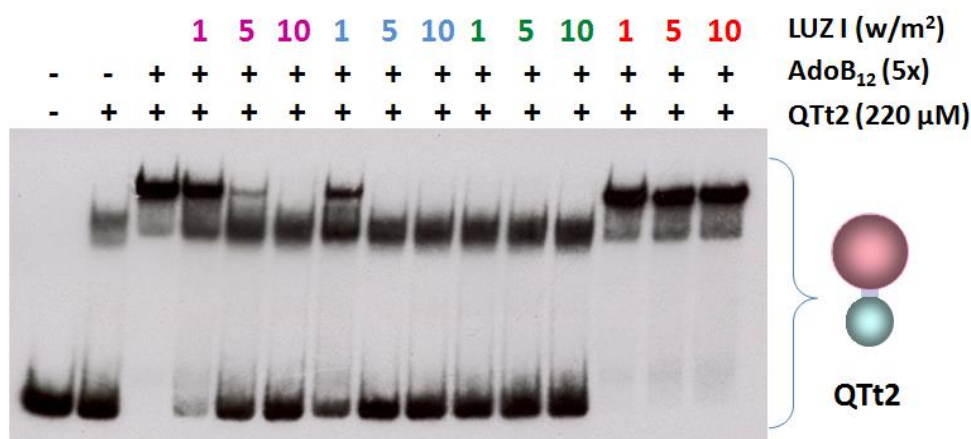


Figura 63. Efecto de la intensidad de la luz a distintas longitudes de onda en la unión de QTt2 al DNA *in vitro*. EMSA con muestras que contienen el fragmento de 130 pb y 220 nM de QTt2 con o sin AdoB₁₂ a una molaridad 5 veces superior a la de la proteína. Las muestras fueron incubadas en oscuridad (35 min) o irradiadas con luz (5 min), después de 30 minutos de incubación en oscuridad, a las intensidades de luz indicadas y las longitudes de onda indicadas por los colores de los números: violeta (405 nm), azul (465 nm), verde (520 nm) y rojo (660 nm).

III.1.6 El complejo AdoB₁₂-CarH proporciona una ruta fotosensora independiente de CarS para la regulación de la carotenogénesis en *M. xanthus*

Como se ha comentado anteriormente, CarS, que solo se produce en la luz, funciona como un antirrepresor contrarrestando la acción de CarA tanto *in vivo* como *in vitro* mediante su interacción con el dominio de unión al DNA de CarA (López-Rubio *et al.* 2002; López-Rubio *et al.* 2004; Pérez-Marín *et al.* 2004; Navarro-Avilés *et al.* 2007; Pérez-Marín *et al.* 2008; León *et al.* 2010). En la Figura 64 puede comprobarse que el efecto antagónico de CarS sobre la unión al DNA mediada por CarANT se mantiene para la quimera QTt1, que fue incapaz de unirse al DNA cuando se incubó, a la vez que CarS, con la sonda en oscuridad y presencia de AdoB₁₂. Dado que CarS también es capaz de interactuar con el dominio N-terminal de CarH y de competir por la unión de CarHnt al DNA *in vitro* (Pérez-Marín *et al.* 2008), la presencia simultánea de CarS en los ensayos de EMSA con QTt2 también impidió la unión de esta última al DNA (Figura 64). Es probable, por tanto, que CarS pueda actuar también como un antirrepresor de CarH *in vivo*. No obstante, y puesto que el efecto negativo de la luz sobre la interacción de QTt1 y QTt2 con su operador ocurre aún en ausencia de CarS, cabe pensar que la asociación de CarH con AdoB₁₂, necesaria para la represión de P_B *in vivo*, podría suponer una ruta alternativa, independiente de CarS, que explotaría la fotosensibilidad intrínseca de la vitamina para responder a la luz.

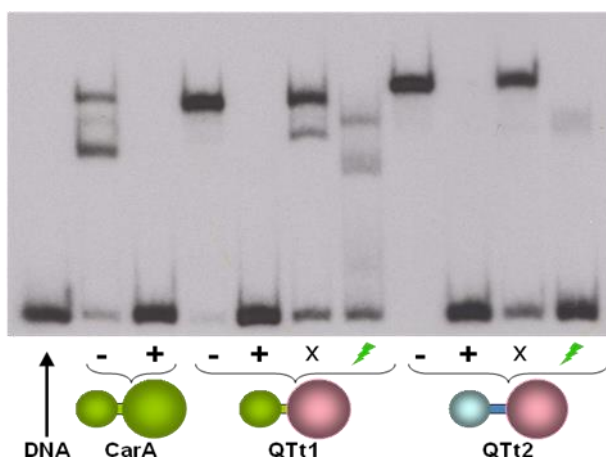


Figura 64. Comparación de los efectos de CarS y de la luz sobre la unión al DNA de QTt1 y QTt2. Todas las proteínas se utilizaron a una concentración de 25 nM. Los ensayos se realizaron en oscuridad y, en el caso de QTt1 y QTt2, en presencia de AdoB₁₂ a 125 nM. (-) ausencia de CarS; (+) presencia de CarS a 750 nM añadida de forma simultánea a CarA, QTt1 o QTt2; (X) presencia de CarS a 750 nM añadida tras 30 minutos de incubación de las proteínas con el DNA; (⚡) muestras que fueron tratadas con luz de 520 nm de longitud de onda, a una intensidad de 10 W/m² durante 5 minutos, tras la incubación durante 30 minutos de las proteínas con el DNA.

Por ello, para separar el efecto directo de la luz sobre el complejo AdoB₁₂-CarH de la antirrepresión mediada por CarS (Pérez-Marín *et al.* 2008; León *et al.* 2010) y examinar la relevancia fisiológica de la fotosensibilidad de la AdoB₁₂ en la regulación de P_B, se generaron estirpes portadoras de la delección de *carH* ($\Delta carH$) o de la doble delección $\Delta carA \Delta carH$ en fondo con una delección en fase de *carS* ($\Delta carS$). La estirpe

$\Delta carS \Delta carH$, en la que P_B solo puede ser reprimido por CarA, mostró una coloración amarilla en la luz, tanto en presencia como en ausencia de B_{12} (Figura 65), y la expresión de P_B-lacZ fue siempre baja, tal como ocurre en la estirpe $\Delta carS$ (Figura 66). Estos resultados son consistentes con el requerimiento de CarS, pero no de B_{12} , para la activación del promotor P_B cuando está reprimido por CarA.

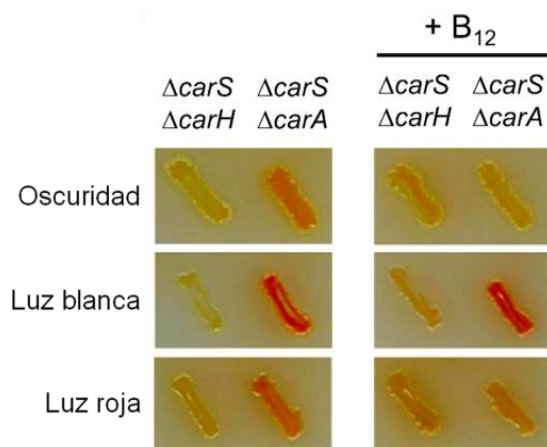


Figura 65. La iluminación con luz blanca, pero no con luz roja, elimina la represión dependiente de B_{12} y mediada por CarH *in vivo* aun en ausencia de CarS. Fenotipo para la carotenogénesis de las estirpes indicadas de *M. xanthus* crecidas en la oscuridad o expuestas a luz (blanca o roja) en presencia o ausencia de $1 \mu M$ de CNB_{12} .

Por el contrario, la estirpe $\Delta carS \Delta carA$, en la que P_B se reprime en la oscuridad por la acción de $AdoB_{12}$ -CarH, pasó del color amarillo observado en oscuridad y presencia de B_{12} al rojo tras ser expuesta a luz blanca. Además, la expresión de la sonda P_B-lacZ se indujo unas 10 veces, alcanzando niveles similares a los de la estirpe silvestre en las mismas condiciones o a los de la estirpe $\Delta carS \Delta carA \Delta carH$ (que expresa constitutivamente P_B) (Figura 66). Al igual que en los ensayos *in vitro*, la luz roja no tuvo ningún efecto *in vivo*, pues tanto la estirpe $\Delta carS \Delta carA$ como la $\Delta carS \Delta carH$ mostraron el mismo fenotipo que en la oscuridad (Figuras 65 y 67).

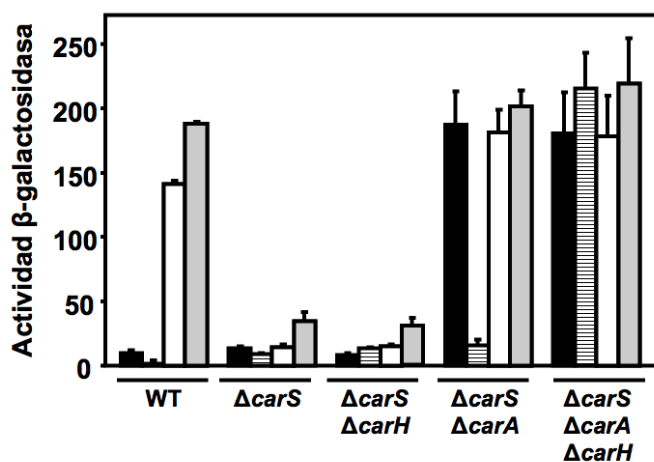


Figura 66. La luz elimina, en ausencia de CarS, la represión mediada por CarH *in vivo*. Expresión de la sonda P_B-lacZ (en términos de actividad β -galactosidasa específica) en oscuridad (barras negras), oscuridad con $1 \mu M$ de CNB_{12} (barras rayadas), luz (barras blancas), y la luz con $1 \mu M$ de CNB_{12} (barras grises) para cada una de las estirpes indicadas. Se muestra la media de tres medidas independientes y las barras de error corresponden al SEM (Standard Error of the Mean).

Cabe concluir, por tanto, que la fotosensibilidad intrínseca de la AdoB₁₂ la convierte, vía CarH, en un interruptor que acopla la señal luminosa y la regulación de la expresión génica, proporcionando una vía distinta de fotoinducción de la carotenogénesis que es independiente de CarS. Y lo que es más importante, estos datos revelan una nueva faceta de la AdoB₁₂, la de actuar como cromóforo de una nueva familia de fotorreceptores bacterianos.

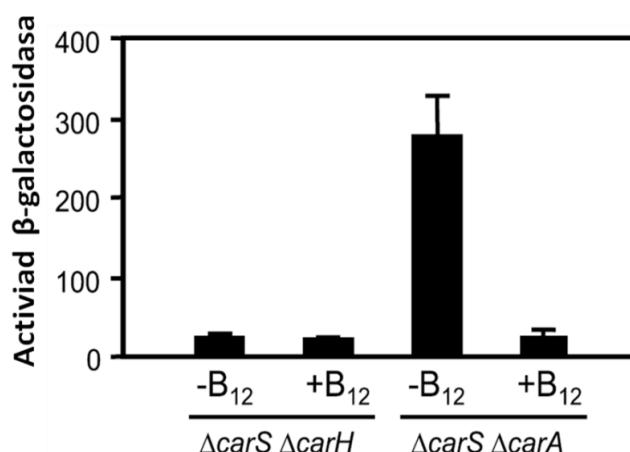


Figura 67. Efecto de la luz roja en la expresión de *carB*. Expresión de la sonda P_B-*lacZ* en cultivos de las estirpes indicadas de *M. xanthus*, incubadas en luz roja y en presencia o ausencia de 1 μM de CNB₁₂. Los resultados son la media de tres medidas independientes y las barras de error corresponden al SEM (Standard Error of the Mean).

III.2 Caracterización de TtCarH

Los resultados de apartados anteriores con las proteínas quiméricas QTt1 y QTt2, que poseen el dominio C-terminal de unión a B₁₂ de la proteína TtCarH de *T. thermophilus*, sugieren que la actividad represora del propio TtCarH debe ser dependiente de AdoB₁₂ y sensible a la luz. Resulta interesante que el gen *TtcarH*, como *carA* y *carH* en *M. xanthus*, se encuentre en *T. thermophilus* adyacente a genes que codifican enzimas carotenogénicos (*crtB*, en este caso), aunque se transcriba en sentido opuesto. Ambos genes se encuentran en el megaplásmido (0.26 Mb) pTT27, en el que, curiosamente, también aparecen agrupados varios genes implicados en la síntesis de B₁₂ (Henne *et al.* 2004). Además, aguas abajo de *crtB* se encuentra el gen *phr*, que determina la síntesis de fotoliasa, la enzima responsable de reparar daños en el DNA por el mecanismo de fotorreactivación, dependiente de luz. La proximidad de un gen carotenogénico y la analogía con CarH, hizo considerar que TtCarH podría regular la expresión fotoinducible de *crtB* (y *phr*) y, por tanto, la producción de

carotenos en *T. thermophilus*, de una manera dependiente de B₁₂. De ser así, cabría esperar que TtCarH fuese capaz de unirse a algún sitio en la región intergénica entre *crtB* y el propio gen *TtcarH*. El análisis de dicho tramo de DNA permitió identificar la posible región -35 y -10 del promotor de *TtcarH*, aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción identificado por Takano *et al.*, 2011, y dos palíndromes imperfectos que guardan cierta similitud con el operador bipartito de CarA/CarH (Figura 68). El palíndromo I, pI, más alejado del sitio de inicio de la transcripción, está constituido por una secuencia palindrómica imperfecta de 6 pb interrumpida por otras 6. Su asimetría (debida a las 3 pb que rompen el palíndromo) contrasta con la región equivalente en *M. xanthus*, perfectamente palindrómica. El otro palíndromo, pII, es un palíndromo imperfecto, al igual que su equivalente en *M. xanthus*, y está formado por una repetición invertida de 6 pb interrumpida por otras 5 pb. Como ocurre en el operador de P_B en *M. xanthus*, el posible sitio de unión pII solapa con la región -35 del promotor de *TtcarH*.

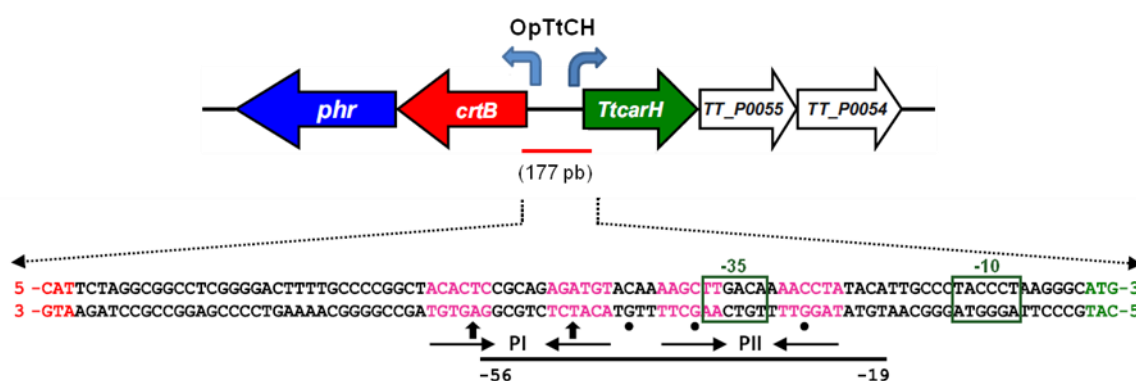


Figura 68. Contexto genómico de *TtcarH* en el megaplásmido pTT27 (NCBI N° de acceso AE017222) de *T. thermophilus*. Los genes colindantes están anotados como: *crtB*, sintasa de fitoeno; *phr*, desoxirribodipirimidina fotoliasa; *TT_P00rr*, proteína reguladora tipo CAP/FNR; y *TT_P0054*, subunidad NADH-ubiquinona oxidoreductasa. La sonda utilizada, representada como un segmento rojo en la parte inferior de la figura, contiene 92 pb de región intergénica (cuya secuencia se muestra en la parte inferior de la figura), más 38 pb de secuencia aguas arriba y 47 pb de secuencia aguas abajo. El codón de inicio de *TtcarH* aparece representado en color verde, y el de *crtB* en rojo. Los cuadros verdes marcan las supuestas regiones -10 y -35. Las secuencias de los cuatro segmentos semejantes al operador bipartito de CarA/CarH aparecen de color magenta con flechas invertidas delgadas debajo. La línea de más abajo abarca la zona protegida en los ensayos de digestión con DNasa I. Los números marcan la posición de la base con respecto al codón de inicio de la traducción de *TtcarH*. Las flechas gruesas en posición vertical señalan las hipersensibilidades y los círculos negros, las bases no protegidas deducidas de los resultados que se describirán más adelante.

III.2.1 La AdoB₁₂ potencia específicamente la unión de TtCarH a la región intergénica *crtB-TtcarH* *in vitro*

Para estudiar la posible unión de TtCarH a la región propuesta se realizaron ensayos de cambio en la movilidad electroforética y de protección frente a la digestión con DNasa I, tras purificar TtCarH (que se mostró soluble). En dichos ensayos se utilizó inicialmente como sonda un fragmento de DNA de 177 pb que contenía la región intergénica *crtB-TtcarH* (Figura 68). Los EMSA realizados con TtCarH y dicha sonda mostraron que la presencia de AdoB₁₂ potencia considerablemente la unión de la proteína al DNA, provocando la formación de un complejo de baja movilidad y bien definido que no se observó en ausencia de AdoB₁₂ incluso a altas concentraciones de la proteína (Figura 69).

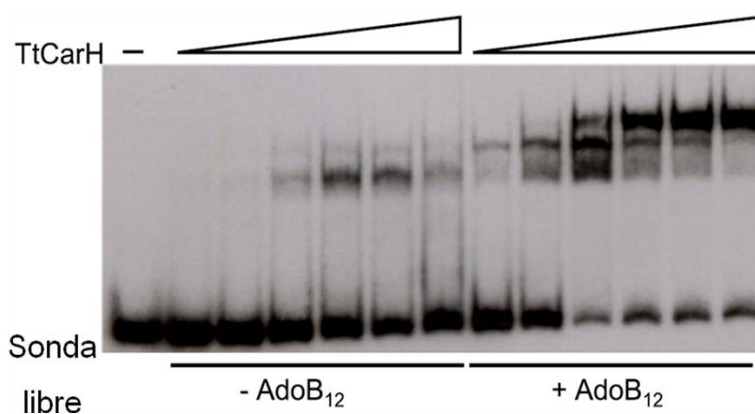


Figura 69. Efecto de la AdoB₁₂ en la unión de TtCarH a la región intergénica *crtB-TtcarH*. EMSA con la sonda de 177 pb y TtCarH (a concentraciones, de izquierda a derecha, de 25, 50, 100, 200, 400 y 900 nM) en oscuridad con y sin AdoB₁₂.

Para delimitar el sitio de unión de TtCarH en el fragmento de 177 pb se realizaron ensayos de protección frente a la digestión con DNasa I. En dichos ensayos, y solo en presencia de AdoB₁₂, se observó protección por TtCarH de una región que abarca aproximadamente desde la posición -56 a la -19, y dos hipersensibilidades situadas entre las dos mitades de pI. El patrón de protección e hipersensibilidades sugiere, por tanto, la unión de TtCarH a una región que incluye pII y al menos parte de pI (Figura 70).

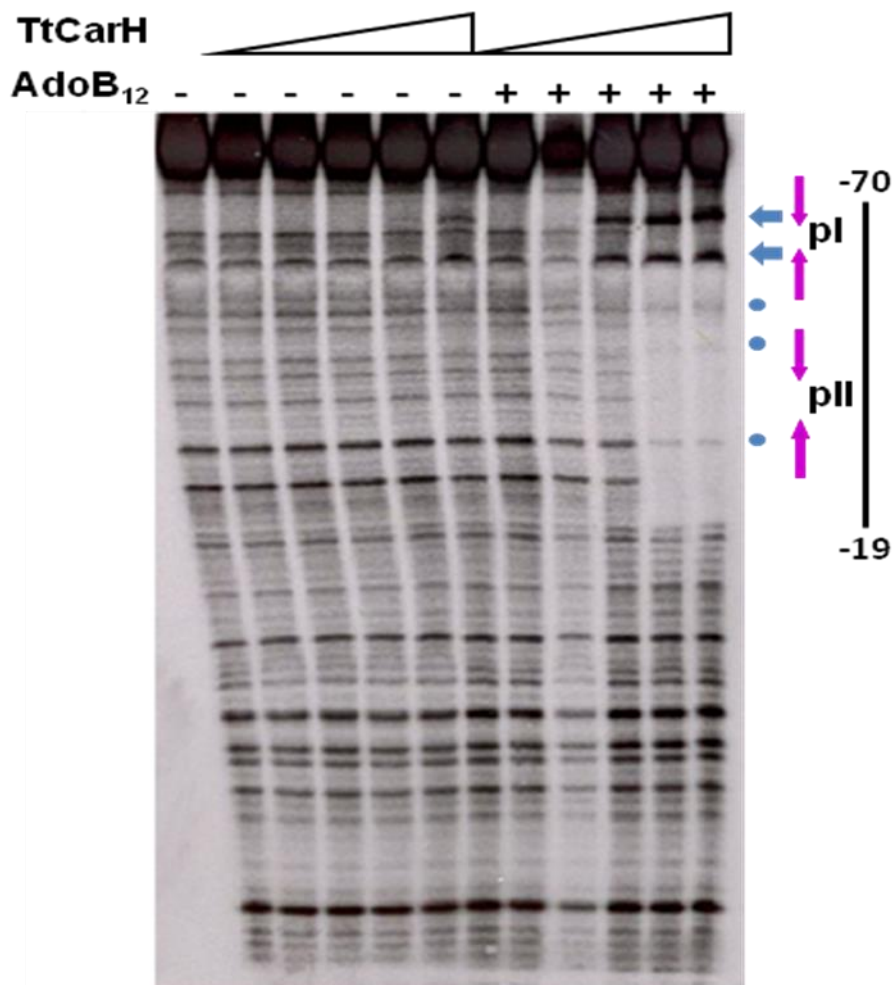


Figura 70. Efecto de la AdoB₁₂ en la unión de TtCarH a la región intergénica *crtB-TtcarH*. Ensayo de protección frente a DNasa I con TtCarH (a concentraciones, de izquierda a derecha, de 25, 50, 100, 200, 400 y 900 nM) con y sin AdoB₁₂. Se utilizó la sonda de 177 pb marcada en la cadena de abajo de la secuencia representada en la Figura 68. Las flechas azules señalan las hipersensibilidades, las rosas los palíndromes pl y pll, y los círculos azules, las bases no protegidas (véase Figura 68).

Para estudiar el posible papel de la AdoB₁₂ en la modulación por la luz de la acción de TtCarH, se compararon los resultados obtenidos a partir de muestras incubadas en oscuridad con los de muestras expuestas a luz de longitudes de onda a las que AdoB₁₂ absorbe (360 nm, 438 nm y 540 nm) o no (luz roja). Como puede observarse en la Figura 71, y al igual que se observó previamente con las quimeras portadoras del dominio C-terminal de TtCarH (QTt1 y QTt2), la iluminación con luz ultravioleta, azul o verde, pero no roja, impidió la aparición del complejo de baja movilidad que se observó en oscuridad y presencia de AdoB₁₂.

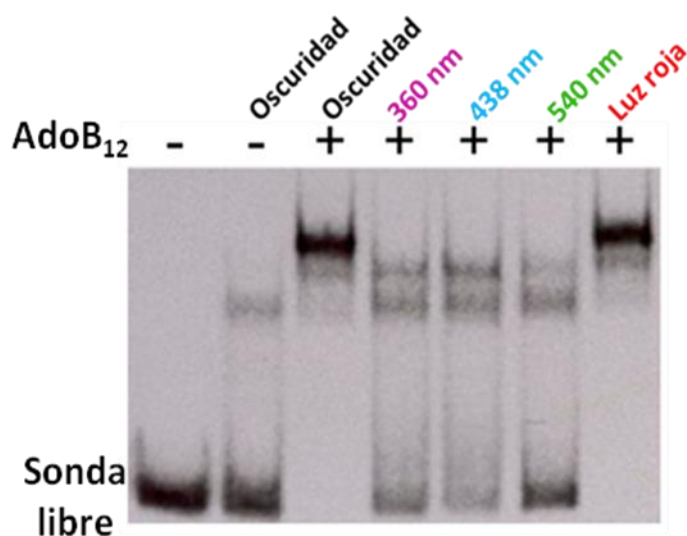


Figura 71. Efecto de la luz de diferentes longitudes de onda en la unión dependiente de AdoB₁₂ de TtCarH a la región intergénica *crtB-TtcarH*. EMSA con la sonda de 177 pb y TtCarH a 400 nM en presencia o ausencia de AdoB₁₂ (a una molaridad cinco veces mayor que la de la proteína) e incubada en la oscuridad (35 min) o expuesta a la luz indicada (5 min) después de 30 minutos de incubación en la oscuridad.

En conjunto, estos resultados indican que TtCarH, como CarH, se une al DNA de una manera dependiente de AdoB₁₂ y que la luz modula dicha unión. Dado que el sitio de unión identificado para TtCarH yace en la región intergénica *crtB-TtcarH*, que debe contener los elementos promotores para la expresión de ambos genes, es posible que TtCarH regule la expresión fotoinducible de *crtB*, así como su propia expresión y, lo que es más importante, que emplee mecanismos fotorreguladores basados en el uso de AdoB₁₂. Esta conclusión viene además avalada por el trabajo de Takano *et al.*, 2011 publicado durante el desarrollo de este trabajo, en el que se demuestra que la regulación fotoinducible de carotenos en *T. thermophilus*, que carece de una proteína homóloga a CarS, depende de TtCarH y de la capacidad de la bacteria de sintetizar B₁₂.

III.2.2 Identificación del operador de TtCarH

Los resultados de los experimentos de protección frente a la digestión con DNasa I presentados en el apartado anterior sugieren que TtCarH se une a una región que engloba pII pero no parece incluir pI al completo (Figura 70). Para delimitar con mayor precisión el operador de TtCarH, se realizaron ensayos de retraso en gel y protección frente a DNasa I con las variantes mutadas y truncadas del fragmento de 177 pb que se muestran en la Figura 72.

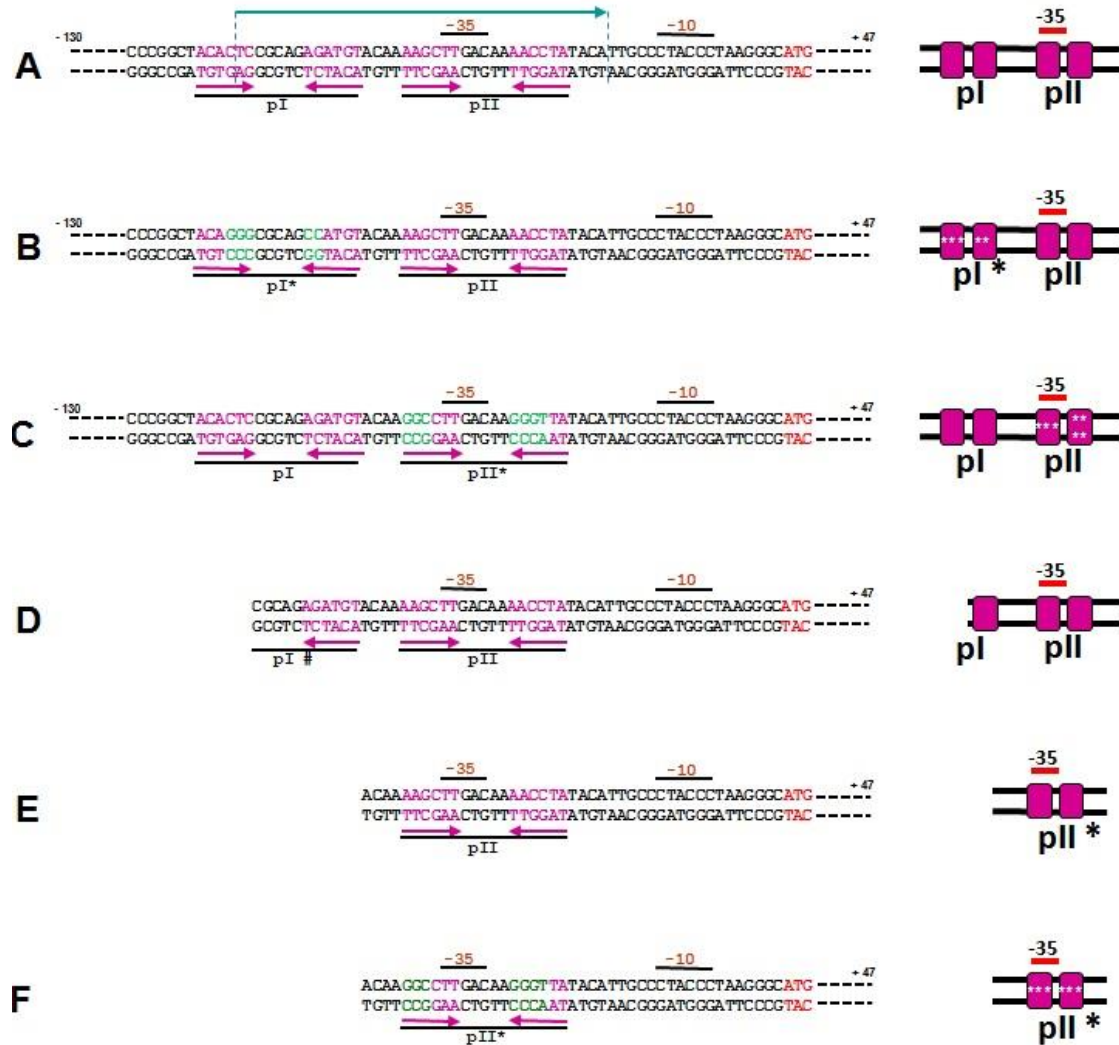


Figura 72. Fragmentos de DNA utilizados en EMSA para delimitar el operador de TtCarH, y su representación esquemática. (A) representa la versión silvestre y (B)-(F) las versiones mutadas o truncadas. Las flechas rosas marcan la extensión de las regiones palindrómicas en la secuencia silvestre. En verde se indican las bases que difieren de la secuencia original, introducidas por mutagénesis dirigida. En (A) una flecha de color azul se extiende a lo largo de toda la zona protegida. En letras rojas se indica el codón de inicio de *crtB*. Los asteriscos negros o blancos indican la presencia de mutaciones. El símbolo # indica que el palíndromo está incompleto.

En primer lugar, para averiguar la relevancia funcional de los dos sitios propuestos, pI y pII, se estudió el efecto de mutar por separado cada uno de los dos sitios en el fragmento de 177 pb. En los ensayos de EMSA, la mutación de las dos mitades del sitio pI no afectó de forma notable a la interacción con TtCarH, pues el patrón de unión de la proteína a esta versión mutada fue similar al obtenido con el fragmento silvestre (Figura 73A). En los ensayos de protección frente a la digestión con DNasa I se observó un patrón de protección menos acusado que el obtenido con el fragmento silvestre a igual concentración de TtCarH, lo que quizás refleje una ligera

disminución de la afinidad (Figura 73B). La mutación de pII produjo un efecto más claro en la unión de TtCarH, observándose en el EMSA una mayor cantidad de DNA libre en presencia de AdoB₁₂ y la pérdida casi completa de la unión de la proteína en ausencia de AdoB₁₂. Aun así, el patrón de bandas observado fue similar al obtenido con la versión silvestre, es decir, un par de bandas retrasadas de poca intensidad en ausencia de AdoB₁₂, y una banda de menor movilidad y más intensa que las dos anteriores en presencia de AdoB₁₂.

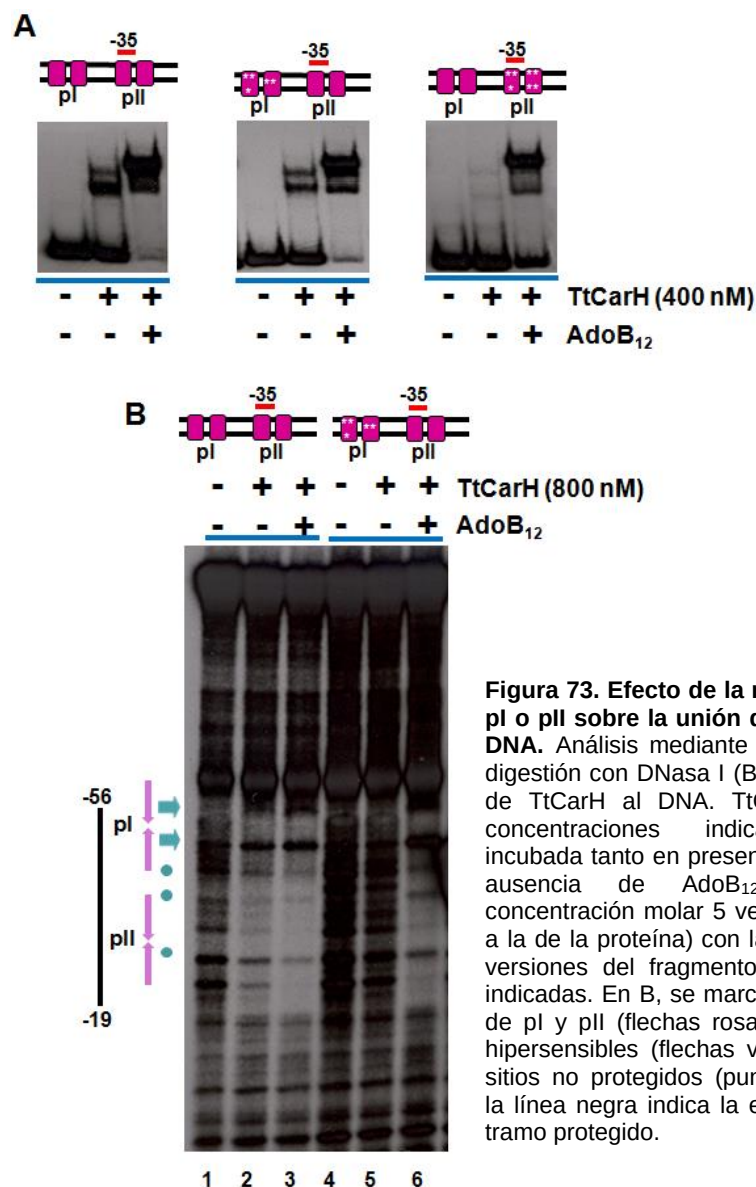
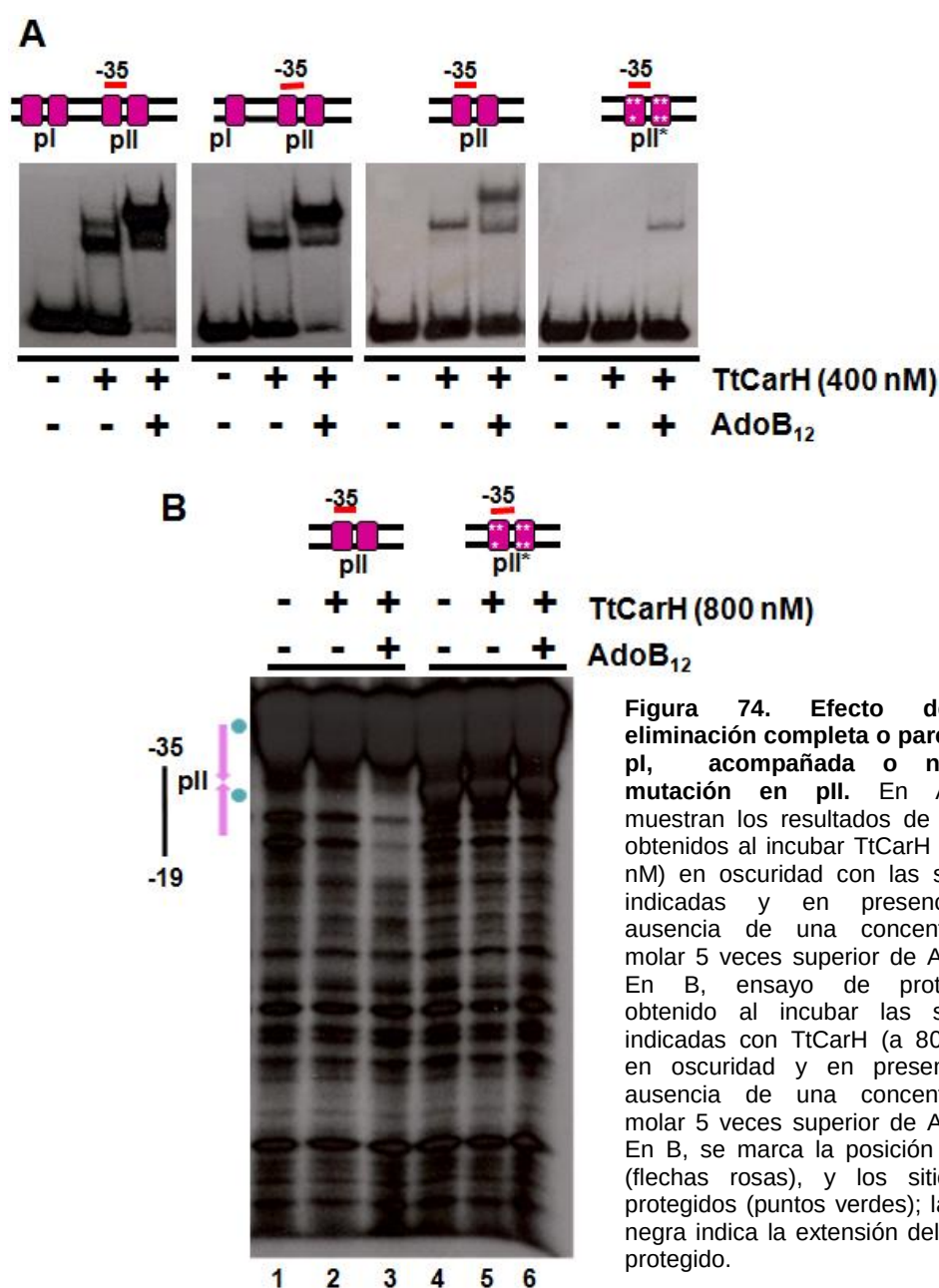


Figura 73. Efecto de la mutación de pI o pII sobre la unión de TtCarH al DNA. Análisis mediante EMSA (A) o digestión con DNasa I (B) de la unión de TtCarH al DNA. TtCarH (a las concentraciones indicadas) fue incubada tanto en presencia como en ausencia de AdoB₁₂ (a una concentración molar 5 veces superior a la de la proteína) con las diferentes versiones del fragmento de 177 pb indicadas. En B, se marca la posición de pI y pII (flechas rosas), los sitios hipersensibles (flechas verdes) y los sitios no protegidos (puntos verdes); la línea negra indica la extensión del tramo protegido.

Los resultados obtenidos con el fragmento de 177 pb mutado en pI o pII apuntan a la participación de pII y, menos claro, de pI, en la unión de TtCarH. Dado que las mutaciones introducidas no destruyen completamente el sitio de unión de la proteína, para evaluar mejor la contribución de cada palíndromo a la unión de TtCarH se procedió a generar versiones truncadas del fragmento de 177 pb (véase Figura 72).

Mientras que la eliminación de la primera mitad de pl no tuvo un efecto apreciable en la afinidad ni el patrón de unión de TtCarH, su eliminación completa provocó una bajada en la intensidad de las bandas retrasadas (particularmente notable en la banda mayoritaria que se obtiene en presencia de AdoB₁₂), acompañada de un aumento paralelo de la cantidad de DNA libre (Figura 74A). Tal resultado lleva a pensar que la segunda mitad de pl, pero no tanto la primera, es importante para la unión de TtCarH. La utilización de una versión truncada, carente de pl y mutada en pll, supuso la pérdida casi completa de la unión de la proteína tanto en los ensayos de EMSA como de protección frente a DNasa I (Figura 74), lo que apunta nuevamente a la importancia de pll en la interacción TtCarH-DNA.



A la luz de estos resultados, cabe concluir que el tramo de DNA que incluye la segunda mitad de pI y todo pII, y se extiende desde la posición -53 hasta la +47, contiene todos los elementos clave para la unión de TtCarH. Que la primera mitad de pI sea un elemento aparentemente prescindible para la unión de TtCarH al DNA contrasta con el operador de *carB* en *M. xanthus*, en el que el elemento pI es el que presenta una interacción más fuerte con CarA/CarH que facilita la unión cooperativa a pII (López-Rubio *et al.* 2002; López-Rubio *et al.* 2004). Por analogía con el operador de CarA/CarH, y por los resultados obtenidos, cabe esperar que la secuencia aguas abajo de pII no influya de forma decisiva en la unión de TtCarH. Para demostrarlo e identificar la región mínima necesaria para la unión de TtCarH, con el fin de utilizar dicho fragmento en los experimentos de cristalización para determinar la estructura del complejo TtCarH-DNA, se realizaron ensayos de retraso en gel con oligonucleótidos de doble cadena de 40, 37, 33 y 30 pb, todos ellos incluyendo pII (Figura 75A). La diferencia entre los oligonucleótidos radica en que incluyan la segunda mitad de pI completa (el de 40 y 37 pb) o no, y en la longitud del tramo de DNA aguas abajo de pII (5 pb en los oligonucleótidos de 30 y 37 pb, y 8 pb en los de 33 y 40 pb). En el caso del operador de CarA/CarH, la presencia de 10 pb, pero no de 4 pb, fue suficiente para garantizar la unión eficaz a pII, probablemente porque si el sitio se encuentra demasiado próximo al extremo 3' no se produce una interacción estable entre la proteína y el DNA.

Con el oligonucleótido más largo, el de 40 pb, que comprende toda la secuencia protegida en los experimentos de digestión con DNasa I y 4 pb adicionales aguas abajo de pII, se observó un comportamiento muy similar al obtenido previamente con el fragmento de 177 pb, en cuanto al número e intensidad relativa de las bandas. La eliminación de 7 pb en la región 5' y/o de 3 pb en la región 3' no tuvo un efecto notable. Incluso con el fragmento más corto, el de 30 pb, se observó un patrón de unión de TtCarH similar al obtenido con el fragmento de 40 pb (Figura 75). Se puede prescindir, por tanto, de gran parte de la secuencia aguas abajo de pII que incluía el fragmento de 177 pb sin afectar significativamente a la unión de TtCarH al DNA. Como ocurre con el operador de CarA/CarH, la presencia de unas pocas bases aguas abajo de pII parecen bastar para permitir el reconocimiento de su operador por TtCarH. Por otro lado, se puede también prescindir de parte de la segunda mitad de pI (las dos primeras primeras bases) sin que se vea afectada de forma notable la unión de TtCarH.

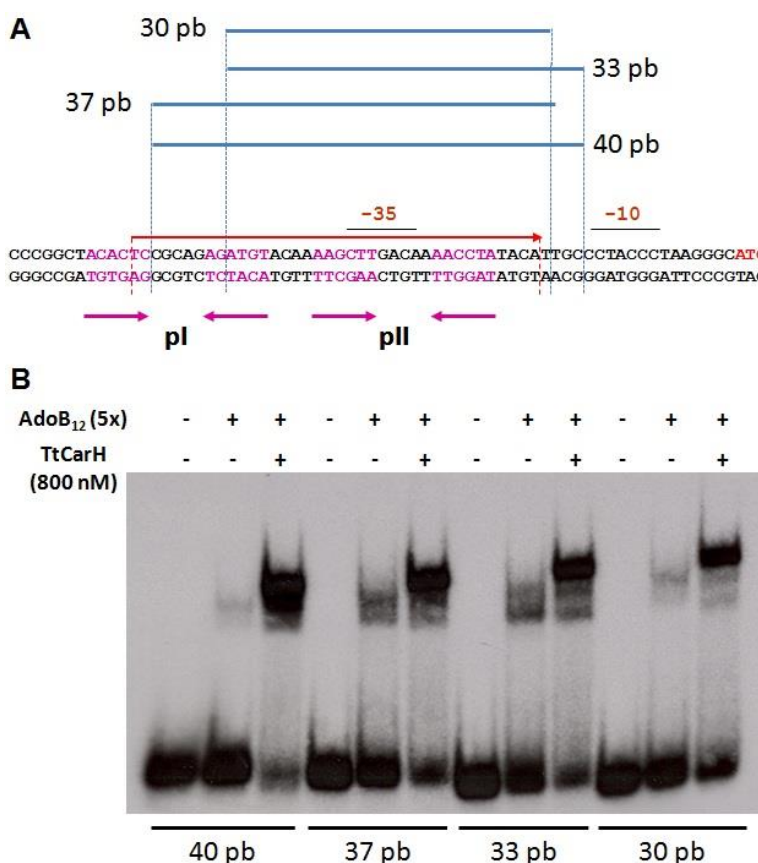


Figura 75. Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la delimitación del sitio mínimo de unión de TtCarH. A, secuencia de los oligonucleótidos utilizados en el ensayo. La extensión de los oligonucleótidos se indica con las líneas azules sobre la secuencia. B, resultados del experimento de EMSA tras incubar la sonda indicada con la proteína (a 800 nM) en oscuridad y en presencia y ausencia de AdoB₁₂ (a una concentración molar 5 veces superior a la de la proteína).

III.2.4 Análisis de la reversibilidad de la acción fotosensora mediada por AdoB₁₂

En general, los fotorreceptores presentan dos estados moleculares interconvertibles, el basal y el excitado, que están determinados por la fotoquímica particular del cromóforo asociado (véase Apartado I.7). El regreso al estado basal tras la excitación con luz de una determinada longitud de onda permite la regeneración del fotorreceptor (Purcell y Crosson 2008). La acción conocida de la luz sobre la AdoB₁₂, el cromóforo de CarH y TtCarH, consiste en la ruptura homolítica del enlace Co-C para dar lugar a hidroxocobalamina y al radical 5' desoxiadenosina (Bond *et al.* 1972; Chen y Chance 1990; Schwartz y Frey 2007). Los estudios *in vitro* realizados en este trabajo con TtCarH o la quimera QTt2 sugieren que, en efecto, los monómeros resultantes del desmantelamiento en la luz de los tetrámeros formados en presencia de AdoB₁₂, se encuentran unidos a OHB₁₂. Por otro lado, los ensayos de calorimetría isotérmica de

titulación (Apartado III.1.4) apuntan a que la OHB₁₂ se une a TtCarH con una afinidad muy inferior a la AdoB₁₂ (en dichos ensayos no se detectó cambio de calor si la AdoB₁₂ había sido expuesta previamente a la luz). Por ello, una posible vía para la regeneración en la oscuridad del complejo CarH/TtCarH-AdoB₁₂, tras su inactivación por la luz, podría ser el desplazamiento de la OHB₁₂ (unida a los monómeros) por AdoB₁₂ libre. Para investigar esta posibilidad se realizaron ensayos de cromatografía de exclusión molecular y de EMSA con TtCarH que, tras ser incubada en presencia de AdoB₁₂ o de OHB₁₂, se sometió a iluminación y, posteriormente, a la presencia de AdoB₁₂ libre en condiciones de oscuridad.

Sorprendentemente, en los ensayos de cromatografía de exclusión molecular no se observó un regreso a la forma tetramérica de TtCarH (observada en oscuridad y presencia de AdoB₁₂) tras la adición de AdoB₁₂ a una muestra de TtCarH-AdoB₁₂ que había sido expuesta previamente a la luz (compárese la Figura 76A y B). Por el contrario, sí se observó la formación de tetrámeros cuando la AdoB₁₂ se añadió a una preparación de TtCarH que había sido incubada con OHB₁₂ en la oscuridad y que, sin la adición de AdoB₁₂, eluyó como un monómero (compárese la Figura 76A y B).

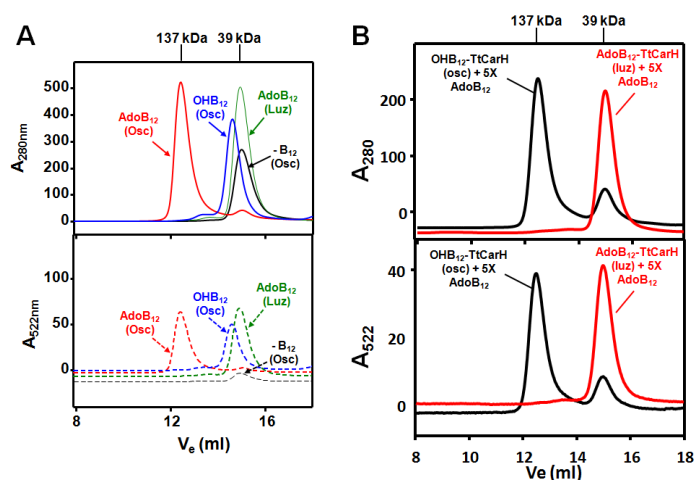


Figura 76. Ensayos de cromatografía de exclusión de tamaño con TtCarH en presencia de AdoB₁₂ y OHB₁₂. Muestras mantenidas en oscuridad (A) o sometidas a iluminación (B) y adición posterior (trazo rojo) o no (trazo negro) de nueva AdoB₁₂. La proteína y las cobalaminas se detectaron midiendo la absorbancia a 280 nm y 522 nm, respectivamente.

Cabe esperar que el cambio aparentemente irreversible en el estado de oligomerización del complejo TtCarH-OHB₁₂ producido por la luz vaya asociado a la pérdida o alteración permanente de la capacidad de unión de la proteína al DNA. Para comprobarlo se realizaron ensayos de retraso en gel con TtCarH incubada en presencia de AdoB₁₂ o OHB₁₂, sometida a iluminación y, por último, incubada con nueva AdoB₁₂ en oscuridad. Para realizar estos ensayos se utilizó TtCarH purificada en presencia de AdoB₁₂ (holoproteína) y que, por tanto, garantiza una estequiometría AdoB₁₂:TtCarH de 1:1. Como se muestra en la Figura 77 (calles 3 y 4), la holoproteína mostró un patrón de unión similar al observado previamente con la apoproteína en

presencia de AdoB₁₂. La iluminación de la holoproteína (Figura 77, calle 5) generó un patrón de unión parecido al observado en ausencia de AdoB₁₂ (desaparición de la banda de menor movilidad; Figura 77 calle 2). Tras la exposición de la holoproteína a la luz, ni siquiera un exceso de AdoB₁₂ de hasta 100 veces permitió recuperar la banda de menor movilidad observada en la oscuridad (Figura 77 calles 6 a 12), aunque sí se detectó una disminución en la cantidad de DNA libre a concentraciones crecientes de AdoB₁₂ y la aparición de bandas de distintas movilidades e intensidades.

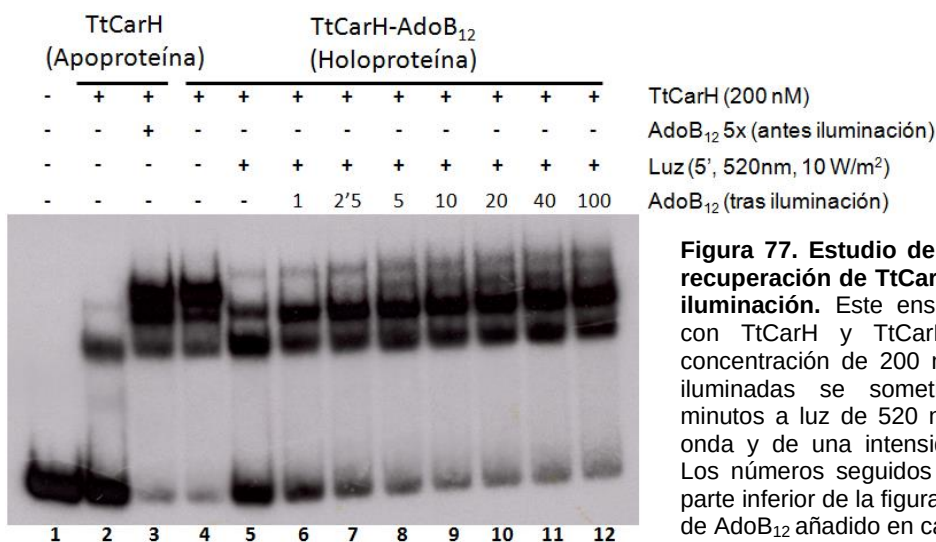


Figura 77. Estudio de la capacidad de recuperación de TtCarH-AdoB₁₂ tras su iluminación. Este ensayo fue realizado con TtCarH y TtCarH-AdoB₁₂ a una concentración de 200 nM. Las muestras iluminadas se sometieron durante 5 minutos a luz de 520 nm de longitud de onda y de una intensidad de 10 W/m². Los números seguidos de una "x" en la parte inferior de la figura indican el exceso de AdoB₁₂ añadido en cada caso.

Por el contrario, cuando la AdoB₁₂ se añadió a una preparación de TtCarH que había sido previamente incubada con OHB₁₂ (que por sí misma no promueve la unión de TtCarH al DNA) sí se detectó la recuperación del patrón de unión observado en oscuridad para la holoproteína o la apoproteína en presencia de AdoB₁₂ (Figura 78 calles 8-14).

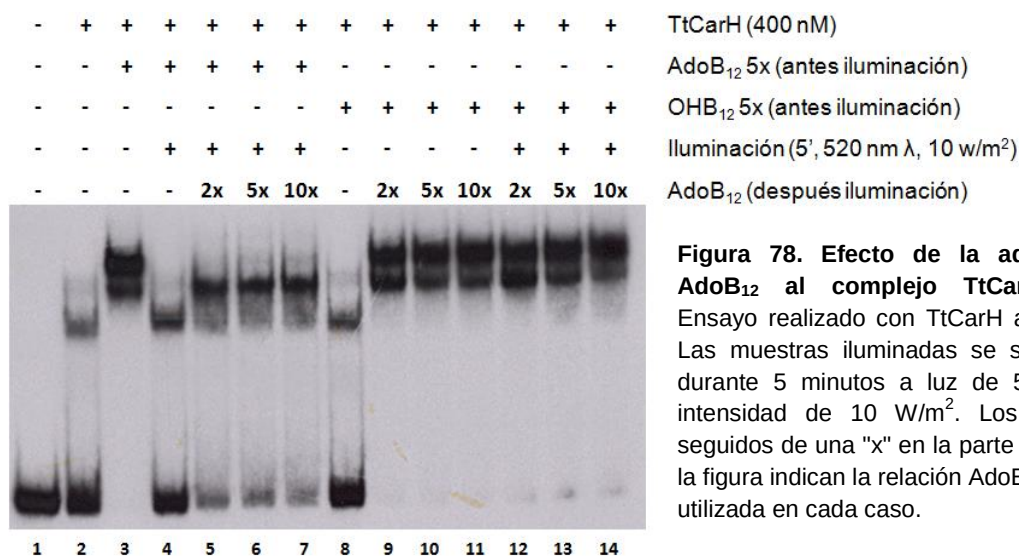


Figura 78. Efecto de la adición de AdoB₁₂ al complejo TtCarH-OHB₁₂. Ensayo realizado con TtCarH a 400 nM. Las muestras iluminadas se sometieron durante 5 minutos a luz de 520 nm e intensidad de 10 W/m². Los números seguidos de una "x" en la parte inferior de la figura indican la relación AdoB₁₂:TtCarH utilizada en cada caso.

Los ensayos de cromatografía de exclusión molecular y de EMSA apuntan, por tanto, a que el complejo TtCarH-OHB₁₂ que deriva de la iluminación de TtCarH-AdoB₁₂ no es equivalente al que se forma cuando TtCarH se incubaba directamente con OHB₁₂, y a que el intercambio de la OHB₁₂ por AdoB₁₂ no es una vía eficaz para la recuperación de fotorreceptor en su estado basal. Para estudiar la base molecular de la diferencia de comportamiento entre los complejos unidos a OHB₁₂, se utilizó HPLC acoplado a espectrometría de masas (Figura 79). EL complejo TtCarH-OHB₁₂ formado por la incubación en oscuridad de TtCarH con OHB₁₂ mostró un peso molecular similar (~33160 Da), equivalente al esperado para un monómero de la proteína, tanto si se mantuvo en condiciones de oscuridad como si se trató con luz. Por el contrario, la holoproteína TtCaH-AdoB₁₂ presentó un peso molecular por monómero superior (34493 Da) cuando se expuso a la luz que cuando se mantuvo en la oscuridad (33142 Da). Que la diferencia de peso molecular entre ambas formas, 1351 Da, se corresponda precisamente con el peso molecular del anillo de cobalamina (sin el ligando 5' desoxiadenosina) y que el pico de 34493 Da absorba a 361 nm mientras que el de 33142 Da no, sugiere que tras la iluminación de TtCarH-AdoB₁₂ se genera un complejo muy estable con el anillo de cobalamina. Dicho complejo no es equivalente al formado por la incubación de TtCarH con OHB₁₂, y explica que la adición de nueva AdoB₁₂ no conduzca a la regeneración del complejo TtCarH-AdoB₁₂.

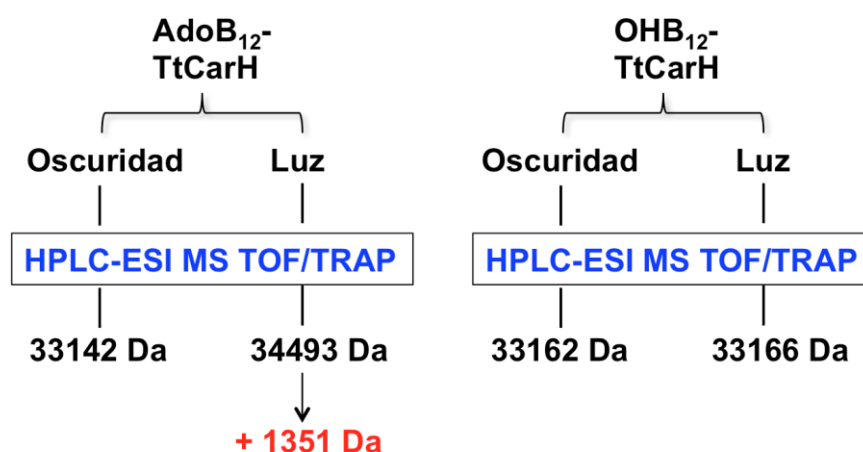


Figura 79. Análisis del efecto de la luz mediante espectrometría de masas. La holoproteína TtCarH-AdoB₁₂ o el complejo TtCarH-OHB₁₂ (formado por la incubación en oscuridad de TtCarH con OHB₁₂) mantenidos en oscuridad o expuestos a la luz, se sometieron a HPLC acoplado a espectrometría de masas: ESI MS (electrospray ionization mass spectrometry) TOF (time of flight) o ESI MS Trap. Los números indican el peso molecular estimado.

IV. DISCUSIÓN

IV.1 Mecanismo de acción molecular de CarH y su dependencia de B₁₂

La respuesta a la luz en *M. xanthus* depende al menos de diez genes estructurales y nueve reguladores (*carF*, *carR*, *carQ*, *carS*, *ihfA*, *carD*, *carG*, *carA* y *carH*). Estudios previos llevados a cabo en nuestro grupo llevaron a establecer que la expresión de nueve de los diez genes estructurales, agrupados en el superoperón *carB-carA*, se encuentra regulada negativamente por CarA y CarH, y positivamente por el antirrepresor CarS.

La similitud de secuencia entre CarA y CarH (35% identidad, 49% similitud) sugiere que se trata de los productos de dos genes parálogos (los dos últimos genes del operón *carA*). Además, tanto CarA como CarH están constituidas por dos dominios estructural y funcionalmente independientes: (i) el dominio N-terminal (CarANt, CarHNt), que media la interacción con el DNA y con CarS; y (ii) el dominio C-terminal (CarACt, CarHCt), que media la oligomerización y la interacción con B₁₂ (Cervantes y Murillo 2002; Pérez-Marín *et al.* 2004). El dominio N-terminal, muy similar en ambas proteínas (41% identidad, 62% similitud), se asemeja al dominio hélice-giro-hélice “alado” de unión al DNA de los factores transcripcionales de la familia MerR (Botella *et al.* 1995; Botella 1996; Navarro-Avilés *et al.* 2007). Aunque CarANt y CarHNt se unen *in vitro* al mismo operador en P_B (CarHNt con una afinidad por el DNA significativamente inferior), ninguno de los dos dominios es suficiente *in vivo* para reprimir P_B, lo que pone de manifiesto que el dominio C-terminal es necesario para su actividad represora (Navarro-Avilés *et al.* 2007; Pérez-Marín *et al.* 2008). La señal de identidad de CarACt y CarHCt, que muestran un 36% de identidad y un 42% de similitud, es la presencia de un motivo de unión a B₁₂ similar al de enzimas como, por ejemplo, la sintetasa de metionina, que usan B₁₂ como cofactor (Cervantes y Murillo 2002; Pérez-Marín *et al.* 2004; Pérez-Marín *et al.* 2008).

Al inicio de este trabajo se había demostrado que CarA era capaz de unir B₁₂, tal como cabría esperar de la presencia del mencionado motivo en CarACt. Sin embargo, aunque la eliminación de CarACt (que media la interacción de CarA consigo misma) condujo a una pérdida de actividad *in vivo* y a una bajada de la afinidad por el DNA *in vitro*, ni la presencia de B₁₂ ni la existencia de un motivo de unión a B₁₂ intacto en la proteína resultaron necesarios para la actividad represora de CarA (Pérez-Marín *et al.* 2008). Paradójicamente, una estirpe con *carA* delecionado fue capaz de reprimir la carotenogénesis en oscuridad y presencia de B₁₂, siempre y cuando el operador de *carB* y el gen aguas abajo de *carA* estuvieran intactos. Dicha observación llevó a la

identificación de *carH* como el gen responsable de la represión de P_B dependiente de B_{12} (Pérez-Marín *et al.* 2008).

Resulta sorprendente que CarA y CarH, con una similitud del 49% y una arquitectura de dominios y función biológica semejantes, se diferencien de forma tan drástica en lo que respecta a su dependencia de B_{12} . Los objetivos principales de este trabajo han sido investigar la base molecular de dicha diferencia de comportamiento, determinar qué forma de cobalamina ($AdoB_{12}$ o MeB_{12}) utiliza CarH y estudiar el posible papel de B_{12} en la respuesta directa a la luz. También, dado que existen proteínas tipo CarA/CarH en otras bacterias, se ha iniciado el estudio de la posible conservación evolutiva del papel fotorregulador mediado por B_{12} descubierto en este trabajo.

IV.1.1 La actividad dependiente de B_{12} reside en el dominio C-terminal de CarH

En principio, la dependencia de B_{12} en CarH podría estar mediada por cualquiera de sus dos dominios, aunque la presencia del motivo de unión a B_{12} en su dominio C-terminal apuntaría a una localización de dicha dependencia en CarHCt. En cualquier caso, para discernir entre las dos posibilidades, en este trabajo se construyeron dos proteínas quiméricas, Q1 y Q2, que portan el dominio N-terminal de CarA y el C-terminal de CarH. Si la diferencia funcional entre CarA y CarH en cuanto a su dependencia o no de B_{12} residiese en sus dominios N-terminales, cabría esperar que las proteínas quiméricas fuesen independientes de B_{12} *in vivo*; pero si, por el contrario, dicha dependencia residiese en sus dominios C-terminales, se esperaría que las quimeras mostrasen actividad represora solo en presencia de la vitamina. A la luz de los resultados obtenidos, en los que ambas quimeras provocaron la represión de P_B en oscuridad de manera dependiente de cobalaminas, se puede concluir que el dominio C-terminal de CarH es necesario y suficiente para conferir la actividad dependiente de B_{12} .

En una tesis previa del grupo (Pérez-Marín 2007) se habían realizado varios intentos, sin éxito, de purificar la proteína CarH para abordar *in vitro* el estudio de su dependencia de B_{12} . Un acierto de este trabajo, que ha permitido obviar la dificultad de purificar CarH, ha sido la construcción de las quimeras QTt1 y QTt2, con el dominio N-terminal de CarA y CarH, respectivamente, fusionado al dominio C-terminal de TtCarH. Aunque TtCarH no fue capaz de complementar *in vivo* la falta de CarA o CarH en *M. xanthus* (Navarro-Avilés *et al.* 2007), probablemente por su incapacidad para

interaccionar con el operador de *carB*, las quimeras con TtCarHCt se comportaron *in vivo* como CarH, reforzando así la conclusión de que el dominio C-terminal funciona como un módulo autónomo que confiere la actividad dependiente de B₁₂. Además, las quimeras QTt1 y QTt2 resultaron solubles, como suele ocurrir con otras proteínas de *T. thermophilus*, facilitando así los estudios *in vitro* que han contribuido a esclarecer el papel de B₁₂ en la modulación de la acción molecular de CarH y conocer qué forma de cobalamina es utilizada por la proteína.

Los ensayos de unión al DNA *in vitro* usando QTt1 y QTt2 demuestran claramente que de las dos formas de cobalamina que pueden usarse como cofactores, la MeB₁₂ o la AdoB₁₂, es esta segunda la que modula la acción de TtCarHCt y lo hace provocando un aumento significativo en la afinidad por el DNA. Dicho efecto fue más evidente para QTt2 que para QTt1, probablemente debido a que la afinidad intrínseca del dominio N-terminal de CarH por su operador es bastante inferior a la del dominio equivalente en CarA. Que la represión de P_B mediada por CarH y B₁₂ se pierda en una estirpe de *M. xanthus* portadora de una delección en el gen *pduO*, que determina la síntesis de la adenosiltransferasa, indica que la conclusión obtenida a partir de los ensayos *in vitro* con las quimeras QTt1 y QTt2 sobre la forma de cobalamina utilizada por TtCarHCt, la AdoB₁₂, son directamente aplicables a CarH. Sorprende, sin embargo, que la adición exógena de AdoB₁₂ al medio de cultivo no restablezca la capacidad represora de CarH. Una posible explicación sería que la enzima PduO de *M. xanthus*, como se ha propuesto para otras adenosiltransferasas (Yamanishi *et al.* 2005), además de la función catalítica tenga la función de actuar como "escolta" intracelular de la AdoB₁₂ hasta CarH. Según el modelo propuesto, la proteína "escolta" evita que este raro cofactor, que se encuentra a bajas concentraciones en la célula y es altamente inestable, se diluya o reaccione con otros componentes celulares antes de llegar a su diana. Si esta especulación fuera correcta, cabría esperar una interacción entre CarH y PduO, que no ha podido ser observada en los ensayos de DHB (comunicación personal de la Dra. M^a del Carmen Polanco). Otra explicación posible a la falta de efecto de la AdoB₁₂ es que el transportador del cofactor a través de la membrana o alguna otra proteína elimine el grupo adenosilo, tal como ocurre con la proteína portadora de cobalaminas humana MMACHC. Según las predicciones, esta proteína interacciona con el transportador lisosomal LMBD1 permitiendo el paso de las cobalaminas al citoplasma. Una vez las cobalaminas (CNB₁₂, MeB₁₂ o AdoB₁₂) están en el citoplasma, MMACHC se une a ellas y cataliza la eliminación del sustituyente superior del cobalto para dar lugar a cob(II)alamina que es convertida posteriormente a sus formas activas, MeB₁₂ o AdoB₁₂ (Banerjee *et al.* 2009). La existencia de un mecanismo de transporte parecido en *M. xanthus* podría explicar que la adición de

AdoB₁₂ exógena no rescata la falta de PduO. No obstante, poco se sabe de los mecanismos de eliminación del sustituyente superior de las cobalaminas en bacterias. Las observaciones experimentales indican que bacterias como *Salmonella typhimurium* o *M. xanthus* tienen la capacidad de eliminar el grupo CN de la CNB₁₂ para transformarla en sus formas activas, pero se desconoce qué enzima cataliza dicha reacción.

Como se mencionó en la *Introducción*, el análisis de la secuencia del dominio C-terminal de CarA y CarH sugiere la existencia de dos subdominios. El primero (extremo amino), según las predicciones sobre estructura secundaria, presentaría cuatro hélices α que podrían adoptar la topología en dos pares de hélices α antiparalelas típica del subdominio I de las sintetetas de metionina (Figura 80). Dicho subdominio I, también llamado “región caperuza”, es el que se encarga de contactar con el ligando superior y limitar la accesibilidad del solvente al sitio activo. A diferencia de las sintetetas de metionina, en las isomerasas dependientes de AdoB₁₂ el subdominio que contacta con la cara superior del cofactor presenta una estructura de tipo barril TIM, constituida por 8 hélices α alternadas con 8 láminas β paralelas (Figura 80). El otro subdominio que se predice en CarACT y CarHCt se asemejaría al subdominio II tanto de la sinteteta de metionina como de las isomerasas, que a su vez es similar al dominio Rossmann de unión a nucleótidos y que en las enzimas dependientes de B₁₂ está implicado en contactar con el dimetilbenzimidazol y la cara inferior del anillo corrínico (Figura 80). Resulta, por tanto, llamativo que CarH y las quimeras QTt1 y QTt2, cuyo subdominio I parece asemejarse más al de la sinteteta de metionina, dependan de AdoB₁₂ y no de MeB₁₂.

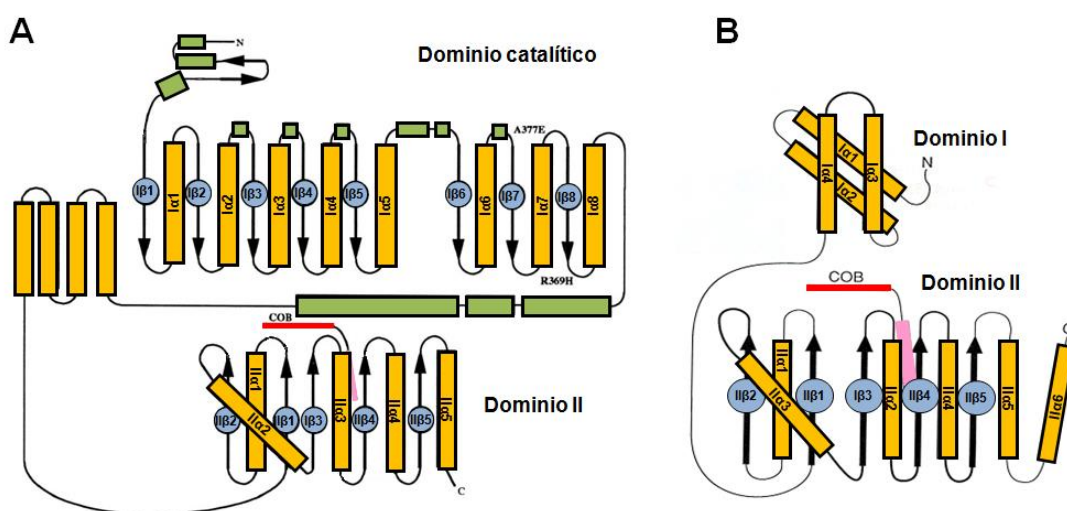


Figura 80. Comparación de los dominios implicados en la unión a cobalaminas de la mutasa de glutamato (A) y de la sinteteta de metionina (B). En rojo se representa el anillo de cobalamina de la B₁₂ y en rosa el Dbm (Modificado a partir de Drennan *et al.*, 1994a; Thoma y Leadlay, 1996).

En la sintetasa de metionina de *E. coli*, los residuos conservados F708 y L715 contribuyen a la formación de una “jaula” hidrofóbica alrededor del grupo metilo (la F se dispone directamente sobre el ligando superior), en la que participan también la V704 y la V718 (Figura 77; Drennan *et al.* 1994b; Amaratunga *et al.* 1996). La mutación a A de la F708 o la L715 provoca un aumento dramático en la tasa de fotólisis, lo que sugiere que, en la enzima en reposo, la “caperuza” recubre la cara superior del cofactor y la protege de la pérdida del grupo metilo por fotólisis u otras reacciones adventicias (Jarrett *et al.* 1996). Puesto que el subdominio I es el que establece contactos con el ligando superior cabe esperar que sea en dicho subdominio en el que radique la especificidad por AdoB₁₂, en vez de MeB₁₂, en CarH y las quimeras con TtCarHCt. Cuando se comparan las secuencias de los dominios de unión a cobalamina de CarH y TtCarH con los de la sintetasa de metionina de *M. xanthus* y de *E. coli* llaman la atención los siguientes cambios en la región “caperuza”. Tanto en CarH como en TtCarH aparece un residuo de W en la posición en la que ambas sintetasas de metionina presentan la F que ha sido implicada en el contacto con el grupo metilo. Además, en CarA, que no depende de B₁₂, destaca la ausencia de varios residuos en dicha región, incluido el W/F. Por otro lado, la V718 que participa en la formación de la “jaula hidrofóbica” de la sintetasa de metionina de *E. coli*, y que está conservada en la proteína homóloga de *M. xanthus*, se encuentra sustituida tanto en CarH como TtCarH (también en CarA) por un residuo de E, seguido de una H y una L que tampoco tienen su correspondencia en las sintetasas de metionina (Figura 81).

finos sobre la interacción entre el cofactor y la proteína reguladora. A este respecto, hay que señalar que ya se encuentra muy avanzada la determinación de la estructura cristalográfica del complejo TtCarH/AdoB₁₂, un trabajo que se está realizando en colaboración con el grupo de la Prof. Catherine L. Drennan y su doctorando Marco Jost en el MIT (*Massachusetts Institute of Technology, USA*). La Dra. Drennan es una experta en el campo y participó en la determinación de la primera estructura tridimensional descrita de un dominio de unión a B₁₂, el de la sintetasa de metionina de *E. coli* (Drennan *et al.* 1994a).

IV.1.2 Acción de las cobalaminas sobre CarH

Los ensayos de retraso en gel y el estudio fenotípico de la estirpe portadora de la delección de *pduO* han llevado a demostrar que la AdoB₁₂ es necesaria para que CarH reprima la expresión de *carB* *in vivo* y que, probablemente, lo hace provocando un aumento significativo en la afinidad de CarH por el DNA. Estudios previos del grupo habían puesto de manifiesto que la interacción de CarA con su operador *in vitro* y la capacidad represora de CarA y CarH *in vivo* se ven drásticamente disminuidas en ausencia de su dominio C-terminal (Pérez-Marín *et al.* 2008), demostrando así la importancia del módulo de unión a B₁₂. En CarA, dicho dominio media tanto la interacción con B₁₂ como la de la proteína consigo misma (López-Rubio *et al.* 2002; Pérez-Marín *et al.* 2008). Sin embargo, las mutaciones en CarACt que reducen significativamente su afinidad por la vitamina, no tuvieron efecto ni en su capacidad de autointeracción ni en su función *in vivo* (Pérez-Marín *et al.* 2008). Estos datos sugieren que lo que hace de CarACt un elemento crítico para el funcionamiento de CarA es su papel mediador de la interacción de CarA consigo misma. Por el contrario, mutaciones similares en el motivo de unión a B₁₂ de CarHCt provocaron una merma notable de la represión de *carB* por parte de esta proteína *in vivo*. Este resultado, unido a la observación inicial de que CarH, en los ensayos de doble híbrido de levaduras, mostró una interacción consigo misma mucho más débil que CarA (Pérez-Marín *et al.* 2008), llevó a sospechar que la dependencia de B₁₂ de CarH podría resultar de una oligomerización de la proteína dependiente de cobalaminas. Debido probablemente a que la levadura *Saccharomyces cerevisiae* no usa B₁₂ como cofactor (Hansen *et al.* 1997), los ensayos de doble híbrido de levaduras no mostraron un efecto de la vitamina en la interacción de CarH consigo misma (Pérez-Marín 2007).

Por ello, en este trabajo se ha utilizado el ensayo del doble híbrido bacteriano (DHB) (Karimova *et al.* 1998; Karimova *et al.* 2000), basado en *E. coli*, un organismo

que aunque incapaz de sintetizar B₁₂ *de novo*, sí es capaz de generar AdoB₁₂ a partir de CNB₁₂ (Roth *et al.* 1996; Zhang *et al.* 2009). Los resultados obtenidos (Figura 51) reflejan que la interacción de CarHCt consigo misma es unas 60 veces más fuerte en presencia de B₁₂ que en su ausencia. Tal efecto de la vitamina no se observó usando el mismo sistema con CarACt, que fue capaz de interaccionar consigo misma tanto en ausencia como en presencia de B₁₂. Además, la mutación H193A, que afecta al motivo de unión a cobalaminas de CarHCt, provocó una bajada de unas 50 veces en las medidas de interacción de esta proteína consigo misma en presencia de B₁₂. En cambio, la mutación equivalente en CarA (H175A) no produjo ningún efecto en su capacidad de oligomerización. Así pues, los resultados del DHB avalan la hipótesis inicial de que la acción de CarH depende de B₁₂ porque, a diferencia de CarA, es incapaz de oligomerizar en ausencia de la vitamina.

Estudios previos del grupo habían demostrado que CarA forma dímeros en solución, que se unen de forma cooperativa al operador de *carB*; así, la unión de un dímero a la región pI, por la que muestra mayor afinidad, favorece la unión de un segundo dímero a la región pII y el consiguiente bloqueo de la unión de la polimerasa de RNA (López-Rubio *et al.* 2002; Pérez-Marín *et al.* 2004). Por tanto, para que se produzca la represión de P_B se requiere el ensamblaje secuencial de dos dímeros de CarA, que probablemente acaban interaccionando entre sí para formar un tetrámero unido al DNA operador. Los ensayos de DHB realizados en este trabajo permiten demostrar que CarH interacciona consigo misma de manera dependiente de B₁₂, pero no aportan información sobre el estado oligomérico que se alcanza en presencia de la vitamina ni sobre la estequiometría del complejo AdoB₁₂-CarH. Para averiguarlo, en este trabajo se ha utilizado la cromatografía de exclusión de tamaño o el entrecruzamiento molecular que, no solo permiten corroborar los resultados del DHB sobre la existencia o no de interacciones proteína-proteína, sino también establecer el número de moléculas que integran el complejo y la relación estequiométrica proteína:cobalamina. Ante la imposibilidad de purificar CarHCt, en estos ensayos se han utilizado TtCarHCt y QTt2. Los resultados demuestran que ambas proteínas se unen a los tres tipos de cobalaminas con una relación proteína:cobalamina 1:1 y que en presencia de CNB₁₂ y MeB₁₂ eluyen como monómeros (lo mismo que en ausencia de cobalaminas), mientras que en presencia de AdoB₁₂ lo hacen como tetrámeros. Dado que QTt2 complementa la falta de función de CarH en *M. xanthus*, es posible que la presencia de AdoB₁₂ induzca también el ensamblaje de tetrámeros de CarH. Alternativamente, y teniendo en cuenta que uno de los mecanismos utilizados por las proteínas termotables para resistir las elevadas temperaturas es formar oligómeros con mayor número de subunidades que sus homólogos mesofílicos (Walden *et al.*

2001), CarH podría formar dímeros en solución (aunque de una forma dependiente de AdoB₁₂) como su homólogo más cercano, CarA.

Que la presencia de AdoB₁₂ induzca la tetramerización de TtCarHCt, en vez de la dimerización, explica las diferencias observadas entre el patrón de unión de CarA a su operador bipartito y el mostrado por las quimeras QTt1 y QTt2. Así, en los ensayos *in vitro* de unión a DNA con QTt1 y QTt2 no se observe la ocupación progresiva del operador bipartito, propia de la unión cooperativa de dos dímeros de CarA, sino la ocupación “de un solo golpe” tanto de pl como de pll. No obstante, una vez unida, la quimera QTt1 (que contiene el dominio de unión al DNA de CarA) genera un patrón de digestión con DNasa I idéntico al de CarA, con la misma extensión de la región protegida (de -70 a -19) y las mismas posiciones hipersensibles (-55 y -63; Figura 44). Algo similar ocurre con la quimera QTt2, que contiene el dominio de unión al DNA de CarH, aunque en este caso aparecen dos sitios hipersensibles adicionales (-45 y -34), que sugieren ciertas diferencias entre la unión de CarHnt y la de CarAnt a su operador. Ya que la DNasa I corta el DNA por el surco menor (Craig *et al.* 1995), la aparición de hipersensibilidades suele interpretarse como indicativa de un doblamiento más pronunciado hacia el surco mayor del DNA. Por tanto, es razonable pensar que la unión de CarH al DNA produce una distorsión del DNA operador mayor que la que produce CarA. Que los patrones de digestión por DNasa I generados por CarA y por QTt1/ AdoB₁₂ sean idénticos indica que la unión al DNA en un solo paso, favorecida por el dominio TtCarHCt, no afecta de forma significativa al modo de interacción de estas proteínas con su operador. No obstante, es bien conocido que la cooperatividad tiene la ventaja de permitir que cambios mínimos en los niveles de la proteína reguladora tengan un efecto pronunciado en la expresión génica. Por tratarse de uno de los primeros ejemplos descritos, cabe citar la importancia de la cooperatividad en la regulación de la expresión génica mediada por el represor cI del fago λ . Este represor está constituido por un dominio N-terminal de unión al DNA (de tipo HTH) y por un dominio C-terminal, responsable tanto de la dimerización como de la interacción cooperativa entre dímeros (véase Koudelka, 2000). El represor cI se une a un operador tripartito, O_R, constituido por tres regiones: O_R1, O_R2, y O_R3. La unión de un dímero del represor a su sitio de alta afinidad, O_R1, facilita la unión de un segundo dímero al sitio de baja afinidad, O_R2. Ambos sitios están, por tanto, ocupados a las bajas concentraciones de cI propias de la etapa lisogénica. De este modo, se impide la unión de la polimerasa de RNA al promotor lítico P_R y se favorece la activación del propio cI, garantizando el mantenimiento del estado lisogénico. La cooperatividad permite que el sistema reaccione de forma rápida a pequeños cambios en la concentración del represor, y que se desencadene el ciclo lítico en respuesta a una

señal meramente transitoria (Johnson *et al.* 1981). En la regulación de P_B , los fenotipos para la carotenogénesis de las estirpes de *M. xanthus* portadoras de QTt1 o QTt2 revelan un comportamiento cualitativamente similar al de CarH. Quizás, para poner de manifiesto alguna pequeña diferencia en la regulación de P_B por las quimeras, que podría derivar de la ausencia de cooperatividad, sería necesario estudiar su capacidad represora en un contexto más natural: es decir, con QTt1 o QTt2 integrados en el sitio genómico que normalmente ocupa *carH* y expresándose bajo el control transcripcional de P_A , en vez de bajo el control del promotor ribosómico P_3 .

Existen múltiples ejemplos en la naturaleza de reguladores transcripcionales cuya oligomerización, dependiente de una determinada biomolécula, favorece su unión al DNA, aunque CarH y TtCarH constituyen el primer caso descrito cuya acción depende de la unión a cobalaminas. Así, por ejemplo, se ha descrito que el estado oligomérico de la proteína BirA, implicada en la regulación transcripcional del operón de la biosíntesis de biotina en *E. coli*, depende de su unión a biotina y a 5'-AMP. La biotina se presenta en la célula unida covalentemente a las carboxilasas que la requieren funcionalmente, como es el caso de la carboxilasa de acetil-CoA. La reacción de unión de la biotina a esta enzima es catalizada en dos pasos por la propia BirA. En el primero de ellos, se sintetiza adenilato de biotina a partir de biotina y ATP y se forma un complejo intermediario BirA-biotina-5'-AMP. En el segundo paso la biotina es transferida a un residuo de lisina de la acetil-CoA carboxilasa. BirA es monomérica en solución, pero su unión a biotina y a 5'-AMP favorece su dimerización e interacción con su operador y, como consecuencia, la inhibición de la síntesis de biotina. El operador es un palíndromo interrumpido al que se unen dos dímeros de BirA de forma cooperativa, lo que recuerda a la forma de unión de CarA (Weaver *et al.* 2001).

Para averiguar qué cambios concretos desencadena AdoB₁₂ en CarH y TtCarH y de qué modo se producen para promover su ensamblaje oligomérico habrá que esperar a los detalles estructurales que, como se mencionó anteriormente, se están abordando en colaboración con la Prof. Catherine L. Drennan y su doctorando Marco Jost en el MIT (*Massachusetts Institute of Technology, USA*).

IV.1.3 Papel de la B₁₂ como grupo cromóforo

Desde hace tiempo se conoce que, en presencia de luz, las cobalaminas experimentan la ruptura de su enlace C-Co con la consiguiente pérdida de su ligando superior (Bond CM *et al.* 1972; Chen y Chance 1990; Schwartz y Frey 2007). Por tanto, cuando en un trabajo previo se descubrió la implicación de la vitamina B₁₂ y CarH en la

regulación por la luz de la carotenogénesis, se especuló que la fotosensibilidad intrínseca de las cobalaminas podría proporcionar una vía de fotoinducción de P_B , alternativa a la antirrepresión por CarS (Pérez-Marín *et al.* 2008). Sin embargo, no ha sido hasta la realización de este trabajo cuando se ha podido demostrar que, en efecto, dicha fotosensibilidad se explota como una cualidad ventajosa en una proteína cuya actividad represora ha de ser anulada en presencia de luz. Así pues, para observar el papel de la AdoB₁₂ en la modulación del estado oligomérico de TtCarHCt (y las quimeras que lo contienen) en los ensayos *in vitro* e *in vivo* (DHB) ha sido imprescindible trabajar en condiciones de muy baja iluminación u oscuridad completa. Varios experimentos de este trabajo demuestran que la presencia de luz de varias longitudes de onda a las que absorbe AdoB₁₂ provoca el desmantelamiento de los tetrámeros de TtCarHCt a monómeros. De igual modo, la oligomerización dependiente de B₁₂ detectada en los ensayos del DHB con CarH no se observó cuando las colonias se incubaron en la luz. No sorprende, por tanto, que en los ensayos de unión al DNA *in vitro* con las quimeras QTt1 y QTt2 se observe una bajada drástica en la afinidad por el DNA cuando las muestras se exponen a la luz, un resultado que avala el posible papel de la vitamina como sensor directo de la señal luminosa en la fotorregulación de P_B .

Para la demostración de que la AdoB₁₂ proporciona una ruta fotosensora paralela e independiente de CarS en *M. xanthus* ha sido preciso anular la acción del antirrepresor por delección del gen *carS*. Así, mientras que la eliminación de CarS en un fondo genético $\Delta carH$ conduce a una represión constitutiva por CarA de la síntesis de carotenos, la falta de CarS en un fondo genético $\Delta carA$ da lugar a un fenotipo silvestre siempre que la vitamina B₁₂ esté presente. Dada la extrema rapidez con la que se produce la ruptura del enlace Co-C en presencia de luz, cabe esperar que sea ésta la vía preferente de inactivación de CarH en *M. xanthus*. Sorprende que existan dos vías paralelas para la regulación de P_B , una dependiente de CarA y CarS e independiente de B₁₂, y la otra dependiente de CarH y AdoB₁₂. Se ha especulado mucho sobre el origen evolutivo antiguo, incluso prebiótico, de la vitamina B₁₂, cuya biosíntesis está restringida en la actualidad a algunas bacterias y arqueas (véase Roth, *et al.* 1996). Cabe pensar, por tanto, que la regulación de P_B por CarH/AdoB₁₂ constituya el mecanismo ancestral de regulación en *M. xanthus* y que la regulación por CarA/CarS haya surgido para evitar las condiciones de baja disponibilidad de B₁₂, pues al ser incapaz de sintetizar B₁₂ *de novo*, *M. xanthus* depende de la vitamina exógena que pueda captar de otros microorganismos del suelo a los que depreda. El mecanismo basado en CarH/AdoB₁₂ podría, por tanto, representar un vestigio evolutivo. No obstante, el hecho de que se haya mantenido a lo largo de la evolución

podría también indicar una ventaja selectiva, relacionada quizás con la posibilidad de responder a longitudes de onda distintas de la luz azul y/o de regular de un conjunto de genes, aún por identificar, que no estén sujetos al control de CarA/CarS.

En cualquier caso, la principal implicación de este trabajo es que la AdoB₁₂, además de fomentar la oligomerización de CarH, sirve como molécula para la recepción directa de la señal luminosa y la consiguiente modulación de la actividad del represor. Se pone así de manifiesto la existencia de un nuevo tipo de fotorreceptor, que usa la AdoB₁₂ como grupo cromóforo, y se desvela una faceta de la cobalamina nunca antes descrita. La AdoB₁₂ se une así al reducido número de compuestos que, como se indica en la *Introducción*, han sido reclutados en la naturaleza para actuar como cromóforos. Además, como se discute más adelante, el mecanismo de regulación por CarH/AdoB₁₂ (o TtCarH/AdoB₁₂) descrito en este trabajo podría ser la base del modo de acción de otras muchas proteínas bacterianas, de función desconocida, que muestran la misma arquitectura de dominios. Que la cobalamina utilizada para este fin sea la AdoB₁₂, que experimenta una fotólisis más rápida que la MeB₁₂ (Bond *et al.* 1972), probablemente confiera al sistema una mayor fotosensibilidad y velocidad de reacción frente a la iluminación. No obstante, como con los ribointerruptores dependientes de B₁₂, muchos de los cuales parecen unir AdoB₁₂ pero otros MeB₁₂ o incluso AqB₁₂, cabe la posibilidad de que el requerimiento específico de AdoB₁₂ observado en este trabajo no se aplique a todos miembros de la familia que resulten depender de B₁₂.

Como se comentó en la *Introducción*, el análisis bioinformático ha puesto de manifiesto en los últimos años la abundancia de proteínas, de función desconocida, que presentan alguno de los seis módulos fotosensores que se habían descrito hasta ahora (van der Horst *et al.* 2007; Losi y Gärtner 2008; Gomelsky y Hoff 2011). En algunas de tales proteínas, al igual que en CarH/TtCarH, el módulo fotosensor aparece asociado a un dominio de unión al DNA conocido, lo que apunta a un probable papel regulador en respuesta a la luz. Un ejemplo de este tipo, que ha sido bien estudiado al nivel estructural, lo constituye la proteína EL222 de la bacteria marina *Erythrobacter litoralis*. Esta proteína está constituida por un dominio C-terminal de unión al DNA, que incluye un motivo hélice-giro-hélice (HTH) propio de los reguladores de tipo LuxR, y un dominio fotorreceptor tipo LOV, que utiliza el FMN como grupo cromóforo. Aunque se sabía que la luz controla la unión al DNA de otras proteínas que, como EL222, presentan un dominio LOV asociado a un dominio de unión al DNA, tales como la proteína WC-1 de *Neurospora crassa*, se desconocía el mecanismo molecular preciso. La determinación de la estructura cristalográfica de EL222 ha puesto de manifiesto que la proteína no se une al DNA en la oscuridad porque el dominio LOV secuestra la

hélice 4 α del motivo HTH. La formación del aducto cisteinil/flavina en presencia de luz azul genera un cambio conformacional en el dominio LOV que desencadena la separación de los dominios C- y N-terminales, la dimerización de EL222 y su unión al DNA a través del motivo HTH (Nash *et al.* 2011). Aunque por un mecanismo muy diferente al de CarH, la proteína EL222 constituye otro ejemplo de factor transcripcional que muestra una interacción proteína-proteína regulada por luz, de la que depende su interacción con el DNA. En este caso, no obstante, la luz promueve su unión al DNA, al contrario que en CarH.

Los fotorreceptores se caracterizan por responder a luz de una determinada longitud de onda pasando, de forma generalmente reversible, de un estado basal a un estado excitado. La vuelta al estado basal puede ocurrir al cesar el estímulo luminoso y mantenerse el fotorreceptor un tiempo en oscuridad o al cambiar la longitud de onda recibida (Purcell y Crosson 2008). Una característica peculiar del nuevo tipo de fotorreceptor descrito en este trabajo es que, al ser dependiente de B₁₂, es excitable prácticamente a todas las longitudes de onda del espectro visible, con excepción de la luz roja. Esta baja especificidad permite un amplio rango de respuesta, lo que podría resultar especialmente útil a la hora de activar la expresión de genes con función fotoprotectora. Además, cabe esperar que la rápida fotólisis de la AdoB₁₂ permita su excitación a bajas intensidades lumínicas durante periodos relativamente cortos de tiempo. Sin embargo, tras la fotólisis de la AdoB₁₂ en solución acuosa, solo un 40 % de la AdoB₁₂ puede ser reconstituida por recombinación del radical 5'-desoxiadenosilo y la cob(II)alamina (Chen y Chance 1990). Por tanto, si la irradiación es prolongada, es improbable que se regenere la AdoB₁₂ por recombinación del radical 5'-desoxiadenosilo perdido en el estado excitado. Como se ha comentado anteriormente, en el caso de la sintetasa de metionina de *E. coli*, varios residuos que forman parte de una caperuza sobre el grupo metilo de la MeB₁₂, protegen al cofactor del proceso fotolítico, e impiden la difusión del grupo metilo, favoreciendo así su recombinación con el cobalto (Jarrett *et al.* 1996). Las propiedades de la fotólisis de la AdoB₁₂ en solución o unida a las enzimas que la usan como cofactor, que da lugar a la pareja de radicales 5'-desoxiadenosilo-cob(II)alamina, ha servido como modelo para el estudio de la hidrólisis enzimática de AdoB₁₂, pues en ambos casos se produce la fisión homolítica del enlace Co-C (Padmakumar *et al.* 1997; Marsh y Ballou 1998; Schwartz y Frey 2007). Como ocurre con la MeB₁₂, la unión del cofactor AdoB₁₂ a las enzimas con las que colabora (como, por ejemplo, la mutasa de glutamato) reduce la formación de los fotoproductos, probablemente porque evita el escape del radical adenosilo y favorece la recombinación de la pareja de radicales (Sension *et al.* 2005; Robertson y Warncke 2009). Por el momento, desconocemos los detalles cinéticos de la fotólisis

que sufre la AdoB₁₂ cuando se encuentra unida al módulo fotosensor descrito en este trabajo y cuánto se asemejan a lo ya descrito para las enzimas que dependen de este cofactor. Cabe esperar que los estudios en curso, en colaboración con el Dr. Alex R. Jones (Univ. de Manchester, UK), mediante espectroscopía ultrarápida del complejo AdoB₁₂/TtCarH, permitan establecer la cinética de la fotólisis del enlace Co-C y del regreso al estado basal tras la fotoexcitación.

En este trabajo se han realizado experimentos para abordar la posible regeneración del fotorreceptor mediante el desplazamiento, por nueva AdoB₁₂, de la OHB₁₂ que se produce tras la pérdida definitiva del radical adenosilo. Curiosamente, tanto en los ensayos de retraso en gel como en los de cromatografía de exclusión molecular con TtCarH no se observó que la AdoB₁₂ fuese capaz de competir con la forma fotolisada de la cobalamina. Más aún, el análisis mediante HPLC acoplado a espectrometría de masas sugiere que tras la iluminación de TtCarH-AdoB₁₂ se genera un complejo muy estable con el anillo de cobalamina, que no es equivalente al formado por la incubación de TtCarH con OHB₁₂, y explica que la adición de nueva AdoB₁₂ no conduzca a la regeneración del complejo TtCarH-AdoB₁₂. Por tanto, al menos en las condiciones ensayadas en este trabajo, el intercambio de la OHB₁₂ por AdoB₁₂ no parece una vía eficaz para la recuperación de la forma fotoexcitable del fotorreceptor.

La profundización en el conocimiento del modo de acción de los módulos fotorreceptores ha derivado en los últimos años en el nacimiento de la denominada Optogenética (Deisseroth 2011), una tecnología que combina la óptica y la genética para el control espacial y temporal con luz de actividades biológicas concretas. Como otros módulos fotosensores que, con este fin, se vienen utilizando (véase, por ejemplo, Herrou y Crosson, 2011), el módulo fotosensor basado en AdoB₁₂ podría sumarse al creciente abanico de herramientas optogenéticas.

IV.1.4 Modelo de regulación del promotor P_B por CarA/CarS y CarH/AdoB₁₂

Los resultados de este y otros trabajos previos del grupo conducen a un modelo para la represión de P_B en la oscuridad en el que participan dos rutas paralelas, controladas por un mismo operador y dos proteínas parálogas, de las cuales una (CarH), pero no la otra (CarA), depende de AdoB₁₂ para ejercer su actividad represora (Figuras 82 y 83). Mientras que CarA interacciona consigo misma, formando dímeros, tanto en ausencia como en presencia de B₁₂, CarH solo oligomeriza en presencia de la

vitamina (probablemente, formando tetrámeros). Así pues, la unión cooperativa de dos dímeros de CarA o de un tetrámero de CarH/AdoB₁₂ al operador bipartito en P_B, que solapa parcialmente con la región -35 del promotor, produce un bloqueo en la entrada de la polimerasa de RNA y la consiguiente represión del promotor. La producción en la luz de CarS, una proteína que interacciona con el dominio N-terminal de CarA imitando al DNA operador, provoca el desmantelamiento de los complejos CarA-DNA y, por tanto, la activación del promotor P_B. Aunque una vez producido, CarS podría igualmente anular la acción represora de CarH, pues es también capaz de interaccionar con su dominio de unión al DNA, cabe esperar que sea la rápida fotólisis de la AdoB₁₂, y el consiguiente desensamblaje de los oligómeros de CarH, la vía mayoritaria de activación de P_B cuando su represión está mediada por CarH. A falta de datos sobre la afinidad relativa de ambos represores por el DNA operador, cabe esperar que, en presencia de B₁₂, la ruta de regulación de P_B mediada por CarA y CarS, y la mediada por CarH y AdoB₁₂, sean funcionalmente redundantes.

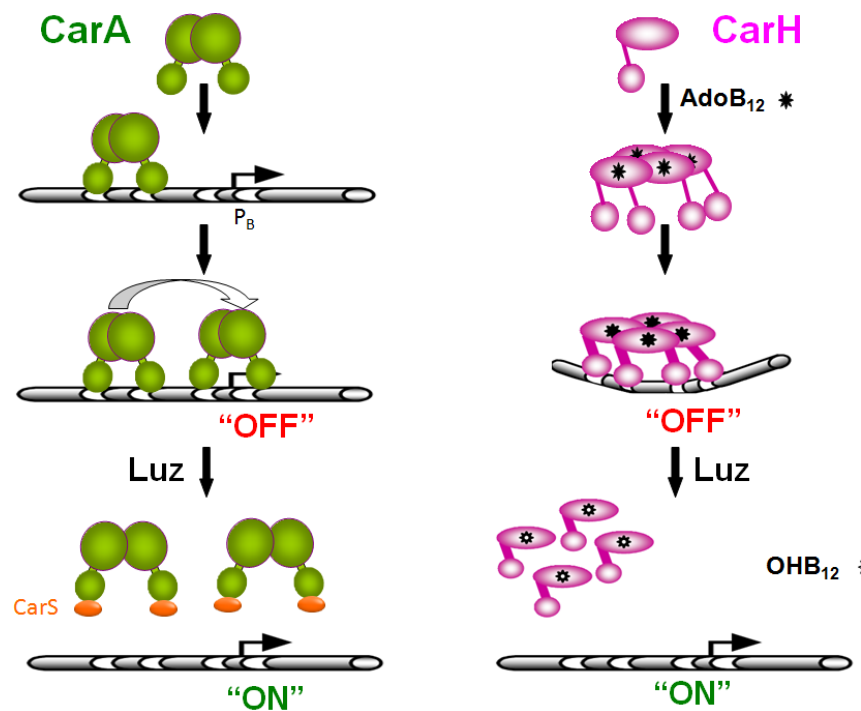


Figura 82. Modelo de regulación del promotor P_B por CarA/CarS (izquierda) y por CarH/AdoB₁₂ (derecha).

Existen, pues, dos niveles distintos para la captación de la señal luminosa en *M. xanthus*, ninguno de ellos basados en el uso de fotorreceptores convencionales, y en ambos, curiosamente, es un tetrapirrol cíclico el responsable de la fotorrecepción (Elías-Arnanz *et al.* 2011; Galbis-Martínez *et al.* 2012). El mecanismo principal que, en última instancia, conduce a la inactivación de CarA, se basa en la fotoexcitación de la

protoporfirina IX (PPIX) y la formación de oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), una especie muy reactiva y dañina del oxígeno. De alguna manera aún por determinar, la presencia de $^1\text{O}_2$ sería detectada por la proteína de membrana CarF y esto conduciría a la inactivación de CarR, a la liberación del factor σ^{ECF} CarQ y a la expresión del operón *carQRS*. El otro mecanismo de captación del estímulo luminoso, un mecanismo más directo para la activación de P_B , se corresponde con el mecanismo basado en CarH y AdoB₁₂ descrito en este trabajo.

Como ya se ha comentado anteriormente, es probable que la vía ancestral para la represión de P_B fuese la vía que en la actualidad sigue dependiendo de CarH y AdoB₁₂, pues el origen evolutivo de la vitamina es muy antiguo y más allá de *M. xanthus* y alguna otra mixobacteria (véase más adelante) no se encuentran homólogos a CarF, ni a CarR o CarS (sí existen factores que guardan cierta homología con CarQ, como factor σ^{ECF} que es, en el propio *M. xanthus* y en otras especies bacterianas). Además, entre las mixobacterias cuyo genoma se ha podido analizar (véase más adelante), existe una correlación perfecta entre la ausencia de *carF* y el operón *carQRS* y la existencia solo de una proteína tipo CarA/CarH, que es probable que funcione como CarH. El mecanismo de fotorrecepción basado en el uso de PPIX y de la cascada de regulación mediada por CarF, CarR, CarQ y CarS es, por tanto, probable que haya surgido posteriormente en la evolución, de manera paralela a la aparición de un represor de P_B independiente de B₁₂, CarA, que cabe esperar sea ventajoso en las condiciones de baja disponibilidad de B₁₂ a las que probablemente se enfrenta *M. xanthus* en la naturaleza.

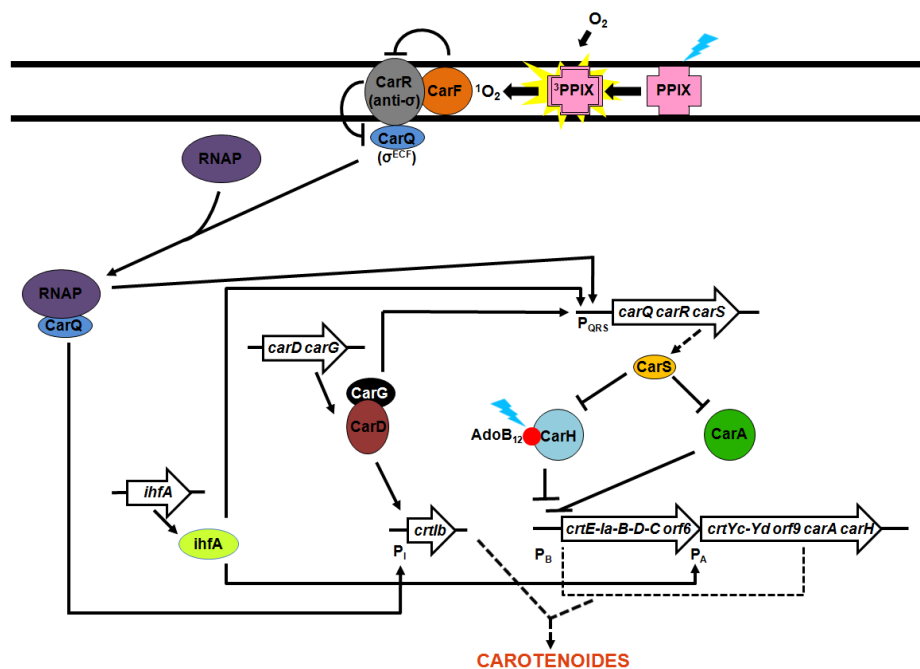


Figura 83. Modelo de regulación de la carotenogénesis que ilustra los dos mecanismos posibles para la captación del estímulo luminoso en *M. xanthus*.

IV.2 Conservación evolutiva del mecanismo de regulación basado en AdoB₁₂

Tras el descubrimiento de CarA y CarH, la disponibilidad creciente de secuencias genómicas ha desvelado la existencia de, al menos, otras 133 proteínas con una arquitectura de dominios similar, que podrían actuar como CarA (independiente de B₁₂) o como CarH (dependiente de B₁₂), en unas 123 especies bacterianas pertenecientes a 18 grupos taxonómicos (Tabla 6). Con excepción de las proteínas de *M. xanthus* (Elías-Arnanz et al. 2008; Elías-Arnanz et al. 2011), *Streptomyces coelicolor* (Takano et al. 2005; Takano et al. 2006) y *T. thermophilus* (Takano et al. 2011), la función de los integrantes de esta familia proteica, que ha venido a denominarse CarA/LitR (LitR es la proteína homóloga de *S. coelicolor*), es desconocida. Solo en algunas mixobacterias (véase más abajo), como *M. xanthus*, se observa la presencia de dos versiones de la proteína, una más parecida a CarA y otra a CarH, y solo en ellas se observan homólogos a CarS. Cabe pues plantearse la posible conservación evolutiva del mecanismo de regulación basado en AdoB₁₂ descubierto en este trabajo.

Como se comentó en la *Introducción*, la proteína de "tipo CarA/H" de *S. coelicolor*, LitR, parece estar también implicada en la regulación por la luz de la síntesis de carotenoides. Al igual que CarA/CarH, LitR ejerce una acción represora sobre su promotor diana en la oscuridad y, aunque no se ha demostrado formalmente, se ha propuesto que la captación de la señal luminosa por la vitamina B₁₂ podría modular la acción de LitR, tal vez provocando un cambio conformacional en dicho factor que permita la expresión de su promotor diana (Takano et al. 2006). Por otro lado, como se discute más adelante, los experimentos *in vitro* realizados en este trabajo y un estudio reciente *in vivo* con *T. thermophilus* (Takano et al. 2011) indican un modo de acción para TtCarH muy similar al descrito para CarH en *M. xanthus*.

En los casos estudiados hasta ahora, las proteínas tipo CarA/CarH se encuentran en las proximidades de genes típicamente asociados a respuestas a la luz, tales como los relacionados con la síntesis de carotenos (*M. xanthus*, *S. coelicolor*, *T. thermophilus*) o el gen de la fotoliasa (*T. thermophilus*), una enzima que repara los daños causados en el DNA por la radiación ultravioleta. Por ello, se ha analizado el contexto genómico de todos los genes que determinan proteínas tipo *carA/carH* en busca de tales genes y se ha encontrado dicha coincidencia en 53 casos, correspondientes a 47 especies bacterianas. Parece pues razonable pensar que sean estas proteínas CarA/CarH las que regulen la expresión de los genes vecinos, y lo

hagan de una forma fotoinducible, tal y como ocurre en *M. xanthus*, *T. thermophilus*, y *S. coelicolor*. Aunque no podemos descartar la existencia en dichas especies bacterianas de una proteína que guarde homología estructural o funcional con CarS (aun sin parecido en su secuencia aminoacídica), es probable que el mecanismo de fotorregulación dependiente de B₁₂ y CarH, e independiente de CarS, descrito en este trabajo, se extienda más allá de los tres ejemplos estudiados. Por otro lado, cabe también preguntarse el posible papel regulador del otro ~50% de proteínas tipo Car/CarH que no se encuentran aparentemente asociadas a genes de respuesta a la luz, si la B₁₂ participa en dicha regulación o no y de qué manera lo hace, así como qué proceso biológico concreto está sujeto a su regulación. También resultará interesante averiguar la función de unos pocos casos, hallados en la búsqueda de proteínas con posibles módulos de unión a B₁₂, en los que dicho módulo se encuentra asociado a un dominio quinasa de histidinas o a un dominio regulador de la respuesta, de los que forman parte de los sistemas de dos componentes.

Tabla 6. Proteínas tipo CarA/CarH en diferentes especies bacterianas

Bacteria	Grupo Taxonómico	Nº de acc. NCBI
<i>Haliangium ochraceum</i> *	δ -proteobacteria (Myxococcales)	YP_003266651
<i>Myxococcus xanthus</i> * ^s	δ-proteobacteria (Myxococcales)	CAA79964 (CarA) CAA79965 (CarH)
<i>Myxococcus fulvus</i> HW-1*	δ-proteobacteria (Myxococcales)	YP_004663840.1 YP_004663839.1
<i>Corallococcus coralloides</i> *	δ-proteobacteria (Myxococcales)	YP_005366794.1 YP_005366795.1
<i>Plesiocystis pacifica</i> *	δ-proteobacteria (Myxococcales)	ZP_01911070
<i>Sorangium cellulosum</i> *	δ-proteobacteria (Myxococcales)	YP_001611216
<i>Stigmatella aurantiaca</i> *	δ-proteobacteria (Myxococcales)	YP_003956654 YP_003956655
<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i>	δ-proteobacteria	NP_967879
<i>Desulfuromonas acetoxidans</i>	δ-proteobacteria	ZP_01313691
<i>Desulfohalobium retbaense</i>	δ-proteobacteria	YP_003198393
<i>Geobacter lovleyi</i>	δ-proteobacteria	YP_001951625
<i>Deinococcus maricopensis</i> DSM 21211*	Deinococcus-Thermus	YP_004171777.1
<i>Meiothermus ruber</i> *	Deinococcus-Thermus	YP_003506173
<i>Meiothermus silvanus</i> *	Deinococcus-Thermus	YP_003684883
<i>Thermus aquaticus</i> *	Deinococcus-Thermus	ZP_03497494
<i>Thermus thermophilus</i> * ^s	Deinococcus-Thermus	YP_145339 (TtCarH)
<i>Truepera radiovictrix</i>	Deinococcus-Thermus	YP_003706311
<i>Agrobacterium vitis</i>	α-proteobacteria	YP_002550011
<i>Hoeflea phototrophica</i>	α-proteobacteria	ZP_02166227
<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> MS-	α-proteobacteria	ZP_00054991.2
<i>Phaeospirillum molischianum</i> DSM 120	α-proteobacteria	ZP_09875649.1
<i>Sphingomonas elodea</i> ATCC	α-proteobacteria	ZP_09956865.1

31461		
<i>Acidovorax delafieldii</i>	β -proteobacteria	ZP_04760938
<i>Acidovorax ebreus</i>	β -proteobacteria	YP_002553836
<i>Acidovorax</i> sp.	β -proteobacteria	YP_987184
<i>Alicyclophilus denitrificans</i> K601 *	β -proteobacteria	YP_004388855.1
<i>Azoarcus</i> sp.	β -proteobacteria	YP_934810
<i>Bordetella avium</i>	β -proteobacteria	YP_784891
<i>Candidatus accumulibacter</i>	β -proteobacteria	YP_003169177
<i>Dechloromonas aromatica</i>	β -proteobacteria	YP_283714
<i>Delftia acidovorans</i>	β -proteobacteria	YP_001565315
<i>Delftia</i> sp. Cs1-4	β -proteobacteria	YP_004487922.1
<i>Herminiimonas arsenicoxydans</i>	β -proteobacteria	CAL62551
<i>Hylemonella gracilis</i> ATCC 19624	β -proteobacteria	ZP_08405284.1
<i>Laribacter hongkongensis</i>	β -proteobacteria	YP_002794311
<i>Leptothrix cholodnii</i>	β -proteobacteria	YP_001789500
<i>Limnobacter</i> sp.	β -proteobacteria	ZP_01915313
<i>Methyloversatilis universalis</i> FAM5	β -proteobacteria	ZP_08503296.1
<i>Methylovorus glucosetrophus</i> SIP3-4	β -proteobacteria	YP_003051081.1
<i>Methylovorus</i> sp.	β -proteobacteria	YP_003051081
<i>Methylobium petroleiphilum</i>	β -proteobacteria	YP_001019435
<i>Polaromonas naphthalenivorans</i>	β -proteobacteria	YP_981683
<i>Ralstonia eutropha</i>	β -proteobacteria	YP_293403
<i>Rubrivivax benzoatilyticus</i> JA2	β -proteobacteria	ZP_08400872.1
<i>Rubrivivax gelatinosus</i> IL144	β -proteobacteria	YP_005439324.1
<i>Thauera</i> sp.	β -proteobacteria	YP_002354707
<i>Thiomonas intermedia</i>	β -proteobacteria	YP_003644171
<i>Thiomonas</i> sp.	β -proteobacteria	CAZ89507
<i>Methylobacter tundripaludum</i>	γ -proteobacteria	ZP_07654418
<i>Methylomicrobium alcaliphilum</i>	γ -proteobacteria	YP_004919240.1
<i>Nitrosococcus halophilus</i>	γ -proteobacteria	YP_003525843
<i>Magnetococcus</i> sp.	Proteobacteria	YP_867583
<i>Actinosynnema mirum</i>	Actinobacteria	YP_003104187
<i>Amycolatopsis mediterranei</i> *	Actinobacteria	YP_003766261
<i>Dermacoccus</i> sp.	Actinobacteria	ZP_07704773
<i>Frankia</i> sp. Eul1c	Actinobacteria	ZP_06238726
<i>Janibacter</i> sp.	Actinobacteria	ZP_00994632
<i>Micromonospora</i> sp.	Actinobacteria	EEP72734
<i>Nakamurella multipartita</i> *	Actinobacteria	YP_003199787
<i>Nocardia farcinica</i> *	Actinobacteria	YP_119275
<i>Streptomyces ambofaciens</i> *	Actinobacteria	CAJ88224
<i>Streptomyces avermitilis</i> *	Actinobacteria	BAC68924
<i>Streptomyces coelicolor</i> * ³	Actinobacteria	NP_624528 (LitR)
<i>Streptomyces flavogriseus</i>	Actinobacteria	ZP_05801878
<i>Streptomyces ghanaensis</i>	Actinobacteria	ZP_04684938
<i>Streptomyces lividans</i> *	Actinobacteria	ZP_05528694
<i>Streptomyces pristinaespiralis</i>	Actinobacteria	EDY64715

<i>Streptomyces sp. C</i>	Actinobacteria	ZP_07285287
<i>Streptomyces svinceus</i>	Actinobacteria	EFH28311
<i>Streptosporangium roseum</i> *	Actinobacteria	YP_003337347
<i>Chitinophaga pinensis</i> *	Bacteroidetes	YP_003125248
<i>Croceibacter atlanticus</i> *	Bacteroidetes	YP_003714950
<i>Cytophaga hutchinsonii</i> *	Bacteroidetes	YP_677677 YP_678640
<i>Dokdonia donghaensis</i> *	Bacteroidetes	ZP_01051271
<i>Dyadobacter fermentans</i> *	Bacteroidetes	YP_003086417
<i>Flavobacteria bacterium</i> *	Bacteroidetes	ZP_01202526
<i>Kordia algicida</i> *	Bacteroidetes	ZP_02163391
<i>Leeuwenhoekiella blandensis</i> *	Bacteroidetes	ZP_01060805
<i>Microscilla marina</i>	Bacteroidetes	ZP_01688448
<i>Pedobacter heparinus</i> *	Bacteroidetes	YP_003093970
<i>Psychroflexus torquis</i> *	Bacteroidetes	ZP_01253496
<i>Rhodothermus marinus</i> *	Bacteroidetes	ACY48488
<i>Robiginitalea biformata</i> *	Bacteroidetes	YP_003195366
<i>Zunongwangia profunda</i> *	Bacteroidetes	YP_003583423
<i>Chloroherpeton thalassium</i> *	Chlorobi	YP_001996324
<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	Firmicutes	YP_002315426
<i>Bacillus cereus sp.</i>	Firmicutes	YP_001374529
<i>Bacillus cellulosilyticus</i>	Firmicutes	ZP_06362586
<i>Bacillus megaterium</i>	Firmicutes	YP_003564800
<i>Bacillus mycoides</i>	Firmicutes	ZP_04156336
<i>Bacillus pseudofirmus</i>	Firmicutes	YP_003427992
<i>Bacillus pseudomycoides</i>	Firmicutes	ZP_04150564
<i>Bacillus selenitireducens</i>	Firmicutes	YP_003700225
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Firmicutes	ZP_04144840
<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	Firmicutes	YP_001644286
<i>Exiguobacterium sibiricum</i>	Firmicutes	YP_001814285
<i>Exiguobacterium sp.</i>	Firmicutes	YP_002887336
<i>Heliobacterium modesticaldum</i>	Firmicutes	YP_001680059
<i>Lysinibacillus fusiformis</i> *	Firmicutes	ZP_07050820
<i>Paenibacillus mucilaginosus</i> 3016	Firmicutes	YP_005315120
<i>Paenibacillus mucilaginosus</i> KNP414	Firmicutes	YP_004644315
<i>Paenibacillus sp.</i>	Firmicutes	YP_003014814
<i>Planococcus donghaensis</i> MPA1U2	Firmicutes	ZP_08095487
<i>Anaerolinea thermophila</i> UNI-1 *	Chloroflexi	YP_004173982 YP_004173983
<i>Caldilinea aerophila</i> DSM 14535 *	Chloroflexi	YP_005440370 YP_005442842
<i>Chloroflexus aggregans</i> *	Chloroflexi	YP_002462292
<i>Chloroflexus aurantiacus</i> *	Chloroflexi	YP_001636279
<i>Chloroflexus sp.*</i>	Chloroflexi	YP_002570616
<i>Herpetosiphon aurantiacus</i> *	Chloroflexi	YP_001545468
<i>Ktedonobacter racemifer</i>	Chloroflexi	ZP_06969864
<i>Oscillochloris trichoides</i>	Chloroflexi	ZP_07686602
<i>Roseiflexus castenholzii</i> *	Chloroflexi	YP_001431863

<i>Roseiflexus sp.*</i>	Chloroflexi	YP_001276447
<i>Isosphaera pallida</i> ATCC 43644	Planctomycetes	YP_004180071
<i>Planctomyces maris</i>	Planctomycetes	ZP_01852990
<i>Planctomyces brasiliensis</i>	Planctomycetes	EFQ19218
<i>Rhodopirellula baltica</i>	Planctomycetes	NP_864391
<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellin6076 *	Acidobacterias	YP_826707
<i>Candidatus Chloracidobacterium thermophilum</i> B*	Acidobacterias	YP_004861458
<i>Opitutus terrae</i>	Verrucomicrobia	YP_001817995
<i>Verrucomicrobium spinosum</i>	Verrucomicrobia	ZP_02929072
<i>Candidatus Nitrospira defluvii</i>	Nitrospirales	CBK39973
<i>Thermobaculum terrenum*</i>	Thermobaculum	YP_003323754
<i>Leptonema illini</i> DSM 21528	Espiroquetas	ZP_09659014
<i>Methanothermobacter marburgensis</i> str. Marburg	Methanobacteria	YP_003849482

**carA/carH* en las proximidades de genes que determinan enzimas carotenogénicas y/o fotoliasas.

§ Proteínas tipo CarA/CarH para las cuales se ha demostrado una implicación en la regulación de la carotenogénesis inducida por luz.

De las 133 proteínas homólogas a CarA/CarH halladas en las bases de datos genómicos, 15 pertenecen a δ -proteobacterias, de las cuales 11 corresponden a mixobacterias; como en *M. xanthus*, en las otras 6 especies de mixobacterias con genes tipo *carA/carH*, dichos genes se encuentran adyacentes a genes para la síntesis de carotenos (Tabla 6 y 7). En 4 de las 7 especies de mixobacterias, incluyendo *M. xanthus*, se observa la duplicación génica en tándem que daría lugar a la síntesis de dos proteínas con la misma arquitectura de dominios, de las cuales una presenta una secuencia más similar a CarA que a CarH, y la otra al revés. Curiosamente, son estas mismas 4 especies las únicas que muestran el operón *carQRS* y un gen homólogo a *carF*, lo que avala la hipótesis de que la vía de fotorrecepción y transducción de la señal luminosa basada en la protoporfirina IX y CarF, y en los productos del operón *carQRS*, ha surgido en mixobacterias para responder a la aparición de un miembro de la familia CarA/CarH que ha perdido la dependencia de B₁₂ (Tabla 7). Sería pues lógico pensar que, en estas tres especies de mixobacterias aún por estudiar, una de las dos proteínas funcione como CarA y la otra como CarH en la regulación de la síntesis de carotenos. La proteína tipo CarA sería independiente de B₁₂ y, por tanto, dependiente de CarS y de toda la maquinaria de detección de la luz y transducción de la señal luminosa mediada por CarF y CarR. La otra sería, como CarH, dependiente de B₁₂. En las otras tres especies de mixobacterias que solo presentan una proteína tipo CarA/CarH y no presentan genes homólogos a *carQRS* ni a *carF*, cabe especular que la fotorregulación de la carotenogénesis ocurra por un mecanismo similar al

descrito en este trabajo, con CarH y la AdoB₁₂ como mediadores exclusivos del control de la expresión génica en respuesta a la presencia o ausencia de luz.

Tabla 7. Mixobacterias que presentan proteínas tipo CarA/CarH.

Especie	CarA/CarH	CarQ	CarR	CarS	CarF
<i>Myxococcus xanthus</i> *	1+1	+	+	+	+
<i>Myxococcus fulvus</i> HW-1*	1+1	+	+	+	+
<i>Corallococcus coralloides</i> *	1+1	+	+	+	+
<i>Stigmatella aurantiaca</i> *	1+1	+	+	+	+
<i>Plesiocystis pacifica</i> *	+	-	-	-	-
<i>Haliangium ochraceum</i> *	+	-	-	-	-
<i>Sorangium cellulosum</i> *	+	-	-	-	-

(+), (1+1), (-): Presencia de una, dos o ninguna, respectivamente, proteínas homólogas a CarA/CarH. Nótese que las especies con dos proteínas tipo CarA/CarH presentan también proteínas tipo CarQ, CarR, CarS y CarF. *: *carA/carH* en las proximidades de genes que determinan enzimas carotenogénicas.

IV.2.1 Mecanismo de acción de TtCarH en *Thermus thermophilus*

Como se ha comentado anteriormente, el gen homólogo a *carA/carH* en *T. thermophilus*, *TtcarH*, se encuentra adyacente (aunque se transcribe en sentido contrario) a un posible operón que incluye el gen *crtB*, implicado en la síntesis de carotenos, y el gen *phr*, que determina la fotoliasa. A diferencia de *M. xanthus*, *T. thermophilus* sí es capaz de sintetizar B₁₂ (Cava *et al.* 2009) y, curiosamente, varios de los genes implicados en la síntesis de B₁₂ se encuentran próximos a la región donde se localiza *TtcarH*, en el genoma del megaplásmido. En este trabajo se ha demostrado que TtCarH, en efecto, se une a la región intergénica *crtB-TtcarH* y que lo hace de una manera dependiente de AdoB₁₂. El análisis de dicha región intergénica ha permitido identificar el posible promotor de *TtcarH* que, como el promotor P_B de *M. xanthus*, presenta una región -35 con una secuencia idéntica a la consenso (TTGACA) reconocida por los factores de la familia σ_{70} . La secuencia de la región -10 en ambos promotores es muy diferente a la consenso (TATAAT) y solo conserva las dos primeras bases, siendo TACCTC y TACCCT en *M. xanthus* y *T. thermophilus*, respectivamente. Las posibles regiones -35 y -10 identificadas se encuentran a las distancias adecuadas aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción identificado por (Takano *et al.* 2011), lo que apunta a una verdadera función promotora.

El análisis de la región intergénica *crtB-TtcarH* ha revelado también la existencia de dos palíndromes imperfectos que guardan cierta similitud con el operador bipartito de CarA/CarH, pero no son idénticos a éste (Figura 78). Así, mientras que pl es un palíndromo perfecto en *M. xanthus*, en *T. thermophilus* no es totalmente simétrico. Tampoco son idénticas las distancias entre las submitades que formarían parte de los dos posibles sitios de unión. Por otro lado, pII es un palíndromo imperfecto en ambas especies, que solapa en los dos casos con la región -35. A pesar de estas diferencias, que probablemente explican que TtCarH no complementa la falta de CarH en *M. xanthus*, TtCarH se une específicamente a la zona que contiene los palíndromes y lo hace de una manera dependiente de AdoB₁₂. No obstante, los ensayos con DNasa I indican protección por TtCarH/AdoB₁₂ solo de pII y de la segunda mitad de pl, y la mutación o eliminación de la mitad no protegida de pl no afecta a la unión de la proteína al DNA. Parece, por tanto, que de los dos posibles sitios identificados, solo pII, el que solapa con la región -35, es realmente importante para la unión de la proteína. A primera vista, estos resultados sorprenden si se comparan con lo que ocurre en *M. xanthus*, donde pl es imprescindible para que se produzca la unión cooperativa de CarA a pII y la represión del operón *carB*. Quizás estas diferencias tengan que ver con el hecho de que, aunque colocadas en distintos sitios en relación al promotor, son la secuencia del sitio pII de *T. thermophilus* y la del sitio pl de *M. xanthus* las que resultan más parecidas. Probablemente, tenga también que ver con el hecho de que TtCarH/AdoB₁₂ se une directamente en forma de tetrámero y no de manera cooperativa en forma de dos dímeros, como CarA.

Que en TtCarH, al igual que en CarH, la presencia de AdoB₁₂ induce la oligomerización de la proteína y la exposición a la luz provoca la reversión al estado monomérico viene avalado por los ensayos *in vivo* (DHB) e *in vitro* (cromatografía de exclusión molecular, entrecruzamiento de proteínas) presentados en este trabajo y por un estudio reciente realizado en colaboración con el grupo dirigido por el Prof. José García de la Torre (Departamento de Química Física, Univ. de Murcia). En dicho estudio, se han utilizado técnicas de ultracentrifugación analítica que indican que, en la oscuridad en presencia de AdoB₁₂, TtCarH forma un tetrámero compacto. Y que en la luz, o en ausencia de AdoB₁₂, la proteína se encuentra formando monómeros predominantemente elipsoidales. Por otro lado, la holoproteína TtCarH/AdoB₁₂ se asocia al DNA en forma de tetrámeros, pero la forma apo o la expuesta a la luz forma complejos más pequeños. Además de corroborar las conclusiones de los ensayos de cromatografía de exclusión molecular, estos estudios sirven para validar la utilización de la técnica de ultracentrifugación analítica como método para el estudio de

parámetros hidrodinámicos cuando la luz es un determinante crucial de las propiedades en solución.

El efecto “desmantelador” de los tetrámeros de TtCarH/AdoB₁₂ provocado por la iluminación, que *in vitro* se traduce en una bajada brusca en la afinidad por el DNA, lleva a pensar que TtCarH, y la modulación de su unión al DNA por AdoB₁₂ y luz, sirvan para mediar el control de la expresión fotoinducible de los genes *crtB* y *phr*, así como del propio *TtcarH*. En este sentido, cabe señalar que coincidiendo con el desarrollo de este trabajo, un estudio genético con *T. thermophilus* ha puesto de manifiesto que, en efecto, la síntesis de cobalaminas y *TtcarH* son necesarios para reprimir en la oscuridad la carotenogénesis (Takano *et al.* 2011). Dicho trabajo ha puesto también de manifiesto que *TtcarH* regula su propia expresión y la de un regulador positivo del promotor de *crtB*, TTP55, que está determinado por el gen inmediatamente aguas abajo de *TtcarH*. Así, a diferencia de *M. xanthus*, en *T. thermophilus* no basta con la inactivación de TtCarH por la luz para que se induzca la síntesis de carotenos, sino que también se requiere un regulador positivo. Este hecho probablemente se relacione con que el promotor de *crtB*, muy distinto del consenso, no sea reconocido eficazmente por polimerasa de RNA aun cuando el promotor no se encuentre bloqueado por la unión de TtCarH.

Un resultado inesperado del estudio sobre TtCarH ha sido la observación de que tras la iluminación de TtCarH-AdoB₁₂ no se regenera su capacidad de tetramerizar ni de unirse al DNA tras la adición de nueva AdoB₁₂, ni siquiera cuando se añade un exceso de unas 20 veces. Y que, por el contrario, sí se regenera cuando la AdoB₁₂ se añade a un complejo TtCarH-OHB₁₂ que no procede de la fotólisis de la AdoB₁₂ en el complejo sino de la unión de TtCarH a OHB₁₂. Esta diferencia de comportamiento indica que, a pesar de que el espectro de absorción del complejo TtCarH-AdoB₁₂ iluminado se corresponde con el de la OHB₁₂, debe existir alguna diferencia entre el complejo TtCarH-OHB₁₂ que deriva de la iluminación de TtCarH-AdoB₁₂ y el que se forma cuando TtCarH se incuba directamente con OHB₁₂. Los resultados del análisis mediante espectrometría de masas apuntan en esa dirección, al revelar que la iluminación de TtCarH-AdoB₁₂ genera un complejo cuya masa molecular se corresponde con la suma de las masas moleculares de TtCarH más el anillo de cobalamina sin ligando superior. Por el contrario, el complejo TtCarH-AdoB₁₂ no iluminado y el complejo TtCarH-OHB₁₂ dan lugar a una molécula cuya masa molecular es similar a TtCarH. No parece, por tanto, al menos en las condiciones en las que se han realizado los ensayos, que la iluminación del fotorreceptor TtCarH-AdoB₁₂ genere un estado excitado reversible. De ser un mecanismo común a otros miembros de la familia, cabría esperar que la inactivación irreversible del cromóforo tenga una

repercusión distinta en organismos que, como *M. xanthus*, dependen de la captación exógena de este cofactor escaso, que en organismos que, como *T. thermophilus*, pueden sintetizarlo *de novo*. Aunque no se ha podido detectar una interacción en el sistema del DHB entre CarH y la adenosiltransferasa de *M. xanthus*, no se puede descartar que sea ésta una posible vía para la regeneración del fotorreceptor *in vivo* tanto en *M. xanthus* como en *T. thermophilus*. En cualquier caso, cabe esperar que los estudios en curso mediante espectroscopía ultrarápida y mediante cristalografía de TtCarH/AdoB₁₂ (en su forma basal y fotoexcitada) en colaboración, respectivamente, con el Dr. Alex R. Jones y con la Dr. Catherine L. Drennan, contribuyan a esclarecer los detalles moleculares sobre la fotobiología de este nuevo tipo de fotorreceptor.

IV.2.2 Dominios independientes de unión a B₁₂

La búsqueda *in silico* de proteínas con posibles dominios de unión a B₁₂ ha puesto de manifiesto que, además de existir proteínas similares a CarA/CarH en otras bacterias (Tabla 6), existen muchas proteínas bacterianas de función desconocida (más de 60, distribuidas en distintas especies) con un motivo de unión a B₁₂ y un tamaño similar al dominio C-terminal de CarA/CarH y que carecen del dominio N-terminal de unión al DNA o de cualquier otro dominio adicional. La propia *M. xanthus* presenta un gen, MXAN_0232, que determinaría la síntesis de uno de dichos módulos independientes con un motivo de unión a B₁₂. Al igual que en el dominio de unión a B₁₂ de CarH y TtCarH, en la región “caperuza” de MXAN_0232 se observa el residuo de W (en vez de la F que aparece en la sintetasa de metionina) separado por nueve residuos de la secuencia EHL (Figura 84). La conservación de estos residuos podría sugerir que, como CarH y TtCarH, la proteína de MXAN_0232 depende de la presencia de AdoB₁₂ para oligomerizar.

En un trabajo de Tesis de Máster llevado a cabo en el grupo durante la realización de este trabajo se ha podido confirmar mediante el sistema de DHB que, en efecto, la proteína MXAN_0232 interacciona consigo misma de una forma dependiente de B₁₂, y que la luz elimina dicha interacción (Soriano-Rubio 2012). Más aún, una proteína quimérica obtenida mediante la fusión de MXAN_0232 al dominio N-terminal de unión al DNA de CarH funciona como CarH en *M. xanthus*, lo que sugiere que la unión de AdoB₁₂ a MXAN_0232 reproduce la modulación por AdoB₁₂ y luz descrita en este trabajo para el propio CarHCt

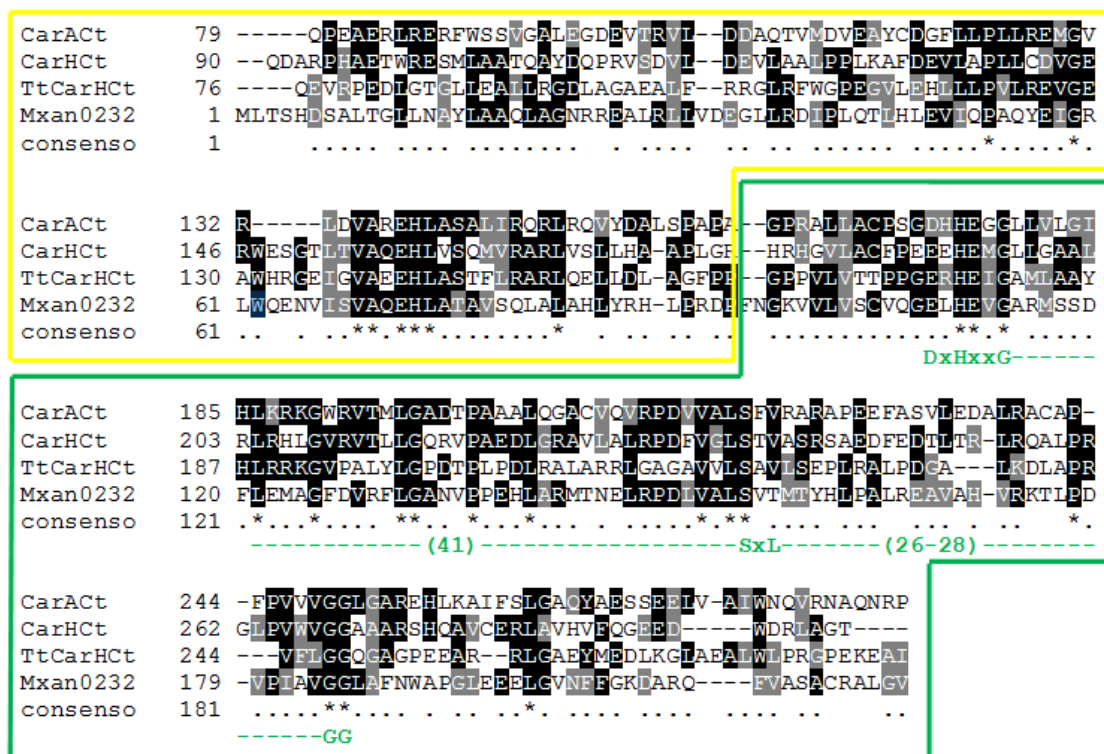


Figura 84. Alineamiento de secuencias de MXAN_0232 y los dominios C-terminales de CarH, y TtCarH. El recuadro amarillo delimita la extensión del subdominio I y el recuadro verde la del subdominio tipo Rossmann.

Cualquiera que sea la función de MXAN_0232 (todavía no se ha podido asignar un fenotipo concreto a la estirpe portadora de la delección del gen), es probable que necesite interaccionar con alguna otra proteína para llevarla a cabo. Tanto en *M. xanthus* como en otras mixobacterias que muestran homólogos de MXAN_0232, el gen correspondiente aparece como el primero de un posible operón formado por otros tres genes más, con los que podría estar relacionado funcionalmente (Figura 85). El que se encuentra inmediatamente aguas abajo de MXAN_0232 determina una proteína hipotética conservada y los dos siguientes determinan elementos de los sistemas de dos componentes (reguladores de respuesta/sensores quinasa de histidinas). Los resultados del análisis mediante el sistema del DHB parecen indicar que MXAN_0232 y MXAN_0231 interaccionan físicamente y que, para ello, se necesita la presencia de B₁₂, lo que apunta a una relación funcional entre ambos factores que podría estar conservada en *M. fulvus*, *C. coralloides* y *S. aurantiaca*. Es probable que el estudio del modo de acción molecular preciso de MXAN_0232, o de alguno de los módulos independientes de unión a B₁₂ presentes en otras bacterias, acabe añadiendo nuevos e interesantes matices al mecanismo de regulación por B₁₂ descrito en este trabajo.

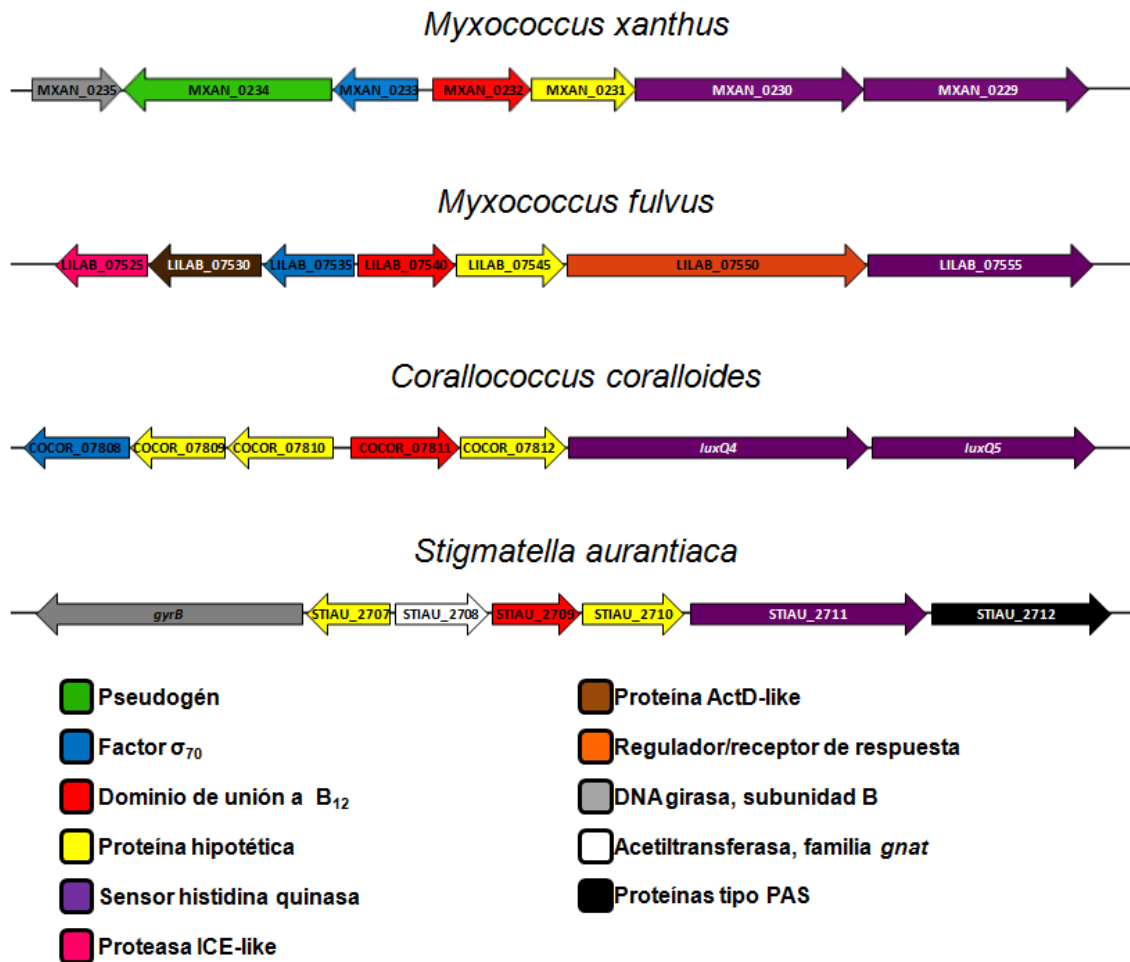


Figura 85. Contexto genómico de *MXAN_0232* y de sus homólogos en *Myxococcus fulvus*, *Corallococcus coralloides*, y *Stigmatella aurantiaca* (flechas rojas).

V. CONCLUSIONES

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

1. La dependencia de B_{12} de CarH reside en su dominio C-terminal, CarHCt, pues las proteínas quiméricas Q1 y Q2, que portan el dominio N-terminal de CarA y el C-terminal de CarH, se comportan como CarH, y no como CarA, en *M. xanthus*.
2. El dominio C-terminal de la proteína homóloga de *T. thermophilus*, TtCarH, ya sea fusionado al dominio de unión al DNA de CarA (quimera QTt1) o de CarH (quimera QTt2), confiere la misma actividad represora dependiente de B_{12} que el propio CarHCt. Las quimeras QTt1 y QTt2 son, por tanto, funcionalmente equivalentes a CarH.
3. De las dos formas de cobalaminas normalmente activas, la Me B_{12} o la Ado B_{12} , es la segunda la que modula la actividad reguladora dependiente de B_{12} de CarH, TtCarH, y las quimeras QTt1 y QTt2.
4. La presencia de Ado B_{12} promueve la oligomerización de CarH y, en consecuencia, provoca un aumento significativo en su afinidad por el DNA operador en el promotor P_B . Así pues, la acción de CarH depende de B_{12} porque, a diferencia de CarA, es incapaz de oligomerizar en ausencia de la vitamina. Dicha diferencia de comportamiento no reside en el cambio de E por D en sus respectivos motivos de unión a B_{12} .
5. Igualmente, la presencia de Ado B_{12} promueve la oligomerización de TtCarH y su unión a un DNA operador en el genoma de *T. thermophilus*, situado entre

el gen *crtB* y el propio *TtcarH*, que guarda cierta similitud con el operador de CarA/CarH en *M. xanthus*.

6. La exposición a luz de longitudes de onda en el rango de absorción de la AdoB₁₂ provoca un desensamblaje de los oligómeros de CaH y TtCarH formados en presencia de AdoB₁₂ y, en consecuencia, produce una bajada brusca en su afinidad por el DNA.
7. Por tanto, en *M. xanthus*, el complejo AdoB₁₂-CarH proporciona una ruta fotosensora alternativa, independiente de CarA y CarS, para la regulación de la carotenogénesis. Es probable que la ruta mediada por CarA/CarS haya surgido para evitar las condiciones de baja disponibilidad de B₁₂ en *M. xanthus*, que es incapaz de sintetizar la vitamina *de novo*.
8. En *T. thermophilus*, que sí sintetiza B₁₂ *de novo*, no presenta la duplicación génica *carA-carH* y carece de un homólogo de CarS, son probablemente TtCarH y la AdoB₁₂ los responsables directos de la fotorregulación de la carotenogénesis.
9. La iluminación de TtCarH-AdoB₁₂ genera un complejo muy estable con OHB₁₂ (estado excitado) que no ha sido posible revertir por la adición de nueva AdoB₁₂ en oscuridad. Parece, por tanto, que el intercambio de la OHB₁₂ por AdoB₁₂ no es una vía eficaz para la recuperación del estado basal.
10. En conjunto, los resultados de este trabajo han supuesto el hallazgo de un nuevo tipo de fotorreceptores bacterianos, que explotan la fotosensibilidad

intrínseca de la AdoB₁₂ y la usan como cromóforo para acoplar la señal luminosa y la regulación de la expresión génica .

11. La presencia de proteínas con la misma arquitectura de dominios que CarH/TtCarH en multitud de especies bacterianas sugiere que el mecanismo de regulación basado en la AdoB₁₂, descubierto en este trabajo, está conservado evolutivamente.

VI. BIBILIOGRAFÍA

Amaratunga, M.; Fluhr, K.; Jarrett, J. T.; Drennan, C. L.; Ludwig, M. L.; Matthews, R. G. y Scholten, J. D. (1996). "A synthetic module for the *methH* gene permits facile mutagenesis of the cobalamin-binding region of *Escherichia coli* methionine synthase: initial characterization of seven mutant proteins." Biochemistry **35**(7): 2453-2463.

Armstrong, G. A. y Hearst, J. E. (1996). "Carotenoids 2: Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis." Federation of American Societies for Experimental Biology Journal **10**(2): 228-237.

Arnold, J. W. y Shimkets, L. J. (1988). "Cell surface properties correlated with cohesion in *Myxococcus xanthus*." Journal of Bacteriology **170**(12): 5771-5777.

Ausubel, F. M.; Brent, R.; Kingston, R.; Seidman, J. G.; Smith, J. A. y Struhl, K. (1988). "Current Protocols in Molecular Biology." New York: Wiley Interscience.

Baker, K. y Perego, M. (2011). "Transcription antitermination by a phosphorylated response regulator and cobalamin-dependent termination at a B₁₂ riboswitch contribute to ethanolamine utilization in *Enterococcus faecalis*." Journal of Bacteriology **193**(10): 2575-2661.

Balsalobre, J. M. (1989). "Inducción por la luz azul de la expresión génica y la carotenogénesis en *Myxococcus xanthus*." Departamento de Genética Tesis doctoral.

Balsalobre, J. M.; Ruiz-Vazquez, R. M. y Murillo, F. J. (1987). "Light induction of gene expression in *Myxococcus xanthus*." Proceedings of the National Academy of Sciences, USA **84**(8): 2359-2362.

Banerjee, R.; Gherasim, C. y Padovani, D. (2009). "The tinker, tailor, soldier in intracellular B₁₂ trafficking." Current Opinion in Chemical Biology **13**(4): 484-491.

Banerjee, R. y Ragsdale, S. W. (2003). "The many faces of vitamin B₁₂: catalysis by cobalamin-dependent enzymes." Annual Review of Biochemistry **72**: 209-247.

Banerjee, R. V.; Frasca, V.; Ballou, D. P. y Matthews, R. G. (1990a). "Participation of cob(I)alamin in the reaction catalyzed by methionine synthase from *Escherichia coli*: a steady-state and rapid reaction kinetic analysis." Biochemistry **29**(50): 11101-11109.

Banerjee, R. V.; Harder, S. R.; Ragsdale, S. W. y Matthews, R. G. (1990b). "Mechanism of reductive activation of cobalamin-dependent methionine synthase: an electron paramagnetic resonance spectroelectrochemical study." Biochemistry **29**(5): 1129-1135.

Banerjee, R. V. y Matthews, R. G. (1990). "Cobalamin-dependent methionine synthase." Federation of American Societies for Experimental Biology Journal **4**(3): 1450-1459.

- Barker, H. A.; Weissbach, H. y Smyth, R. D. (1958).** "A coenzyme containing pseudovitamin B₁₂." Proceedings of the National Academy of Sciences, USA **44**(11): 1093-1097.
- Barrick, J. y Breaker, R. (2007).** "The distributions, mechanisms, and structures of metabolite-binding riboswitches." Genome Biology **8**(11).
- Bastet, L.; Dubé, A.; Massé, E. y Lafontaine, D. A. (2011).** "New insights into riboswitch regulation mechanisms." Molecular Microbiology **80**(5): 1148-1154.
- Bocobza, S.; Adato, A.; Mandel, T.; Shapira, M.; Nudler, E. y Aharoni, A. (2007).** "Riboswitch-dependent gene regulation and its evolution in the plant kingdom." Genes & Development **21**(22): 2874-2883.
- Bond CM; Lees KA y RP., E. (1972).** "Photolytic decomposition of 3 cobalamins: a quantitative study". Journal of Pharmacy and Pharmacology. **143**.
- Bond, C. M.; Lees, K. A. y Enever, R. P. (1972).** "Photolytic decomposition of 3 cobalamins: a quantitative study." Journal of Pharmacy and Pharmacology **143**.
- Bonifacio, A.; Guidetti, R.; Altiero, T.; Sergo, V. y Rebecchi, L. (2012).** "Source and function of pigments in tardigrades: *in vivo* Raman imaging of carotenoids in *Echiniscus blumi*." PLoS One **7**(11): e50162.
- Botella, J. A. (1996).** "Un operón de la bacteria *Myxococcus xanthus* implicado en la síntesis de carotenoides y su regulación." Departamento de Genética Tesis doctoral.
- Botella, J. A.; Murillo, F. J. y Ruiz-Vázquez, R. (1995).** "A cluster of structural and regulatory genes for light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*." European Journal of Biochemistry **233**(1): 238-248.
- Bretscher, A. y Kaiser, D. (1978).** "Nutrition of *Myxococcus xanthus*, a fruiting myxobacterium." Journal of Bacteriology **133**(2): 763-771.
- Bretscher, A. y Kaiser, D. (1978).** "Nutrition of *Myxococcus xanthus*, a fruiting myxobacterium". Journal of Bacteriology. **133**: 763-771.
- Britton, G. (1983).** The biochemistry of natural pigments **Cambridge: Cambridge University Press**.
- Britton, G. (1993).** "Carotenoids in chloroplast pigment-protein complexes." Pigments protein complexes in plastids: synthesis and assembly **California: Academic Press, San Diego**(Editado por Sundqvist, M. y M. Rydberg): 447-484.
- Browning, D. F.; Whitworth, D. E. y Hodgson, D. A. (2003).** "Light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: functional characterization of the ECF sigma factor CarQ and antisigma factor CarR." Molecular Microbiology **48**(1): 237-251.
- Burchard, R. P. y Dworkin, M. (1966).** "Light-induced lysis and carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*." Journal of Bacteriology **91**(2): 535-545.

Cava, F.; Hidalgo, A. y Berenguer, J. (2009). "*Thermus thermophilus* as biological model." Extremophiles **13**(2): 213-231.

Cayuela, M. L.; Elías-Arnanz, M.; Peñalver-Mellado, M.; Padmanabhan, S. y 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." Journal of Bacteriology **185**(12): 3527-3537.

Cervantes, M. y Murillo, F. J. (2002). "Role for vitamin B₁₂ in light induction of gene expression in the bacterium *Myxococcus xanthus*." Journal of Bacteriology **184**(8): 2215-2224.

Cogdell, R. (1988). "The function of pigments in chloroplasts." Plants Pigments Londres: Academic Press(Editado por Goodwin, T. W.): 183-230.

Craig, M. L.; Suh, W. C. y Record, M. T. J. (1995). "HO. and DNase I probing of Es⁷⁰ RNA polymerase--lambda P_R promoter open complexes: Mg²⁺ binding and its structural consequences at the transcription start site." Biochemistry **34**(48): 15624-15632.

Croft, M.; Moulin, M.; Webb, M. y Smith, A. (2007). "Thiamine biosynthesis in algae is regulated by riboswitches." Proceedings of the National Academy of Sciences, USA **104**(52): 20770-20775.

Croft, M. T.; Lawrence, A. D.; Raux-Deery, E.; Warren, M. J. y Smith, A. G. (2005). "Algae acquire vitamin B₁₂ through a symbiotic relationship with bacteria." Nature **438**(7064): 90-93.

Cheah, M.; Wachter, A.; Sudarsan, N. y Breaker, R. (2007). "Control of alternative RNA splicing and gene expression by eukaryotic riboswitches." Nature **447**(7143): 497-997.

Chen, E. y Chance, M. (1990). "Nanosecond transient absorption spectroscopy of coenzyme B₁₂. Quantum yields and spectral dynamics." The Journal of Biological Chemistry **265**(22): 12987-13081.

Davis, S. J.; Vener, A. V. y Vierstra, R. D. (1999). "Bacteriophytochromes: phytochrome-like photoreceptors from nonphotosynthetic eubacteria." Science **286**(5449): 2517-2520.

Dawid, W. (2000). "Biology and global distribution of myxobacteria in soil." Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews **24**(4): 403-427.

Deisseroth, K. (2011). "Optogenetics." Nature Methods **8**(1): 26-29.

Deruère, J.; Römer, S.; d'Harlingue, A.; Backhaus, R. A.; Kuntz, M. y Camara, B. (1994). "Fibril assembly and carotenoid overaccumulation in chromoplasts: a model for supramolecular lipoprotein structures." Plant Cell **6**(1): 119-133.

Di Mascio, P.; Kaiser, S. y Sies, H. (1989). "Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher." Archives of Biochemistry and Biophysics **274**(2): 532-538.

Dirks, G.; Moore, A. L.; Moore, T. A. y Gust, D. (1980). "Light absorption and energy transfer in polyene-porphyrin esters." Photochemistry and Photobiology **32**: 277-280.

Drennan, C. L.; Huang, S.; Drummond, J. T.; Matthews, R. G. y Ludwig, M. L. (1994a). "How a protein binds B₁₂: A 3.0 Å X-ray structure of B₁₂-binding domains of methionine synthase." Science **266**(5191): 1669-1674.

Drennan, C. L.; Matthews, R. G. y Ludwig, M. L. (1994b). "Cobalamin-dependent methionine synthase: the structure of a methylcobalamin-binding fragment and implications for other B₁₂-dependent enzymes." Current Opinion in Structural Biology **4**(6): 919-929.

Elías-Arnanz, M.; Fontes, M. y Padmanabhan, S. (2008). "Carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: A complex regulatory network." Myxobacteria: Multicellularity and Differentiation ASM Press, Washington, DC (Whitworth, D. E.): 211-225.

Elías-Arnanz, M.; Padmanabhan, S. y Murillo, F. J. (2010). "The regulatory action of the myxobacterial CarD/CarG complex: a bacterial enhanceosome?" Federation of european Microbiological Societies (FEMS). Microbiology Reviews **34**(5): 764-778.

Elías-Arnanz, M.; Padmanabhan, S. y Murillo, F. J. (2011). "Light-dependent gene regulation in nonphototrophic bacteria." Current Opinion in Microbiology **14**(2): 128-135.

Fontes, M.; Galbis-Martínez, L. y Murillo, F. J. (2003). "A novel regulatory gene for light-induced carotenoid synthesis in the bacterium *Myxococcus xanthus*." Molecular Microbiology **47**(2): 561-571.

Fontes, M.; Ruiz-Vázquez, R. y Murillo, F. J. (1993). "Growth phase dependence of the activation of a bacterial gene for carotenoid synthesis by blue light." The EMBO Journal **12**(4): 1265-1275.

Fox, K.; Ramesh, A.; Stearns, J.; Bourgogne, A.; Reyes-Jara, A.; Winkler, W. y Garsin, D. (2009). "Multiple posttranscriptional regulatory mechanisms partner to control ethanolamine utilization in *Enterococcus faecalis*." Proceedings of the National Academy of Sciences, USA **106**(11): 4435-4475.

Fuchs, R. T.; Grundy, F. J. y Henkin, T. M. (2007). "S-adenosylmethionine directly inhibits binding of 30S ribosomal subunits to the SMK box translational riboswitch RNA." Proceedings of the National Academy of Sciences, USA **104**(12): 4876-4880.

Fujii, K. y Huennekens, F. M. (1974). "Activation of methionine synthetase by a reduced triphosphopyridine nucleotide-dependent flavoprotein system." The Journal of Biological Chemistry **249**(21): 6745-6753.

Galbis-Martínez, L. (2005). "Análisis genético y molecular de un transductor de la señal luminosa de la bacteria *Myxococcus xanthus*." Departamento de Genética Tesis doctoral.

Galbis-Martínez, L.; Galbis-Martínez, M.; Murillo, F. J. y Fontes, M. (2008). "An anti-antisigma factor in the response of the bacterium *Myxococcus xanthus* to blue light." Microbiology **154**(Pt3): 895-904.

Galbis-Martínez, M.; Padmanabhan, S.; Murillo, F. J. y Elías-Arnanz, M. (2012). "CarF mediates signaling by singlet oxygen, generated via photoexcited protoporphyrin IX, in *Myxococcus xanthus* light-induced carotenogenesis." Journal of Bacteriology **194**(6): 1427–1436.

Gao, J.; Ajjawi, I.; Manoli, A.; Sawin, A.; Xu, C.; Froehlich, J. E.; Last, R. L. y Benning, C. (2009). "Fatty acid desaturase 4 of *Arabidopsis* encodes a protein distinct from characterized fatty acid desaturases." Plant Journal **60**(5): 832-839.

García-Heras, F.; Abellón-Ruiz, J.; Murillo, F. J.; Padmanabhan, S. y Elías-Arnanz, M. (2012). "The high mobility group A (HMGA)-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*." Journal of Bacteriology.

García-Heras, F.; Padmanabhan, S.; Murillo, F. J. y Elías-Arnanz, M. (2009). "Functional equivalence of HMGA- and histone H1-like domains in a bacterial transcriptional factor." Proceedings of the National Academy of Sciences, USA **106**(32): 13546-13551.

García-Moreno, D.; Abellón-Ruiz, J.; García-Heras, F.; Murillo, F. J.; Padmanabhan, S. y 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 Research **38**(14): 4586-4598.

Glaser, P.; Ladant, D.; Sezer, O.; Pichot, F.; Ullmann, A. y Danchin, A. (1988). "The calmodulinsensitive adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*: cloning and expression in *Escherichia coli*." Molecular Microbiology **2**(19-30).

Gomelsky, M. y Hoff, W. D. (2011). "Light helps bacteria make important lifestyle decisions." Trends in Microbiology **19**(9): 441-448.

Goodwin, T. W. (1980). "Plants." The Biochemistry of the Carotenoids. Volumen I. 2ª edición Nueva York (Editado por Chapman and Hall).

Gorham, H. C.; McGowan, S. J.; Robson, P. R. y Hodgson, D. A. (1996). "Light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: light-dependent membrane sequestration of ECF sigma factor CarQ by anti-sigma factor CarR." Molecular Microbiology **19**(1): 171-186.

Griffith, K. L. y Wolf, R. E., Jr. (2002). "Measuring beta-galactosidase activity in bacteria: cell growth, permeabilization, and enzyme assays in 96-well arrays." Biochemical and Biophysical Research Communications **290**(1): 397-402.

Gruber, K. y Kratky, C. (2002). "Coenzyme B₁₂ dependent glutamate mutase." Current Opinion in Chemical Biology **6**(5): 598-603.

Guest, J. R.; Friendman, S.; Woods, D. D. y Smith, E. L. (1962). "A methyl analogue of cobamide coenzyme in relation to methionine synthesis by bacteria." Nature **195**: 340-342.

Han Y.; Meyer M.H.; Keusgen M. y G., K. (2007). "A haem cofactor is required for redox and light signalling by the AppA protein of *Rhodobacter sphaeroides*". Molecular Microbiology. **64**: 1090-1104.

Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." Journal of Molecular Biology **166**(4): 557-580.

Hansen, J.; Muldbjerg, M.; Chérest, H. y Surdin-Kerjan, Y. (1997). "Siroheme biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* requires the products of both the MET1 and MET8 genes." Federation of European Biochemical Societies letters **401**(1): 20-24.

Hasegawa, K.; Masuda, S. y Ono, T. A. (2006). "Light induced structural changes of a full-length protein and its BLUF domain in YcgF(Blrp), a blue-light sensing protein that uses FAD (BLUF)." Biochemistry **45**(11): 3785-3793.

Heldwein, E. E. y Brennan, R. G. (2001). "Crystal structure of the transcription activator BmrR bound to DNA and a drug." Nature **409**(6818): 378-382.

Henne, A.; Brüggemann, H.; Raasch, C.; Wiezer, A.; Hartsch, T.; Liesegang, H.; Johann, A.; Lienard, T.; Gohl, O.; Martinez-Arias, R.; Jacobi, C.; Starkuviene, V.; Schlenczeck, S.; Dencker, S.; Huber, R.; Klenk, H. P.; Kramer, W.; Merkl, R.; Gottschalk, G. y Fritz, H. J. (2004). "The genome sequence of the extreme thermophile *Thermus thermophilus*." Nature Biotechnology **22**: 547-553.

Herrou, J. y Crosson, S. (2011). "Function, structure and mechanism of bacterial photosensory LOV proteins." Nature Reviews. Microbiology **9**(10): 713-723.

Hewlett, E. y Wolff, J. (1976). "Soluble adenylate cyclase from the culture medium of *Bordetella pertussis*: purification and characterization." Journal of Bacteriology **127**(2): 890-898.

Ho, S. N.; Hunt, H. D.; Horton, R. M.; Pullen, J. K. y Pease, L. R. (1989). "Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction." Gene **77**(1): 51-59.

Hodgkin, D. C.; Kamper, J.; Mackay, M.; Pickworth, J.; Trueblood, K. N. y White, J. G. (1956). "Structure of vitamin B₁₂." Nature **178**(4524): 64-66.

Hoshino, T.; Fujii, R. y Nakahara, T. (1993). "Molecular cloning and sequence analysis of the *crtB* gene of *Thermus thermophilus* HB27, an extreme thermophile producing carotenoid pigments." Applied and Environmental Microbiology **59**(9): 3150-3153.

Iniasta, A. A.; Cervantes, M. y Murillo, F. J. (2007). "Cooperation of two carotene desaturases in the production of lycopene in *Myxococcus xanthus*." Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Journal **274**(16): 4306-4314.

Jarrett, J. T.; Amaratunga, M.; Drennan, C. L.; Scholten, J. D.; Sands, R. H.; Ludwig, M. L. y Matthews, R. G. (1996). "Mutations in the B₁₂-binding region of methionine synthase: how the protein controls methylcobalamin reactivity." Biochemistry **35**(7): 2464-2475.

Johnson, A. D.; Poteete, A. R.; Lauer, G.; Sauer, R. T.; Ackers, G. K. y Ptashne, M. (1981). "λ repressor and cro--components of an efficient molecular switch." Nature **294**(5838): 217-223.

Johnson, C.; Pechonick, E. y Park, S. (2001). "Functional genomic, biochemical, and genetic characterization of the *Salmonella pduO* gene, an ATP: cob (I) alamin adenosyltransferase gene." Journal of Bacteriology **183**(5): 1577-1584.

Johnson, C. L.; Buszko, M. L. y Bobik, T. A. (2004). "Purification and initial characterization of the *Salmonella enterica* PduO ATP:Cob(I)alamin adenosyltransferase." Journal of Bacteriology **186**(23): 7881-7887.

Johnson, C. L.; Pechonick, E.; Park, S. D.; Havemann, G. D.; Leal, N. A. y Bobik, T. A. (2001). "Functional genomic, biochemical, and genetic characterization of the *Salmonella pduO* gene, an ATP:cob(I)alamin adenosyltransferase gene." Journal of Bacteriology **183**(5): 1577-1584.

Johnson, J. E. J.; Reyes, F. E.; Polaski, J. T. y Batey, R. T. (2012). "B₁₂ cofactors directly stabilize an mRNA regulatory switch." Nature **492**(7427): 133-137.

Kaiser, D. (2000). "Bacterial motility: how do pili pull?" Current Biology: CB **10**(21): R777-R7780.

Kaiser, D. (2008). "*Myxococcus*-from single-cell polarity to complex multicellular patterns." Annual Review of Genetics **42**:: 109-130.

Kaiser, D. y Dworkin, M. (2008). "λ Myxobacterial Biology." Myxobacteria: Multicellularity and Differentiation AMS Press, Washington DC(Editado por Whitworth, D. E.).

Kaiser, D.; Robinson, M. y Kroos, L. (2010). "Myxobacteria, polarity, and multicellular morphogenesis." Cold Spring Harbor Perspective in Biology **2**(8): a000380. doi: 10.1101/cshperspect.a000380.

Karimova, G.; Pidoux, J.; Ullmann, A. y Ladant, D. (1998). "A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway." Proceedings of the National Academy of Sciences, USA **95**(10): 5752-5756.

Karimova, G.; Ullmann, A. y Ladant, D. (2000). "A bacterial two-hybrid system that exploits a cAMP signaling cascade in *Escherichia coli*." Methods in Enzymology **328**: 59-73.

Kashefi, K. y Hartzell, P. (1995). "Genetic suppression and phenotypic masking of a *Myxococcus xanthus* *frzF*- defect." Molecular Microbiology **15**(3): 483-494.

Kleinig, H. y Reichenbach, H. (1969). "Carotenoid pigments of *Stigmatella aurantiaca* (Myxobacterales).I. The minor carotenoids." Archiv fur Mikrobiologie **68**(3): 210-217.

Kleinig, H.; Reichenbach, H. y Achenbach, H. (1970). "Carotenoid pigments of *Stigmatella aurantiaca* (Myxobacterales). II. Acylated carotenoid glucosides." Archiv fur Mikrobiologie **74**(3): 223-234.

Koudelka, G. B. (2000). "Cooperativity: action at a distance in a classic system." Current Biology: CB **10**(19): R704-R707.

Koutmos, M.; Datta, S.; Patridge, K. A.; Smith, J. L. y Matthews, R. G. (2009). "Insights into the reactivation of cobalamin-dependent methionine synthase." Proceedings of the National Academy of Sciences, USA **106**(44): 18527-18532.

Kroos, L. (2007). "The *Bacillus* and *Myxococcus* developmental networks and their transcriptional regulators." Annual Review of Genetics **41**: 13-39.

Kubodera, T.; Watanabe, M.; Yoshiuchi, K.; Yamashita, N.; Nishimura, A.; Nakai, S.; Gomi, K. y Hanamoto, H. (2003). "Thiamine-regulated gene expression of *Aspergillus oryzae* *thiA* requires splicing of the intron containing a riboswitch-like domain in the 5'-UTR." FEBS letters **555**(3): 516-536.

Kühlbrandt, W.; Wang, D. N. y Fujiyoshi, Y. (1994). "Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography." Nature **367**(6464): 614-621.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.

Leal, N. A.; Olteanu, H.; Banerjee, R. y Bobik, T. A. (2004). "Human ATP:Cob(I)alamin adenosyltransferase and its interaction with methionine synthase reductase." The Journal of Biological Chemistry **279**(46): 47536-47542.

Lenhert, P. G. (1968). "The structure of vitamin B₁₂. The X-ray analysis of the vitamin B₁₂ coenzyme." Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences **303**: 45-84.

Lenhert, P. G. y Hodgkin, D. C. (1961). "Structure of the 5,6-dimethylbenzimidazolylcobamide coenzyme." Nature **192**: 937-938.

León, E.; Navarro-Avilés, G.; Santiveri, C.; Flores-Flores, C.; Rico, M.; González, C.; Murillo, F.; Elías-Arnanz, M.; Jiménez, M. y Padmanabhan, S. (2010). "A bacterial antirepressor with SH3 domain topology mimics operator DNA in sequestering the repressor DNA recognition helix." Nucleic Acids Research **38**(15): 5226-5267.

León, E.; Navarro-Avilés, G.; Santiveri, C. M.; Flores-Flores, C.; Rico, M.; González, C.; Murillo, F. J.; Elías-Arnanz, M.; Jiménez, M. Á. y Padmanabhan, S. (2010). "A bacterial antirepressor with SH3 domain topology mimics operator DNA in sequestering the repressor DNA recognition helix." Nucleic Acids Research **38**(15): 5226–5241.

Lizuka, T.; Jojima, Y.; Fudou, R. y Yamanaka, S. (1998). "Isolation of myxobacteria from the marine environment." FEMS Microbiological Letters **169**(2): 317-322.

Lonetto, M. A.; Brown, K. L.; Rudd, K. E. y Buttner, M. J. (1994). "Analysis of the *Streptomyces coelicolor sigE* gene reveals the existence of a subfamily of eubacterial RNA polymerase sigma factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions." Proceedings of the National Academy of Sciences, USA **91**(16): 7573-7577.

López-Rubio, J. J. (2005). "Mecanismo de regulación de un promotor de la bacteria *Myxococcus xanthus* inducible por luz azul." Departamento de Genética Tesis doctoral.

López-Rubio, J. J.; Elías-Arnanz, M.; Padmanabhan, S. y Murillo, F. J. (2002). "A repressor-antirepressor pair links two loci controlling light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*." The Journal of Biological Chemistry **277**(9): 7262-7270.

López-Rubio, J. J.; Padmanabhan, S.; Lázaro, J. M.; Salas, M.; Murillo, F. J. y Elías-Arnanz, M. (2004). "Operator design and mechanism for CarA repressor-mediated down-regulation of the photoinducible *carB* operon in *Myxococcus xanthus*." The Journal of Biological Chemistry **279**(28): 28945-28953.

Losi, A. y Gärtner, W. (2008). "Bacterial bilin- and flavin-binding photoreceptors." Photochemical and Photobiological Sciences **7**(10): 1168-1178.

Losi, A.; Polverini, E.; Quest, B. y Gärtner, W. (2002). "First evidence for phototropin-related blue-light receptors in prokaryotes." Biophysical Journal **82**(5): 2627-2634.

Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." Journal of Biological Chemistry **193**(1): 265-275.

Ludwig, M. L.; Drennan, C. L. y Matthews, R. G. (1996). "The reactivity of B₁₂ cofactors: the proteins make a difference." Structure **4**(5): 505-512.

Ludwig, M. L. y Matthews, R. G. (1997). "Structure-based perspectives on B₁₂-dependent enzymes." Annual Review of Biochemistry **66**: 269-313.

- Mancia, F.; Keep, N. H.; Nakagawa, A.; Leadlay, P. F.; McSweeney, S.; Rasmussen, B.; Bösecke, P.; Diat, O. y Evans, P. R. (1996).** "How coenzyme B₁₂ radicals are generated: the crystal structure of methylmalonyl-coenzyme A mutase at 2 Å resolution." Structure **4**(3): 339-350.
- Mangum, J. H.; Murray, B. K. y North, J. A. (1969).** "Vitamin B₁₂ dependent methionine biosynthesis in cultured mammalian cells." Biochemistry **8**(9): 3496-3499.
- Mangum, J. H. y Scrimgeour, K. G. (1962).** "Cofactor requirements and intermediates in methionine biosynthesis." Federation Proceedings **21**: 242.
- Maresca, J. A.; Graham, J. E. y Bryant, D. A. (2008).** "The biochemical basis for structural diversity in the carotenoids of chlorophototrophic bacteria." Photosynthesis Research **97**(2): 121-140.
- Marsh, E. N. (2000).** "Coenzyme-B₁₂-dependent glutamate mutase." Bioorganic Chemistry **28**(3): 176-189.
- Marsh, E. N. G. y Ballou, D. P. (1998).** "Coupling of cobalt-carbon bond homolysis and hydrogen atom abstraction in adenosylcobalamin-dependent glutamate mutase." Biochemistry **37**(34): 11864-11872.
- Marsh, E. N. G. y Drennan, C. L. (2001).** "Adenosylcobalamin-dependent isomerases: new insights into structure and mechanism." Current Opinion in Chemical Biology **5**(5): 499-505.
- Martínez-Laborda, A.; Balsalobre, J. M.; Fontes, M. y Murillo, F. J. (1990).** "Accumulation of carotenoids in structural and regulatory mutants of the bacterium *Myxococcus xanthus*." Molecular and General Genetics **223**(2): 205-210.
- Martínez-Laborda, A.; Elías, M.; Ruiz-Vázquez, R. M. y Murillo, F. J. (1986).** "Insertions of Tn5 linked to mutations affecting carotenoid synthesis in *Myxococcus xanthus*." Molecular and General Genetics **205**: 107-114.
- Martínez-Laborda, A. y Murillo, F. J. (1989).** "Genic and allelic interactions in the carotenogenic response of *Myxococcus xanthus* to blue light." Genetics **122**(3): 481-490.
- McGowan, S. J.; Gorham, H. C. y Hodgson, D. A. (1993).** "Light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: DNA sequence analysis of the carR region." Molecular Microbiology **10**(4): 713-735.
- Meiser, P.; Bode, H. y Müller, R. (2006).** "The unique DKxanthene secondary metabolite family from the myxobacterium *Myxococcus xanthus* is required for developmental sporulation." Proceedings of the National Academy of Sciences, USA **103**(50): 19128-19133.
- Mera, P. E. y Escalante-Semerena, J. C. (2010).** "Multiple roles of ATP:cob(I)alamin adenosyltransferases in the conversion of B₁₂ to coenzyme B₁₂." Applied Microbiology and Biotechnology **88**: 41-48.
- Mera, P. E. y Escalante-Semerena, J. C. (2010).** "Multiple roles of ATP:cob(I)alamin adenosyltransferases in the conversion of B₁₂ to coenzyme B₁₂." Applied Microbiology and Biotechnology **88**(1): 41-48.

Mignot, T.; Shaevitz, J. W.; Hartzell, P. L. y Zusman, D. R. (2007). "Evidence that focal adhesion complexes power bacterial gliding motility." Science **315**(5813): 853-856.

Miller, J. (1972). "Experiments in molecular genetics." Cold Spring Harbor. Laboratory Press. NY.

Miller, J. (1992). "A short course in bacterial genetics." Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.

Minot, G. R. y Murphy, W. P. (1926). "Treatment of pernicious anemia by a special diet." Journal of the American Medical Association **87**: 470-476.

Miranda-Ríos, J.; Navarro, M. y Soberón, M. (2001). "A conserved RNA structure (thi box) is involved in regulation of thiamin biosynthetic gene expression in bacteria." Proceedings of the National Academy of Sciences, USA **98**(17): 9736-9777.

Mock, M. y Ullmann, A. (1993). "Calmodulin-activated bacterial adenylate cyclases as virulence factors." Trends in Microbiology **1**(5): 187-92.

Moraleta-Muñoz, A.; Pérez, J.; Fontes, M.; Murillo, F. J. y Muñoz-Dorado, J. (2005). "Copper induction of carotenoid synthesis in the bacterium *Myxococcus xanthus*." Molecular Microbiology **56**(5): 1159-1168.

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

Moreno, A. J.; Fontes, M. y Murillo, F. J. (2001). "*ihfA* gene of the bacterium *Myxococcus xanthus* and its role in activation of carotenoid genes by blue light." Journal of Bacteriology **183**(2): 557-569.

Moskvina, O. V.; Gilles-Gonzalez, M. A. y Gomelsky, M. (2010). "The PpaA/AerR regulators of photosynthesis gene expression from anoxygenic phototrophic proteobacteria contain heme-binding SCHIC domains". Journal of Bacteriology. **192**: 5253-5256.

Moskvina, O. V.; Kaplan, S.; Gilles-Gonzalez, M. A. y Gomelsky, M. (2007). "Novel heme-based oxygen sensor with a revealing evolutionary history." Journal of Biological Chemistry **282**(39): 28740-28748.

Nahvi A; Barrick J. E. y Breaker R. R. (2004). "Coenzyme B₁₂ riboswitches are widespread genetic control elements in prokaryotes." Nucleic Acids Research **32**(1): 143-150.

Nahvi, A.; Sudarsan, N.; Ebert, M. S.; Zou, X.; Brown, K. L. y Breaker, R. R. (2002). "Genetic control by a metabolite binding mRNA." Chemical Biology **9**(9): 1043-1049.

Nakasone, Y.; Ono, T. A.; Ishii, A.; Masuda, S. y Terazima, M. (2007). "Transient dimerization and conformational change of a BLUF protein: YcgF." Journal of the American Chemical Society **129**(22): 7028-7035.

Nash, A. I.; McNulty, R.; Shillito, M. E.; Swartz, T. E.; Bogomolni, R. A.; Luecke, H. y Gardner, K. H. (2011). "Structural basis of photosensitivity in a bacterial light-oxygen-voltage/helix-turn-helix (LOV-HTH) DNA-binding protein." Proceedings of the National Academy of Sciences, USA **108**(23): 9449-9454.

Navarro-Avilés, G.; Jiménez, M. A.; Pérez-Marín, M. C.; González, C.; Murillo, F. J.; Elías-Arnanz, M. y Padmanabhan, S. (2007). "Structural basis for operator and antirepressor recognition by *Myxococcus xanthus* CarA repressor." Molecular Microbiology **63**(4): 980-994.

Newberry, K. J. y Brennan, R. G. (2004). "The structural mechanism for transcription activation by MerR family member multidrug transporter activation, N terminus." Journal of Biological Chemistry **279**(19): 20356-20362.

Ng, W. O.; Grossman, A. R. y Bhaya, D. (2003). "Multiple light inputs control phototaxis in *Synechocystis* sp. strain PCC6803." Journal of Bacteriology **185**(5): 1599-1607.

Nicolás, F. J. (1995). "Un gen de *Myxococcus xanthus*, *carD*, que regula la carotenogénesis y controla el proceso de desarrollo multicelular." Departamento de Genética Tesis doctoral.

Nicolás, F. J.; Cayuela, M. L.; Martínez-Argudo, I. M.; Ruiz-Vázquez, R. M. y Murillo, F. J. (1996). "High mobility group I(Y)-like DNA-binding domains on a bacterial transcription factor." Proceedings of the National Academy of Sciences, USA **93**(14): 6881-6885.

Nicolás, F. J.; Ruiz-Vázquez, R. M. y Murillo, F. J. (1994). "A genetic link between light response and multicellular development in the bacterium *Myxococcus xanthus*." Genes & Development **8**(19): 2375-2387.

Oltean, S. y Banerjee, R. (2003). "Nutritional modulation of gene expression and homocysteine utilization by vitamin B₁₂." The Journal of Biological Chemistry **278**(23): 20778-20784.

Oltean, S. y Banerjee, R. (2005). "A B₁₂-responsive internal ribosome entry site (IRES) element in human methionine synthase." The Journal of Biological Chemistry **280**(38): 32662-32668.

Padmakumar, R.; Padmakumar, R. y Banerjee, R. (1997). "Evidence that cobalt-carbon bond homolysis is coupled to hydrogen atom abstraction from substrate in methylmalonyl-CoA mutase." Biochemistry **36**(12): 3713-3718.

Padmanabhan, S.; Elías-Arnanz, M.; Carpio, E.; Aparicio, P. y Murillo, F. J. (2001). "Domain architecture of a high mobility group A-type bacterial transcriptional factor." The Journal of Biological Chemistry **276**(45): 41566-41575.

Pathak, D. T.; Wei, X. y Wall, D. (2012). "Myxobacterial tools for social interactions." Research in Microbiology **163**(9-10): 579-591.

Peñalver-Mellado, M. (2005). "Identificación de proteínas de *Myxococcus xanthus* que interaccionan con el factor transcripcional CarD." Departamento de Genética Tesis doctoral.

Peñalver-Mellado, M.; García-Heras, F.; Padmanabhan, S.; García-Moreno, D.; Murillo, F. J. y 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*." Molecular Microbiology **61**(4): 910-2.

Pérez-Marín, M. C. (2007). "Papel de la vitamina B₁₂ en la síntesis de carotenos regulada por la luz en *Myxococcus xanthus*." Departamento de Genética Tesis doctoral.

Pérez-Marín, M. C.; López-Rubio, J. J.; Murillo, F. J.; Elías-Arnanz, M. y Padmanabhan, S. (2004). "The N terminus of *Myxococcus xanthus* CarA repressor is an autonomously folding domain that mediates physical and functional interactions with both operator DNA and antirepressor protein." The Journal of Biological Chemistry **279**(32): 33093–33103.

Pérez-Marín, M. C.; Padmanabhan, S.; Polanco, M. C.; Murillo, F. J. y Elías-Arnanz, M. (2008). "Vitamin B₁₂ partners the CarH repressor to downregulate a photoinducible promoter in *Myxococcus xanthus*." Molecular Microbiology **67**(4): 804–819

Peselis, A. y Serganov, A. (2012). "Structural insights into ligand binding and gene expression control by an adenosylcobalamin riboswitch." Natural Structural and Molecular Biology **19**(11): 1182-1184.

Purcell, E. B. y Crosson, S. (2008). "Photoregulation in prokaryotes." Current Opinion in Microbiology **11**(2): 168-178.

Ravnum, S. y Andersson, D. I. (1997). "Vitamin B₁₂ repression of the *btuB* gene in *Salmonella typhimurium* is mediated via a translational control which requires leader and coding sequences." Molecular Microbiology **23**(1): 35-42.

Reichenbach, H. y Kleinig, H. (1971). "The carotenoids of *Myxococcus fulvus* (Myxobacterales)." Archives of Microbiology **76**: 364-380.

Reichenbach, H. y Kleinig, H. (1972). "The carotenoids of myxobacteria." Zentralbl Bakteriol [Original en alemán] **220**(1): 458-463.

Rickes, E. L.; Brink, N. G.; Koniuszy, F. R.; Wood, T. R. y Folkers, K. (1948). "Purification of anti-pernicious anaemia factors from liver." Science **107**(2781): 396-397.

Robertson, W. D. y Warncke, K. (2009). "Photolysis of adenosylcobalamin and radical pair recombination in ethanolamine ammonia-lyase probed on the micro- to millisecond time scale by using time-resolved optical absorption spectroscopy." Biochemistry **48**(1): 140-147.

Rodionov, D. A.; Vitreschak, A. G.; Mironov, A. A. y Gelfand, M. S. (2002). "Comparative genomics of thiamin biosynthesis in procaryotes. New genes and regulatory mechanisms." The Journal of Biological Chemistry **277**(50): 48949-49008.

Rodionov, D. A.; Vitreschak, A. G.; Mironov, A. A. y Gelfand, M. S. (2003). "Comparative genomics of the vitamin B₁₂ metabolism and regulation in prokaryotes." The Journal of Biological Chemistry **278**(42): 41148-41207.

Roof, D. M. y Roth, J. R. (1989). "Functions required for vitamin B₁₂-dependent ethanolamine utilization in *Salmonella typhimurium*." Journal of Bacteriology **171**(6): 3316-3323.

Roof, D. M. y Roth, J. R. (1992). "Autogenous regulation of ethanolamine utilization by a transcriptional activator of the eut operon in *Salmonella typhimurium*." Journal of Bacteriology **174**(20): 6634-6643.

Rossi, M.; Glusker, J. P.; Randaccio, L.; Summers, M. F.; Toscano, P. J. y Marzilli, L. G. (1985). "The structure of a B₁₂ coenzyme: methylcobalamin studies by X-ray and NMR methods." Journal of the American Chemical Society (ACS Publications) **107**: 1729-1738.

Roth, J. R.; Lawrence, J. G. y Bobik, T. A. (1996). "Cobalamin (coenzyme B₁₂): synthesis and biological significance." Annual Review of Microbiology **50**: 137-181.

Ruiz-Vázquez, R.; Fontes, M. y Murillo, F. J. (1993). "Clustering and co-ordinated activation of carotenoid genes in *Myxococcus xanthus* by blue light." Molecular Microbiology **10**(1): 25-34.

Ruiz-Vázquez, R. y Murillo, F. J. (1984). "Abnormal motility and fruiting behavior of *Myxococcus xanthus* bacteriophage-resistant strains induced by a clear-plaque mutant of bacteriophage Mx8." Journal of Bacteriology **160**(2): 818-821.

Sambrook, J. y Russell, D. W. (2001). "Molecular cloning: a laboratory manual." Cold Spring Harbor. Laboratory Press. NY.

Sandmann, G. (2009). "Evolution of carotene desaturation: the complication of a simple pathway." Archives of Biochemistry and Biophysics **483**(2): 169-174.

Schroeder, C.; Werner, K.; Otten, H.; Krätzig, S.; Schwalbe, H. y Essen, L. O. (2008). "Influence of a joining helix on the BLUF domain of the YcgF photoreceptor from *Escherichia coli*." Chembiochem **9**(15): 2463-2473.

Schwartz, P. y Frey, P. (2007). "5'-Peroxyadenosine and 5'-peroxyadenosylcobalamin as intermediates in the aerobic photolysis of adenosylcobalamin." Biochemistry **46**(24): 7284-7376.

Sension, R. J.; Harris, D. A.; Stickrath, A.; Cole, A. G.; Fox, C. C. y Marsh, E. N. (2005). "Time-resolved measurements of the photolysis and recombination of adenosylcobalamin bound to glutamate mutase." Journal of Physical Chemistry. B. **109**(38): 18146-18152.

Shanklin, J.; Achim, C.; Schmidt, H.; Fox, B. G. y Münck, E. (1997). "Mössbauer studies of alkane omega-hydroxylase: evidence for a diiron cluster in an integral-membrane enzyme." Proceedings of the National Academy of Sciences, USA **94**(7): 2981-2986.

Shibata, N.; Masuda, J.; Tobimatsu, T.; Toraya, T.; Suto, K.; Morimoto, Y. y Yasuoka, N. (1999). "A new mode of B₁₂ binding and the direct participation of a potassium ion in enzyme catalysis: X-ray structure of diol dehydratase." Structure **7**(8): 997-1008.

Smith, E. L. (1948). "Purification of anti-pernicious anaemia factors from liver." Nature **161**(4095): 638.

Soriano-Rubio, M. V. (2012). "Estudio de la dependencia de B₁₂ de la proteína Mxan0232 de la bacteria *Myxococcus xanthus* e interacción con Mxan0231." Departamento de Genética Tesis doctoral.

Stevens, R. (1982). "The total synthesis of vitamin B₁₂. Volumen 1." B₁₂ **New York, NY**(Editado por Wiley. E. y Dolphin D.): 169-200.

Sudarsan, N.; Barrick, J. y Breaker, R. (2003). "Metabolite-binding RNA domains are present in the genes of eukaryotes." RNA **New York, NY**: 644-651.

Taga, M. E.; Larsen, N. A.; Howard-Jones, A. R.; Walsh, C. T. y Walker, G. C. (2007). "BluB cannibalizes flavin to form the lower ligand of vitamin B₁₂." Nature **446**(7134): 449-453.

Takaichi, S. (2011). "Carotenoids in algae: distributions, biosyntheses and functions." Marine Drugs **9**(6): 1101-1118.

Takano, H.; Beppu, T. y Ueda, K. (2006). "The CarA/LitR-family transcriptional regulator: Its possible role as a photosensor and wide distribution in non-phototrophic bacteria." Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry **70**(9): 2320-2324.

Takano, H.; Kondo, M.; Usui, N.; Usui, T.; Ohzeki, H.; Yamazaki, R.; Washioka, M.; Nakamura, A.; Hoshino, T.; Hakamata, W.; Beppu, T. y Ueda, K. (2011). "Involvement of CarA/LitR and CRP/FNR family transcriptional regulators in light-induced carotenoid production in *Thermus thermophilus*." Journal of Bacteriology **193**(10): 2451-2459.

Takano, H.; Obitsu, S.; Beppu, T. y Ueda, K. (2005). "Light-induced carotenogenesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2): identification of an extracytoplasmic function sigma

factor that directs photodependent transcription of the carotenoid biosynthesis gene cluster." Journal of Bacteriology **187**(5): 1825-1832.

Thoma, N. H. y Leadlay, P. E. (1996). "Homology modeling of human methylmalonyl-CoA mutase: A structural basis for point mutations causing methylmalonic aciduria." Protein Science **5**: 1922-1927.

Tian, B. y Hua, Y. (2010). "Carotenoid biosynthesis in extremophilic *Deinococcus-Thermus* bacteria." Trends in Microbiology **18**(11): 512-520.

Tschowri, N.; Busse, S. y Hengge, R. (2009). "The BLUF-EAL protein YcgF acts as a direct anti-repressor in a blue-light response of *Escherichia coli*." Genes & Development **23**(4): 522-534.

Ueki, T. y Inouye, S. (2006). "A novel regulation on developmental gene expression of fruiting body formation in Myxobacteria." Applied Microbiology and Biotechnology **72**(1): 21-29.

Van der Horst, M. A.; Key, J. y Hellingwerf, K. J. (2007). "Photosensing in chemotrophic, non-phototrophic bacteria: let there be light sensing too." Trends in Microbiology **15**(12): 554-562.

Vitreschak, A.; Rodionov, D.; Mironov, A. y Gelfand, M. (2004). "Riboswitches: the oldest mechanism for the regulation of gene expression?" Trends in Genetics : TIG **20**(1): 44-94.

Vitreschak, A. G.; Rodionov, D. A.; Mironov, A. A. y Gelfand, M. S. (2003). "Regulation of the vitamin B₁₂ metabolism and transport in bacteria by a conserved RNA structural element." Cold Spring Harbor Perspectives in Biology **9**: 1084 - 1097.

Wachter, A.; Tunc-Ozdemir, M.; Grove, B.; Green, P.; Shintani, D. y Breaker, R. (2007). "Riboswitch control of gene expression in plants by splicing and alternative 3' end processing of mRNAs." The Plant Cell **19**(11): 3437-3487.

Walden, H.; Bell, G. S.; Russell, R. J.; Siebers, B.; Hensel, R. y Taylor, G. L. (2001). "Tiny TIM: a small, tetrameric, hyperthermostable triosephosphate isomerase." Journal of Molecular Biology **306**(4): 745-757.

Wall, D. y Kaiser, D. (1999). "Type IV pili and cell motility." Molecular Microbiology **32**(1): 1-10.

Warren, M.; Raux, E.; Schubert, H. y Escalante-Semerena, J. (2002). "The biosynthesis of adenosylcobalamin (vitamin B₁₂)."
Natural Product Reports **19**(4): 390-412.

Weaver, L. H.; Kwon, K.; Beckett, D. y Matthews, B. W. (2001). "Corepressor-induced organization and assembly of the biotin repressor: a model for allosteric activation of a transcriptional regulator."
Proceedings of the National Academy of Sciences, USA **98**(11): 6045-6050.

Whipple, G. H. y Robscheitt-Robbins, F. S. (1926). "III. Muscle Hemoglobin as a Source of Bile Pigment."
American Journal of Physiology **78**: 675.

Whitworth, D. E. y Hodgson, D. A. (2001). "Light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: evidence that CarS acts as an anti-repressor of CarA."
Molecular Microbiology **42**(3): 809-819.

Winkler, W.; Nahvi, A. y Breaker, R. (2002). "Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression."
Nature **419**(6910): 952-958.

Winkler, W.; Nahvi, A.; Roth, A.; Collins, J. y Breaker, R. (2004). "Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme."
Nature **428**(6980): 281-287.

Wolgemuth, C.; Hoiczky, E.; Kaiser, D. y Oster, G. (2002). "How myxobacteria glide."
Current Biology: CB **12**(5): 369-377.

Yamanishi, M.; Vlasie, M. y Banerjee, R. (2005). "Adenosyltransferase: an enzyme and an escort for coenzyme B₁₂?"
Trends in Biochemical Sciences **30**(6): 304-312.

Yanisch-Perron, C.; Vieira, J. y Messing, J. (1985). "Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors."
Gene **33**(1): 103-119.

Youderian, P.; Burke, N.; White, D. J. y Hartzell, P. L. (2003). "Identification of genes required for adventurous gliding motility in *Myxococcus xanthus* with the transposable element mariner."
Molecular Microbiology **49**(2): 555-570.

Zhang, Y.; Rodionov, D. A.; Gelfand, M. S. y Gladyshev, V. N. (2009). "Comparative genomic analyses of nickel, cobalt and vitamin B₁₂ utilization."
BioMed Central Genomics **10**: 78.

