



TRABAJO FIN DE GRADO

**GRADO EN
BIOTECNOLOGÍA**

Fases preliminares para el estudio de la activación de la transcripción dependiente del factor de transcripción cianobacteriano NtcA.

Alumno: Jose Manuel Aguilera Porcar
Tutor UCV: Leonor Puchades Carrasco
Tutor externo: José Luis Llácer Guerri
Curso académico: 4º de Biotecnología



INSTITUT DE
BIOMEDICINA DE
VALÈNCIA



Facultad de Veterinaria
y Ciencias Experimentales
Universidad Católica de Valencia
San Vicente Mártir

ÍNDICE

<i>RESUMEN</i>	<i>I</i>
<i>ABSTRACT</i>	<i>III</i>
<i>ABREVIATURAS</i>	<i>V</i>
<i>1.INTRODUCCIÓN</i>	<i>1</i>
1.1: La regulación de la transcripción en bacterias.	1
1.2: La familia de reguladores transcripcionales CRP/FNR.	3
1.3: La regulación transcripcional del metabolismo del nitrógeno en cianobacterias mediada por NtcA y PII.	3
1.4: El papel de PipX en la regulación del metabolismo del nitrógeno.	6
1.5. El complejo RNAP-NtcA-PipX-DNA.....	8
1.6. Plan de trabajo y estado inicial del proyecto.	8
<i>2.OBJETIVOS</i>	<i>11</i>
<i>3.MATERIALES Y MÉTODOS</i>	<i>13</i>
3.1: Clonación en tándem de los distintos genes en los plásmidos pQLink.	13
3.1.1: Diseño de la estrategia de clonación a seguir y fundamento general de la clonación de genes en tándem en vectores pQLink.....	13
3.1.2: Construcción de los plásmidos de coexpresión de la tres variantes RNAP en pQLink.....	15
3.1.3: Transformación.....	17
3.1.4: Comprobación de plásmidos con el/los inserto/s deseados mediante PCR de colonias y electroforesis en gel de agarosa.....	18
3.1.5: Purificación de los plásmidos con los constructos de interés y cuantificación de estos.	18
3.1.6: Secuenciación de los constructos y de forma complementaria comprobación del tamaño de los genes en tándem mediante digestión con PaeI.....	20
3.1.7: Eliminación de una mutación en el gen rpoC2 (β').....	20
3.2: Expresión y purificación de NtcA y PipX.....	24
3.2.1: Expresión de NtcA y PipX.	24
3.2.2: Comprobación de los resultados de la expresión mediante electroforesis desnaturalizante SDS-Page.....	25
3.2.3:Purificación de NtcA y PipX mediante cromatografía de afinidad.....	26

<i>4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN</i>	29
4.1: Clonación en tándem de los genes que codifican la RNA polimerasa cianobacteriana en vectores pQLink.....	29
4.2: Eliminación de la mutación de rpoC2.	33
4.2.1: Mutagénesis.	33
4.2.2: Eliminación de la mutación mediante un gen artificial.....	35
4.3: Expresión de NtcA y PipX.	36
4.4: Purificación de NtcA.	37
4.5: Estudio de complejos de iniciación de la transcripción bacterianos.	40
4.4.1: Bases estructurales de la activación de la transcripción mediada por un activador de tipo II.	40
4.4.2: Posible papel de PipX en la activación de la transcripción en cianobacterias.	42
<i>5.CONCLUSIÓN</i>	45
<i>6. LÍNEAS FUTURAS</i>	47
6.1: Estrategia de coexpresión y purificación de una RNAP cianobacteriana.	47
6.2: Ensamblaje del complejo RNAP-NtcA-PipX-DNA para su estudio mediante Cryo-EM.....	48
<i>7.BIBLIOGRAFÍA</i>	51
<i>8.ANEXO</i>	59

RESUMEN

La regulación transcripcional del metabolismo del nitrógeno en cianobacterias está mediada mayoritariamente por el factor de transcripción NtcA, perteneciente a la familia CRP-FNR. Este factor de transcripción se une específicamente a secuencias consenso del promotor facilitando el reclutamiento de la RNA polimerasa (RNAP) al lugar de inicio de la transcripción. NtcA adopta su conformación activa compatible con la unión a DNA cuando une 2-oxoglutarato, que es un metabolito cuyos niveles aumentan en situaciones de pobreza de fuentes nitrogenadas. En condiciones en las que la concentración de nitrógeno es muy baja, la proteína PipX actúa como coactivador de la transcripción uniéndose y estabilizando la forma activa de NtcA. Se desconoce a nivel molecular tanto el modo en el que el complejo NtcA-PipX interacciona con la RNAP y los diferentes promotores, como el mecanismo por el cual activan la transcripción. El objetivo global de este proyecto en el laboratorio de acogida es comprender esta interacción estudiando la estructura del complejo NtcA-PipX-Promotor-RNAP mediante criomicroscopía electrónica. Este proyecto de trabajo de fin de grado se enmarca dentro de este objetivo global y en él se ha pretendido dar los primeros pasos para la obtención de la RNAP de la cianobacteria *Synechococcus elongatus* de forma recombinante en *Escherichia coli*, usando para ello vectores de coexpresión que porten los genes que codifican las distintas subunidades de la RNAP. Además se han expresado y purificado las proteínas NtcA y PipX.

PALABRAS CLAVE

Cianobacteria; Regulación del metabolismo del nitrógeno; Transcripción; RNAP; NtcA; PipX; 2OG.

Fases preliminares para el estudio de la activación de la transcripción dependiente del factor de transcripción cianobacteriano NtcA

ABSTRACT

Transcriptional regulation of nitrogen metabolism in cyanobacteria is mainly mediated by NtcA, a transcription factor which belongs to the CRP-FNR family. NtcA specifically binds to consensus promoter sequences facilitating the recruitment of RNA polymerase (RNAP) to the transcription start site. NtcA adopts its active conformation compatible with DNA binding when bound to 2-oxoglutarate, a metabolite whose levels increase when nitrogen sources levels are low. Moreover, under conditions in which the nitrogen concentration is very low, the PipX protein acts as a coactivator of transcription, binding and stabilizing the active form of NtcA. The way in which the NtcA-PipX complex interacts with the RNAP and the different promoters, as well as the mechanism by which they activate transcription, is unknown at molecular level. The main objective of the project in the host laboratory is to understand this interaction studying the structure of the NtcA-PipX-Promoter-RNAP complex using cryo-electron microscopy. This end-of-degree work project is part of this global objective, and the main purpose has been to take the first steps to obtain a recombinant RNAP from the cyanobacteria *Synechococcus elongatus*, using co-expression vectors that carry the genes that encode the different subunits of RNAP. Furthermore, we have expressed and purified the proteins NtcA and PipX.

KEYWORDS

Cyanobacteria; Nitrogen regulation; Transcription; RNAP; NtcA; PipX; 2OG.

Fases preliminares para el estudio de la activación de la transcripción dependiente del factor de transcripción cianobacteriano NtcA

ABREVIATURAS

2-OG: 2-oxoglutarato

α -CTD: Dominio C-terminal de la subunidad alfa de la RNA polimerasa

α -NTD: Dominio N-terminal de la subunidad alfa de la RNA polimerasa

BSA: Albúmina sérica bovina

CRP: Proteína receptora de cAMP (factor de transcripción bacteriano)

CRP/FNR: cAMP receptor protein-fumarate/nitrate reductase regulator (grupo de factores de transcripción)

DMSO: Dimetil sulfóxido

DTT: 1,4-ditio-D-treitol

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

FPLC: Una modalidad de cromatografía líquida para proteínas, de alta velocidad

GS: Glutamina sintetasa

GST: Glutación-S-transferasa

GOGAT: Glutamato sintetasa

HTH: Motivo hélice-giro-hélice (Helix-Turn-Helix) de unión a DNA

IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

LB: Luria-Bertani

NAGK: N-acetilglutamato quinasa

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDB: Banco de datos de proteínas (Protein Data Bank)

RNAP: RNA polimerasa

RPc: Conformación cerrada RNAP-promotor

RPo: Conformación abierta RNAP-promotor

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes

Fases preliminares para el estudio de la activación de la transcripción dependiente del factor de transcripción cianobacteriano NtcA

1. INTRODUCCIÓN

1.1: La regulación de la transcripción en bacterias.

La RNA polimerasa dependiente de DNA en bacterias está formada por 4 subunidades diferentes, $\beta\beta'\alpha_2\omega$ (Darst, 2001). El sitio activo de la RNAP contiene las subunidades β y β' (1.342 y 1.407 aminoácidos, respectivamente) que unen el DNA y el RNA producto de la transcripción (Korzheva et al., 2000 citado en Browning y Busby, 2004). Las dos subunidades α (329 aminoácidos) son idénticas; el dominio N-terminal, más grande, se encarga del ensamblaje de las subunidades β y β' y el dominio C-terminal, más pequeño, participa en la unión al DNA y tiene un papel esencial en algunos promotores (Gourse, Ross y Gaal, 2000). La subunidad más pequeña, ω , no tiene un papel directo en la transcripción, pero parece que actúa como una chaperona en el plegamiento de la subunidad β' (Minakhin et al., 2001).

Para el inicio de la transcripción, el complejo $\beta\beta'\alpha_2\omega$ necesita unirse a un factor σ . Esta proteína tiene 3 funciones principales: facilitar la separación de las dos hebras de DNA en el sitio de inicio de la transcripción, asegurar el reconocimiento de una secuencia promotora específica y facilitar la unión de la RNAP a esta secuencia (Wösten, 1998; Feng, Zhang y Ebright, 2016). *E. coli* tiene un factor σ principal, σ_{70} , que permite a la RNAP unirse a la mayoría de los promotores. Además, también hay seis factores σ alternativos que participan en respuesta a diferentes estímulos (Yura y Nakahigashi, 1999; Ishihama, 2000). En la unión entre la RNAP y el promotor es clave el paso del complejo RNAP-promotor cerrado (RPc) al complejo RNAP-promotor abierto (RPo). Para generar este complejo abierto, la RNAP se puede unir a factores de transcripción para facilitar el desenrollamiento de 12-14 pb del dúplex de DNA y permitir la unión de la hebra molde al sitio activo de la RNAP (Boyaci, Chen, Jansen, Darst y Campbell, 2019).

Los promotores bacterianos son regiones de DNA que regulan la iniciación de la transcripción y contienen secuencias consenso altamente conservadas que interaccionan con los factores σ de la RNAP bacteriana y los factores de transcripción. Las secuencias consenso más importantes son la región -10 (TATAAT), conocida como caja Pribnow (Waldburger, Gardella, Wong y Sussking, 1990 citado en Ruff, Record y Artsimovitch, 2015) y la región -35 que contiene la secuencia consenso TTGACA (Nickels, 2006 citado en Ruff et al.); algunos promotores contienen una secuencia

llamada región -10 extendida que también participa en el inicio de la transcripción (Keilty y Rosenberg, 1987; Barne, Bown, Busby y Minchin, 1997 citado en Ruf et al.). Las interacciones aguas arriba más lejanas entre el promotor y la RNAP se encuentran en una región rica en AT entre -40 y -60 pb del inicio de la transcripción conocida como elemento UP (Gourse et al., 2000 citado en Ruff et al.) (Figura 1).

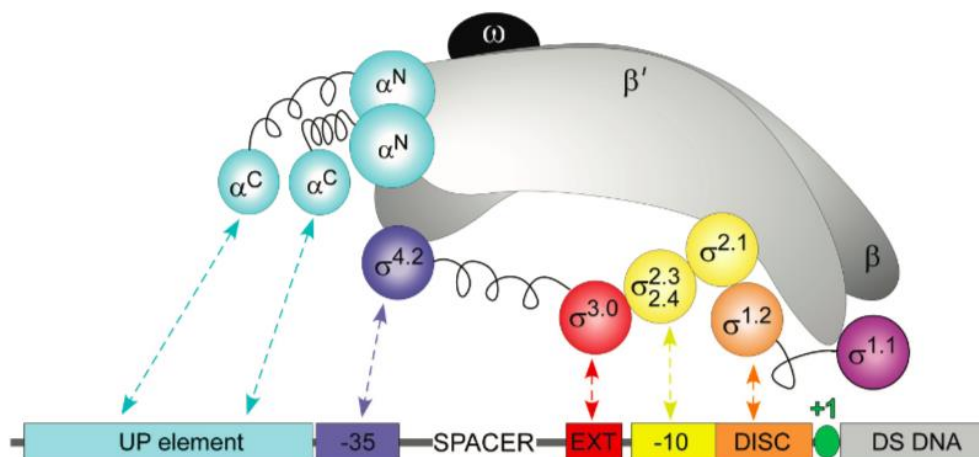


Figura 1. Interacciones RNAP-Promotor: En esta figura se observan las interacciones específicas de secuencia entre el factor σ_{70} de una RNA polimerasa bacteriana y las secuencias consenso de los promotores de los genes; extraída de Ruff et al. (2015).

Los factores de transcripción (FT) participan activamente en la regulación transcripcional y se componen por dos dominios, uno que se encarga de interpretar las señales externas e internas y otro que participa en la unión al DNA (en procariontes el motivo hélice-giro-hélice es el elemento más común que participa en esta unión). Entre 270 y 280 FT bacterianos son proteínas de unión a DNA que cuando se unen a secuencias específicas interactúan con las diferentes subunidades de la RNAP en el promotor formando la maquinaria transcripcional (Busby y Ebricht, 1999 citado en Ishihama, 2010). Además de los FT de unión a DNA, hay unas 20-30 especies de factores de transcripción que se unen directamente a las subunidades β o β' de la RNAP y están altamente involucrados en el control de la transcripción (Ishihama, 2009).

Los FT pueden regular la transcripción positivamente interactuando con una molécula inductora que les permite unirse a los genes operadores para la activación de la transcripción; estos FT se suelen unir aguas arriba de los promotores en la mayoría de los casos. Existen a su vez reguladores negativos o represores, que en ausencia de una molécula inductora se suelen unir a los promotores (o cerca de estos) de los genes e impiden la unión de la RNAP a estos o inhiben la fase de elongación (Yamamoto e Ishihama, 2003; Ishihama, 2010).

1.2: La familia de reguladores transcripcionales CRP/FNR.

La familia CRP/FNR (cAMP receptor protein-fumarate/nitrate reductase regulator) está formada por un grupo de FT que regulan un amplio número de genes. Este grupo de proteínas actúan principalmente como activadores de la transcripción uniéndose a -61,5 (tipo I) o a -41,5 (tipo II) nucleótidos del sitio de inicio de transcripción. En algún caso pueden actuar como represores uniéndose muy cerca del sitio de inicio de transcripción y afectando negativamente a la unión de la RNAP al promotor. Estas proteínas poseen un dominio N-terminal de unión a ligando (AMPc en CRP), un dominio C-terminal con un motivo hélice-giro-hélice de unión a ADN y una gran hélice α que une ambos dominios y permite la formación de dímeros (Browning y Busby, 2004 citado en Forcada-Nadal, 2018).

Esta familia de factores de transcripción está adaptada para potenciar la versatilidad metabólica bacteriana, y sus funciones abarcan el control de factores de virulencia, enzimas de degradación de anillos aromáticos, control del metabolismo del nitrógeno, fotosíntesis y varios tipos de respiración. Además los reguladores CRP-FNR se destacan por responder a una gran variedad de señales intracelulares y exógenas tales como AMPc, anoxia, estado redox, estrés oxidativo y nitrosativo, óxido nítrico, monóxido de carbono, 2-oxoglutarato o temperatura. (Korner, Sofia y Zumft, 2003).

1.3: La regulación transcripcional del metabolismo del nitrógeno en cianobacterias mediada por NtcA y PII.

El nitrógeno es un bioelemento muy importante para los seres vivos y se incorpora a microorganismos y plantas por distintos procesos de asimilación. Numerosos compuestos nitrogenados pueden ser incorporados por los seres vivos como fuentes de nitrógeno, por ejemplo, iones inorgánicos como el nitrato y el amonio o compuestos orgánicos como los aminoácidos o la urea. El control del metabolismo del nitrógeno es un proceso esencial que está presente en una gran cantidad de microorganismos y consiste en la represión de las vías de asimilación de algunas fuentes de nitrógeno cuando otras más fácilmente asimilables están disponibles (Herrero, Muro-Pastor y Flores, 2001).

Las cianobacterias, procariotas gram negativas son capaces de realizar la fotosíntesis, fijando el CO₂ en el ciclo de Calvin. Estos microorganismos tienen un papel importante en la formación de la biosfera de la tierra. La hipótesis sobre su origen es la aparición de oxígeno atmosférico a un nivel similar al actual, que permitió la aparición

de estos seres vivos (Shestakov y Karbysheva, 2017). Por su fácil asimilación, suelen usar amonio (NH_4^+) como fuente de nitrógeno, aunque pueden utilizar otras fuentes como nitratos, nitritos, aminoácidos neutros, cianato, urea o dinitrógeno. El amonio es incorporado mayoritariamente por la acción de dos enzimas, la glutamina sintetasa (GS) y la glutamato sintasa (GOGAT), en un ciclo llamado vía GS-GOGAT. En primer lugar la GS cataliza la incorporación, dependiente de ATP, del amonio en una molécula de glutamato formándose glutamina, seguidamente la GOGAT cataliza la transferencia del grupo amido de la glutamina al 2-oxoglutarato (2OG), produciéndose dos moléculas de glutamato que permiten a la bacteria sintetizar otros aminoácidos. (Muro-Pastor y Florencio, 2003; Muro-Pastor, Reyes y Florencio, 2005; Maldonado, 2008). Así a bajos niveles de glutamina y altos niveles de 2OG hay poca concentración de nitrógeno en la célula, y viceversa. Además el 2OG es un intermediario del ciclo de Krebs (Stanier y Cohen-Bazire, 1977), por lo tanto, esta molécula es un nexo importante entre el metabolismo del nitrógeno y del carbono, siendo clave en el balance N/C de las células.

NtcA es un activador de la transcripción de clase II perteneciente a la familia CRP-FNR que participa en la regulación transcripcional del metabolismo del nitrógeno en cianobacterias (Herrero et al., 2001). La proteína NtcA fue aislada de la cianobacteria *Synechococcus elongatus* PCC 7942 detectándose un transcrito de 1,3 Kb (Herrero et al.) que codifica una proteína de 222 aminoácidos (Vega-Palas, Flores y Herrero, 1992), además se han detectado secuencias homólogas a la de NtcA en otras cepas, lo que indica una amplia conservación de este gen en cianobacterias (Frias, Mérida, Herrero, Martín-Nierto y Flores, 1993).

NtcA promueve la expresión de genes que controlan el metabolismo del nitrógeno como *nper* (asimilación de nitrato), *urt* (transporte de urea) o *amt* y *glnA* (asimilación de amonio); aunque también pueden actuar como represor de algunos genes (Herrero et al., 2001). En *Synechococcus elongatus* PCC 7942, la expresión de NtcA es reprimida con el aumento de la concentración de amonio (NH_4^+), (Luque, Flores y Herrero, 1994), lo que indica que NtcA se activa en condiciones de ausencia de nitrógeno.

El sitio de unión de NtcA al ADN contiene la secuencia GTAN₈TAC (Luque et al., 1994 ; Herrero et al., 2001) aunque la secuencia esencial para la unión es GTN₁₀AC (Luque, Vázquez-Bermúdez, Paz-Yepes, Flores y Herrero, 2004). El sitio de unión de NtcA a los promotores suele estar a -41,5 nucleótidos del sitio de inicio de la transcripción, además NtcA puede unirse a más de un sitio de unión en algunos

promotores (Luque et al., 2004) y puede actuar como represor en las cajas que están a -35 y -10 pares de bases del sitio de inicio de la transcripción (Herrero et al., 2001).

El 2OG es un metabolito implicado en la activación de NtcA, de modo que cuando este se une al factor de transcripción promueve la adopción de su conformación activa. (Muro-Pastor, Reyes y Florencio, 2001 citado en Herrero, Muro-Pastor, Valladares y Flores, 2004). Cuando NtcA no está unida al 2OG se encuentra en una conformación inactiva (Llácer, 2012); en esta forma, NtcA sigue siendo capaz de unirse a su sitio de unión en el promotor, pero es incapaz de activar la transcripción de los genes que regula. Cuando el 2OG se une a NtcA, la proteína pasa a un estado activo el cual le permitiría (por homología a lo que ocurre con la proteína CRP) activar la transcripción de dos maneras: favoreciendo el paso de estado cerrado a abierto del complejo RNAP-promotor facilitando la formación de la burbuja de transcripción (se cree que esto pasa gracias a contactos entre NtcA con las subunidades σ y el dominio N-terminal de la subunidad α de la RNAP) y con una interacción directa entre NtcA y el extremo C-terminal de la subunidad α , facilitando considerablemente la unión de la RNAP al DNA (Browning y Busby, 2004; Llácer, 2012; Forcada-Nadal, Llácer, Contreras, Marco-Marín y Rubio, 2018; Forcada-Nadal, 2018).

NtcA es una proteína homodimérica de 222 aminoácidos, y cada subunidad está compuesta por un dominio N-terminal que es el dominio regulador o de unión al efector (se une al 2OG) y por un dominio C-terminal que contiene un motivo hélice-giro-hélice que participa en la unión al promotor (Figura 2), mostrando la estructura característica de los reguladores transcripcionales pertenecientes a la familia CRP-FNR (Llácer, 2012).

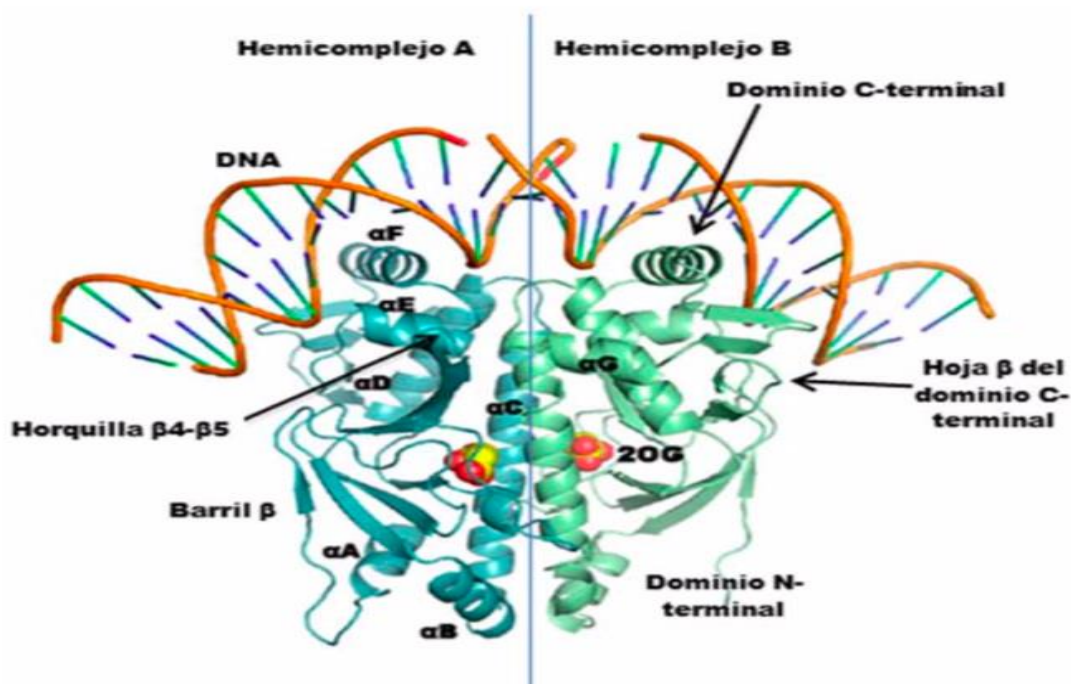


Figura 2. Estructura del factor de transcripción NtcA: En esta figura se observa la estructura del regulador transcripcional NtcA en su forma activa interaccionando con 2OG y DNA; extraída de Forcada-Nadal (2018).

Otra proteína cianobacteriana que participa en la regulación del metabolismo del nitrógeno y está regulada por el 2OG es la proteína señalizadora PII, que está ampliamente conservada en la mayoría de los organismos excepto en animales (Sant'Anna et al., 2009). Para que el 2OG se una a la proteína es estrictamente necesario que también esté unida una molécula de ATP. En ausencia de ATP, PII se une a ADP o AMP, lo que imposibilita la unión del 2OG. Esta competición entre el ATP y el ADP/AMP, permite a PII controlar el estado energético celular (Zeth, Fokina y Forchhammer, 2014).

1.4: El papel de PipX en la regulación del metabolismo del nitrógeno.

PipX es una proteína reguladora conservada en cianobacterias que participa en la regulación del metabolismo del nitrógeno uniéndose tanto a NtcA como a PII. En la estructura cristalina de PipX se observa que está formada por un dominio de plegamiento β seguido de dos hélices α C-terminales. En el dominio β se observa el plegamiento de un dominio de tipo tudor que participa en la interacción de la proteína con PII, NtcA y otras moléculas de PipX (Llácer et al., 2010; Llácer, 2012).

PipX se une al factor de transcripción NtcA actuando como un coactivador de la expresión génica a altos niveles de 2OG y bajos de nitrógeno en la célula. De otro modo, esta proteína se une a PII cuándo hay bajos niveles de 2OG dejando los dominios de PipX que interactúan con NtcA ocultos impidiendo su unión con el factor de transcripción (Llácer et al., 2010). Entonces, PII regula a NtcA formando un complejo con PipX cuya función parece ser el secuestro y la liberación controlada de PipX en función de la disponibilidad de nitrógeno asimilable para evitar la transcripción innecesaria de genes dependientes de NtcA en condiciones de abundancia de nitrógeno o para inducir una transcripción incrementada de estos genes en situaciones de pobreza de nitrógeno (Espinosa, Forchhammer, Burillo y Contreras, 2006).

En el complejo NtcA-PipX, un dímero de NtcA se une a dos moléculas de PipX y a dos moléculas de 2OG (Figura 3). Cuando NtcA interactúa con el DNA produce una curvatura en este último que podría favorecer su interacción con la RNAP además de impedir la interacción de PipX con el promotor, sin embargo, estas estructuras no explican a nivel molecular cómo actúa NtcA sobre la RNAP para activarla, ni si hay interacción entre PipX y la RNAP (Llácer et al., 2010).

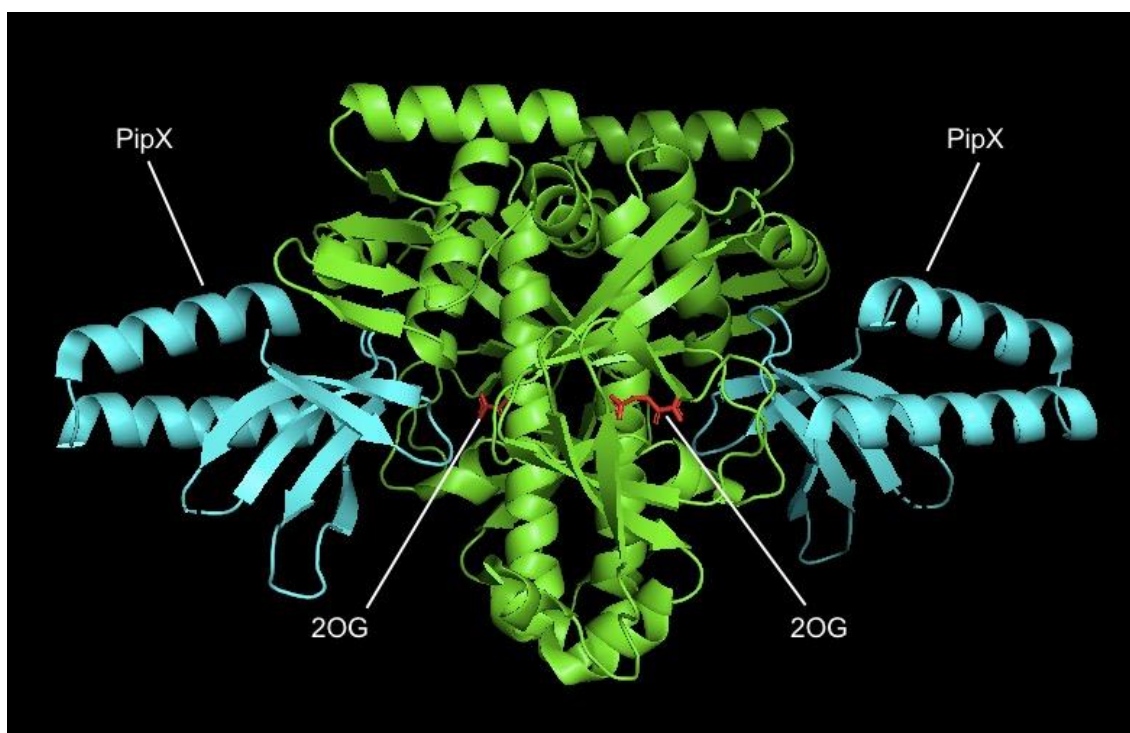


Figura 3. Complejo NtcA-PipX-2OG:En esta figura se observa la interacción del dímero de NtcA con el dominio de tipo tudor (hoja beta antiparalela curvada de 5 elementos) de dos moléculas de PipX, además de la unión del 2OG que posibilita la interacción entre los dos reguladores transcripcionales, activando a NtcA; extraída de Llácer et al. (2010) y visualizada en el programa pymol (Código PDB: 2XKO).

1.5. El complejo RNAP-NtcA-PipX-DNA.

El núcleo de la RNAP cianobacteriana es relativamente similar al del resto de bacterias, sin embargo, se sabe que en su núcleo contiene una subunidad adicional, resultante de la escisión del gen codificante de la subunidad β' en dos genes distintos, γ (correspondiente a la parte N-terminal del gen β' de otras bacterias) y β' (correspondiente a la parte C-terminal del gen β' de otras bacterias) (Schneider y Haselkorn, 1988). Por tanto, el núcleo de la RNAP cianobacteriana está compuesto por cinco subunidades distintas, $\alpha_2\beta\gamma\beta'\omega$ (Imamura y Asayama, 2009).

Para iniciar la transcripción de forma específica, el núcleo de la RNAP debe incorporar un factor σ que interactúe con regiones clave en el promotor del gen a transcribir (caja -35, caja TATA) y forme la holoenzima de la RNAP. El homólogo a σ_{70} en cianobacterias es σ_A (rpoD1). Además, al menos dos factores σ más (σ_B y σ_C), están implicados en la transcripción de genes del regulón de NtcA. (Imamura y Asayama, 2009; Gosh, Bose y Zhang, 2010).

El objetivo final del proyecto en el grupo de acogida es estudiar el complejo RNAP-NtcA-PipX-DNA mediante criomicroscopía electrónica (cryo-EM) para poder entender a nivel molecular/estructural cómo se activa la transcripción mediada por NtcA-PipX y por extensión poder comprender en mayor detalle la activación de la RNAP por activadores transcripcionales bacterianos de tipo II.

1.6. Plan de trabajo y estado inicial del proyecto.

Este es un proyecto que no empieza de 0; además de un conocimiento detallado de la temática del proyecto, el grupo de acogida cuenta ya con clones para la expresión de las proteínas NtcA y PipX así como contrastada experiencia en cuanto a su purificación. Además ya se ha realizado parte del trabajo de clonaje de la RNAP en los vectores de destino para su posterior coexpresión. Dados los antecedentes del proyecto, el trabajo a realizar consta de dos fases distintas, no necesariamente diferenciadas en el tiempo sino que pueden realizarse de forma simultánea:

i) Obtención de los reguladores transcripcionales NtcA y PipX en grandes cantidades y elevada pureza, para lo cual seguiremos los protocolos descritos por Llácer (2012) y Forcada-Nadal (2018),

ii) Finalizar la clonación de las distintas subunidades de la RNAP para poder producir de forma recombinante mediante coexpresión y usando vectores policistronicos

compatibles entre sí (pETCola y pQLink) la RNAP cianobacteriana de *Synechococcus elongatus*, incluyendo los tres factores σ que participan en la regulación de la transcripción mediada por NtcA. Las subunidades α y β ya se encuentran clonadas en un plásmido pETCola. Debemos además generar tres tipos de plásmidos pQLink con los genes para las subunidades β' , γ , ω junto a σ_A , σ_B y σ_C clonadas en tándem.

El sistema Link permite la clonación en tándem de un número ilimitado de proteínas en vectores de expresión bacterianos para su posterior coexpresión. Las secuencias LINK de los plásmidos permiten la inserción de un fragmento cortado con el enzima Pacl de uno de los plásmidos en el sitio Swal de otro plásmido mediante la técnica LIC (Ligation Independent Cloning). Esta técnica es muy útil para proteínas que forman complejos a partir de diferentes subunidades como es el caso de la RNAP. Los vectores pQLink contienen además del origen de replicación y de un marcador de selección, una etiqueta GST que facilita su posterior purificación. Este método de clonación es muy interesante porque para la disposición en tándem de los distintos genes se evita la amplificación mediante PCR, eliminando cualquier riesgo de mutación. (Scheich, Kümmel y Soumailakakis, 2007).

Los vectores elegidos para la coexpresión deben contener diferentes orígenes de replicación y diferentes marcadores de selección. Respecto a la primera condición, el origen de replicación en pQLink es ColE1Ori, en cambio, para pETCola es ColA. En relación a los marcadores de selección, pETCola resiste a kanamicina mientras que la ampicilina nos sirve para seleccionar pQLink.

Algunos vectores pQLink contienen una etiqueta GST y pETCola posee una etiqueta de poli-histidinas en el gen clonado en su posición 1. La elección de las dos subunidades de la RNAP clonadas junto a las etiquetas no es aleatoria sino que su elección se basa principalmente en criterios estructurales que facilitan el ensamblaje correcto y purificación de la RNAP; más concretamente y tras observar la estructura del núcleo de la RNAP bacteriana de *Thermus aquaticus* (código PDB: 1L9Z), se observa que la región N-terminal de las subunidades α y γ quedan expuestas hacia el solvente, y lejos del resto de la RNAP y por lo tanto son idóneas para contener en esta región la cola de poli-Histidinas y la GST, respectivamente y no deberían dificultar el ensamblaje de la RNAP. En cambio, la introducción de una etiqueta en el extremo N o C-terminal de las subunidades β' y ω puede afectar al ensamblaje de la RNAP ya que quedan expuestas hacia el complejo. Dado que la clonación inicial en los plásmidos de destino se realizó mediante digestión con enzimas de restricción, se ha comprobado además

Fases preliminares para el estudio de la activación de la transcripción dependiente del factor de transcripción cianobacteriano NtcA

que cada uno de los genes puede ser realmente clonado en estos sin digerir accidentalmente el gen, lo cual no es trivial para genes muy largos que en algún caso se aproximan a los 4000 pares de bases de longitud.

2.OBJETIVOS

El **objetivo general** de este proyecto es proporcionar los materiales necesarios para la posterior obtención de la estructura del complejo RNAP-NtcA-PipX-Promotor mediante criomicroscopía electrónica. Debido a la finalización prematura de la parte experimental de este proyecto por la pandemia de Covid-19, se han planteado **objetivos específicos** acordes a la situación.

1. Diseñar una estrategia de clonación eficiente de las distintas subunidades de la RNAP en los plásmidos policistrónicos, que favorezca su coexpresión y purificación.
2. Obtener las subunidades β' , γ , ω junto a σ_A , σ_B y σ_C clonadas en tándem en plásmidos pQLink, a una concentración y pureza adecuados de estos, adquiriendo tres combinaciones distintas de plásmido (una para cada subunidad σ).
3. Diseñar una estrategia de mutagénesis para eliminar una inserción de 49 pares de bases en el gen rpoC2 (que codifica para la subunidad β') que se produjo de forma involuntaria durante la amplificación y clonación de este gen.
4. Expresar y purificar NtcA y PipX obteniendo altas concentraciones y elevada pureza de proteína.
5. Desarrollar una hipótesis de cómo NtcA y PipX favorecerían la activación de la transcripción mediante una revisión bibliográfica de complejos de iniciación de la transcripción.

Fases preliminares para el estudio de la activación de la transcripción dependiente del factor de transcripción cianobacteriano NtcA

3.MATERIALES Y MÉTODOS

En esta memoria se expone la clonación de los genes que codifican las subunidades β' , γ , ω , σ_A , σ_B y σ_C de la RNAP de la cianobacteria *Synechococcus elongatus* en vectores pQLink para su posterior coexpresión junto a pETCola + rpoA (α) + rpoB (β), la eliminación de una inserción de 49 pb en el gen rpoC2 que codifica la subunidad β' y la expresión y purificación de los reguladores transcripcionales NtcA y PipX. Se han utilizado técnicas de biología molecular de acuerdo con los procedimientos recogidos en los “Current Protocols in Molecular Biology” (Ausubel, 1998) además de los protocolos de expresión y purificación de NtcA y PipX descritos por Llácer (2012) y Forcada-Nadal (2018).

3.1: Clonación en tándem de los distintos genes en los plásmidos pQLink.

3.1.1: Diseño de la estrategia de clonación a seguir y fundamento general de la clonación de genes en tándem en vectores pQLink

En el laboratorio de acogida ya se encontraban disponibles los genes rpoA (α) y rpoB (β) clonados en el vector pETCola. Los genes rpoZ (ω), rpoD1 (σ_A), rpoD2 (σ_B) y rpoD5 (σ_C) se encontraban clonados en vectores pQLinkN (ADDGENE; Figura 4) y el gen rpoC1 (γ) se encontraba clonado en el vector pQLinkG2 (ADDGENE; Figura 4) junto a la GST. El gen rpoC2 (β') también estaba clonado en un vector pQLinkN, pero contenía una mutación (inserción) indeseada que debía eliminarse (ver apartado 3.1.7). La estrategia de clonación se basó en digerir en primer lugar, con la enzima de restricción Pac I (NEB), el vector pQLinkG2 que contenía el gen rpoC1 (γ) y la etiqueta GST (PacI corta a ambos extremos del gen de interés; Figura 4A), y seguidamente se digirió con la enzima de restricción SwaI (NEB) el vector pQLinkN que contenía el gen rpoZ (ω) dejando el vector linealizado (SwaI corta una única vez en un extremo del gen de interés; Figura 4A). Una vez digeridos los vectores se procedió a una extensión de las secuencias mediante tratamiento con T4 DNA polimerasa que genera extremos cohesivos (técnica LIC; Ligation Independent Cloning) y se procedió a la ligación de ambos fragmentos (Figuras 4B y 4C) obteniendo el gen rpoC1 (γ) en 4ª posición y el gen rpoZ (ω) en 3ª posición. Para el resto de subunidades, la intención era realizar el mismo procedimiento siguiendo la estrategia mostrada en la figura 5, situando el gen rpoC2 (β') y los genes que codifican las tres subunidades σ (rpoD1, rpoD2 y rpoD5) en 2ª y 1ª posición, respectivamente.

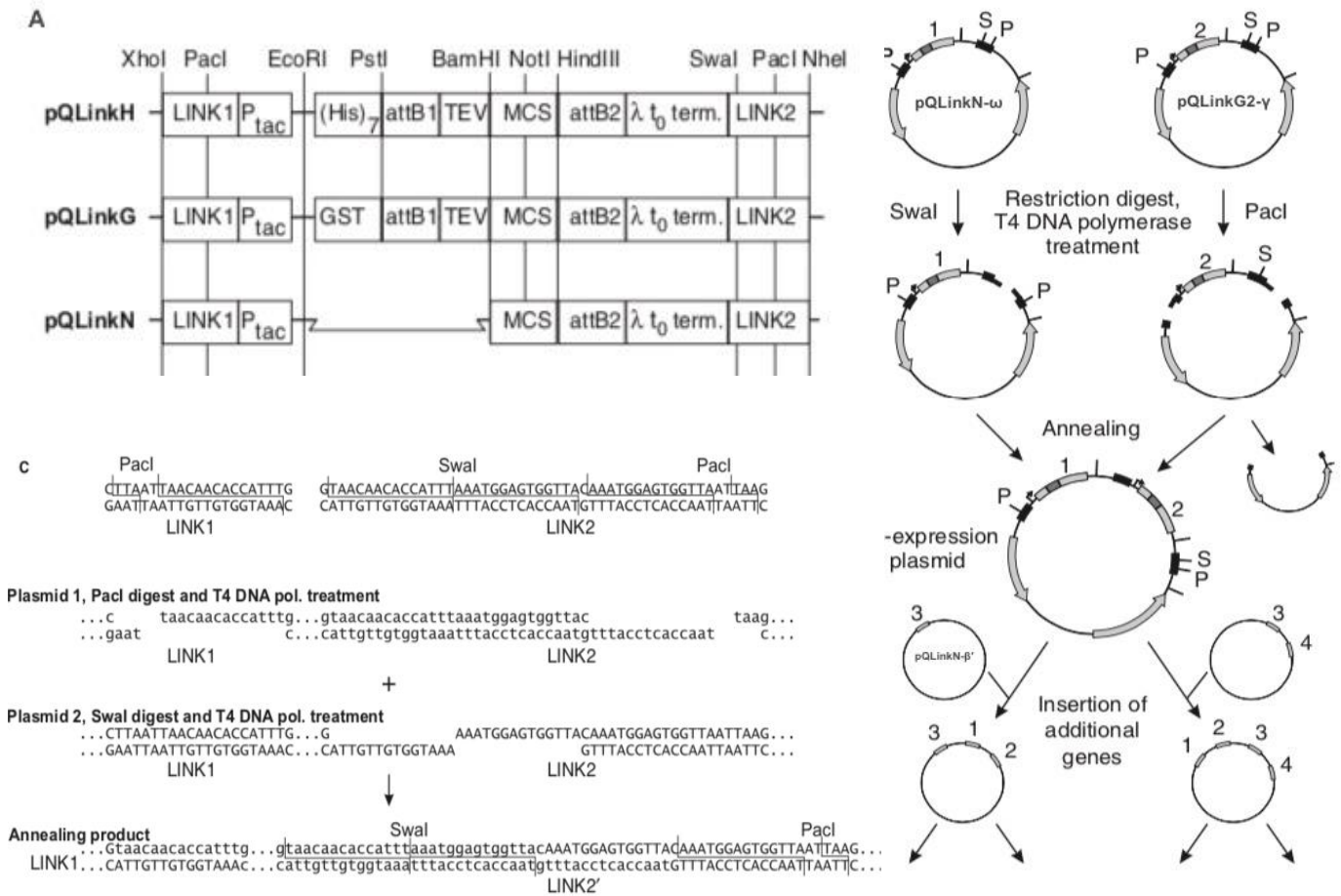


Figura 4: Sistema Link de clonación. (A) Elementos genéticos de los vectores pQLinkH, pQLinkG y pQLinkN (MCS: Multiple cloning site, TEV: sitio de escisión de proteasas, term: terminador de la transcripción). (B) Construcción del plásmido de coexpresión a partir de los vectores pQLinkN y pQLinkG2 con dos insertos distintos nombrados como 1 (ω) y 2 (γ), el plásmido originado acepta insertos adicionales (S: Swal, P: Pacl). (C) Las secuencias Link, su digestión con Pacl y Swal, su tratamiento con T4 DNA pol. y su posterior ligación. Editada de Scheich, Kümmel y Soumailakakis (2007).

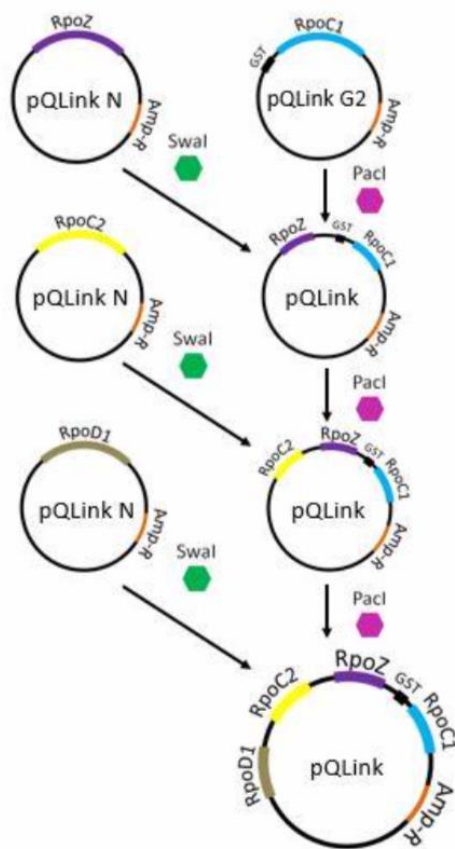


Figura 5. Estrategia de clonación en tándem de los genes que codifican las subunidades de la RNAP en vectores pQLink: En esta figura se muestra la estrategia seguida para la clonación de las subunidades de una RNAP cianobacteriana a partir de dos vectores pQLink. Para los genes *rpoD2* (σ_B) y *rpoD5* (σ_C), se procede de igual manera que con *rpoD1*.

3.1.2: Construcción de los plásmidos de coexpresión de la tres variantes RNAP en pQLink.

En primer lugar se digirió con PacI el plásmido pQLinkG2 + *rpoC1* (γ) (77,6 ng/uL) durante 3 horas a 37 °C (tabla 1) y el plásmido pQLinkN + *rpoZ* (ω) (39,5 ng/uL) durante 3 horas a 25 °C (tabla 2) con SwaI. Seguidamente y con el objeto de generar extremos cohesivos en los dos plásmidos a ligar, se realizó una reacción exonucleasa usando T4 DNA polimerasa en presencia de dCTPs o dGTPs para los plásmidos digeridos con PacI (Tabla 3) y SwaI (Tabla 4), respectivamente, durante 30 minutos a 25 °C. A continuación se inactivaron las enzimas de restricción a 65 °C durante 20 minutos. Se mezclaron 20 uL de cada uno de los dos fragmentos y se incubaron durante 3-4 minutos a 65 °C para eliminar cualquier estructura secundaria que pudiese dificultar la ligación posterior. En último lugar, para facilitar la ligación de los dos fragmentos, se dejó enfriar la mezcla unos 10 minutos a temperatura ambiente y finalmente se añadieron 2 uL de

EDTA 25 mM antes de proceder a la transformación de *E. coli* con el producto de ligación (ver apartado siguiente).

Tabla 1: Digestión pQLink G2 + γ con Pac I

REACTIVOS	VOLUMEN (ul)
pQLink G2 + γ (77,6 ng/ul)	2,5 (194 ng)
Pacl (5u)	0,5
Tampón CutSmart (NEB) (10X)	1
Agua Milli-Q	6
Total	10

Tabla 2: Digestión pQLink N + ω con Swa I

REACTIVOS	VOLUMEN (ul)
pQLink N + ω (39,5 ng/ul)	8 (316 ng)
Swa I (5u)	0,5
Tampón 3.1 (NEB) (10X)	1
Agua Milli-Q	0,5
Total	10

Tabla 3: Tratamiento con T4 DNA polimerasa.

REACTIVOS	VOLUMEN (ul)
Producto de digestión con Pac I	5
Tris-HCl 50 mM	1
MgCl ₂ 10mM	2
BSA 5 ug/ul	2
DTT 5mM	1
dCTP 2,5 mM	0,5
T4 DNA polimerasa (NEB)	0,5
Agua Milli-Q	8
Total	20

Tabla 4: Tratamiento con T4 DNA polimerasa.

REACTIVOS	VOLUMEN (ul)
Producto de digestión con Swa I	5
Tris-HCl 50 mM	1
MgCl ₂ 10mM	2
BSA 5 ug/ul	2
DTT 5mM	1
dGTP 2,5 mM	0,5
T4 DNA polimerasa (NEB)	0,5
Agua Milli-Q	8
Total	20

Tras comprobar que el constructo pQLink + rpoZ (ω) + rpoC1 (γ) era correcto (ver apartados 3.1.3 a 3.1.6), se decidió clonar cada una de las subunidades σ , rpoD1, rpoD2 y rpoD5 (σ_A , σ_B y σ_C), junto a rpoC1 y rpoZ (γ y ω). Para situar los factores σ en tándem con rpoZ (ω) + rpoC1 (γ), se repitió el mismo procedimiento anteriormente utilizado, pero cambiando los volúmenes de las reacciones de digestión de forma acorde a la concentración de cada plásmido. La reacción de corte con Pacl de pQLink + rpoC1 + rpoZ (100 ng/uL) se ve reflejada en la tabla 5 y las reacciones de corte con SwaI de pQLinkN con cada σ se observan en las tablas 6, 7 y 8. Seguidamente, se procedió al tratamiento con la T4 DNA pol. para la generación de extremos cohesivos (Tablas 3 y 4), y posterior ligación de los distintos productos de digestión para la obtención de los tres constructos [pQLink + rpoD1 (σ_A) + rpoZ (ω) + rpoC1 (γ)], [pQLink + rpoD2 (σ_B) + rpoZ (ω) + rpoC1 (γ)] y [pQLink + rpoD5 (σ_C) + rpoZ (ω) + rpoC1 (γ)].

Tabla 5: Digestión pQLink + γ + ω con la enzima de restricción Pacl.

REACTIVOS	VOLUMEN (ul)
pQLink + γ + ω (100 ng/ul)	4,3 (430 ng)
Pacl (5u)	0,5
Tampón CutSmart (NEB) (10X)	1
Agua Milli-Q	4,2
Total	10

Tabla 6: Digestión pQLink N + σ_A con la enzima de restricción Swa I.

REACTIVOS	VOLUMEN (ul)
pQLink N + σ_A (115,8 ng/ul)	4,34 ul (500 ng)
Swa I (5u)	0,5
Tampón 3.1 (NEB) (10X)	1
Agua Milli-Q	4,16
Total	10

Tabla 7: Digestión pQLink N + σ_B con la enzima de restricción Swa I.

REACTIVOS	VOLUMEN (ul)
pQLink N + σ_B (65,6 ng/ul)	7,62 (500 ng)
Swa I (5u)	0,5
Tampón 3.1 (NEB) (10X)	1
Agua Milli-Q	0,88
Total	10

Tabla 8: Digestión pQLink N + σ_C con la enzima de restricción Swa I

REACTIVOS	VOLUMEN (ul)
pQLink N + σ_C (134,5 ng/ul)	3,7 (500 ng)
Swa I (5u)	0,5
Tampón 3.1 (NEB) (10X)	1
Agua Milli-Q	4,8
Total	10

La paralización abrupta de la parte experimental del proyecto ha impedido la realización de la última parte de la clonación, que hubiese sido la incorporación del gen rpoC2 (β') ya corregido a estas tres combinaciones de vectores de coexpresión obtenidas. El procedimiento hubiese sido el mismo que el ya descrito, dirigiendo para ello con SwaI pQLinkN + rpoC2 (β') y con PacI cada uno de los tres constructos [pQLink + (σ_A ó σ_B ó σ_C) + rpoZ (ω) + rpoC1 (γ)].

3.1.3: Transformación.

Transformación por choque térmico.

Las transformaciones por choque térmico se realizaron en células competentes de *E.coli* Top Ten (NEB) con los constructos [pQLink + rpoZ (ω) + rpoC1 (γ)] y [pQLink + rpoD1(σ_A) + rpoZ (ω) + rpoC1 (γ)]. En primer lugar se añadieron 50 ul de células Top Ten y 5 uL de vector en un tubo Eppendorf, seguidamente se incubó la mezcla 30 minutos en hielo, 45 segundos a 42 °C y finalmente 5 minutos más en hielo para aumentar la permeabilidad de la membrana celular. Después se añadieron 200 uL de LB a la mezcla y se incubó 1 hora a 37 °C para que las células se recuperaran del estrés ocasionado. Finalmente, se añadieron 100 uL de mezcla a dos placas de LB agar con ampicilina (0,1 mg/mL) y se incubaron a 37 °C “overnight”.

Transformación por electroporación.

Las transformaciones por electroporación se realizaron en células electrocompetentes DH5 α (Clontech) para el resto de constructos descritos en esta memoria. En primer lugar, se utilizó luz UV para desinfectar las cubetas de electroporación. Para la electroporación se mezclaron 3 uL de vector y 40 uL de suspensión celular de *E.coli* DH5 α en las cubetas previamente desinfectadas. Se introdujo la cubeta de electroporación en un Electroporator 2510 (Eppendorf) a un

voltaje de 1700 V que provocó un aumento de la permeabilidad de la membrana celular permitiendo la entrada de los plásmidos a la bacteria. Para que las células se recuperaran del estrés ocasionado, se añadieron a la mezcla electroporada 200 uL de LB y se incubaron 1 hora a 37 °C. Finalmente se añadieron 100 uL de mezcla a 2 placas de LB agar con ampicilina (0,1 mg/mL) y se incubaron a 37 °C “overnight”.

3.1.4: Comprobación de plásmidos con el/los inserto/s deseados mediante PCR de colonias y electroforesis en gel de agarosa.

El procedimiento seguido fue el mismo para todas las clonaciones realizadas. En primer lugar se “picaron” las colonias mediante una punta de pipeta (para volúmenes de 0.5-10 µL) estéril y se introdujeron por un lado en un tubo con 5mL de LB + ampicilina (0,1 mg mL⁻¹) y por otro en un tubo con los materiales necesarios (“master mix”) para la reacción de PCR (Tabla 9) siguiendo las indicaciones del fabricante (NZYTech); el “master mix” utilizado contenía la polimerasa NZY Taq II (NZYTech), los dNTPs, el tampón de reacción y el resto de compuestos necesarios para la PCR. Seguidamente se introdujeron las muestras en el termociclador y se siguió el protocolo de amplificación recomendado por el fabricante (NZYTech; Tabla 10). Una vez obtenidos los productos de PCR se realizó una electroforesis de DNA en gel de agarosa 0,8 % cargando 5 uL de cada muestra y 4 uL de marcador de 1kb (Thermo Fisher), corriendo el gel durante 25 minutos a 120 V. Para la tinción del DNA se usó GelRed (Biotium), usando las concentraciones recomendadas por el fabricante.

Tabla 9: Reactivos utilizados en la PCR con NZYTaq II DNA polymerase

REACTIVOS	VOLUMEN X1 (ul)	VOLUMEN X9 (ul)
Green Master Mix (2X) (NZYTech)	12,5	112,5
Cebador pQTEV 3U (10uM) (ANEXO)	1,25	11,25
Cebador pQTEV 3L (10uM) (ANEXO)	1,25	11,25
Agua Milli-Q	10	90
Total	25	225

Tabla 10. Ciclo térmico con NZYTaq II DNA polymerase

Pasos del Ciclo	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 min	1
Desnaturalización	94	40 s	35
Hibridación	50	45 s	35
Extensión	72	15-30 s/kb	35
Extensión final	72	7 min	1

3.1.5: Purificación de los plásmidos con los constructos de interés y cuantificación de estos.

Con todas las colonias de *E. coli* de las que se amplificó un inserto del tamaño esperado (juzgado mediante electroforesis en gel de agarosa, ver apartado anterior), se crecieron cultivos de 5 mL de LB y 3 uL de ampicilina a 100 mg/mL y se incubaron a 37

°C “overnight”. Para el aislamiento y purificación del DNA plasmídico de *E.coli* se siguió un protocolo comercial de lisis alcalina, (Miniprep de NZYTech). En primer lugar, se centrifugó el cultivo de *E.coli* en una centrífuga 5810R con refrigeración y rotor basculante (de Eppendorf) durante 10 minutos a 4000 xg y se recuperaron las células en el pellet. Se desechó el sobrenadante y se procedió a la lisis celular resuspendiendo el pellet en 250 µL de tampón A1 (de resuspensión) que contiene RNAsas, y mezclando vigorosamente. Después, se transfirió la solución a un microtubo de 1,5 mL donde se añadieron los 250 µL de tampón A2 de lisis (que contiene NaOH 0.2M y SDS 1%) y se mezcló 6-8 veces por inversión dejando incubar a temperatura ambiente 4 minutos. Con posterioridad se adicionaron 300 µL de tampón A3 (neutralizante; estos suelen contener acetato sódico pH 4.8 y un agente caotrópico tipo guanidinio hidrocloreuro), y se mezcló invirtiendo el tubo 6-8 veces. Después se centrifugó 10 minutos para clarificar el lisado y el sobrenadante se pasó por la columna NZYTech para que tuviera lugar la unión del DNA.

Tras la unión del DNA plasmídico a la columna de sílice, se agregaron al filtro 500 µL de tampón AY (de lavado) para el lavado de la membrana y para la eliminación de las endonucleasas. Se volvió a centrifugar a 11000 xg durante 60 segundos y se desechó el eluido. Más adelante, y tras la adición de 600 µL de tampón A4 (con 70% etanol) se centrifugó otro minuto a 11000 xg y se eliminó el eluido ulterior. Para facilitar la completa eliminación del etanol, se centrifugó 2 minutos a 11000 xg recogiendo el eluido en un tubo de 2 mL nuevo. Finalmente se procedió a la elución del DNA plasmídico puro, colocando la columna NZYTech en un microtubo de 1,5 mL y añadiendo 50 µL de tampón AE (de elución) en la parte central de la columna. Tras incubar 1 minuto a temperatura ambiente, se centrifugó un minuto a 11000 xg provocando la elución del DNA plasmídico. Una vez finalizada la elución, se almacenó el DNA purificado a -20 °C.

En todos los casos, una vez obtenidas las muestras purificadas, se cuantificó la concentración de DNA midiendo su absorbancia a 260 nm y se observó el ratio de absorción 260/280, indicativo de su pureza, utilizando para ello un NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). Para la medición, primero se lavó y calibró la zona de medición con 1 uL de agua Milli-Q. Seguidamente se utilizó como blanco el tampón AE usado para la miniprep y se añadió 1 uL de muestra para la medición.

3.1.6: Secuenciación de los constructos y de forma complementaria comprobación del tamaño de los genes en tándem mediante digestión con *PacI*.

Se secuenciaron las muestras de los constructos [rpoC1 + rpoZ] y [rpoC1 + rpoZ + rpoD1] en el Servicio de Secuenciación y Análisis de ADN del Instituto de Biomedicina de Valencia. El Servicio requiere por secuenciación un mínimo de 4 uL de muestra a una concentración adecuada (> a 50ng/uL) y 5 uL de cebador a una concentración de 5 mM. Para saber si los genes rpoC1 y rpoZ se encontraban realmente en el plásmido aislado, se llevaron a cabo dos reacciones de secuenciación usando 4 uL de muestra en cada caso además de 5 uL de cebador pQTEV 3U y 5 uL de un cebador interno de γ (PIG1; ver anexo 8.2), respectivamente.

Con el objeto de hacer una criba previa y enviar solo a secuenciar constructos que casi con toda seguridad resulten positivos, para el constructo [rpoC1 + rpoZ + rpoD1], se realizó una digestión con *PacI* (NEB) (Tabla 11) para comprobar que el tamaño del inserto digerido no fuera menor a la suma del tamaño de los tres genes (y de la tag de GST) y se juzgó el tamaño por la aparición de una banda del tamaño teórico esperado en un gel de agarosa. El constructo fue a continuación secuenciado, usando 10 uL de muestra y 5 uL de los cebadores PIG1 y pQTEV 3L (anexo 8.2). Usando el cebador PIG1 se secuenció parte del gen rpoC1, mientras que con el cebador pQTEV 3L se secuenció parte del gen rpoD1.

Cuándo se recibieron los archivos con las secuencias (ver anexo 8.3) se efectuó un alineamiento de las secuencias obtenidas con los distintos genes que codifican la RNAP mediante Clustal Omega para comprobar que no se hubiesen generado mutaciones indeseadas durante los procedimientos realizados.

3.1.7: Eliminación de una mutación en el gen rpoC2 (β').

El gen rpoC2 clonado en el vector pQLinkN contenía una inserción de 49 pb, generada probablemente por la aparición de estructuras secundarias en el DNA molde durante la amplificación del gen pues esta inserción es una duplicación casi perfecta (ya que solo difería en una base) de la secuencia de las anteriores 49 pb a esta inserción en el gen. En la clonación previa del gen en pQLinkN habían surgido numerosas dificultades, derivadas en parte por el gran tamaño del gen rpoC2 (3957 pb), como por el poco rendimiento de las PCR en cuanto a cantidad de amplificado e inespecificidad y aparición de varias mutaciones puntuales. Por tanto se decidió tratar de eliminar la

mutación en vez de empezar la clonación de nuevo. Para poder eliminar esta mutación se realizaron dos estrategias:

Mutagénesis.

Se diseñó una estrategia de mutagénesis con el objeto de amplificar todo el gen rpoC2 excepto la secuencia mutada a partir de una PCR utilizando los cebadores RpoC2mut_F (52 pb) y RpoC2mut_R (52 pb) (ver anexo 8.2). Estos cebadores fueron seleccionados mediante el software Gene-Runner y debían hibridar específicamente con la secuencia no mutada aprovechando la diferencia de 1 pb con la secuencia de la inserción, además de tres pb adicionales en uno de los extremos que favoreciesen la hibridación con el resto del gen no mutado y no con la inserción.

En primer lugar se realizaron varias PCR con la DNA polimerasa NZY Supreme (NZYTech) variando concentraciones de DMSO (previene la formación de estructuras secundarias y facilita la hibridación; con la acción de DMSO queríamos evitar el problema que posiblemente causó la aparición de la inserción) y tratando el producto de PCR con DpnI (corta las hebras de DNA madre metiladas). Al no obtener ningún amplicón, se pasó a utilizar el kit Q5 de mutagénesis (NEB) usando los mismos cebadores (tabla 11 y 12) y tratando los productos de PCR con KLD mix (Kinase-Ligase-Dpn1) (NEB), en las condiciones recomendadas por el fabricante (tabla 13), para eliminar la hebra madre metilada y ligar el constructo pQLinkN + rpoC2 (β') para obtenerlo en su forma circular. A continuación, se realizó una electroforesis de DNA en gel de agarosa 0,8 % cargando 5 uL de producto de PCR y 4 uL de marcador de 1kb (Thermo Fisher), corriendo el gel durante 25 minutos a 120 V para comprobar si se observaba un amplicón del tamaño teórico esperado.

Tabla 11: Condiciones PCR de mutagénesis de rpoC2 (β').

REACTIVOS	VOLUMEN (ul)
Q5 Master Mix (2X)	12,5
pQLink N + β' (144 ng/ul)	1
MFL (10uM)	1,25
MRL (10uM)	1,25
DMSO (100%)	0,5
Agua Milli-Q	8,5
Total	25

Tabla 12: Ciclos PCR mutagenesis de rpoC2 (β')

Pasos del ciclo	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	98	30 s	1
Desnaturalización	98	10 s	25
Hibridación	68	30 s	25
Extensión	72	2 min 30 s	25
Extensión final	72	2 min	1

Tabla 13: Tratamiento con KLD-mix.

REACTIVOS	VOLUMEN (ul)
Producto de PCR	1
Buffer de reacción 1X (NEB)	5
KLD mix 1X (NEB)	1
Agua Milli-Q	3
Total	10

Seguidamente, se transformó *E.coli* DH5 α por electroporación con el producto de PCR obtenido (ver apartado 3.1.3), y se realizó una PCR de colonia para observar si se habían obtenido colonias con el inserto del tamaño teórico deseado (ver apartado 3.1.4). A continuación, se purificó y cuantificó el DNA plasmídico de las colonias que contenían el inserto esperado (ver apartado 3.1.5). Finalmente para comprobar si se había conseguido eliminar la mutación, se secuenció el gen rpoC2 (β') de las muestras purificadas en el Servicio de Secuenciación y Análisis de ADN del Instituto de Biomedicina de Valencia usando 5 uL de cada muestra purificada y 4 uL de un cebador interno de rpoC2 (PIB3; ver en anexo) (5 mM) que permitió secuenciar el fragmento del gen donde se encontraba la secuencia mutada.

Eliminación de la mutación de rpoC2 (β') mediante un gen artificial.

Para la realización de esta estrategia se utilizaron las enzimas de restricción BbCI y NgoMIV (NEB) que cortaban pQLinkN + rpoC2 (β'), en único lugar, justo antes y después de la inserción liberando un fragmento de 1438 pb y dejando el plásmido linealizado (7327 pb). Para sustituir el fragmento liberado (que contenía la mutación) se pidió un gen sintético de 1389 pb con la secuencia correcta del gen clonado en un plásmido de alto número de copias, pUC19 (Proteogenix) (ver anexo 8.3) sitios de corte en ambos extremos para BbCI y NgoMIV, para cortarlo y ligarlo al plásmido linealizado, sustituyendo así el fragmento mutado.

En primer lugar se digirió el plásmido pQLinkN + rpoC2 (144 ng/uL) con las enzimas de restricción BbCI y NgoMIV en las condiciones recomendadas por el fabricante (NEB) (tabla 14) durante 2 horas a 37 °C. Una vez finalizada la digestión, se realizó una electroforesis en gel de agarosa 0,8 % cargando los 50 uL de producto de digestión y 10 uL de marcador de 1kb (Thermo Fisher) para purificar el fragmento de 7327 pb que correspondía al plásmido digerido.

Tabla 14: Digestión pQLink N + rpoC2 con BbvC I y NgoM IV.

REACTIVOS	VOLUMEN (uL)
pQLink N + rpoC2 (144 ng/uL)	25 (3,6 ug)
Tampón CutSmart (NEB) (10X)	5
BbvCI (2u/uL)	9
NgoMIV (10 u/uL)	1,8
Agua Milli-Q	9,2
Total	50

En este caso, se procedió como con el resto de electroforesis, excepto en que se utilizó un peine o molde modificado con el objetivo de unir los pocillos y que pudiera caber el mayor volumen de muestra posible (50 uL). Una vez finalizó la electroforesis y se produjo la separación, mediante la ayuda de un transiluminador Vilber Lourmat Super Bright TFX-20 MX y con un bisturí, se escogió la sección de gel que contenía pQLinkN + rpoC2 linealizado (7327 pb) y sin la región que contenía la inserción. La sección se introdujo en un tubo de cultivo vacío que fue previamente pesado en una balanza de precisión PB3002-S DeltaRange (Mettler Toledo), para poder determinar los gramos de gel que se recuperaron.

Se procedió a la purificación del DNA mediante GeneClean Turbo Kit (MP Biomedicals), adicionando 100 µL de la Turbo Salt Solution de GeneClean por cada 0,1 g de porción de gel. Seguidamente, se incubó durante 5 minutos a 55 °C en el baño de agua Grant TX150-P5 para que se derritiera el gel y se fue invirtiendo el tubo para homogeneizar la solución. A partir de esta combinación DNA/Solución salina se puede transferir una cantidad menor a 600 µL a cada columna. Seguidamente, se centrifugó la columna a 11000 xg en la microcentrífuga 5415R (Eppendorf) hasta que todo el líquido pasó a través del filtro (~5 segundos), se vació el tubo recolector y se repitió este proceso hasta transferir toda la muestra obtenida al filtro. Seguidamente se añadieron 500 uL de tampón Turbo Wash (de lavado), se centrifugó a 11000 xg durante 5 segundos y se vació el tubo recolector (repetiendo el procedimiento de lavado se puede aumentar la pureza).

Finalmente, se introdujo la columna en un microtubo de 1,5 mL y se añadieron 30 uL de solución de elución (Turbo Elution). Se incubó 5 minutos a 25 °C y se centrifugó 5 segundos a 11000 xg. Durante la elución, cuando la concentración de sales disminuye, la matriz se rehidrata y se rompe la atracción entre el DNA y el sílice permitiendo la elución.

El siguiente paso fue determinar la concentración de la muestra purificada tras medir su absorbancia a 260nm mediante el NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (ver apartado 3.1.5). Una vez obtenida la muestra a una concentración y pureza aceptables, tras la llegada del pedido con el gen artificial al laboratorio (este llegó al laboratorio durante el estado de alarma cuando ya no era posible hacer más trabajo experimental en el laboratorio) y su digestión con BbCl y NgoMIV, se realizará una reacción de ligación entre pQLinkN linealizado y el gen artificial empleando la ligasa de DNA del bacteriófago T4 (1 u/uL) y el tampón de reacción suministrado por el proveedor, T4 DNA Ligasa Buffer 10x (New England Biolabs). Una vez finalizada la reacción, se transformarán células de *E. coli* con el producto de ligación y se obtendrá finalmente el gen rpoC2 (β') clonado en pQLinkN libre de mutaciones (comprobación mediante secuenciación).

3.2: Expresión y purificación de NtcA y PipX.

Para la expresión y purificación de NtcA y PipX, se partió de glicerizados de *E. coli* Rosetta (Novagen) con los genes *ntca* y *pipx* clonados en los vectores pET15b y pTrc99A (respectivamente), a partir de los cuales se pudo proceder directamente a realizar protocolos de expresión y purificación siguiendo los procedimientos descritos por Llácer (2012) y Forcada-Nadal (2018).

3.2.1: Expresión de NtcA y PipX.

El protocolo utilizado fue idéntico para las dos proteínas, se partió de glicerizados de *E. coli* Rosetta que contenían el vector pET15b + *ntca* y pTrc99A + *pipx* (resistencia a ampicilina). La cepa Rosetta se usa para incrementar la expresión de ciertas proteínas debido a que contiene un plásmido con copias de genes para tRNAs poco abundantes en *E. coli*, cuya carencia es una de las causas principales de la baja expresión de proteínas de otros organismos en la bacteria. Dicho plásmido confiere resistencia a cloranfenicol. En primer lugar, a partir del glicerizado, se realizó un precultivo en un tubo con 5 mL de LB, 3uL de ampicilina a 100 mg/mL y 10 ul de cloranfenicol a 20 mg/mL; 6 horas a 37 °C. A continuación, se realizó un segundo precultivo añadiendo 1 mL del precultivo inicial a un pequeño matraz con 25 mL de LB, 15 uL de ampicilina 100 mg/mL y 50 ul de cloranfenicol 20 mg/mL, y se dejó creciendo en agitación “overnight” a 37 °C. Al día siguiente, se transfirió todo el volumen del precultivo a un matraz con 1 L de LB, 600 ul de ampicilina 100 mg/mL y 2 mL de

cloranfenicol 20 mg/mL y se cultivó a 37 °C en agitación hasta que llegó a una absorbancia de 0,6-0,8 (a 600 nm) para que hubiera una concentración celular suficiente antes de la inducción de la expresión de la proteína de interés y que el cultivo estuviera en fase exponencial de crecimiento. Antes de inducir, se extrajeron 100 uL de muestra para utilizarlo como control de expresión en un posterior gel de poliacrilamida.

Seguidamente se añadieron 500 uL de IPTG 1M (homólogo de la lactosa que se une al promotor del operón lac que se encuentra en el plásmido de expresión y provoca la liberación del represor) para activar la expresión y se incubó la muestra en agitación a 20 °C “overnight”. Al día siguiente se extrajeron 100 uL de muestra inducida para un posterior gel de poliacrilamida.

A continuación, se dividió toda la muestra en dos botes de polipropileno a partes iguales y se centrifugaron 15 minutos a 4 °C y a 4000 rpm para desechar el sobrenadante y quedarse solo con las células (pellet). Una vez desechado el sobrenadante, se disolvieron los pellets en 30 mL de tampón A de NtcA (tabla 16), que en este caso se utilizó como tampón de lavado. Una vez disueltos, se transfirieron a dos tubos Falcon de 50 mL a partes iguales. Finalmente se centrifugó 30 minutos a 4 °C y a 4000 rpm en la centrifuga Eppendorf 5810R, se descartó el sobrenadante y se congelaron los pellets con las células a -80 °C para conservarlos hasta la purificación.

3.2.2: Comprobación de los resultados de la expresión mediante electroforesis desnaturizante SDS-Page.

Cómo se ha comentado anteriormente, en la expresión de ambas proteínas, se guardaron 100 uL de muestra antes y después de inducir con IPTG para comprobar si las proteínas se habían expresado correctamente.

Para ello, se realizó una electroforesis desnaturizante SDS-Page en un gel de poliacrilamida 10 %. Para hacer el gel se realizaron dos capas distintas (“separating” y “stacking” gel) utilizando los reactivos expuestos en la tabla 15. Una vez preparado el gel, se cargaron 10 uL de muestra resuspendida en (la alicuota de 100 uL se centrifuga y el pellet de células se resuspende en 10 uL de tampón de carga) tampón de carga 2X y 3uL de patrón de proteínas (BSA). Seguidamente se tiñó el gel con Azul de Comassie G250 y se eliminó el exceso de colorante para poder observar las bandas correctamente.

Tabla 15: Componentes del gel de poliacrilamida.

SEPARATING GEL (10 %)		STACKING GEL	
REACTIVOS	VOLUMEN	REACTIVOS	VOLUMEN
Acrilamida 40 %	1,25 mL	Acrilamida 40 %	0,23 mL
Agua Milli-Q	2,45 mL	Agua Milli-Q	1,5 mL
Separating gel 4 %	1,25 mL	Stacking gel 4 %	0,5 mL
APS 10 %	56 uL	APS 10 %	14 uL
TEMED	2,5 uL	TEMED	14 uL
Total	3,8835 mL	Total	2,258 mL

3.2.3: Purificación de NtcA y PipX mediante cromatografía de afinidad.

La purificación de NtcA se realizó en un sistema FPLC (ÄKTA) mediante una cromatografía de afinidad, utilizando como etiqueta una cola de poli-histidinas y aprovechando su afinidad por la columna HisTrap HP (1-5 mL) (GE Healthcare). La composición de los tampones utilizados está expuesta en las tablas 16 y 17.

Tabla 16. Composición de los tampones A y B para la purificación del factor de transcripción NtcA

Tampón A		Tampón B	
REACTIVOS	VOLUMEN (ml)	REACTIVOS	VOLUMEN (ml)
Tampón HEPES (25 mM) (pH 7,5)	10 (1 M)	Tampón HEPES (25 mM) (pH 7,5)	5 (1 M)
NaCl (0,5 M)	40 (0,5 M)	NaCl (0,5 M)	20 (5 M)
MgCl ₂ (5 mM) (pH 7,7)	1 (2 M)	MgCl ₂ (5 mM) (pH 7,7)	0,5 (2 M)
Imidazol (20 mM)	2 (4 M)	Imidazol (20 mM)	25 (4 M)
Agua Milli-Q	347	Agua Milli-Q	149,5
Total	400	Total	200

Tabla 17. Composición de los tampones de sonicado y conservación para la purificación del factor de transcripción NtcA. El tampón de conservación contiene Na Citrato a pH 6 para evitar la precipitación de la proteína debido a que su pI es de 8,76.

Sonicado		Conservación	
REACTIVOS	VOLUMEN (ml)	REACTIVOS	VOLUMEN (ml)
Tampón Na Citrato (25 mM) (pH 6,5)	5 (0,5 M)	Tampón Na Citrato (25 mM) (pH 6)	5 (0,5 M)
NaCl (0,5 M)	10 (5 M)	NaCl (0,5 M)	10 (5 M)
MgCl ₂ (5 mM) (pH 7,7)	0,25 (2 M)	MgCl ₂ (5 mM) (pH 7,7)	0,25 (2M)
Imidazol (5 mM)	0,125 (4 M)	L-arginina (50 mM)	25 (0,5 M)
DTT (1mM)	0,06 (1 M)	L-glutamina(50 mM)	10 (0,5 M)
Inhibidores de proteasas	0,3 (1M)	DTT (1 mM)	10 (1 M)
Agua Milli-Q	81,765	Agua Milli-Q	50
Total	100	Total	200

En primer lugar se descongelaron los dos pellets de la expresión de NtcA que estaban congelados a -80 °C (ver apartado 3.2.1) y se les añadió 15 mL de tampón de Sonicado (tabla 17) disolviéndolos por agitación. Previamente, al tampón se le había añadido el DTT y los inhibidores de proteasas justo antes de empezar el protocolo de purificación (el DTT se oxida muy fácilmente y varios de los inhibidores de proteasas tienen una vida media muy corta). Se mezclaron los dos pellets disueltos y se introdujeron en un matraz metálico conservándolos siempre en hielo para evitar la degradación de las proteínas de interés. Una vez mezclados, se procedió a la lisis celular mediante sonicación (15 ciclos de 11 µm de amplitud de 15 segundos, con 45 segundos de separación entre pulsos).

Una vez lisadas las células, se centrifugó la muestra sonicada en la centrífuga Eppendorf 5810R durante 30 minutos a 15000 rpm y 4°C de temperatura. Después de centrifugar, se desecharon los pellets que contenían los restos celulares y se recuperó el sobrenadante que contenía la proteína. Seguidamente, se filtró el sobrenadante con un filtro de nitrocelulosa de 0,45 μm de poro para eliminar todos los restos indeseados (podrían obturar las columnas de cromatografía y el sistema FPLC). Después de filtrar se cargó la muestra en la columna HisTrap HP (GE Healthcare) mediante una bomba peristáltica a un flujo de 5 mL/min (NtcA contiene una cola de poli-histidinas y se une a los iones de níquel de la columna por afinidad). Previo al cargado de la muestra en la columna, esta se lavó con 5 volúmenes de H₂O Milli-Q y 5 volúmenes de tampón A de NtcA.

Una vez cargada la muestra, se montó la columna en el sistema FPLC (ÄKTA) y se creó un gradiente del 0 al 100% entre los tampones A y B de NtcA (Tabla 16) para eluir la proteína usando una concentración creciente de imidazol (compite con las histidinas por la unión a la columna de níquel debido a su similitud estructural), seguidamente se monitorizó la elución de las proteínas de la columna usando el detector de UV del aparato y se recogieron fracciones de 2mL. Una vez finalizado el gradiente se seleccionaron las fracciones de interés observando en el cromatograma los picos de A₂₈₀ (las proteínas poseen un pico de absorción máxima a dicha longitud de onda) durante la elución a diferentes concentraciones de tampón B (tabla 16).

Seguidamente, se realizó una cuantificación mediante el método de Bradford (A=595 nm) (Kruger, 2009) para determinar la concentración de proteína en cada fracción de interés. Para ello, se realizó una curva patrón midiendo la A₅₉₅ a diferentes concentraciones de BSA (0, 2, 4, 6 y 8 $\mu\text{g/mL}$), añadiendo a cada una 1 mL de reactivo de Bradford (Bio-Rad). Una vez realizada la curva patrón, se procedió de forma similar con las muestras y se midió la A₅₉₅ para poder conocer la concentración de proteína en cada fracción de interés. A continuación, se realizó una electroforesis desnaturizante SDS-Page (ver apartado 3.2.2) para observar que fracciones contenían proteínas del tamaño esperado para NtcA (~25 kDa). Se cargaron diferentes volúmenes para cada muestra (fracciones de interés, pellet del sonicado, sobrenadante del sonicado, fracción no retenida en la columna y lavados de esta) en el gel dependiendo de la concentración de proteína que contenían.

Finalmente, se añadieron a un mismo tubo Falcon las fracciones de proteína de 2 mL que contenían NtcA pura y se concentró la proteína mediante ultrafiltración en la

centrífuga Eppendorf 5810R a 4 °C y 4000 rpm con dispositivos Amicon Ultra de Millipore de corte nominal 10 kDa (no permiten el paso de NtcA). Una vez concentrada la muestra y tras la adición de glicerol al 10% (función como crioprotectante), se cuantificó la concentración de proteína por el método de Bradford (a partir de la curva patrón de BSA) y se realizaron alícuotas de 100 ul que se congelaron en nitrógeno líquido para seguidamente conservarlas a -80 °C.

Para la purificación de PipX se realizará el mismo procedimiento, aunque variando algunos componentes de los tampones de sonicado y conservación que favorecen a la estabilidad de la proteína debido a su mayor insolubilidad comparada con NtcA. En ambos tampones, se utilizará tampón MES pH 6 (50mM) en sustitución al tampón Na Citrato, además de añadir glicerol (10% v/v) con el objeto de aumentar la estabilidad de la proteína. En cuanto a la etapa de concentración de la proteína una vez purificada, se deberá utilizar un dispositivo Amicon de un corte nominal menor a 10 kDa ya que PipX tiene un tamaño de 10,5 kDa.

4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la sección de materiales y métodos se ha descrito como se ha procedido a la clonación en tándem de los genes que codifican las subunidades de la RNAP de *Synechococcus elongatus* (rpoC1, rpoC2, rpoZ, rpoD1, rpoD2, rpoD5) en vectores pQLink y a la expresión y purificación de las proteínas NtcA y PipX. En este apartado se explicarán detalladamente los principales resultados obtenidos, además de una hipótesis de cómo NtcA y PipX podrían favorecer la activación de la transcripción.

4.1: Clonación en tándem de los genes que codifican la RNA polimerasa cianobacteriana en vectores pQLink.

Para la clonación en tándem de todas las subunidades en un único vector pQLink es necesario que el gen rpoC1 (γ), que se encontraba clonado en el vector pQLinkG2 junto a la GST, esté en 4ª posición para que la etiqueta no se vea comprometida (pQLinkG2 + rpoC1 se digirió con PaeI porque la secuencia que codifica para GST es digerida por el enzima de restricción SwaI). En cuanto al orden del resto de genes, es preferible que rpoC2 (β') quede en 2ª posición para asegurar una expresión adecuada a pesar de su gran tamaño y en 3ª posición la subunidad ω . Con la intención de minimizar el número de pasos, se quería situar en la 1ª posición el factor σ , que es la subunidad variable de la RNAP; de este modo una vez obtenido el núcleo β' - ω - γ , solamente se necesita incorporar cada subunidad σ (σ_A , σ_B o σ_C) a este núcleo una sola vez, mientras que de otro modo implica dos eventos de clonación extra (ver apartado 3.1.1). Sin embargo, debido a que la mutación que contenía el gen rpoC2 (β') todavía no se había podido corregir (ver apartado 4.2), se decidió clonar cada una de las subunidades σ , rpoD1, rpoD2 y rpoD5 (σ_A , σ_B y σ_C) en 2ª posición junto a rpoZ y rpoC1 (ω y γ) (3ª y 4ª posición, respectivamente), por lo que el gen rpoC2 (β') quedará en 1ª posición.

Entonces, la primera clonación en tándem en realizarse fue la de los genes rpoZ (ω) y rpoC1 (γ) que se encontraban clonados en los vectores pQLinkG2 y pQLinkN, respectivamente. Una vez realizado el protocolo de clonación (ver materiales y métodos), se transformó por choque térmico *E.coli* Top 10 con el constructo pQLink + rpoZ (ω) + rpoC1 (γ) obteniendo más de 100 colonias. Se seleccionaron 16 colonias y se realizó una PCR de estas para amplificar el inserto y comprobar mediante electroforesis si se obtenían amplicones del tamaño esperado (~3300 pb) (Figura 6).

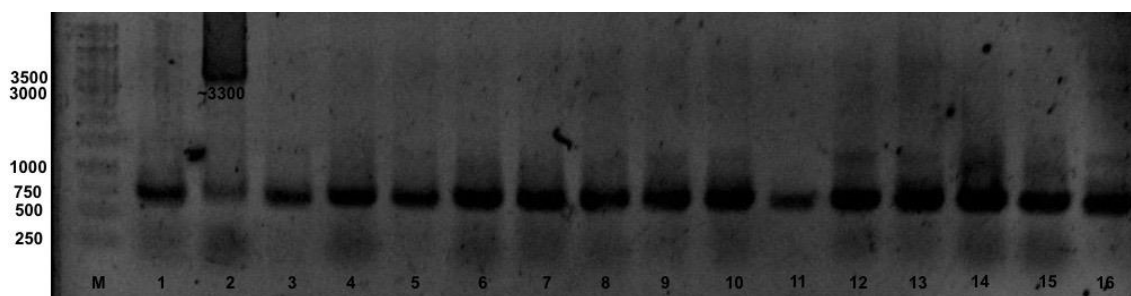


Figura 6. Gel de agarosa 0,8 % de la PCR de colonia del constructo pQLink N + ω + γ . M: 4 μ L de marcador de peso molecular de 1kb (Thermo Scientific), 1-16: 5 μ L de producto de PCR de colonia de pQLink N + ω + γ .

Se obtuvieron resultados positivos para el inserto (~3300 pb) en la colonia 2. Se aisló y purificó el DNA plasmídico de la colonia que contenía el inserto del tamaño esperado mediante miniprep (NZYTech) obteniendo una concentración y pureza adecuadas (100 ng/ μ L). A continuación, se secuenció el constructo pQLinkN + rpoZ (ω) + rpoC1 (γ) (100 ng/ μ L) de la muestra purificada en el Servicio de Secuenciación y Análisis de ADN del Instituto de Biomedicina de Valencia con los cebadores pQTEV3U (permite la secuenciación de rpoZ) y PIG1 (permite secuenciar una parte de rpoC1). Una vez obtenidos los resultados, se efectuó un alineamiento de las secuencias obtenidas con los genes rpoC1 y rpoZ mediante Clustal Omega. Finalmente, en las secuencias obtenidas se observa que los genes están clonados correctamente y no han aparecido mutaciones (ver anexo 8.3).

A continuación se procedió a clonar los genes que codifican las subunidades σ , rpoD1, rpoD2 y rpoD5 (σ_A , σ_B y σ_C) junto a rpoC1 y rpoZ (γ y ω). Para ello se realizaron tres clonaciones en tándem (una para cada gen). Se transformó por choque térmico *E.coli* Top 10 con el constructo pQLink + rpoD1 (σ_A) + rpoZ (ω) + rpoC1 (γ) y por electroporación *E.coli* DH5 α con los constructos pQLink + rpoD2 (σ_B) + rpoZ (ω) + rpoC1 (γ) y pQLink + rpoD5 (σ_C) + rpoZ (ω) + rpoC1 (γ). En el caso del constructo que contenía rpoD1 se obtuvieron 4 colonias y en los que contenían rpoD2 y rpoD5 se obtuvieron más de 100 (esto se debe a que la electroporación suele ser una técnica de transformación más eficaz que el choque térmico). En los tres casos, se realizó una PCR de colonia seguida de una electroforesis de DNA en gel de agarosa 0,8 % con los productos de PCR para comprobar si se observaban amplicones del tamaño esperado (Figuras 7, 8 y 9).

Para pQLink + rpoD1 (σ_A) + rpoZ (ω) + rpoC1 (γ) se realizó una PCR para los 4 transformantes obtenidos y en el gel se observó que en las carreras 2 y 4 se obtuvieron

amplicones del tamaño esperado (~4700 pb) (Figura 7). Sin embargo, en el gel se observa que la PCR fue bastante inespecífica, por esta razón, se realizó una digestión con *PacI* (NEB) con el objeto de comprobar que el tamaño del inserto digerido era mayor a la suma del tamaño de los tres genes (*rpoD1*, *rpoZ* y *rpoC1*) y la tag de GST y se juzgó el tamaño por la aparición de una banda del tamaño teórico esperado (~4700 pb) en un gel de agarosa (Figura 8, carril 1). En el gel se observan un par de bandas contiguas, una que puede corresponder al tamaño esperado de 4700 pb y otra del resto del plásmido cortado sin los insertos, por lo tanto se puede presuponer que la clonación funcionó correctamente. Además la digestión fue probablemente incompleta pues en el gel aparece una banda de mayor tamaño correspondiente al plásmido sin digerir (~10000 pb) (Figura 8, carril 1).

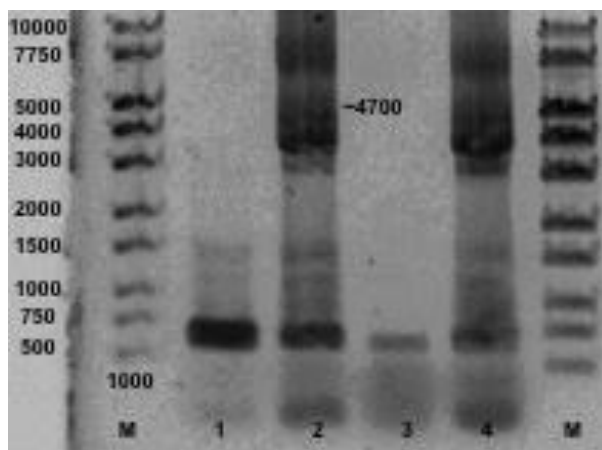


Figura 7. Gel de agarosa 0,8 % de la PCR de colonia del constructo pQLink N + σ_A + ω + γ . M: 4 μ L de Marcador de peso molecular O'GeneRuler (1kb) 1-4: 5 μ L de producto de PCR de colonia de pQLink N + σ_A + ω + γ .

Se decidió entonces secuenciar el constructo de las colonias 2 y 4. En primer lugar, se aisló y purificó el DNA plasmídico de las colonias que contenían el inserto esperado (2 y 4) mediante miniprep (NZYTech) obteniendo una concentración (78 ng/ μ L y 51,5 ng/ μ L) y pureza adecuadas. A continuación, se secuenciaron los dos constructos de pQLink + *rpoD1*(σ_A) + *rpoZ* (ω) + *rpoC1* (γ) usando 5 μ L de cada muestra y 5 μ L de los cebadores PIG1 y pQTEV 3L (anexo 8.2). Usando el cebador PIG1 se secuencia parte del gen *rpoC1*, mientras que con pQTEV 3L se secuencia parte del gen *rpoD1*. Finalmente, en la secuencia obtenida (anexo 8.3) a partir del cebador PIG1 se observa que el gen *rpoC1* está clonado correctamente, en cambio, la secuenciación realizada a partir del cebador pQTEV 3L no funcionó, por lo tanto, falta volver a secuenciar el constructo con este cebador para comprobar definitivamente que el gen *rpoD1* está clonado correctamente. Igualmente, el tamaño de las bandas obtenidas corresponde al

tamaño teórico esperado para pQLink + rpoD1(σ_A)+ rpoZ (ω) + rpoC1 (γ), por esta razón, confiamos en haber obtenido el constructo con los tres genes clonados correctamente.

Para los constructos pQLink + rpoD2 (σ_B) + rpoZ (ω) + rpoC1 (γ) y pQLink + rpoD5 (σ_C)+ rpoZ (ω) + rpoC1 (γ) se seleccionaron 8 y 7 colonias, respectivamente. Se realizó una PCR para comprobar si los 8 transformantes del constructo que contenía rpoD2 (σ_B) y los 7 transformantes del que contenía rpoD5 (σ_C) tenían los insertos con los genes clonados correctamente. En el gel de agarosa al 0,8 % de los productos de PCR se observa que no se obtuvo ningún amplicón del tamaño esperado (~4450 pb) para el constructo pQLink + rpoD2 (σ_B) + rpoZ (ω) + rpoC1 (γ) (Figura 8). En cambio para pQLink + rpoD5 (σ_C)+ rpoZ (ω) + rpoC1 (γ) se obtuvieron resultados positivos para el inserto (~4700 pb) en las carreras 11, 12, 15 y 16 (Figura 8).

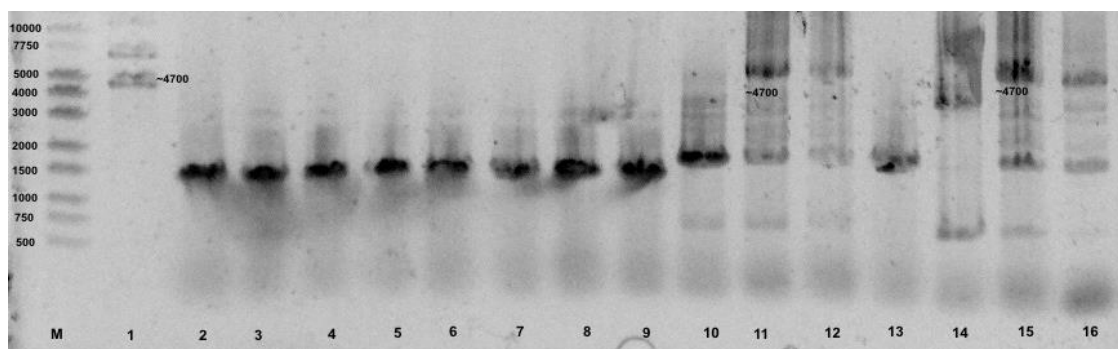


Figura 8. Gel de agarosa 0,8 % de la PCR de colonia de los constructos pQLink N + σ_B + ω + γ y pQLink N + σ_C + ω + γ ; y de la digestión con PacI del constructo pQLink N + σ_A + ω + γ . M: 4 uL de marcador de peso molecular de 1kb (Thermo Scientific), 1: 5 uL de producto de PCR de colonia de la digestión con PacI de pQLink N + σ_A + γ + ω , 2-9: 5 uL de producto de PCR de colonia de pQLink N + σ_B + ω + γ , 10-16: 5 uL de producto de PCR de colonia de pQLink N + σ_C + ω + γ .

La banda observada en los productos de PCR de pQLink + rpoD2 (σ_B)+ rpoZ (ω) + rpoC1 (γ) (carreras 2-9) posiblemente corresponda a rpoD2 (σ_B) en pQLinkN (plásmido no digerido o religado tras la digestión). Se decidió entonces seleccionar 16 nuevas colonias transformadas con pQLink + rpoD2 (σ_B) + rpoZ (ω) + rpoC1 (γ) y se realizó una PCR de colonia y una electroforesis de DNA para observar si alguno de los transformantes contenía el inserto esperado (~4450 pb). Finalmente, se obtuvieron amplicones del tamaño esperado para las colonias 1 y 9 (Figura 9).

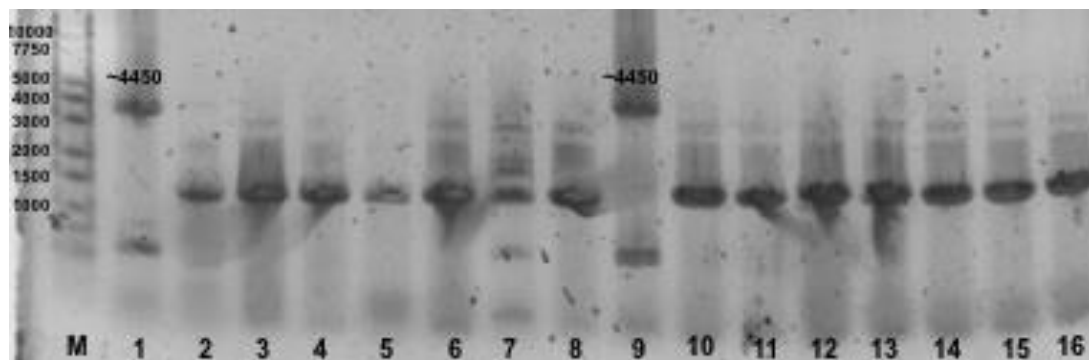


Figura 9. Gel de agarosa 0,8 % de la PCR de colonia del constructo pQLink N + ω + γ + σ_B . M: 4 μ L de Marcador de peso molecular de 1kb (Thermo Scientific), 1-16: 5 μ L de producto de PCR de colonia de pQLink N + ω + γ + σ_B .

Seguidamente, se aisló y purificó el DNA plasmídico de estos transformantes 1 y 9 del constructo pQLink + rpoD5 (σ_B) + rpoZ (ω) + rpoC1 (γ) (figura 9), además de los transformantes 11 y 15 (la banda obtenida en el gel era más clara e intensa; figura 8) del constructo pQLink + rpoD2 (σ_C) + rpoZ (ω) + rpoC1 (γ). Se obtuvo una concentración y pureza aceptables para el transformante 9 (41 ng/ μ L) del constructo que contenía rpoD5 (σ_C) y para el transformante 11 (50,5 ng/ μ L) del constructo que contenía rpoD2 (σ_B).

A falta de confirmar mediante secuenciación, los resultados obtenidos hasta el momento son compatibles con los tamaños esperados para los constructos pQLink + rpoD1 (σ_A) + rpoZ (ω) + rpoC1 (γ), pQLink + rpoD2 (σ_B) + rpoZ (ω) + rpoC1 (γ) y pQLink + rpoD5 (σ_C) + rpoZ (ω) + rpoC1 (γ). Confiamos haber obtenido estos constructos, por lo que únicamente falta la clonación del gen rpoC2 (β'), una vez eliminada la mutación (ver apartado 4.2), en cada uno de los tres constructos obtenidos para empezar a realizar ensayos de expresión y purificación de la RNAP de *Synechococcus elongatus*.

4.2: Eliminación de la mutación de rpoC2.

Como se ha comentado anteriormente, para la eliminación de la mutación (inserción) de 49 pb del gen rpoC2 (β'), se realizaron dos metodologías, una estrategia de mutagénesis y una estrategia de sustitución de la mutación mediante un gen artificial.

4.2.1: Mutagénesis.

La inserción de 49 pb que contenía el gen rpoC2 era prácticamente una duplicación ya que solo difería en 1 pb con los 49 pb anteriores a esta en el gen. Por lo

tanto, para su eliminación se seleccionaron dos cebadores mediante el software Gene-Runner nombrados como RpoC2mut_F (52 pb) y RpoC2mut_R (52 pb) (ver anexo 8.2) que al realizar la PCR de mutagénesis debían hibridar solamente con la secuencia no mutada aprovechando la diferencia de 1 pb con la secuencia de la inserción, además de tres pb adicionales en uno de los extremos que favoreciesen la hibridación con el resto del gen no mutado y no con la inserción. Dado el gran tamaño de los cebadores (obliga a utilizar temperaturas de hibridación muy similares a las de extensión), nos encontrábamos a priori ante una reacción de PCR de gran dificultad y con escasas posibilidades de éxito.

Después de varios intentos fallidos, se obtuvo un amplicón (~5000 pb) que podía corresponder al inserto que contenía el gen rpoC2 (β') (Figura 10) cuando se usó el kit Q5 de mutagénesis (NEB) para la reacción y se trató el producto de PCR con KLD mix (Kinase-Ligase-Dpn1) (NEB).

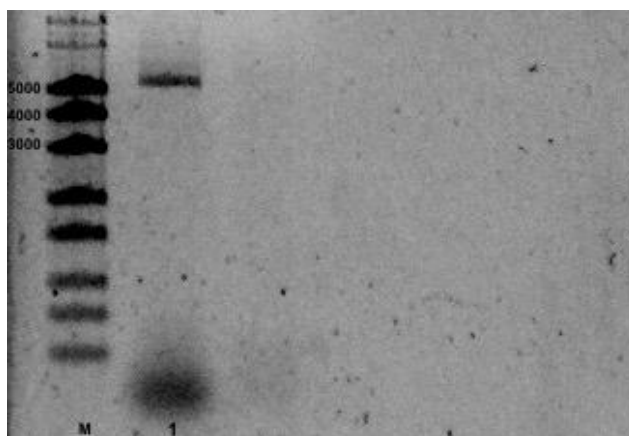


Figura 10. Gel de agarosa del producto de PCR de la mutagénesis de rpoC2 (β'). 1: 4 uL de marcador de peso molecular de 1kb (Thermo Scientific), 2: 5 uL de producto de PCR.

Al haber obtenido una banda que podía corresponder al inserto de pQLinkN que contenía rpoC2, se transformaron células *E.coli* DH5 α con el producto de PCR y se obtuvieron 10 transformantes. Seguidamente, se realizó una PCR de colonia con 7 de los transformantes y una electroforesis con los productos obtenidos para comprobar que colonias habían incorporado el inserto del tamaño esperado (Figura 11).

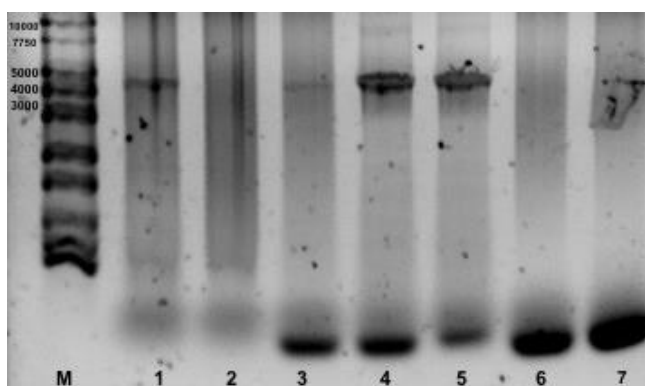


Figura 11. Gel de agarosa 0,8 % de la PCR de colonia de rpoC2 (β'). M: 4 μ L de Marcador de peso molecular de 1kb (Thermo Scientific), 1-6: 5 μ L de producto de PCR de colonia.

Se obtuvieron bandas que podían corresponder al inserto del tamaño teórico esperado (~5000 pb) en las carreras 1, 3, 4 y 5. Aunque las bandas que corresponden a las carreras 1 y 3 son muy poco intensas, se decidió aislar, purificar y secuenciar el DNA plasmídico de las 4 colonias. Para la secuenciación se utilizó el cebador PIB3 (ver anexo 8.2), el cual permite secuenciar el fragmento de rpoC2 donde se encuentra la mutación. Lamentablemente, en todas las secuencias obtenidas (ver anexo 8.3) se observa la misma inserción de 49 pb, Los resultados negativos obtenidos para esta estrategia seguramente se deban a que durante la PCR de mutagénesis los cebadores utilizados (RpoC2mut_F y RpoC2mut_R; anexo 8.2) hibridaron con la secuencia mutada y no con los 49 pb anteriores a esta en el gen.

4.2.2: Eliminación de la mutación mediante un gen artificial.

Como se ha descrito en el apartado 3.1.7, al no haber obtenido resultados positivos con la estrategia de mutagénesis, se diseñó y se solicitó a la empresa Proteogenix un gen artificial con la secuencia correcta (1389 pb) (ver anexo 8.3), flanqueado por los dos sitios de restricción de BbvCI y NgoMIV para sustituir el fragmento de 1438 pb, que contenía la mutación, liberado tras la digestión con las enzimas de restricción. Después de digerir 25 μ L del constructo pQLinkN + rpoC2 (β') (144 ng/ μ L) con BbvCI y NgoMIV, se realizó una electroforesis en gel de agarosa 0,8 % cargando los 50 μ L de la reacción de digestión (tabla 14).

La electroforesis se realizó durante 1 hora a 100V (el doble de tiempo habitual) y tal y como se esperaba, se obtuvo una banda intensa de tamaño inferior a 7750 pb que posiblemente corresponda a pQLinkN + rpoC2 (β') sin el fragmento de 1438 pb (7327 pb) escindido que contenía la mutación. Esta banda de alrededor de 1438 pb no

aparece en el gel de la figura 12, pero previamente nos cercioramos de su existencia tomando una imagen del gel tras solo 30 minutos de tiempo de electroforesis (no mostrado). En la figura 12 puede observarse además la aparición de varias bandas menos intensas entre 7750 y 10000 pb que posiblemente correspondan al plásmido sin digerir, por lo que concluimos que deberíamos haber empleado más tiempo en la reacción de digestión del constructo.

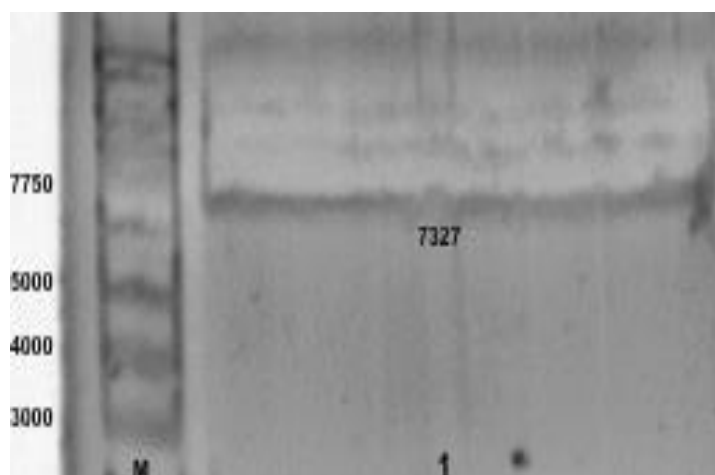


Figura 12. Gel de agarosa 0,8 % de la digestión con Bbvcl y NgoMIV de pQLink N + rpoC2 (β'). M: 4 uL de Marcador de peso molecular de 1kb (Thermo Scientific), 1: 50 uL de digestión de pQLink N + β' con Bbvcl y NgoM IV.

En cualquier caso, al haber suficiente separación entre las bandas se pudo seccionar la banda de 7327 pb y se purificó el DNA mediante GeneClean Turbo Kit, obteniendo una concentración de solo 4,7 ng/uL y una pureza elevada (a juzgar por su $A_{260/280}$ de 1,78). Este DNA purificado posteriormente se ligará con el producto de digestión BbvCI-NgoMIV del gen artificial de 1389 pb en pUC19 (9 ng/uL) (ver anexo 8.3) para obtener el constructo pQLink N + rpoC2 (β') libre de mutaciones y se podrá proceder a la última etapa de clonaje del gen rpoC2 (β') en los constructos pQLink + rpoD1 (σ_A) + rpoZ (ω) + rpoC1 (γ), pQLink + rpoD2 (σ_B) + rpoZ (ω) + rpoC1 (γ) y pQLink + rpoD5 (σ_C) + rpoZ (ω) + rpoC1 (γ). Tras esto, se co-transformarán células *E. coli* BL21 con cada uno de estos plásmidos y el plásmido pETCola + α + β y se podrán empezar a realizar pruebas de expresión de la RNAP.

4.3: Expresión de NtcA y PipX.

En la figura 15 se observan los resultados obtenidos para la inducción de la expresión de NtcA y PipX mediante IPTG (homólogo de la lactosa que se une al promotor del operón lac que se encuentra en el plásmido de expresión y provoca la liberación del

repositor) después de realizar una electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida 10 %. La inducción de la expresión se realizó con IPTG aprovechando que los vectores pET15b (*ntca*) y pTrc99A (*pipx*) contienen el operón lac clonado junto a los genes que codifican las proteínas NtcA y PipX.

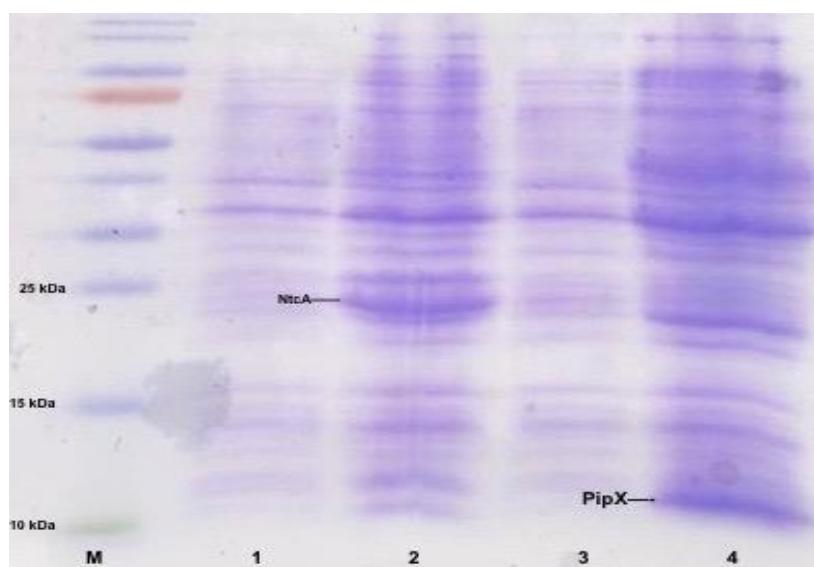


Figura 13. Gel de poliacrilamida 10 % de la expresión de las proteínas NtcA y PipX antes y después de inducir la expresión con IPTG. M: 3 uL de marcador PageRuler™ (Thermo Scientific), 1: 10 uL de expresión de NtcA antes de inducir con IPTG, 2: 10 uL de expresión de NtcA después de inducir con IPTG, 3: 10 uL de expresión de PipX antes de inducir con IPTG, 4: 10 uL de expresión de PipX después de inducir con IPTG.

En el carril 2 (figura 13), el cuál muestra la expresión de NtcA después de inducir con IPTG, se observa una banda a ~25 kDa que se corresponde bien con el tamaño de NtcA junto a la cola de polihistidinas (etiqueta para la posterior purificación). Cabe destacar que NtcA es una proteína dimérica (dos monómeros de 25 kDa), sin embargo, al haber realizado una electroforesis desnaturalizante solo se observan los monómeros a 25 kDa. En el carril 4, que muestra la expresión de PipX después de inducir con IPTG, se observa una banda bastante pronunciada a 11-12 kDa que se corresponde bien con el tamaño de la proteína PipX junto a la cola de poli-histidinas.

4.4: Purificación de NtcA.

Tal y como se ha descrito en materiales y métodos, el pellet de células de la expresión de NtcA se resuspendió en tampón de sonicado, y tras el lisado de las células, la fracción soluble se cargó en una columna de níquel His-trap. Tras el lavado de la columna mediante tampón A, se procedió a eluir NtcA. En la figura 16 se observa un gráfico de A_{280} de las diferentes fracciones de proteína eluida obtenido tras haber

finalizado el gradiente de Imidazol creado en el sistema FPLC a diferentes concentraciones de tampón A y B de NtcA (Tabla 16)

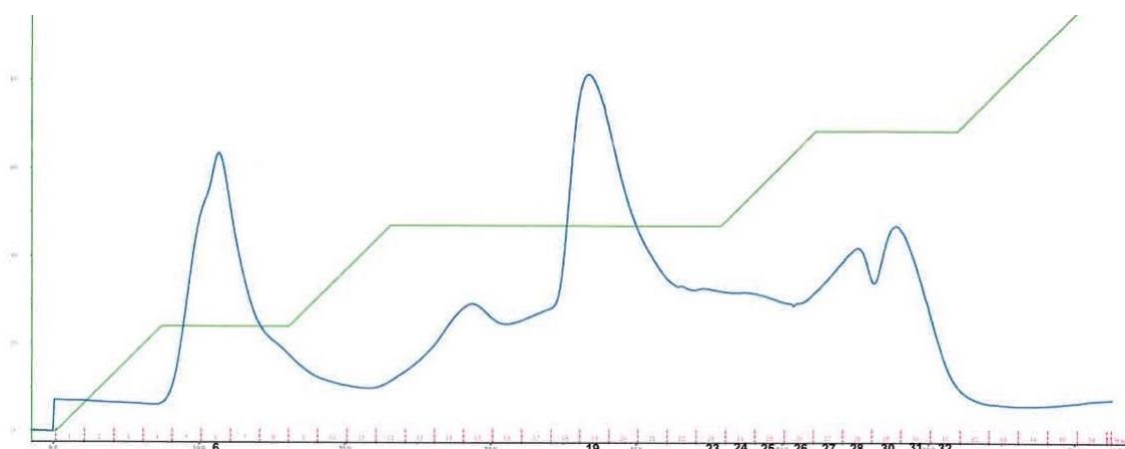


Figura 14. Gráfica de A₂₈₀ de las diferentes fracciones obtenidas a diferentes concentraciones de tampón B. El eje Y contiene el porcentaje de tampón B, el eje X las diferentes fracciones y los picos son la absorbancia obtenida para cada fracción.

Se obtuvieron 3 picos de A₂₈₀ bastante significativos en las fracciones 6, 19 y 30, aproximadamente, que podrían corresponder a NtcA. Seguidamente, se midió la concentración de proteína en las fracciones de interés (6, 19 y 30), en el pellet de sonificado (resuspendido en el mismo volumen que el volumen de sobrenadante), en el sobrenadante del sonificado, en la fracción no retenida de la columna y en el lavado de la columna mediante el método de Bradford (Tabla 18) a partir de una curva patrón ($y=0,0532x + 0,0018$) realizada midiendo la A₅₉₅ de BSA a diferentes concentraciones (0, 2, 4, 6, 8 mg/mL).

Tabla 18: Volumen de muestra utilizado para la cuantificación, absorbancia y concentración de proteína obtenida mediante el método de Bradford.

	Volumen (uL)	A ₅₉₅	[Proteína] mg/mL
No retenido	1	0,293	5,47
Pellet	1	0,143	2,66
Sobrenadante	0,8	0,2	5,13
Lavado	1	0,305	5,69
Fracción 6	1	0,158	2,94
Fracción 19	3	0,124	0,77
Fracción 30	1	0,204	3,80

Se observó una alta concentración proteica en el pellet del lisado (2.66 mg/mL), esto muestra que se perdió bastante proteína y se deberían haber realizado más ciclos de sonicación. Además se observa que las fracciones 6 y 30 contienen una concentración bastante alta de proteína total (2,94 y 3,8 mg/mL) por lo que podían corresponder a NtcA ya que en las purificaciones de esta proteína se obtienen concentraciones bastante altas (Llácer, 2012; Forcada-Nadal, 2018). A continuación, se realizó una electroforesis desnaturalizante SDS-Page en un gel de poliacrilamida al 10% con el objeto de conocer que fracciones contenían la proteína NtcA (Figuras 15 y 16).

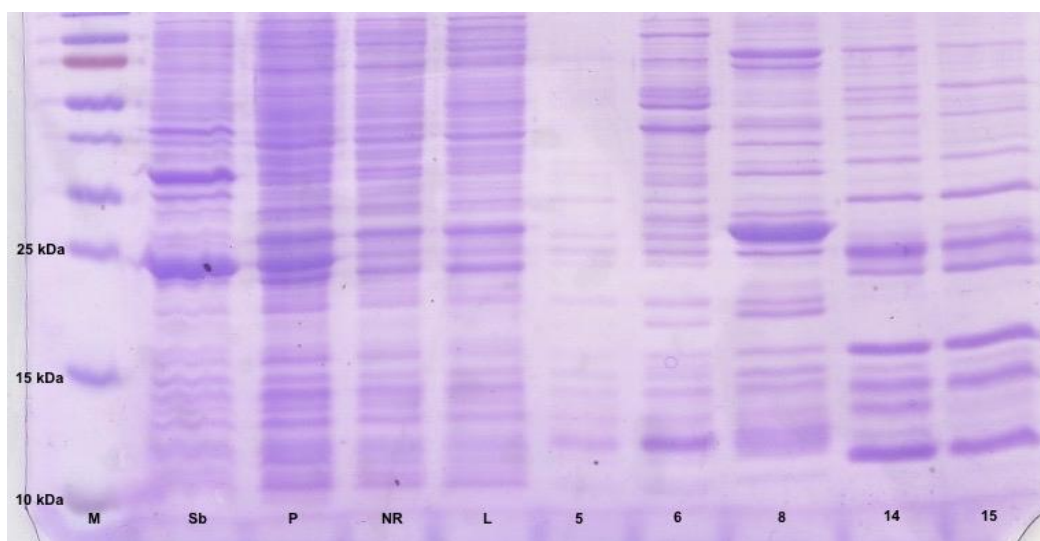


Figura 15. Gel de poliacrilamida 10 % de la purificación de NtcA. M: Marcador PageRuler™ (Thermo Scientific), Sb: Sobrenadante del sonicado, P: Pellet del sonicado, NR: No retenido en la columna, L: Lavado de la columna, 5-15: Fracciones de interés.

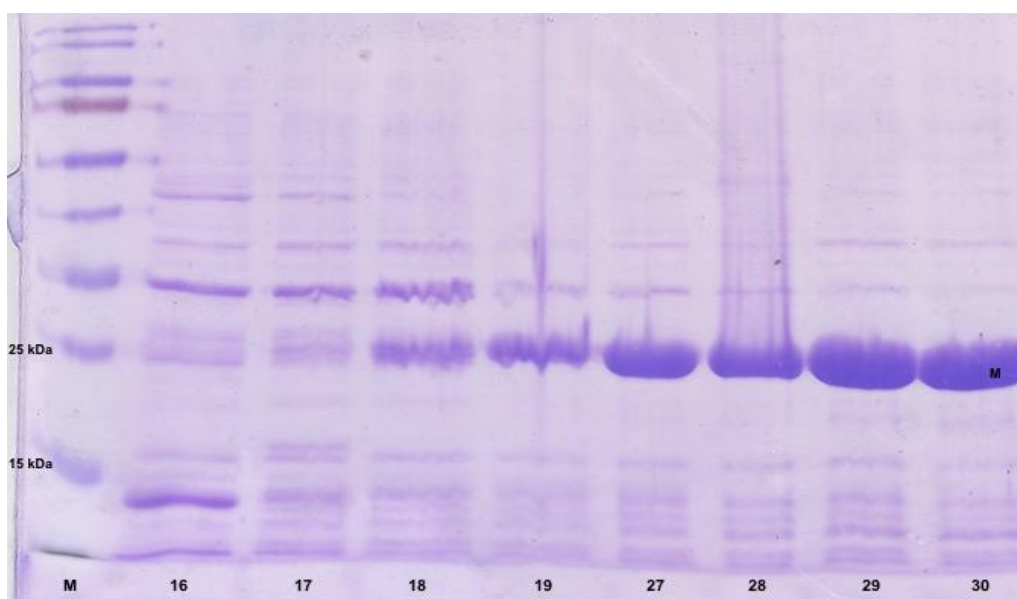


Figura 16. Gel de poliacrilamida 10 % de la purificación de NtcA. M: Marcador PageRuler™ (Thermo Scientific), 16-30: Fracciones de interés.

En las fracciones 5-18 no se observa una banda pronunciada a 25-26 kDa que pueda corresponder a NtcA, en cambio en la fracción 19 se empieza a observar una banda clara que corresponde al tamaño de NtcA y en las fracciones 27-30 ya se observa una banda muy pronunciada y sin apenas contaminación de otras proteínas. Se decidieron añadir en un mismo tubo las fracciones 23-32 (2 mL cada una, volumen total de 20 mL) y se concentró la proteína mediante ultrafiltración usando un filtro de 10kDa hasta un volumen de 11 mL, y concentración de proteína de 3,5 mg/mL (calculada mediante el método de Bradford a partir de la curva patrón de BSA utilizada anteriormente). Por tanto, se obtuvieron 38,5 mg de NtcA pura, que es más que suficiente para la continuación proyecto y la realización de experimentos de cryo-EM. Aunque no dio tiempo a la obtención de la proteína de PipX purificada, a tenor de lo observado en los experimentos realizados por Llácer et al. (2010), es muy posible que cuando se realice su purificación, la concentración y cantidad total obtenida de PipX sea mas baja que la de NtcA debido a su alta insolubilidad. En cualquier caso la cantidad obtenida será mas que suficiente para los estudios de interacción y de cryo-EM del complejo RNAP-NtcA-PipX-Promotor. De hecho para la formación del complejo la proteína limitante no será PipX, sino la RNAP debido a la gran complejidad de su expresión y purificación (ver apartado 6.1).

4.5: Estudio de complejos de iniciación de la transcripción bacterianos.

En este apartado se expone una hipótesis, basada en el conocimiento adquirido sobre la obtención de otros complejos de iniciación de la transcripción, bacterianos de como NtcA y PipX promoverían la transcripción.

4.4.1: Bases estructurales de la activación de la transcripción mediada por un activador de tipo II.

Como se ha comentado anteriormente, NtcA es un activador de la transcripción de tipo II perteneciente a la familia CRP-FNR que cuenta con una gran homología estructural y funcional con la proteína CRP. En un estudio llevado a cabo por Feng, Zhang y Ebright (2016) se muestra una estructura cristalina de un complejo de la activación de la transcripción mediado por el activador transcripcional de tipo II TAP (Figura 17), el cual es un homólogo funcional y estructural de CRP (Agari, Kuramitsu y Shinkai, 2012). Esta estructura puede tener cierta similitud al modo en el que NtcA activa la transcripción en cianobacterias.

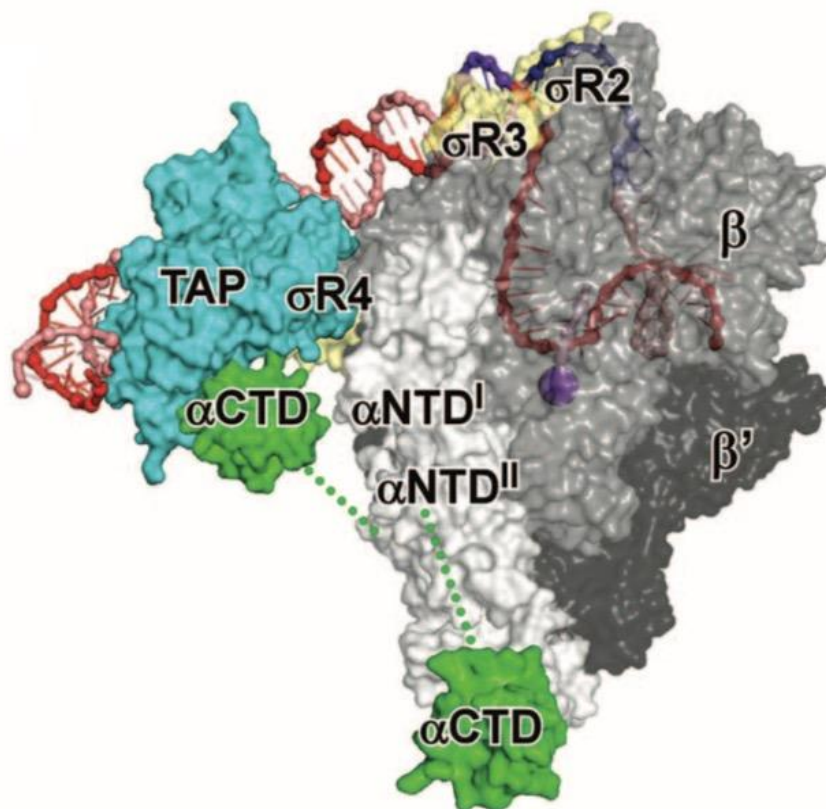


Figura 17. Complejo RNAP-TAP.DNA. En esta figura se observa la interacción del factor de transcripción TAP, una RNA polimerasa y DNA en complejo abierto; extraída de Feng et al. (2018).

Las interacciones de TAP con el promotor facilitan el reconocimiento de este por parte de la RNAP y su posterior desenrollamiento necesario para la formación de la burbuja de transcripción. La estructura TAP-RPo (conformación abierta RNAP-promotor) (Figura 17) es superponible a RPo sin la unión de TAP, esto indica que la interacción de un activador transcripcional de tipo II y RPo no parece alterar la estructura de la RNAP (Feng et al., 2016).

Los activadores transcripcionales de tipo II de la familia CRP-FNR, además de unirse a la región -41,5, también interactúan con la región -35. Esta interacción es menos específica que en la transcripción independiente de FT debido a que la curvatura que le proporciona el activador (en este caso TAP) al DNA disminuye el número de residuos del factor σ (σ R4) que interactúan con la región -35 (Rhodius et al., 1997, Feng et al., 2016).

Como un activador transcripcional de clase II promueve el paso de la conformación cerrada RNAP-promotor a la conformación abierta (con el DNA desenrollado) es todavía una incógnita. En esta estructura (Figura 17) se demuestra que

el activador transcripcional no altera la conformación de la RNAP ni la burbuja de transcripción, sin embargo, se observan interacciones de TAP con α -CTD que seguramente promuevan la formación de RPc (conformación cerrada RNAP-promotor) además de la estabilización de tanto la conformación cerrada (RPc) como la abierta (RPO). Además, existen interacciones proteína-proteína simples y estabilizadoras de TAP con α -NTD, la subunidad β y el factor σ (σ R4) que quizá promuevan el paso de RPc a RPO y por lo tanto la activación de la transcripción (Feng et al., 2016) (Figura 17).

Al haber una homología estructural entre TAP y NtcA, se puede predecir que su modo de activar la transcripción debería ser muy similar y por lo tanto, en esta estructura se puede observar el modo en el que posiblemente NtcA podría favorecer la activación de la transcripción.

4.4.2: Posible papel de PipX en la activación de la transcripción en cianobacterias.

En un estudio llevado a cabo por Forcada-Nadal (2018) se describe una estructura cristalina a 3,8 Å de resolución, de NtcA-PipX-DNA que demostró que PipX no interacciona directamente con el DNA ya que se encuentra a demasiada distancia de este. Además, PipX tampoco parece provocar cambios estructurales en la conformación de NtcA y el DNA durante la unión. Sin embargo, en la estructura aparecen nuevas interacciones entre NtcA y el DNA, lo que seguramente se deba a que PipX favorece esta unión y promueve la formación de estos contactos adicionales.

En un estudio realizado por Llácer (2012) se realizó un modelo de la posible interacción NtcA-PipX- α CTD-DNA superponiendo PipX-NtcA y CRP-DNA- α CTD (Lawson et al., 2004) aprovechando la homología estructural y funcional de NtcA y CRP (Figura 18).

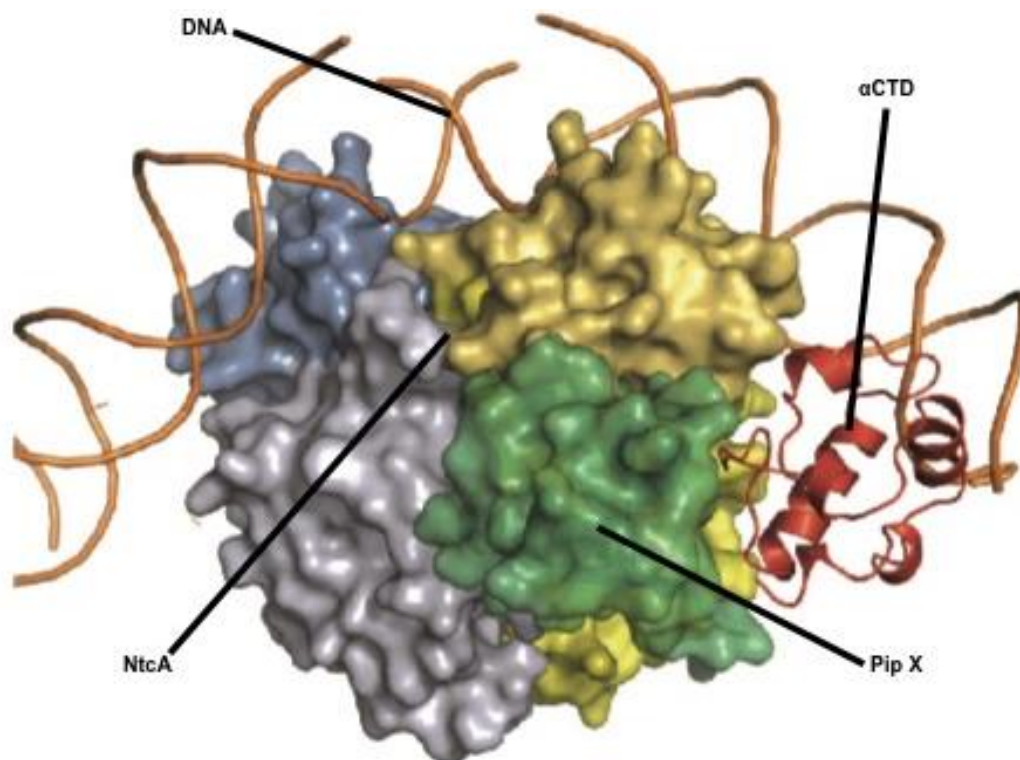


Figura 18. Modelo de interacción NtcA-PipX-RNAP-DNA. Modelo de PipX-NtcA con DNA y el dominio α -CTD de la RNAP creado a partir de la superposición de NtcA-PipX y CRP-DNA- α CTD; editada de Llácer (2012).

En el modelo estructural se observa que la mayoría de PipX permanece expuesta en complejo con NtcA y muy cercana a la subunidad α CTD de la RNAP, por lo que es posible que PipX proporcione contactos extra del complejo con la RNAP. Por otra parte, al asumir que NtcA se une a los promotores igual que CRP, Llácer (2012) obtuvo otro modelo in silico de la posible interacción NtcA-PipX-Promotor-RNAP completa (Figura 19).

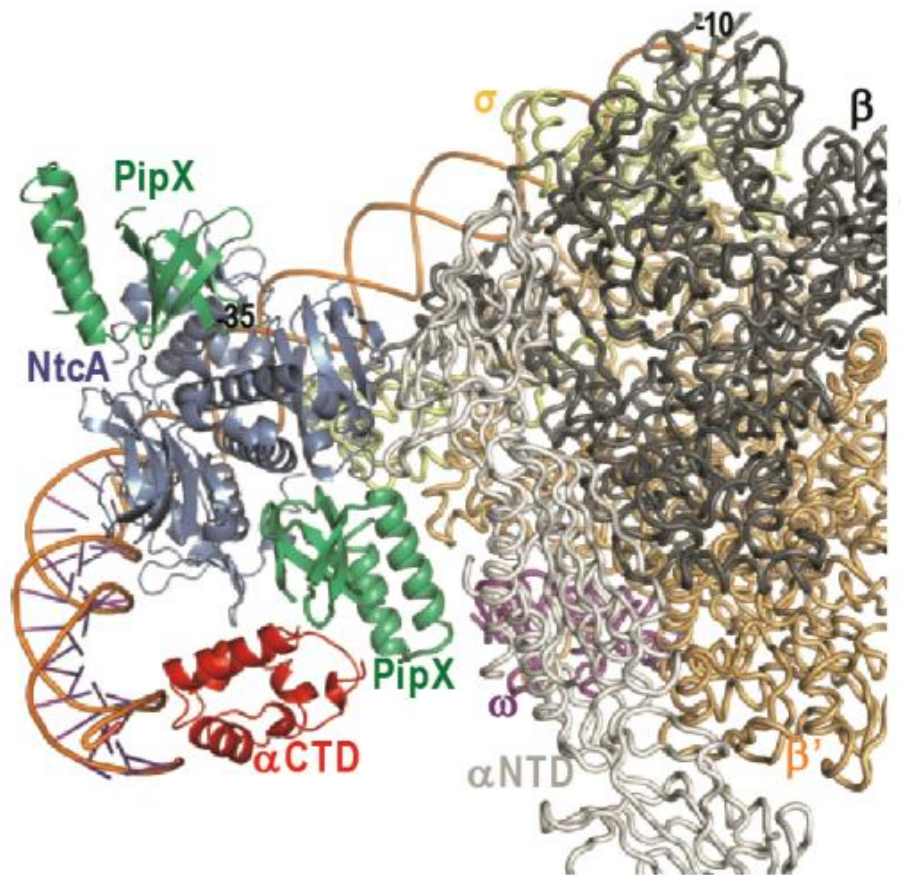


Figura 19. Modelo de la posible interacción de NtcA-PipX con la totalidad de la RNAP, extraída de Llácer (2012).

En este modelo hipotético una de las moléculas de PipX se encontraría entre NtcA y la RNAP, contactando con las subunidades α CTD, β' , ω y σ a partir de sus hélices C-terminales, teniendo un papel importante en la interacción y por lo tanto, posiblemente en la activación de la transcripción (Llácer, 2012).

5. CONCLUSIÓN

1. Se ha diseñado una estrategia de clonación que ha funcionado perfectamente y ha permitido clonar en tándem todas los genes que codifican las diferentes subunidades de la RNA polimerasa cianobacteriana excepto *rpoC2* (β').
2. Los resultados obtenidos para eliminar la mutación de 49 pb del gen *rpoC2* mediante mutagénesis por PCR no han sido positivos, en cambio la mutación ha quedado a un paso de ser eliminada mediante la sustitución de un fragmento del gen que contiene la secuencia mutada por un gen artificial de 1389 pb del mismo fragmento pero con la secuencia correcta.
3. Se han expresado las proteínas NtcA y PipX obteniendo bandas del tamaño esperado en un gel de poliacrilamida.
4. Se ha conseguido purificar la proteína NtcA mediante cromatografía de afinidad obteniendo altas concentraciones y pureza de esta.
5. Se ha desarrollado una hipótesis de cómo NtcA favorecería la activación de la transcripción mediante el conocimiento adquirido sobre la activación de la transcripción mediada por TAP, un factor de transcripción de tipo II homólogo a NtcA. Además se ha estudiado un modelo de la interacción NtcA-PipX-RNAP-promotor obtenido por “docking” por Llácer (2012) para observar el posible papel de PipX en la activación de la transcripción

En resumen, se ha conseguido obtener todos los genes que codifican la RNAP de *Synechococcus elongatus* clonados en tándem excepto *rpoC2* (β') que contenía una mutación que ha quedado a un paso de ser eliminada. En cuanto a NtcA y PipX, se han expresado las dos proteínas y ha faltado por purificar la segunda. Además se ha desarrollado una hipótesis sobre como NtcA y PipX podrían favorecer la transcripción.

Fases preliminares para el estudio de la activación de la transcripción dependiente del factor de transcripción cianobacteriano NtcA

6. LÍNEAS FUTURAS

Una vez clonadas en tándem todas las subunidades que codifican la RNAP cianobacteriana en vectores pQLink se podrá continuar con el proyecto expresando y purificando la RNAP; y realizando el ensamblaje del complejo RNAP-NtcA-PipX-DNA para su estudio mediante Cryo-EM. Para ello, se han diseñados dos estrategias.

6.1: Estrategia de coexpresión y purificación de una RNAP cianobacteriana.

Para la expresión de la RNAP de *Synechococcus elongatus* se partirá de los genes rpoA (α) y rpoB (β) clonados en el vector pETCola (Novagen) y de los genes rpoC1 (γ), rpoC2 (β'), rpoZ (ω), junto a rpoD1 (σ_A) ó rpoD2 (σ_B) ó rpoD5 (σ_C), clonados en vectores pQLink (Figura 20).

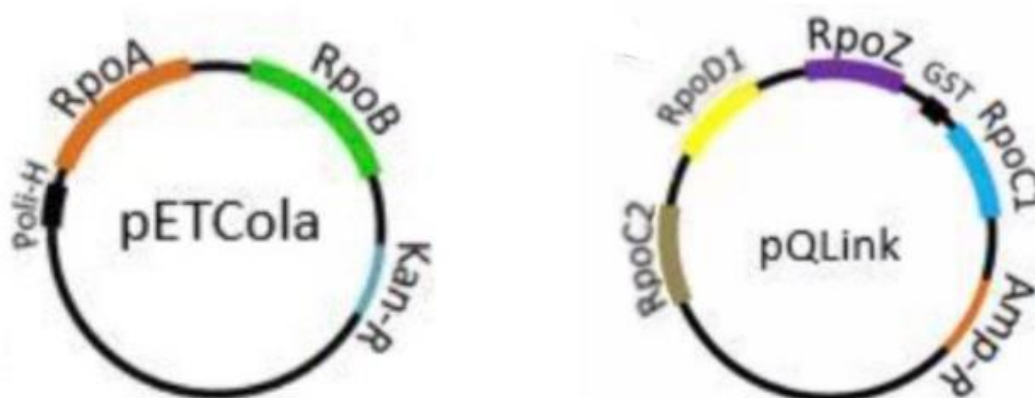


Figura 20. Plásmidos para la coexpresión de la RNA polimerasa cianobacteriana: En esta figura se muestran el vector pETCola (etiqueta Poli-His) y marcador de resistencia a kanamicina) con los genes rpoA (α) y rpoB (β) clonados y el vector pQLink (etiqueta GST y gen de resistencia a ampicilina) con los genes rpoC2 (β'), rpoD1(σ_A), rpoZ (ω) y rpoC1 (γ) [los genes rpoD2 (σ_B) y rpoD5 (σ_C) se encuentran clonados en la misma posición que rpoD1].

La cepa elegida para la coexpresión sería *E.coli* BL21 (DE3) (Novagen) debido a que es una cepa con bajos niveles de proteasas, característica muy necesaria debido a la complejidad de la expresión. En el caso de que la expresión de algunas subunidades presente problemas, se pasará a utilizar *E.coli* Rosseta (ver apartado 3.2.1). Se realizarán varias pruebas de expresión a distintas concentraciones de IPTG y temperaturas de expresión (15-37 °C) debido a la presumible baja insolubilidad de algunas de las subunidades de la RNAP. Si pese a ello continúan habiendo problemas de solubilidad se podrán añadir chaperonas moleculares o se inducirán las carabinas

propias de *E.coli* mediante shocks combinados de etanol/frío previo a la inducción para favorecer la estabilidad de las diferentes subunidades.

Una vez expresada la proteína, se podrá proceder a la purificación de las tres combinaciones de RNAP con los tres factores σ distintos (σ_A , σ_B y σ_C) partiendo de cultivos de 1 a 6 litros. Para la purificación se realizarán dos cromatografías de afinidad a partir de la cola de poli-histidina que se encuentra en la subunidad α en el vector pETCola y la GST que se encuentra clonada en la subunidad γ en los vectores pQLink; además, se realizará un último paso mediante cromatografía de exclusión molecular para obtener la RNAP con la estequiometría deseada. Para la cromatografía de afinidad a partir de la cola de poli-histidinas, se realizará el mismo protocolo general que en la purificación de NtcA (ver apartado 3.2.3). Para la segunda cromatografía de afinidad se utilizará una columna GST Trap FF, y después de cargar la muestra en la columna, la RNAP se eluirá usando un tampón B con 10 mM de glutatión (compite con GST por la unión a la columna). Dado que algunas de las subunidades podrían estar purificadas en exceso en comparación al resto (previsiblemente α y γ , ya que son las subunidades con etiquetas), se realizará una cromatografía de exclusión molecular usando una columna Superdex200 (separa moléculas de entre 10 y 600 kDa; el tamaño de la RNAP es de alrededor de 560kDa).

6.2: Ensamblaje del complejo RNAP-NtcA-PipX-DNA para su estudio mediante Cryo-EM.

En primer lugar, se necesitará el diseño de tres operadores cuya secuencia corresponda a genes bajo el control de NtcA como *glnA*, *glnB* y *glnN* (Imamura y Asayama, 2009). Estos genes tienen diferentes requerimientos de 2OG, NtcA, PipX y factores σ para activar la transcripción (Forcada-Nadal, Forchhammer y Rubio, 2014). La longitud de las secuencias diseñadas sería de unos 85 pb (de -70 a +15 del sitio de inicio de transcripción), basándonos en los procedimientos utilizados por Feng, Zhang y Ebright (2016) y Jian, Deng, Dong y Liu (2020). Las secuencias diseñadas (Figura 21) contendrán una secuencia consenso en la posición -41.5 (sitio de unión de NtcA al promotor) y el resto de regiones consenso necesarias para la formación del complejo de iniciación; además se añadirán algunas base no complementarias (de -13 a +5 del inicio de la transcripción) para facilitar la formación de la burbuja de transcripción (Jian et al.).

Fases preliminares para el estudio de la activación de la transcripción dependiente del factor de transcripción cianobacteriano NtcA

7. BIBLIOGRAFÍA

- Agari, Y., Kuramitsu, S., & Shinkai, A. (2012). X-ray crystal structure of TTHB099, a CRP/FNR superfamily transcriptional regulator from *thermus thermophilus* HB8, reveals a DNA-binding protein with no required allosteric effector molecule. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 80(5), 1490-1494.
- Ausubel, F. M. (1998). *Current Protocols in Molecular Biology*. Editorial John Wiley & Sons. (Libro)
- Barne, K. A., Bown, J. A., Busby, S. J., & Minchin, S. D. (1997). Region 2.5 of the *Escherichia coli* RNA polymerase $\sigma 70$ subunit is responsible for the recognition of the 'extended-10' motif at promoters. *The EMBO journal*, 16(13), 4034-4040.
- Boyaci, H., Chen, J., Jansen, R., Darst, S. A., & Campbell, E. A. (2019). Structures of an RNA polymerase promoter melting intermediate elucidate DNA unwinding. *Nature*, 565(7739), 382-385.
- Browning, D. F., & Busby, S. J. (2004). The regulation of bacterial transcription initiation. *Nature Reviews Microbiology*, 2(1), 57-65.
- Busby, S., & Ebricht, R. H. (1999). Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *Journal of molecular biology*, 293(2), 199-213.
- Darst, S. A. (2001). Bacterial RNA polymerase. *Current opinion in structural biology*, 11(2), 155-162.
- Espinosa, J., Forchhammer, K., Burillo, S., & Contreras, A. (2006). Interaction network in cyanobacterial nitrogen regulation: PipX, a protein that interacts in a 2-oxoglutarate dependent manner with PII and NtcA. *Molecular microbiology*, 61(2), 457-469.
- Feng, Y., Zhang, Y., & Ebricht, R. H. (2016). Structural basis of transcription activation. *Science*, 352(6291), 1330-1333.

- Forcada-Nadal, A., Llácer, J. L., Contreras, A., Marco-Marín, C., & Rubio, V. (2018). The PII-NAGK-PipX-NtcA regulatory axis of cyanobacteria: a tale of changing partners, allosteric effectors and non-covalent interactions. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 5, 91.
- Forcada-Nadal, A., Forchhammer, K., & Rubio, V. (2014). SPR analysis of promoter binding of *Synechocystis* PCC6803 transcription factors NtcA and CRP suggests cross-talk and sheds light on regulation by effector molecules. *FEBS letters*, 588(14), 2270-2276.
- Forcada-Nadal, A. (2018). *Hacia el entendimiento del control de la expresión génica del regulón cianobacteriano del nitrógeno mediado por el factor de transcripción ntcA y la proteína reguladora pipx* (Doctoral dissertation, Universitat de València).
- Frias, J. E., Mérida, A., Herrero, A., Martín-Nieto, J., & Flores, E. (1993). General distribution of the nitrogen control gene *ntcA* in cyanobacteria. *Journal of bacteriology*, 175(17), 5710-5713.
- Ghosh, T., Bose, D., & Zhang, X. (2010). Mechanisms for activating bacterial RNA polymerase. *FEMS microbiology reviews*, 34(5), 611-627.
- Gourse, R. L., Ross, W., & Gaal, T. (2000). UPs and downs in bacterial transcription initiation: the role of the alpha subunit of RNA polymerase in promoter recognition. *Molecular microbiology*, 37(4), 687-695.
- Herrero, A., Muro-Pastor, A. M., & Flores, E. (2001). Nitrogen control in cyanobacteria. *Journal of bacteriology*, 183(2), 411-425.
- Herrero, A., Muro-Pastor, A. M., Valladares, A., & Flores, E. (2004). Cellular differentiation and the NtcA transcription factor in filamentous cyanobacteria. *FEMS microbiology reviews*, 28(4), 469-487.

- Imamura, S., & Asayama, M. (2009). Sigma factors for cyanobacterial transcription. *Gene regulation and systems biology*, 3, GRSB-S2090.
- Imashimizu, M., Fujiwara, S., Tanigawa, R., Tanaka, K., Hirokawa, T., Nakajima, Y. & Tsuzuki, M. (2003). Thymine at—5 Is crucial for cpc promoter activity of *Synechocystis* sp. strain PCC 6714. *Journal of bacteriology*, 185(21), 6477-6480.
- Ishihama, A. (2000). Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 499-518.
- Ishihama, A. (2009). The Nucleoid: An Overview. *EcoSal—Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*.
- Ishihama, A. (2010). Prokaryotic genome regulation: multifactor promoters, multitarget regulators and hierarchic networks. *FEMS microbiology reviews*, 34(5), 628-645.
- Keilty, S., & Rosenberg, M. (1987). Constitutive function of a positively regulated promoter reveals new sequences essential for activity. *Journal of Biological Chemistry*, 262(13), 6389-6395.
- Koksharova, O. A., Klint, J., & Rasmussen, U. (2007). The first protein map of *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *Microbiology*, 76(1), 124-124.
- Körner, H., Sofia, H. J., & Zumft, W. G. (2003). Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs. *FEMS microbiology reviews*, 27(5), 559-592.
- Korzheva, N., Mustaev, A., Kozlov, M., Malhotra, A., Nikiforov, V., Goldfarb, A., & Darst, S. A. (2000). A structural model of transcription elongation. *Science*, 289(5479), 619-625.
- Kruger, N. J. (2009). The Bradford method for protein quantitation. In *The protein protocols handbook* (pp. 17-24). Humana Press, Totowa, NJ.

- Lawson, C. L., Swigon, D., Murakami, K. S., Darst, S. A., Berman, H. M., & Ebright, R. H. (2004). Catabolite activator protein: DNA binding and transcription activation. *Current opinion in structural biology*, 14(1), 10-20.
- Llácer, J. L., Contreras, A., Forchhammer, K., Marco-Marín, C., Gil-Ortiz, F., Maldonado, R., ... & Rubio, V. (2007). The crystal structure of the complex of PII and acetylglutamate kinase reveals how PII controls the storage of nitrogen as arginine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(45), 17644-17649.
- Llácer, J. L., Fita, I., & Rubio, V. (2008). Arginine and nitrogen storage. *Current opinion in structural biology*, 18(6), 673-681.
- Llácer, J. L., Espinosa, J., Castells, M. A., Contreras, A., Forchhammer, K., & Rubio, V. (2010). Structural basis for the regulation of NtcA-dependent transcription by proteins PipX and PII. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(35), 15397-15402.
- Llácer, J. L. (2012). Bases estructurales de la señalización mediada por la proteína PII. (Doctoral dissertation, Universitat de València).
- Luque, I., Flores, E., & Herrero, A. (1994). Molecular mechanism for the operation of nitrogen control in cyanobacteria. *The EMBO journal*, 13(12), 2862-2869.
- Luque, I., Vázquez-Bermúdez, M. F., Paz-Yepes, J., Flores, E., & Herrero, A. (2004). In vivo activity of the nitrogen control transcription factor NtcA is subjected to metabolic regulation in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *FEMS microbiology letters*, 236(1), 47-52.
- Lyford Delano, W. (2020). PyMOL (Versión 2.3) [Windows]. South San Francisco, California: Schrödinger.
- Madan Babu, M., & Teichmann, S. A. (2003). Evolution of transcription factors and the gene regulatory network in *Escherichia coli*. *Nucleic acids research*, 31(4), 1234-1244.

- Maheswaran, M., Urbanke, C., & Forchhammer, K. (2004). Complex formation and catalytic activation by the PII signaling protein of N-acetyl-L-glutamate kinase from *Synechococcus elongatus* strain PCC 7942. *Journal of Biological Chemistry*, 279(53), 55202-55210.
- Maldonado, J. M. (2008). Asimilación del nitrógeno y del azufre. In *Fundamentos de fisiología vegetal* (pp. 287-303). McGraw-Hill Interamericana de España.
- Mérida, A. N. G. E. L., Candau, P. E. D. R. O., & Florencio, F. J. (1991). Regulation of glutamine synthetase activity in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 by the nitrogen source: effect of ammonium. *Journal of bacteriology*, 173(13), 4095-4100.
- Minakhin, L., Bhagat, S., Brunning, A., Campbell, E. A., Darst, S. A., Ebright, R. H., & Severinov, K. (2001). Bacterial RNA polymerase subunit ω and eukaryotic RNA polymerase subunit RPB6 are sequence, structural, and functional homologs and promote RNA polymerase assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(3), 892-897.
- Muro-Pastor, M. I., Reyes, J. C., & Florencio, F. J. (2001). Cyanobacteria perceive nitrogen status by sensing intracellular 2-oxoglutarate levels. *Journal of Biological Chemistry*, 276(41), 38320-38328.
- Muro-Pastor, M. I., & Florencio, F. J. (2003). Regulation of ammonium assimilation in cyanobacteria. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41(6-7), 595-603.
- Muro-Pastor, M. I., Reyes, J. C., & Florencio, F. J. (2005). Ammonium assimilation in cyanobacteria. *Photosynthesis research*, 83(2), 135-150.
- Nickels, B. E., Roberts, C. W., Roberts, J. W., & Hochschild, A. (2006). RNA-mediated destabilization of the $\sigma 70$ region 4/ β flap interaction facilitates engagement of RNA polymerase by the Q antiterminator. *Molecular cell*, 24(3), 457-468.

- Parkinson, G., Wilson, C., Gunasekera, A., Ebright, Y. W., Ebright, R. E., & Berman, H. M. (1996). Structure of the CAP-DNA complex at 2.5 Å resolution: a complete picture of the protein-DNA interface. *Journal of molecular biology*, 260(3), 395-408.
- Rhodus, V. A., West, D. M., Webster, C. L., Busby, S. J., & Savery, N. J. (1997). Transcription activation at class II CRP-dependent promoters: the role of different activating regions. *Nucleic acids research*, 25(2), 326-332.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M., & Stanier, R. Y. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Microbiology*, 111(1), 1-61.
- Ruff, E. F., Record, M. T., & Artsimovitch, I. (2015). Initial events in bacterial transcription initiation. *Biomolecules*, 5(2), 1035-1062.
- Sant'Anna, F. H., Trentini, D. B., de Souto Weber, S., Cecagno, R., Da Silva, S. C., & Schrank, I. S. (2009). The PII superfamily revised: a novel group and evolutionary insights. *Journal of molecular evolution*, 68(4), 322-336.
- Scheich, C., Kümmel, D., Soumailakakis, D., Heinemann, U., & Büssow, K. (2007). Vectors for co-expression of an unrestricted number of proteins. *Nucleic acids research*, 35(6), e43.
- Schneider, G. J., & Haselkorn, R. (1988). RNA polymerase subunit homology among cyanobacteria,
- Shestakov, S. V., & Karbysheva, E. A. (2017). The origin and evolution of cyanobacteria. *Biology Bulletin Reviews*, 7(4), 259-272.
- Shi, W., Jiang, Y., Deng, Y., Dong, Z., & Liu, B. (2020). Visualization of two architectures in class-II CAP-dependent transcription activation. *PLoS Biology*, 18(4), e3000706.

- Some, D., Amartely, H., Tsadok, A., & Lebendiker, M. (2019). Characterization of Proteins by Size-Exclusion Chromatography Coupled to Multi-Angle Light Scattering (SEC-MALS). *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (148), e59615.
- Stanier, R. Y., & Cohen-Bazire, G. (1977). Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Annual review of microbiology*, 31(1), 225-274.
- Waldburger, C., Gardella, T., Wong, R., & Susskind, M. M. (1990). Changes in conserved region 2 of Escherichia coli σ 70 affecting promoter recognition. *Journal of molecular biology*, 215(2), 267-276.
- Wösten, M. M. S. M. (1998). Eubacterial sigma-factors. *FEMS microbiology reviews*, 22(3), 127-150.
- Yamamoto, K., & Ishihama, A. (2003). Two different modes of transcription repression of the Escherichia coli acetate operon by IclR. *Molecular microbiology*, 47(1), 183-194.
- Yura, T., & Nakahigashi, K. (1999). Regulation of the heat-shock response. *Current opinion in microbiology*, 2(2), 153-158.
- Zeth, K., Fokina, O., & Forchhammer, K. (2014). Structural basis and target-specific modulation of ADP sensing by the Synechococcus elongatus PII signaling protein. *Journal of Biological Chemistry*, 289(13), 8960-8972.

Fases preliminares para el estudio de la activación de la transcripción dependiente del factor de transcripción cianobacteriano NtcA

8.ANEXO

8.1: Secuencias de los genes que codifican las diferentes subunidades de la RNA polimerasa de *Synechococcus elongatus*.

>Synpcc7942_2209 DNA-directed RNA polymerase subunit alpha
GTGACATTTCAAGTCGAATGCGTCGAGAGCCGCACTGAAGCCGACCAAGGGCAATATGGCCGCTTTT
CCATCGAGCCTCTCGCTCGTGGGCAAGGTACAACGGTTGGCAATGCGCTCCGGCGTGTGTTGCTCTC
CAACCTAGAAGGAACAGCCGTCACAGCTGTCCGGATCGGTGGTGTCAACCACGAATTCGCAACCATC
CCCGGCGTGCGGGAGGATGTCTCGACATCTTGCTCAACGTCCTGAGTTGGTGGTGCATGCCACACA
GTCTCAGCCCCAGATTGGTCCGCTGCGGTGGTGGTCCGGCAACTGTCACGGCTGCTGATGTTGA
CTTTGGCCCTGAAGTTGAAGTCATCAATCCCAATCACTACATCGCTTCGCTCTCTGAGGGTGCCACC
CTCGAGATGGAGTTGAAAGTTGAGTGGGGCACGGGCTACCGCGCCATCGACCGCAGCCATGACGAAA
CGACTGCCCTAGACTTTCTGCAACTTGATGCTGTATTCATGCCGGTGCCTCGGGTGAACACAGCGT
TGAAGATGCGCGCGTCCGGGAATCCACGGCCATCGACCGCCTCGTACTCGAGGTTTGGACCAATGGC
AGTCTCTCGCCCCAGGAAGCACTGAGCCAAGCCGCTCTTGTCTCGTCGCGCTGTTTCGAGCCGTTGA
AAAACGTCAGTGTGGCAGTACCCACACCGCCGATCCTGAGCCCACGCCCCGAAAGCCAAACGCCGAT
CGAAGATCTGCAGCTTTCCGGTTCGGGCTTACAACCTGCCTGAAGCGGGCGCAAGTGAACCTCCGTTGCT
GACTTGCTGAGCTACACCTACGAAGATCTACTGGAG

>Synpcc7942_1522 DNA-directed RNA polymerase subunit beta
ATGGCTGAGCAAACGCAACTCGCTCCCGCTGCCTTCCATTTACCTGATCTCGTTGCCATTCAACGGA
ACAGCTTCCGTTGGTTCCCTAGAAGAAGGGCTCATTGAGGAGCTGGAAAGCTTTTCACCAATCACCGA
CTATACCGGTAAGCTTGAGCTTCACTTCCTCGGTAAGCAGTATAAGCTCAAGCGCCCGAAGTACGAC
GTTGATGAAGCAAACCGGCTGACGGCACCTACTCGGTTCAAATGTATGTGCCGACCCGTTTGTATCA
ACAAAGAAACGGGCGAAATCAAGGAGCAGGAAGTCTTTATTGGCGATCTGCCCTGATGACTGATCG
CGGCACCTTCATCATCAACGGTGCCGAACGGGTGATCGTCAACCAGATCGTCCGTAGCCCCGGCGTC
TACTACAAATCAGAGCGCGACAAGAACGGTGCCTCACCCACAATGCCAGCCTGATCCCCAACCGTG
GCGCTTGGCTGAAATTTGAAACCGATAAAAACGGTTTAGTTTGGGTGCGCATCGACAAGACGCGTAA
GTTGTCGGCGCAGGTAAGTACTGCTGAAAGCCTTGGGCTGAGCGACAACGAAATTTACGACAAGCTCCGT
CACCTGAGTATTACCAGAAGACCATCGATAAAGAAGGTCAGTTCAGCGAAGACGAAGCGCTGATGG
AGCTCTACCGCAAGCTCCGTCCGGGCGAACCGCCACGGTCTCTGGCGGTGAGCAATTGCTGGAATC
GCGGTTCTTCGATCCCAAACGCTACGACCTAGGTCCGGTGGGCGCTACAAGCTCAATAAGAAGCTG
GGTCTCAACGTCGCTGATACGGTGCAGGCTGACATCCGAAGATATTTTGGCGGCGATCGACTACC
TGATTAACCTCGAGCTTGACTTGGGTGGCTGTGAAGTCGATGACATCGACCACCTCGGCAACCGTGC
GGTGCAGTCCGTTGGGCGAGCTGCTGCAAAACCAAGTGCGGGTCCGGCTCAACCGCCTAGAGCGGATC
ATTCGGGAACGGATGACGGTGTCCGATTCCGACAGTCTTTCCGGGCTTCCCTTGGTCAACCCCAAAC
CGCTGGTGGCTGCGATCAAAGAATTTCTTGGTTCCCTCGCAACTCTCGCAGTTTTCATGGACCAAACCAA
CCCCCTGGCGGAGTTGACCCATAAAGCAGCTCTGAGTGCCCTCGGTCCCGGTGGTTTGGACACGGGAG
CGGGCTGGCTTTGCGGTGCGGGACATTCACCCAGCCACTACGGCCGGATTTGCCCGATTGAAACGC
CGGAAGGCCCGAACGCGGGTCTGATTGGTTCCCTTAGCGACCCACGCCCCGCTCAACGACTACGGCTT
TATTGAAACGCCGTTCTGGCGGCTCGAAGAAGGACGGGTTGCAAGGACTTGGCGCCGGTCTACATG
ACTGCTGACCAGGAAGATGACCTGCGGGTGGCTCCGGGAGACGTGGCTACGGATGACGCGGGCTACA
TCCTGGGAACCACAATTCGGTACGTTATCGCCAGGACTTCACCACCACGACGCCGGAGCGGGTGA
CTACGTTGCGCTCTCGCCGGTGCAGATTATCTCGGTGGCAACGTCGTTGATTCTTTCTTGAACAC
GATGACGCCAACCGTGCCTGATGGGCTCGAACATGCAACGGCAGGCGGTGCCGCTGTTGCGGCCAG
AGCGGCCCTTGGTCCGGACGGTCTGGAGCCCCAAGCGGCCCGTACTCAGGGATGGTGTATCACCAG
CCCGGTGATGGCACGATCTCTACGTCGATGCCACCCACATTGAGGTGACGGCTGACACAGGTGAG
AAGTATGGCTACGCCCTACAGAAGTACCAGCGCTCCAACCAAGATACTTGTCTGAACCAACGGCCGA
TCGTGTTTGAAGGCGATCGCGTTCAACGGGGTTCAGGTGATTGCTGACGGTCTGCCACCGAAAAGG
TGAGCTGGCCCTGGGGCAAAAACATCTCGTCGCTACATGCCTTGGGAAGGCTACAACCTACGAGGAC
GCGATTCTGATCAGCGAGCGGCTGGTCTATGACGACGCTATAACCTCGATCCACATTGAAAAATTCG
AGATTGAGGCGCTCAGACCAAGTTAGGCCCTGAGGAGATTACCCGCGAAATTCACCAACGTTGGCGA
AGATGCTCTGCGCCAACCTCGACGAAAACGGGATTATCCGCTCGGCGCATGGGTGGAGTCCGGTGC
ATCTTGGTTGGTAAGGTGACGCCCAAAGGCGAATCGGATCAGCCGCCAGAAGAAAAACTGCTGCGGG

Fases preliminares para el estudio de la activación de la transcripción dependiente del factor de transcripción cianobacteriano NtcA

CAATCTTCGGTGAGAAAGCGCGGGACGTCCGCGATAACTCCCTGCGGGTGCCGAATGGTGAGAAAGG
CCGCGTTGTTGATGTGCGTCTCTTACCCCGTGAGCAGGGTGATGAGTTGCCGCCGGGCGCCAACATG
GTTGTCCGGGTTTACGTGGCTCAGAAACGCAAGATCCAAGTCGGCGACAAGATGGCGGGTCGCCACG
GCAACAAGGGGATCATTTTCGCGGATTCTGCCCTGCGAAGACATGCCTTACCTGCCGATGGCAGGCC
GCTAGACATCGTGCTCAATCCCTTGGGTGTACCCTCGCGGATGAACGTCCGGTCAGGTGTTTGAGTGC
ATGCTGGGCTGGGCGGGTCAGCTGCTAGATGCCCGCTTCAAGGTCACGCCCTTTGACGAGATGTACG
GGGCGGAAGCCTCTCGCTTGACTGTCAACGCCAAGCTGTCTGAAGCGCGGGAGCAAACAGGTGAGCC
CTGGGTCTTTAGCGATGATGAACCCGGCAAGATCCAGGTCACGACGGTCGGACAGGGGAACCCCTTC
GATCGCCAGTGACGGTGGGTCTGCCTACATGCTTAAGCTGGTTCACCTGGTCGACGACAAGATCC
ACGCTCGCTCGACAGGTCCCTACTCCTTGGTGACCCAACAACCCCTTGGGTGGTAAAGCCCAACAAGG
GGGTCAGCGCTTCGGGGAGATGGAAGTTTGGGCACTGGAAGCCTACGGTGTGCTTACATCCTGCAA
GAGTTGCTGACGGTCAAGTCGGACGACATGCAAGGGCGGAATGAAGCTCTCAATGCGATCGTTAAGG
GCAAAGCGATTCTCGCCCCGGCACACCAGAGTCTTTCAAGGTGTTGATGCGAGAGCTGCAGTGCCT
CTGTCTCGACATTGCGGTCTACAAGGCCTCAACCGAGGACTATGAAGAAGACAAAAGAAGTGGATCTG
ATGGCGGATGTCAACCAGCGTCGGACTCCCTCGCGCCCCGACCTACGAGTCGATGTCTGTGGGCGACA
TTGATGACGATGACGACTAA

>Synpcc7942_1523 DNA-directed RNA polymerase subunit gamma

ATGGCGAAGCAGGAACAGCGGTTTACTACGTCAAGATCGCACTTGCCTCACCGGAGCGTATCCGGC
AGTGGGGTGAGCGCACGCTGCCCAATGGTCAAGTAGTCGGTGAAGTCACCAACCTGAAACCATCAAC
TATCGGACACTGAAGCCGGAGATGGACGGGCTGTTTTGCGAAAAAATCTTTGGTCTGCGAAGGACT
GGGAATGCCACTGCGGTAAGTACAAACGTGTTCCGGCACCAGCGGCATTGTCTGCGAGCGTGTGGCGT
GGAAGTCACCGAATCACGGGTGCGACGGCACCGTATGGGCTTCAATAAACTGGCTGCTCCGGTTGCC
CACGTTTGGTACCTCAAAGGCATCCCAGCTACATCGCGATTCTGCTCGACATGCCCCGCGAGACG
TTGAGCAAATCGTCTATTTCAACTCCTACGTGCTCCTCAACCCAGGCAACCCACAGCGAGCTGCAGTA
CAAGCAGCTACTGAACGAAGACCAGTGGATGGAGATCGAGGACCAAATCTACGCTGAGGAATCTGAC
CTCGAAGGTATTGAGGTTGGCATCGGTGCAGAAGCCCTGCAACAGTTGCTGCAGGATTTGAACCTCA
ATGAAGAGTCGGAAAAACTCCGTCAAGAGATTGCTGAGTCGAAGGGCCAAAAACGGGCCAAGTTAAT
CAAACGCCCTGCGTGTGATTGATAACTTCAATGGCACAGAGTCTCGGCCCGAGTGGATGGTGTGAAT
GTCATCCCGGTGATCCCTCCCGATCTCCGCCCGATGGTGCAGTTGGATGGTGGCCGCTTTGCCACCA
GTGACCTCAACGATCTTACCCTCGGGTGTGATCAACCCGGAATAACCGGTTAGCGCGTCTGCAGGAGAT
TCTCGCACCTGAGATTATCGTCCGTAACGAAAAACGGATGTTGCAGGAAGCAGTAGACGCTCTGATC
GACAACGGTCGTGCTGGCCGTACGGTGTGCGGTGCCAACCAACCGACCCCTCAAGTCCCTCTCGGACA
TCATCGAAGGGAACAGGGTCCGTTCCGGCAAAACTTGCTGGGTAAACGGGTTGATTACTCCGGTTCG
GTCGGTTCATGCTGCTCGGCCCAACCTGAAAATTCACCAAGTGTGGTCTGCCACGGGAAATGGCGATC
GAGCTGTTCCAGCCGTTTGTATCCATCGCCTGATCAAAAAATCACAGCATCAACAACATCAAGCAGG
CCAAAAACTCATTGAGAAGAACGATCCCTTGATTTGGGATGTCTTGAAGAGGTGATTGAAGGCCA
CCCTGTGATGCTGAACCGGGCCCCGACGCTGCACCGTTCGGGGATTCAAGCCTTCGAACCGATCTTG
GTAGAAGGCCGTGCGATCCAGCTTCAATCCCTTGGTCTGTCCAGCGTTTAAACGCTGACTTTGATGGTG
ACCAAATGGCGGTTACAGTCCCCCTCTCGATTGAAGCCCAGGCTGAAGCTCGTATGCTGATGCTGGC
TTCGGGCAACATTTCTGTGCGCCGCAACGGGGCAACCCATTGTCACGCCGTCACGATATGGTCTTG
GGTGTACTACTTTGACCGCCGAGAATCCTGGTGTCTCAGAAAGGGGCTGGACGCTACTTTGCCAACC
TCGAAGATGCCATCCGCGCCTTTGAGCAGGGCTCTGTGATCTTCATGCCTGGGTCTGGGTGCGCTT
TGATGGCGAAGTGAAAGCGAGGGTGAAAGCGACGAACCGGAGTCGGTGGTTCGACGCCGATGATGGC
ACGGTCACCAAGACCTATCGTTTCCGCCGAATTCGCGAGACTGAAGACGGGCAGCGTCTCTCCAGT
ACGTGAAAACAACGCCCGGTGCGATTCTCTTCAACAACACTGTTTCAGACTGCGTTGATCCACTAG

>Synpcc7942_1524 DNA-directed RNA polymerase subunit beta'

ATGGCAGAAGCGAAAAGCGCGCCGATTTTCCGCAACCGGGTCATCGATAAGAAGCAGCTGAAGAAGC
TGATTGGCTGGACCTTTGCTCACTATGGGACAGCAAAAAACAGCCGTAGTTGCCGACGATCTCAAAGC
CCTGGGATTCCGTTACGCCACCCGTGCTGGGGTTTCAATCAGTATTGATGACCTCAAGGTGCCGGGT
TCTAAGGCGGAGCTGCTAGAGTCTGCTGAAAAGCGGATTCAGAGACTGAAGATCGCTACACCCGTG
GAGAAATCACCGAGGTGGAGCGCTTCCAGAAGGTGATCGACACCTGGGCGAACACCAACGATGAGCT
GACCGATCGCGTGGTCAAAAACTTCCGCGAGTCCGATCCGCTCAACTCCGTCTACATGATGGCGTTC
TCGGGTGCCCGGGGAATATCTCCAGGTGCGACAGCTGGTGGGGATGCGGGGTCTGATGGCCAACC
CCCAAGGCGAGATTATTGACTTGCCGATTAAGACCAACTTCCGGGAAGGTTTACCGGTTACGGAGTA

Fases preliminares para el estudio de la activación de la transcripción dependiente del factor de transcripción cianobacteriano NtcA

CATCATCTCCTCCTACGGGGCGCGTAAGGGCCTGGTTGATACGGCTCTGCGGACGGCGGACTCGGGT
TACTTGACCCGTCTGTTGGTGGACGTTTTTCGAGGACGTGATCATTACGAAGTGGACTGCGGAACCA
GCCGGGGCCTATTTGTGGAAGCGATGACCGATGGCGATCGCATTTTGTATTCCGATTTTCGAGCGCTT
GTTGGGTTCGGGTTACGGCTGAGGCCGTGCTAGATCCAGTACGGATGAAGTGTGGCTGAAGCAGGC
CAAGACATCAATGAAGATCTGGCCAATCGAATTGAGAAAAGCAGGCATCAAAAAGGTGAAGGTGCGAT
CGCCCTGACCTGCGAAGCCGCACGATCGGTTTGCCAAAAGTGTACGGCTGGAGCCTTGCCACGC
CCAGATGGTGGACATGGGTGAAGCTGTGCGGATCATCGCAGCCAGTCGATCGGTGAGCCGGGGACC
CAGCTGACCATGCGGACCTTCCACACGGGTGGGGTATTTACGGGGAAACTGCCCGTCTGCTGCGGG
CACCTGTAGCGGGCACGATTAAGCTCGGCAAAAAGCCCGGACTCGTCCCTACCGGACCCGCCACGG
CGAGGAAGCGCTGCTGGCAGAGGCAAACCTTTGACCTCGTGTGGAAGGGAAAGGTGCGAAGGAAACC
TTCGCAATTCTGCAAGGTTGACGATTTTTTGTGCAGGACGGCGATAAAGTTCGAGCCGAAGCAATCT
TGGCCGAGGTGCCAGTCAGCGGTGCTACCAAGCGCACCCGTAGAAAAAGCCACCAAGGACGTGGCGAC
TGATTTGGCGGGTGAATTCGCTTCCAAGACATCGTTCGGAAGAGAAAACCGATCGCCAAGGCAAC
ACTACCCGTATTGCTCAGCGGGGTGGTCTGCTTTGGGTCTTGGCTGGCGATGTCTACAACCTTGCTGC
CGGGTGTGAGCCGACCGTCAAAAACGGCGATCGCGTAGAGGTGGGAGATGTCTTGGCTGAAACCAA
GCTGACCACTGAGCGCGGGTACCCTGCGCATGGGTGAGGACAACGGGAGCAGTACCCACCGGGAA
GTCGAAATCATCACGGCGTCAGTGGTACTAGATAACCGCAACGGTGAAGCCGAGGCGAGCCAAGGCC
GTGAGCACTACGTGATTGAGACCAAGGGTGGCCAGCGGTTTAACTTGTGGCAGCACCGGGAACTAA
GGTCACGACTGGCCACGTGGTGGCTGAGCTAATCGACAGCCGCTACCGGACTCAAACCGGTGGTCTG
CTCAAATACTCCGGCGTGGAAATCTCCAAAAAAGGCCGGGCTAAGGCGAAACAGGGCTACGAGGTGA
CCAAGGGCGGCACCCTGCTCTGGATTCCCGAAGAGACCCACGAGGTCAACAAGGACATCTCCTTGCT
GAACGTGCAAGACGGTCAGTTGGTGGAAAGCTGGCACGGAAGTCGTCAAAGACATCTTTTGCCAGACG
ACTGGGATTTGTTTCGGTCAACCAGAACAACGACATTTCTGCGGAAATCGTGATCAAGCCTGGAGATG
TCCACGTGTTGGATGACCCAGACACGGCGCGAAGTACGACGAAGGTGCTTGGTTAACGCCGGCGA
AGAAGTCTTCCCAGGTTTACGGCCGAACAACCTGGTCTGGGCAGAAGCCGTTGATGGTACGGACGGC
CCGCTCCTCTTGCTGCGACCGGTGCAAGAGCTAGTCATTCCTGATGAGCCGCCAGTACCGAGCCAAG
ACTCCTCGCAAGAGTCAAGCAGCCGTTTCGATTCGCTGCGTGGTCCAACGTCTGCAGTTCCAAGA
TGGTGAACGGATCAAGTCCGTTGAGGGAGTAGATCTCCTGCGGACCCAGTTAGTGCTGGAGTCTGAA
GAAGTTCCCTCCCAGCTCTCGGCTGACATTGAACTGCTGCCGGACAGCAAGGATCCTGAAACGCTGC
GCCTGCAGTTAGTAATCATTGAGCCTGTGGTGAATTCGTGCGGACGTGCTTCTGACACCACCCACGG
CAGTACGCACACCGAGTTGCGGTTAAAGATGGCCAAAAGGTGAAGCCGGGCGCCGTATTGCTTGC
ACGCAAATTCAGTGCAAGGAAGCCGGTGTGGTTTCGCGGCATTCAAGAGGGCAGCGAAGCCGTTCTGC
GCCTCTTGGTTCGAGCGGGAACGGGACTGCGTCAACCTTGACCTTGATGTCACTGCGGCAACGCAACT
CCAGCCTGGCTCGCTGATTGTGGCGGGTACCCAGTTGGTAGATGGCATCATCGCACCGGAATCCGGT
GAGGTTCTGCGATCGCACCCGGGCAACTGCAACTGCGGATTGCTCGTCCCTACCGTGTGTGCGCAGG
GTGCAGTCTGCACGTTGAAGATAAAGGTCTGGTGCAGCGGGGTGACAACCTTAGTGCTGCTCGTGT
TGAACGAGCGAAAACCTGGGGACATCATTACGGGTCTACCGCGGATTGAGGAGCTCCTCGAGGCTCGT
AAACCCAAGGAAGCCTGCATTTTGCCCGCCGTCGCGGTGTGGCGCACATCAACTACAGCGATGACG
ATGCAATCGACATCCAAGTGATTGAAGCAGACGGTACCCAAGCTGATTATCCAGTTGGTCTGGTCA
GCCGCTGATCATCAGTGACGGTGAACCCGTGGATGCAGGGCAAGCCCTGACGGATGGGCCAGCAAAC
CCCATGACTTGCTAGAAATCTACTACGACTACTTCCGCGAGCAGTTGGGCGAAGACTACGAAGCAG
CGTAGAGAGCCTGCGTCCGGTGCAAGCTCTGCTGGTGAACGAGGTGCAGTCGGTCTATCAATCCCA
AGGGATTGATATCTCCGACAAACACATCGAGGTGATCGTGCAGGATGACTTCTAAGGTGCGGATC
GACGATGGCGGCGACACGATCATGCTGCCGGGCGAATTGCACGAACTGCGAGAGGTCTACAACCTCA
ACAACACCATGGCTTTGACGGCATGGCCCCGGCTCAGTTCACACCGGTTCTGTTGGGGATTACCAA
GGCCTCACTCAACACCAACAGCTTCATCTCGGCAGCAGCTTCCAAGAGACGACACGGGTGCTCACG
GAAGCGCAATCGAAGGCAAGTCCGATTGGCTGCGCGGCTCAAGAGAACGTGATTATCGGTGCTC
TGATTCGGCGAGGACTGGTTTCAAGGCCTACGAAGAGTCCCTTGCTGACCGACGTTGATGGTGGCTA
CGAAGATCGGGTCTACGACGACGATTTGGCCGATGTGGTGAATCGATGATCGCGCCGCTCGCAGCTAC
ACCTCAATGAAGGTGCGGACTTCAGTCTGTTGATGACCTTTGCCGAAGGCGAATCGATGATTCTCG
ACGACGGTGAAGAGTTGATCGATGACAGCAGTGCCAGCCTCCGCAACCTGGTGGATGTTGACGAAGA
CTAG

>Synpcc7942_1710 DNA-directed RNA polymerase subunit omega

ATGCTCCAGCGCTTCGATCTGGATTCTCAAGATCTGCTCTTCAAAGCTGAGAGCCTGATTGTTAACT
CCACGAATCGCTATCACGTCACCTACAAATCGCCCGTCGCGCCAAGCAGGCTCGCTACGAAGAGAT

Fases preliminares para el estudio de la activación de la transcripción dependiente del factor de transcripción cianobacteriano NtcA

GGAAAACCTCAGCGAAGAACTGGCATTAAAGCCCGTGCTGCGGCCATTTTAGAAATGTCAGACGAG
CTCAATCAACCGGAGATTATCGGCGGGTGA

>Synpcc7942_0649 RNA polymerase sigma factor SigA

ATGACGCAGCTGATTTCAATCGATAAGGAGCAAGAGGAAGCCGGCATGACTCAGGCCACCGAACTAC
TCGACCCCGCGCTCAAACCGGCGGAAACAAAGGCCAAACGGAGTAGTCGCAAAAAAGCGCAACTGC
TGTGTTGAGCCCGCAACCACGATCGCTCCGACTGCAGATGTCGACGCGATCGACGACGAGGATTCC
GTTGGTGAGGATGAAGATGCGGCGGCCAAAGCCAAAGCTAAAGTCCGCAAAACCTATACAGAAGACT
CAATTCGGCTCTATCTCCAAGAGATTGGTTCGAATTCGGTTGCTGCGGGCCGATGAAGAAATTGAGCT
CGCCCGTCAAATCGCTGACTTGCTTGCTCTAGAACGCATTCGCGATGAGTTGCTCGAACAGCTCGAT
CGTTTGCCGAGCGACGCCGAGTGGGCCGCTGCTGTTGACTCGCCGCTGGATGAATTCGCGCCGCC
TGTTCCGGGGTCGCGCGCCAAGGACAAGATGGTGCAGTCGAACCTGCGGTTGGTGGTGTGATCGC
CAAGAAATACATGAACCGGGGCTGTCTCTTCCAAGACCTGATTCAGGAAGGTAGCTTGGGTCTGATT
CGGGCTGCCGAAAAGTTTGACCACGAGAAGGGCTACAAGTTCTCGACCTACGCGACTTGGTGGATTC
GCCAAGCCATCACCCGCGCGATCGCGGATCAAAGCCGCACGATCCGCCTGCCTGTTACCTCTACGA
AACCATTTCTCGCATTAAGAAAACCACCAAGCTGCTTTCTCAGGAAATGGGTGCTAAGCCACCGAG
GAAGAGATCGCCACTCGCATGGAGATGACGATCGAGAAGCTGCGGTTTATCGCTAAGTCAGCCCAGC
TGCCAAATTCGCTGGAAACCCCAATCGGTAAAGAAGAAGACTCGCGTCTGGGTGACTTCATCGAAGC
TGATGGCGAAACCCCGAAGATGAAGTCGCAAAAAACCTGCTGCGCGAAGACCTTGAAGGCGTCTTT
AGCACTCTCAGCCCCGCGAGCGCGATGTGCTGCGCCTGCGCTATGGCTTGGATGACGGCCGATGA
AAACGCTGGAAGAAATCGGCCAGTTGTTTAAATGTCAACCGCGAACGCATCCGCCAGATCGAGGCGAA
AGCACTGCGGAAACTGCGTCAATCCAACCGCAACAGCATCCTGAAAGAGTACATCCGCTAG

>Synpcc7942_1746 group2 RNA polymerase sigma factor SigB

ATGTCTACCTCCTCCGCTCAATACAGTCCTGATTTAGTCCGTGCTTACCTGCAAGAAATTGGCCGGG
TGCGGCTGCTGACCGCTGAAGAAGAGTTGTGCTTTGGCCGACAGGTTAGCGCCTGATGATGCTCTT
GGATGCTCAAACCGAGCTGCGCGATCGCTTGGGGCATGAGCCTAGCAAAGAAGAAATGGGCTGCTGCT
GTTGACCTGAATCTCGAAGATCTCGATCGCCAAATTGACAAGGTCAGCGGGCGAAACGCAAAATGAT
TGAGGCCAACCTGCGCCTCGTTGTTTCGATCGCCAAGAAAATACCAGAAGCGTCACATGGAATTCTTG
GATCTCATCCAAGAAGGCACACTGGGGCTGGAGCGTGGTGTGCAAAAATTCGATCCCCTCAAAGGCT
ACAAGTTCTCTACCTATGCCTACTGGTGGATTGCGCAAGCTATTACCCGTGCGATCGCCCAACAATC
CCGCACGATTGCTCTGCCTATTCACATCACTGAAAAGCTGAACAAGCTCAAAAAAACCCAGCGCGAA
CTCTCGCAGCAATTGGGCCGAGTGCCACAGCTTCAGAGCTGGCAGAAGTGTGGAGCTGCCACTGG
AGCAGGTGCGGGAATACATCCAAATGAACCGCCAGCCAGTATCGCTCGATGTCAAAGTAGGTGACAG
CCAAGACACTGAATTGCAGGAACGCTGGAAGACGAGCAGTCTTCGCCCTCAGATTACGTGGAACAA
GAATCGCTACGCCGCGATCTACGCAATTTAATGGCAGAAGTACCCCCAGCAACAGGCCGTGATTG
CCCTGCGCTACGGCTTGGATGAAGGTGACAGTCTGTGTTGGCCAAAGTCGGCGAACGCCTGAATAT
CAGCCGCAACGCGTGGGAAACTAGAGCGCAAGCCATGGATCACCTACGTGCGCCGAGTCTGCTT
CTGGCGGAATACGCAGCTAGCTAG

>Synpcc7942_1849 RNA polymerase sigma factor SigC

ATGACGGCTGCCTATTTCACTCATTCCACGGAATACGAAGCAGTTTTCGTCTGACGTCGCTAACTTGT
CAGAAACTCCAAGTTCTGAAGCCGTGGAACAGCGGTCTCTAGCCGCCAGTCAACCGATCTGATTTCG
GCTGTATTTACAAGACATCGGGCGAGTCCGTCTCCTTGGGCGCGATGAAGAGGTGAGTGAGGCACGG
TGGGTGACGCGCTACATGCAGTTGTTGGCGGTTCCGAATTCGCTCCCGTTGAAGAAGGAGGGTTCT
CAAGGATTACGTTGACCTGCAGGAAGGCCGCGATCGCCTGACCGCGCAGCTGGGTCACCGTCTTCC
TTTGAAGCTTGGGCCAAGATTGTGATGTTTCTTACTGAATTACGCCAAGCACTACAACCTGGGGC
TGCATCGCTGGGCTGAAGTCTGCCAGCTCGATCTTGAGGAATTAAGCAGGTCTGCAAAGAAGGCCA
GCGAGCTAAAGATCACATGATCAAGGCCAACCTCCGTTTAGTTGTTTTCCGTCGCTAAAAAATATCAA
AACCGAGGACTAGAGCTTCTCGATCTCGTTCAAGAAGGCACCCTAGGACTAGAGCGGGCTGTTGAGA
AGTTGACCCGACGAAAGGCTATCGATTTAGTACCTATGCCTATTGGTGGATTGCTCAGGGAATTAC
CCGCGCGATCGCAACCCAAAGTCGGACGATTGCTTGGCCGTCATGTGACGGAGAAATTAACCGG
ATCAAAAAAGCCCAGCGCAAAATTCGCAAAACAAAGGGCAGAAGTGCACCTTGGAGGAGATTGCTC
AAGAACTTGAGATGACCCCCGATCAAGTGCGGGAAGTCTGTTGCGGGTGGCCAAATCGATTTCCCT
AGAAACCCGTGTTGGCAAGGAAAAGGATACGGAGCTAGGGGATTTGCTGGAACACCGATTTACC

CCAGAAGAACGATTGACTCAGGAATCCCTCAGCAATGATCTGCAGCGGTTATTGCTCGAACTCAATC
ACCGCGAACGCGATGTAATTCGGATGCGGTTTGGTCTGCGCGATGGGCAGATTTATCCCTCGCTGA
AATTGGGCAAGTGTCTCGACCTATCGCGTGAGCGAGTTCGCCAGATTGAGGCTAAGGCCCTGCAAAAG
CTGCGGCATCCGCGACGACGCAATCAGATCCGTGACTATTTGGAGTTGTTGCACTAG

8.2: Cebadores utilizados.

Tabla 19: Cebadores utilizados durante el Proyecto.

Nombre	Secuencia	Longitud (nt)	% CG
PQTEV3U	TATAAAAATAGGCGTATCACGAGG	24	37,5
PQTEV3L	CCAGTGATTTTTTTCTCCATTTT	23	30,5
RpoC2mut_F	CAACGACATTCTGCGGGAAATCGTGA TCAAGCCTGGAGATGTCCACGTGTTG G	52	53,8
RpoC2mut_R	TTCTGGGTGACCGAAACAATCCCAGT CGTCTGGCAAAGATGTCTTTGACGA	52	51,9
PIG1	TGGGCTTCATTAAGCTGG	18	44,4
PIB3	AGCCGCTACCGGACTCAAAC	20	60

8.3: Secuenciación y gen artificial.

En rojo se muestra región correspondiente a la mutación (inserción) del gen rpoC2 obtenida tras la realización de la estrategia de mutagénesis.

Rpoc2_Colonia_PIB3

GGTGGAAATCTCCAAAAAGGCCGGGCTAAGGCGAAAAACAGGGCTACGAGGTGACCAAGGGCGGCAC
CCTGCTCTGGATTCCCGAAGAGACCCACGAGGTCAACAAGGACATCTCCTTGCTGAACGTCGAAGAC
GGTCAGTTGGTGAAGCTGGCAGCGAAGTTCGTCAAAGACATCTTTTGCCAGACGACTGGGATTGTTT
CGGTCACCCAGAACAACGACATTCAGCGGGAAA**TCGTGATCAAGCCTGGAGATGTCCACGTGCAACG**
ACATTCTGCGGGAAATTCGTGATCAAGCCTGGAGATGTCCACGTGTTGGATGACCCAGACACGGCGGC
GAAGTACGACGAAGGTTCGCTTGGTTAACGCCGGCGAAGAAGTCTTCCAGGTTTGACGGCCGAACAA
CTGGTCTGGGCGAAGCCGTTGATGGTACGGACGGCCCGCTCCTCTTGCTGCGACCGGTGCAAGAGC
TAGTCATTCCTGATGAGCCGCCAGTACCGAGCCAAGACTCCTCGCAAGAGTCAAGCAGCCGTTTCGAT
TCGCCTGCGTGCGGTCCAACGTCTGCAGTTCCAAGATGGTGAACGGATCAAGTCCGTTGAGGGAGTA
GATCTCCTGCGGACCCAGTTAGTGTGGAGTCTGAAGAAGGTTCTCCAGCTCTCGACTGACATTG
AACTGCTGCCGACAGCAAGGATCCTGAAACGCTGCGCCTGCAGTTAGTAATCATTGAGCCTGTGGT
GATTCGTGCGGACGTCGCTTCTGACACCACCCACGGCAGTACGCACACCGAGTTGCGCGTTAAAGAT
GGCCAAAAGGTGAAGCCGGGCGCCGTCATTGCTTGCACGCAAATTCAGTGCAAGGAAGCCGGTGTGG
TTCGCGGCATTCAGAGGGCAGCGAAGCGGTTTCGTGCGCTTGGTTCGAGCGGGAACGGGACTGCGT
CACCTTGACCTTGATGTCACTGC

En rojo se muestra la región correspondiente a la secuencia del gen gen rpoZ (ω).

Clonación_Rpoz+RpoC2_3U

CACCATTTGTCGAGAAATCATAAAAAATTTATTTGCTTTGTGAGCGGATAACAATTATAATAGATTC
AATTGTGAGCGGATAACAATTCACACAGAATTCATTAAAGAGGAGAAATTAATACTATGGGATCC**ATG**
CTCCAGCGCTTCGATCTGGATTCTCAAGATCTGCTCTTCAAAGCTGAGAGCCTGATTGTTAACTCCA

CGAATCGCTATCACGTCACCTACAAATCGCCCGTCGCGCCAAGCAGGCTCGCTACGAAGAGATGGA
AAACCTCAGCGAAGAAACTGGCATTAAAGCCCGTGTGCGCGCCATTTTAGAAATGTCAGACGAGCTC
AATCAACCGGAGATTATCGGCGGGTGAAGCTTAATTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCC
AGTAATGACCTCAGAACTCCATCTGGATTTGTTTCAGAACGCTCGGTTGCCGCCGGCGTTTTTTTTATT
GGTGAGAATCCAAGTAACAACACCATTTGTGAGAAAATCATAAAAAATTTATTTGCTTTGTGAGCGG
ATAACAATTATAATAGATTCAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGAATTCATTAAGAGGAGA
AATTAACATATGTCCCCTATACTAGGTTATTGGAAAATTAAGGGCCTTGTGCAACCCACTCGACTTCT
TTTGGAATATCTTGAAGAAAAATATGAAGAGCATTGTATGAGCGCGATGAAGGTGATAAATGGCGA
AACAAAAAGTTTGAATTGGGTTTGGAGTTTCCAATCTTCTTATTATATTGATGGTGTATGTTAAAT
TAACACAGTCTATGGCCATCATACGTTATATAGCTGACAAGCACAACATGTTGGGGTGGTTGTCCAA
AAGAGCGTGCAGAGATTTCAATGCTTGAAGGAGCGGGTTTTGGATATTAGATACGGTGTTCGAGA
AATTGCATATAGTAAAGACTTT

Al haber utilizado un cebador interno toda la secuencia obtenida corresponde al gen rpoC1 (γ).

Clonación_Rpoz+RpoC2_PIG1

GGCATCCCGAGCTACATCGCGATTCTGCTCGACATGCCCTGCGAGACGTTGAGCAAATCGTCTATT
TCAACTCCTACGTCGTCTCAACCCAGGCAACCACAGCGAGCTGCAGTACAAGCAGCTACTGAACGA
AGACCAGTGGATGGAGATCGAGGACCAAATCTACGCTGAGGAATCTGACCTCGAAGGTATTGAGGTT
GGCATCGGTGCAGAAGCCCTGCAACAGTTGCTGCAGGATTTGAACCTCAATGAAGAGTCGGAAAAAC
TCCGTCAAGAGATTGCTGAGTCAAGGGCCAAAAACGGGCCAAGTTAATCAAACGCCCTGCGTGTGAT
TGATAACTTCATTGGCACAGAGTCTCGGCCCGAGTGGATGGTGTGAATGTCATCCCGGTGATCCCT
CCCGATCTCCGCCCGATGGTGCAGTTGGATGGTGGCCGCTTTGCCACCAGTGACCTCAACGATCTCT
ACCGTCGGGTGATCAACCGGAATAACCGGTTAGCGCGTCTGCAGGAGATTCTCGCACCTGAGATTAT
CGTCCGTAACGAAAAACGGATGTTGCAGGAAGCAGTAGACGCTCTGATCGACAACGGTCGTGCGTGGC
CGTACGGTTCGTGCGGTGCCAACACCCGACCCCTCAAGTCCCTCTCGGACATCATCGAAGGGAAACAGG
GTCGCTTCCGGCAAAACTTGTGGGTAAACGGGTTGATTACTCCGGTTCGGTTCGGTTCATCGTGGTGC
GCCCCAACCTGAAAATTCACCAGTGTGGTCTGCCACGGGAAATGGCGATCGAGCTGTTCCAGCCGTT
TGTTATCCATCGCCTGATCAAAAATCACAGGCATCAACAACATCAAGCAGGCCAAAAAACTCATTC
AGAAGAACGATCCCTTGATTTGGGGATGTCTTGGAAAGAGGTGATTG

Clonación_Rpoz+RpoC2+RpoD1_PIG1

ATCCCGAGCTACATCGCGATTCTGCTCGACATGCCCTGCGAGACGTTGAGCAAATCGTCTATTTCA
ACTCCTACGTCGTCTCAACCCAGGCAACCACAGCGAGCTGCAGTACAAGCAGCTACTGAACGAAGA
CCAGTGGATGGAGATCGAGGACCAAATCTACGCTGAGGAATCTGACCTCGAAGGTATTGAGGTTGGC
ATCGGTGCAGAAGCCCTGCAACAGTTGCTGCAGGATTTGAACCTCAATGAAGAGTCGGAAAAACTCC
GTCAAGAGATTGCTGAGTCAAGGGCCAAAAACGGGCCAAGTTAATCAAACGCCCTGCGTGTGATTGA
TAACTTCATTGGCACAGAGTCTCGGCCCGAGTGGATGGTGTGAATGTCATCCCGGTGATCCCTCCC
GATCTCCGCCCGATGGTGCAGTTGGATGGTGGCCGCTTTGCCACCAGTGACCTCAACGATCTCTACC
GTCGGGTGATCAACCGGAATAACCGGTTAGCGCGTCTGCAGGAGATTCTCGCACCTGAGATTATCGT
CCGTAACGAAAAACGGATGTTGCAGGAAGCAGTAGACGCTCTGATCGACAACGGTCGTGCGTGGCCGT
ACGGTTCGTGCGGTGCCAACACCCGACCCCTCAAGTCCCTCTCGGACATCATCGAAGGGAAACAGGGTC
GCTTCCGGCAAAACTTGTGGGTAAACGGGTTGATTACTCCGGTTCGGTTCGGTTCATCGTTCGTGGCCC
CAACCTGAAAATTCACCAGTGTGGTCTGCCACGGGAAATGGCGATCGAGCTGTTCCAGCCGTTTGT
ATCCATCGCCTGATCAAAAATCACAGCATCAACAACATCAAGCAGGCCAAAAAACTCATTCAGAAGA
ACGATCCCTTGATTTGGGATGTCTTGGAAAGGAGGTGATTGAAGGGCCACCCCTGTGATGCTGAACCG
GGCCCCGACGGCTGCACCGTTTTGGGGATTCAGGCCTTTGAAACCGATCTTGGGTAGAAAGGC
CGTGCG

En rojo se muestra el sitio de corte de la enzima de restricción BbvCI y en naranja el sitio de corte de la enzima de restricción NgoMIV.

Gen_artificial_RpoC2

Fases preliminares para el estudio de la activación de la transcripción dependiente del factor de transcripción cianobacteriano NtcA

GCTGAGGCCGTGCTAGATCCCAGTACGGATGAAGTGCTGGCTGAAGCAGGCCAAGACATCAATGAAG
ATCTGGCCAATCGAATTGAGAAAGCAGGCATCAAAAAGGTGAAGGTGCGATCGCCCCTGACCTGCGA
AGCCGCACGATCGGTTTGCCAAAAGTGCTACGGCTGGAGCCTTGCCACGCCCAGATGGTGGACATG
GGTGAAGCTGTCGGGATCATCGCAGCCCAGTCGATCGGTGAGCCGGGGACCCAGCTGACCATGCGGA
CCTTCCACACGGGTGGGGTATTTACGGGGGAAACTGCCCGTCTGCTGCGGGCACCTGTAGCGGGCAC
GATTAAGCTCGGCAAAAAGCCCGACTCGTCCCTACCGGACCCGCCACGGCGAGGAAGCGCTGCTG
GCAGAGGCAAACCTTTGACCTCGTGCTGGAAGGGAAAGGTCGGAAGGAAACCTTCGCAATTCTGCAAG
GTTCGACGATTTTTGTGCAGGACGGCGATAAAGTCGCAGCCGAAGCAATCTTGGCCGAGGTGCCAGT
CAGCGGTCTGACCAAGCGCACCGTAGAAAAAGCCACCAAGGACGTGGCGACTGATTTGGCGGGTGAA
ATTCGCTTCCAAGACATCGTTCCGGAAGAGAAAACCGATCGCCAAGGCAACACTACCCGTATTGCTC
AGCGGGTGGTCTGCTTTGGGTCTTGGCTGGCGATGTCTACAACCTTGCTGCCGGGTGCTGAGCCGAC
CGTCAAAAACGGCGATCGCGTAGAGGTGGGAGATGTCTTGGCTGAAACCAAGCTGACCACTGAGCGC
GGCGGTACCGTGCGCATGGGTGAGGACAACGGGAGCAGTACCCACCGGGAAGTCGAAATCATCACGG
CGTCAGTGGTACTAGATAACCGCAACGGTGAAAGCCGAGGCGAGCCAAGGCCGTGAGCACTACGTGAT
TGAGACCAAGGGTGGCCAGCGGTTTAACTTGTTGGCAGCACCGGGAACCTAAGGTCACGACTGGCCAC
GTGGTGGCTGAGCTAATCGACAGCCGCTACCGGACTCAAACCGGTGGTCTGCTCAAATACTCCGGCG
TGGAATCTCCAAAAAGGCCGGGCTAAGGCGAAACAGGGCTACGAGGTGACCAAGGGCGGCACCCT
GCTCTGGATTCCCGAAGAGACCCACGAGGTCAACAAGGACATCTCCTTGCTGAACGTCGAAGACGGT
CAGTTGGTGAAGCTGGCACGGAAGTCGTCAAAGACATCTTTTGCCAGACGACTGGGATTGTTTCGG
TCACCCAGAACAACGACATCTGCGGGAAATCGTGATCAAGCCTGGAGATGTCCACGTGTTGGATGA
CCCAGACACGGCGGCGAAGTACGACGAAGGTCGCTTGGTTAACGCCGGC