

## Secuencias reguladoras de la transcripción en procariontas

Marta Fabiana Gorriti<sup>1</sup>. Julio Ricardo Moreno<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Microbiología, Instituto de Biología.

Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Rio de Janeiro, Brasil

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias Naturales e IML, Universidad Nacional de Tucumán.

Miguel Lillo 205-4000. San Miguel de Tucumán. Argentina.

[marta\\_gorriti@hotmail.com](mailto:marta_gorriti@hotmail.com) [julio\\_m@live.com.ar](mailto:julio_m@live.com.ar)

**Resumen:** se estudiarán diferentes secuencias de ADN involucradas en el inicio de la transcripción, y se tendrán en cuenta las diversas metodologías de determinación de secuencias promotoras.

**Palabras clave:** Secuencia promotora. Holoenzima ARNP. Activador. Represor. Factor sigma. Autoinhibición. Polilinker.

### INTRODUCCIÓN

El promotor es una secuencia específica del ADN a la cual se une la holoenzima ARN Polimerasa (ARNP) para iniciar la transcripción. Los promotores están localizados en las regiones previas a la de los genes.

Las bases que aparecen con más frecuencia formando parte de la secuencia del promotor conforman lo que se conoce como secuencia consenso.

Un elevado número de promotores en *E. coli* reconocidos por el factor  $\sigma^{70}$  no son idénticos, sin embargo, presentan dos secuencias altamente conservadas dentro del promotor. Una está 10 bases antes del inicio de la transcripción, es decir, la región -10 (llamada secuencia o caja Pribnow). Cuando se comparan las regiones -10 de todos los promotores para determinar qué base aparece con más frecuencia se llega a la secuencia consenso **TATAAT**. La segunda secuencia conservada está a 35 bases de inicio de la transcripción. La secuencia consenso para -35 es **TTGACA**. La distancia entre cada hexámero es de 15 a 21 pb, con una frecuencia mayor de 17 pb.

En años más recientes se descubrió una secuencia rica en A+T que se halla aproximadamente 4 bases arriba del hexámero -35 en el promotor ribosomal *rrBp1* a la cual se la llamó **elemento UP**. Ésta es reconocida por la subunidad  $\alpha$  de la ARNP y le confiere al promotor una mayor fuerza de adhesión. El elemento UP se ha detectado en muchos otros promotores, incluso de *Bacillus subtilis* (Fig. 1).

También se demostró la existencia de una secuencia denominada **caja -10 extendida** conformada por un 5'-TG-3' conservado una base arriba de la secuencia -10. Su presencia hace que la secuencia -35 no sea imprescindible para la transcripción. Se ha reportado su existencia en el 30% de promotores de *E. coli* y en el 50% de bacterias Gram positivas (HUERTA, 2004).

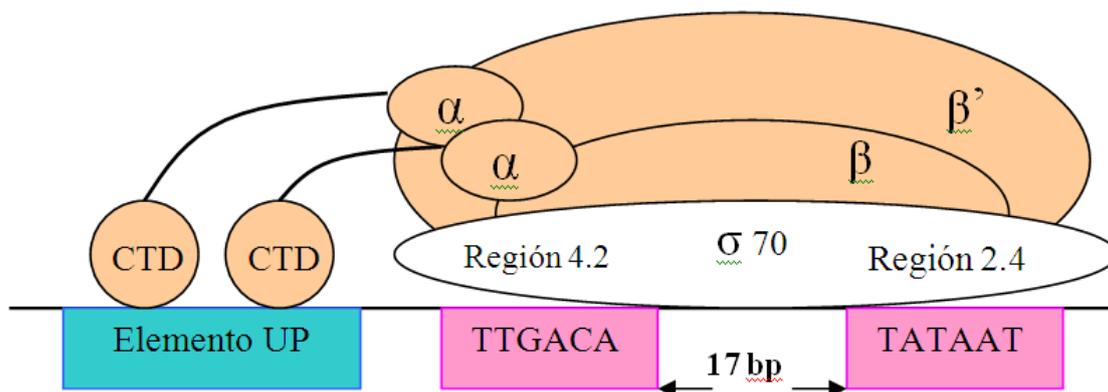


Figura 1. Diagrama del promotor reconocido por  $\sigma^{70}$  de *E. coli*. TTGACA corresponde a la secuencia -35, TATAAT es la secuencia -10, el elemento UP es la secuencia caracterizada en promotores ribosomales reconocida por la subunidad  $\alpha$ . Las regiones 4.2 y 2.4 del factor sigma reconocen la caja -35 y -10 respectivamente.  $\beta$  y  $\beta'$  subunidades de la ARNP (Huerta, 2004).

En ocasiones, los genes dependientes de un activador para su expresión tienen el hexámero -35 muy débil (alejado de la secuencia consenso). Esto y el hecho de que sea indispensable debido al motivo TG hacen de la región -35 muy heterogénea.

La secuencia -10 se encuentra más conservada que la secuencia -35. Una caja -35 muy alejada de la secuencia consenso sugiere que hay un elemento adicional que ayuda al pegado de la ARNP después de que ésta reconoce a la caja -10. Este puede ser un sitio de unión para una proteína reguladora, un elemento UP o una caja -10 extendida.

Por lo general el promotor que interacciona muy fuerte con la ARNP es regulado negativamente por un represor que se une al ADN. En algunos casos se han encontrado promotores que tienen una caja -10 muy conservada y también está regulado negativamente pero se sugiere que hay algún tipo de regulación positiva no reportado porque los sitios adicionales de pegado vistos no se observan.

Diferentes combinaciones de estos elementos pueden darse y definir un promotor funcional (Huerta, 2004). Aquellos promotores que se parecen a las secuencias consenso unen la ARN polimerasa más efectivamente que otros y se dice que son **promotores fuertes**, esto es de considerable interés en ingeniería genética (MADIGAN *et al.*, 1997). Un promotor que es reprimido debería tener regiones -35 y -10 fuertes para que en ausencia del represor el gen se exprese de manera constitutiva, de no ser estas secuencias cercanas al consenso entonces se pensaría que hay un mecanismo adicional que

intervenga en la transcripción en ausencia del represor. En la figura 2 se muestran algunos casos posibles de un promotor dependiente de  $\sigma^{70}$ .

**Promotor fuerte: Elemento UP, caja -35, caja-10**

**Promotor canónico: caja -35, caja -10**

**Promotor -10 extendida: Elemento TG, caja -10**

**Promotor clase II: Sitio activador, caja -10**

**Promotor clase I: Sitio activador, elemento UP, caja -  
35, caja -10**

Figura 2. Reglas generales de los elementos que pueden componer un promotor  $\sigma^{70}$ .

#### TIPOS DE FACTORES SIGMA

El factor sigma media el reconocimiento y unión de la ARNP a la secuencia promotora. También está implicado en la separación de las cadenas de ADN del promotor, en el control temprano de la transcripción y es el blanco de activadores. Un único microorganismo puede tener diversos factores sigma que dan origen a ARNPs con diferentes propiedades capaces de reconocer distintas secuencias promotoras variando la respuesta del microorganismo frente a diferentes necesidades fisiológicas (Buck *et al.*, 2000).

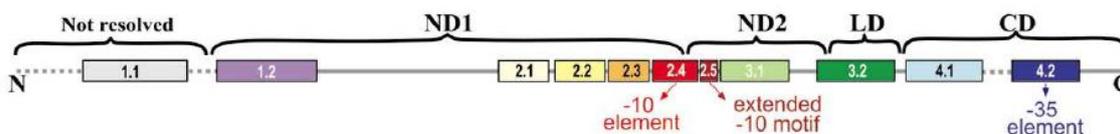
Los factores sigma se dividen en dos clases basándose en diferencias funcionales y estructurales. La primera clase reconoce promotores y forma complejos abiertos transcripcionalmente competentes en ausencia de otros factores o fuentes de energía. A esta familia, llamada sigma 70 ( $\sigma^{70}$ ), pertenecen la mayoría de los factores sigma involucrados en la expresión de genes durante el crecimiento exponencial. La segunda familia con un único miembro, sigma 54 ( $\sigma^{54}$ ), forma la holoenzima ARNP que reconoce promotores pero requiere factores proteínicos adicionales (enhancer) y una fuente de energía en forma de ATP o GTP para la formación del complejo abierto transcripcionalmente competente (BORUKHOV *et al.*, 2002).

En la Tabla 1 se describen diferentes factores sigma y las respectivas secuencias consenso de promotores que éstos reconocen. Las proteínas de la clase  $\sigma^{70}$  (por  $\sigma^{70}$  de *E. coli*) participan en la transcripción de la mayoría de los genes que componen un genoma y se las conoce como sigma endógeno, primario o "house-keeping".

Factor sigma	gen	Función	Región -35	Región -10
$\sigma^{70}$	rpoD	Transcripción de genes house-keeping.	TTGACA	TATAAT
$\sigma^{32}$	rpoA	Transcripción de genes de shock térmico.	TCTCNCCCTTG AA	CCCATNTA
$\sigma^{s(38)}$	rpoS	Transcripción de genes en células en fase estacionaria.	No muy conservada	TATACT
$\sigma^{F(28)}$	rpoF	Expresión de operones flagelares.	CTAAA	CCGATAT
$\sigma^E$	rpoE	Involucrado en respuesta a estrés oxidativo y shock térmico. Regula la expresión de proteínas extracitoplasmáticas.	GgAACTttt + TTTTTT 10 bp río arriba	ggTCaaA
$\sigma^{54}$	rpoN (ntrA, glnF)	Transcripción de genes regulados por nitrógeno.	Región -24 CTGGNA	Región -12 TTGCA

**Tabla 1. Principales característica de las subunidades que forman la ARNP de *E. coli*.**

Múltiples alineamientos de secuencias de las proteínas de la familia  $\sigma^{70}$  revelan cuatro regiones conservadas, a las que se le asignó números de 1 a 4. Éstas a su vez pueden ser subdivididas. Datos estructurales demuestran que las proteínas de la familia  $\sigma^{70}$  consisten de al menos tres dominios  $\alpha$ -helicoidales que están conectados uno con el otro por uniones muy flexibles. Tal organización estructural permite múltiples conformaciones de sigma. Las diferentes propiedades bioquímicas de sigma en estado libre y en el contexto de holoenzima ARNP son debidas a los cambios en las posiciones relativas de los dominios estructurales. Las regiones evolutivamente conservadas se encuentran en estos dominios. En la figura 3 se muestran las regiones conservadas y el modelo de  $\sigma^A$  de *Thermus thermophilus*.



**Figura 3. Secuencia de aminoácidos conservada y estructura de factores sigma del tipo  $\sigma^{70}$ . A) Representación de los dominios estructurales de  $\sigma$  y regiones conservadas. Las regiones conservadas están representadas por cajas numeradas y coloreadas. B) Diagrama de cinta de  $\sigma^A$  de *T. thermophilus*. El color es como en (A). El sitio activo de la ARNP coincide con la posición del ión  $Mg^{++}$  (Modificado de BORUKHOV *et al.*, 2002).**

La región N-terminal (amino-terminal) 1.1 está presente en algunos factores sigma y es desordenada o móvil tanto en sigma libre como en la holoenzima ARNP. Las regiones 1.2 (lila), 2.1 (amarillo claro), 2.2 (amarillo), 2.3 (naranja) y 2.4 (rojo) conjuntamente forman un único dominio estructural, el dominio N-terminal 1 o ND1. El tamaño de este dominio varía en los diferentes factores sigma debido a la presencia de secuencias evolutivamente variables entre las regiones 1.2 y 2.1 (gris). Sin embargo, fragmentos proteolíticos libres de los rasgos estructurales formados por las regiones evolutivamente

conservadas, 1.2, 2.1, 2.2, 2.3 y 2.4, de  $\sigma^{70}$  de *E. coli* y  $\sigma^A$  de *T. aquaticus*, y  $\sigma^A$  de *T. aquaticus* y *T. thermophilus* unidos a su núcleo de ARNP, son virtualmente idénticos. Las regiones 2.5 (rojo oscuro) y 3.1 (verde claro) forman un pequeño dominio independiente, ND2, que está conectado a ND1 por un fragmento corto flexible. La región 3.2 (verde oscuro) forma un dominio de unión largo, LD. Este dominio es inestructurado y sensible a proteólisis en sigma libre pero es estable en la estructura holoenzima. El dominio estructural C-terminal (carboxi-terminal), CD, está formado por las regiones 4.1 (azul claro) y 4.2 (azul oscuro).

Aunque la subunidad  $\sigma$  es claramente responsable del reconocimiento del promotor por la holoenzima ARNP, múltiples cambios parecen tener lugar dentro de estas proteínas para asegurar que las subunidades  $\sigma$  en estado libre no se unan y ocluyan el promotor. Por ejemplo, cada una de las tres regiones conservadas (2.4, 2.5, 4.2) con capacidad de unión al ADN solo es capaz de unirse débilmente con su respectivo elemento de ADN. Ninguna de estas interacciones individuales es suficiente para la formación del complejo con el promotor. Además en  $\sigma$  libre la distancia entre los dominios de unión al ADN es inapropiada (mucho más corta que la distancia entre -10 y -35) para la interacción simultánea con sus respectivos elementos de promotor. Después de la formación de la holoenzima se induce un cambio conformacional en las regiones 2 y 4, lo que hace posible la interacción simultánea entre los dominios de  $\sigma$  y su promotor. Por último, una o más interacciones autoinhibitorias previenen el reconocimiento del promotor por sigma libre. La autoinhibición es removida con la formación de la holoenzima.

Datos genéticos, bioquímicos y estructurales demuestran que la región conservada de aminoácidos 4.2 del factor  $\sigma^{70}$  reconoce la secuencia consenso -35. La región 4.2 tiene una conformación de hélice-giro-hélice característica de las proteínas bacterianas que se unen a ADN y se une al elemento -35 por interacciones específicas en el surco mayor. Varios reguladores bacterianos afectan la eficiencia de la transcripción por interacción con la región 4.2, ya sea aumentando (activadores) o mermando (represores) la interacción entre esta región y la secuencia -35 del promotor.

Datos genéticos, bioquímicos y estructurales demuestran que la región conservada 2.4 de sigma reconoce la secuencia consenso -10 del promotor. Aislamientos de subunidades y de fragmentos de sigma conteniendo la región 2 reconocen débilmente la doble cadena de ADN con la secuencia -10. Sin embargo, en presencia del núcleo de la enzima son capaces de unirse específicamente a la cadena "no molde" del ADN. La interacción primaria entre  $\sigma$  y el núcleo de la ARNP ocurre a través de un contacto fuerte entre las regiones sigma 1.2 y 2.2 y el elemento evolutivamente conservado tipo espiral enrollado (coiled-coil) de la subunidad  $\beta'$ . La interacción entre sigma y el espiral enrollado  $\beta'$  remueve una interacción autoinhibitoria que interfiere con el reconocimiento específico de la secuencia -10 por  $\sigma$  libre. La naturaleza de esta interacción es desconocida. Pero se sabe que un péptido correspondiente a la regiones 2.1 y 2.2 de sigma inhibe la formación de la holoenzima. Por otra parte, un péptido correspondiente

al espiral enrollado  $\beta'$ , induce el reconocimiento eficiente de la simple cadena de la secuencia  $-10$  del promotor por  $\sigma^{70}$  o sus fragmentos conteniendo la región 2.

Otros estudios demuestran que la región 2.5 de sigma interacciona específicamente con el motivo 'TG' de la caja  $-10$  extendida. La región 2.5 de diferentes factores sigma puede reconocer diferentes extensiones  $-10$  y así contribuir a la especificidad de reconocimiento de promotor.

Es clara la contribución de sigma en la estabilidad del complejo abierto a través de interacciones con el elemento  $-10$  en forma de simple cadena, pero no es claro el rol de sigma en la separación del ADN. La región 2.3 tiene varios residuos aromáticos conservados que pueden participar en la separación de nucleótidos. Sin embargo, la propagación de ese complejo abierto desde el sitio de inicio de la transcripción parece no involucrar a sigma y puede ser gatillado por establecimiento de contacto entre ADN río abajo del sitio de inicio de la transcripción y el núcleo de la ARNP.

La region 1.1 también contribuye a aumentar la eficiencia de utilización del promotor por la holoenzima. La región 1.1 se considera responsable de autoinhibir el reconocimiento del promotor por sigma libre. Una mutación de  $\sigma^{70}$  sin la región 1.1 es capaz de unirse a la secuencia  $-35$  del promotor, mientras que  $\sigma^{70}$  original no tiene esa capacidad. Análisis biofísicos indican, sin embargo, que la región 1.1 no interacciona con la región 4 en sigma libre y la inhibición de unión al ADN puede ser una consecuencia indirecta de la elevada carga negativa de la región 1.1. Otros datos indican que la región 1.1 en la holoenzima ocluye parte del canal donde la doble cadena de ADN río abajo del sitio de inicio de la transcripción es propensa a unirse. Datos biofísicos indican que la posición 1.1 cambia con la interacción de la holoenzima con el promotor. Se propuso que la interacción de la región 1.1 de  $\sigma$ -ARNP modula la eficiencia de la formación del complejo promotor, pero no está bien dilucidada cual es la función exacta de este dominio de  $\sigma$ .

El mecanismo de cambio de conformación de sigma involucra interacciones proteína-proteína entre un elemento flexible del núcleo de la polimerasa, el dominio flap de la subunidad  $\beta$  y la región 4 de sigma. La interacción de  $\beta$  flap con la región 4 de sigma hace que la posición relativa de flap en la ARNP difiera de su posición el núcleo de la enzima, se sugiere que la interacción dispara el movimiento de flap incrementando la distancia interdominio entre las regiones 2 y 4 de  $\sigma$ . Cuando se remueve flap por mutación, la holoenzima ARNP es capaz de formarse pero la distancia entre las regiones 2 y 4 de sigma sigue siendo corta. Por lo tanto  $\beta$  flap es necesario para el reconocimiento de promotores  $-10/-35$ .

$\beta$  flap hace que estrictamente se requiera una distancia de aproximadamente 17 pb entre las secuencias consenso. Por consiguiente, es posible que factores que afecten el movimiento de  $\beta$  flap permitan el reconocimiento de promotores con distancias subóptimas.

Considerando el caso de dos factores de *E. coli*,  $\sigma^{70}$  y  $\sigma^s$ , sus respectivas holoenzimas tienen funciones fisiológicas diferentes. La holoenzima  $\sigma^s$  es la responsable de la transcripción de genes necesarios para la supervivencia en fase estacionaria. En el contexto de holoenzima ARNP, los factores  $\sigma^{70}$  y  $\sigma^s$  reconocen la misma secuencia consenso pero presentan diferentes afinidades por el promotor *in vivo* e *in vitro*. La holoenzima  $\sigma^s$  parece ser más tolerante a desviaciones del consenso -35 y a las condiciones de reacción que debilitan la interacción ARNP-promotor, tales como elevadas concentraciones de sal. Las razones de esto se desconoce. La interacción de  $\sigma^s$  con  $\beta$  flap es mucho más fuerte que la interacción  $\sigma^{70}$ - $\beta$  flap. Por lo cual es atractivo especular que la interacción fuerte con  $\beta$  flap (y como consecuencia su cambio de orientación) posiciona firmemente la región 4 de  $\sigma^s$  en la vecindad de la secuencia -35 del promotor y permite que se establezca el contacto entre la región 4.2 y la secuencia subóptima -35 (BORUKHOV *et al.*, 2002).

Factor  $\sigma^s$ : Al comparar la secuencia de aminoácidos de  $\sigma^s$  con otros factores sigma se determinó que  $\sigma^s$  es el más cercano a  $\sigma^{70}$  en *E. coli*. A diferencia de los factores sigma alternativos, los factores sigma primarios o vegetativos contienen la caja RpoD, un motivo altamente conservado en las regiones 2.3 y 2.4, así como también motivos característicos de 14 y 20 aminoácidos en las regiones 2.4 y 4.2 respectivamente. Con algunos cambios, todas estas secuencias conservadas están también presentes en  $\sigma^s$  por lo que fue clasificado como un factor sigma no esencial con una elevada homología a los factores sigma primarios. Sin embargo, si bien  $\sigma^s$  es no esencial para el crecimiento en laboratorio, es esencial para la supervivencia en presencia de escasez de nutrientes, condición que prevalece en la naturaleza.

Cuando un nutriente esencial está totalmente ausente en el medioambiente, la célula entra en fase estacionaria. En contraste a la respuesta específica, la naturaleza de la respuesta en fase estacionaria no parece depender del nutriente ausente, sería una respuesta pleiotrópica donde las proteínas inducidas durante esta fase están involucradas en la resistencia a estrés por lo que las células se tornan tolerantes al shock térmico a elevadas temperaturas, a elevadas concentraciones de  $H_2O_2$ , NaCl, etanol, acetona, pH ácido a básico, etc.

En una respuesta específica a la limitación de un nutriente se activa una serie de genes que permiten aumentar la afinidad de captación de ese nutriente presente en baja concentración o la utilización de otra sustancia que pertenece a la misma clase de nutrientes. Estos sistemas específicos de nutrientes incluyen el regulón proteína receptora AMPc-AMP cíclico (CRP) para el uso de fuentes alternativas de carbono; el regulón PhoB/PhoR que es inducido cuando fuentes de fósforo son limitantes; sistemas para la supervivencia en bajas concentraciones de hierro u otras sustancias esenciales. De este modo la célula con limitación de nutriente podría entrar en dos estados parcialmente superpuestos.

No todos los genes controlados por  $\sigma^s$  dependen totalmente de este factor para su expresión debido a que frecuentemente tienen más de un promotor y solo uno es

controlado por  $\sigma^5$ , por ejemplo *bolA*, *ecp-htrE*, *glgS*, *osmB*, y *proP* que codifican para proteínas con funciones en la morfogénesis, síntesis de glicógeno, termotolerancia y osmotolerancia, agregación celular y osmoprotección respectivamente. Además, la transcripción de los genes controlados por  $\sigma^5$  no es iniciada necesariamente por la holoenzima ARNP conteniendo este factor  $\sigma$ . Esto parece indicar que varios genes están probablemente bajo un control indirecto de  $\sigma^5$  (Hengge-Aronis, 1996).

Las regiones de unión al promotor (2.5, 2.4 y 4.2 en  $\sigma^{70}$ ) son altamente homólogas o muy idénticas en factores sigma de diferentes especies que reconocen la misma secuencia consenso de promotor, por ejemplo  $\sigma^{70}$  en *E. coli* y  $\sigma^{43}$  en *B. subtilis*. Como ya mencionamos,  $\sigma^5$  es muy similar a  $\sigma^{70}$  en estas regiones, sin embargo hay promotores dependientes de  $\sigma^{70}$  que no son transcritos por  $\sigma^5$  y viceversa. Lo que indicaría que determinados promotores son similares pero no enteramente idénticos. En la tabla 2 se muestra la secuencia consenso -10 reconocida por la ARNP- $\sigma^5$ . La secuencia -35 no está muy conservada por lo que podría haber un requerimiento adicional de factores regulatorios o cumpliría un rol la interacción  $\sigma^5$ - $\beta$  flap en el contacto de  $\sigma$  con el promotor.

Factor  $\sigma^E$ : Otra proteína esencial para *E. coli* es el factor sigma E. Este factor es extracitoplasmático; se encuentra secuestrado a nivel de membrana por el factor anti- $\sigma^E$  RseA.  $\sigma^E$  se induce en respuesta a cambios ocurridos en el periplasma, tales como la acumulación de proteínas desnaturalizadas, estrés por etanol, calor, hiperósmosis, etc. Estos cambios activan las proteasas DgeS y RseP, que clivan a RseA, liberando  $\sigma^E$  en el citoplasma. Éste factor se encuentra en niveles intracelulares similares al de  $\sigma^{70}$  e induce más de 80 genes (UDEKWU *et al.*, 2007).

Factor  $\sigma^{54}$ : El tipo de holoenzima- $\sigma^{54}$  alterna entre dos estados isoméricos, uno cerrado, que se halla unido a las secuencias promotoras de ADN bicatenario antes de la activación, y otro abierto, dentro del cual se encuentran las cadenas separadas del promotor y se inicia la transcripción (Fig. 4). Para isomerizar al estado abierto la holoenzima- $\sigma^{54}$  utiliza la actividad ATPasa del activador, el cual se encuentra en regiones distantes y mediante un mecanismo "looping" del ADN, interacciona con la holoenzima. Las proteínas activadoras están controladas por su propia ruta de transducción de señal permitiendo una regulación de la holoenzima sin la necesidad de represores y a un único tipo de polipéptido  $\sigma^{54}$  mediar respuestas transcripcionales en una amplia variedad de necesidades fisiológicas. Este factor sigma fue inicialmente reconocido en bacterias entéricas. En la actualidad se sabe que está ampliamente distribuido entre bacterias tales como *Bacillus subtilis*, *Planctomyces limnophilus*, proteobacterias, etc. La ARN polimerasa- $\sigma^{54}$  está involucrada principalmente en el metabolismo de nitrógeno. En proteobacterias, los productos de la transcripción dependientes de  $\sigma^{54}$  participan en el metabolismo energético, modificación del ARN, quimiotaxis, flagelación, transporte de electrones, respuesta a shock térmico y a fagos, y en la expresión de factores sigma alternativos. En apariencia éste factor no participa en condiciones de crecimiento favorables para el microorganismo (BUCK *et al.*, 2000).

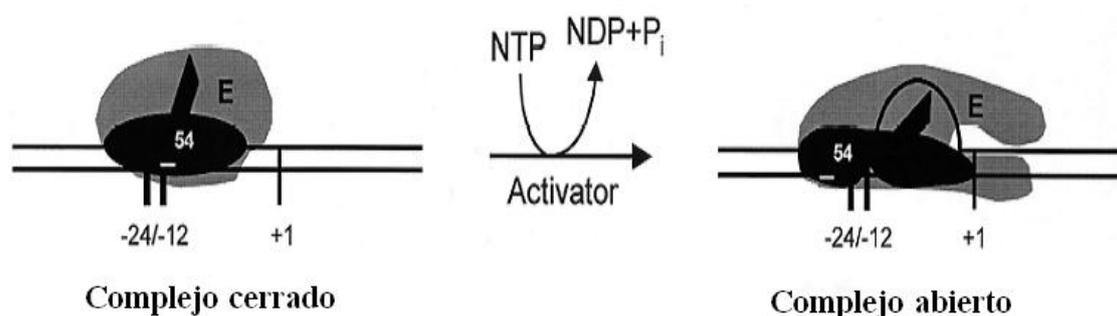


Figura 4. Holoenzima ARNP conteniendo  $\sigma^{54}$  se une a las secuencias consenso  $-12$  y  $-24$  del promotor y forma un complejo cerrado estable en el cual no hay transcripción. La hidrólisis de nucleótido mediada por el activador conduce a la formación del complejo abierto. NTP: nucleósido trifosfato, NDP: nucleósido difosfato (BUCK *et al.*, 2000).

Múltiples factores sigma: En *Bacillus subtilis* la transición del estado vegetativo a esporulado es gobernado por seis factores sigma. Entre ellos, el factor sigma primario de células vegetativas,  $\sigma_A$ , y cinco factores que se activan durante la diferenciación, llamados  $\sigma_H$ ,  $\sigma_F$ ,  $\sigma_E$ ,  $\sigma_G$  y  $\sigma_K$  (en este orden aparecen). Los factores  $\sigma_A$  y  $\sigma_H$  son activados después de la formación del septo, y no son posteriormente consideradas. Los otros cuatro,  $\sigma_F$ ,  $\sigma_E$ ,  $\sigma_G$  y  $\sigma_K$ , son específicos de cada tipo de célula y a la transcripción directa del gen en uno u otro compartimiento formado por la septación.

## MÉTODOS DE DETERMINACION DE SECUENCIAS PROMOTORAS

Los métodos mediante los cuales se pueden detectar secuencias promotoras pueden ser del tipo computacional o analítico.

Los métodos computacionales tienen ciertas complicaciones a la hora de diferenciar un falso promotor de un promotor funcional. Sin embargo, la detección con herramientas computacionales de un cúmulo de secuencias potencialmente promotoras nos permite distinguir de manera exacta donde se hallan las regiones de inicio de los genes porque la densidad de estas secuencias sólo se da en estos sitios y ayuda a seleccionar las regiones donde hacer experimentos de mapeo de promotores. Éstos métodos computacionales vienen de paradigmas determinísticos donde los modelos más representativos son: "String-Pattern Matching", Programación Dinámica, y métodos de Teoría Lingüística como las Gramáticas Generativas; y de paradigmas heurísticos como: los modelos de Teoría de la Información, de Teoría de Mecánica Estadística, métodos probabilísticos como los de Funciones de Densidad de Probabilidad, modelos de Optimización de Similitud Local, modelo de Redes Neuronales y Cadenas de Markov, modelos estocásticos como los basados en los Métodos de Montecarlo (HUERTA, 2004). La tabla 2 contiene algunas direcciones web que ofrecen este tipo de servicio.

Nombre	Dirección Web	Referencia
ConsInspector	<a href="http://www.gsf.de/biodv/consinspector.html">http://www.gsf.de/biodv/consinspector.html</a>	
Core-Promoter—for finding RNAPII promoters of human genes by quadratic discriminant analysis	<a href="http://rulai.cshl.edu">http://rulai.cshl.edu</a>	ZHANG, 1998
NNPP Promoter Prediction by Neural Network for prokaryotes or eukaryotes	<a href="http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html">http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html</a>	REESE <i>et al.</i> , 1996
Promoter element weight matrices and HMMs	<a href="http://www.epd.isb-sib.ch/promoter_elements/">http://www.epd.isb-sib.ch/promoter_elements/</a>	BUCHER, 1990
PromoterInspector	<a href="http://www.gsf.de/biodv/">http://www.gsf.de/biodv/</a>	KLINGENHOFF <i>et al.</i> , 1999
PromoterScan	<a href="http://bimas.dcrn.nih.gov/molbio/proscan/">http://bimas.dcrn.nih.gov/molbio/proscan/</a>	PRESTRIDGE, 1995 y ver sitio Web
BPROM	<a href="http://www.softberry.com/berry.phtml">http://www.softberry.com/berry.phtml</a>	

**Tabla 2. Programas de predicción de promotores y páginas Web.**

El análisis experimental para detectar promotores se realiza empleando vectores sonda de promotor; mediante métodos como “Primer extension”; DNAasa Protection Análisis; Secuenciación total o parcial de ARN con identificación del nucleósido trifosfato 5’; Identificación genética o mutacional de las regiones –35 y –10; Mapeo S1 nucleasa de alta resolución; y Alta resolución de transcritos *in vitro* (MILLER, 1992).

Los vectores sonda de promotor se basan en un gen reportero sin promotor. Río arriba de éste gen, se encuentra el sitio polilinker. Únicamente cuando se inserta un fragmento de ADN con actividad promotora en éste lugar, se expresa el gen reportero que le otorga a la célula huésped una característica especial que permite diferenciarla de las demás.

El método “Primer Extension” se basa en el empleo de un cebador construido a partir de una secuencia conocida de un gen. La amplificación a partir del ARNm, mediante transcriptasa reversa, empleando este cebador, da un producto único marcado. Posteriormente, los productos del secuenciamiento del ADN, empleando el mismo cebador, comparados con éste producto único en gel de poliacrilamida, permite determinar el sitio de inicio de la transcripción y toda la secuencia río arriba con potencial actividad promotora.

El Análisis de Protección con DNAsa permite determinar secuencias promotoras empleando ADN marcado y sometido a digestión controlada con ADNasa. El mismo ADN marcado, en contacto con la ARNP, arroja productos de la degradación con DNAsa con un perfil distinto puesto que el ADN unido (promotor) a la ARNP se halla protegido. Por comparación de ambos perfiles se determina la secuencia promotora protegida.

### BIBLIOGRAFIA

- Beckwith, J. y Zipsers, D. 1996. *Escherichia coli and Salmonella*. Celular and Molecular Biology. 78, pp. American Society for Microbiology, 1227-1228.
- Bonocora, R. P.; Decker, P. K.; Glass, S.; Knipling, L. y Hinton, D. M. 2013. Architecture of the Bacteriophage T4 Activator MotA/Promoter DNA Interaction during Sigma Appropriation. *J Biol Chem.*, 288: 27607-27618.
- Borukhov, S and Severinov, K. 2002. *Role of the RNA polymerase sigma subunit in transcription initiation*. *Microbiol.* 153: 557–562.
- Buchert, P. 1990. Weight Matrix Descriptions of Four Eukaryotic RNA Polymerase II Promoter Elements Derived from 502 Unrelated Promoter Sequences. *J. Mol. Biol.*, 212, 563578.
- Huerta, A. 2004. *Análisis y predicción de secuencias de promotores bacterianos dependiendo de sigma y alpha y de otros factores reguladores diferentes a la RNAP*. Tesis doctoral. UNAM, México.
- Jacob, F y Monod, J. 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of molecular biology*, 3: 318–56.
- Klingenhoff, A.; Frech, K.; Quandt, K. y Werner, T. 1999. Functional promoter modules can be detected by formal models independent of overall nucleotide sequence similarity. *Bioinformatics*, 15, 180-186.
- Madigan, M.; Martinko, J. y Parker, J. 1997. *Brock. Biología de los Microorganismos*. 8, pp. 273-277; 7, 232-240. Prentice Hall Iberia, Ltd. Ed.
- Vassilyev, D. G.; Sekine, S.; Laptenko, O.; Lee, J.; Vassilyeva, M.; Borukhov, S. y Yokoyama, S. 2002. Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6Å resolution. *Nature*, 417: 712-719.
- Prestridge, D. S. 1995. Predicting Pol II promoter sequences using transcription factor binding sites. *J. Mol. Biol.*, 5: 923-32.

Reese, M. G.; Harris, N. L. y Eeckman, F. H. 1996. *Large Scale Sequencing Specific Neural Networks for Promoter and Splice Site Recognition*. The seventh international genome sequencing and analysis conference, Hilton Head Island, SC. World Scientific Publishing Co, Singapore.

Zhang, M. Q. 1998. Identification of Human Gene Core Promoters in Silico. *Genome Res.*, 8(3): 319–326.

### BIBLIOGRAFIA DE CONSULTA

Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. y Watson, J. D. 1994. *Molecular Biology of the Cell*. 3rd ed. New York and London: Garland Publishing.

Ausubel, F. M.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D. D.; Seidman, J. G.; Smith, J. A. y Struhl, K. 1999. *Short Protocols in Molecular Biology*. 1, pp. 1.27-1.28. John Wiley and Sons, Inc. Eds.

Bertani, G. 1951. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 62: 293-300.

Birnboim, H y Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7:1513-1523.

Borukhov, S y Severinov, K. 2002. Role of the RNA polymerase sigma subunit in transcription initiation. *Microbiol.*, 153: 557–562.

Brown, T. A. 2002. *Genomes* 2<sup>nd</sup> ed. Oxford, UK, BIOS Scientific Publishes Ltd.

Buck, M.; Gallegos, M.; Studholme, D.; Guo, Y. y Gralla, J. 2000. The bacterial enhancer-dependent  $\sigma^{54}$  ( $\sigma^N$ ) transcription factor. *J. Bacteriol.*, 182: 4129–4136.

Gerhardt, P.; Murray, R. G. E.; Costilow, R. N.; Nester, E. W.; Wood, W. A.; Krieg, N. R. y Phillips, G. R. 1981. *Manual of Methods for General Bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, DC.

Griffiths, A. J. F.; Gelbart, W. M.; Miller, J. H. y Lewontin, R. C. 1999. *Modern Genetic Analysis*. New York, W.H. Freeman & Co.

Hengge-Aronis, R. 1996. *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Celular and Molecular Biology*. 93, pp. American Society for Microbiology, Ed. 1497-1551.

Israelsen, H.; Madsen, S.; Vrang, A.; Hansen, E y Johansen, E. 1995. Cloning and partial characterization of regulated promoters from *Lactococcus lactis* Tn917-lacZ

integrants with the new promoter probe vector, pAK80. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 2540-2547.

Langella, P.; Le Loir, Y.; Ehrlich, S. D. y Gruss, A. 1993. Efficient plasmid mobilization by pIP501 in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *J. Bacteriol.*, 175: 5806-5813.

Lapierre, L.; Mollet, B. y Germondy, J. E. 2002. Regulation and adaptive evolution of lactose operon expression in *Lactobacillus delbrueckii*. *J. Bacteriol.*, 184: 928-935.

Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, S. L.; Matsudaira, P.; Baltimore, D. y Darnell, J. E. 1999. *Molecular Cell Biology* 4<sup>th</sup> ed. New York. W.H. Freeman & Co.

Madigan, M. T.; Martinko, J. M. y Parker, J. 1999. *Brock: Biología de los Microorganismos*. 8<sup>o</sup> Edición. Ed. Prentice Hall Iberia. Madrid. 1064 p.

Madigan, M.T.; Martinko, J. M. y Parker J. 2004. *Brock: Biología de los Microorganismos*. 10<sup>o</sup> Edición. Ed. Pearson Educación., Madrid. 1011 p.

Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Dunlap, P. V. y Clark, D. P. 2009. *Brock: Biología de los Microorganismos*. 12<sup>o</sup> Edición. Ed. Pearson Educación., Madrid. 1296 p.

Miller, J. H. 1992. *A Short Course in Bacterial Genetics*. A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. 17, pp. Cold Spring Harbor Laboratory Press. N. Y. 17.2-17.7.

Moreno, J. R.; Gorriti, M. F.; Flores, M. R. y Albarracín, V. H. 2012. Microbiología ambiental y ecología microbiana en el estudio de microorganismos en ambientes extremos. *Reduca(Biología) Serie Microbiología*, 5(5): 94-109.

Muriana, P y Kleanhammer, T. 1991. Cloning, phenotypic expression, and DNA sequence of the gene for lactacin F, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus* spp. *J. Bacteriol.*, 173: 1779-1788.

Ordoñez, O. F.; Flores, M. R.; Dib, J. R.; Paz, A. y Farías, M. E. 2009. Extremophile culture collection from andean lakes: Extreme pristine environments that host a wide diversity of microorganisms with tolerance to UV radiation. *Microbial Ecology*, 58(3): 461-73.

Pospiech, A y Neumann, B. 1995. A versatile quick prep of genomic DNA from Gram positive bacteria. *Trends Genet*, 11:217-218.

Prescott, L.; Harley, J. y Klein, D. 2002. *Microbiology*. 5<sup>th</sup> Edn. McGraw-Hill. London. 950 pp.

Raya, R.; Bardowski, J.; Anderson, P. S.; Ehrlich, S. D. y Chopin, A. 1998. Multiple transcriptional control of the *Lactococcus lactis* trp operon. *J. Bacteriol.*, 180: 3174-3180.

Sambrook, J.; Fritsch, E. F. y Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd. Ed. Cold Spring Harbor. N.Y.

Tortora, G. J.; Funke, B. R. y Case, C. L. 2007. *Introducción a la Microbiología*. 9° Edición. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires. 988 p.

Udekwi, K. y Wagner, G. H. 2007. Sigma E controls biogenesis of the antisense RNA MicA. *Nucleic Acids Res.*, 35: 1279-1288.

Recibido: 1 septiembre 2013.

Aceptado: 21 diciembre 2014.