



**CONGRESO
DE LA
SOCIEDAD ESPAÑOLA
DE GENÉTICA**



San Lorenzo de El Escorial del 7 al 10 de Septiembre de 2003

Organizado por el Departamento de Genética, Facultad de Biología, UCM, Madrid

replicación (el complejo de replicación se monta y permanece parado). Si se elimina la Hu y se añade Rif para que sólo existan las horquillas que ya estaban ensambladas, la síntesis residual de DNA es de un 170% y las células presentan más de 4 y 8 cromosomas. Estos resultados demuestran que al eliminar la Hu, todas las horquillas continúan la replicación, tanto las que estaban alongando al añadir la droga como las que se ensamblan durante las dos horas de tratamiento. Estos resultados sugieren por tanto que la Hu afecta a la actividad del complejo de replicación pero no a su funcionalidad. También se observa que la Hu no afecta al inicio de la replicación puesto que durante las dos horas de tratamiento la célula acumula "potencial de iniciación" que entrará en elongación tan pronto como la droga sea eliminada.

P109

Construcción de un interactoma para la regulación del metabolismo del nitrógeno en la cianobacteria *Synechococcus* sp. PCC 7942

Javier Espinosa*; Sergio Burillo; María Luisa Cayuela; Ignacio Luque y Asunción Contreras

División de Genética. Universidad de Alicante, Apartado 99, E-03080 Alicante.
* Javier.Espinosa@ua.es

La necesidad de coordinar los procesos de asimilación y catabolismo de las distintas fuentes de carbono y nitrógeno es una constante en el metabolismo bacteriano, aunque los mecanismos de regulación y los elementos implicados están por lo general poco conservados. Una notable excepción la constituyen las proteínas PII, presentes en la mayoría de las bacterias y en los cloroplastos vegetales.

En cianobacterias el amonio es la fuente preferida de nitrógeno y en su presencia se reprime la asimilación de otras fuentes de nitrógeno. La única función demostrada para GlnB (PII) en este grupo filogenético es la inhibición del transporte de nitrato en presencia de amonio. Otro elemento clave es NtcA, que juega un papel central en la regulación transcripcional de genes implicados en la asimilación de distintas fuentes de nitrógeno. La actividad de ambas proteínas es modulada por α -cetoglutarato, que estaría implicado en la transmisión de información sobre los niveles de carbono fijado. Ambas pro-

teínas podrían estar también implicadas en la percepción de los niveles de nitrógeno, aunque se desconocen los mecanismos y la naturaleza de la(s) señal(es) que participan. Otros elementos implicados en la regulación por nitrógeno son NblR y NblS, que formarían un sistema de dos componentes implicado en la supervivencia de las células en condiciones de estrés, y entre las que se incluye el estrés de nitrógeno.

Con el objeto de contribuir a la comprensión de la transducción de señales de nitrógeno en cianobacterias, estamos intentando establecer conexiones funcionales entre reguladores clave en cianobacterias. La identificación de proteínas que interactúan físicamente con diferentes reguladores clave nos ha permitido construir una red de interacciones proteína-proteína en la regulación por nitrógeno. Además de incorporar nuevos elementos se han establecido conexiones previamente insospechadas entre reguladores clave.

P110

Identificación de interacciones moleculares mediadas por la histidina quinasa NTRB mediante el escrutinio de genotecas de doble híbrido

Paloma Salinas y Asunción Contreras

División de Genética, Universidad de Alicante, Apartado 99, E-03080 Alicante, Spain

En enterobacterias, la transducción de señales en respuesta a cambios en la disponibilidad de nitrógeno está mediada por el sistema de dos componentes NtrBC. NtrB es una histidina quinasa citoplasmática cuyas actividades quinasa y fosfatasa están reguladas por las proteínas PII (codificadas en los genes *glnB* y *glnK*) en función de la relación carbono/nitrógeno.

En nuestro laboratorio, hemos utilizado con éxito el sistema del doble híbrido para poner de manifiesto las interacciones específicas que tienen lugar entre dominios conservados de NtrB y las proteínas reguladoras NtrC y GlnB. Con el fin de aprovechar el potencial demostrado por este sistema en el estudio de las interacciones mediadas por proteínas implicadas en transducción de señales, se construyeron genotecas doble híbrido de *E. coli* y se procedió a su

escrutinio utilizando como cebo la histidina quinasa NtrB. El conjunto de datos obtenidos para este escrutinio, y otros actualmente en desarrollo utilizando otras proteínas clave del metabolismo del nitrógeno como cebos, permitirá completar el mapa de interacciones en la transducción de señales del nitrógeno en enterobacterias, así como añadir nuevos elementos de conexión entre esta y otras rutas de transducción de señales.

Tres polipéptidos distintos fueron repetidamente identificados en los escrutinios con NtrB como cebo: GlnB, GlnK y AspA⁹¹⁻³¹². El análisis de los determinantes de interacción entre NtrB y los polipéptidos GlnK y AspA⁹¹⁻³¹², muestran la implicación de ambos en interacciones con dominios conservados de NtrB. Los resultados obtenidos se discuten en relación a la representatividad y características de las genotecas construidas y a la función del módulo transmisor de NtrB en la regulación de la actividad de esta proteína.

P111

Estudio de la topología del DNA durante la replicación de plásmidos bacterianos

Olavarrieta, L.; Martínez-Robles, M. L.; Krimer, D.; Hernández, P. y Schwartzman, J. B.

Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC). Velázquez 144, Madrid-28006, Spain. los@cib.csic.es

La topología del DNA cambia constantemente a medida que progresa la replicación. Pero la dinámica de este proceso es hasta hoy desconocida. Para abordar este problema en *Escherichia coli*, construimos varios plásmidos con un origen ColE1 y una barrera polar para la replicación localizada a distintas distancias del origen. El análisis de los intermediarios de replicación de estos plásmidos por electroforesis bidimensional en geles de agarosa y microscopía electrónica nos ha permitido comprobar que el superenrollamiento negativo disminuye a medida que avanza la horquilla. Hemos comprobado que la cloroquina y el bromuro de etidio, que inducen el superenrollamiento positivo de moléculas no replicadas, son incapaces de inducir el superenrollamiento positivo de los intermediarios de replicación. Esto se debe a que en los intermediarios el super-

enrollamiento positivo es inmediatamente adsorbido por una regresión de las horquillas. El anudamiento de las doble-hélices hermanas detrás de la horquilla ocurre normalmente durante la replicación. Para estudiar la dinámica de la formación de nudos, utilizamos geles bidimensionales para identificar burbujas anudadas en moléculas con la horquilla detenida en distintos sitios a lo largo del proceso. Hemos comprobado que el número y complejidad de burbujas anudadas aumenta en función del tamaño de la burbuja, lo que sugiere que la probabilidad de anudamiento es inversamente proporcional a la densidad de pre-encadenados. Finalmente, estudiamos las consecuencias topológicas de la colisión frontal entre replicación y transcripción. Los resultados obtenidos indican que este tipo de colisión favorece la formación de burbujas anudadas y que un exceso de intermediarios anudados tendría consecuencias deletéreas para la segregación. Esta podría ser al menos una de las razones por lo que a lo largo de la evolución los genomas han evitado la colisión frontal entre transcripción y replicación.

P112

Distribución de frecuencias alélicas y genotipos de loci microsatélites, en el genoma de poblaciones de *Saccharomyces cerevisiae*

M^a Angeles Pérez* y Pilar Hidalgo

Instituto Madrileño de Investigación Agraria y Alimentaria (IMIA). Comunidad de Madrid. Finca El Encín. Apdo. 127. 28800 Alcalá de Henares. Madrid.

* mangle.perez@imia.madrid.org

El presente trabajo expone la distribución de frecuencias alélicas y genotipos generados por un panel de 6 loci microsatélites polimórficos desarrollados para la identificación, tipificación y diferenciación genética de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, especie de gran importancia en las fermentaciones industriales.

El estudio se ha realizado sobre un total de 51 aislados, procedentes de fermentaciones vínicas, determinándose 44 genotipos, con un total de 57 alelos, lo que ha permitido establecer los microsatélites con mayor poder de discriminación. Asimismo, se ha observado que la frecuencia con que los diferentes alelos de cada locus aparecen en la población estudiada es muy varia-