



Universitat Autònoma de Barcelona
Departament de Genètica i Microbiologia

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA
CAJA SOS DE *Ralstonia metallidurans* Y
DE *Deinococcus radiodurans***

LORENA CASARES PROAÑO

2003

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Departament de Genètica i Microbiologia

Identificación y caracterización de la caja SOS de *Ralstonia metallidurans* y de *Deinococcus radiodurans*

Memoria presentada por
Lorena Casares Proaño para
optar al Grado de Doctor en
Ciencias Biológicas por la
Universitat Autònoma de
Barcelona

Vº Bº

La Directora de la Tesis

Dra. Montserrat Llagostera

A mis papis Pedro y Cecilia

RESUMEN

El sistema SOS de *Escherichia coli* ha sido durante mucho tiempo el modelo de referencia para su estudio en otras especies. Este sistema se encuentra en otros microorganismos incluyendo bacterias gramnegativas, grampositivas y otras. Recientemente se han encontrado diferencias entre las cajas SOS y los genes que integran el regulón SOS de *E. coli* con respecto a otras especies bacterianas.

El propósito de este trabajo ha sido determinar y caracterizar las cajas SOS de dos especies bacterianas, *Ralstonia metallidurans* y *Deinococcus radiodurans*, pertenecientes a los grupos β -Proteobacteria y Deinococci, respectivamente.

En primer lugar, se realizó la clonación y secuenciación de los genes *recA* y *lexA* de *R. metallidurans*, el primero mediante hibridación con una sonda del gen *recA* de *Agrobacterium tumefaciens* y el segundo utilizando programas informáticos en los que se usó la secuencia del gen *lexA* de *E. coli* para identificar dicho gen en la secuencia parcial del genoma de *R. metallidurans*. Tras un análisis de sus regiones promotoras, se determinó que ambas contenían el motivo regulador, CTGT-N₈-ACAG, idéntico al de *E. coli*.

Se comprobó que esta caja reguladora era funcional tanto en *R. metallidurans* como en *E. coli*, determinando la inducción de la expresión del gen *recA* frente a lesiones en el DNA en ambas especies. Adicionalmente, se determinó que la caja SOS de este microorganismo se encontraba en varios genes, que en *E. coli* forman parte del regulón SOS, como *recA*, *lexA* y un hipotético gen de la familia *impB/samB/mucB*. En cambio, no se identificó dicha caja en los hipotéticos genes *uvrA*, *ruvAB* y *dinG*, los cuales, en *E. coli*, también integran el regulón SOS. Mediante el análisis cuantitativo por RT-PCR a tiempo real de los transcritos, se demostró que la expresión de todos estos genes era inducible al lesionar el DNA. Asimismo, mediante ensayos de movilidad electroforética, utilizando la proteína LexA de *E. coli* purificada y extractos crudos de *R. metallidurans* y *R. metallidurans*

LexA(Def), se determinó que la proteína LexA era la responsable de la regulación de los genes *recA*, *lexA* y del hipotético gen de la familia *impB/samB/mucB*. Por el contrario, los hipotéticos genes *uvrA*, *ruvAB* y *dinG* no están bajo el control de la proteína LexA. Por lo tanto, si bien *R. metallidurans* posee una caja SOS idéntica a la de *E. coli*, sólo algunos de los genes integrados en el regulón SOS de *E. coli* forman parte de este regulón en *R. metallidurans*. Además, el hecho de que los hipotéticos genes *uvrA*, *ruvAB* y *dinG* sean inducibles por lesiones en el DNA indica que deben estar sometidos a algún control independiente de LexA.

Para determinar la caja SOS de *D. radiodurans* se procedió a clonar el gen *lexA*, obteniéndose su secuencia mediante programas informáticos que permiten localizar secuencias de un genoma con un determinado grado de similitud a otras secuencias conocidas. Una vez clonado dicho gen, se sobreexpresó la proteína LexA de este microorganismo y el extracto proteico obtenido se utilizó para realizar ensayos de movilidad electroforética frente al promotor del gen *lexA* de *D. radiodurans*, demostrándose que el gen *lexA* se autorregula. Seguidamente y mediante ensayos de movilidad electroforética se acotó al máximo la región promotora del gen *lexA* hasta identificar un posible motivo regulador. Mediante mutagénesis dirigida de las diferentes bases de dicho motivo, se determinó que la proteína LexA de *D. radiodurans* reconoce específicamente el palíndromo CTTG-N₈-**CAAG** como motivo de unión, siendo las bases señaladas en negrita las más importantes para la unión proteína-DNA. Finalmente, se demostró que otros genes como *recA* o el hipotético *lexA2* no tienen la misma caja SOS ni son regulados por LexA. Se concluye que la proteína LexA de *D. radiodurans* tiene un motivo regulador diferente a los anteriormente descritos para otros grupos de microorganismos y que probablemente debe existir un tipo de regulación distinto a los anteriormente descritos para los genes involucrados en procesos reparativos.

Índice

1. Introducción	1
1.1. El sistema SOS en <i>E. coli</i>	3
1.1.1. Inducción y regulación del sistema SOS	5
1.1.2. La proteína RecA	7
1.1.3. La proteína LexA	13
1.1.4. Funciones de los genes SOS	19
1.1.4.1. Reparación	19
1.1.4.2. Mutagénesis SOS	22
1.1.4.3. Otra funciones de SOS	22
1.2. El sistema SOS en otros microorganismos	23
1.2.1. El gen <i>recA</i>	23
1.2.2. El gen <i>lexA</i>	25
1.2.3. Bacterias gramnegativas y el sistema SOS	26
1.2.4. Bacterias grampositivas y el sistema SOS	30
1.2.5. Reparación de DNA en <i>D. radiodurans</i>	34
1.3. Objetivos	35
2. Materiales y métodos	37
2.1. Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos	37
2.2. Métodos microbiológicos	37
2.2.1. Métodos de cultivo y conservación de cepas	37
2.2.1.1. Medios de cultivo	40
2.2.1.2. Antibióticos	46
2.2.1.3. Otras soluciones y productos químicos	47
2.2.2. Pruebas de supervivencia células	47
2.2.2.1. Prueba de complementación del gen <i>recA</i> con MMS	47
2.2.2.2. Resistencia a la radiación ultravioleta (Test de la gota)	48
2.2.2.3. Supervivencia a la radiación ultravioleta	48
2.2.3. Inducción de la respuesta SOS	49
2.2.3.1. Inducción con mitomicina C	49

2.2.3.2.	Inducción por radiación ultravioleta	49
2.3.	Métodos genéticos	50
2.3.1.	Transformación	50
2.3.1.1.	Transformación con cloruro cálcico (CaCl ₂)	50
2.3.1.2.	Electrotransformación	51
2.3.2.	Conjugación	53
2.3.2.1.	Conjugación triparental	54
2.3.2.2.	Conjugación biparental	54
2.4.	Métodos bioquímicos	55
2.4.1.	Ensayo de la actividad β-galactosidasa	55
2.5.	Métodos de manipulación de DNA	58
2.5.1.	Extracción de DNA cromosómico	58
2.5.1.1.	Miniextracción de DNA cromosómico	58
2.5.1.2.	Maxiextracción de DNA cromosómico	59
2.5.2.	Extracción de DNA plasmídico	62
2.5.2.1.	Miniextracción de DNA plasmídico	62
2.5.2.2.	Maxiextracción de DNA plasmídico	63
2.5.3.	Digestión con enzimas de restricción	66
2.5.4.	Electroforesis de DNA	67
2.5.4.1.	Geles de agarosa	67
2.5.4.2.	Cuantificación de DNA	71
2.5.5.	Clonación en vectores plasmídicos	71
2.5.5.1.	Purificación de fragmentos de DNA	72
2.5.5.1.1.	Purificación por columna	72
2.5.5.2.	Preparación del vector y del inserto	73
2.5.5.3.	Reacción de ligación	75
2.5.6.	Amplificación de DNA	77
2.5.6.1.	PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	77
2.5.6.2.	Secuenciación	81
2.5.7.	<i>Southern blotting</i>	82
2.5.7.1.	Transferencia a membrana	82
2.5.7.2.	Marcaje de sondas	84
2.5.7.3.	Hibridación	88
2.5.7.3.1.	Prehibridación	89

2.5.7.3.2. Hibridación y lavados	89
2.5.7.4. Detección y revelado	91
2.6. Métodos de manipulación de RNA	92
2.6.1. Extracción de RNA	93
2.6.1.1. Extracción de RNA por fenol ácido	93
2.6.1.2. Extracción de RNA utilizando el <i>RNeasy</i> [®] <i>Mini Kit</i> (Quiagen)	97
2.6.2. RT-PCR	98
2.6.3. RT-PCR <i>on-line</i>	100
2.7. Métodos de manipulación de proteínas	102
2.7.1. Extractos crudos de proteínas	102
2.7.2. Sobreexpresión de proteínas con el <i>pET System</i> (Novagene)	104
2.7.3. Detección de proteínas	108
2.7.3.1. Electroforesis de proteínas	108
2.7.4. Ensayo de movilidad electroforética (EMSA)	112
2.7.4.1. Marcaje de fragmentos de DNA	112
2.7.4.2. Reacción de unión proteína-DNA	113
2.7.4.3. Preparación del gel de poliacrilamida y electroforesis	114
2.7.4.4. Transferencia	116
2.7.4.5. Revelado y detección	116
3. Resultados	117
3.1. Identificación de la caja SOS de <i>R. metallidurans</i>	117
3.1.1. Clonación y secuenciación del gen <i>recA</i> de <i>R. metallidurans</i>	117
3.1.2. Clonación y secuenciación del gen <i>lexA</i> de <i>R. metallidurans</i>	122
3.1.3. Construcción del mutante RecA(Def) de <i>R. metallidurans</i>	124
3.1.4. Construcción del mutante LexA(Def) de <i>R. metallidurans</i>	127

3.1.5. Expresión del gen <i>recA</i> de <i>R. metallidurans</i> en <i>E. coli</i> y en los mutantes RecA(Def) y LexA(Def) de <i>R. metallidurans</i>	129
3.1.6. Regulación de la expresión de diferentes genes de reparación del DNA de <i>R. metallidurans</i> por la proteína LexA	132
3.1.6.1. Unión de la proteína LexA de <i>E. coli</i> a diferentes genes de <i>R. metallidurans</i> que codifican proteínas de reparación del DNA	134
3.1.6.2. Expresión de algunos genes de reparación del DNA de <i>R. metallidurans</i> en la cepa salvaje y en el mutante LexA(Def)	136
3.1.6.3. Unión al gen <i>lexA</i> y al hipotético gen <i>uvrA</i> de extractos crudos de proteínas de la cepa salvaje y del mutante LexA(Def) de <i>R. metallidurans</i>	138
3.2. Identificación de la caja SOS de <i>D. radiodurans</i>	141
3.2.1. Clonación y secuenciación del gen <i>lexA</i> de <i>D. radiodurans</i>	142
3.2.2. Unión al gen <i>lexA</i> de un extracto proteico que contiene la proteína LexA sobreexpresada de <i>D. radiodurans</i>	144
3.2.3. Determinación de la caja SOS de <i>D. radiodurans</i> mediante mutagénesis dirigida de la región promotora del gen <i>lexA</i>	147
4. Discusión	155
4.1. Identificación de la caja SOS de <i>R. metallidurans</i>	156
4.2. Identificación de la caja SOS de <i>D. radiodurans</i>	162
5. Conclusiones	171
6. Bibliografía	173
Agradecimientos	193

1. Introducción

Todos los organismos tienen entre sus principales funciones la perpetuación de la especie, lo que se consigue manteniendo la estabilidad del DNA, molécula que almacena toda la información genética. El material genético está expuesto a diferentes tipos de daños o agresiones que pueden tener un origen endógeno o exógeno. Los de tipo endógeno pueden derivarse del propio metabolismo celular o del DNA, mientras que los de tipo exógeno se deben a la exposición a agentes físicos o químicos medioambientales (Friedberg *et al.*, 1995). Todos estos agentes provocan diferentes grados de lesión en el DNA lo cual puede llegar a afectar al desarrollo normal del organismo. Frente a estas lesiones, la célula dispone de varias estrategias de defensa para restaurar la estructura y función del DNA dañado o minimizar sus efectos. Entre estas estrategias están la reparación por reversión directa, la escisión y la tolerancia al daño. Las dos primeras implican la restauración de la secuencia correcta de bases y de la estructura normal del DNA, tras retirar la lesión del genoma por acción de enzimas que revierten directamente el daño o por procesos de síntesis reparativa del DNA, mientras que la tercera consiste en enfrentarse al daño sin retirarlo inicialmente, de manera que la célula a pesar de no reparar las lesiones, puede continuar la replicación de DNA y posteriormente reparar la lesión por alguna otra estrategia, introduciendo en algunos casos mutaciones.

Dentro de los procariotas, *E. coli* es el microorganismo más estudiado. Recientes estudios de la expresión génica de células tratadas con mitomicina C, han determinado que más de 1000 genes podrían estar implicados en la respuesta al daño del DNA en *E. coli* (Khil y Camerini-Otero, 2002). En este microorganismo se han descrito tres sistemas multigénicos capaces de activarse según el tipo y nivel de daño al que se ha sometido a la célula. Estos sistemas utilizan diferentes mecanismos de reparación los cuales pueden actuar independiente o conjuntamente para cumplir su objetivo y son:

- Respuesta adaptativa a los agentes alquilantes
- Respuesta al estrés oxidativo
- Sistema de reparación de emergencia del DNA (o SOS)

La respuesta adaptativa a los agentes alquilantes cumple la función de reparar las alquilaciones producidas en el DNA debidas a la acción de diferentes agentes químicos, tales como la N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), el metil metanosulfonato (MMS), el etil metanosulfonato (EMS), etc., cuando las células han sido expuestas a dosis subletales de estos compuestos. Esta vía de reparación está integrada por un regulador positivo, la proteína Ada, y un regulón formado por los genes *ada*, *alkA*, *alkB* y *aidB*. El producto del gen *ada* tiene funciones de reparación y regulación, mientras que los productos de los genes *alkA*, *alkB* y *aidB* están implicados solamente en los procesos de reparación (Landini y Volkert, 2000). La inducción de la transcripción tiene lugar cuando la proteína Ada, activada por su metilación, reconoce una secuencia específica AAAT-N₆-GCAA en la región promotora de los genes pertenecientes al regulón (Landini y Volkert, 1995). Estos genes se inducen más frente a la presencia de agentes metilantes, que frente a agentes etilantes o los que tienen grupos alquilo más grandes. Durante la fase estacionaria, el gen *rpoS*, que codifica el factor sigma σ^s específico de esta fase de crecimiento, permite que los genes de este sistema de reparación presenten un cierto nivel de inducción con el objetivo de prevenir la acumulación de daño del DNA, debida a la producción endógena de agentes alquilantes.

La respuesta al estrés oxidativo permite la reparación de lesiones debidas a especies reactivas del oxígeno (EROs) exógenas o endógenas, tales como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) o radicales superóxido (O₂⁻) o nitrilo (NO). Este sistema incluye más de 20 genes, que se encuentran en diferentes regulones y están controlados por los productos de los genes *oxyR* y *soxRS*. El daño causado por compuestos generadores de peróxido de hidrógeno es eliminado por los productos del regulón *oxyR*. El mecanismo por el cual la célula detecta el H₂O₂ es la oxidación directa del regulador OxyR. Este

regulador activado induce la transcripción de varios genes (*katG*, *ahpCF*, *dps*, *gorA*, *grxA* y *oxyS*, entre otros) que codifican diferentes enzimas con funciones antioxidantes como la catalasa y varias reductasas. Por otro lado, la transcripción del factor SoxR es activada por compuestos generadores de óxido nítrico y superóxidos intracelulares. El factor SoxR oxidado induce la transcripción de un segundo factor, el SoxS, que activa directamente la transcripción de varios genes, *sodA*, *fpr*, *zwf*, *fumC*, *nfo*, *acnA* y *micF*, entre otros, que codifican enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, proteínas del metabolismo aeróbico como la fumarasa y la resistencia a antibióticos, solventes orgánicos y metales pesados. Se ha descrito un regulador adicional para la supervivencia frente al estrés oxidativo que es el gen *rpoS*, que codifica la subunidad σ^S de la RNA polimerasa, ya mencionado como regulador de la respuesta adaptativa a los agentes alquilantes en la fase estacionaria. El regulón controlado por el producto del gen *rpoS* incluye los genes *katG*, *dps* y *gorA*, que también son controlados por OxyR (Demple, 1997; Michán *et al.*, 1999; Zheng *et al.*, 1999).

1.1. El sistema SOS en *E. coli*

El sistema SOS es una red compuesta por más de 40 genes (Tabla 1.1) regulada por la proteína RecA como activador y la proteína LexA como represor (Fernández de Henestrosa, *et al.*, 2000; Courcelle *et al.*, 2001). Estas dos proteínas son las más importantes del sistema, sin embargo se han descrito más reguladores, como la proteína DinI que podría actuar como un regulador negativo (Voloshin *et al.*, 2001; Yasuda *et al.*, 2001). El sistema SOS se activa frente a una lesión a nivel celular o cuando hay una perturbación en la replicación del DNA, desencadenando la expresión de los productos de múltiples genes que cumplen diferentes funciones en reparación, replicación, recombinación y división celular. Los genes del regulón SOS son capaces de actuar en varias formas independientes. Así, entre otros procesos están la reparación por escisión que es mejorada por el aumento de producción de la UvrD helicasa y de las subunidades UvrA y UvrC de la excinucleasa UvrABC, la inducción de la DNA polimerasa II que

Tabla 1.1. Genes pertenecientes al sistema SOS de *E. coli* regulados por LexA

Genes¹	Función
<u>Cromosómicos</u>	
<i>dinA</i> (<i>polB</i>)	DNA polimerasa II.
<i>dinB</i> (<i>dinP</i>)	Posible función en mutagénesis SOS.
<i>dinD</i> (<i>pscA</i>)	Desconocida. Mutante de sensibilidad al frío.
<i>dinF</i>	Desconocida. Está en el mismo operón de <i>lexA</i> .
<i>dinG</i>	Desconocida.
<i>dinI</i>	Inhibición de <i>umuD</i> , posible regulador del sistema.
<i>dinL</i> (<i>sosC</i> , <i>yjiW</i>)	Desconocida.
<i>dinM</i> (<i>sosD</i> , <i>ydjQ</i>)	Posible homólogo de <i>uvrC</i> , posible escinucleasa.
<i>dinO</i> (<i>sosF</i> , <i>molR</i>)	Posible regulador de la síntesis de molibdato.
<i>dinQ</i>	Desconocida.
<i>dinS</i>	Posible transposasa.
<i>ftsK</i> (<i>dinH</i>)	Desconocida.
<i>hokE</i> (<i>ybdY</i>)	Posible proteína asesina.
<i>lexA</i>	Represor del sistema SOS.
<i>recA</i>	Recombinación, coproteasa, inductor del sistema SOS, mutagénesis SOS.
<i>recN</i>	Recombinación por la vía RecF, reparación de roturas de cadena doble y sencilla.
<i>ruvAB</i>	Recombinación por la vía RecF.
<i>sbmC</i>	Resistencia a la Microcina B17.
<i>ssb</i>	Inducción de la unión a DNA de cadena sencilla, recombinación y otras.
<i>sulA</i> (<i>sfiA</i>)	Inhibición de la división celular.
<i>umuDC</i>	Mutagénesis SOS.
<i>uvrA</i> (<i>dinE</i>)	Reconocimiento del daño, reparación por escisión de nucleótido.
<i>uvrB</i>	Reparación por escisión de nucleótido.
<i>uvrD</i>	Helicasa II, reparación por escisión de nucleótido, reparación de errores de apareamiento incorrecto.
<i>ybfE</i>	Desconocida.
<i>ydjM</i>	Desconocida.
<i>yebG</i>	Desconocida.
<i>ysdAB</i>	Desconocida.
<u>Extracromosómicos</u>	
<i>colA</i> (<i>caa</i>)	Producción de colicinas (ColA).
<i>colE</i> (<i>cea</i>)	Producción de colicinas (Col E1).
<i>impAB</i>	Similar a <i>umuDC</i> . Mutagénesis SOS.
<i>mucAB</i>	Similar a <i>umuDC</i> . Mutagénesis SOS.
represores fágicos*	Inducción de profagos.
<i>samAB</i>	Similar a <i>umuDC</i> . Mutagénesis SOS.
<i>tum</i>	Inducción del fago ϕ 186.

*No regulados por LexA pero con un mecanismo análogo de hidrólisis

Modificado de Friedberg, 1995; Walker, 1996; Koch y Woodgate, 1998, Fernández de Henestrosa *et al.*, 2000, Courcelle *et al.*, 2001.

incrementa la capacidad de la célula para sintetizar a través de sitios abásicos y los niveles altos de las proteína RecA y RecN, que son cruciales en el proceso de la reparación recombinativa. Cuando estos procesos no son suficientes para combatir el daño, se activan otros, como la mutagénesis SOS, catalizada por el complejo Umu(D')₂C (Smith y Walker, 1998), o la inhibición de la división celular, debido a la sobreproducción de la proteína SulA. En caso de que el daño persista se puede producir la inducción de plásmidos colicinogénicos y de profagos cuya expresión lisa la célula (Kuzminov, 1999).

1.1.1. Inducción y regulación del sistema SOS

El complejo mecanismo de regulación de este sistema está controlado por las proteínas LexA y RecA, ya mencionadas (Fig. 1.1). En una célula no inducida y en crecimiento normal, los genes llamados *din* (damage-inducible) están reprimidos por la proteína LexA, la cual se une a secuencias operadoras palindrómicas denominadas cajas SOS, que están ubicadas en la región promotora de cada gen u operón. En esta situación algunos de los genes de este sistema presentan una expresión basal significativa, para cumplir diferentes funciones vitales para la célula.

Cuando el DNA es lesionado y, como consecuencia, se inhibe la replicación, se origina una señal intracelular de inducción SOS. Esta señal consiste en regiones de DNA de cadena sencilla (ssDNA) que se generan cuando la célula intenta replicar una región lesionada y la lesión impide la progresión de la síntesis debida a la DNA polimerasa III (Sassanfar y Roberts, 1990) o por la actividad helicasa de la proteína RecBCD sobre la doble cadena de DNA (Chaudhury y Smith, 1985). Esta señal es reconocida por la proteína RecA, la cual pasa a su estado activado RecA* y forma filamentos espirales nucleoproteicos alrededor del DNA en presencia de un nucleósido trifosfato. La proteína LexA reconoce esta estructura, uniéndose a ella, y como fruto de esta interacción se produce la autodigestión de LexA a nivel de sus residuos Ala₈₄ y Gly₈₅. Se generan dos fragmentos polipeptídicos sin actividad, lo cual produce la desrepresión del sistema y la transcripción de los genes SOS.

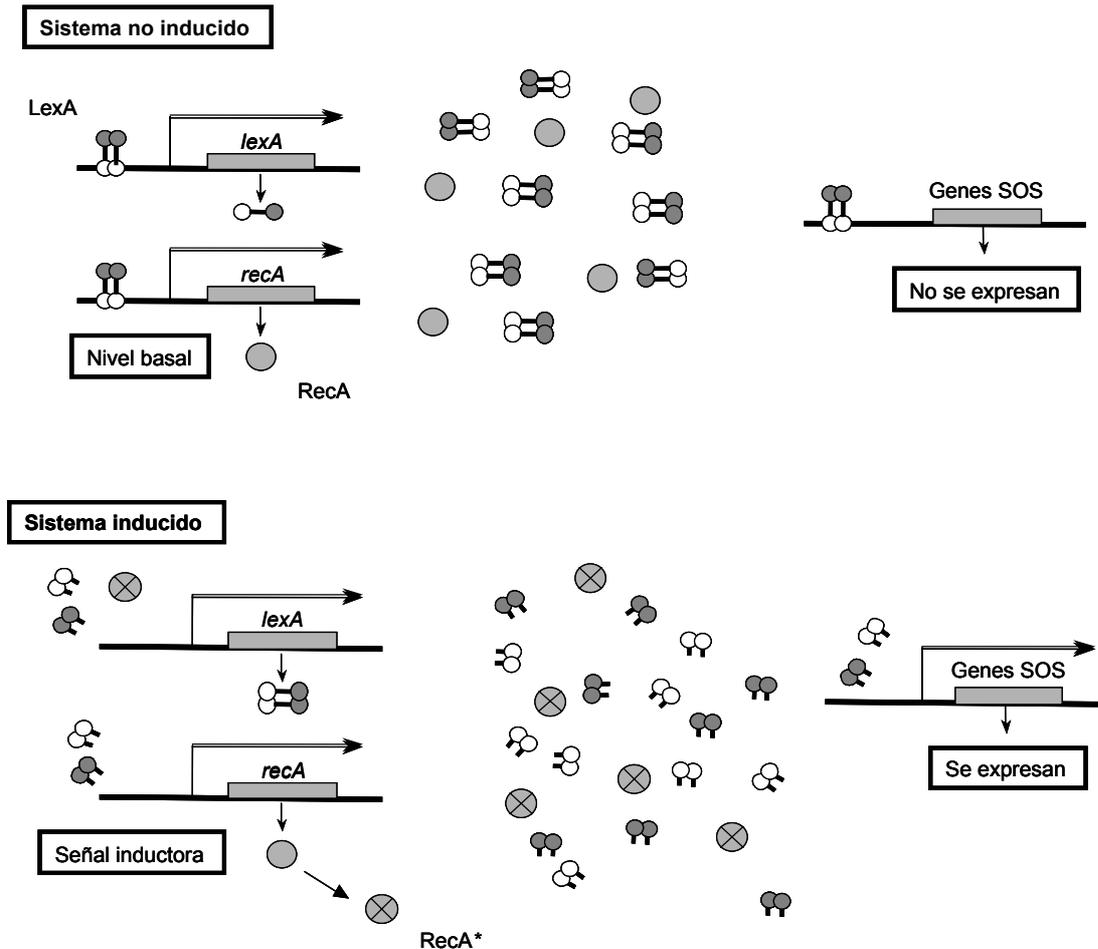


Figura 1.1. Modelo de regulación del sistema SOS en *E. coli*

Mientras mayor sea el nivel de inducción del sistema, más genes se expresarán para producir la respuesta SOS y los procesos de reparación. Finalmente, cuando se repara la lesión y desaparece la señal inductora, la proteína RecA* revierte a su estado normal no activado, se acumula proteína LexA intacta y se produce la represión del regulón SOS, volviendo la célula a un estado no inducido (Friedberg *et al.*, 1995; Walker, 1996; Koch y Woodgate, 1998).

En la inducción del sistema de reparación SOS también intervienen otras proteínas, como son RecFOR que colaboran en la inducción, mejorando la eficiencia de la nucleación de RecA* sobre la cadena sencilla de DNA e intensificando la señal inductora (Whitby y Lloyd, 1995; Kuzminov, 1999) y el complejo RecBCD que tiene actividad helicasa y participa en la generación del ssDNA (Kogoma, 1997; Churchill *et al.*, 1999). Además, la proteína SSB

participa en la formación de la interacción entre el ssDNA, el nucleósido-fosfato y la proteína RecA, produce la activación de dicha proteína y mejora su actividad, lo que permite la extensión de complejo ternario (ssDNA, RecA, ATP) por la disrupción de regiones del ssDNA que normalmente no son accesibles debido a su estructura secundaria. La proteína SSB además tiene una función de regulación, pues también compite con RecA por el DNA de cadena sencilla e inhibe la nucleación del filamento (Rehrauer y Kowalczykowski, 1996; Bork *et al.*, 2001).

1.1.2. La proteína RecA

El producto del gen *recA* es una proteína multifuncional altamente conservada entre las bacterias, lo cual ha permitido realizar estudios filogenéticos mediante la comparación de su secuencia por el método SSPA (*significant segment pair alignment*) (Karlin *et al.*, 1995) y de conservación evolutiva, basándose en la estructura y funciones de la misma (Karlin y Brocchieri, 1996).

La proteína RecA de *E. coli* está ampliamente descrita y caracterizada (Ogawa *et al.*, 1979; Sancar *et al.*, 1980). Tiene un peso molecular de 37.8 kDa y está constituida por 352 residuos. Esta proteína está codificada por el gen *recA*, que no forma parte de ningún operón, localizándose en una zona del cromosoma en la que se encuentran genes *housekeeping* y metabólicos (Horii *et al.*, 1980) y está flanqueado por los genes *recX* y *alaS*. El gen *recA* mantiene la expresión de la proteína RecA a un nivel basal relativamente alto de entre 1000 y 10000 monómeros por célula, que en estado inducido puede aumentar entre 20 y 50 veces (Kuzminov, 1999).

Cumple diferentes funciones en procesos celulares importantes como la recombinación homóloga, la regulación de la expresión de los genes del sistema SOS y la mutagénesis SOS, que da lugar a un tipo de reparación de DNA altamente mutagénica (Fig. 1.2). Para realizar todas estas funciones, esta proteína participa en diferentes procesos bioquímicos: a) apareamiento homólogo e intercambio de bases; b) actividad coproteasa dependiente de

ATP y de DNA frente a proteínas; y c) interacción con factores proteicos mutagénicos que facilitan la reparación tendente al error en lesiones de DNA (Bianco y Kowalczykowski, 2001).

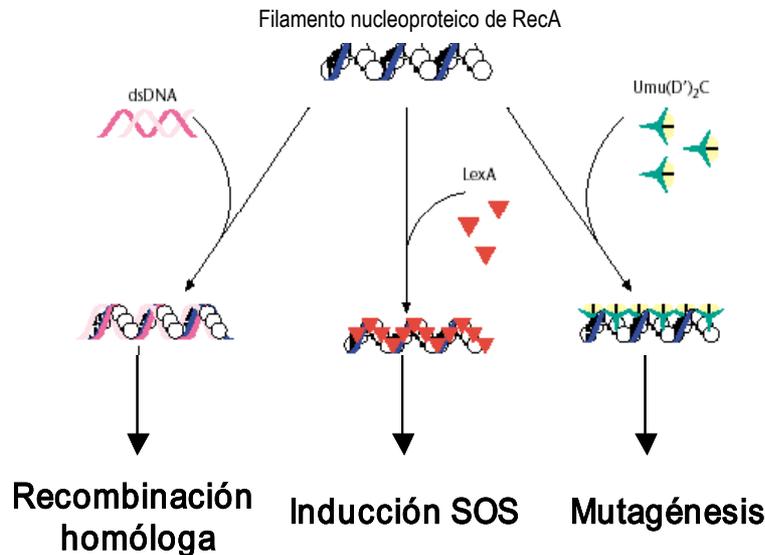


Figura 1.2. Roles del filamento nucleoproteico de RecA en el metabolismo del DNA. El esquema indica las diferentes funciones mutuamente exclusivas de la proteína RecA.

Modificado de Rehrauer *et al.*, 1998.

La proteína RecA participa en la catálisis de la recombinación homóloga, proceso en el cual dos moléculas homólogas de DNA se aparean e intercambian regiones de sus cadenas. Su forma funcional para este proceso es la de un filamento extendido que rodea al ssDNA, llamado filamento presináptico. Este filamento tiene dos sitios de unión, uno primario que es necesario para la relación con el ssDNA, y el sitio secundario, que está localizado fuera del eje central del filamento y que es responsable de la unión al dsDNA entrante y, después del intercambio, se une también al producto obtenido en la reacción, en forma de DNA de cadena sencilla. En este proceso se distinguen tres fases:

- a) La presinapsis, en la que la proteína RecA se une a la cadena sencilla de DNA y forma el complejo nucleoproteico activo con la ayuda del producto del gen *ssb*, dando lugar a la formación del sitio de unión secundario en dicho complejo. En esta fase, la presencia de

determinadas secuencias de DNA también tiene importancia en el posicionamiento de las moléculas de RecA. Así, cada monómero está interactuando con tres nucleótidos (Volodin y Camerini-Otero, 2002).

- b) La sinapsis, durante la cual se produce la unión del DNA de doble cadena al filamento, se forma la molécula de unión intermedia y comienza la búsqueda de homología, hasta que se produce el apareamiento de las cadenas. El heterodúplex de doble cadena ocupa el sitio primario de unión y el ssDNA desplazado pasa al sitio secundario. Se pueden formar dos tipos de uniones, una paranémica, en que la unión es a nivel interno del dúplex de DNA, y otra plectonémica, en que la unión se realiza en los extremos del dúplex de DNA. Las uniones paranémicas se forman más frecuentemente y constituyen productos intermedios hasta la formación de uniones más estables como son las plectonémicas.
- c) La extensión del heterodúplex de DNA, posterior a la formación de la unión plectonémica, se produce por migración de las cadenas y empieza con el intercambio, lo que origina la formación de un círculo de doble cadena cortado. La migración se realiza en sentido 5'→3' con relación a la cadena sencilla a la que está unida, a una velocidad de 2-10 pb s⁻¹, requiere la hidrólisis de ATP e induce estrés torsional en el DNA de doble cadena. Cuando la reacción se ha completado, la proteína RecA se disocia de los productos formados, precisándose la hidrólisis del ATP.

La actividad coproteasa de la proteína RecA le otorga un papel importante en la regulación del sistema SOS y en otros procesos de la reparación del DNA. Su función es estimular la rotura autocatalítica de varias proteínas. Así, está la acción de RecA* frente al represor LexA, explicada anteriormente en el apartado 1.1.1, que conduce a la inducción de los genes del regulón SOS.

Otro tipo de proteínas sobre las que RecA* tiene actividad coproteasa son algunos represores de fagos, como el represor CI del fago λ, que frente al daño severo del DNA se autohidroliza y tiene lugar la inducción de profagos. (Mustard y Little, 2001).

Finalmente, el último grupo de sustratos de RecA* son algunas proteínas mutagénicas, como UmuD, cuya autohidrólisis es indispensable para que se realice la mutagénesis SOS o reparación tendente al error. Este es el último recurso con que cuenta la célula para asegurar su supervivencia frente a una lesión que no ha podido ser resuelta por otros procesos. En este caso, la lesión es detectada por la DNA polimerasa III y, ante la imposibilidad de repararla, se detiene la replicación hasta que se produce la reparación tendente al error, para lo cual se requiere una polimerasa capaz de insertar un nucleótido incorrecto frente a la lesión, produciendo de esta manera una mutación, pero permitiendo que continúe la síntesis normal de DNA. Este proceso requiere de altas cantidades de las proteínas UmuD y UmuC que en condiciones normales se expresan a muy bajos niveles. Cuando el sistema se induce frente a un daño del DNA se desreprime el operón *umuDC*, con lo cual aumenta el nivel intracelular de las proteínas UmuD y UmuC. La proteína RecA* cataliza la proteólisis de UmuD a su forma activa UmuD' (Nohmi *et al.*, 1988) y se forma el complejo Umu(D')₂C, que se une a la región del DNA donde se ha producido la lesión, con la intervención de RecA* (Ekaterina *et al.*, 1993). Se había descrito que en este punto dicho complejo actuaba sobre la polimerasa III, obligándola a realizar la síntesis translesión (Rehrauer *et al.*, 1998; Smith y Walker, 1998), pero recientemente se ha demostrado la existencia de la polimerasa V, producto de los genes *umuD* y *umuC*, que está formada por un heterotrímero del complejo UmuD'₂C y es la responsable de la síntesis translesión (Tang *et al.*, 1999; González y Woodgate, 2002). La polimerasa V también ha sido descrita solamente como el producto del gen *umuC* (Reuven *et al.*, 2000) que interactúa en este proceso con el filamento nucleoproteico de RecA mediado por UmuD'₂. Otro elemento indispensable en el sistema es la presencia de SSB, que facilita la formación del filamento nucleoproteico de RecA* y la unión de éste a la cadena de ssDNA. Se ha descrito además la posibilidad de que SSB esté formando un complejo junto a RecA* que se une al DNA, lo cual sería un requisito para que se produzca el "bypass" de la lesión (Reuven *et al.*, 2001). No está determinado exactamente el mecanismo de acción de la proteína RecA* en este proceso, pero existen diferentes posibilidades. La proteína UmuD y la molécula de DNA podrían

estar compitiendo por la misma región de unión en el filamento nucleoproteico de RecA (Rehrauer *et al.*, 1996; Harmon *et al.*, 1996; Rehrauer *et al.*, 1998), o bien, RecA intervendría como un cebo para situar a las proteínas Umu frente al ssDNA lesionado (Smith y Walker, 1998).

Estructuralmente, el filamento nucleoproteico activado es un complejo helicoidal regular formado por seis monómeros de RecA por vuelta que constituyen un polímero que rodea la cadena sencilla de DNA, aunque en algunos casos puede estar rodeando a DNA de doble cadena, y es la unidad central y funcional de esta proteína. Este filamento tiene como característica relevante la presencia de un surco helicoidal largo. Uno de los lados de este surco es liso, mientras que el otro es irregular debido a las prominencias de los monómeros individuales. Precisamente, en este lugar se encuentra el sitio de unión del filamento al represor LexA y también al DNA de doble cadena, entre los que se ha demostrado que hay una competencia (Rehrauer *et al.*, 1996; Harmon *et al.*, 1996), lo cual indica que la recombinación y la actividad coproteasa de la proteína RecA compiten entre sí (Fig. 1.3).

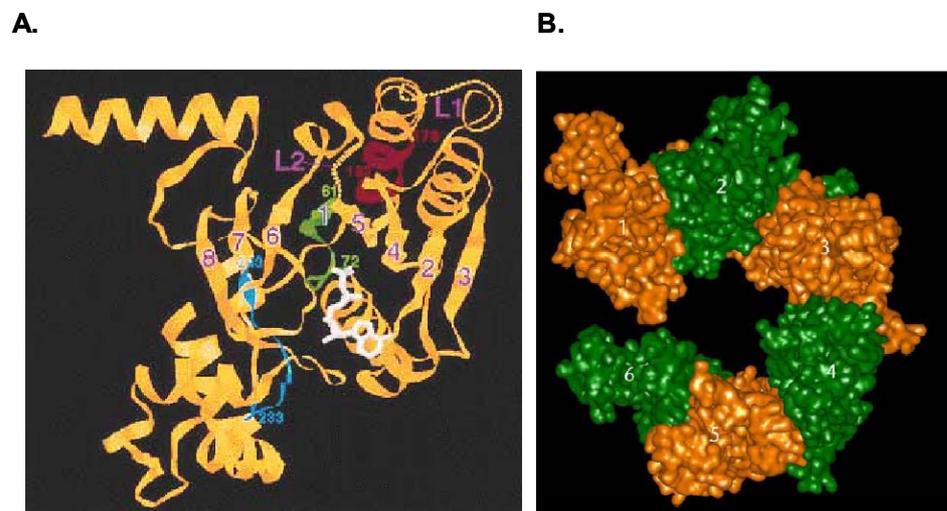


Figura 1.3. Estructura de la proteína RecA. A: Estructura tridimensional del monómero de la proteína RecA. Las cadenas β están numeradas del 1-8 y los "bucles 1 y 2" están también indicados. B: Estructura de una sola vuelta del surco helicoidal de la proteína RecA, formada por seis monómeros.

Modificado de Rehrauer y Kowalczykowski, 1996; Bianco y Kowalczykowski, 2001.

Se ha descrito la estructura cristalina de esta proteína por resolución atómica y se ha determinado que está formada por diferentes dominios. El dominio central (aminoácidos 36-266 \pm 4) contiene la región de unión a nucleótidos y dos regiones de baja densidad electrónica, el “bucle 1” y el “bucle 2”, que están involucrados en la unión al DNA. Este dominio central está flanqueado por dos subdominios pequeños en las regiones amino-terminal (1-36 \pm 8) y carboxi-terminal (266-352) (Story *et al.*, 1992; Rehrauer y Kowalczykowski, 1996). A continuación se describen los diferentes dominios funcionales relacionados con las actividades que desempeña (Karlin y Brocchieri, 1996):

- a) Dominios de unión a nucleótidos e hidrólisis. Son dos dominios altamente conservados que se encuentran en la región de unión A comprendida entre los residuos 66-73 (GPESGKT) y la región B comprendida en los residuos 140-144, que se encargan, respectivamente, de la unión a ribonucleósido trifosfatos (NTPs) y de la hidrólisis del ATP.
- b) Dominios de unión a DNA. Se proponen como los posibles sitios de unión del DNA a la proteína los denominados “bucle 1” (156-165) y “bucle 2” (194-210), que se encuentran en la zona central de la proteína y forman plegamientos. Además podrían haber otros residuos importantes fuera de esta región, como son los residuos 61-72, 178-183 y 233-243 que cumplirían también funciones de unión al DNA (Rehrauer y Kowalczykowski, 1996).
- c) Dominios de interacción monómero-monómero y entre filamentos. Como se ha descrito la proteína RecA forma oligómeros, resultantes de interacciones hidrofóbicas entre los diferentes monómeros a lo largo de toda la proteína. Los residuos implicados en la interacción entre filamentos se encuentran en zonas alejadas de cada monómero, en sus regiones N- y C-terminal y son 37-38 y 298-301, respectivamente.
- d) Dominios de unión a LexA y a otras proteínas (*target protein binding domain*). Los residuos activos para la unión de RecA al represor LexA y a otras proteínas como UmuD y represores fágicos, son los aminoácidos 229 y 243. El aminoácido 243 es un sitio de unión por el

cual compiten el DNA y la proteína LexA. Adicionalmente, se ha descrito que se encuentra involucrada en la unión a LexA también la región correspondiente al “bucle 1”, propuesta como una región de unión al DNA (Yu y Egelman, 1993).

1.1.3. La proteína LexA

En *E. coli*, el gen *lexA* codifica una proteína de 202 aminoácidos y de un peso molecular de 22.7 kDa ampliamente descrita y caracterizada (Horii *et al.*, 1981). Esta proteína cumple la función de represor transcripcional de los genes del sistema SOS, incluyendo a *lexA* y *recA* (Little *et al.*, 1981; Brent y Ptashne, 1981). La proteína LexA actúa uniéndose a una región específica localizada en la región promotora de estos genes, denominada caja SOS. Dicha caja es un palíndromo perfecto cuya secuencia consenso es 5'-TACTGT(AT)₄ACAGTA-3' (Walker, 1984; Wertman y Mount, 1985). La proteína LexA tiene la capacidad de formar dímeros y de autorrotura a un pH básico o en presencia de la proteína RecA* como catalizador.

Generalmente, cada gen del regulón tiene una sola caja SOS, pero en algunos casos pueden haber dos (*lexA* entre otros) y hasta tres (*recN*) regiones operadoras (Schnarr *et al.*, 1991). Cada una de las bases del motivo consenso tiene un diferente grado de importancia, siendo las más conservadas entre los genes regulados por LexA: **CTGT-N₈-ACAG** (Tabla 1.2). La región específica del operador que se une a la proteína es **CTGTNNNN** (Knegtel *et al.*, 1995).

El represor se une a la región promotora de los diferentes genes, lo que sugiere que la proteína actúa inhibiendo la iniciación de la transcripción, al impedir la unión de la RNA polimerasa (Brent y Ptashne, 1981). El grado de represión de la proteína LexA frente a los diferentes genes es variable y depende de la localización exacta de las regiones operadoras con respecto al inicio de la transcripción (ATG), los posibles cambios de bases frente a la caja consenso, el número de cajas presentes y la fuerza de la interacción

Tabla 1.2. Genes cromosómicos de *E. coli* regulados por LexA y las secuencias de sus cajas SOS correspondientes

Genes ¹	Caja SOS
<i>dinA</i> (<i>polB</i>)	G ACTGT TATAAAA ACCACAGCC
<i>dinB</i> (<i>dinP</i>)	C ACTGT TACTTTA CCAGTG
<i>dinD</i> (<i>pscA</i>)	A ACTGT TATATAAAT ACAGTT
<i>dinG</i>	TAT TTGG CTGTTTATA ACAGTA
<i>dinI</i>	AC CTGT TATAAATA ACCAGTA
<i>dinL</i> (<i>sosC</i> , <i>yjiW</i>)	T ACTGA TGATATATA ACAGGT
<i>dinM</i> (<i>sosD</i> , <i>ydjQ</i>)	C ACTGG ATAGATA ACCAGCA
<i>dinO</i> (<i>sosF</i> , <i>molR</i>)	A ACTGG ATAAAAT ACAGGG
<i>dinQ</i>	T ACTGT ATGATTAT CCAGTT
<i>dinS</i>	AG CTGT ATTTGTCT CCAGCA
<i>ftsK</i> (<i>dinH</i>)	TC CTGT TAATCCATA ACAGCA
<i>hokE</i> (<i>ybdY</i>)	C ACTGT TATAAATA ACAGCT
<i>lexA/dinf</i> (1)	TG CTGT TATATACT ACAGCA
<i>lexA/dinf</i> (2)	TG CTGT TATATAC ACCAGGG
<i>recA</i>	T ACTGT ATGCTCAT ACAGTA
<i>recN</i> (1)	T ACTGT ATATAAAA CCAGTT
<i>recN</i> (2)	T ACTGT ACACAATA ACAGTA
<i>recN</i> (3)	TA ATGG TTTTTTCATA ACAGGA
<i>ruvAB</i>	CG CTGG ATGTCTAT CCAGCA
<i>sbmC</i>	T ACTGT ATATAAAA ACAGTA
<i>ssb</i>	AC CTGA ATGAATATA ACAGTA
<i>sulA</i> (<i>sfiA</i>)	T ACTGT ACATCCATA ACAGTA
<i>umuDC</i>	T ACTGT ATATAAAA ACAGTA
<i>uvrA</i> (<i>dinE</i>)	T ACTGT ATATTCAT TCAGGT
<i>uvrB</i>	A ACTGT TTTTTTTAT CCAGTA
<i>uvrD</i>	AT CTGT ATATATA CCAGCT
<i>ybfE</i>	A ACTGA TTAAA ACCAGCG
<i>ydjM</i> (1)	T ACTGT ACGTATCG ACAGTT
<i>ydjM</i> (2)	C ACTGT TATAAAAAT CCTATA
<i>yebG</i>	T ACTGT TATAAAAAT ACAGTT
<i>ysdAB</i>	C ACTGT TTATTTTATA ACAGTA
Consenso	T ACTGT ATATATATA ACAGTA

Las bases en negrita corresponden a los motivos más conservados.

Las bases en negrita y subrayadas corresponden a desviaciones de los motivos conservados CTGT, ACAG.

Modificado de Fernández de Henestrosa *et al.*, 2001.

operador-represor. Mientras mayor sea la afinidad del represor por la caja, mayor será el nivel de represión y más difícil será que se produzca la desrepresión de ese gen (Schnarr *et al.*, 1991). Así, genes como *lexA*, *recA* y los *uvr* tienen menor afinidad y son los primeros en ser desreprimidos, mientras que otros como *sulA* o el operón *umuDC* tienen mayor afinidad y son los últimos en ser desreprimidos.

Esta proteína está constituida por dos dominios, unidos por una región conectora:

- a) El dominio amino-terminal incluye los residuos 1-72, es el motivo de unión al DNA y tiene una estructura similar al motivo canónico HTH (*helix-turn-helix*), presente en muchas proteínas reguladoras (Pabo y Sauer, 1984; Harrison y Aggarwal, 1990; Schnarr *et al.*, 1991). Por estudios de resonancia magnética nuclear, se ha determinado que esta región tiene una estructura de tres hélices α en los residuos 6-21, 28-35 y 40-52, denominadas I, II y III y dos cadenas β antiparalelas, entre los residuos 50-58 y 66-68 (Fogh *et al.*, 1994). El sitio de reconocimiento del DNA se encuentra entre las hélices II y III, y precisamente en esta última se realiza la interacción con la secuencia operadora de los genes SOS (Thliveris y Mount, 1992). Estudios realizados comparando los datos obtenidos por métodos biofísicos y bioquímicos y programas informáticos, han permitido desarrollar un modelo de la interacción del represor LexA con el dominio de unión al DNA (Knegtel *et al.*, 1995). Se establece que la región del represor se sitúa en el surco mayor del DNA y se forman interacciones mediante puentes de hidrógeno entre los residuos Glu₄₅, Glu₄₄ y Asn₄₁ y el motivo CTGT. Adicionalmente se observan interacciones hidrofóbicas entre el DNA y los residuos Ser₃₉, Asn₄₁ y Ala₄₂. Otros aminoácidos están también implicados en contactos inespecíficos (Arg₇, Glu₈, Arg₃₈, Ser₆₀ y Arg₆₄) y hay otros residuos involucrados que aunque no intervienen directamente en la interacción entre el DNA, el operador y el represor ayudan a mejorar la unión, estabilizando la dimerización de la proteína (Fig. 1.4) (Knegtel *et al.*, 1995).

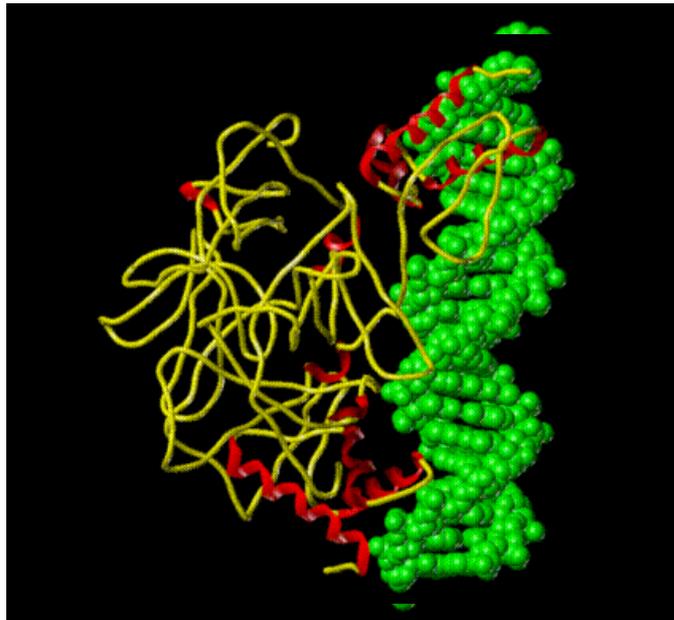


Figura 1.4. Modelo de la unión del dímero de LexA al DNA

Ref. http://www.rtc.riken.go.jp/jouhou/image/dna-protein/all/small_N1qaa.gif

- b) La región conectora abarca desde el aminoácido 73 al 94 y contiene los residuos Ala₈₄ y Gly₈₅, donde se produce la rotura de la proteína LexA.
- c) El dominio carboxi-terminal está comprendido entre los residuos 95 al 202 y está implicado en los procesos de rotura, formación del dímero de la proteína previo a la unión con el DNA y la interacción con la proteína RecA*. Esta región y parte de la conectora son parecidas al represor CI del fago λ y a la proteína UmuD (Battista *et al.*, 1990), entre otras. Estas proteínas comparten propiedades en cuanto a la interacción con la proteína RecA* y su capacidad de autólisis. Sin embargo, se ha demostrado que la autohidrólisis de estas proteínas se realiza por mecanismos parecidos pero no idénticos entre sí (McDonald *et al.*, 1998; Mustard y Little, 2000). En esta región se encuentran los aminoácidos Ser₁₁₉ y Lys₁₅₆ que también intervienen en la hidrólisis específica del represor (Slilaty y Little, 1987; Slilaty y Vu, 1991).

Generalmente, la proteína LexA está en forma monomérica en solución, pero su estructura activa y funcional es la de un dímero, indispensable para la unión de la proteína al DNA (Fig. 1.5). El proceso de dimerización se lleva a cabo en dos pasos. En primer lugar, se produce la unión de un monómero del represor, a nivel de su dominio carboxi-terminal, al motivo **CTGT** de la región operadora. El siguiente paso es la unión de otro monómero al motivo **ACAG** del operador por una interacción previa entre las dos moléculas proteicas (Kim y Little, 1992).

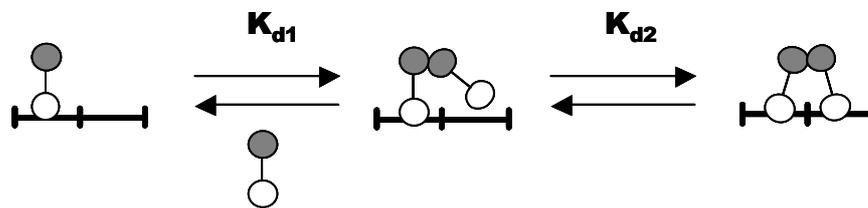


Figura 1.5. Modelo de dimerización de la proteína LexA y su unión a la caja SOS. El dominio N-terminal está representado por un círculo blanco y el C-terminal por un círculo gris.

Modificado de Kim y Little, 1992.

En el proceso de autohidrólisis de la proteína LexA (Fig. 1.6) no se ha explicado exactamente cómo se produce la interacción entre la región conectora y el centro catalítico, pero se esperaría que estas dos regiones claves estuvieran cercanas espacialmente y la unión se produjera solamente cuando hubiera un realineamiento sutil de los grupos dentro del complejo. Contrariamente, se ha postulado que estas regiones estarían más alejadas y que se necesitaría un cambio conformacional para que ambas se aproximen y pueda producirse la unión y la posterior rotura (Shepley y Little, 1996). Se ha propuesto que la autohidrólisis de LexA se debe a una desprotonización del grupo amino del residuo Lys₁₅₆, el cual sustrae un protón del grupo hidroxilo de la Ser₁₁₉, lo cual produce un ataque nucleofílico del enlace peptídico situado entre los aminoácidos Ala₈₄ y Gly₈₅ (Slilaty y Little, 1987).

1.1.4. Funciones de los genes SOS

Como ya se ha mencionado, el regulón SOS cumple muchas funciones relacionadas con los procesos de reparación del daño de DNA, para garantizar la supervivencia de la célula. Las principales funciones son la reparación, la mutagénesis SOS, la inhibición de la división celular y la inducción de profagos.

1.1.4.1. Reparación

Según el tipo de lesión sobre el DNA y el nivel de daño pueden actuar diferentes mecanismos de reparación. De entre ellos, la reparación por escisión de nucleótido y por recombinación son funciones del sistema SOS.

- **Reparación por escisión de nucleótido**

Es un mecanismo de reparación de alta fidelidad, ya que elimina la lesión y la sustituye por la secuencia original, utilizando como molde una cadena de DNA intacta. Las lesiones que se reparan con este sistema incluyen las producidas por agentes físicos, como la radiación UV, y diferentes agentes químicos (Friedberg *et al.*, 1995).

Este mecanismo de reparación necesita de los productos de los genes *uvrA*, *uvrB*, *uvrC* y *uvrD*, de la DNA polimerasa I y de la DNA ligasa y de entre éstos solamente los genes *uvrA*, *uvrB* y *uvrD* pertenecen al regulón SOS. Se ha propuesto que la reparación se realiza en tres etapas:

- unión a DNA y reconocimiento del daño
- escisión de la cadena lesionada
- síntesis de la nueva cadena

Un dímero de la proteína UvrA recorre la cadena de DNA y la rastrea hasta encontrar el daño, cambia su conformación y se produce la torsión de esa región del DNA, lo cual permite su interacción con la proteína UvrB,

formándose un complejo UvrA₂B. Utilizando la energía de la hidrólisis del ATP, la actividad helicasa de la proteína UvrB abre la doble cadena y se forma un complejo de preincisión entre el DNA y UvrB, liberándose el dímero UvrA₂.

El siguiente paso consiste en la escisión de la cadena lesionada, para lo cual se requiere la interacción entre UvrC y el complejo formado por UvrB y el DNA. Se producen dos incisiones, una corta en el octavo enlace fosfodiéster en dirección 5' con respecto a la lesión y otra a nivel del cuarto enlace fosfodiéster en dirección 3' con respecto a la lesión. La primera incisión se produce en 3' por la acción endonucleasa de la proteína UvrB, mientras que la segunda en 5' es catalizada por UvrC. Se libera el fragmento que contiene la lesión y se separa la proteína UvrC, permitiendo la entrada de otra nueva proteína, UvrD (helicasa II).

Finalmente, por acción de la helicasa II y la DNA polimerasa I se produce la síntesis reparadora de la nueva cadena, en presencia de dinucleósido-trifosfatos (dNTPs). Para esto, la proteína UvrB es desplazada por la DNA polimerasa I. Por último, el nuevo fragmento se une al resto de la cadena por acción de la DNA ligasa.

Este proceso normal de reparación por escisión de nucleótidos se denomina, *short patch repair*. Sin embargo, en algunas ocasiones (10%), este sistema falla y se produce el denominado *long patch repair* que se diferencia del anterior, porque los parches de reparación son mucho mayores a los habituales de 12 nucleótidos, pudiendo llegar hasta los 1500 nucleótidos.

- **Reparación por recombinación**

Este es un proceso que se pone en marcha cuando en el DNA hay lesiones frente a las que la DNA polimerasa no puede continuar su funcionamiento normal y tiene que “saltar”, dejando un hueco de unas 1000 bases en la cadena que estaba replicando. Como resultado de este proceso quedará una discontinuidad en la doble cadena o huecos postreplicativos en las

cadenas hijas. Por esto, no se podrá realizar una reparación por replicación, ya que no se cuenta con una cadena de molde intacta. Mediante el proceso de reparación por recombinación la célula es capaz de continuar la replicación de una de las cadenas y, a partir de aquí ya se podrá realizar la reparación de la lesión, mediante otras vías.

Además del papel que cumplen las proteína RecA y SSB en el proceso de recombinación, también participan otros mecanismos. Las dos vías más importantes para reparar daños de doble cadena en la fase presináptica son la vía RecBCD y la vía RecF. En la primera está implicado el producto de los genes *recBCD* que tiene actividad ATPasa, DNA-helicasa, dsDNA- y ssDNA-exonucleasa y endonucleasa. Precisamente, la exonucleasa V en la fase presináptica, degrada los extremos de la doble cadena hasta que una región Chi correctamente orientada convierte la RecBCD degradada en una RecBCD* recombinasa, la cual sigue su actividad degradada en una sola cadena, generando un extremo 3' libre, que permite a la proteína RecA continuar con la sinapsis (Friedberg, 1995; Kogoma, 1997; Churchill *et al.*, 1999; Kuzminov, 1999). La segunda vía, la de RecF, está relacionada con la reparación replicativa y la replicación en plásmidos, y representa sólo una pequeña parte de la replicación cromosómica e interviene en la reparación de huecos de cadenas hijas. Participan los productos de los genes *recF*, *recJ*, *recO*, *recN*, *recQ* y *recR*. En la fase previa a la sinapsis, el complejo RecOR, con la participación del complejo RecFR, interviene sobre las cadenas hijas acomplejadas con la proteína SSB, permitiendo la acción polimerasa de la proteína RecA sobre estas cadenas hijas y que ésta pueda realizar la recombinación. Aparte de *recA* y *ssb*, solamente el gen *recN* está regulado por LexA (Friedberg, 1995; Kuzminov, 1999).

Otras vías menos importantes actúan en casos especiales. Por ejemplo la de RecE, que se activa en mutantes *sbcA* relacionados con la presencia del fago críptico Rac, en la que participa la exonucleasa VIII (producto del gen *recE*) junto con la proteína RecT (Kuzminov, 1999) o la vía SbcBC, que participa en la eliminación de estructuras concretas.

En la fase postsináptica intervienen también dos vías adicionales, que participan en el proceso de *branch migration*, llevado a cabo por el producto del gen *recG*, la RecG helicasa, y más frecuentemente por el producto de los genes *ruvABC*, el resolvasoma RuvABC. De estos genes solamente *ruvA* y *ruvB* están regulados por LexA (Friedberg, 1995; Kogoma, 1997; Kuzminov, 1999).

1.1.4.2. Mutagénesis SOS

La mutagénesis SOS, síntesis translesión o reparación tendente al error, indicada anteriormente, es un mecanismo relacionado con el sistema SOS, que tiene lugar cuando el nivel de daño en el DNA es muy alto y permitirá que la célula continúe con la replicación, a pesar de no haber reparado las lesiones. La célula podrá continuar sus procesos normales y será en etapas posteriores cuando reparará las lesiones. Sin embargo, éste es un proceso que tiene una alta tasa de mutagénesis y su mecanismo ha sido descrito con detalle en el apartado 1.1.2 de esta memoria (Friedberg, 1995; Walker, 1996; Koch y Woodgate, 1998; Smith y Walker, 1998). En este proceso están involucradas varias proteínas como RecA, UmuD y UmuC cuyos genes están regulados por LexA.

1.1.4.3. Otras funciones de SOS

Entre otras funciones que forman parte de la respuesta SOS, está la inhibición de la división celular, que se produce cuando el daño del DNA es persistente y no ha podido ser reparado. La célula continúa elongándose, pero no puede septarse por lo que forma filamentos. El producto del gen *sulA*, regulado por LexA, es el inhibidor de la septación y actúa bloqueando la actividad de FtsK, de manera que la célula no puede dividirse y se produce una filamentación transitoria, cuya función podría ser retardar la división celular mientras se repara el daño. La proteína SulA es muy inestable y solamente se puede observar una acumulación de la misma cuando el sistema está totalmente inducido (Huisman y D'Ari, 1981; Walker, 1996).

Finalmente, otra función del sistema SOS, en caso de daño severo, es la inducción de profagos. Éstos no están regulados por la proteína LexA, pero en un sistema inducido, la proteína RecA* tiene la capacidad de catalizar la autohidrólisis de varios represores de los genes líticos de algunos profagos, tales como λ , $\phi 80$ y 434, con lo que se induce el ciclo lítico que provoca la muerte celular (Sauer *et al.*, 1982). Tal es el caso del represor CI del fago λ , ampliamente estudiado y que presenta similitudes con las proteínas LexA y UmuD en su mecanismo de autohidrólisis dependiente de RecA* (Mustard y Little, 2000).

1.2. El sistema SOS en otros microorganismos

A pesar de que se ha tomado como modelo de estudio el sistema SOS en *E. coli*, en los últimos años se han hecho grandes avances en el conocimiento de este sistema en otros microorganismos (Eisen y Hanawalt, 1999). Se ha demostrado la existencia de esta red en otros organismos y se han encontrado diferencias y también similitudes entre las diferentes especies bacterianas. En general, se puede decir que la existencia del sistema de reparación SOS o algún sistema similar es generalizado entre los distintos grupos bacterianos, en arqueobacterias e incluso en eucariotas como *Saccharomyces cerevisiae*.

1.2.1. El gen *recA*

El producto del gen *recA* es una proteína ubicua en el dominio Bacteria y una de las más conservadas entre los microorganismos de este dominio, lo que sugiere un origen ancestral.

A través de diferentes estrategias se ha aislado e identificado la proteína RecA de diversas especies bacterianas. Así, mediante la complementación específica (Roca y Cox, 1990) de mutantes RecA(Def) de *E. coli*, en presencia de agentes mutagénicos, se han aislados los genes *recA* de *Pseudomonas aeruginosa* (Sano y Kayegama, 1987), *Proteus mirabilis* (Eitner *et al.*, 1981) y *Serratia marcescens* (Liao y Liu, 1989). Para aislar el

gen *recA* de *Rhodobacter sphaeroides* (Calero *et al.*, 1994) se utilizó la misma técnica anterior, pero el mutante era de *P. aeruginosa*, debido a la mayor coincidencia en el contenido de GC de estos microorganismos. Otra técnica utilizada ha sido la hibridación de genotecas, utilizando sondas marcadas de regiones conservadas del gen. Las sondas se escogen en base a la afinidad que puedan tener entre sí los microorganismos. Mediante este método se ha clonado el gen *recA* de *Xanthomonas campestris* (Lee *et al.*, 1996). Otra estrategia ha sido el diseño de oligonucleótidos degenerados de regiones conservadas del gen, basándose, para realizar las variaciones de las secuencias, en el “*codon-usage*” de la especie de la que se quiere clonar el *recA*. Esta técnica ha sido utilizada para clonar el gen *recA* de varios microorganismos alejados filogenéticamente de *E. coli*, como *Lactococcus lactis*, *Mycoplasma pulmonis*, *Mycoplasma mycoides*, *Chlorobium tepidum*, *Streptomyces lividans*, *Corynebacterium tuberculosis*, *Clostridium perfringens*, *Borrelia burgdorferi*, *Thermus aquaticus*, *Thermotoga maritima* y *Aquifex pyrophilus* (Duwat *et al.*, 1992; Angov y Camerini-Otero, 1994; Wetmur *et al.*, 1994; Pogson *et al.*, 1996; Johnston *et al.*, 1997; Gruber *et al.*, 1999).

En los estudios de SSPA (*significant segment pair alignment*) realizados por Karlin y colaboradores (1995) y por Karlin y Brocchieri (1996), mencionados anteriormente, se compararon 63 secuencias de la proteína RecA de 62 especies, las cuales comprenden 37 secuencias de proteobacterias (α , β , γ , δ , ϵ) incluyendo las dos de RecA de *Myxococcus xanthus*, 11 de grampositivas, 3 de micoplasmas, 3 de cianobacterias, 3 de *Deinococcus-Thermus* y 6 de especies no agrupadas, determinándose que el tamaño medio de esta proteína está alrededor de 350 residuos y hallándose una similitud del 43-100% a nivel de aminoácidos entre las diferentes proteínas RecA. Además, en todas ellas hay una alta conservación de diferentes regiones claves de su estructura y funcionamiento. Así, las regiones A y B del dominio de unión a nucleótidos e hidrólisis, la región amino del “bucle 1”, uno de los dominios de unión a DNA, varias regiones de los dominios de interacción monómero-monómero, la región de unión a LexA, especialmente

en las proteobacterias, y en menor grado regiones de interacción entre filamentos son todas ellas muy conservadas. Según estos estudios se pueden separar las proteobacterias de las bacterias grampositivas, clasificándose estas últimas en 6 grupos, tres de alto contenido de G+C y tres de bajo contenido. En el grupo de las proteobacterias, las γ -Proteobacterias se dividen en dos grupos, las que tienen como huéspedes a vertebrados y las que son habitantes habituales del suelo. Las α -Proteobacterias están agrupadas en dos clases, las que interactúan con plantas y las bacterias fotosintéticas de vida libre. Las β -Proteobacterias comprenden un grupo menos coherente y difícil de clasificar. Por otro lado, quedan emparentadas con otros grupos, aunque en menor grado, las δ - y las ϵ -Proteobacterias, los micoplasmas, las cianobacterias, el grupo *Deinococci*, los termófilos, algunos de los cuales están relacionados con el grupo *Deinococci*, y el resto de microorganismos no clasificados utilizados en dichos estudios.

1.2.2. El gen *lexA*

El otro regulador importante del sistema SOS, es el producto del gen *lexA*, el cual está presente en varias especies bacterianas, estando en algunas más conservado que en otras. En cambio, otras especies bacterianas carecen de este gen, posiblemente por una pérdida del mismo a lo largo de la evolución, tal como sucede en *Aquifex aeolicus*, *Borrelia burgdorferi*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori* y *Porphyromonas gingivalis*. Aparentemente, las especies de arqueobacterias carecen también de este gen, habiéndose sugerido que en estos microorganismos podría existir otro tipo de regulación transcripcional que estaría controlando una respuesta análoga a la SOS (Eisen y Hanawalt, 1999).

En general, clonar el gen *lexA* presenta más dificultades que clonar los genes *recA*, ya que la presencia del gen *lexA* en un plásmido portador no le confiere a la célula portadora ninguna característica selectiva. Sin embargo, en nuestro laboratorio se desarrolló un sistema que permite clonar, por

selección directa, genes *lexA* que reconozcan la misma caja SOS que la de *E. coli*. El sistema se basa en la represión que ejerce la proteína LexA sobre el gen *sulA*, cuyo producto se caracteriza por producir toxicidad y muerte celular, si su expresión génica es constitutiva. Si se construye una genoteca del microorganismo problema en un vector plasmídico que contenga un gen *sulA* funcional y se introduce en células de *E. coli* LexA(Def), SulA(Def), las células supervivientes serán las que hayan sido capaces de incorporar un gen *lexA* funcional (Calero *et al.*, 1991). Más recientemente y gracias a los proyectos de secuenciación de genomas microbianos es posible la identificación de secuencias génicas de este gen o análogos en diferentes microorganismos.

En general, los represores LexA tienen regiones muy conservadas, tales como su dominio N-terminal, involucrado en la unión a DNA, la región cercana al sitio de lisis Ala-Gly (Ala₈₄-Gly₈₅ en *E. coli*), la región C-terminal, envuelta en la dimerización y catálisis de la autohidrólisis, y también los residuos catalíticos Ser y Lys (Ser₁₁₉-Lys₁₅₆ en *E. coli*) que se mantienen a distancias relativamente constantes para que se pueda producir la autodigestión.

Se han descrito muchos microorganismos con operadores en las regiones promotoras de los genes SOS similares a los de *E. coli*, identificándose cajas SOS iguales a la de esta especie (CTGT-N₈-ACAG) y otras diferentes; aunque en algunos casos no se conserva la organización palindrómica del motivo.

1.2.3. Bacterias gramnegativas y el sistema SOS

- **Grupo γ -Proteobacteria**

Diferentes microorganismos de este grupo, patógenos de animales (vertebrados) o patógenos de plantas y otros cuyo hábitat es el suelo, muy próximos filogenéticamente entre sí y a *E. coli*, tienen un tipo de regulación

similar a la de este microorganismo, presentando la misma caja SOS CTGT-N₈-ACAG. Así, entre los que tienen una caja SOS y una regulación similar a la de *E. coli* están los miembros de diferentes familias, cuyo gen *lexA* fue identificado en nuestro laboratorio con el método antes descrito, como *Salmonella typhimurium*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas putida*, *P. aeruginosa*, *Providencia rettgeri* y *Aeromonas hydrophila* (Calero *et al.*, 1991; Garriga *et al.*, 1992; Riera y Barbé, 1993; Riera y Barbé 1995). Otro microorganismo de este grupo que también tiene este sistema conservado es *Haemophilus influenzae*.

No obstante, recientemente se ha reportado que *Xylella fastidiosa*, un patógeno de plantas, presenta un motivo de unión a la proteína LexA diferente al descrito para las otras γ -Proteobacterias, definiéndose como el palíndromo imperfecto TTAG-N₆-TACTA. Una diferencia importante en la regulación del sistema en esta especie con respecto a *E. coli*, es que sus genes *lexA* y *recA* constituyen una unidad transcripcional única y además que el motivo de unión se encuentra muy cerca del codón de inicio de traducción de este operón. En este estudio se determinó, mediante programas informáticos, la presencia de la secuencia de reconocimiento de LexA en la región promotora de otros genes de *X. fastidiosa*, demostrándose experimentalmente esta unión solamente a uno de estos promotores. Varios genes que pertenecen al regulón SOS en *E. coli*, como *uvrA*, *uvrB*, *ssb*, *ruvAB*, *ftsK*, *dinG*, *recN* y *ybfE* no son regulados por la proteína LexA en *X. fastidiosa*. Adicionalmente se ha encontrado dicho motivo en las regiones promotoras del gen *lexA* de varios microorganismos del orden *Xanthomonadales* (*Xanthomonas campestris*, *X. oryzae*, *Xylella oleander* y *X. almonder*), por lo que se ha propuesto definir a la secuencia TTAG-N₆-TACTA, como el sitio de unión del LexA de dicho orden (Campoy *et al.*, 2002).

- **El grupo α -Proteobacteria**

Este grupo incluye, entre otras, las familias *Rhizobiaceae* y *Rhodobacteriales* que se caracterizan mayoritariamente por ser bacterias de vida libre, cuyo hábitat natural es el suelo y con diferentes características metabólicas. En nuestro laboratorio se ha estudiado el sistema de regulación SOS en varios microorganismos de este grupo, tales como *Rhodobacter sphaeroides*, *Sinorhizobium meliloti*, *R. capsulatus* y *Paracoccus denitrificans* (Fernández de Henestrosa *et al.*, 1998; Tapias y Barbé, 1999; Labazi *et al.*, 1999; del Rey *et al.*, 1999). La caja SOS consenso para el grupo es GTTC-N₇-GTTC o GAAC-N₇-GAAC. Cabe destacar que no se trata de motivos palindrómicos, sino de repeticiones directas y que en algunos promotores de genes SOS puede estar presente más de una caja (Tabla 1.3). La regulación del sistema es parecido a la de *E. coli*, con algunas variaciones. Recientes estudios han demostrado que la proteína LexA de *R. sphaeroides* no solamente cumple un papel de represor, cuando está unida a las dos cajas SOS, sino también de activador del gen *recA*, si está unida solamente a una de las cajas (Tapias *et al.*, 2002).

Otro microorganismo relacionado filogenéticamente al grupo α -Proteobacteria es la cepa MC-1, una bacteria magnetotáctica marina en cuyos promotores de los genes SOS no se ha encontrado el mismo motivo regulador que en el resto de las α -Proteobacterias. Estudios recientes han permitido aislar y purificar su proteína LexA, definiéndose como motivo de unión de esta proteína al DNA el palíndromo perfecto CCT-N₁₀-AGG. Este motivo se encuentra en la región promotora del gen *lexA* y también del operón *umuDC*, pero no en otros genes como *recA*, *recN* y *uvrA-ssb* que forman parte del clásico regulón SOS de *E. coli* (Fernández de Henestrosa *et al.*, 2003).

Tabla 1.3. Análisis comparativo de la caja operadora SOS de bacterias del grupo α *Proteobacteria*

Microorganismo	Gen	Secuencia
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	<i>recA</i> (1)	GTTTCGCCTTAT <u>GATC</u>
	<i>recA</i> (2)*	GTTTCGCCTCAAG GTTTC
	<i>lexA</i> (1)*	GTTCTGCCCCGC GTTTC
	<i>lexA</i> (2)*	GTTACACGCCT GTTTC
	<i>uvrA</i>	GTTCATACTAT GTTTC
	<i>uvrB</i> (1)	<u>GCTC</u> CGCCCTT GTTTC
	<i>uvrB</i> (2)*	<u>GATC</u> CGTTTTT GTTTC
	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	<i>recA</i> (1)
<i>recA</i> (2)*		GTTCTGCTTTC GTTTC
<i>uvrA</i>		GTTCCCTGTTCC GTTTC
<i>Rhodopseudomonas viridis</i>	<i>recA</i> (1)	GTTCTCTTCTT GTTTC
	<i>recA</i> (2)*	<u>GTACACGATTT</u> GTTTC
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	<i>recA</i> (1)*	GTTTCGCAATAT GTTTC
	<i>recA</i> (2)*	<u>GTACCCTATTT</u> GTTTC
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>recA</i> (1)*	GTTCTGCTTTC GTTTC
	<i>recA</i> (2)*	<u>GTACTCTATTT</u> GTTTC
<i>Rhizobium etli</i>	<i>recA</i> (1)*	GTTCTATATTT GTTTC
	<i>recA</i> (2)*	<u>GTACCCTATTT</u> GTTTC
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	<i>recA</i> (1)*	GTTTCGATTCTT GTTTC
	<i>recA</i> (2)*	<u>GTACATGTTTT</u> GTTTC
	<i>uvrA</i>	GTTCTTTTTTT GTTTC
<i>Mesorhizobium loti</i>	<i>recA</i> (1)*	GTTCTTTTTTTC <u>GTAC</u>
	<i>recA</i> (2)*	<u>GTACCCTTTTT</u> GTTTC
<i>Brucella abortus</i>	<i>recA</i> (1)	GTTTCGTGGATAG GTTTC
	<i>recA</i> (2)*	GTTCCATTCTT GTTTC
	<i>uvrA</i>	GTTTCGATATTT GTTTC
	<i>ssb</i> *	GTTTCCTGTTTT GTTTC
<i>Paracoccus denitrificans</i>	<i>recA</i> *	GTTTCACGGGTT GTTTC
	<i>uvrA</i>	GTTTCCTGTGAT GTTTC
<i>Aquaspirillum magnetotacticum</i>	<i>recA</i>	GTTCTCCTCTC GTTTC
<i>Acidiphilium facilis</i>	<i>recA</i> *	<u>GTTTTGTCAAC</u> GTTTC
<i>Zynomonas mobilis</i>	<i>recA</i>	GTTTCACCTTAT GTTTC
	<i>uvrA</i> (1)	<u>ATTCCCCCTTT</u> GTTTC
	<i>uvrA</i> (2)	<u>ATTCTGCTACC</u> GTTTC
<i>Sphingomonas aromaticivorans</i>	<i>recA</i> (1)	GTTCCCCCCTT GTTTC
	<i>recA</i> (2)*	<u>GTACTCGTTGT</u> GTTTC
<i>Caulobacter crescentus</i>	<i>recA</i> *	<u>GTACACTCTTT</u> GTTTC
	<i>lexA</i> (1)*	GTTCTCCTGGT GTTTC
	<i>lexA</i> (2)*	<u>GTTTGCGGTTT</u> GTTTC
Consenso		GTTTCYYYTTTT GTTTC

Las bases en negrita corresponden a los motivos más conservados.

Las bases en negrita y subrayadas corresponden a desviaciones de los motivos conservados GTTC, GTTC.

* Secuencias en las que se ha utilizado su inversa complementaria para realizar la comparación.

Modificado de Labazi *et al.*, 1999; Tapias y Barbé, 1999.

- **Grupo δ -Proteobacteria**

Dentro del grupo δ -Proteobacteria se ha estudiado el sistema SOS de la bacteria reductora de hierro(III), *Geobacter sulfurreducens*. En esta especie se han descrito dos genes *lexA*, denominados *lexA1* y *lexA2*, parecidos entre sí, habiéndose localizado una copia del gen *dinB* adyacente a ambos genes *lexA*, con el que forman un operón. En este estudio se ha demostrado que en la región promotora de los genes *lexA* hay un motivo de unión de DNA a la proteína LexA, que es el palíndromo imperfecto GGTTNNCNNNNGNNACC. Esta secuencia reguladora se encuentra también en la región promotora del gen *lexA* de *G. metallireducens*, pero no se ha encontrado en las de otros genes de *G. sulfurreducens* que en *E. coli* pertenecen al regulón SOS como *recA*, *recN*, *ruvAB*, *ssb*, *umuDC*, *uvrA* y *uvrB*. Además, en este microorganismo se ha demostrado que el gen *recA* tiene un nivel de expresión constitutivo muy alto y no inducible frente al daño del DNA (Jara *et al.*, 2003).

1.2.4. Bacterias grampositivas y el sistema SOS

También se ha estudiado el sistema SOS en varias bacterias grampositivas. El organismo más conocido de este grupo es *Bacillus subtilis*, una bacteria aeróbica, formadora de esporas, cuyo hábitat es el suelo. En *B. subtilis*, también existe un sistema de regulación parecido al de *E. coli*, denominado sistema SOB, un gen *recA* con un 50% de similitud al de *E. coli* y un gen similar al *lexA* de *E. coli* en un 34%, denominado *dinR*, que codifica la proteína DinR que actúa como represor de los genes *din* (Miller *et al.*, 1996; Winterling *et al.*, 1997). Se encuentra también en la región promotora de estos genes una secuencia operadora, conocida como la caja "Cheo" (Cheo *et al.*, 1991; Yasbin *et al.*, 1992; Winterling *et al.*, 1998) cuya secuencia consenso es el palíndromo CGAACRNRYGTTTCG, donde se une la proteína DinR (Miller *et al.*, 1996).

El sistema funciona básicamente como el de *E. coli*, si bien con algunas diferencias. Presenta genes inducibles frente a lesiones del DNA,

mecanismos de reparación similares, reparación tendente al error, inducción de profagos y filamentación celular (Yasbin *et al.*, 1992). Frente a la presencia de una lesión, la proteína RecA es activada y cataliza la autohidrólisis de la proteína DinR a nivel de sus aminoácidos Ala₉₁-Gly₉₂, lo que provoca la desrepresión de los genes del sistema y la inducción de las funciones SOS.

La región carboxi-terminal de DinR es la más conservada con respecto a la proteína LexA de *E. coli*, conservándose la región de los residuos catalíticos Ser₁₁₉ y Lys₁₅₆. Su región amino-terminal es bastante distinta, lo cual es esperable, ya que ésta es la zona de interacción entre la proteína y la región operadora, la cual como ya se ha comentado es diferente en ambas especies.

Entre las diferencias más importantes en los dos sistemas está la capacidad de inducción del sistema SOB no sólo frente a lesiones, sino también cuando el microorganismo presenta competencia natural (Love *et al.*, 1985). Este sistema es independiente de la regulación de RecA y tiene lugar por la unión del producto del gen *comK*, la proteína CTF (factor activador transcripcional), a la región operadora de este gen, permitiendo la transcripción de los genes *din*, por desplazamiento del represor (Haijema *et al.*, 1996).

Otra diferencia significativa es la presencia de múltiples operadores en las regiones promotoras de los genes del sistema que, como se ha propuesto para otras proteínas reguladoras, provocarían la formación de un bucle regulador por la unión en forma de un tetrámero del represor DinR (Gralla, 1989; Lobell y Schleif, 1990). Sin embargo, estudios realizados por Winterling y colaboradores (1998) han demostrado que DinR se une al DNA como un dímero.

Otros grampositivos entre los que se incluyen *Clostridium perfringens*, *Corynebacterium glutamicum*, *Mycobacterium leprae*, *M. smegmatis*, *M. tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptomyces lividans* y *S. coelicolor* poseen un sistema de reparación de emergencia similar al comentado para

B. subtilis (Tabla 1.4) (Yasbin *et al.*, 1992; Durbach *et al.*, 1997; Movahedzadeh *et al.*, 1997a; Winterling *et al.*, 1998).

Estudios realizados por Davis y colaboradores (2002) han redefinido la caja SOS de los genes regulados por LexA en *M. tuberculosis* como TCGAAC-N₄-GTTCGA. Mediante esta secuencia consenso se han realizado análisis que han permitido identificar varios genes regulados por LexA en este microorganismo y se ha determinado la presencia de estas regiones operadoras en genes que no se suponían regulados por este sistema. Además se ha encontrado que algunos genes conocidos del sistema de reparación de *E. coli*, en *M. tuberculosis* no estaban siendo regulados por el sistema LexA, lo que sugiere la posibilidad de que exista algún sistema alternativo adicional (Movahedzadeh *et al.*, 1997b; Brooks *et al.*, 2001).

Recientemente ha sido determinada la secuencia de unión a LexA de *Dehalococcoides ethenogenes*, una bacteria difícil de ubicar filogenéticamente que podría pertenecer al grupo de bacterias verdes no del azufre (Hugenholtz *et al.*, 1998). Dicha secuencia es el palíndromo perfecto AGAAC-N₄-GTTCT, muy parecida a la de las bacterias grampositivas. El represor DinR de *B. subtilis* es capaz de reconocer dicho motivo, por lo que se podría incluir a *D. ethenogenes*, como la primera especie no grampositiva, que posee un tipo de regulación similar a la de las bacterias grampositivas. Por otra parte, también se ha determinado que, aparte del gen *lexA*, solamente el gen *uvrA* tiene el mismo motivo de unión y está bajo el control de LexA, mientras que otros genes como *ruvA*, *ruvB*, *recN* y el mismo *recA*, carecen de dicho motivo y no son regulados por este sistema (Fernández de Henestrosa *et al.*, 2002).

Tabla 1.4. Posibles cajas reguladoras de genes *din* de *B. subtilis*, de algunas bacterias grampositivas y de otras relacionadas

Microorganismo	Gen	Secuencia
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>recA</i>	<u>CGAAT</u> ATGC C TT C G
	<i>dinA</i>	CGAAC T TTAG T TT C G
	<i>dinB</i>	<u>AGAAC</u> TCAT G TT C G
	<i>dinC</i> (1)	CGAACGTAT G TT T G
	<i>dinC</i> (2)	<u>AGAAC</u> AAG T GTT C G
	<i>dinR</i> (1)	CGAACCTCAG T TT T G
	<i>dinR</i> (2)	CGAACAAAC G TT T C
	<i>dinR</i> (3)	<u>GGAAT</u> GTT T GTT C G
	<i>uvrB</i>	<u>AAAAC</u> AAAC G TT C G
	<i>dnaX</i>	CGAACCAAG G TT C A
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>recA</i> (1)	<u>CGAAT</u> TAA A C T TT T G
	<i>recA</i> (2)	CGAACGGAT C AT C G
<i>Bifidobacterium breve</i>	<i>recA</i> (1)	<u>CGTTC</u> ACCC G CAT C
	<i>recA</i> (2)	CGAACAAAT G TT C G
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>recA</i>	AGAAC T TAT G TT C G
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	<i>recA</i>	<u>CGTAG</u> GAAT T TT C G
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	<i>recA</i>	<u>AGAAT</u> GG T C G TT A G
<i>Lactococcus lactis</i>	<i>recA</i>	<u>TGATA</u> GAAA G TT C C
<i>Mycobacterium leprae</i>	<i>recA</i> (1)	CGAACAGAT G TT C G
	<i>recA</i> (2)	<u>CGTAC</u> TGCG A TT C G
	<i>lexA</i> (1)	CGAACACAT G TT T G
	<i>lexA</i> (2)	CGAACAT T C G AT C G
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	<i>recA</i> (1)	CGAACAGGT G TT C G
	<i>recA</i> (2)	<u>GGAAC</u> ACCG G TC A G
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>recA</i>	CGAACAGGT G TT C G
	<i>lexA</i>	CGAACACAT G TT T G
<i>Spiroplasma melliferum</i>	<i>recA</i>	<u>XGATC</u> ACG A GA A CG
<i>Spiroplasma citri</i>	<i>recA</i>	<u>TGATC</u> ACG A GA A CA
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>recA</i>	CGAACAAAT A TT C G
<i>Streptococcus mutans</i>	<i>recA</i>	CGAACATGC C TT T G
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>recA</i>	<u>GGATC</u> ATT A GA A T G
	<i>dinF</i>	<u>TGAAC</u> TTGA A AT C G
<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>recA</i>	<u>CGATT</u> AGGA G A A CG
<i>Streptomyces lividans</i>	<i>recA</i>	CGAACATCC A TT T CT
<i>Streptomyces coelicolor</i>	<i>recA</i>	<u>AGAAT</u> GGAT G TT C G
	<i>lexA</i>	<u>CAAAC</u> ACAC G TT C G
<i>Streptomyces clavuligenes</i>	<i>lexA</i>	<u>CGTTC</u> GAG T GAAA A
<i>Streptomyces rimosus</i>	<i>recA</i>	CGAACGTCT A TT C A
<i>Streptomyces ambofaciens</i>	<i>recA</i>	CGAACATCC A TT C A
<i>Thermotoga maritima</i>	<i>recA</i>	<u>CGAAT</u> GTCA G TT T G
Consenso		CGAACRNRY G TT C G

Las bases en negrita corresponden a los motivos más conservados.

Las bases en negrita y subrayadas corresponden a desviaciones de los motivos conservados CGAAC, GTTCG.

Según la nomenclatura estandarizada R = G o A; Y = C o T.

Modificado de Yasbin *et al.*, 1992; Durbach *et al.*, 1997; Winterling *et al.*, 1998.

1.2.5. La reparación de DNA en *D. radiodurans*

D. radiodurans es una especie microbiana perteneciente al *phylum* de bacterias extremófilas *Deinococci*, muy antiguo filogenéticamente y que se caracteriza por su excepcional capacidad de resistir a diferentes tipos de lesiones del DNA, presentando una gran habilidad para reparar el daño. Se han realizado varios estudios sobre los sistemas de reparación que utiliza este microorganismo, encontrándose diferencias importantes con respecto a otras especies. Han sido identificados varios genes relacionados con la reparación como *recA*, *lexA*, *uvrA*, *uvrB*, *uvrC*, *ruvA*, *ruvB*, *recR*, *polA*, *polB*, *dinG*, *umuD*, *umuC*, *ssb*, entre otros, que estarían cumpliendo funciones similares a las de otros microorganismos (Makarova *et al.*, 2001). En cuanto a las proteínas más importantes en el sistema de reparación SOS, RecA y LexA, se han encontrado diferencias importantes con respecto a su regulación y funciones. Se ha demostrado que la proteína RecA es independiente de LexA (Narumi *et al.*, 2001), que es autorregulable (Bonacossa de Almeida *et al.*, 2002) y que posiblemente una proteína denominada IrrE podría estar involucrada en su control. (Earl *et al.*, 2002). Adicionalmente, se ha descrito la posibilidad de que exista una segunda copia de la proteína LexA, la denominada LexA2, sobre la cual hay pocos datos hasta el momento (Makarova *et al.*, 2001). Por otro lado, no se ha descrito ningún tipo de motivo regulador o caja SOS que permita la unión de la proteína LexA a promotores de genes involucrados en la reparación. Las diferencias en el sistema reparativo que presenta este microorganismo y el hecho de pertenecer a un grupo de bacterias alejado filogenéticamente hacen muy interesante el estudio del mismo y de su sistema de reparación SOS.

1.3. Objetivos

En función de lo comentado hasta el momento, es posible pensar que el mecanismo de regulación convencional y complejo LexA-RecA que posee *E. coli* y que incluye la regulación de aproximadamente 40 genes, no esté tan conservado entre las diferentes especies y grupos bacterianos, como se podría esperar. Se han descrito varios motivos reguladores que permiten la unión entre el DNA de genes relacionados con la reparación y la proteína LexA, mientras que otros genes que supuestamente pertenecerían al regulón SOS no están regulados por el represor LexA.

Dentro de este marco y con la finalidad de contribuir al conocimiento del sistema SOS del mundo microbiano, el objetivo del presente trabajo es el estudio y la caracterización de la caja SOS de dos grupos de bacterias, cuyo motivo de unión LexA-DNA no ha sido descrito previamente. Se trata de la β -Proteobacteria, *R. metallidurans* y de *D. radiodurans*, bacteria del grupo *Deinococci*. Los objetivos concretos del presente trabajo han sido:

- Clonación y secuenciación de los genes *recA* y *lexA* de *R. metallidurans* y sus regiones promotoras.
- Análisis de la región promotora de dichos genes e identificación de la caja SOS de *R. metallidurans*.
- Obtención de mutantes RecA(Def) y LexA(Def) de *R. metallidurans* para realizar estudios de expresión comparativos con la cepa salvaje.
- Caracterización del regulón SOS de *R. metallidurans*.
- Clonación y secuenciación del gen *lexA* de *D. radiodurans* y de sus regiones promotoras e identificación de un motivo regulador del sistema SOS en este microorganismo.