



Universidad Autónoma de Barcelona
Departamento de Genética y Microbiología

**ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DEL REGULÓN
LEXA EN EL DOMINIO *Bacteria***

Mónica Jara Ramírez

2004



Universidad Aut3noma de Barcelona
Departamento de Gen3tica y Microbiolog3a

AN3LISIS DE LA COMPOSICI3N DEL REGUL3N
LEXA EN EL DOMINIO *Bacteria*

M3nica Jara Ram3rez

2004

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA

Departamento de Genética y Microbiología

Análisis de la composición del regulón LexA en el dominio

Bacteria

Memoria presentada por Mónica Jara Ramírez
para optar al Grado de Doctor en Ciencias
Biológicas por la Universidad Autónoma de
Barcelona.

VºBº

El Director de la Tesis

La Codirectora de la Tesis

Dr. Jordi Barbé García

Dra. Susana Campoy Sánchez

A mis padres y hermanos.

A Miguel.

Existe un sólo propósito en la vida: ser testigo de las maravillas del mundo y comprender sus complejidades, su belleza, sus misterios, sus enigmas. Cuando mejor las comprendas, cuantas más cosas conozcas, más gozarás de la vida y de una sensación de paz. Eso es lo fundamental. Lo demás son menudencias. Si una actividad no está basada en el amor o el aprendizaje, no tiene ningún valor.

Palabras de Zurvan a Azriel.

A. Rice "El sirviente de los huesos".

Resumen

Estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio han analizado el contenido del regulón LexA de las Gamma proteobacterias (Erill *et al.*, 2003). Siguiendo la misma línea, el presente trabajo pretende ampliar la descripción de dicho regulón a otras familias del Dominio *Bacteria*: *Geobacter sulfurreducens*, como representante del grupo Desulfuromonas, perteneciente a la subdivisión Delta de las proteobacterias; *Fusobacterium nucleatum*, del Phylum *Fusobacteria*; microorganismos pertenecientes a la Clase Alfa de proteobacterias y bacterias gram positivas.

En primer lugar se procedió a determinar las cajas de unión a LexA de los microorganismos *G. sulfurreducens* y *F. nucleatum*, para lo cual se clonaron y secuenciaron sus respectivos genes *lexA*. Tras sobreexpresar y purificar las respectivas proteínas se procedió a realizar ensayos de retraso electroforético y de *footprinting*, con lo que se definieron ambos motivos de unión a LexA: GGTT N₂ C N₄ G N₃ ACC para *G. sulfurreducens* y TGTATC N₁₂ TACA para *F. nucleatum*.

A continuación, se estudió *in silico* la distribución de los motivos descritos en cada genoma. En ambos casos el único gen, a parte del *lexA*, que resultó estar bajo el control de la proteína LexA fue el gen *dinB*. En *G. sulfurreducens* el gen *recA*, además de no poseer el motivo LexA y de no unirse a dicha proteína, presentó una expresión constitutiva frente al daño en el DNA. Por el contrario, el gen *recA* de *F. nucleatum* es inducible por lesiones en el DNA aunque no está regulado directamente por *lexA*.

Una vez descritos estos dos microorganismos se abordó el estudio de microorganismos pertenecientes a la clase Alfa de las proteobacterias y a las bacterias gram positivas. Dado que las cajas LexA de estos microorganismos ya se conocían, se procedió a buscar dichos motivos en sus genomas. Una vez analizados los resultados biocomputacionales, se procedió en cada caso a validar dichos resultados experimentalmente escogiendo un microorganismo como representante. Para el caso de las proteobacterias Alfa se escogió a *Sinorhizobium meliloti*, y como bacteria gram positiva se eligió a *Bacillus subtilis*. En ambos microorganismos los datos experimentales han coincidido totalmente con los obtenidos *in silico*. El conjunto de resultados obtenidos ha demostrado la existencia de una gran variabilidad en el contenido del regulón LexA en el Dominio *Bacteria*.

Este hecho sugiere la existencia de una importante transferencia genética horizontal en el Dominio *Bacteria* en lo que hace referencia a este regulón.

Índice

1. Introducción	1
1.1. El sistema SOS en <i>Escherichia coli</i>	2
1.1.1. La proteína LexA	5
1.1.1.1. Estructura	5
1.1.1.2. Dimerización	7
1.1.1.3. Autohidrólisis	7
1.1.2. La proteína RecA	9
1.1.2.1. Estructura	9
1.1.2.2. Funciones	10
1.1.2.2.1. Recombinación homóloga	11
1.1.2.2.2. Actividad coproteasa	12
1.1.2.2.3. Mutagénesis SOS	12
1.1.3. El regulón SOS	15
1.1.3.1. Variabilidad de la caja SOS	16
1.1.4. Funciones SOS de reparación	18
1.1.4.1. Reparación por escisión de nucleótido	18
1.1.4.2. Reparación por recombinación	20
1.1.5. La mutagénesis SOS	22
1.1.6. Otras funciones del sistema SOS	23
1.2. El regulón SOS en otras proteobacterias	23
1.3. Objetivos	24
2. Material y métodos	25
2.1. Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos	25
2.2. Métodos microbiológicos	25
2.2.1. Métodos de cultivo y conservación de cepas	25
2.2.1.1. Medios de cultivo	37
2.2.1.2. Incubación en anaerobiosis	39
2.2.1.3. Antibióticos	40
2.2.1.4. Otras soluciones y productos químicos	40
2.2.2. Inducción de la respuesta SOS	40
2.3. Métodos genéticos	41
2.3.1. Transformación	41
2.3.1.1. Transformación con cloruro cálcico	41
2.3.1.2. Electrotransformación	42
2.4. Métodos de manipulación de DNA	43

2.4.1.	Extracción de DNA cromosómico.....	43
2.4.2.	Extracción de DNA plasmídico.....	45
2.4.2.1.	Miniextracción de DNA plasmídico	45
2.4.2.2.	Maxiextracción de DNA plasmídico	46
2.4.3.	Digestión con enzimas de restricción	48
2.4.4.	Electroforesis de DNA.....	48
2.4.4.1.	Preparación de geles de agarosa.....	48
2.4.4.2.	Marcadores de peso molecular	50
2.4.4.3.	Cuantificación de DNA	50
2.4.5.	Clonación en vectores plasmídicos.....	50
2.4.5.1.	Purificación de fragmentos de DNA.....	50
2.4.5.2.	Preparación del vector y del inserto	51
2.4.5.3.	Reacción de ligación	52
2.4.6.	Amplificación de DNA	53
2.4.6.1.	PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	53
2.4.6.2.	Secuenciación	54
2.5.	Métodos de manipulación de RNA.....	54
2.5.1.	Extracción de RNA	54
2.5.1.1.	Extracción de RNA con Tri Reagent ³ LS	54
2.5.1.2.	Extracción de RNA utilizando el RNeasy ² Mini Kit (Quiagen).....	56
2.5.2.	RT-PCR.....	57
2.5.3.	RT-PCR en tiempo real.....	57
2.6.	Métodos de manipulación de proteínas	58
2.6.1.	Sobreexpresión y purificación de proteínas con pGEX4T-1	58
2.6.2.	Electroforesis de proteínas	60
2.6.3.	Cuantificación de proteínas.....	63
2.6.4.	Ensayo de movilidad electroforética (EMSA).....	63
2.6.4.1.	Marcaje de fragmentos de DNA	64
2.6.4.2.	Reacción de unión proteína-DNA.....	64
2.6.4.3.	Preparación del gel de poliacrilamida y electroforesis	65
2.6.4.4.	Transferencia	66
2.6.4.5.	Revelado y detección	66
2.7.	Ensayo de protección frente a la DNasaI o de <i>footprinting</i>	68
2.8.	Métodos biocomputacionales	70
2.8.1.	Comparaciones genómicas y bases de datos	70

2.8.2. Software generador de consensos	71
2.8.3. Métodos analíticos.....	72
3. Resultados	73
3.1. La caja LexA de <i>Geobacter sulfurreducens</i>	73
3.1.1. <i>G. sulfurreducens</i> tiene dos genes <i>lexA</i>	73
3.1.2. Identificación de la caja de unión a DNA de la proteína LexA1 y LexA2	75
3.2. La caja LexA de <i>Fusobacterium nucleatum</i>	79
3.2.1. Clonación y secuenciación del gen <i>lexA</i>	79
3.2.2. Identificación de la caja de unión a DNA de la proteína LexA	80
3.3. Estudio comparativo del regulón LexA en diferentes grupos filogenéticos	85
3.3.1. Análisis en <i>G. sulfurreducens</i>	85
3.3.1.1. Estudio del entorno y de la expresión de los genes <i>lexA</i>	85
3.3.1.2. Caracterización de la expresión del gen <i>recA</i>	87
3.3.2. Análisis en <i>F. nucleatum</i>	89
3.3.2.1. Contenido del regulón LexA	89
3.3.2.2. Estudio de la expresión de los genes <i>lexA</i> , <i>recA</i> y <i>dinP</i> mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real	93
3.3.3. Análisis en la clase Alfa de proteobacterias	94
3.3.3.1. Contenido del regulón LexA	94
3.3.3.2. Análisis de la expresión <i>in vivo</i> del regulón LexA	96
3.3.4. Análisis en bacterias gram positivas	99
3.3.4.1. Contenido del regulón LexA.....	99
3.3.4.2. Análisis de la expresión <i>in vivo</i> del regulón LexA.....	101
4. Discusión.....	104
5. Conclusiones.....	110
6. Bibliografía.....	111

1. Introducción

La principal función de todo organismo es la perpetuación de la especie, para lo cual es imprescindible el mantenimiento de la estabilidad de la información genética de generación en generación. Esta información genética, almacenada en el DNA, se ve continuamente expuesta a daños o agresiones tanto de tipo endógeno, derivado del propio metabolismo celular, como de tipo exógeno, debidos a la exposición a agentes físicos o químicos medioambientales (Friedberg *et al.*, 1995). Las lesiones en el DNA provocadas por estos agentes pueden llegar a afectar al desarrollo normal del organismo, por lo que la célula dispone de varias estrategias de defensa para restaurar la estructura y función del DNA dañado o, al menos, minimizar sus efectos.

Algunas de estas estrategias de defensa, como la reparación por reversión directa y la escisión, implican la retirada de la lesión del genoma por acción de enzimas que revierten directamente el daño o por procesos de síntesis reparativa con lo que se restaura la secuencia correcta de bases y la estructura normal del DNA. Otras estrategias, como la tolerancia al daño, no reparan las lesiones inicialmente, sino que se enfrentan a él y posteriormente la reparan introduciendo mutaciones en algunos casos.

El microorganismo más estudiado dentro de los procariotas es sin duda *Escherichia coli*. Diferentes análisis de la expresión génica de células tratadas con agentes mutagénicos han permitido identificar genes implicados en la respuesta frente al daño en su DNA (Courcelle *et al.*, 2001, Khil y Camerini-Otero, 2002, Quillardet *et al.* 2003). Hasta el momento, en esta bacteria se han descrito tres sistemas multigénicos capaces de activarse según el tipo y nivel de daño al que se ve sometido la célula. Estos sistemas utilizan diferentes mecanismos de reparación que pueden actuar de forma independiente o conjunta y que son:

- i) **La respuesta adaptativa a los agentes alquilantes.** Mediante esta red multigénica la célula repara las alquilaciones (o adiciones de grupos alquilo) producidas en el DNA por dosis subletales de agentes químicos tales como la N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), el metil metanosulfonato (MMS) o el etil metanosulfonato (EMS) entre otros. Esta vía de reparación está integrada por un regulón formado por los genes *ada*, *alkA*, *alkB* y *aidB* regulado positivamente por la proteína Ada, teniendo ésta última una doble función de reparación y regulación. En cambio los productos de los genes *alkA*, *alkB* y *aidB* están implicados solamente en los procesos de reparación (Landini y Volkert, 2000). La proteína Ada se activa mediante metilación, modificación que la hace capaz de reconocer la secuencia específica AAAT-N₆-GCAA de la región promotora de los genes pertenecientes al regulón, activando de esta manera su transcripción (Landini y Volkert, 1995).
- ii) **La respuesta al estrés oxidativo.** Este sistema permite reparar las lesiones debidas a especies reactivas del oxígeno (EROs) exógenas o endógenas, tales como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), radicales superóxido (O₂⁻) o nitrilo (NO), generadas como consecuencia del metabolismo aeróbico. Los regulones *oxyR* y *soxR*, con más de 20 genes, son los responsables principales de minimizar este