
efecto, si bien los regulones *katF* y *soxQ* también están implicados (Demple, 1991). Por un lado el peróxido de hidrógeno oxida la proteína OxyR activándola, e induciendo de esta manera la transcripción de varios genes (*katG*, *ahpCF*, *dps*, *forA*, *grxA* y *oxyS*, entre otros) que codifican diferentes enzimas con funciones antioxidantes como la catalasa y varias reductasas. Por otro lado, los compuestos generadores de óxido nítrico y superóxidos intracelulares oxidan el factor SoxR induciendo su transcripción y la de un segundo factor, la proteína SoxS, que a su vez activa la transcripción de varios genes, como *sodA*, *fpr*, *zwf*, *fumC*, *nfo*, *acnA* y *micF* que codifican enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, proteínas del metabolismo aeróbico como la fumarasa y proteínas de resistencia a antibióticos, solventes orgánicos y metales pesados.

Además se ha descrito un regulador adicional para la supervivencia frente al estrés oxidativo que es el gen *rpoS*, que codifica la subunidad ω^S de la RNA polimerasa, y que también ejerce como regulador de la respuesta adaptativa a los agentes alquilantes en la fase estacionaria. El producto de este gen controla un regulón que incluye los genes *katG*, *dps* y *gorA*, que también son controlados por OxyR (Demple, 1997; Michán *et al.*, 1999; Zheng *et al.*, 1999).

- iii) La respuesta SOS o sistema de reparación de emergencia.** Sobre este último sistema versa la presente tesis, por lo que a continuación se detallará su funcionamiento.

1.1. El sistema SOS en *Escherichia coli*

Este regulón está integrado por más de 40 genes (Tabla 1.1) que se encuentran reprimidos por la proteína LexA y activados por RecA (Fernández de Henestrosa, *et al.*, 2000; Courcelle *et al.*, 2001). Además de estas dos proteínas, que son las más importantes del sistema, se han descrito otros reguladores, entre ellos la proteína DinI que podría actuar como un regulador negativo (Voloshin *et al.*, 2001; Yasuda *et al.*, 2001). Este sistema responde a lesiones en el DNA o a una parada en el proceso de replicación y a la consecuente acumulación de DNA de cadena sencilla, desencadenando la expresión de múltiples genes que participan en reparación, replicación, recombinación y división celular.

Estos genes son capaces de actuar en varias formas independientes. Así, entre otros procesos, llevan a cabo:

- i)** La reparación por escisión que se ve incrementada por el aumento de producción de la UvrD helicasa y de las subunidades UvrA y UvrC de la excinucleasa UvrABC.
- ii)** La inducción de la DNA polimerasa II que incrementa la capacidad de la célula de copiar el DNA frente a sitios abásicos.
- iii)** El aumento de los niveles de las proteínas RecA y RecN, que son cruciales en el proceso de la reparación por recombinación.
- iv)** La mutagénesis SOS, catalizada por el complejo Umu(D')₂C (Smith y Walker, 1998), y que tiene lugar cuando los procesos anteriores no son suficientes para contrarrestar el daño producido.

- v) La inhibición de la división celular, debido a la sobreproducción de la proteína SulA, y que tiene como finalidad impedir la segregación de células hijas con lesiones en el DNA.
- vi) La inducción de profagos así como de genes que codifican bacteriocinas y que generalmente se encuentran en plásmidos (Kuzminov, 1999).

Estos genes se encuentran distribuidos en diferentes sitios del cromosoma y su expresión está basada en la interacción de las dos proteínas LexA y RecA. (Fig.1.1).

Tabla 1.1. Genes de *E. coli* regulados por LexA.

Genes ¹	Función
<u>Cromosómicos</u>	
<i>dinA</i> (<i>polB</i>)	DNA polimerasa II.
<i>dinB</i> (<i>dinP</i>)	DNA polimerasa IV.
<i>dinD</i> (<i>pscA</i>)	Desconocida.
<i>dinF</i>	Desconocida. Está en el mismo operón que <i>lexA</i> .
<i>dinG</i>	Desconocida.
<i>dinI</i>	Inhibición de <i>umuD</i> . Estabilizador de filamentos de RecA.
<i>dinJ</i> (<i>sosA</i>)	Desconocida.
<i>dinK</i> (<i>sosC</i>)	Desconocida.
<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> .
<i>dinN</i> (<i>sosE</i>)	Desconocida
<i>dinO</i> (<i>sosF</i> , <i>molR</i>)	Desconocida.
<i>dinQ</i>	Desconocida.
<i>dinS</i>	Posible transposasa.
<i>ftsK</i> (<i>dinH</i>)	División celular y segregación cromosómica.
<i>hokE</i> (<i>ybdY</i>)	Posible proteína asesina.
<i>lexA</i>	Represor del sistema SOS.
<i>recA</i>	Recombinación y coproteasa. Regulador positivo del sistema 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>	Unión a DNA de cadena sencilla.
<i>sulA</i> (<i>sfiA</i>)	Inhibición de la división celular.
<i>umuDC</i>	Mutagénesis SOS. DNA polimerasa V.
<i>uvrA</i> (<i>dinE</i>)	Reparación por escisión de nucleótido.
<i>uvrB</i>	Reparación por escisión de nucleótido.
<i>uvrD</i>	Helicasa II.
<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 λ 186.

¹ Se incluyen únicamente aquellos genes cuya expresión se encuentra regulada directamente por LexA.

*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).

En ausencia de lesiones en el DNA, los genes SOS tienen el represor LexA unido a una secuencia palindrómica presente en su región promotora, que se denomina caja SOS, reprimiendo su transcripción. En esta situación algunos de los genes del sistema presentan una expresión basal suficiente para cumplir funciones vitales para la célula.

Cuando el DNA es dañado, o la replicación del DNA se bloquea, se acumula DNA de cadena sencilla (ssDNA) y tiene lugar un aumento de la expresión de estos genes. La proteína RecA, en presencia de dATP o de ATP, forma filamentos en la cadena sencilla del DNA (ssDNA) adquiriendo así actividad proteasa, RecA*. Esto inicia una cascada de reacciones ya que RecA* cataliza la hidrólisis del represor LexA a nivel de sus residuos Ala₈₄ y Gly₈₅ y se generan dos fragmentos polipeptídicos sin actividad, lo que produce la desrepresión del sistema y la transcripción de los genes SOS.

El número de genes expresados para desencadenar la respuesta SOS y los procesos de reparación es proporcional al nivel de inducción del sistema. Finalmente, el sistema recupera su estado inicial cuando se repara la lesión y con ello desaparece la señal inductora (ssDNA), con lo que la proteína RecA* revierte a su estado normal, no se hidroliza más LexA y por lo tanto se ésta se acumula 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).

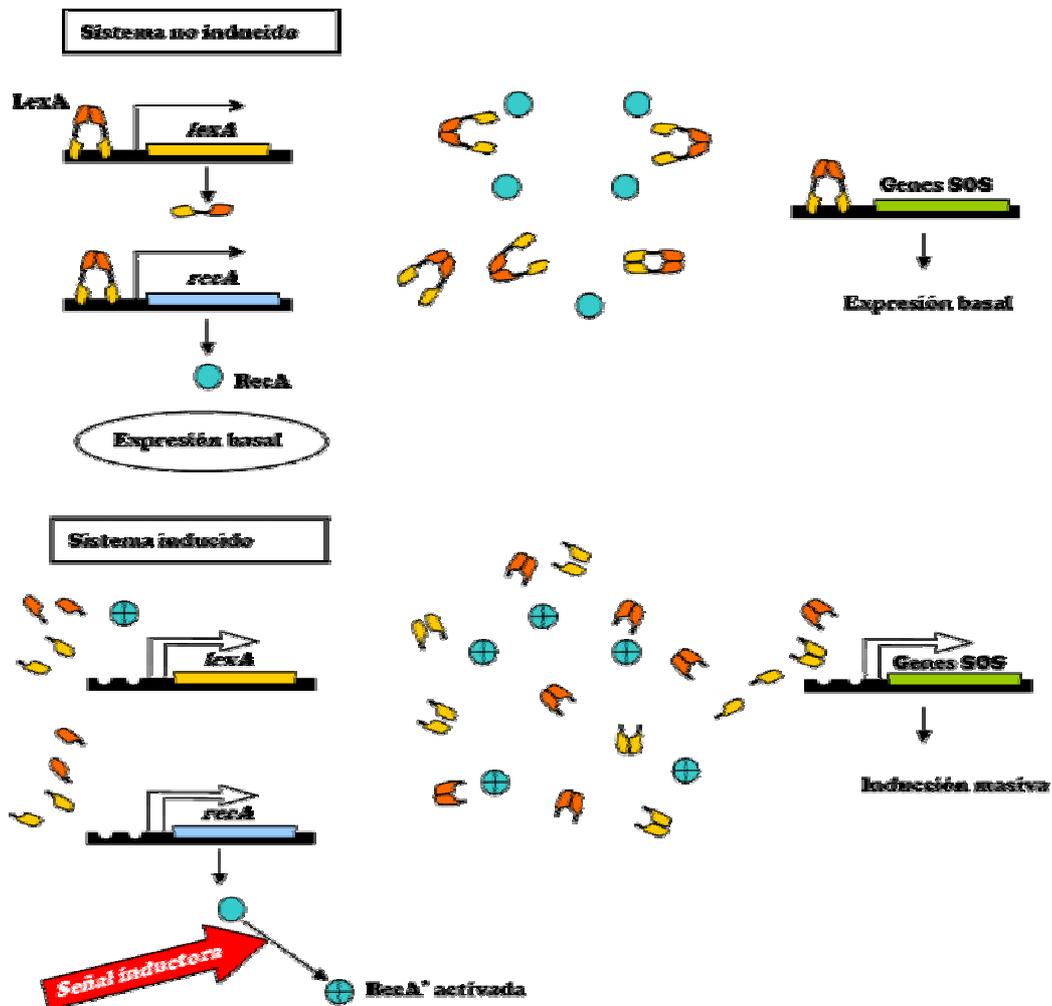


Figura 1.1. Modelo de regulación del sistema SOS en *E. coli*.

Además hay otras proteínas que participan en la respuesta SOS:

- i) Las proteínas RecFOR 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).
- ii) El complejo RecBCD tiene actividad helicasa y participa en la generación del ssDNA (Kogoma, 1997; Churchill *et al.*, 1999).
- iii) La proteína Ssb participa en la estabilización de la interacción del ssDNA, con ATP y la proteína RecA, y permite, por lo tanto, la extensión de complejo ternario (ssDNA, RecA y ATP) por la disrupción de regiones del ssDNA que normalmente no son accesibles debido a su estructura secundaria. Además, compete con RecA por el DNA de cadena sencilla e inhibe la nucleación del filamento, con lo que también ejerce una función reguladora (Rehrauer y Kowalczykowski, 1996; Bork *et al.*, 2001).

1.1.1. La proteína LexA

Se trata de una proteína de 202 aminoácidos y de un peso molecular de 22,7 kDa ampliamente descrita y caracterizada (Horii *et al.*, 1981) que cumple la función de represor transcripcional de los genes del sistema SOS, incluyendo a *recA* y el propio *lexA* (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 SOS, denominada caja SOS o LexA, y que se compone de 16 nucleótidos de estructura palindrómica con la secuencia consenso 5'-CTGT(AT)₄ACAG-3' (Walker, 1984; Wertman y Mount, 1985). Al unirse inhibe el inicio de la transcripción impidiendo la interacción de la RNA polimerasa con el promotor (Brent y Ptashne, 1981) y el grado de represión es variable dependiendo de la localización exacta de las regiones operadoras con respecto al inicio de transcripción (ATG), los posibles cambios de bases frente a la caja consenso y el número de cajas presentes y la fuerza de la interacción.

Entre sus características más destacadas podemos citar su capacidad de formar dímeros y de autohidrolizarse a pH básico o en presencia de la proteína RecA como catalizador.

1.1.1.1. Estructura

Está constituida por dos dominios unidos entre sí mediante una región conectora (Fig.1.2). El dominio N-terminal incluye los residuos del 1 al 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 ζ en los residuos 6-21, 28-35 y 40-52, denominadas 1, 2 y 3 y dos cadenas η antiparalelas, entre los residuos 50-58 y 66-68 (Fogh *et al.*, 1994).

El sitio de reconocimiento del DNA se encuentra entre las hélices 2 y 3, y precisamente en esta última se produce 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). En dicho modelo 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. Existen otros aminoácidos también implicados en contactos inespecíficos (Arg₇, Glu₈, Arg₃₈, Ser₆₀ y Arg₆₄) aunque no intervienen directamente en la interacción entre el DNA (Knegtel *et al.*, 1995).

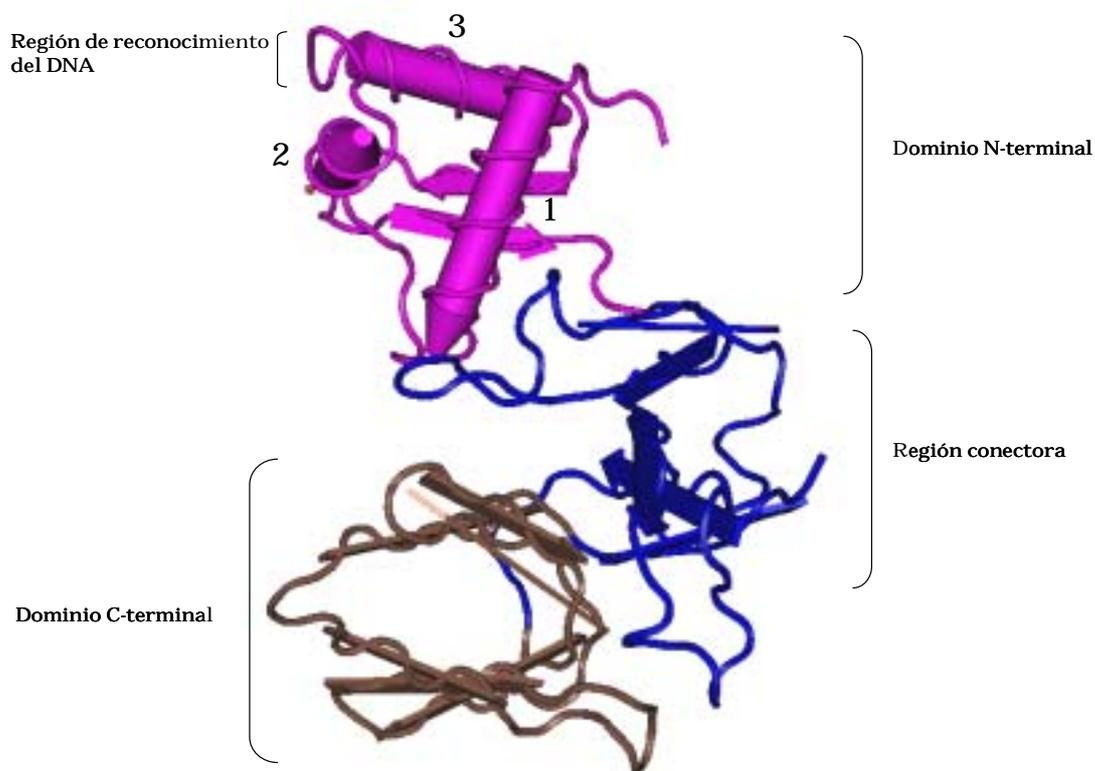


Figura 1.2. Representación de la estructura de la proteína LexA.

La región conectora abarca desde el aminoácido 73 al 94 y contiene los residuos Ala₈₄ y Gly₈₅, donde se produce la hidrólisis de la proteína LexA. Esta región posee un cierto plegamiento (Little y Hill, 1985; Oertel-Buchheit *et al.*, 1998) y su interacción con el dominio carboxi-terminal sirve para crear una estructura espacial necesaria para la rotura (Oertel-Buchheit *et al.*, 1998).

El dominio carboxi-terminal está comprendido entre los residuos 95 al 202 y está implicado en los procesos de hidrólisis, dimerización e interacción con la proteína RecA*. En esta región se encuentran los aminoácidos Ser₁₁₉ y Lys₁₅₆ que son fundamentales en la hidrólisis de la molécula (Slilaty y Little, 1987; Slilaty y Vu, 1991).

1.1.1.2. Dimerización

La estructura activa y funcional de la proteína LexA es la de un dímero, indispensable para la unión de la proteína al DNA. El proceso de dimerización se lleva a cabo en dos pasos (Fig.1.3). En primer lugar, se produce la unión de un monómero del represor, a nivel de su dominio N-terminal, al motivo CTGT de la región operadora. A continuación tiene lugar la unión de otro monómero al operador debido a una interacción previa entre las dos moléculas proteicas (Kim y Little, 1992).

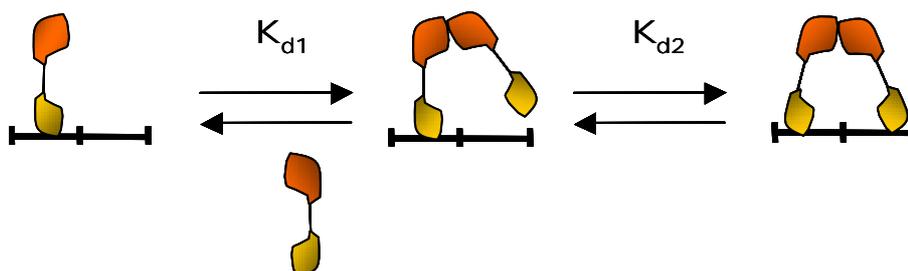


Figura 1.3. Modelo de dimerización de la proteína LexA y su unión a la caja SOS. El dominio N-terminal está representado en amarillo y el C-terminal en naranja. Modificado de Kim y Little, (1992).

1.1.1.3. Autohidrólisis

El mecanismo de inactivación del represor LexA consiste en una reacción en la que tanto el sustrato de la reacción (sitio de rotura) como el centro catalítico se encuentran en la propia molécula de LexA, y en la que la proteína RecA cataliza la reacción (Fig.1.4). Por otro lado, esta reacción también puede darse de forma espontánea en condiciones de pH básico (Little, 1984; Lin y Little, 1988).

Concretamente, el sitio de rotura se encuentra entre los aminoácidos Ala₈₄ y Gly₈₅, mientras que el centro catalítico está formado por los aminoácidos Ser₁₁₉ y Lys₁₅₆ (Slilaty y Little, 1987; Roland y Little, 1990). En el momento en que, o bien la proteína RecA está activada (RecA*), o bien hay una subida del pH, se produce una desprotonización del grupo amino de la Lys₁₅₆ (pK 9,5). Este grupo amino, a su vez, le sustrae el protón al grupo hidroxilo del aminoácido Ser₁₁₉ lo que provoca un ataque nucleofílico sobre el enlace peptídico entre Ala₈₄ y Gly₈₅.

Se ha postulado que la región conectora y el centro catalítico están alejadas, por lo que se necesitaría un cambio conformacional para que ambas se aproximen y pueda producirse la interacción y posterior rotura (Shepley y Little, 1996).

En este proceso, que se cree análogo al mecanismo de las η -lactamasas (Little, 1993), la proteína RecA* tendría el papel de disminuir la pK de la desprotonización de la Lys₁₅₆, fruto de la modificación conformacional de la proteína LexA (Kim y Little, 1993).

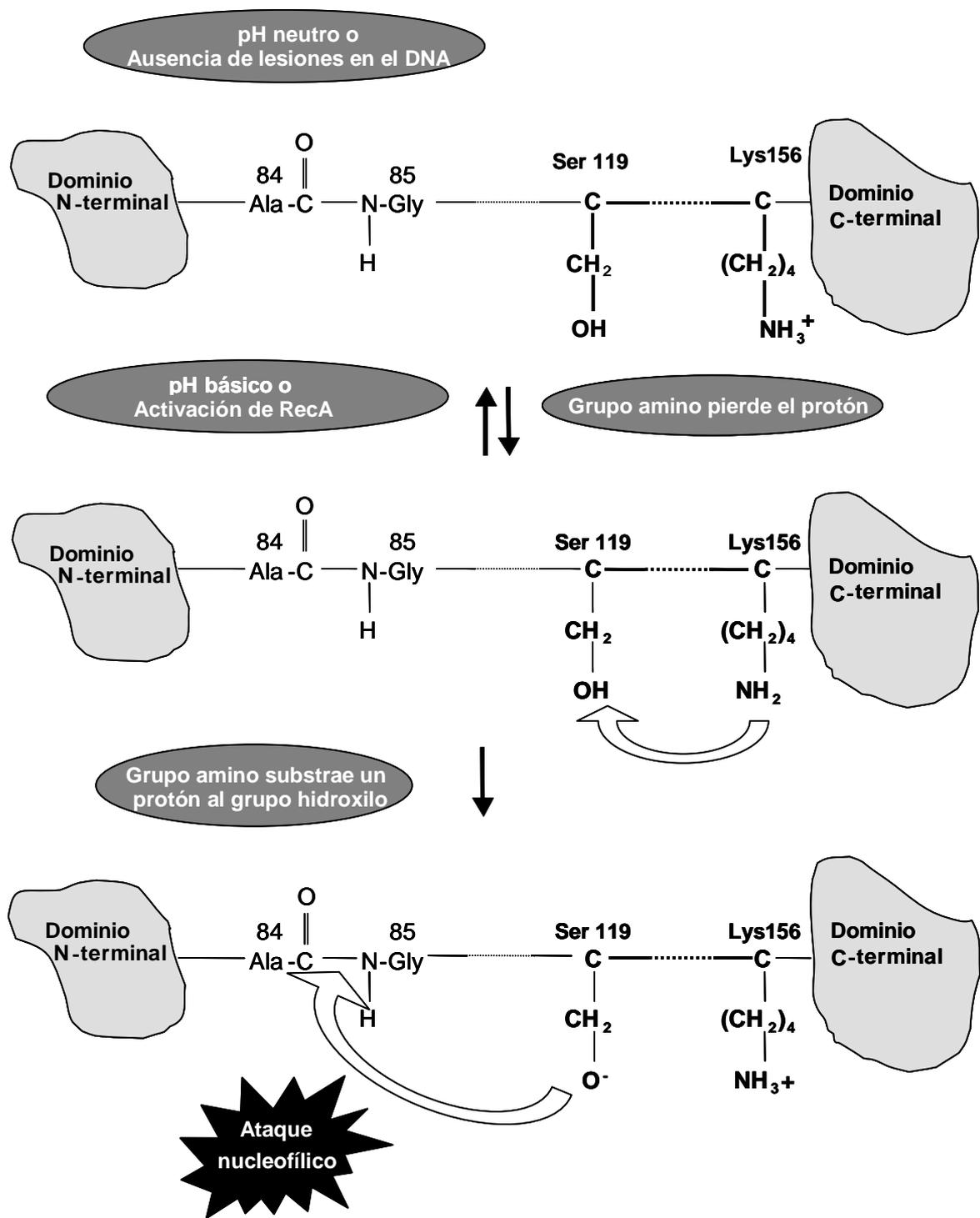


Figura 1.4. Mecanismo de autohidrólisis de la proteína LexA.

1.1.2. La proteína RecA

Se trata de una proteína con 352 aminoácidos y 38kDa que es multifuncional y altamente conservada en bacterias, por lo que se han realizado estudios filogenéticos mediante la comparación de su secuencia por el método SSPA (*significant segment pair alignment*) (Karlin *et al.*, 1995).

1.1.2.1. Estructura

La unidad funcional de la proteína RecA es en forma de polímero helicoidal regular formado por seis monómeros de RecA por vuelta. Esta estructura es la que rodea la cadena sencilla de DNA, aunque en algunos casos puede estar rodeando a DNA de doble cadena, formando el complejo de filamento nucleoproteico activado.

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. Es precisamente en este lugar donde 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 competencia (Rehrauer *et al.*, 1996; Harmon *et al.*, 1996), lo que indica que la recombinación y la actividad coproteasa de la proteína RecA compiten entre sí.

Se ha descrito su estructura cristalina mediante resolución atómica y se han determinado diferentes dominios (Fig.1.5). El dominio central (aminoácidos 36 al 266 \div 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 al 36 \div 8) y carboxi-terminal (266 al 352) (Story *et al.*, 1992; Rehrauer y Kowalczykowski, 1996).

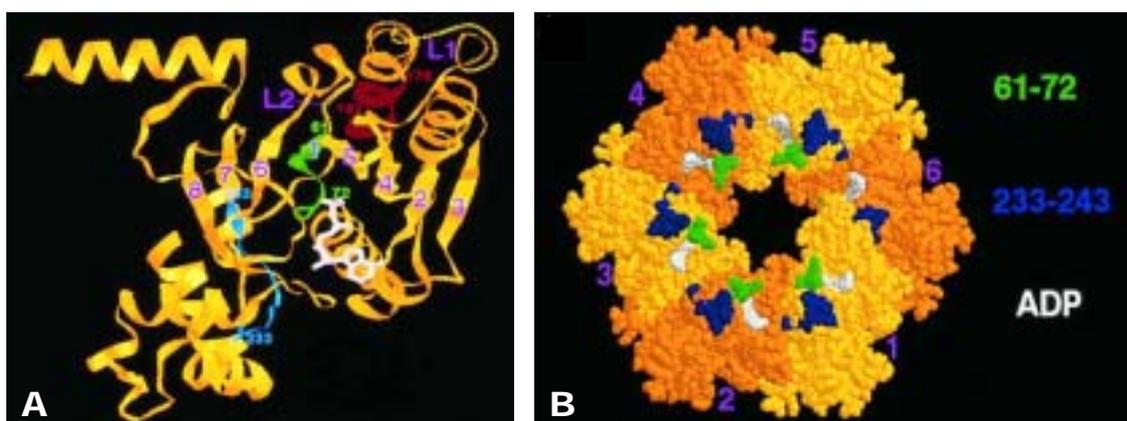


Figura 1.5. Estructura de la proteína RecA.

A: Estructura tridimensional del monómero de la proteína RecA. Las cadenas η están numeradas del 1-8 y se indican los bucles entre los aminoácidos 157-164 (L1) y 195-209 (L2). La posición del ADP está representada en blanco. B: Estructura de una sola vuelta del surco helicoidal de la proteína RecA, formada por seis monómeros. Modificado de Rehrauer y Kowalczykowski (1996).

A continuación se describen los diferentes dominios funcionales relacionados con las actividades que desempeñan (Karlin y Brocchieri, 1996):

- i) 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 y 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.
- ii) Dominios de unión a DNA.** Se ha propuesto que los posibles sitios de unión del DNA a la proteína son los denominados "bucle 1" (156 a 165) y "bucle 2" (194 a 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 a 72, 178 a 183 y 233 a 243 que cumplirían también funciones de unión al DNA (Rehrauer y Kowalczykowski, 1996).
- iii) 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 a 38 y 298 a 301, respectivamente.
- iv) Dominios de unión a LexA y a otras proteínas.** 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 (Karlin y Brocchieri, 1996). El aminoácido 243 es un sitio de unión por el cual compiten el DNA y la proteína LexA. Adicionalmente, también se encuentra involucrada en la unión a LexA la región correspondiente al "bucle 1" (Yu y Egelman, 1993).

1.1.2.2. Funciones

La proteína RecA interviene en funciones celulares muy importantes, como la recombinación homóloga, la regulación de la expresión de los genes del sistema SOS y la mutagénesis SOS, lo que provoca un tipo de reparación del DNA altamente mutagénico (Fig.1.6). Para llevar a cabo estas funciones participa en procesos bioquímicos tales como:

- i)** Apareamiento homólogo e intercambio de bases.
- ii)** Actividad coproteasa dependiente de ATP y de DNA frente a proteínas.
- iii)** Interacción con factores proteicos mutagénicos que facilitan la reparación tendente a error frente a lesiones de DNA (Tang *et al.*, 2000).

Debido a su importante función celular, su nivel basal es elevado (entre 1000 y 10000 monómeros por célula), y puede aumentar entre 20 y 50 veces en estado inducido (Kuzminov, 1999).

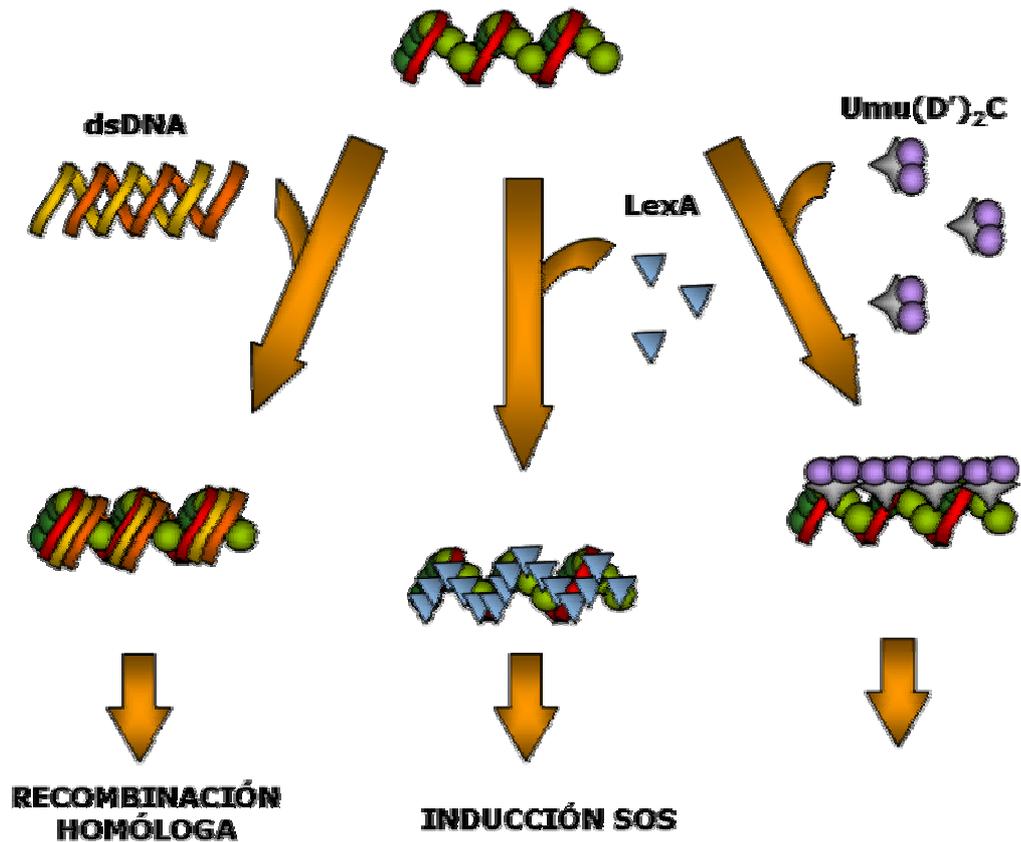


Figura 1.6. Funciones mutuamente exclusivas que puede llevar a cabo la proteína RecA. Modificado de Rehrauer *et al.* (1998).

1.1.2.2.1. Recombinación homóloga

RecA participa en la catálisis de este proceso, en el que dos moléculas homólogas de DNA se aparean e intercambian regiones de sus cadenas. Previamente RecA se encuentra en forma de un filamento extendido que rodea al ssDNA, y que se conoce como filamento presináptico. Este filamento presenta dos sitios de unión, uno primario, necesario para la relación con el ssDNA, y otro secundario, localizado fuera del eje central del filamento y responsable de la unión al dsDNA entrante. Además este segundo sitio de unión, una vez realizado el intercambio, se une también al producto obtenido en la reacción, en forma de DNA de cadena sencilla.

A lo largo del proceso se distinguen tres fases:

- i) **Presinapsis:** 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*, lo que da lugar a la formación del sitio secundario de unión.
- ii) **Sinapsis:** 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 es desplazado al sitio secundario, y a continuación se produce la unión.