

Figura 3.8. (A) Diagrama que representa los fragmentos amplificados a partir del promotor *lexA* de *F. nucleatum* usados en experimentos EMSA. Las posiciones numeradas se refieren al punto de inicio de traducción del gen *lexA* de *F. nucleatum*. (B) Movilidad electroforética de los fragmentos LexA1, LexA2, LexA3, LexA4 y LexA5 en presencia (+) y ausencia (-) de la proteína purificada LexA de *F. nucleatum*.

Para confirmar que dicho motivo es la caja LexA se diseñaron los oligonucleótidos LexA-40+4C, LexA-40.2, y LexA-40.3 que introducían cuatro citosinas en medio, sustituían TGTA por cuatro citosinas, y sustituían TATA también por cuatro citosinas respectivamente (Fig.3.10). Los fragmentos obtenidos mediante PCR con dichos oligonucleótidos y LexA+65dig se usaron en ensayos EMSA (Fig.3.10).

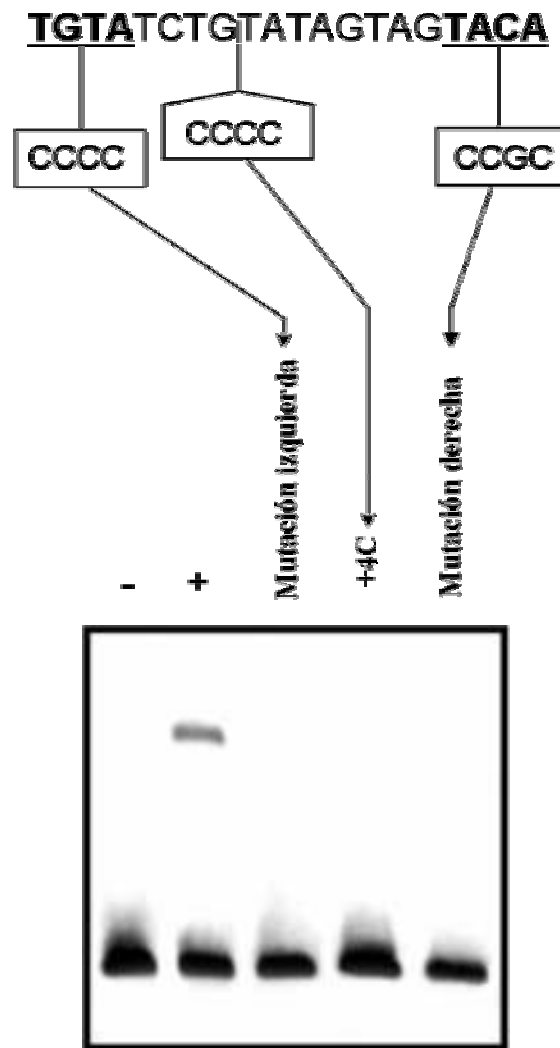


Figura 3.10. Movilidad electroforética de fragmentos modificados de LexA4. Dichos fragmentos presentan sustituciones en los motivos TGTA (Mutación izquierda), TACA (Mutación derecha) o una inserción de 4 nucleótidos en la región interna de la secuencia a estudiar. Se muestra tanto la movilidad de dichos fragmentos en presencia de proteína LexA, como la del fragmento LexA4 en presencia y en ausencia de la misma cantidad de proteína como control.

Tal y como se observa en la Figura 3.10, sustituciones de cuatro nucleótidos de cada motivo y la inserción de cuatro citosinas en medio de la repetición directa deshacen el retraso del fragmento de promotor de *lexA*, por lo que éste motivo es importante para la unión.

Para confirmar que esta secuencia contiene el lugar específico de unión a LexA, se llevaron a cabo análisis mutacionales del promotor *lexA* usando el fragmento LexA4, a partir del cual fueron introducidas mutaciones puntuales de cada nucleótido. Para esto se diseñaron los oligonucleótidos del LexA1.3 al LexA9.2 indicados la Tabla 2.2. Los efectos que cada mutación tuvo en la movilidad electroforética del fragmento en presencia de la proteína LexA se muestran en la Figura 3.11.

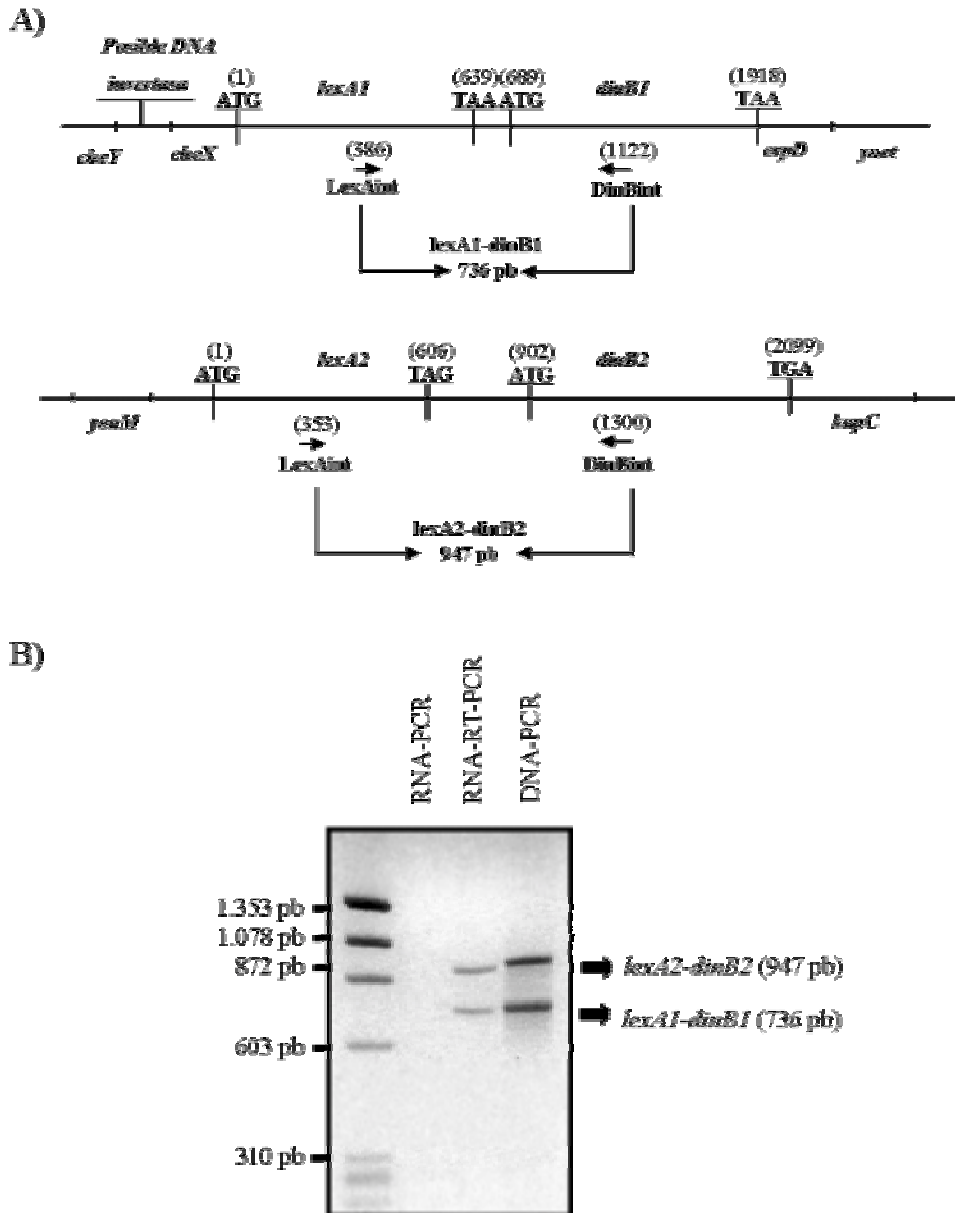


Figura 3.12. (A) Disposición estructural de los genes *lexA1*, *dinB1*, *lexA2* y *dinB2* de *G. sulfurreducens*. Los puntos de inicio de traducción y los codones STOP de cada uno de estos genes se encuentran en **negrita y subrayados**. Las posiciones de los oligonucleótidos (LexAint y DinBint) utilizados para determinar las características de las unidades transcripcionales están indicadas por flechas. Los números indican la posición con respecto al codón de inicio de traducción de *lexA1* o *lexA2*. Los genes encontrados inmediatamente por encima y por debajo de *lexA1-dinB1* y de *lexA2-dinB2* también están indicados. (B) Análisis mediante RT-PCR de las unidades transcripcionales *lexA1-dinB1* y *lexA2-dinB2* sobre RNA total de *G. sulfurreducens* (RNA-RT-PCR). Como control se llevaron a cabo PCR con los mismos oligonucleótidos, pero sin transcriptasa inversa, tanto sobre el RNA (RNA-PCR), como sobre el DNA (DNA-PCR) como molde. El marcador de peso molecular utilizado (DNA de λ x174 digerido con *Hae*III) se muestra en el lado izquierdo del gel en pares de bases.

Con el fin de confirmar esta hipótesis, se llevaron a cabo análisis de RT-PCR sobre RNA total de *G. sulfurreducens* diseñando una única pareja de oligonucleótidos (LexAint y DinBint) con los que se pretendían obtener fragmentos de 736 y 947 pb, respectivamente, si *lexA1-dinB1* o *lexA2-dinB2* formaban parte de la misma unidad transcripcional (Fig.3.12A). El diseño de una única pareja de oligonucleótidos se pudo llevar a cabo gracias a las regiones homólogas presentes tanto entre ambos genes *lexA* como entre ambos genes *dinB*. Los

productos obtenidos demostraron que la transcripción de cada uno de los dos *lexA* está unida a su respectivo *dinB* (Fig.3.12B).

Por otro lado, y tal y como se observa en la Figura 3.12, los entornos de ambos genes *lexA* son diferentes, y es interesante la presencia de una DNA invertasa inmediatamente antes del gen *lexA1*.

3.3.1.2. Caracterización de la expresión del gen *recA*

Con la intención de analizar la expresión del gen *recA* de *G. sulfurreducens*, que como se ha mencionado en la introducción es un gen que en *E. coli* está implicado tanto en recombinación como en reparación tendente a error, se llevaron a cabo diversos estudios. Primero se identificó el gen en cuestión mediante una búsqueda TBLASTN con la proteína RecA de *E. coli* como muestra. Se encontró una proteína RecA de *G. sulfurreducens* cuyo homólogo más parecido fue la RecA2 de *Myxococcus xanthus* (73%), otro miembro de las proteobacterias Delta. Por otro lado, el contenido de G+C del gen *recA* de *G. sulfurreducens* era similar al de su gen *lexA2*.

Una búsqueda en la región anterior al gen *recA* reveló la ausencia del palíndromo imperfecto requerido para la unión de LexA1 y LexA2. De acuerdo con esto, la movilidad electroforética del promotor de *recA* no se vió afectada por la presencia de las proteínas LexA1 y LexA2 en el correspondiente ensayo EMSA (Fig. 3.13A).

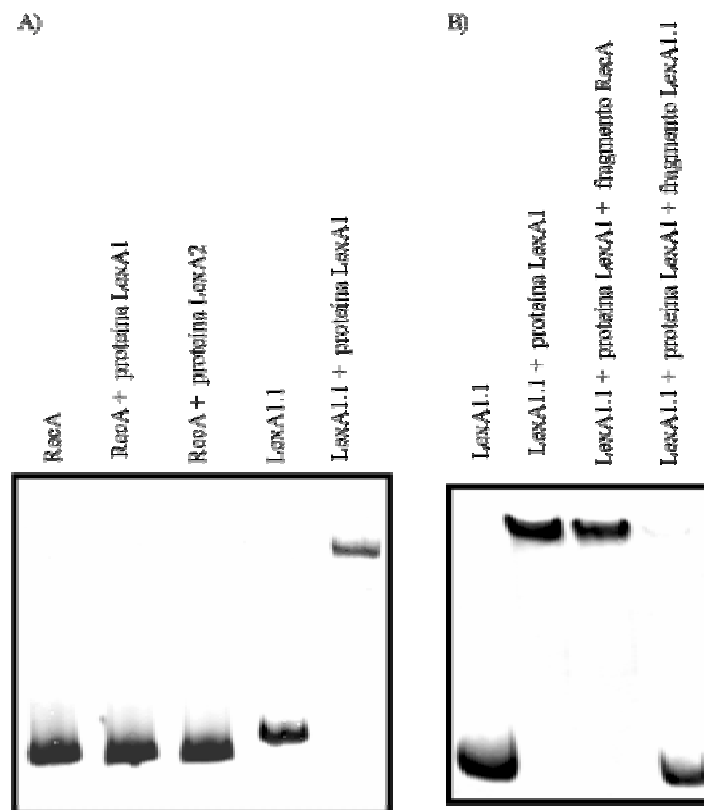


Figura 3.13. (A) Movilidad electroforética del promotor *recA* en presencia o ausencia de proteínas LexA1 y LexA2 purificadas de *G. sulfurreducens*. La movilidad del fragmento LexA1.1 en ausencia y en presencia de la proteína LexA1 también se muestra como control. (B) Efecto del exceso de fragmento RecA en la movilidad electroforética del fragmento LexA1.1 en presencia de proteína LexA1. Como controles, se muestra la movilidad del fragmento LexA1.1 en ausencia de proteína LexA1, así como en presencia de proteína LexA1 pero con y sin el fragmento LexA1.1 sin marcar como competidor.

Dicho fragmento del promotor de *recA* se obtuvo mediante PCR con los oligonucleótidos RecAup y RecAdw, y clonando el fragmento resultante, de 268 pb, en el vector de pGEM-T². Tras ser secuenciado utilizando los oligonucleótidos Direct-Cy5 y Reverse-Cy5 se procedió a amplificar la misma porción de promotor *recA* marcado con digoxigenina, a partir del pGEM-Tp*recA* secuenciado, mediante los oligonucleótidos RecAup y RecAdw-dig.

Para asegurarse de la ausencia de capacidad del promotor de *recA* de *G. sulfurreducens* para unirse a las proteínas LexA se probó añadir promotor *recA* no marcado a una reacción de unión entre un fragmento del promotor de *lexA1* marcado y la proteína LexA1 (Fig.3.13B). En dicho análisis se observó que el promotor de *recA* no competía por el de *lexA1* en su unión con la proteína LexA1, con lo que se concluyó que el gen *recA* no se une a ninguna de las proteínas LexA de *G. sulfurreducens*.

Como consecuencia de los resultados obtenidos, se decidió investigar si el gen *recA* de *G. sulfurreducens* era inducible por daño en el DNA (Fig.3.14). A partir de RNA de *G. sulfurreducens* tratado y no tratado con 20 μ g/ml de mitomicina C durante 1,5 horas, se realizó una RT-PCR cuantitativa a tiempo real, en la que se analizó el comportamiento tanto de *recA* como del tandem *lexA2-dinB2*. Para llevarla a cabo se utilizaron los oligonucleótidos TrpB, TrpA (que amplificaban parte de la región codificante del gen triptófano sintetasa, estándar para nuestro ensayo), RecAA, RecAB, LexA2A y LexA2B.

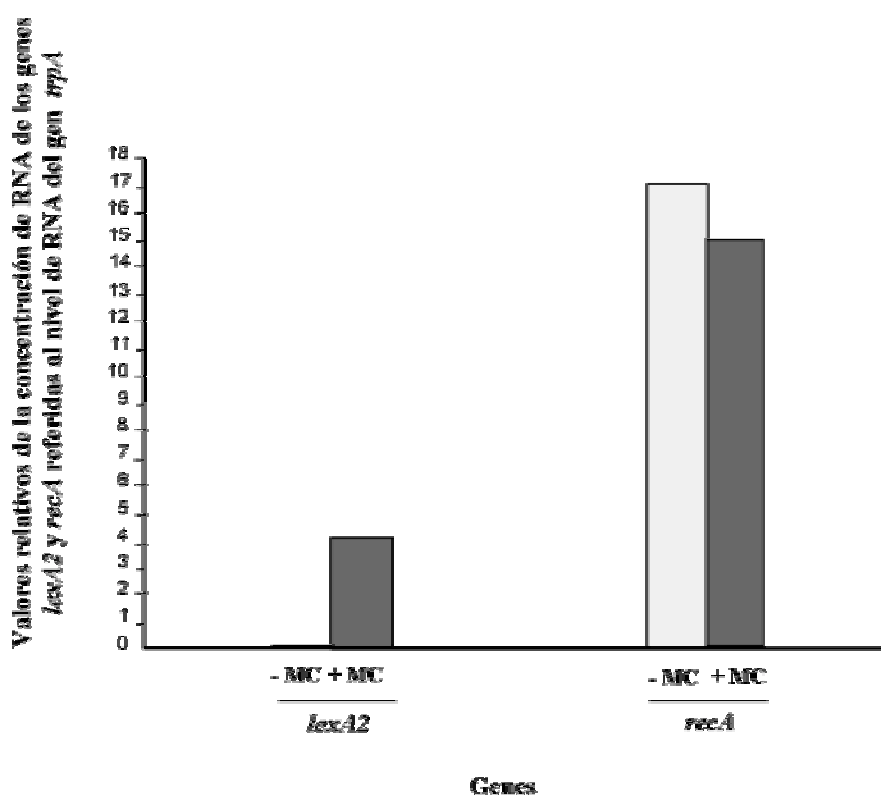


Figura 3.14. Inducción por mitomicina C de los genes *recA* y *lexA2* determinada por RT-PCR cuantitativa. Los datos presentados son la relación entre las concentraciones de mRNA de *lexA2* y *recA* en relación con el de *trpA*, tanto en presencia (+MC) como en ausencia (-MC) de mitomicina C. Los valores fueron calculados 1,5 horas tras la adición de mitomicina C. En todos los casos, los datos presentados son la media de tres PCR independientes y la desviación estándar de cada valor nunca superó el 10%.