
Los resultados de dicho estudio se indican en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Resultados de la cuantificación de RNA en *F. nucleatum* para los diferentes genes del estudio.

Gen	Niveles sin mitomicina C ¹	Niveles con mitomicina C ¹	Factor de Inducción ²
<i>lexA</i>	6,71E-05	1,72E-03	25,63
<i>dinB</i>	8,05E-05	2,16E-03	26,83
<i>recA</i>	2,29E-04	1,44E-03	6,29

¹ Cifras en unidades relativas a la concentración del RNA de 16SrRNA utilizado como estándar.

² El factor fue calculado dividiendo los valores relativos de la concentración de RNA de los genes indicados referidos al nivel de RNA del 16SrRNA con y sin 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%.

Estos datos ponen de manifiesto que los tres genes estudiados se ven inducidos por daños en el DNA.

3.3.3. Análisis en la clase Alfa de proteobacterias

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio habían determinado que la caja LexA del gen *recA* de *Rhizobiaceae* era GAAC N₇ GAAC (Tapias y Barbé, 1998). Además una comparación entre los promotores de los genes *recA* y *uvrA* de diferentes especies del grupo Alfa definió el motivo GTTCYKYYYYGTTC como la caja SOS de dicho grupo filogenético (Tapias y Barbé, 1999).

Partiendo de esta base y siguiendo el ejemplo de anteriores estudios realizados en nuestro laboratorio (Erill *et al.*, 2003) se procedió a realizar una búsqueda de genes bajo el control de una caja LexA en diferentes especies pertenecientes a las proteobacterias Alfa: *Agrobacterium tumefaciens*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Caulobacter crescentus*, *Mesorhizobium loti*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Sinorhizobium meliloti*, *Rickettsia conorii* y *Rickettsia prowazekii*.

3.3.3.1. Contenido del regulón LexA

Mediante un programa algorítmico predictivo de motivos reguladores se procedió a analizar los genomas de los microorganismos indicados en el apartado anterior. El estudio tiene lugar en dos fases. En una primera fase el programa reconoce mediante búsqueda BLAST los genes de los microorganismos que son similares como mínimo en un 60% a los genes SOS de *E. coli*. A continuación busca un motivo parecido a GAAC N₄ GAAC y, a partir de las cajas encontradas, el programa crea una caja consenso y la utiliza para filtrar el total de cajas previamente descubiertas en el genoma. En una segunda fase el programa extrae un núcleo de genes conservados y, juntamente con los datos experimentales previos, se crea una segunda búsqueda más astringente. Los resultados se muestran en la Tabla 3.2.

Los resultados de dicho estudio se indican en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Resultados de la cuantificación de RNA en *F. nucleatum* para los diferentes genes del estudio.

Gen	Niveles sin mitomicina C ¹	Niveles con mitomicina C ¹	Factor de Inducción ²
<i>lexA</i>	6,71E-05	1,72E-03	25,63
<i>dinB</i>	8,05E-05	2,16E-03	26,83
<i>recA</i>	2,29E-04	1,44E-03	6,29

¹ Cifras en unidades relativas a la concentración del RNA de 16SrRNA utilizado como estándar.

² El factor fue calculado dividiendo los valores relativos de la concentración de RNA de los genes indicados referidos al nivel de RNA del 16SrRNA con y sin 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%.

Estos datos ponen de manifiesto que los tres genes estudiados se ven inducidos por daños en el DNA.

3.3.3. Análisis en la clase Alfa de proteobacterias

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio habían determinado que la caja LexA del gen *recA* de *Rhizobiaceae* era GAAC N₇ GAAC (Tapias y Barbé, 1998). Además una comparación entre los promotores de los genes *recA* y *uvrA* de diferentes especies del grupo Alfa definió el motivo GTTCYYKYYYYGTTTC como la caja SOS de dicho grupo filogenético (Tapias y Barbé, 1999).

Partiendo de esta base y siguiendo el ejemplo de anteriores estudios realizados en nuestro laboratorio (Erill *et al.*, 2003) se procedió a realizar una búsqueda de genes bajo el control de una caja LexA en diferentes especies pertenecientes a las proteobacterias Alfa: *Agrobacterium tumefaciens*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Caulobacter crescentus*, *Mesorhizobium loti*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Sinorhizobium meliloti*, *Rickettsia conorii* y *Rickettsia prowazekii*.

3.3.3.1. Contenido del regulón LexA

Mediante un programa algorítmico predictivo de motivos reguladores se procedió a analizar los genomas de los microorganismos indicados en el apartado anterior. El estudio tiene lugar en dos fases. En una primera fase el programa reconoce mediante búsqueda BLAST los genes de los microorganismos que son similares como mínimo en un 60% a los genes SOS de *E. coli*. A continuación busca un motivo parecido a GAAC N₄ GAAC y, a partir de las cajas encontradas, el programa crea una caja consenso y la utiliza para filtrar el total de cajas previamente descubiertas en el genoma. En una segunda fase el programa extrae un núcleo de genes conservados y, juntamente con los datos experimentales previos, se crea una segunda búsqueda más astringente. Los resultados se muestran en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Genes con caja LexA en las diferentes proteobacterias Alfa estudiadas.

Genes SOS	Cc	At	Sm	Bm	Bs	MI	Bj	Rp	Función
<i>lexA</i>									Represor del sistema SOS.
<i>recA</i>									Regulador positivo del sistema SOS.
<i>ssb</i>									Unión a ssDNA.
<i>yigN</i>									Desconocida.
<i>uvrA</i>									Reparación por escisión.
<i>sulA1</i>									Inhibidor de la división celular.
<i>dinB</i>									DNA polimerasa IV.
<i>uvrD</i>									Helicasa II
<i>recN</i>									Recombinación.
<i>uvrB</i>									Reparación.
<i>ftsK</i>									División celular.
<i>sulA2</i>									Inhibidor de la división celular.
<i>ruvA</i>									Recombinación.
Posibles adiciones									
<i>moaA</i>									Biosíntesis del cofactor de molibdeno.
<i>dnaE</i>									Subunidad ζ de la DNA polimerasa III.
<i>ruvC</i>									Recombinación.
<i>recG</i>									Helicasa.
<i>mgpS</i>									Desconocida.
<i>moaAco</i>									Desconocida.
<i>comM</i>									Competencia.
<i>htpX</i>									Proteasa.
<i>rhIE-2</i>									Helicasa.
<i>recJ</i>									Exonucleasa.
<i>nth</i>									Enconucleasa.
<i>ibpA</i>									Resistencia al calor.
<i>hflX</i>									Unión a GTP.
<i>mfd</i>									Factor de reparación.
<i>ftsY</i>									División celular.
<i>dinF</i>									Desconocida.
<i>xerD</i>									Integrasa/recombinasa.
<i>cheW</i>									Quimiotaxis.
<i>parE</i>									DNA topoisomerasa IV.
<i>sulAco</i>									Desconocida.

Cc: *Caluobacter crescentus*, At: *Agrobacterium tumefaciens*, Sm: *Sinorhizobium meliloti*, Bm: *Brucella melitensis*, Bs: *Brucella suis*, MI: *Mesorhizobium loti*, Bj: *Bradyrhizobium japonicum*, Rp: *Rhodopseudomonas palustris*. Los cuadrados grises indican la bacteria en la que el gen correspondiente presenta el motivo LexA.

En dicha Tabla no aparecen *Rickettsia conorii* ni *Rickettsia prowazekii* porque el programa, siendo coherente con los resultados hasta ahora publicados (Dunkin y Wood, 1994), no encontró ningún análogo a *lexA* en su genoma. Estos microorganismos, parásitos intracelulares estrictos, habrían reducido su genoma al mínimo necesario para la supervivencia dentro del huésped, donde el entorno no contendría sustancias mutagénicas que hicieran necesarias la existencia de un regulón LexA.

En el resto de bacterias se observa la existencia de un amplio regulón LexA conservado dentro de las proteobacterias Alfa en comparación con las Gamma: *lexA*, *recA*, *ssb*, *yigN*, *uvrA* y *sulA1*. En las proteobacterias Gamma, el regulón LexA conservado se limita a los genes *lexA*, *recA* y *recN* (Erill *et al.*, 2003).

Dentro de las posibles adiciones destacan los genes *dnaE*, *moaA* y *ruvC*, presentes en todos los casos, y *comM*, menos representado pero con una interesante función que potenciaría la competencia en una bacteria en situación de desventaja. Asimismo, cabe señalar que el gen situado cerca de *moaA*, que en el presente trabajo se indica como *moaAco*, comparte motivo de unión a LexA en un número significativo de proteobacterias Alfa.

3.3.3.2. Análisis de la expresión *in vivo* del regulón LexA

Con el objetivo de validar experimentalmente mediante ensayos *in vivo* los resultados conseguidos mediante el análisis biocomputacional, se seleccionaron 13 genes del microorganismo *Sinorhizobium meliloti* que presentaban al menos una caja con un HI (índice de heterología) menor que 6 (Tabla 3.3). Se determinó este valor como estándar porque, en una prueba sobre *E. coli*, al añadir este valor al programa se obtuvo la máxima sensibilidad y especificidad, es decir, el programa definió el máximo número de genes regulados que ya se conocían, y mostró menos genes no definidos previamente (Erill *et al.*, 2003).

Con el fin de realizar ensayos EMSA con los promotores de los genes seleccionados se decidió clonar, sobreexpresar y purificar la proteína LexA de *S. meliloti*. Se amplificó la región codificante del gen *lexA* de *S. meliloti* mediante los oligonucleótidos *lexSmdwSal* y *lexSm+1Eco* a partir de su DNA genómico. Como resultado se obtuvo un fragmento de 713 pb con dianas *EcoRI* y *Sall* en los extremos que fue clonado en el vector pGEM-T² y secuenciado. A continuación se procedió, como en los casos anteriores, a su liberación mediante una digestión con los enzimas de restricción *EcoRI* y *Sall* y a su clonación en el vector pGEX-4T-1 para llevar a cabo la sobreexpresión y purificación de la proteína LexA de *S. meliloti* (Fig.3.21).

Tabla 3.3. Genes de *S. meliloti* seleccionados para su estudio *in vivo*.

Nombre	Locus	Caja	D ¹	HI ²
<i>lexA</i>	SMc01183	GTTCTTGATTTGTTT	21	2.30
		GAACACATATGGAAC	47	3.11
<i>comM</i>	SMc00420	GTTCTATCATTGTTTC	139	5.29
<i>dinP/dinB</i>	SMc01373	GTTCCGGATATGATC	+6	6.54
		GTTCAACATTTGTTTC	5	3.66
<i>dnaE</i>	SMc01375	GAACACGCAGTAAAC	102	7.82
		GAACAGTAGCGGAAA	248	9.66
		GAACAAAAAGGGAAC	259	0
		GAACGGAAATAGAAC	270	4.15
<i>moaA</i>	SMc00866	GTTCTTGATTTGTTTC	65	0.72
<i>moaAco</i> ³	SMc00865	GAACAAATCAAGAAC	101	1.92
<i>parE</i>	SMc01018	ATTCGCCTTTTGTTC	118	5.60
<i>ruvC</i>	SMc03967	GTTTTTGTTTTGTTTC	44	1.75
<i>sulA1</i>	SMc03790	GAACATAACATGAAC	+6	2.65
<i>sulA2</i>	SMa0888	GAACAAATACAGAAC	+33	2.08
<i>sulA1co</i> ⁴	SMc03791	GTTCAATGTTATGTTTC	135	3.13
<i>yigN</i>	SMc01102	GTTCTCGTTTTGATC	35	3.68
SMc03093	SMc03093	GTTCTTGATTTGTTTC	148	0.72

¹ Distancia de la caja al inicio de traducción. Los valores positivos indican cajas intragénicas.

² Índice de heterología de cada motivo.

³ Este gen es adyacente al *moaA*. Durante todo el experimento se usó este nombre.

⁴ Este gen es adyacente al *sulA* cromosómico. Durante todo el experimento se usó este nombre.

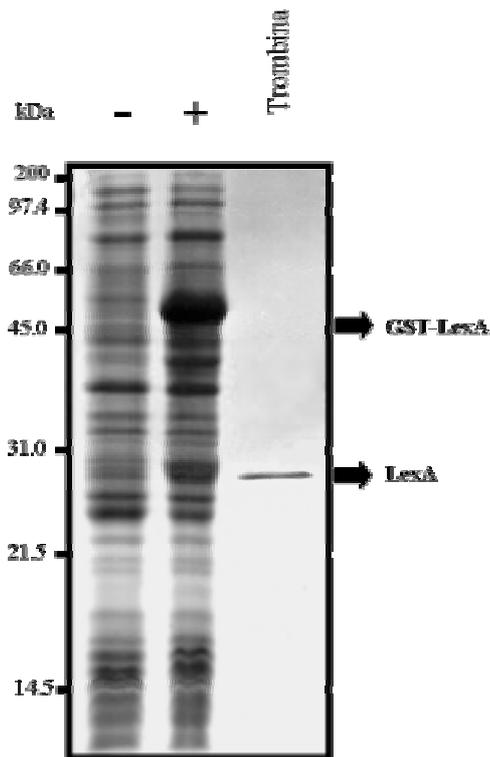


Figura 3.21. Sobreexpresión y purificación de la proteína de *S. meliloti* en *E. coli*. Las muestras fueron visualizadas en un gel de poliacrilamida SDS al 13%. En la imagen se presentan extractos crudos de células *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) llevando el plásmido pGEX-4TLexA en ausencia (-) o en presencia (+) de IPTG (isopropyl- η -D-thiogalactopyranoside). También se observa la proteína LexA purificada. Los marcadores de peso molecular están indicados en el lado izquierdo de la imagen en kilodaltons.

Paralelamente se amplificaron los promotores de los genes seleccionados las parejas de oligonucleótidos descritos en la Tabla 2.2. Una vez amplificados, clonados en pGEMT-T² y secuenciados, todos estos fragmentos sirvieron de competidores para la unión de plexA-LexA (Fig.3.22).

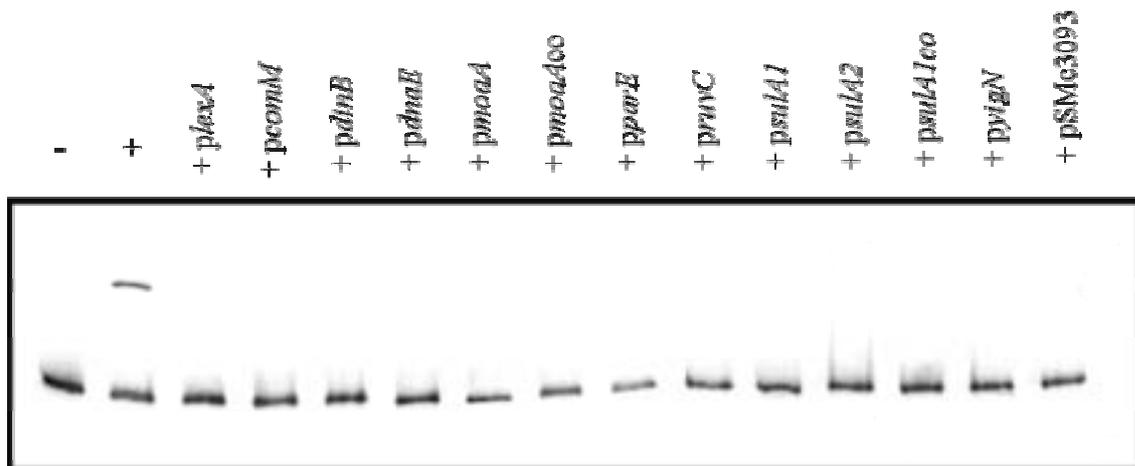


Figura 3.22. Movilidad electroforética del promotor *lexA* de *S. meliloti* sin (-) y con (+) proteína LexA purificada del mismo microorganismo en presencia de promotores que contienen una posible caja LexA de este microorganismo. En los siguientes pozos se observa el efecto que tiene en dicha unión la adición de 1 μ g de

fragmentos de promotores sin marcar con digoxigenina. Como se puede observar, dichos fragmentos deshacen el retraso, por lo que se puede afirmar que compiten con el promotor *lexA* marcado por unirse a la proteína LexA.

Tal y como muestra la Figura 3.22, todas las regiones promotoras de los genes indicados en la Tabla 3.2 se unen a la proteína LexA. A continuación nos propusimos estudiar la expresión *in vivo* de estos genes en condiciones inductoras del sistema SOS. Para llevarlo a cabo, como en el caso de *G. sulfurreducens*, se realizó una inducción de *S. meliloti* con 20 µg/ml de mitomicina C durante 6 horas y se extrajo su RNA mediante el kit Quiagen² tal y como se describe en el punto 2.5.1.2 del apartado de Material y Métodos.

Paralelamente se diseñaron las parejas de oligonucleótidos adecuados para amplificar la región interna de cada gen a estudiar, entre los que se encontraba una que permitía amplificar la región interna del gen codificante de la treonina sintetasa, cuyo producto se utilizó como estándar para la RT cuantitativa a tiempo real. Los resultados obtenidos mediante el ensayo que procedió a continuación se indican en la Tabla 3.4 y muestran que existe inducción en todos los casos.

Tabla 3.4. Análisis cuantitativo de la evolución de diferentes genes de *S. meliloti* tras ser tratada con mitomicina C.

Gen	Niveles sin mitomicina C ¹	Niveles con mitomicina C ¹	Factor de Inducción ²
<i>lexA</i>	2,18E-01	2,67	12,26
<i>comM</i>	9,3E-02	2,1	22,62
<i>dinB</i>	5,09E-01	86,82	170,65
<i>dnaE</i>	3,02E-02	4,82E-02	1,6
<i>moaA</i>	3,71E-02	5,94E-01	16,02
<i>moaAco</i>	4,23E-01	1,7	4,02
<i>parE</i>	5,61E-02	1,51E-01	2,7
<i>ruvC</i>	1,4E-02	7,1E-03	5,2
<i>sulAcr</i>	2,11E-02	1,22	58,00
<i>sulApl</i>	5,7E-03	9,33E-01	164,17
<i>sulAcrco</i>	7,46E-01	1,86	2,49
<i>yigN</i>	1,53E-01	2,03	13,30
SMc3093	2E-04	6,05E-2	300,62

¹ Cifras en unidades relativas a la concentración del RNA del gen *thrC*, utilizado como estándar.

² El factor fue calculado dividiendo los valores relativos de la concentración de RNA de los genes indicados referidos al nivel de RNA del 16SrRNA con y sin 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%.

Esta inducción validó los resultados de *S. meliloti* obtenidos biocomputacionalmente, y, por lo tanto, permitieron otorgar un alto grado de fiabilidad a los obtenidos en el resto de microorganismos.

De esta forma, el motivo de unión de LexA en *S. meliloti* quedó definido por la secuencia consenso RAWC N₇ RAAH.

3.3.4. Análisis en bacterias gram positivas

Publicaciones previas habrían identificado los motivos de unión a LexA de *Bacillus subtilis* (Winterling *et al.*, 1997) y de *Mycobacterium tuberculosis* (Davis *et al.*, 2002). A partir de estos datos y, como en el punto anterior, se procedió a seleccionar un grupo de microorganismos perteneciente a las bacterias gram positivas para proceder a su análisis biocomputacional. Se procuró realizar el estudio sobre bacterias representantes del mayor número posible de clases, por lo que finalmente fueron seleccionadas 24 cepas pertenecientes a 21 especies: *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis CDC 1551*, *Mycobacterium tuberculosis H37Rv*, *Streptomyces coelicolor*, *Corynebacterium efficiens* y *Corynebacterium glutamicum* como representantes de los actinomicetales; *Bifidobacterium longum* como representante de los bifidobacteriales; *Bacillus subtilis*, *Bacillus halodurans* y *Bacillus anthracis* de los Bacillaceae; *Listeria innocua* y *Listeria monocytogenes* de los Listeria; *Staphylococcus aureus MW2*, *Staphylococcus aureus Mu50*, *Staphylococcus aureus N315* y *Staphylococcus epidermidis* como representantes de los Staphylococcus; *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium perfringens* y *Clostridium tetani* de los Clostridia; y *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* y *Lactococcus lactis*.

3.3.4.1. Contenido del regulón LexA

De la misma manera que en el estudio de las proteobacterias Alfa, se realizó el estudio biocomputacional sobre los microorganismos arriba descritos. Los resultados se representan en la Tabla 3.5.

En dicha Tabla no se muestran los resultados correspondientes a *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* y *Lactococcus lactis* porque el estudio no reveló la presencia de gen *lexA* en ninguno de ellos.

Asimismo, se observa que el regulón LexA conservado en los diferentes grupos es bastante reducido, restringido a los genes *lexA* y *recA*. Esto es lógico teniendo en cuenta el alto número de microorganismos estudiados procedentes de muy diversos grupos taxonómicos.

Si se pasa a analizar los resultados de forma particular, se observa un regulón LexA conservado bastante extenso en el género *Listeria*, el formado por los genes *lexA*, *recA*, *dinB*, *uvrB* y *ruvA*. Asimismo, en el resto de grupos los genes *dinB*, *uvrB* y *ruvA* son los que más frecuentemente se hayan con un motivo LexA predecible en su promotor.

Al analizar los resultados también se observan conjuntos de genes que, aunque tradicionalmente no se han descrito como genes SOS, nuestro estudio indica como posibles adiciones al regulón LexA. Estos genes se presentan agrupados según la filogenia, y a continuación se comentan los más significativos:

- i) En Actinomicetales se observan los genes *trpD* y *appC*. El gen *trpC* codifica una proteína que cataliza la síntesis de antranilato, sustancia usada como protector frente a ultravioleta en la industria cosmética.

Tabla 3.5. Genes con caja LexA en las diferentes bacterias gram positivas estudiadas.

Genes SOS	ACTINOBACTERIA										FIRMICUTES										Función
	ACTINOMICETALES					BACILLACEAE					BACILLALES					CLOSTRIDIA					
	MI	MtC	MtH	Sc	Ce	BI	Cg	Bs	Bh	Ba	LI	Lm	SaMW	SaMu	SaN	Se	Ca	Cp	Ct		
lexA																				Represor del sistema SOS.	
recA																				Regulador positivo del sistema SOS.	
dinB																				DNA polimerasa IV	
uvrB																				Reparación por escisión.	
uvrA																				Recombinación	
ssb																				Unión a ssDNA.	
uvrA																				Reparación por escisión.	
ftsK																				División celular.	
recN																				Recombinación.	
uvrB																				Recombinación.	
uvrD																				Helicasa II.	
uvrC																				Recombinación.	
Posibles adiciones																					
dnaE																				DNA polimerasa III.	
radA																				Reparación.	
trpD																				Síntesis de antranilato.	
dnaB																				Helicasa.	
appC																				Transportador ABC.	
pcrA																				Helicasa.	
recQ																				Helicasa.	
uvrC																				Reparación.	
recO																				Recombinación.	
recR																				Recombinación.	
impB/mucB																				Unión a GTP/ATP.	
dnaA																				Iniciador de la replicación.	
xerD																				Integrasa/recombinasa.	
czrA																				Represor de transporte zinc/cobalto.	
udk																				Uridina quinasa.	
rpsF																				Proteína ribosomal.	
sbcD																				Exonucleasa.	
xerC																				Integrasa/recombinasa.	
MW2098																				Hidrolasa dependiente de metal.	

MI: *Mycobacterium leprae*, MtC: *MtMycobacterium tuberculosis* CDC 1551, MtH: *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, Sc: *Streptomyces coelicolor*, Ce: *Corynebacterium efficiens*, Cg: *Corynebacterium glutamicum*, BI: *Bifidobacterium longum*, Bs: *Bacillus subtilis*, Bh: *Bacillus halodurans*, Ba: *Bacillus anthracis*, LI: *Listeria innocua*, Lm: *Listeria monocytogenes*, SaMW: *Staphylococcus aureus* MW2, SaMu: *Staphylococcus aureus* Mu50, SaN: *Staphylococcus aureus* N315, Se: *Staphylococcus epidermidis*, Ca: *Clostridium acetobutylicum*, Cp: *Clostridium perfringens*, y Ct: *Clostridium tetani*.

- ii) En *Bacillaceae* y *Listeria* es común el gen *pcrA*, que codifica una helicasa.
- iii) *xerD*, *udk*, *sbcD* y MW2098 son posibles adiciones en la familia *Staphylococcus*, que codifican, respectivamente, una recombinasa específica de lugar, una uridina deoxiribonucleosido quinasa, una exonucleasa y una hidrolasa dependiente de metal.
- iv) *czrA* es un gen frecuentemente encontrado en los grupos *Staphylococcus* y *Clostridia*, y codifica un represor del transporte de zinc.

Desde un punto de vista global parece ser que, al igual que en el caso de proteobacterias Alfa, las bacterias patógenas presentan un regulón LexA menos desarrollado, como es el caso de *Mycobacterium* y *Staphylococcus*.

3.3.4.2. Análisis de la expresión *in vivo* del regulón LexA

Al igual que en el caso de proteobacterias Alfa, se diseñaron diferentes experimentos para validar los resultados obtenidos. En este caso el microorganismo escogido fue *Bacillus subtilis*, debido a que se disponía tanto de la cepa como de la proteína purificada. Así, y debido a que el número de genes con caja LexA es menor que en el caso de *S. meliloti*, se decidió comprobar la funcionalidad *in vivo* de todos los motivos LexA encontrados. Dichos motivos se indican en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6. Genes de *B. subtilis* candidatos para su estudio *in vivo*

Nombre	Locus	Caja	D ¹
<i>lexA</i>	Bsu1786	GAACCTATGTTT	59
		GAACAAACGTTT	88
		GAATGTTTGTTT	125
<i>dinB</i> ²	Bsu0563	GAACTCATGTTC	43
<i>recA</i> ²	Bsu1695	GAATATGCGTTC	87
		GAAAAACAGTTC	16
<i>uvrB</i> ²	Bsu3514	GAACTTTAGTTC	79
<i>ruvA</i>	Bsu2770	GAACATATGTTA	66
<i>dnaE</i>	Bsu2919	GAACATTTGTTT	63
<i>appC</i>	Bsu1141	GAACAAATTTTC	180
<i>pcrA</i>	Bsu0662	GAACGTATGTTT	23
<i>recQ</i>	Bsu2301	GAACAGCGGTTC	47
<i>uvrC</i>	Bsu2845	AAACAAACGTTC	46
<i>recO</i>	Bsu2524	GAACGTATTTTC	152
<i>recR</i>	Bsu0021	AAACAGCGGTTC	+77
<i>yneA</i> ²	Bsu1787	AAACATAGGTTC	70
		GAACAAACATTC	4
<i>tagC</i> ²	Bsu3575	GAACAAGTGTTT	87
		GAACGTATGTTT	57

¹ Distancia de la caja al inicio de traducción. Los valores positivos indican cajas intragénicas.

² Genes cuya pertenencia al regulón LexA ya ha sido descrita y demostrada con anterioridad (Marrero y Yasbin, 1988; Raymond-Denise y Guillen, 1991; Cheo *et al.*, 1991; Kawai *et al.*, 2003).

Descartados los genes que con anterioridad ya estaban descritos como pertenecientes al regulón LexA, se procedió al estudio de la capacidad de unión de los 9 genes restantes a la proteína LexA. Para llevarlo a cabo se diseñaron los oligonucleótidos indicados en la Tabla 2.2.2, se amplificaron mediante PCR fragmentos de la región promotora de cada gen que contenía el motivo de unión y se clonó en el vector pGEM-T². Tras su secuenciación se amplificaron y purificaron para proceder a su utilización en un ensayo EMSA (Figura 3.23).

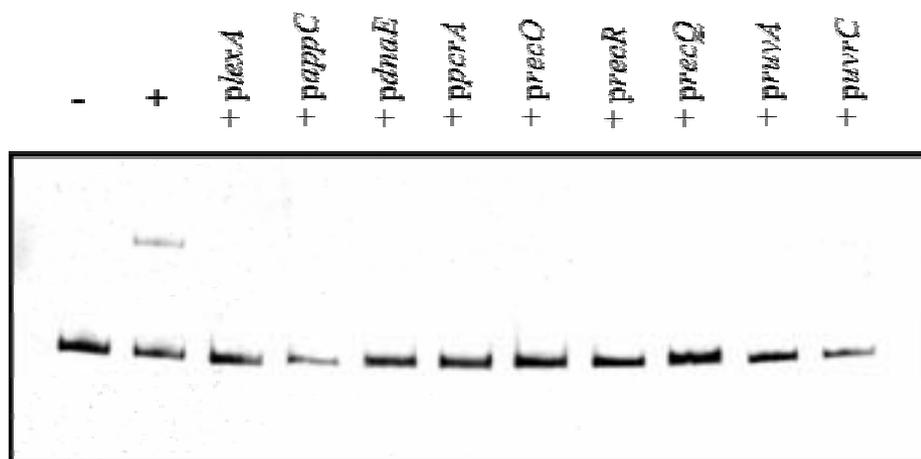


Figura 3.23. Movilidad electroforética del promotor *lexA* de *B. subtilis* sin (-) y con (+) 5 ng de proteína LexA purificada del mismo microorganismo en presencia de promotores que contienen una posible caja LexA de este microorganismo. En los siguientes pozos se observa el efecto que tiene en dicha unión la adición de fragmentos de promotores sin marcar con digoxigenina. Como se puede observar, dichos fragmentos deshacen el retraso, por lo que se puede afirmar que compiten con el promotor *lexA* marcado por unirse a la proteína LexA.

Tal y como muestra la Figura 3.23, todas las regiones promotoras de los genes indicados en la Tabla 3.6 se unen a la proteína LexA. A continuación, de manera similar a la llevada a cabo en el caso de *S. meliloti*, se propuso estudiar la expresión *in vivo* de estos genes en condiciones inductoras del sistema SOS.

Con esta intención se diseñaron oligonucleótidos para amplificar un fragmento de entre 200 y 300 pb de la región interna de cada gen. Dichos oligonucleótidos fueron destinados a un estudio de RT-PCR cuantitativa a tiempo real, en el que el RNA de estudio fue el obtenido, mediante el quit Quiagen² (punto 2.5.1.2), de células *B. subtilis* tras un tratamiento con 20 µg/ml de mitomicina C durante 1,5 horas. RNA procedente de células sin tratar también fue necesario para comparar ambos niveles de expresión y deducir el comportamiento de los genes estudiados frente a situaciones inductoras del sistema LexA.

Los resultados obtenidos en dicho estudio corroboraron los reflejados en el ensayo EMSA (Fig. 3.23), observándose inducción en todos los casos. Así pues, se validaron los resultados de *B. subtilis* obtenidos biocomputacionalmente lo que, al igual que en el caso de las proteobacterias Alfa, otorgó un alto grado de fiabilidad a los obtenidos en el resto de microorganismos.

En el caso particular de *B. subtilis*, el motivo consenso de unión a LexA quedó definido como RAAH N₄ DTTH.

4. Discusión

Los resultados obtenidos a lo largo del presente trabajo, resumidos en la Tabla 4.1, nos indicaron la existencia de regulones LexA muy diversos según la especie e incluso con pequeñas variaciones entre cepas. Asimismo, se observaron patrones de expresión no descritos hasta la fecha. Este es el caso de *G. sulfurreducens*, cuyo estudio reveló que la transcripción de cada gen *lexA* se haya unida a su respectivo gen *dinB* siendo la primera especie bacteriana descrita con esta organización genética. En *E. coli* el gen *lexD* es el que se encuentra detrás del gen *lexA* (Miki *et al.*, 1984); y en *Xylella fastidiosa* es *recA* el que sigue a *lexA* (Campoy *et al.*, 2002). Una búsqueda TBLASTN por el genoma de *Geobacter metallireducens* (<http://www.jgi.doe.gov>) con la proteína LexA1 de *G. sulfurreducens* como sonda reveló que el gen *dinB* también se encuentra inmediatamente detrás del gen *lexA* en esta especie. Este hecho podría indicar que la presencia de una sola unidad transcripcional que comprende ambos genes *lexA* y *dinB* es una característica común en el género *Geobacter*. No obstante, a diferencia de *G. sulfurreducens*, no se detectó una segunda copia del operón *lexA-dinB* en *G. metallireducens*. Debido a que el genoma de este microorganismo aún no está completamente secuenciado, no se puede descartar su posible existencia. El contenido G+C de los genes *lexA2* de *G. sulfurreducens* y el *lexA* de *G. metallireducens*, al igual que el de sus entornos, es aproximadamente del 65%, mientras que el del gen *lexA1* es solamente del 56%. Esta diferencia no nos permite excluir una posible incorporación del gen *lexA1* mediante transferencia horizontal.

Algunos regulones estudiados, como el de *G. sulfurreducens* y *F. nucleatum*, han resultado ser bastante reducidos. Ambos incluyen únicamente los respectivos genes *lexA* y *dinB*. El gen *recA* de *G. sulfurreducens* es el primero que, perteneciendo a un microorganismo con proteína LexA, no es inducible por daño en el DNA. El gen *recA* de *Porphyromonas gingivalis* tampoco es estimulado por daño en el DNA (Liu *et al.*, 2001), pero en la secuencia completa de este microorganismo no se encontró ningún gen *lexA* (<http://www.tigr.org>). El gran potencial mutagénico del entorno al que se ve sometido *G. sulfurreducens* podría haber dirigido un proceso evolutivo hacia una síntesis constitutiva de RecA, que, tal y como se indica en la introducción, es una de las proteínas más importantes implicadas en la reparación mediante recombinación en bacterias. De hecho, el nivel transcripcional del gen *recA* de *G. sulfurreducens* demostró ser muy superior tanto al de *lexA* como al de *trpA* (Fig. 3.14).

En el caso de *F. nucleatum* también nos encontramos con un gen *recA* no regulado por LexA (Fig.3.20) pero, a diferencia del perteneciente a *G. sulfurreducens*, es inducible por daño en el DNA (Tabla 3.1), aunque en grado menor al de los genes *lexA* y *dinB*. Una posible explicación sería la existencia de un segundo gen *lexA* funcional, que controlaría a el gen *recA*, pero búsquedas biocomputacionales no han dado ningún resultado en este sentido. Ante este hecho, la posible existencia de un segundo mecanismo de respuesta al daño en el DNA, a parte del clásico controlado por LexA, ha sido apuntada por algunos autores (Brooks *et al.*, 2001). El hecho que en *G. sulfurreducens* el gen *recA* no se encontrara tampoco

Tabla 4.1. Composición génica del regulón LexA en los microorganismos analizados en el presente trabajo.

	Genoma ¹	Regulación	Reparación ²	Ciclo celular ²	Metabólicos ²	Competencia ²
§	Caulobacteriales					
	<i>Caulobacter crescentus</i>	lexA recA	ssb uvrA uvrD recN uvrB dnaE recG rhIE-2 recJ nth	sulA1 sulA2 ftsK ftsY	moaA hflX	comM ibpA cheW
	Rhizobiales					
	<i>Brucella mellitensis</i>	lexA recA	ssb uvrA dinB uvrD dnaE ruvC recG rhIE-2 recJ nth parE	sulA ftsY	moaA	
	<i>Brucella suis</i>	lexA recA	ssb uvrA dinB ruvC recG rhIE-2 recJ mfd xerD parE	sulA.	moaA hflX	comM ibpA cheW
	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	lexA recA	ssb uvrA dinB uvrD recN uvrB dnaE ruvC recG rhIE-2 nth mfd	sulA ftsY	moaA hflX	comM ibpA
	<i>Mesorhizobium loti</i>	lexA recA	ssb uvrA dinB recN dnaE ruvC recG recJ xerD parE	sulA ftsY	moaA	comM
	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	lexA recA	ssb uvrA dinB uvrD ruvA dnaE ruvC nth mfd parE	sulA1 sulA2 ftsK	moaA hflX	comM ibpA cheW
	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	lexA recA	ssb uvrA dnaE ruvC	sulA	moaA	comM
	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	lexA recA	ssb uvrA dnaE ruvC	sulA	moaA	
	Rickettsiales					
	<i>Rickettsia conorii</i>	----- ³				
<i>Rickettsia prowazekii</i>	----- ³					
	Fusobacteriales					
	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	lexA	dinB			
†	Desulfuromonadales					
	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	lexA1 lexA2	dinB1 dinB2			
Bajo G+C	Bacillales					
	<i>Bacillus subtilis</i>	lexA recA	ssb dinB uvrB ruvA dnaE pcrA recQ uvrC recO recR		appC	
	<i>Bacillus halodurans</i>	lexA recA	ssb dinB uvrA uvrB dnaB pcrA recR	ftsK		
	<i>Bacillus anthracis</i>	lexA recA	dinB ruvA ruvB uvrC		impB/mucB	
	<i>Listeria innocua</i>	lexA recA	dinB uvrB ruvA dnaE radA pcrA uvrC			
	<i>Listeria monocytogenes</i>	lexA recA	dinB uvrB ruvA dnaE pcrA recQ uvrC			
	<i>Staphylococcus aureus</i> MW2	lexA recA	uvrB dnaA xerD sbcD xerC		impB/mucB czrA udk rpsF	
	<i>Staphylococcus aureus</i> Mu50	lexA recA	dinB uvrB xerD sbcD xerC		czrA udk rpsF	
	<i>Staphylococcus aureus</i> N315	lexA recA	uvrB xerD sbcD xerC		impB/mucB czrA udk rpsF	
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	lexA recA	dinB uvrB dnaA sbcD		czrA udk	
	Clostridiales					
	<i>Clostridium perfringens</i>	lexA recA	ssb dinB pcrA recO recQ		czrA	
	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	lexA recA	uvrB		czrA	
	<i>Clostridium tetani</i>	lexA recA	dinB	ftsK		
	Lactobacillales					
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	----- ³				
	<i>Streptococcus mutans</i>	----- ³				
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	----- ³				
<i>Streptococcus pyogenes</i>	----- ³					
<i>Lactococcus lactis</i>	----- ³					
Micoplasmatales	----- ³					
Alto G+C	Actinomicetales					
	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	lexA recA	ssb recN ruvB uvrD radA dnaA		impB/mucB	
	<i>Corynebacterium efficiens</i>	lexA recA	ssb dnaE			
	<i>Streptomyces coelicolor</i>	lexA recA	uvrA dnaE pcrA		trpD appC	
	<i>Mycobacterium leprae</i>	lexA recA	recN dnaE dnaB		trpD appC	
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC 1551	lexA recA	ruvC dnaB	ftsK	trpD appC	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	lexA recA	ruvC dnaB		trpD appC		
Bifidobacteriales						
<i>Bifidobacterium longum</i>	lexA recA					

¹ Microorganismos listados por ordenes de acuerdo con el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. En colores se indica el hábitat correspondiente ambiental (azul), plantas (verde), animales(rojos si son patógenos obligados o naranja si pueden tener vida libre).

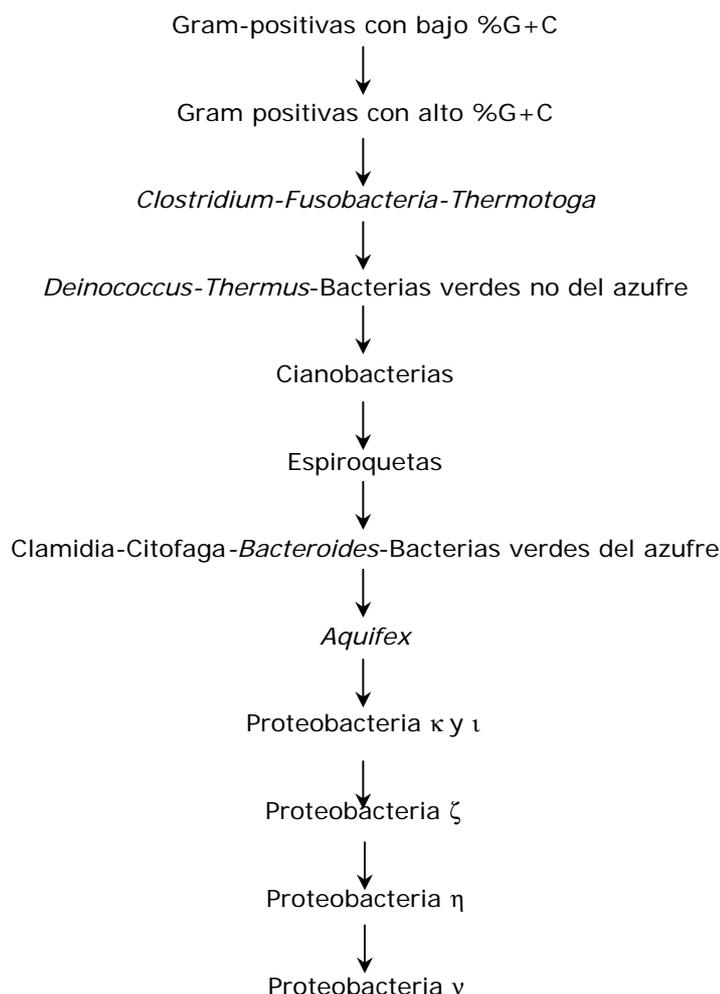
² En negrita se indican los genes que pertenecen al regulón LexA en *E. coli*. Se resaltan en colores los genes que se comentan en la discusión.

³ Especies que carecen de *lexA* aunque poseen *recA*.

regulado por LexA, indica la existencia de regulones LexA atípicos, cuya cascada de reacciones está por dilucidar. En este caso, en el entorno natural de *F. nucleatum*, (orofaringe, tracto gastrointestinal y genitourinario) es de esperar que los desencadenantes del tradicional sistema SOS (ultravioleta, mutágenos) no sean muy frecuentes, por lo que la existencia de un regulón SOS reducido y, en cierta manera, atípico, sería lógico. De hecho, recientemente se ha descrito en *M. tuberculosis* genes inducibles por daño en el DNA mediante un mecanismo independiente a RecA (Rand *et al.*, 2003).

Sin embargo, estos dos microorganismos no son los únicos con un regulón LexA reducido. En el caso de *X. fastidiosa* (Campoy *et al.*, 2002) solamente la unidad transcripcional *lexA-recA* y un gen que codifica una posible metilasa se encuentran bajo el control directo de la proteína LexA. A parte de *G. sulfurreducens* y *F. nucleatum*, otros microorganismos estudiados en el presente trabajo han resultado presentar un regulón LexA con pocos componentes. Es el caso, por ejemplo, de los pertenecientes a los géneros *Clostridium* y *Mycobacterium*.

Los resultados globales demuestran la existencia de un regulón LexA flexible, que a lo largo de la evolución ha ido aumentando o perdiendo genes bajo su control. Estudios recientes describen la evolución de los diferentes grupos bacterianos a partir de un ancestro común (Gupta *et al.*, 2002), describiendo su orden filogenético como se indica a continuación:



Según dicho orden, la tendencia general del regulón LexA a lo largo de la evolución habría sido la de aumentar progresivamente sus componentes. No obstante, dentro de cada grupo existe cierta diversidad. Con el fin de averiguar si la composición del regulón LexA estaba relacionado con el entorno del microorganismo, en la Tabla 4.1 se procedió a indicar, mediante colores, si el entorno de la bacteria es ambiental (azul), vegetal (verde), animal y/o humana patógena oportunista o no (naranja) y animal y/o humana patógena obligada (rojo). En general, bacterias patógenas muy dependientes del huésped presentaron un regulón LexA muy reducido o inexistente. Este es el caso de Rickettsiales dentro de las proteobacterias Alfa, y de los Micoplasmatales dentro de las bacterias gram positivas.

En cambio, un género como *Brucella*, cuyos componentes son patógenos animales y humanos que han visto disminuido el tamaño de su genoma (Delrue *et al.*, 2004), resultaron presentar un regulón LexA bastante desarrollado.

A grandes rasgos parece influir más el grupo taxonómico al que pertenece que el entorno en el que se desarrolla el microorganismo. Por esto, y de acuerdo con trabajos precedentes (Erill *et al.*, 2003), el uso de la composición del regulón LexA como marcador filogenético sería totalmente válido.

De entre los genes pertenecientes a dicho regulón y comunes para todas las proteobacterias Alfa estudiadas que poseen regulón LexA se encontraron los genes reguladores *lexA* y *recA*, el gen codificante de la proteína de unión a DNA de cadena sencilla *ssb*, un componente del complejo de reparación por escisión (*uvrA*) y el inhibidor de filamentación celular *suIA*. Otros genes se hallaron en un gran número de microorganismos, si bien no en todos. Es el caso de la DNA polimerasa IV (*dinB*), y otro componente del complejo de reparación por escisión (*uvrD*). Por lo tanto, queda patente la importancia de la DNA polimerasa IV como integrante del regulón LexA. Su ubicuidad dentro del dominio *Bacteria* como perteneciente a dicho regulón, se observa al haberse descrito también en proteobacterias Gamma (Erill *et al.*, 2003), y al hallarse en el presente estudio en proteobacterias Alfa, en *G. sulfurreducens* y en *F. nucleatum*, así como en bacterias gram positivas. De hecho, estudios recientes describen la importancia de la actividad de este gen para la supervivencia celular y el mantenimiento de la *fitness* a lo largo de la evolución (Bjedov *et al.*, 2003).

En cambio, otros genes típicos del regulón LexA en *E. coli*, como *ftsK* que codifica una proteína de división celular que participa, juntamente con XerD y XerC, en la resolución de dímeros (Massey *et al.*, 2004), y un componente de la reacción de reactivación de horquillas de replicación bloqueadas (*ruvA*), pertenecen al regulón LexA de únicamente dos proteobacterias Alfa, *S. meliloti* y *C. crescentus*. De hecho, son estos dos microorganismos los que poseen un regulón LexA más desarrollado y parecido al descrito para *E. coli*. En cambio, *xerC* y *xerD*, que en *E. coli* no forman parte del regulón LexA, si que se encontraron en el regulón en varias *Bacillales*.

Asimismo, genes que hasta ahora no se habían descrito como genes SOS (Tabla 4.1) se encuentran ampliamente representados en las proteobacterias Alfa. En este grupo tenemos el que codifica la proteína de biosíntesis del cofactor de molibdeno, *moaA*, la subunidad ζ de la DNA polimerasa III (*dnaE*) y una resolvasa (*ruvC*). El gen *dnaE* también

forma parte del regulón LexA de algunas bacterias gram positivas. La inclusión de la DNA polimerasa III dentro del sistema SOS de grupos filogenéticos anteriores a las proteobacterias Alfa significaría una gran diferencia en cuanto a la organización genética de este grupo del dominio *Bacteria* con respecto a lo descrito en especies como *E. coli*, donde es la enzima de replicación cromosómica más destacada (McHenry, 1991). Esto podría señalar hacia una evolución de las DNA polimerasas en las que algunas de ellas, como la DNA polimerasa III, hubiese ido perdiendo su papel inicial como integrante de la respuesta SOS para pasar a dedicarse únicamente a la replicación cromosómica en las proteobacterias Gamma.

En las bacterias gram positivas estudiadas también se observaron genes pertenecientes al regulón LexA no descritos hasta ahora. Este es el caso, por ejemplo, del gen *pcrA*, que codifica una helicasa esencial de bacterias gram positivas, aunque su papel preciso en el metabolismo celular del DNA aún es desconocido (Anand *et al.*, 2004). Los resultados obtenidos en el presente trabajo le adjudican un papel como componente del regulón LexA en 6 de las 18 bacterias gram positivas estudiadas y que resultaron poseer un sistema SOS análogo.

Por otro lado, cabe destacar el descubrimiento del gen *sbcD* como integrante del regulón LexA en los microorganismos del género *Staphylococcus*. Homólogos a SbcC y SbcD se encuentran en muchas bacterias y siempre se encuentran juntas. Por tanto, la interacción de estas proteínas parece que se ha conservado a lo largo del tiempo (Eisen *et al.*, 1999). Dada la homología existente entre estas proteínas y MRE11/RAD50 (que se encuentran en eucariotas y en las *Archaea*), se puede pensar que se trataban de proteínas antiguas y que su ausencia en determinadas especies se debe a una pérdida genética (Eisen *et al.*, 1999). Teniendo en cuenta los problemas sanitarios que infecciones provocadas por *Staphylococcus* producen hoy en día, profundizar en las funciones que este componente del regulón LexA pudiera ejercer durante la infección podría ser interesante para futuras aplicaciones sanitarias.

Otro gen controlado por LexA en microorganismos de un grupo muy específico, los Actinomicetales, fue el *trpD*. En microorganismos como *B. subtilis* y *E. coli*, los genes *trp* están regulados negativamente por el producto de la vía en la que participan y, además, todos ellos se encuentran juntos en un único operón (Hu *et al.*, 1999). En cambio, en *S. coelicolor* el gen *trpD* se encuentra a parte. La proteína codificada por *trpD* cataliza la reacción de síntesis de un intermediario de la vía de biosíntesis de los aminoácidos aromáticos triptófano, tirosina y fenilalanina a partir de corismato. Este intermediario es el antranilato, cuyo derivado N-acetil-metil antranilato tiene propiedades fotoprotectoras (Beeby y Jones, 2001). Aunque ninguna publicación relaciona el antranilato bacteriano con su compuesto derivado usado en la industria química, es sumamente sugerente que la síntesis de un compuesto con posibles características fotoprotectoras se halle bajo el control de la respuesta SOS, ya que supondría una barrera más de defensa ante los daños de la luz ultravioleta para este grupo de microorganismos.

En general, cada especie presenta un regulón LexA diferente según su clasificación filogenética y sus características particulares. La flexibilidad en su composición, a veces muy

alejada de la clásica de *E. coli*, abre las puertas a futuros estudios sobre la variabilidad de la respuesta SOS en el mundo bacteriano.

5. Conclusiones

1. *G. sulfurreducens* posee dos unidades transcripcionales *lexA-dinB* independientes y cuyas respectivas proteínas LexA1 y LexA2 se unen al mismo motivo de secuencia GTT N₂ C N₄ G N₃ ACC.
2. El gen *recA* de *G. sulfurreducens* no está bajo el control de ninguna de las dos proteínas LexA, y su expresión es constitutiva frente al daño en el DNA.
3. El regulón LexA de *G. sulfurreducens* tan sólo está constituido por las dos unidades transcripcionales *lexA-dinB*.
4. Mediante ensayos de movilidad electroforética, mutagénesis dirigida y *footprinting*, se ha demostrado que el motivo TRTAM N₁₀ TACA es a la caja LexA de *F. nucleatum*.
5. La proteína LexA de *F. nucleatum* no se une al promotor de su gen *recA* a pesar de que éste es inducible por mitomicina C. Por lo tanto el gen *recA* no forma parte del regulón LexA de *F. nucleatum* que tan sólo está compuesto por *lexA* y *dinB*.
6. Mediante análisis *in silico* hemos demostrado que las proteobacterias Alfa estudiadas poseen unos regulones LexA cuyos genes comunes son: *lexA*, *recA*, *ssb*, *yigN*, *uvrA*, *sulA* y *moaA*, estando a su vez muy representados los genes *dinB*, *dnaE*, *ruvC* y *comM*.
7. Los estudios *in silico* realizados sobre bacterias gram positivas han permitido identificar posibles nuevos genes regulados por LexA, como *appC* en *M. leprae*, *pcrA* en *B. subtilis*, y *sbcD*, *xerD* y *czrA* en *S. aureus*.
8. El conjunto de resultados obtenidos en el análisis de la constitución del regulón LexA de diferentes especies bacterianas pone de manifiesto que éste presenta una extraordinaria variabilidad, sugiriendo la existencia de transferencia génica horizontal en su evolución.

6. Bibliografía

Anand SP, Khan SA. 2004. Structure-specific DNA binding and bipolar helicase activities of PcrA. *Nucleic Acids Res.* Jun 15;32(10):3190-7. Print 2004.

Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, y K. Struhl. 1995. *Current Protocols in Molecular Biology*. Eds. John Wiley & Sons Inc. Cambridge. Massachusetts. USA.

Battista, J. R., J. Ohta, T. Nohmi, W. Sun, y G. C. Walker. 1990. Dominant negative *umuD* mutations decreasing RecA-mediated cleavage suggest roles for intact UmuD in modulations of SOS mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* Sep;87(18):7190-4.

Beeby, A., A. E. Jones. 2001. Photophysical properties of N-acetyl-menthyl anthranilate. *J Photochem Photobiol B.* Nov 15;64(2-3):109-16.

Berg, O. G. y P. H. von Hippel. 1987. Selection of DNA binding sites by regulatory proteins. Statistical-mechanical theory and application to operators and promoters. *J Mol Biol.* Feb 20;193(4):723-50.

Berg, O. G. 1988. Selection of DNA binding sites by regulatory proteins. Functional specificity and pseudosite competition. *J Biomol Struct Dyn.* Oct;6(2):275-97.

Bianco, P. R. y S. C. Kowalczykowski. 1997. The recombination hotspot Chi is recognized by the translocating RecBCD enzyme as the single strand of DNA containing the sequence 5'-GCTGGTGG-3'. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun 24;94(13):6706-11.

Birnboim, H. C., y J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* Nov 24;7(6):1513-23.

Bjedov, I., G. Lecointre, O. Tenailon, C. Vaury, M. Radman, F. Taddei, E. Denamur e I. Matic. 2003. Polymorphism of genes encoding SOS polymerases in natural populations of *Escherichia coli*. *DNA Repair (Amst).* Apr 2;2(4):417-26.

Bork, J. M., M. M. Cox, y R. B. Inman. 2001. RecA protein filaments disassemble in the 5' to 3' direction on single-stranded DNA. *J Biol Chem.* Dec 7;276(49):45740-3.

Brent, R., y M. Ptashne. 1981. Mechanism of action of the *lexA* gene product. *Proc Natl Acad Sci USA.* Jul;78(7):4204-8.

Brooks PC, Movahedzadeh F, Davis EO. 2001. Identification of some DNA damage-inducible genes of *Mycobacterium tuberculosis*: apparent lack of correlation with LexA binding. *Bacteriol. Aug*;183(15):4459-67.

Caccavo F. Jr, D. J. Lonergan, D. R. Lovley, M. Davis, J. F. Stolz y M. J. McInerney. 1994. *Geobacter sulfurreducens* sp. nov., a hydrogen- and acetate-oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism. *Appl Environ Microbiol.* Oct;60(10):3752-9.

Campoy S, Mazon G, Fernandez de Henestrosa AR, Llagostera M, Monteiro PB, Barbe J. 2002. A new regulatory DNA motif of the gamma subclass Proteobacteria: identification of the LexA protein binding site of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Microbiology.* Nov;148(Pt 11):3583-97.

Campoy, S., M. Fontes, S. Padmanabhan, P. Cortes, M. Llagostera, J. Barbe. 2003. LexA-independent DNA damage-mediated induction of gene expression in *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol.* Aug;49(3):769-81.

Cheo, D. L., K. W. Bayles y R. E. Yasbin. 1991. Cloning and characterization of DNA damage-inducible promoter regions from *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* Mar;173(5):1696-703.

Churchill, J. J., D. G. Anderson, y S. C. Kowalczykowski. 1999. The RecBC enzyme loads RecA protein onto ssDNA asymmetrically and independently of chi, resulting in constitutive recombination activation. *Genes Dev.* Apr 1;13(7):901-11.

Coppi, M. V., C. Leang, S. J. Sandler y D. R. Lovley. 2001. Development of a genetic system for *Geobacter sulfurreducens*. *Appl Environ Microbiol.* Jul;67(7):3180-7.

Courcelle, J., A. Khodursky, B. Peter, P. O. Brown y P. C. Hanawalt. 2001. Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. *Genetics.* May;158(1):41-64.

Cox, M. M. 1998. A broadening view of recombinational DNA repair in bacteria. *Genes Cells.* Feb;3(2):65-78.

Davis, E. O., E. M. Dullaghan y L. Rand. 2002. Definition of the mycobacterial SOS box and use to identify LexA-regulated genes in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol.* Jun;184(12):3287-95.

Delrue, R. M., P. Lestrade, A. Tibor, J. J. Letesson y X. De Bolle. 2004. Brucella pathogenesis, genes identified from random large-scale screens. *FEMS Microbiol Lett.* Feb 9;231(1):1-12.

Demple, B. 1997. Study of redox-regulated transcription factors in prokaryotes. *Methods Enzymol.* Mar;11(3):267-78.

Dower, W. J., J. F. Miller, y C. W. Ragsdale. 1988. High efficient transformation of *Escherichia coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* Jul 11;16(13):6127-45.

Dunkin, S. M. y D. O. Wood. 1994. Isolation and characterization of the *Rickettsia prowazekii recA* gene. *J Bacteriol.* Mar;176(6):1777-81.

Eisen, J. A. y P. C. Hanawalt. 1999 . A phylogenomic study of DNA repair genes, proteins, and processes. *Mutat Res.* Dec 7;435(3):171-213.

Erill, I., M. Escribano, S. Campoy y J. Barbe. 2003. In silico analysis reveals substantial variability in the gene contents of the gamma proteobacteria LexA-regulon. *Bioinformatics.* Nov 22;19(17):2225-36.

Felis, G. E. , F. Dellaglio, L. Mizzi y S. Torriani. 2001. Comparative sequence analysis of a *recA* gene fragment brings new evidence for a change in the taxonomy of the *Lactobacillus casei* group. *Int J Syst Evol Microbiol.* Nov;51(Pt 6):2113-7.

Fernández de Henestrosa, A. R., T. Ogi, S. Aoyagi, D. Chafin, J. J. Hayes, H. Ohmori, y R. Woodgate. 2000. Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* Mar;35(6):1560-72.

Fogh, R. H., G. Oettleben, H. Rüterjans, M. Schnarr, R. Boelens, y R. Kaptein. 1994. Solution structure of the LexA repressor DNA binding domain determined by NMR spectroscopy. *EMBO J.* Sep 1;13(17):3936-44.

Frank, E. G ., J. Hauser, A. S. Levine y R. Woodgate. 1993. Targeting of the UmuD, UmuD', and MucA' mutagenesis proteins to DNA by RecA protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* Sep 1;90(17):8169-73.

Friedberg, E. C., G. C. Walker, y W. Siede. 1995. DNA repair and mutagenesis. American Society for Microbiology Press, American Society for Microbiology, Washington D. C.

Galas, D. J. y A. Schmitz. 1978. DNase footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity. *Nucleic Acids Res.* Sep;5(9):3157-70.

Gelfand, M. S., E. V. Koonin y A. A. Mironov. 2000a. Prediction of transcription regulatory sites in Archaea by a comparative genomic approach. *Nucleic Acids Res.* Feb 1;28(3):695-705.

Gelfand, M. S., P. S. Novichkov, E. S. Novichkova y A. A. Mironov. 2000b. Comparative analysis of regulatory patterns in bacterial genomes. *Brief Bioinform.* Nov; 1(4):357-71.

Gonzalez, M., y R. Woodgate. 2002. The "tale" of UmuD and its role in SOS mutagenesis. *BioEssays.* Feb; 24(2):141-8.

Gupta, R. S. y E. Griffiths. 2002. Critical issues in bacterial phylogeny. *Theor Popul Biol.* Jun; 61(4):423-34.

Harmon, F. G., W. M. Rehrauer, y S. C. Kowalczykowski. 1996. Interaction of *Escherichia coli* RecA protein with LexA repressor. II. Inhibition of DNA strand exchange by the uncleavable LexA S119A repressor argues that recombination and SOS induction are competitive processes. *J. Biol. Chem.* Sep 27; 271(39):23874-83.

Harrison, S. C., y A. K. Aggarwal. 1990. DNA recognition by proteins with the helix-turn-helix motif. *Annu Rev Biochem.* 59:933-969.

Horii, T., T. Ogawa, T. Nakatani, T. Hase, H. Matsubara, y H. Ogawa. 1981. Regulation of SOS functions: purification of *E. coli* LexA protein and determination of its specific site cleaved by the RecA protein. *Cell.* Dec; 27(3 Pt 2):515-22.

Hu, D. S., D. W. Hood, R. Heidstra R y D. A. Hodgson. 1999. The expression of the *trpD*, *trpC* and *trpBA* genes of *Streptomyces coelicolor* A3(2) is regulated by growth rate and growth phase but not by feedback repression. *Mol Microbiol.* May; 32(4):869-80.

Huisman, O. y R. D'Ari. 1981. An inducible DNA replication-cell division coupling mechanism in *Escherichia coli*. *Nature.* Apr 30; 290(5809):797-9.

Kapatral, V., I. Anderson, N. Ivanova , G. Reznik, T. Los, A. Lykidis, A. Bhattacharyya, A. Bartman, W. Gardner, G. Grechkin, L. Zhu, O. Vasieva, L. Chu, Y. Kogan, O. Chaga, E. Goltsman, A. Bernal, N. Larsen, M. D'Souza, T. Walunas, G. Pusch, R. Haselkorn, M. Fonstein, N. Kyrpides, R. Overbeek. 2002. Genome sequence and analysis of the oral bacterium *Fusobacterium nucleatum* strain ATCC 25586. *J Bacteriol.* Apr; 184(7):2005-18.

Karlin, S., G. M. Weinstock y V. Brendel. 1995. Bacterial classifications derived from RecA protein sequence comparisons. *J. Bacteriol.* Dec; 177(23):6881-93.

Karlin, S. y L. Brocchieri. 1996. Evolutionary conservation of RecA genes in relation to protein structure and function. *J. Bacteriol.* Apr; 178(7):1881-94.

Kawai, Y., S. Moriya y N. Ogasawara. 2003. Identification of a protein, YneA, responsible for cell division suppression during the SOS response in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol. Feb;47(4):1113-22.

Khil, P. P. y R. D. Camerini-Otero. 2002. Over 1000 genes are involved in the DNA damage response of *Escherichia coli*. Mol Microbiol. Apr;44(1):89-105.

Kim, B. y J. W. Little. 1993. LexA and lambda CI repressors as enzymes: specific cleavage in an intermolecular reaction. Cell. Jun 18;73(6):1165-73.

Kim, S. R., G. Maenhaut-Michel, M. Yamada, Y. Yamamoto, K. Matsui, Sofuni, T. Nohmi y H. Ohmori. 1997. Multiple pathways for SOS-induced mutagenesis in *Escherichia coli*: An overexpression of *dinB/dinP* results in strongly enhancing mutagenesis in the absence of any exogenous treatment to damage DNA. Proc Natl Acad Sci U S A. Dec 9;94(25):13792-7.

Kim, B., y J. W. Little. 1992. Dimerization of a specific DNA-binding protein on the DNA. Science. Jan 10;255(5041):203-6.

Kitagawa, Y., E. Akaboshi, H. Shinagawa, T. Horii, H. Ogawa y T. Kato. 1985. Structural analysis of the *umu* operon required for inducible mutagenesis in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A. Jul;82(13):4336-40.

Knegtel, R. M. A., R. H. Fogh, G. Otteleben, H. Rüterjans, P. Dumoulin, M. Schnarr, R. Boelens y R. Kaptein. 1995. A model for the LexA repressor DNA complex. Proteins. Mar;21(3):226-36.

Koch, W. H. y R. Woodgate. 1998. The SOS response. DNA damage and repair: DNA repair in prokaryotes and lower eukaryotes. Eds. J. A. Nickoloff y M. F. Hoekstra, 1a. ed. Humana Press, Totowa, New Jersey. Pag. 107-134.

Kogoma, T. 1997. Stable DNA replication: interplay between DNA replication, homologous recombination, and transcription. Microbiol Mol Biol Rev. Jun;61(2):212-38.

Kullen, M. J., L. J. Brady, D. J. O'Sullivan. 1997. Evaluation of using a short region of the *recA* gene for rapid and sensitive speciation of dominant bifidobacteria in the human large intestine. FEMS Microbiol Lett. Sep 15;154(2):377-83.

Kuzminov, A. 1999. Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage lambda. Microbiol Mol Biol Rev. Dec;63(4):751-813.

Landini, P., y M. Volkert. 1995. Transcriptional activation of the *Escherichia coli* adaptive response gene *aidB* is mediated by binding of methylated Ada protein. Evidence for a new consensus sequence for Ada-binding sites. *J Biol Chem.* Apr 7;270(14):8285-9.

Landini, P., y M. Volkert. 2000. Regulatory responses of the adaptive response to alkylation damage: a simple regulon with complex regulatory features. *J Bacteriol.* Dec;182(23):6543-9.

Lewis, L. K., G. R. Harlow, L. A. Gregg-Jolly y D. W. Mount. 1994. Identification of high affinity binding sites for LexA which define new DNA damage-inducible genes in *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* Aug 26;241(4):507-23.

Lin, L. L. y J. W. Little. 1988. Isolation and characterization of noncleavable (Ind-) mutants of the LexA repressor of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* May;170(5):2163-73.

Little, J. W., D. W. Mount, y C. R. Yanisch-Perron. 1981. Purified LexA protein is a repressor of the *recA* and *lexA* genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* Jul;78(7):4199-203.

Little, J. W. 1984. Autodigestion of LexA and phage lambda repressors. *Proc Natl Acad Sci USA.* Mar;81(5):1375-9.

Little, J. W. y S. A. Hill. 1985. Deletions within a hinge region of a specific DNA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Apr;82(8):2301-5.

Little, J. W. 1993. LexA cleavage and other self-processing reactions. *J Bacteriol.* Aug;175(16):4943-50.

Liu, Y. y H. M. Fletcher. 2001. Environmental regulation of *recA* gene expression in *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol.* Jun;16(3):136-43.

Lovley, D. R. 2000. Fe(III) and Mn(IV) reduction, p. 3-30. *In* D. R. Lovley (ed.), *Environmental microbe-metal interactions.* ASM Press, Washington, D.C.

Lowry O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr y R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* Nov;193(1):265-75.

Marechal, J., B. Clement, R. Nalin, C. Gandon, S. Orso, J. H. Cvejic, M. Bruneteau, A. Berry y P. Normand. 2000. A *recA* gene phylogenetic analysis confirms the close proximity of *Frankia* to *Acidothermus*. *Int J Syst Evol Microbiol.* Mar;50 Pt 2:781-5.

Marrero, R. y R. E. Yasbin. 1988. Cloning of the *Bacillus subtilis* *recE+* gene and functional expression of *recE+* in *B. subtilis*. *J Bacteriol.* Jan;170(1):335-44.

Massey, T. H., L. Aussel, F. X. Barre y D. J. Sherratt. 2004. Asymmetric activation of Xer site-specific recombination by FtsK. *EMBO Rep. Apr*;5(4):399-404.

McHenry, C. S. 1991. DNA polymerase III holoenzyme. Components, structure, and mechanism of a true replicative complex. *J Biol Chem. Oct 15*;266(29):19127-30.

McKenzie, G. J., D. B. Magner, P. L. Lee y S. M. Rosenberg. 2003. The *dinB* operon and spontaneous mutation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol. Jul*;185(13):3972-7.

Michan, C., M. Machado, G. Dorado, y C. Pueyo. 1999. *In vivo* transcription of the *Escherichia coli oxyR* regulon as a function of growth phase and in response to oxidative stress. *J. Bacteriol. May*;181(9):2759-64.

Miki, T., K. Shirabe, Y. Ebina y A. Nakazawa. 1984. Transcription analysis of the *lexA* gene of *Escherichia coli*: attenuation and cotranscription with the neighboring region. *Nucleic Acids Res. Jan 25*;12(2):1203-17.

Miller, J. M. 1992. A short course in bacterial genetics. Handbook. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.

Mustard, J. A., y J. W. Little. 2000. Analysis of *Escherichia coli* RecA interactions with LexA, I Cl, and UmuD by site-directed mutagenesis of *recA*. *J. Bacteriol. Mar*;182(6):1659-70.

Nohmi, T., J. R. Battista, L. A. Dodson, y G. C. Walker. 1988. RecA-mediated cleavage activates UmuD mutagenesis: mechanistic relationship between transcriptional derepression and posttranslational activation. *Proc Natl Acad Sci USA. Mar*;85(6):1816-20.

Oertel-Buchheit, P., J. Reinbolt, M. John, M. Granger-Schnarr y M. Schnarr. 1998. A LexA mutant repressor with a relaxed inter-domain linker. *Protein Sci. Feb*;7(2):512-5.

Pabo, C. O. y R. T. Sauer. 1984. Protein-DNA recognition. *Annu Rev Biochem. 53*:293-321.

Patzer, S. I. y K. Hantke. 2000. The zinc-responsive regulator Zur and its control of the *znu* gene cluster encoding the ZnuABC zinc uptake system in *Escherichia coli*. *J Biol Chem. Aug 11*;275(32):24321-32.

Pham, P., E. M. Seitz, S. Saveliev, X. Shen, R. Woodgate, M. M. Cox y M. F. Goodman. 2002. Two distinct modes of RecA action are required for DNA polymerase V-catalyzed translesion synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. Aug 20*;99(17):11061-6.

Quillardet, P., M. A. Rouffaud y P. Bouige. 2003. DNA array analysis of gene expression in response to UV irradiation in *Escherichia coli*. Res Microbiol. Oct; 154(8):559-72.

Rajewsky, N., N. D. Socci, M. Zapotocky y E. D. Siggia. 2002. The evolution of DNA regulatory regions for proteo-gamma bacteria by interspecies comparisons. Genome Res. Feb; 12(2):298-308.

Rand L, Hinds J, Springer B, Sander P, Buxton RS, Davis EO. 2003. The majority of inducible DNA repair genes in *Mycobacterium tuberculosis* are induced independently of RecA. Mol Microbiol. Nov; 50(3): 1031-42.

Rangarajan, S., R. Woodgate, M. F. Goodman. 2002 . Replication restart in UV-irradiated *Escherichia coli* involving pols II, III, V, PriA, RecA and RecFOR proteins. Mol Microbiol. Feb; 43(3):617-28.

Raymond-Denise, A. y N. Guillen. 1992. Expression of the *Bacillus subtilis* *dinR* and *recA* genes after DNA damage and during competence. J Bacteriol. May; 174(10):3171-6.

Rehrauer, W. M., I. Bruck, R. Woodgate, M. F. Goodman, y S. C. Kowalczykowski. 1998. Modulation of RecA nucleoprotein function by the mutagenic UmuD'C protein complex. J Biol Chem. Dec 4; 273(49):32384-7.

Rehrauer, W. M., P. E. Lavery, E. L. Palmer, R. N. Singh, y S. C. Kowalczykowski. 1996. Interaction of *Escherichia coli* RecA protein with LexA repressor. I. LexA repressor cleavage is competitive with binding of a secondary DNA molecule. J Biol Chem. Sep 27; 271(39):23874-83.

Rehrauer, W. M., y S. C. Kowalczykowski. 1996. The DNA binding site(s) of the *Escherichia coli* RecA protein. J. Biol. Chem. May 17; 271(20):11996-12002.

Reuven, N. B., G. Arad, A. Z. Stasiak, A. Stasiak, y Z. Livneh. 2001. Lesion bypass by the *Escherichia coli* DNA polymerase V requires assembly of a RecA nucleoprotein filament. J Biol. Chem. Feb 23; 276(8):5511-7.

Rodriguez-Garcia, A., M. Ludovice, J. F. Martin y P. Liras. 1997. Arginine boxes and the *argR* gene in *Streptomyces clavuligerus*: evidence for a clear regulation of the arginine pathway. Mol Microbiol. Jul; 25(2):219-28.

Roland, K.L., J. W. Little. 1990. Reaction of LexA repressor with diisopropyl fluorophosphate. A test of the serine protease model. J Biol Chem. Aug 5; 265(22):12828-35.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, y T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N. Y.

Sanger, F., S. Nicklen, y A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Dec;74(12):5463-7.

Sauer, R. T., R. R. Yocum, R. F. Doolittle, M. Lewis, y C. O. Pabo. 1982. Homology among DNA binding proteins suggests use of a conserved super-secondary structure. Nature. Jul 29;298(5873):447-51.

Schnarr, M., P. Oertel-Buchheit, M. Kazmaier, y M. Granger-Schnarr. 1991. DNA binding properties of the LexA repressor. Biochimie. Apr;73(4):423-31.

Shepley, D. P., y J. W. Little. 1996. Mutant LexA proteins with specific defects in autodigestion. Proc Natl Acad Sci USA. Oct 15;93(21):11528-33.

Shigekawa, K., y W. J. Dower. 1988. Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: a general approach to the introduction of macromolecules into cells. Biotechniques Sep;6(8):742-51.

Slilaty, S. N., y H. K. Vu. 1991. The role of electrostatic interactions in the mechanism of the peptide bond hydrolysis by Ser-Lys catalytic dyad. Protein Eng. Dec;4(8):919-22.

Slilaty, S. N., y J. W. Little. 1987. Lysine-156 and Serine-119 are required for LexA repressor cleavage: a possible mechanism. Proc Natl Acad Sci USA. Jun;84(12):3987-91.

Smith, B. T., y G. C. Walker. 1998. Mutagenesis and more: umuDC and the *Escherichia coli* SOS response. Genetics. Apr;148(4):1599-610.

Story, R. M., I. T. Weber, y T. A. Steitz. 1992. The structure of the *Escherichia coli* RecA protein monomer and polymer. Nature. Jan 23;355(6358):318-25. Erratum in: Nature 1992. Feb 6;355(6360):567.

Strauss, V. S., R. Roberts, L. Francis, y P. Pouryazdanparast. 2000. Role of the *dinB* gene product in spontaneous mutation in *Escherichia coli* with and impaired replicative polymerase. J Bacteriol. Dec;182(23):6742-50.

Sutton, M. D., B. T. Smith, V. G. Godoy, G. C. Walker. 2000. The SOS response: recent insights into umuDC-dependent mutagenesis and DNA damage tolerance. Annu Rev Genet.;34:479-497.

Tamas, I., L. Klasson, B. Canback, A. K. Naslund, A. S. Eriksson, J. J. Wernegreen, J. P. Sandstrom, N. A. Moran y S. G. Andersson. 2002. 50 million years of genomic stasis in endosymbiotic bacteria. Science. Jun 28;296(5577):2376-9.

Tang, M., P. Pham, X. Shen, J. S. Taylor, M. O'Donnell, R. Woodgate y M.F. Goodman. 2000. Roles of *E. coli* DNA polymerase IV and V in lesion-targeted and untargeted SOS mutagenesis. *Nature*. Apr 27;404(6781):1014-8.

Tang, M., X. Shen, E. G. Frank, M. O'Donnell, R. Woodgate, y M. F. Goodman. 1999. UmuD'2C is an error-prone DNA polymerase, *Escherichia coli* polV. *Proc Natl Acad Sci USA*. Aug 3;96(16):8919-24.

Tapias, A. y J. Barbe. 1998. Mutational analysis of the *Rhizobium etli* *recA* operator. *J Bacteriol*. Dec;180(23):6325-31.

Tapias, A. y J. Barbe. 1999. Regulation of divergent transcription from the *uvrA-ssb* promoters in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Gen Genet*. Aug;262(1):121-30.

Tartoff, K. D., y C. A. Hobbs. 1987. Improved media for growing plasmid and cosmid clones. *Bethesda Res. Lab. Focus* 9:12.

Thliveris, A. T. y D. W. Mount. 1992. Genetic identification of the DNA binding domain of *Escherichia coli* LexA protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. May 15;89(10):4500-4.

Thompson, C. C., F. L. Thompson, K. Vandemeulebroecke, B. Hoste, P. Dawyndt y J. Swings. 2004. Use of *recA* as an alternative phylogenetic marker in the family *Vibrionaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol*. May;54(Pt 3):919-24.

Torriani, S., G. E. Felis y F. Dellaglio. 2001. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers. *Appl Environ Microbiol*. Aug;67(8):3450-4.

Volkert, M. R. y P. Landini. 2001. Transcriptional responses to DNA damage. *Curr Opin Microbiol*. Apr;4(2):178-85.

Voloshin, O. N., B. E. Ramirez, A. Bax, y R. D. Camerini Otero. 2001. A model for the abrogation of the SOS response by an SOS protein: a negatively charged helix in DinI mimics DNA in its interaction with RecA. *Genes Dev*. Feb 15;15(4):415-27.

Wagner, J., P. Gruz, S. R. Kim, M. Yamada, K. Matsui, R. P. Fuchs y T. Nohmi. 1999. The *dinB* gene encodes a novel *E. coli* DNA polymerase, DNA pol IV, involved in mutagenesis. *Mol Cell*. Aug;4(2):281-6.

Walker, G. C. 1984. Mutagenesis and inducible response to desoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev*. 48:60-93.

Walker, G. C. 1996. The SOS response of *Escherichia coli* en *Escherichia coli* and *Salmonella* in *Cellular and Molecular Biology*, Vol.1. Edited by Neidhart, FC. Washington DC: ASM Press; 1400-1412.

Wertman, K. F., y D. Mount. 1985. Nucleotide sequence binding specificity of the LexA repressor of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* Jul; 163(1): 376-84.

Whitby, M. C., y R. G. Lloyd. 1995. Altered SOS induction associated with mutations in *recF*, *recO* and *recR*. *Mol Gen Genet.* Jan 20; 246(2): 174-9.

Winterling KW, Levine AS, Yasbin RE, Woodgate R. 1997. Characterization of DinR, the *Bacillus subtilis* SOS repressor. *J Bacteriol.* Mar; 179(5): 1698-703.

Witkin E. M., y I. E. Wermundsen. 1979. Targeted and untargeted mutagenesis by various inducers of SOS functions in *Escherichia coli*. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol.* 43: 881-886.

Yasuda, T., K. Morimatsu, R. Kato, J. Usukura, M. Takahashi, y H. Ohmori. 2001. Physical interactions between DinI and RecA nucleoprotein filament for the regulation of SOS mutagenesis. *EMBO J.* Mar 1; 20(5): 1192-202.

Yu, X., y E. H. Egelman. 1993. The LexA repressor binds within the deep helical groove of the activated RecA filament. *J Mol Biol.* May 5; 231(1): 29-40.

Zheng, M., B. Doan, T. D. Schneider, y G. Storz. 1999. OxyR and SoxRS regulation of *fur*. *J Bacteriol.* Aug; 181(15): 4639-43.

Agradecimientos

Hace 5 años me presenté, medio por casualidad, en el despacho del Dr. Jordi Barbé. No pretendía alargar más mis estudios, con la carrera acabada creía que ya sabía lo suficiente. Pero conocí a la gente del departamento, y me di cuenta de lo poco que sabía. Fue la dedicación, inteligencia y entusiasmo de los entonces doctorandos lo que me picó el gusanillo... y a partir de entonces decidí intentar aprender todo lo que ellos sabían. Ha llovido mucho desde entonces, y en estos años he descubierto a la verdadera Biología, aquella a la que los libros no hace justicia, pues es aquella a la que hay que dedicar horas, semanas y meses para conseguir unos resultados que no siempre coinciden con lo esperado, pero con los que hay que pelear para conseguir la verdad.

Primero agradecer al Dr. Jordi Barbé el haber hecho posible que esto tuviera lugar, y a la Dra. Montserrat Llagostera, pues entre ambos consiguen reclutar a gente que acaba sintiéndose parte de una gran familia. Gracias también a la Dra. Susana Campoy, Susanita, por enseñarme en los comienzos, guiarme en el camino y ayudarme al final. Que su energía y gran capacidad sigan inspirando a los futuros científicos.

También debo agradecer a los doctorandos de entonces, la "vieja hornada" que me inspiró en los comienzos. Gracias a Raul, tan serio, y a Alfonso, que a pesar de sus gustos musicales no era un mal chico (je,je). También a Mar, a la que recuerdo siempre dominando la situación y, como no, a Joan, el pilar de ambos laboratorios, ¿qué haríamos sin tener que andar de un lado para otro buscándole?. También a los veteranos, Angels y Toni, siempre dispuestos a ayudar, y a los doctores del laboratorio 2, José Antonio y Montse Bosch con sus bromas, Montse Rebollo con su estrés, Lorena con su simpatía y Mirle con sus lecciones.

Un agradecimiento muy especial a mis compañeros de generación: Elenita, con la que aún queda pendiente crear un "sindicato", Gerard con su música rara y Núria, una persona dulce y con principios. Gracias a todos vosotros los malos momentos no fueron tan malos, ¡y los buenos mucho mejores!.

Gracias también a la "nueva generación": Pilar con sus prisas, Vanessa, que cuidará estupendamente del Mac, Susana, Sus, con sus graciosos comentarios, Anna, con su ajetreada vida social (¡qué envidia!), José, casi doctor, a Ivan y sus ensaimadas, y, como no, a la nueva generación del laboratorio 1: Jordi, casi compañero de generación, muy callado pero...¡ojo cuando se suelta!, Marc y su dominio de la situación, Anna H., la alegría del laboratorio 1 y, como no, importantísima, Noelia, mi discípula durante un breve año (o al menos eso me pareció, ¡a ella igual se le hizo eterno!), inteligente y muy capaz, siempre dispuesta a ir de compras a Barna.

Evidentemente, ante todo gracias a mis padres, Carmen y Antonio, por alentarme y aconsejarme siempre lo más adecuado, a mis hermanos, Alberto y Miguel Angel, por distraerme cuando tenía un mal día, y Miguel, por su apoyo y paciencia.

También gracias a la familia de Miguel: Paco, Oscar, Inés, Javi, y a la abuela, y sobre todo a las croquetas y súper tortillas de la Pepi, que dan mucha energía para ir a matar "bichitos".

Gracias a todos, más que por hacer que esta tesis haya sido posible, por hacer que esta persona sea mucho mejor persona que cuando comenzó.
