

---

# **Análisis de la composición del regulón LexA en el dominio *Bacteria***

## **Resumen**

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

En primer lugar se procedió a determinar las cajas de unión a LexA de los microorganismos *G. sulfurreducens* y *F. nucleatum*, para lo cual se clonaron y secuenciaron sus respectivos genes *lexA*. Tras sobreexpresar y purificar las respectivas proteínas se procedió a realizar ensayos de retraso electroforético y de *footprinting*, con lo que se definieron ambos motivos de unión a LexA: GGTT N<sub>2</sub> C N<sub>4</sub> G N<sub>3</sub> ACC para *G. sulfurreducens* y TGTATC N<sub>12</sub> TACA para *F. nucleatum*.

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

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

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

# **Analyses of the composition of the LexA regulon in the *Bacteria* Domain.**

## **Summary**

Previous studies carried out in our laboratory have analyzed the content of the LexA regulon of Gamma proteobacterias (Erill *et al.*, 2003). Following the same line, the present work tries to extend the description of this regulon to other families of the *Bacteria* Domain: *Geobacter sulfurreducens*, representative of the Desulfuromonas group, pertaining to the subdivision Delta of Proteobacteria; *Fusobacterium nucleatum*, of the Phylum Fusobacteria; microorganisms pertaining to the Alpha Class of Proteobacteria and gram-positive bacterias.

In the first place it was come to determine the boxes of union to LexA of microorganisms *G. sulfurreducens* and *F. nucleatum*, for which their respective *lexA* genes were cloned and sequenced. After sobreexpressing and purifying respective proteins EMSA assays and footprinting were performed, and both recognition motifs of LexA were defined: GGTT N2 C N4 G N3 ACC for *G. sulfurreducens* and TGTATC N12 TACA for *F. nucleatum*.

Next, the described motifs were studied with *in silico* methodology, in order to know their distribution in each genome. In both cases the only gene, in addition to *lexA*, that turned out to be under the control of the LexA protein was the *dinB* gene. In *G. sulfurreducens* the *recA* gene, in addition to not having the LexA motif and not being united to this protein, forehead to the damage in the DNA presented a constituent expression. On the contrary, the *recA* gene of *F. nucleatum* is induced by injuries in the DNA although it is not regulated directly by *lexA*.

Once described these two microorganisms, the study of microorganisms pertaining to the class Alpha of the Proteobacteria group and to the gram-positive bacteria was approached. Since the LexA motifs of these microorganisms already were known, it was come to look for these motifs in his genomes. Once analyzed the *in silico* results, they were validated experimentally choosing a representative microorganism. For the case of Alpha Proteobacteria *Sinorhizobium meliloti* was chosen, and as gram-positive bacteria *Bacillus subtilis*. In both microorganisms the experimental datas have agreed totally with the *in silico* obtained ones. The set of obtained results has demonstrated the existence of a great variability in the content of the LexA regulon in the *Bacteria* Domain. This fact suggests the existence of an important horizontal genetic transference in the *Bacteria* Domain in which it makes reference to this regulon.