



**Departament de Genètica i Microbiologia**

**Análisis funcional de la región promotora de los  
genes *recA* y *uvrA* de *Paracoccus denitrificans***

**Alfonso del Rey Pérez**

**2001**

# UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Departament de Genètica i Microbiologia

## **Análisis funcional de la región promotora de los genes *recA* y *uvrA* de *Paracoccus denitrificans***

Memoria presentada por  
Alfonso del Rey Pérez  
para optar al grado de Doctor  
en Ciencias Biológicas por la  
Universitat Autònoma de  
Barcelona

Vº Bº

El Director de la tesi

Dr. Jordi Barbé

## **Cuanto puedas**

Si imposible es hacer tu vida como quieres,  
por lo menos esfuérate  
cuanto puedas en esto: no la envilezcas nunca  
en contacto excesivo con el mundo,  
con una excesiva frivolidad.

No la envilezcas  
en el tráfago inútil  
o en el necio vacío  
de la estupidez cotidiana,  
y al cabo te resulte un huésped inoportuno

Konstantinos Kavafis (1863-1933)

**A mis padres**

## **Agradecimientos**

---

## Agradecimientos

Estoy, probablemente, ante uno de los momentos más difíciles que se plantean a la hora de escribir una tesis doctoral. Tengo que redactar los agradecimientos. Pero es algo que hago con gusto, porque no se puede obviar que una tesis doctoral es el reflejo de una parte del trabajo que se ha llevado a cabo durante una serie de años en un grupo de investigación, pero este trabajo no es el fruto del esfuerzo de una única persona, sino que muchas otras han influido de una forma más o menos directa. Justo es que a la hora de plasmar lo realizado por escrito se tenga presente a todos aquellos que nos ayudaron en el camino.

En primer lugar quiero expresar mi agradecimiento a los investigadores responsables del grupo de Microbiología Molecular del Departamento de Genética y Microbiología de la Universidad Autónoma de Barcelona, el Dr. Jordi Barbé y la Dra. Montserrat Llagostera. En especial a este primero, por ser el director de la tesis y por haberme dado la confianza de trabajar en su grupo y así poder saber como es el mundo de la investigación por dentro.

Otro referente importante en mis inicios fue Toni. Él me enseñó prácticamente todas las técnicas que he utilizado durante estos años y a pensar de una forma positiva a pesar de que los experimentos salieran fatal.

Un laboratorio es un centro en el que el personal se renueva muy rápidamente. Al entrar uno entra en contacto con los "veteranos", los cuales se marchan antes de que el novato, en este caso yo, lleguemos a tenerles confianza. Pero a pesar de todo, en esos tiempos de continuas dudas siempre estaban ahí para resolverlas. Dentro de este grupo estarían Eva, Sebas, Berta, Eugeni o Sebi. Aquí también habría que mencionar a Angels, con la que coincidí más tiempo. Me resultó de gran ayuda en mis inicios al trabajar en cosas similares a las mías y además me enseñó lo que es tener una pasión desmesurada por aquello que uno hace.

En un lugar de contínuas idas y venidas se puede establecer otro grupo y es aquel que comprende a las personas que comenzaron en la misma época que uno. Es el caso de Raül, mi amigo del alma de la universidad, compañero de pupitre y después de poyata. Siempre juntos menos al final, desgraciadamente. Mohamed y su peculiar manera de entender el mundo. Julio, con quien siempre había que estar alerta para no caer víctima de su cinismo. Calín, la rana peruana que trabajó con una presión temporal fortísima sin perder nunca el buen humor. Laura, otra compañera de la universidad. Rodri, el guapo del barrio. David y su risa profunda y José Antonio que tiene la fama aunque sean otros los que cardan la lana.

Con el paso del tiempo se produce un fenómeno curioso, pasas de hacer preguntas a responderlas, es el momento en el que mientras tú todavía crees que te falta mucho por aprender, eres requerido por personas, que aunque parezca mentira, te consideran un "veterano". Pasó así en el caso de Montse Rebollo, es un placer hablar con alguien de castells y que encima te entienda. Maribel, hasta conocerla no había visto a nadie limpiar una lata de Coca-Cola antes de bebérsela. Mirle, con la cual he aprendido mucho sobre Cuba. Lorena, bueno, tú no me preguntabas mucho, lo siento. Montse Bosch una gran Celestina y Susana, que te puedo decir. Muchas gracias ¿ Lo sabes no?

---

Pero la entrada de gente nueva no se detiene nunca, ellos aportan su ilusión y son el futuro del laboratorio. Gerard, un tipo con el que he aprendido muchas cosas y espero seguir haciéndolo. Mónica que cuando me vaya echará de menos mis quejas musicales. Núria y su visión naíf del mundo que espero que no pierda nunca. Elena con su risa tan contagiosa. Ricardo, chico, lo reconozco, a veces no entiendo nada de lo que me dices. José, es curioso, pero cuando te veo por la sala de electroforesis algo me huele mal. Por último, dos “fichajes” del verano, que esperemos que se queden mucho tiempo, Jordi y Marc.

También creo justo recordar a dos personas como Sergio, el “holandés”, que estuvo poco tiempo, pero me enseñó el significado de tomarse la vida con filosofía. Muchas de sus anécdotas aún son recordadas por los más viejos del lugar. Así como a Montse Sabaté, “okupa” ocasional de nuestro laboratorio y la persona más alocada que conozco.

Unos integrantes muy importantes del laboratorio son sus laborantes, aquellos que nos permiten hacer nuestro trabajo con mayor libertad y que muchas veces tienen que soportar que descarguemos con ellos nuestras frustraciones o perseguirnos como a niños pequeños para que no nos escaqueemos en nuestras obligaciones. Mi agradecimiento para Virginia, especialista en aterrorizar a los novatos, espero que se recupere rápidamente de sus problemas de salud. Para Mar, la que más me ha tenido que perseguir. Para la última en llegar, Susana Escribano y finalmente para Joan, un “chollo” de profesional para los que tenemos que trabajar con él.

Gracias también a Olga y Vicky que me suministraron regularmente esos cultivos tan llamativos de *Chromatium vinosum*. A Xavi, Toni Solé y Marc Llorós por hacer que la tarea de preparar y dar clases prácticas fuera más agradable. A Sergi, compañero de carrera y doctorado, por su ayuda técnica y por las charlas en las cuales nos desahogamos. A Salva, por hacer las fotos de los geles.

También tengo que recordar a Bet, que me acompañó en mis primeros años. Así como a Cynthia, por lo que significa para mí.

No puedo olvidarme de PIUNE y de todos los profesionales, alumnos, voluntarios y objetores que conocí mientras hice la prestación social y el voluntariado. Consiguieron que una obligación se convirtiera en un placer. Que descubriese, demasiado tarde, que la universidad es algo más y que cambiara mi visión del mundo. También quiero agradecer a la Colla Castellera Capgrossos de Mataró las alegrías que me han dado desde que soy miembro de ella. La lucha por conseguir objetivos comunes y la emoción de obtenerlos ha sido un bálsamo a las tensiones que a menudo se acumulan en el trabajo diario.

Finalmente quiero expresar mi agradecimiento a mis padres por todos los sacrificios y esfuerzos que han tenido que hacer para que ésta tesis se convirtiera en realidad. Creo que no soy consciente de lo afortunado que soy.

---

## **Resumen**



---

## Análisis funcional de los genes *recA* y *uvrA* de *Paracoccus denitrificans*

Hace mucho tiempo que se conoce la existencia en *Escherichia coli* de un sistema multigénico que responde a las lesiones en el DNA. Este sistema, conocido como sistema SOS no es exclusivo de esta especie bacteriana. Se han descrito sistemas similares no solamente en muchas otras especies de bacterias gramnegativas sino que también en especies grampositivas, siendo *Bacillus subtilis* el referente en estas últimas.

El objetivo de esta tesis ha sido ahondar en el conocimiento de la regulación del sistema SOS dentro del grupo de las Proteobacterias. Para conseguir nuestro objetivo hemos estudiado la regulación de los genes *recA* y *uvrA* de *Paracoccus denitrificans* y *Rhodobacter capsulatus*.

En primera instancia procedimos a aislar, secuenciar y caracterizar el gen *recA* de *P. denitrificans*, gracias a una sonda derivada del gen *recA* de *Rhodobacter sphaeroides*. Posteriormente obtuvimos una cepa *RecA<sup>-</sup>* de *P. denitrificans*. También aislamos y secuenciamos la región operadora y el extremo 5' de la región codificante del gen *uvrA* de *P. denitrificans*, mediante hibridación con un fragmento interior del gen *uvrA* de *R. sphaeroides*. Para asegurarnos de que el gen *uvrA* de *P. denitrificans* formaba parte del sistema SOS de dicho microorganismo comprobamos su capacidad de inducción frente a lesiones en el DNA.

El estudio de las regiones operadoras de los genes *recA* y *uvrA*, tanto *in vitro* mediante análisis de movilidad electroforética, como *in vivo* mediante el análisis de la inducción de fusiones con el gen *lacZ* de *E. coli*, nos ha permitido identificar el motivo GTTCN<sub>7</sub>GTTC como la caja SOS de *P. denitrificans*. La presencia de este motivo es necesaria para la unión de un represor, análogo al LexA de *E. coli*.

Así mismo, y dado que el gen *recA* de *R. capsulatus* ya había sido secuenciado en nuestro laboratorio con anterioridad, nos centramos en el aislamiento y secuenciación del gen *uvrA* de esta especie bacteriana mediante una sonda obtenida a partir del gen *uvrA* de *R. sphaeroides*. Una vez dispusimos de la secuencia operadora y del extremo 5'

de la región codificante de este comprobamos su inducibilidad frente a lesiones en el DNA.

El estudio *in vivo* de la región operadora de estos dos genes pertenecientes al sistema SOS de *R. capsulatus* se llevó a cabo mediante fusiones con el gen *lacZ* de *E. coli*. En este caso también se comprobó que la caja SOS de *R. capsulatus* responde al motivo GTTCN<sub>7</sub>GTTC.

Los resultados obtenidos en este trabajo así como los estudios previos realizados en nuestro laboratorio sobre el sistema SOS de *R. sphaeroides* y de la familia *Rhizobiaceae* nos permiten afirmar que el motivo **GTTCYYYTTTTGTTC** es la secuencia consenso para la caja SOS del grupo de las Proteobacterias. Este es el primer caso en el que se describe una caja SOS cuya secuencia no es palindrómica.

Los siguientes artículos describen y discuten los resultados en los cuales está basado este trabajo. En el texto se identifican con números romanos.

- I. **Fernández de Henestrosa, A. R., del Rey, A., Tarragó, R. y Barbé, J.** 1997. Cloning and characterization of the *recA* gene of *Paracoccus denitrificans* and construction of a *recA*-deficient mutant. FEMS Microbiol. Lett. **147**: 209-213.
- II. **del Rey, A., Diestra, J., Fernández de Henestrosa, A. R. y Barbé, J.** 1999. Determination of the *Paracoccus denitrificans* SOS box. Microbiology **145**: 577-584.
- III. **Labazi, M., del Rey, A., Fernández de Henestrosa, A. R. y Barbé, J.** 1999. Consensus sequence for the *Rhodospirillaceae* SOS operators. FEMS Microbiol. Lett. **171**: 37-42.

## **Índice**

---

# Índice

1. Introducción .....	1
1.1. El sistema SOS de <i>Escherichia coli</i> .....	2
1.1.1. Modelo de replicación del sistema SOS .....	2
1.1.1.1. Inducción del sistema .....	2
1.1.1.2. Los genes SOS .....	4
1.1.1.3. La caja SOS .....	6
1.1.2. Funciones del sistema SOS .....	8
1.1.2.1. Reparación.....	8
1.1.2.1.1. Reparación por escisión de nucleótido.....	9
1.1.2.1.2. Reparación por recombinación.....	12
1.1.2.2. La mutagénesis SOS.....	14
1.1.2.3. Otras funciones.....	16
1.1.3. La proteína RecA.....	16
1.1.3.1. Características y función del gen <i>recA</i> .....	16
1.1.3.2. Mecanismo de acción de la proteína RecA.....	17
1.1.3.3. Estructura bioquímica de la proteína RecA.....	18
1.1.4. La proteína LexA.....	19
1.1.4.1. Estructura de la proteína LexA.....	19
1.1.4.2. Dimerización.....	20
1.1.4.3. Autohidrólisis.....	21
1.2. El sistema SOS en otras especies bacterianas.....	23
1.2.1. El sistema SOS en otras bacterias gramnegativas.....	23
1.2.1.1. El gen <i>recA</i> en el mundo bacteriano.....	26
1.2.1.2. El gen <i>lexA</i> y su distribución en el mundo bacteriano.....	28
1.2.1.3. Los genes <i>uvr</i> en diferentes especies bacterianas.....	29
1.2.1.4. La caja SOS en las bacterias gramnegativas.....	30
1.2.2. El sistema SOS en bacterias grampositivas.....	30
1.2.2.1. El sistema SOS en <i>Bacillus subtilis</i> .....	30
1.2.3. El sistema SOS en eucariotas y arqueobacterias.....	34

---

---

2. Resultados y discusión.....	35
2.1. Identificación de la caja SOS de <i>Paracoccus denitrificans</i> (Artículos I y II)	36
2.1.1. Clonación y secuenciación del gen <i>recA</i> de <i>P. denitrificans</i> .....	36
2.1.2. Construcción de un mutante <i>recA</i> .....	38
2.1.3. Expresión del gen <i>recA</i> de <i>P. denitrificans</i> .....	38
2.1.4. Caracterización del punto de inicio de transcripción del gen <i>recA</i> de <i>P. denitrificans</i> .....	39
2.1.5. Clonación del gen <i>uvrA</i> de <i>P. denitrificans</i> .....	40
2.1.6. Movilidad electroforética de los promotores <i>recA</i> y <i>uvrA</i> de <i>P. denitrificans</i> .....	41
2.1.7. Efecto de mutaciones en su zona operadora sobre la expresión de los genes <i>recA</i> y <i>uvrA</i> de <i>P. denitrificans</i> .....	42
2.2. Identificación de la región SOS de <i>Rhodobacter capsulatus</i> (Artículo III).....	43
2.2.1. Análisis mutacional del promotor del gen <i>recA</i> de <i>R. capsulatus</i> .....	43
2.2.2. Caracterización de la expresión del gen <i>uvrA</i> de <i>R. capsulatus</i> .....	44
2.2.3. Definición de la caja SOS del grupo de las Proteobacterias.....	45
3. Conclusiones.....	

---

# **1. Introducción**

---

# 1. Introducción

Todos los organismos contemplan dentro de sus funciones básicas el mantenimiento de la información genética contenida en sus moléculas de DNA. A pesar de que ciertas mutaciones pueden comportar a la larga un incremento de la adaptación al medio de un individuo y por extensión de la especie, lo más habitual es que estas mutaciones afecten de forma negativa a la viabilidad del organismo.

Las lesiones en el DNA pueden ser debidas a diferentes factores:

- Procesos propios del DNA: replicación, etc.
- Productos del metabolismo celular: moléculas oxidativas, etc.
- Agentes químicos.
- Agentes físicos.

Los organismos han tenido que desarrollar mecanismos de defensa frente a estas agresiones, para poder mantener su viabilidad. Si nos centramos en los procariotas y más concretamente en *E.coli*, el microorganismo más estudiado, comprobamos que se han encontrado tres sistemas multigénicos que se activan en respuesta a diferentes agentes mutagénicos y a lesiones.

- 1- La respuesta adaptativa a los agentes alquilantes, cuyo regulador positivo es la proteína Ada. Este regulón está formado por 4 genes: *ada*, *alkA*, *alkB* y *aidB*.
- 2- La respuesta adaptativa al estrés oxidativo, capaz de reparar lesiones inducidas por los radicales químicos que se generan como consecuencia del metabolismo aeróbico. Los regulones *oxyR* y *soxR*, con mas de 20 genes, son los responsables principales de minimizar este efecto, si bien los regulones *katF* y *soxQ* también están implicados (Demple, 1991).
- 3- La respuesta SOS o sistema de reparación de emergencia.

A continuación comentaremos con un cierto detalle este último sistema ya que es sobre el que versa la presente tesis.

## **1.1. El sistema SOS de *Escherichia coli***

El sistema SOS es un regulón integrado por más de 30 genes que responde a lesiones en el DNA o a una parada en el proceso de replicación (Tabla 1.1). Estos genes se llaman *din* (damage inducible). Con la activación de estos genes se consigue reparar las lesiones y garantizar la supervivencia de la célula.

### **1.1.1. Modelo de regulación del sistema SOS**

#### **1.1.1.1. Inducción del sistema**

Cuando el DNA de las células de *E. coli* no presenta lesiones, los genes que forman parte del regulon SOS, incluido el propio gen *lexA*, se encuentran reprimidos por la proteína LexA. La represión de la transcripción de estos genes no es total, ya que existe una cierta expresión basal. Esto permite, por ejemplo, que haya suficiente concentración de proteína LexA que pueda reprimir el sistema SOS, así como de proteína RecA, cuya síntesis también forma parte del sistema SOS, para llevar a cabo sus funciones relacionadas con la recombinación.

Cuando se produce una lesión en el DNA o una parada en la replicación, la proteína RecA pasa a la forma activa RecA\* que tiene actividad coproteasa y favorece la autohidrólisis de la proteína LexA entre los residuos Ala-84 y Gly-85, esta hidrólisis inactiva la proteína LexA (Little, 1991). Al estar inactivo el represor se produce un incremento de la transcripción de los genes del sistema SOS al no estar tan fuertemente reprimidos. Una vez se han reparado las lesiones disminuye la cantidad de RecA\*, se incrementa la de LexA activa y el sistema vuelve a estar reprimido.



**Tabla 1.1.** Genes pertenecientes al sistema SOS de *E. coli*

<b>Gen<sup>a</sup></b>	<b>Función</b>
<u>Genes cromosómicos</u>	
<i>dinA</i> ( <i>polB</i> )	DNA polimerasa II.
<i>dinB</i> ( <i>dinP</i> )	Hipotética función en mutagénesis SOS debido a su similitud con UmuC.
<i>dinD</i> ( <i>pcsA</i> )	Función desconocida. Mutantes sensibles al frío.
<i>dinF</i>	Función desconocida. Situado a continuación de <i>lexA</i> .
<i>dinG</i>	Función desconocida. Similitud con algunas helicasas reparativas. Supresor en alto número de copias de mutaciones <i>pcsA</i> .
<i>dinI</i>	Función desconocida. Supresor en alto número de copias de mutaciones <i>pcsA</i> , Hipotética función en la desestabilización de los filamentos de RecA, y por tanto, en la parada de la señal inductora del sistema SOS. Inhibición de la rotura de UmuD.
<i>dinJ</i> ( <i>sosA</i> )	Función desconocida <sup>1</sup> .
<i>dinK</i> ( <i>sosB</i> )	Función desconocida <sup>1</sup> .
<i>dinL</i> ( <i>sosC</i> )	Función desconocida <sup>1</sup> .
<i>dinM</i> ( <i>sosD</i> )	Función desconocida <sup>1</sup> .
<i>dinN</i> ( <i>sosE</i> )	Función desconocida <sup>1</sup> .
<i>dinO</i> ( <i>sosF</i> )	Función desconocida <sup>1</sup> .
<i>lexA</i>	Represor del sistema.
<i>recA</i>	Recombinación, mutagénesis SOS e inducción del sistema.
<i>uvrA</i>	Unión a DNA, reconocimiento de lesiones en la reparación por escisión de nucleótido.
<i>uvrB</i>	DNA helicasa, unión al daño e incisión dual en la reparación por escisión de nucleótido.
<i>uvrD</i>	DNA helicasa II. Reparación por escisión de nucleótido y reparación de errores de apareamiento incorrecto.
<i>sulA</i>	Inhibición de la división celular.
<i>umuDC</i>	Mutagénesis SOS.
<i>ruvAB</i>	Resolvasa. Recombinación y reparación por recombinación.
<i>recN</i>	Recombinación y reparación por recombinación.
<i>sbmC</i>	Resistencia a la microcina B17.
<i>sb</i>	Unión a DNA de cadena sencilla. Múltiples funciones.
<u>Genes extracromosómicos</u>	
<i>colA</i>	Producción de colicinas.
<i>colE</i>	Producción de colicinas.
<i>mucAB</i>	Homólogo a UmuDC. Mutagénesis SOS.
<i>impAB</i>	Homólogo a UmuDC. Mutagénesis SOS.
represores fágicos	Inducción de profagos <sup>2</sup> .
<i>tum</i>	Inducción de 186

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

1. Genes hipotéticamente regulados por LexA, definidos por búsqueda de operadores SOS en los bancos de datos.

2. No regulados por LexA pero con un mecanismo análogo de hidrólisis.

Referencias: Lewis *et al.*, (1994); Friedberg *et al.*, (1995); Koch y Woodgate, (1998).

La inducción del sistema viene dada por la presencia de DNA de cadena sencilla (ssDNA) originado como consecuencia de lesiones presentes en el DNA o de la parada de la replicación subsiguiente. La proteína RecA forma un complejo ternario con ssDNA y un nucleótido trifosfato (Roberts *et al.*, 1982) lo que provoca que pase a la forma activa ( RecA\* ).

Además de *recA* y *lexA* existen otros genes cuyo producto es necesario para la inducción del sistema. Sería el caso de:

- *recFOR*, que intervienen en la recombinación. En concreto, la proteína RecF optimiza el paso a RecA\* (Thoms y Wackernagel, 1987; Whitby y Lloyd, 1995; Hedge *et al.*, 1995).
- *ssb*, cuyo producto parece ser necesario para la formación del complejo ternario antes mencionado (Cohen *et al.*, 1983).
- *recBCD*, que codifican el holoenzima exonucleasa V cuya función helicasa participa en la génesis de las regiones de ssDNA (Chaudhury y Smith, 1985).
- *isfA*, cuyo producto colaboraría con la proteína RecA en alguna de sus funciones coproteásicas como la hidrólisis de UmuD (Bebenek y Pietrzykowska, 1995; Koch y Woodgate, 1998)

### **1.1.1.2. Los genes SOS**

Como ya se ha comentado, los genes SOS constituyen un regulón de más de 30 genes cromosómicos, pudiendo también estar presentes en plásmidos y fagos. Todos ellos presentan en su promotor la caja SOS(Tabla 1.2).

Se han caracterizado muchos de los genes SOS y se conoce la función de las proteínas que codifican. De todas formas aún quedan funciones a las cuales no se les ha atribuido ningún gen.

**Tabla 1.2.** Análisis comparativo de los operadores SOS de *E. coli*

<b>Gen</b>	<b>Secuencia</b>
<u>Genes cromosómicos</u>	
<i>dinA (polB)</i>	G A C T G T A T A A A A C C A C A G C C
<i>dinH</i>	T C C T G T T A A T C C A T A C A G C A
<i>dinG</i>	T A T T G G C T G T T T A T A C A G T A
<i>recN1</i>	T A C T G T A T A T A A A A C C A G T T
<i>recN2</i>	T A C T G T A C A C A A T A A C A G T A
<i>recA</i>	T A C T G T A T G A G C A T A C A G T A
<i>uvrA-sbs</i>	T A C T G T A T A T T C A T T C A G G T
<i>uvrB</i>	A A C T G T T T T T T T A T C C A G T A
<i>uvrD</i>	A T C T G T A T A T A T A C C C A G C T
<i>lexA1</i>	T G C T G T A T A T A C T C A C A G C A
<i>lexA2</i>	A A C T G T A T A T A C A C C C A G G G
<i>sulA</i>	T A C T G T A C A T C C A T A C A G T A
<i>ruvAB</i>	C G C T G G A T A T C T A T C C A G C A
<i>dinI (pyrC)</i>	A C C T G T A T A A A T A A C C A G T A
<i>sosC</i>	T A C T G A T G A T A T A T A C A G G T
<i>sosD</i>	C A C T G G A T A G A T A A C C A G C A
<i>umuDC</i>	T A C T G T A T A T A A A A A C A G T A
<u>Genes extracromosómicos</u>	
<i>tum (186)</i>	T A C T G T A T G T T T A T A C A G T A
<i>clo DF13</i>	T A C T G T G T A T A T A T A C A G T A
<i>impAB</i>	T A C T G T A T A T A C A T A C A G C A
<i>mucAB</i>	T A C T G T A T A A A T A A A C A G T T
<i>cre (P1)</i>	A C C T G T A A A T C C A T A C A G T T
<i>oop (λ)</i>	T C C T G T T G A T A G A T C C A G T A
<u>Operadores solapados</u>	
retrón 67-1	T A C T G T A A A T A T A A A C A G T G
retrón 67-2	C A G T G G T T A T G T G T A C A G T A
<i>colN-1</i>	A A C T G T A T A T A A A A C C A G T G
<i>colN-2</i>	C A G T G G T T A T G T G T A C A G T A
<i>colE1-1</i>	T G C T G T A T A T A A A A C C A G T G
<i>colE1-2</i>	C A G T G G T T A T A T G T A C A G T A
<i>colE2-1</i>	A T C T G T A C A T A A A A C C A G T G
<i>colE2-2</i>	C A G T G G T T T T A T G T A C A G T A
<i>colE3-1</i>	A T C T G T A C T A A A A C C C A G T G
<i>colE3-2</i>	C A G T G G T T T T A T G T A C A G T A
<i>colB-1</i>	A T C T G T A C A T A A A A C C A G T G
<i>colB-2</i>	C A G T G G T T A T A T G T A C A G T A
pMB1Col-1	G G C T G T A C G T A A A A C C A G T G
pMB1Col-2	C A G T G A T T T T A T G T A C A G T A
<i>colA-1</i>	T A C T G T A T A T A A A C A C A T G T
<i>colA-2</i>	A C A T G T G A A T A T A T A C A G T T
<b>Secuencia consenso</b>	<b>T A C T G T A T A T A T A T A C A G T A</b>

Modificado de Lewis *et al.*, (1994).

También hay que comentar la existencia de genes que se inducen debido a lesiones en el DNA, pero que no están regulados directamente por LexA. Entre estos se encuentra, por ejemplo, el gen *phr*, que participa en la reparación del DNA o los genes *dnaA*, *dnaB*, *dnaN* y *recQ*, relacionados con el metabolismo del DNA.

### 1.1.1.3. La caja SOS

Los genes SOS que están regulados negativamente por la proteína LexA presentan en su región promotora lo que se denomina la caja SOS, una región que reconoce la proteína LexA y a la cual se une. La secuencia consenso de la caja SOS es el palíndromo CTG-(TA)<sub>5</sub>-CAG. Las bases CTG y CAG parecen ser más importantes para la unión de LexA, mientras que las bases centrales (TA)<sub>5</sub> tienen un papel moderado.

Como podemos ver en la Tabla 1.2, los genes SOS tienen una caja SOS que diverge en menor o en mayor medida de la consenso. Cuanto más se parezca la caja SOS a la consenso más afinidad tendrá la proteína LexA por ella y por lo tanto más reprimida estará la expresión del gen en cuestión. Esto permite que no todas las funciones propias del sistema SOS se activen al mismo tiempo sino de forma gradual, dependiendo del alcance de la lesión (Tabla 1.3). Así, las que tienen menos afinidad son las de *lexA*, *recA* y los genes *uvr* implicados en la reparación por escisión. Estos genes se inducen rápidamente. Si las lesiones son más importantes entonces se inducen los genes *umu* que intervienen en la mutagénesis SOS así como el gen *sulA* que inhibe la división celular.

El grado de represión de los genes también viene determinado por el número ( hay genes que tienen más de una caja SOS ) y la localización de las cajas SOS (Lloubes *et al.*, 1991, Schnarr *et al.*, 1991). También se ha descrito que las condiciones fisiológicas de la célula afectan, ya que hay una activación diferente en función de la fase del ciclo celular (Dri y Moreau, 1994; Relan *et al.*, 1997).

**Tabla 1.3.** Expresión *in vivo* de algunos genes SOS de *E. coli*, y valores de afinidad de la proteína LexA por sus operadores

Gen	Regulación <i>in vivo</i>			Regulación <i>in vitro</i>	
	Nivel basal <sup>a</sup>	Nivel inducido <sup>b</sup>	Factor de inducción <sup>b</sup>	Afinidad relativa <sup>d</sup>	Índice de heterología <sup>e</sup>
<i>lexA</i>	1300	7500	5,8	15	6,4 y 8,3
<i>recA</i>	1000-10000	100000	12	3,8	4,3
<i>recN</i>	N. D.	N. D.	10	N. D.	4,2 y 9,4
<i>uvrA</i>	20	250	4,8	14,6	7
<i>uvrB</i>	250	1000	3,7	8,8	6,1
<i>uvrD</i>	6500	45000	5,9	17,9	8,8
<i>polB</i>	40	300	7,3	N. D.	12,1
<i>ruvA</i>	700	5600	2-3	N. D.	9,2
<i>ruvB</i>	200	1600	Forma un operón con <i>ruvA</i>		
<i>dinI</i>	500	2300	N. D.	N. D.	6,23
<i>sulA</i>	N. D.	N. D.	125	1	4,7
<i>umuD</i>	180	2400	22,5	1,1	2,8
<i>umuC</i>	5	200	Forma un operón con <i>umuD</i>		

a y b. Número de copias por célula.

c. Factor de inducción promedio de una fusión con el gen *lacZ*.

d. Afinidad relativa: cantidad de proteína LexA necesaria en la determinación de la  $K_{app}$  mediante retraso electroforético y comparando con el operador de *sulA*. Los valores elevados corresponden a operadores débiles.

e. Índice de heterología: medida de la desviación de una caja con respecto a la secuencia consenso. Los valores elevados corresponden a operadores débiles.

En el caso de operadores múltiples se indica el valor para cada uno de ellos.

N. D. No determinado.

Modificado de Lewis *et al.*, (1994) y Kuzminov, (1999).

## **1.1.2. Funciones del sistema SOS**

Como se aprecia en la Tabla 1.1, los genes SOS codifican una serie de funciones orientadas a la supervivencia de las células frente a las agresiones ambientales. Las funciones básicas son: procesos reparativos (ya sea por escisión de nucleótido o por recombinación), la mutagénesis SOS o reparación tendente al error, la inhibición de la división celular y la inducción de profagos.

### **1.1.2.1. Reparación**

En el DNA nos podemos encontrar diferentes tipos de lesiones. Los mecanismos que reparan estas lesiones se clasifican en función de la forma en que las eliminan. Fundamentalmente existen tres mecanismos:

- 1- Reparación directa, en la que se produce una reversión de la lesión. Es el caso, por ejemplo, de la fotorreactivación.
- 2- Reparación por escisión. En este caso tenemos dos modalidades: de base o de nucleótido. En la primera se cercena la base lesionada y se coloca la correcta. En la segunda se elimina una parte de la cadena lesionada y se vuelve a sintetizar utilizando la otra cadena como molde.
- 3- Reparación por recombinación, que tiene lugar en el caso que no tengamos una cadena molde intacta.

La reparación por escisión de nucleótido y por recombinación forman parte de la vía SOS.

### 1.1.2.1.1. Reparación por escisión de nucleótido

Se trata de una vía reparativa con una elevada fidelidad, ya que utiliza la cadena complementaria intacta como molde. Repara una elevada variedad de lesiones, que tienen en común la deformación de la cadena de DNA. Así, en el caso de la radiación UV, el 85% de las lesiones producidas son dímeros de timina, que provocan deformidades, las cuales son reconocidas y reparadas mediante la escisión de nucleótido. Las otras lesiones producidas por la radiación UV también son reparadas.

En este mecanismo reparativo intervienen 6 proteínas, que son las siguientes: UvrABC, UvrD, DNA polimerasa I y DNA ligasa.

UvrA, UvrB y UvrC forman un complejo con actividad escinucleasa (Tabla 1.4). Mutaciones en alguno de los 3 genes que codifican estas proteínas no son letales pero disminuyen la viabilidad en casos de tratamiento con productos mutagénicos.

El gen *uvrA* (2082 pb) es monocistrónico y es adyacente, aunque orientado en sentido contrario, al gen *ssb* (Sancar y Rupp, 1979; Sancar *et al.*, 1981). Ambos genes están reprimidos por LexA, debido a la presencia de una caja SOS en la región intergénica. *uvrA* codifica una proteína de 107 kDa, dimérica en solución (Sancar *et al.*, 1981; Oh y Grossman, 1989). La proteína UvrA se une al DNA de cadena doble, preferentemente al lesionado, y a UvrB. Además tiene actividad ATPasa, generando la energía necesaria para el proceso de reparación (Seeberg y Steinum, 1982, Kacinski y Rupp, 1982; Grossman y Thiagalingam, 1993).

El gen *uvrB* (2019 pb) también es monocistrónico y está regulado por LexA. La proteína UvrB, con un tamaño de 82 kDa, tiene función ATPasa y helicasa. Conjuntamente con UvrA forma el complejo UvrA<sub>2</sub>UvrB-DNA, que es el denominado complejo de preincisión (Lin *et al.*, 1992).

**Tabla 1.4.** Características de las subunidades UvrABC.

<b>Proteína</b>	<b>Peso molecular<sup>a</sup></b>	<b>Motivos funcionales</b>	<b>Actividad</b>	<b>Papel en la reparación por escisión de nucleótido</b>
UvrA	107	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Unión a ATP. Motivos de Walker tipo A</li> <li>- Dedos de Zn</li> <li>- Hélice-giro-hélice</li> <li>- Región polibisagra rica en Gly</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Actividad ATPasa</li> <li>- Unión inespecífica a DNA de cadena doble</li> <li>- Unión específica a DNA dañado</li> <li>- Interacción con UvrB</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Unión a DNA</li> <li>- Reconocimiento de la lesión</li> <li>- “transporte” de UvrB a la lesión</li> </ul>
UvrB	82	<ul style="list-style-type: none"> <li>- motivos helicasa</li> <li>- Homología con TRCF</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ATPasa y helicasa latente dependiente de la interacción con UvrA</li> <li>- Unión a DNA de cadena sencilla</li> <li>- Unión a UvrA</li> <li>- Unión a UvrC</li> <li>- Endonucleasa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Reconocimiento de la lesión</li> <li>- Formación del complejo de pre-incisión</li> <li>- Incisión en 3'</li> </ul>
UvrC	69	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cierta homología con UvrB</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Endonucleasa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inducción de la incisión en 3'</li> <li>- Incisión en 5'</li> </ul>

a. En kDa.

Modificado de Grossman y Thiagalingan, (1993) y Sancar, (1996).



El gen *uvrC* (1840 pb) codifica una proteína de 69 kDa con actividad endonucleasa. Es la responsable de la incisión en el extremo 5' e induce la incisión en el extremo 3' llevada a cabo por UvrB (Sancar *et al.*, 1984; Lin y Sancar, 1990). El gen *uvrC* no está regulado por LexA (Granger-Schnarr *et al.*, 1986).

El gen *uvrD* (2100 pb), que sí está regulado por LexA, da lugar a la proteína UvrD que tiene función helicasa e interviene en la síntesis de DNA una vez se ha eliminado la cadena lesionada (Arthur *et al.*, 1982; Oeda *et al.*, 1981; Maples y Kushner, 1982).

El mecanismo por el cual se lleva a cabo la reparación por escisión de nucleótido se puede dividir en 3 fases: reconocimiento de la lesión, escisión de la cadena lesionada y síntesis de la nueva cadena.

La proteína UvrA, formando un dímero, recorre la doble cadena de DNA y cuando encuentra una lesión que altera la estructura del DNA se modifica conformacionalmente, provoca la torsión del DNA y permite la llegada de UvrB que tiene función helicasa y abre la doble cadena de DNA. En este momento es cuando se forma el complejo de preincisión (UvrA<sub>2</sub>B-DNA). La proteína UvrA se libera una vez ha reconocido la zona de la lesión y ha permitido la interacción de UvrB con el DNA.

Para que se produzca la incisión se tiene que formar un complejo UvrC-UvrB-DNA. La proteína UvrB, inducida por UvrC provoca una incisión en el cuarto enlace fosfodiéster a partir de la lesión en dirección 3' y después la propia proteína UvrC realiza una incisión en el octavo enlace fosfodiéster a partir de la lesión en dirección 5'. Se libera un fragmento de 13 nucleótidos. Una vez se ha hecho la incisión, UvrC se separa y se une la proteína UvrD (helicasa II).

En este momento se produce la síntesis de la nueva cadena. En esta función intervienen por un lado UvrD y por el otro la DNA polimerasa I. La unión de la DNA polimerasa I desplaza a la proteína UvrB del DNA.

Una vez se ha sintetizado el nuevo fragmento, éste se liga al resto de la cadena por la acción de la DNA ligasa.

### 1.1.2.1.2. Reparación por recombinación

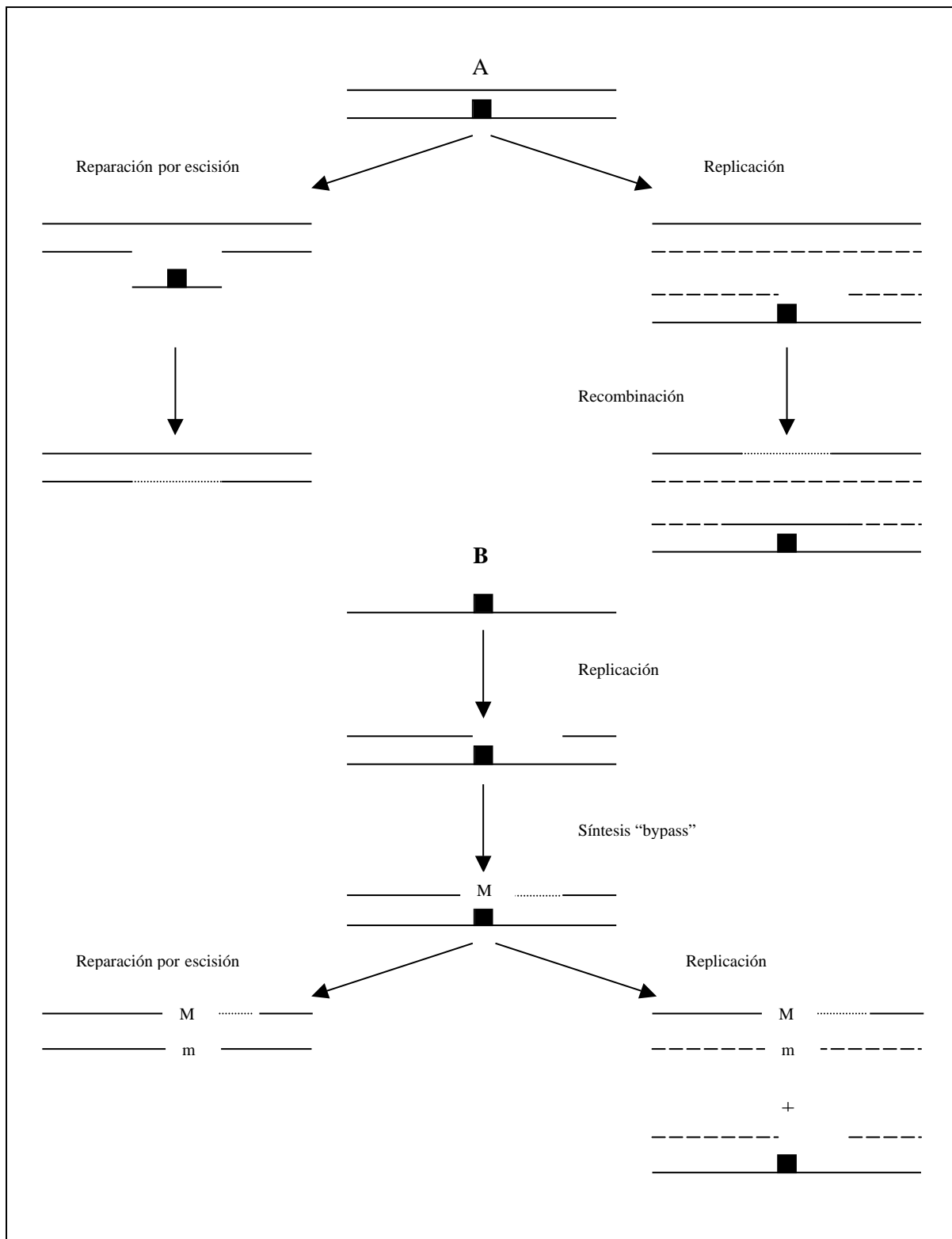
En ocasiones, cuando la DNA polimerasa se encuentra con lesiones que modifican la estructura del DNA salta y provoca un hueco de unas 1000 bases en la cadena que se está replicando. De esta manera, nos encontramos que en una de las cadenas hay una lesión mientras que en la otra hay una discontinuidad. Este hecho comporta la ausencia de una cadena molde que permita la actuación de otros mecanismos de reparación. La recombinación, lo que permite es que en la doble cadena hija tengamos una cadena molde con la secuencia correcta, de forma que entonces pueden actuar otras vías de reparación (Fig. 1.1).

En los procesos de recombinación están implicadas varias vías, unas más importantes que otras. Aquí destacaremos algunas. De los genes que participan en estas vías hay algunos que están regulados negativamente por LexA. Además, algunas de las proteínas de estas vías favorecen la inducción del sistema SOS.

La vía que tiene un papel más relevante es la RecBCD que depende del holoenzima con el mismo nombre, que tiene actividad exonucleasa y helicasa. Interviene en procesos de recombinación cromosómica y está implicada en la reparación de roturas de doble cadena (Michel *et al.*, 1997). RecBCD le proporciona a la proteína RecA su sustrato de acción, es decir, ssDNA que le permite crear la sinapsis de recombinación (Taylor y Smith, 1985; Kowalczykowski *et al.*, 1994; Anderson y Kowalczykowski, 1998). Ninguno de los genes que codifican RecBCD está regulado por LexA.

Otra vía implicada es la de RecF. Esta vía interviene en la recombinación plasmídica y replicativa. Su papel en la recombinación cromosómica es pequeño. RecF está implicado en la reparación de los huecos generados en las cadenas hijas. En esta vía participan los productos de los genes *recF*, *recJ*, *recO*, *recN*, *recQ* (Kowalczykowski *et al.*, 1994; Kuzminov, 1999). El gen *recN* está regulado por LexA (Schnarr *et al.*, 1991).

Las otras vías parecen ser poco relevantes, ya que, o bien actúan en casos muy especiales (por ejemplo *recE*), o bien en la resolución de estructuras concretas.



**Figura 1.1. A.** Mecanismo de reparación por escisión y mecanismo de reparación por recombinación postreplicativa del daño en el DNA. **B.** Modelo general de síntesis "bypass" de la mutagénesis por radiación UV.

Lesión (cuadrado negro); cadena paterna (línea continua); cadena hija (línea discontinua); muesca rellenada por polimerización (línea de puntos); nucleótido erróneo (M); mutación (m).

Referencias: Modificado de Livneh *et al.*, 1993.

### 1.1.2.2. La mutagénesis SOS

La mutagénesis SOS también se denomina síntesis de translesión o reparación tendente a error. Es una función del sistema SOS que solo se pone en marcha cuando el grado de lesiones del DNA es muy elevado.

Cuando el número de lesiones es alto, no se pueden reparar y eso comporta un bloqueo de la replicación. La mutagénesis SOS promueve un sistema alternativo de replicación, en el cual se incorporarán nucleótidos erróneos en los huecos opuestos a las lesiones. Las lesiones, por lo tanto, se mantienen, pero se evita el bloqueo de la replicación, que sería deletéreo. Más adelante, los mecanismos de reparación o replicación podrán eliminar las lesiones.

En la mutagénesis SOS están implicadas las siguientes proteínas: RecA, UmuD, UmuC y la DNA polimerasa III.

La DNA polimerasa III es la que actúa normalmente en la replicación del cromosoma de *E. coli*. Es la única polimerasa esencial para la mutagénesis SOS (Haganese *et al.*, 1987). La síntesis de algunas de sus unidades se induce con las lesiones en el DNA, pero no está regulado por LexA.

El operón discistrónico *umuDC* está regulado por LexA (Kitagawa *et al.*, 1985). Cada uno de los genes codifica una proteína de 15 kDa y 47'6 kDa respectivamente. Su expresión se activa con la radiación UV y con algunos agentes químicos (Perry *et al.*, 1985). Es el único operón que se debe inducir para que se lleve a cabo la mutagénesis SOS (Sommer *et al.*, 1993).

La proteína UmuD ( dimérica en solución) tiene que sufrir un proceso de autohidrólisis para conseguir dar la forma activa, UmuD'. UmuD presenta una elevada homología con la región carboxi-terminal de la proteína LexA. En este caso, como también sucede con LexA, la proteína RecA actúa como coproteasa del proceso. El denominado UmuD' es

un fragmento carboxi-terminal de 12 kDa. Posteriormente se puede formar el complejo multimérico UmuD<sub>2</sub>'C, responsable de la mutagénesis SOS.

La mutagénesis SOS está regulada de una forma muy estrecha, ya que su acción puede comprometer la estabilidad de la célula. Estos son los mecanismos implicados en la regulación:

- 1- El promotor del operón *umuDC* está fuertemente reprimido por LexA y solo se induce su expresión cuando las lesiones en el DNA son elevadas. (Kitagawa *et al.*, 1985).
- 2- Tanto UmuD como UmuC son proteínas muy lábiles.
- 3- UmuD tiene que pasar a la forma activa antes de ser funcional. En este caso, la reacción catalizada por RecA es más lenta que en el caso de la proteína LexA (Nohmi *et al.*, 1988).
- 4- UmuD' tiene más afinidad por UmuD de la que tiene por otra molécula de UmuD'. Por lo tanto es más probable la formación de heterodímeros UmuDD' no funcionales que la de homodímeros UmuD<sub>2</sub>' (Battista *et al.*, 1990).

El mecanismo por el cual actúa la mutagénesis SOS parece ser el siguiente: la DNA polimerasa III se pararía cuando se encontrase con una zona del DNA lesionada. En este momento, la proteína RecA se uniría al ssDNA y formaría un nucleofilamento que permitiría la unión de UmuD<sub>2</sub>'C. Después se daría lo que se denomina la síntesis translesión, es decir, la incorporación de un nucleótido incorrecto frente a la lesión y la posterior elongación de la cadena. El complejo UmuD<sub>2</sub>'C, que tendría por si mismo actividad polimerasa (se ha propuesto llamarle DNA polimerasa V), se supone que desplazaría a la DNA polimerasa III y gracias a la colaboración de RecA colocaría el nucleótido delante de la lesión. Posteriormente la cadena se elongaría unos cuantos nucleótidos más y a continuación volvería a actuar la DNA polimerasa III (Tang *et al.*, 1999; Sutton *et al.*, 2000).

### 1.1.2.3. Otras funciones SOS

Además de las reparativas, el sistema SOS tiene otras funciones. Uno de los genes más fuertemente controlados por LexA es el gen *sulA* (Schnarr *et al.*, 1991). La función de la proteína SulA es inhibir la división celular (D'Ari y Huisman, 1983; Cole, 1983). SulA bloquea la acción de FtsZ e inhibe la formación del septo de división celular (Dai y Lutkenhaus, 1991), esto provoca la formación de filamentos mientras se reparan las lesiones. En cuanto las lesiones ya han sido reparadas disminuye la concentración de SulA y las células se vuelven a dividir.

Otra de las funciones del sistema SOS es la inducción de profagos. Los represores de los genes líticos de algunos profagos se parecen mucho a la proteína LexA. Es el caso, por ejemplo, de  $\lambda$ ,  $\phi$ 80 y  $\phi$ 434 (Sauer *et al.*, 1982). En estos casos la proteína RecA\* induce la autohidrólisis y se activa el ciclo lítico. La hidrólisis se produce entre dos residuos Ala-Gly, como en el caso de LexA. De esta manera los fagos activan su ciclo lítico en una situación en que la célula que los hospeda tiene comprometida su viabilidad.

### 1.1.3. La proteína RecA

#### 1.1.3.1. Características y función del gen *recA*

El gen *recA* codifica una proteína de 352 aminoácidos con un peso de 38 kDa (Ogawa *et al.*, 1979; Sancar *et al.*, 1980). Se trata de un operón monocistrónico que se encuentra en una zona del cromosoma de *E.coli* en la que encontramos genes de "housekeeping" y relacionados con el metabolismo (Horii *et al.*, 1980). El gen *recA* está flanqueado por *alaS* y *recX*. La proteína RecA presenta un nivel basal en la célula importante, ya que

realiza funciones básicas para la misma. Pero su nivel se eleva significativamente debido a la inducción del sistema SOS.

La proteína RecA tiene múltiples actividades. No solo actúa como parte integrante del sistema SOS: inducción del sistema SOS y mutagénesis SOS. También desarrolla otras funciones vitales para la célula como son la replicación estable inducida como respuesta al daño, replicación estable constitutiva, partición cromosómica, recombinación homóloga y recombinación replicativa (Kowalczykowski *et al.*, 1994; Kogoma, 1997).

### **1.1.3.2. Mecanismo de acción de la proteína RecA**

La forma activa de la proteína RecA en el intercambio de cadenas de DNA y la autohidrólisis de algunas proteínas (por ej. LexA) es la de un filamento nucleoproteico helicoidal. En este filamento hay 6 monómeros de RecA por vuelta y se forman en dirección 5' 3' en el ssDNA (Di Capua *et al.*, 1982; Roca y Cox, 1990). Se ha dilucidado la estructura de estos complejos de 6 monómeros de RecA y es similar a la de un tipo de helicasas como ahora RuvB o DnaB (Brenner *et al.*, 1988, 1990; Heuser y Griffith, 1989; Yu y Egelman, 1997; Egelman, 1998) lo que puede dar pistas sobre su actividad.

Para que se lleve a cabo el intercambio de cadena en el DNA, RecA se ha de unir a ssDNA y a ATP, para dar lugar a lo que se denomina filamento presináptico. En principio, la interacción con dsDNA es al azar (Gonda y Radding, 1986), pero una vez se establece la unión se produce una obertura de la doble cadena y una búsqueda de zonas homólogas con la cadena de ssDNA (Shibata *et al.*, 1979).

Los estudios que se han realizado hasta la fecha parecen indicar que la proteína LexA se une a la ranura que existe entre dos subunidades de RecA polimerizadas adyacentes (Yu y Engelman, 1993). Esto explicaría porque es necesaria la presencia de filamentos de RecA para que se produzca la inducción del sistema SOS y porque esta inducción depende de la presencia de ssDNA.

### 1.1.3.3. Estructura bioquímica de la proteína RecA

En la proteína RecA se pueden encontrar 4 tipos de dominios importantes.

- 1- **Dominio de unión a nucleótidos e hidrólisis.** La proteína RecA tiene función ATPasa. Parece que la filamentación de RecA requiere la presencia de ATP, pero no su hidrólisis. Sin embargo, su hidrólisis sí que es necesaria para la disociación del filamento (Lee y Cox, 1990a; 1990b). En esta unión están implicadas 2 regiones correspondientes a los residuos 66-73 y 140-144. Los aminoácidos de las regiones circundantes también parecen tener importancia.
- 2- **Dominio de unión a DNA.** La zona central de la proteína RecA presenta un elevado número de estructuras  $\alpha$  y además nos encontramos con lo que se denominan "loop 1" (los aminoácidos 156-165) y "loop 2" (194-210), que son dos estructuras que presentan plegamiento al azar y que parecen ser las responsables directas de la unión al DNA. Cuando RecA forma los filamentos, los dos "loops" quedan en el interior de dichos filamentos. Mutaciones en estas regiones afectan a la unión a DNA.
- 3- **Dominio de interacción monómero-monómero e interacción entre filamentos.** La formación de oligómeros de RecA depende de interacciones hidrofóbicas. Para obtener los filamentos de RecA tenemos dos zonas implicadas, una en la zona amino-terminal y otra en la zona carboxi-terminal, lo cual permite suponer que se trata de una interacción del tipo "cabeza-cola". Los aminoácidos implicados son los 37-38 y 298-301.
- 4- **Dominio de interacción con LexA y otras proteínas ("target binding domain").** Los aminoácidos Gly-229 y Lys-243 son los implicados en la interacción con las proteínas cuya autohidrólisis estimula RecA.



### 1.1.4. La proteína LexA

El gen *lexA* codifica una proteína de 202 aminoácidos con un peso molecular de 22,7 kDa. La proteína LexA regula negativamente el sistema SOS. Esta regulación, como ya se ha explicado, la lleva a cabo uniéndose a una secuencia de DNA denominada caja SOS. La proteína LexA también tiene la capacidad de formar dímeros y la de autohidrolizarse. En condiciones fisiológicas para poderse autohidrolizar necesita la acción catalizadora de la proteína RecA.

#### 1.1.4.1. Estructura de la proteína LexA

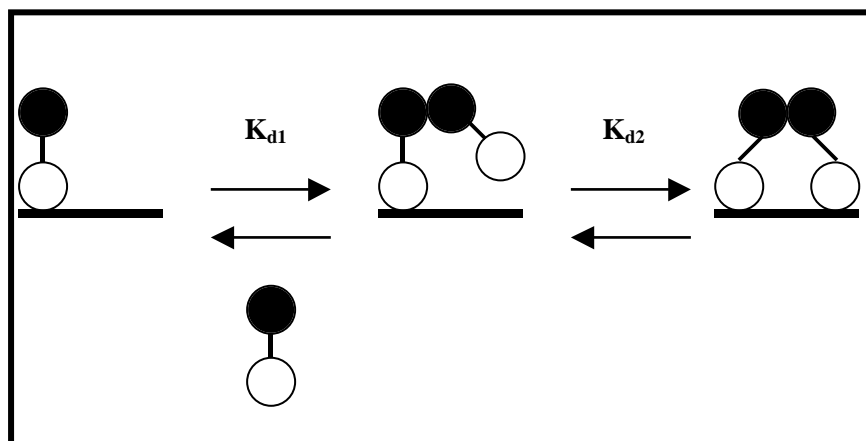
La proteína LexA tiene tres zonas diferenciadas a nivel estructural y funcional.

- 1- **Dominio amino-terminal.** Comprende los aminoácidos que van del 1 al 72. Es el dominio de la proteína LexA que se une al DNA. En su estructura presenta una variante de HTH (helix-turn-helix), que es común en las proteínas reguladoras (Pabo y Sauer, 1984; Harrison y Aggarwal, 1990). Por RMN (resonancia magnética nuclear) se ha resuelto la estructura de este dominio. Se ha observado la presencia de 3 hélices que comprenden los aminoácidos 6-21, 28-35 y 40-52. Además existen 2 cadenas antiparalelas.
- 2- **Región conectora ("hinge region").** Está constituida por los aminoácidos del 73 al 94. Aquí encontramos el enlace entre los aminoácidos Ala-84-Gly-85. Este es el enlace que se rompe en el proceso de autohidrólisis de la proteína LexA. La región conectora, contrariamente a lo que se pensaba, tiene un cierto plegamiento (Little y Hill, 1985; Oertel-Buchheit *et al.*, 1998). Su interacción con el dominio carboxi-terminal sirve para crear una estructura espacial necesaria para la rotura (Oertel-Buchheit *et al.*, 1998).
- 3- **Dominio carboxi-terminal.** En este dominio encontramos los aminoácidos que van del 95 al 202 y está implicado en la autohidrólisis, la dimerización y en la interacción con RecA\*. El dominio carboxi-terminal presenta una elevada

homología con UmuD y cI (el represor del fago  $\lambda$ ) (Battista *et al.*, 1990). a partir de la secuencia de aminoácidos se puede deducir que a nivel estructural abundan las cadenas  $\alpha$  (Hurstel *et al.*, 1986)

### 1.1.4.2. Dimerización

La proteína LexA es monomérica en solución (Schnarr *et al.*, 1985), pero para que lleve a cabo la represión se necesitan dos moléculas que forman un dímero (Thliveris *et al.*, 1991). Esta aparente contradicción ya ha sido resuelta. Experimentalmente se ha demostrado que un monómero interacciona con el motivo CTG y, acto seguido, un segundo monómero se une al otro motivo, CAG. El segundo monómero se une gracias a una interacción proteína-proteína (Fig. 1.2). Esta unión es cooperativa y tiene lugar en el dominio carboxi-terminal (Kim y Little, 1992).



**Figura 1. 2.** Modelo actual de unión de la proteína LexA a la caja SOS. El dominio N-terminal de la proteína LexA se representa con un círculo blanco y el C-terminal con un círculo negro.

Referencias: Kim y Little, 1992.

### 1.1.4.3. Autohidrólisis

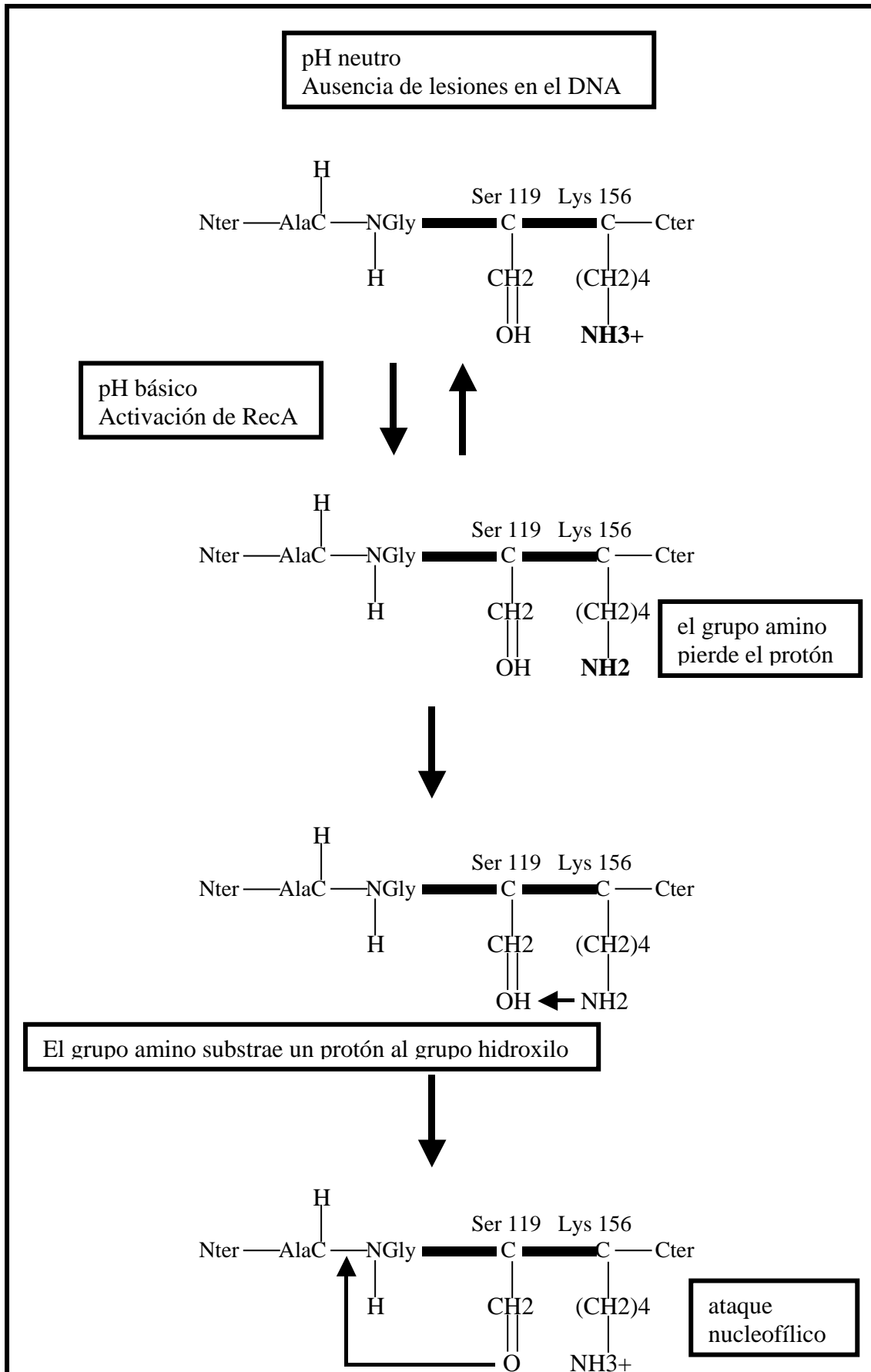
La rotura de la proteína LexA se considera un proceso de autohidrólisis ya que, tanto el sustrato de la reacción (sitio de rotura) como el centro catalítico se encuentran en la propia molécula de LexA (Fig. 1.3). La proteína LexA se modifica covalentemente a sí misma (Kim y Little, 1993). A pH neutro, la proteína RecA cataliza la reacción. Asimismo, esta reacción también puede darse de forma espontánea en condiciones de pH básico (Little, 1984; Lin y Little, 1988).

El sitio de rotura, como ya hemos comentado anteriormente, se halla entre los aminoácidos Ala-84 y Gly-85, mientras que el centro catalítico está formado por los aminoácidos Ser-119 y Lys-156 (Slilaty y Little, 1987; Roland y Little, 1990). Como podemos ver en la figura, en el momento en que, o bien la proteína RecA está activada (RecA<sup>\*</sup>), o bien hay una subida del pH se produce una desprotonización del grupo amino de la Lys-156 (pK 9,5). Este grupo amino, a su vez, le sustrae el protón al grupo hidroxilo del aminoácido Ser-119. Esto provoca un ataque nucleofílico del enlace peptídico entre Ala-84 y Gly-85.

Parece ser que el papel que desarrollaría la proteína RecA<sup>\*</sup> sería el de disminuir la pK de la desprotonización de la Lys-156, fruto de una modificación conformacional de la proteína LexA.

Este modelo de autohidrólisis se asemeja al mecanismo que utilizan las serin-proteasas (como la tripsina). De todas formas, se cree que es más análogo al mecanismo de las lactamasas (Little, 1993).

Como interaccionan espacialmente el sitio de rotura (Ala-84-Gly-85) y el centro catalítico (Ser-119 y Lys-156) no está totalmente resuelto. Hay dos hipótesis: o bien las dos regiones se encuentran cercanas espacialmente y es necesario un cambio conformacional para que se lleve a cabo la reacción, o bien se hallan distantes y es necesario un acercamiento de ambas (Shepley y Little, 1996). En el segundo mecanismo



**Figura 1.3.** Reacción de autohidrólisis de la proteína LexA.

se necesita la existencia de alguna zona flexible (Oertel-Buchheit *et al.*, 1998), que aproxime las dos regiones y que podría corresponder a la zona conectora.

## **1.2. El sistema SOS en otras especies bacterianas**

Hasta ahora hemos visto las características básicas del sistema SOS en *E. coli*, pero hay genes y proteínas similares a las del sistema SOS en otros microorganismos. Algunos de estos microorganismos son muy cercanos a *E. coli*, pero también los hay que están bastante o muy alejados filogenéticamente. Estos descubrimientos demuestran que la existencia de un sistema similar a SOS es un hecho generalizado en los microorganismos. Estudios llevados a cabo también han demostrado que existen proteínas similares a las que forman parte del sistema SOS en organismos eucariotas como *Saccharomyces cerevisiae* y en arqueobacterias.

### **1.2.1. El sistema SOS en otras bacterias gramnegativas**

Con los estudios acerca del sistema SOS que se han hecho en otros microorganismos gramnegativos diferentes de *E. coli* se pretende observar la presencia de las proteínas de este sistema y comprobar si su síntesis es inducida o no por los mismos factores que en este último organismo. También es muy interesante comprobar si estos genes tienen una caja SOS como la de *E. coli*, o bien si tienen otro tipo de caja. Las proteínas que se han estudiado más son: RecA, LexA y las diferentes subunidades del complejo UvrABC.

### 1.2.1.1. El gen *recA* en el mundo bacteriano

Es la proteína del sistema SOS que más se ha estudiado (Miller y Kokjohn, 1990; Karlin *et al.*, 1995; Karlin y Brocchieri, 1996) (Tabla 2.1). Hay más de 70 secuenciadas. En la mayoría de los casos el estudio del sistema SOS se ha quedado aquí. *recA* es el único gen del sistema SOS que parece estar presente en todos los microorganismos, pues en todos aquellos en los que se ha buscado se ha encontrado. Además se trata de un gen altamente conservado, con poca variabilidad interespecífica, lo cual indica que probablemente el origen es muy ancestral (Eisen y Hannawalt, 1999). A pesar de todo, tiene algunas zonas con cierta variabilidad, como es el caso del extremo carboxi-terminal ( los últimos 30 aminoácidos), que en *E. coli* están implicados en la regulación de la actividad RecA.

Para clonar los genes *recA* se han seguido diferentes estrategias que a continuación explicamos brevemente:

1. La estrategia más común hasta la fecha se basa en utilizar alguna de las múltiples cepas de *E. coli* RecA<sup>-</sup>. Aquellas células mutantes que hayan incorporado un plásmido que contenga una copia de un gen *recA* heterólogo verán incrementada su resistencia a agentes mutagénicos. Algunos de los genes *recA* aislados así serían los de: *Pseudomonas aeruginosa* (Sano y Kayegama, 1987), *Proteus mirabilis* (Eitner *et al.*, 1981) y *Serratia marcescens* (Liao y Liu, 1989).

En algunas ocasiones es posible que la complementación llevada a cabo por el gen *recA* heterólogo no sea total y algunas de las funciones de la proteína RecA no sean realizadas por la proteína heteróloga. Por ejemplo, esto pasaría en los casos de *Erwinia carotovora* (Keener *et al.*, 1984) y *Legionella pneumophila* (Dreyfus, 1989). Sus proteínas RecA no tienen la función coproteasa sobre el represor cI del fago

Hay casos en los que no hay inducción porque las secuencias reguladoras de los genes de una especie no son funcionales en *E.coli*. Es el caso, por ejemplo, de *Rhizobium phaseoli* (Michiels *et al.*, 1991), *Agrobacterium tumefaciens* (Wardham *et al.*, 1992) o *Acinetobacter calcoaceticus* (Gregg-Jolly y Ornston, 1994).

2. Un segundo método consiste en la utilización de cepas RecA<sup>-</sup>, pero que no son de *E. coli* sino de microorganismos más afines a la especie de que queremos obtener el gen *recA*. Esta técnica se ha utilizado, por ejemplo, para conseguir clonar el gen *recA* de *Rhodobacter sphaeroides*, utilizando un mutante RecA<sup>-</sup> de *Pseudomonas aeruginosa* (Calero *et al.*, 1994).
3. También se pueden usar sondas de DNA marcadas, obtenidas a partir de PCR. Para diseñar la sonda se utilizan las zonas del gen más conservadas. Esta sonda se hibrida con una genoteca del microorganismo que nos interesa y así podemos seleccionar clones que contendrán el gen *recA*. Esta estrategia se ha usado, por ejemplo, en el caso de *Xanthomonas campestris* (Lee *et al.*, 1996).
4. Finalmente, se pueden diseñar unos oligonucleótidos degenerados, a partir de zonas muy conservadas del gen *recA*. Se trata de un sistema muy interesante en el caso de microorganismos muy alejados filogenéticamente de *E. coli*. Algunos ejemplos serían el caso de *Lactococcus lactis*, *Mycoplasma pulmonis*, *Mycoplasma mycoides*, *Chlorobium tepidum*, *Streptomyces lividans*, *Corynebacterium tuberculosis*, *Clostridium perfringens*, *Borrelia burgdorferi*, *Xantomonas campestris*, *Thermus aquaticus*, *Termotoga maritima* y *Aquifex pyrofilus* (Dawat *et al.*, 1992; Jonhnston *et al.*, 1997; Wertnur *et al.*, 1994; Pogson *et al.*, 1996; Angov y Camerini-Otero, 1994; Gruber *et al.*, 1999).

**Tabla 1.5.** Organismos en los que se ha aislado un gen *recA* análogo al de *E. coli*.

Organismo	Recomb def.	Gen			Proteína		
		Clonac.	Híbrid.	Sec.	Recomb.	Coprot.	Reacción cruzada
<b>subclase <math>\gamma</math>-entéricas</b>							
<i>Aeromonas caviae</i>	+	+	+		+		
<i>A. salmonicida</i>		+	+	+	+		
<i>Citrobacter intermedus</i>			+				
<i>Escherichia adecarboxilata</i>			+				
<i>E. alkalescens</i>			+				
<i>E. aurescens</i>			+				
<i>E. blattae</i>			+				
<i>E. coli B/r</i>		+	+	+	+	+	+
<i>Erwinia carotovora</i>	+	+	+ <sup>a</sup>	+	+	+ <sup>b</sup>	+
<i>E. chrysanthemi</i>	+	+			+	+ <sup>b</sup>	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>			+				
<i>K. aerogenes</i>			+				
<i>Proteus mirabilis</i>	+	+	+/-	+	+	+	+
<i>P. vulgaris</i>		+	+ <sup>a</sup>	+	+	+	+
<i>Providencia rettgeri</i>			-				
<i>Salmonella typhimurium</i>	+		+			+	+
<i>Serratia marcescens</i>	+	+	+	+	+	+	
<i>Shigella flexneri</i>		+	+	+	+	+	+
<i>vibrio anguillarum</i>		+		+	+	+	
<i>V. cholerae</i>	+	+	-	+	+	+	+
<i>Yersinia pestis</i>		+		+	+	+	
<b>Subclase <math>\gamma</math>-no entéricas</b>							
<i>Haemophilus influenzae</i>	+	+		+ <sup>c</sup>	+	-	
<i>Legionella pneumophila</i>		+	-	+	+	+ <sup>b</sup>	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+(- <sup>a</sup> )	+	+	+	+
<i>P. cepacia</i>		+		+			
<i>P. fluorescens</i>	+			+			
<i>P. putida</i>	+	+		+	+		
<i>P. syringae</i>	+	+	-		+		
<i>Xanthomonas campestris</i>	+	+		+			
<b>Subclase <math>\beta</math></b>							
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	+	+		+			
<i>Bordetella pertusis</i>		+	-	+	+	+ <sup>b</sup>	-
<i>Methylophilus methylotrophus</i>		+	+		+	+	
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	+	+		+	+		
<i>N. meningitidis</i>		+		+			
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>		+		+	+	+	+
<b>Subclase <math>\alpha</math></b>							
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	+	+	+	+ <sup>c</sup>	+		
<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i>	+	+	+	+	+		
<i>Paracoccus denitrificans</i>	+	+		+			
<i>Rhizobium etli</i>	+	+	+	+	+		
<i>R. japonicum</i>			+				
<i>R. leguminosarum</i>	+	+	+	+			
<i>R. meliloti</i>	+	+	+	+	+		
<i>R. capsulatus</i>	+	+		+			
<i>R. sphaeroides</i>	+	+	-	+			
<b>Otros gramnegativos</b>							
<i>Aquaspirillum magnetotacticum</i>	+	+	+	+	+		



Tabla 1.5. (continuación)

Organismo	Recomb . def.	Gen			Proteína		
		Clonac.	Híbrid.	Sec.	Recomb.	Coprot.	Reacción cruzada
<i>Aquifex pyrophilus</i>		+		+			
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	+	+	+	+	+		
<i>Myxococcus xanthus</i>	+/- <sup>e</sup>	+		+			
<i>Thermotoga maritima</i>		+		+			
<i>Thermus aquaticus</i>		+		+			+
<b>Cyanobacteria</b>							
<i>Anabaena variabilis</i>		+		+	+	-	
<i>Gloeocapsa alpicola</i>		+			+	+	
<i>Synechococcus sp.</i>		+	+	+	+	+	
<b>Grampositivos</b>							
<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	- <sup>a</sup>	+		+ <sup>b,d</sup>	+
<i>Clostridium perfringens</i>		+		+	+		
<i>Corynebacterium glutamicum</i>		+		+			
<i>C. pseudotuberculosis</i>	+	+		+	+		
<i>Deinococcus radiodurans</i>	+	+		+			
<i>Enterococcus faecalis</i>	+						
<i>Lactococcus lactis</i>		+		+			
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>		+		+			
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+		+ <sup>c</sup>			
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	+	+		+			+
<i>S. pyogenes</i>	+	+		+			
<i>Streptomyces coelicolor</i>	+						
<i>S. lividans</i>		+		+	+		
<i>S. violaceus</i>		+		+			
<b>Bacteroides</b>							
<i>Bacteroides fragilis</i>		+	-	+	+	+	+
<i>Prevotella ruminicola</i>		+		+	+	+	
<b>Espiroquetas</b>							
<i>Borrelia burgdorferi</i>		+		+			
<i>Leptospira biflexa</i>		+	-	+	+	+	+
<b>Parásitos obligados</b>							
<i>Rickettsia prowazekii</i>		+		+			
<b>Mollicutes</b>							
<i>Acholeplasma laidlawi</i>	+	+		+	-		
<i>Mycoplasma mycoides</i>		+		+			
<i>M. pulmonis</i>		+		+			
<i>Spiroplasma citri</i>	+ <sup>f</sup>	+		+			
<i>S. melliferum</i>	+ <sup>f</sup>	+		+			

La primera columna indica si se ha aislado algún mutante deficiente en la recombinación. La tercera columna indica la detección de hibridación con el gen *recA* de *E. coli* K-12 sin especificar si ésta es débil o fuerte. Las tres columnas referentes a la proteína indican si el análogo de *recA* es capaz de complementar a un mutante de *E. coli* K-12 tanto en su actividad recombinativa o coproteasa, y si se observa reacción cruzada con anticuerpos policlonales contra la proteína RecA de *E. coli*.

a. Se empleó la región que codifica el lugar de unión del ATP propuesta por Knight *et al.* (1988).

b. No presenta actividad coproteásica frente al represor CI del bacteriófago .

c. Secuencia parcial.

d. *In vitro*.

e. *M. xanthus* presenta dos genes *recA* diferentes en su cromosoma. Sólo se ha obtenido un mutante deficiente en uno de ellos (Norioka *et al.*, 1995).

f. Se comportan como deficientes en *recA* de manera natural (Marais *et al.*, 1996).

Modificado de Roca y Cox, 1990.

### 1.2.1.2. El gen *lexA* y su distribución en el mundo bacteriano

El gen *lexA* es más difícil de clonar que el gen *recA* y eso explica porque hay muchos menos secuenciados. Un plásmido portador de un gen *lexA* no confiere una ventaja selectiva a la cepa que lo contiene. Con la puesta en marcha de múltiples proyectos de secuenciación de genomas completos se irán obteniendo en el futuro las secuencias de muchos genes *lexA* (así es como se han podido conocer las secuencias de los genes *lexA* de *Synechocystis ssp.*, *Thermotoga neapolitana* y *Deinococcus radiodurans*, entre otras especies).

En nuestro laboratorio se diseñó un sistema para clonar genes *lexA* en microorganismos cercanos a *E.coli* y que reconocieran la misma caja SOS que éste. De este modo se pudieron secuenciar los genes de: *Salmonella typhimurium*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Providenza rettgeri* y *Aeromonas hydrophila* (Calero *et al.*, 1991; Garriga *et al.*, 1992; Riera y Barbé, 1993; Riera y Barbé 1995).

El sistema consiste en aprovechar la función represora de la proteína LexA sobre el gen *sulA*, el producto del cual puede dar lugar a la muerte celular cuando se expresa constitutivamente. Si tenemos una cepa de *E. coli* LexA<sup>-</sup> y SulA<sup>-</sup>, y le introducimos una genoteca que utiliza un vector que contiene un gen *sulA* funcional, solo sobrevivirán aquellas células que hayan incorporado una copia de un gen *lexA* heterólogo.

Del estudio comparativo de estas proteínas LexA se deduce que hay una elevada homología entre ellas. Los aminoácidos Ser-119 y Lys-156, el centro activo del proceso de autohidrólisis y sus aminoácidos circundantes están totalmente conservados. También en la zona amino-terminal encontramos mucha homología en el motivo HTH, sobretodo en las hélices que lo forman. Es lógica esta homología si pensamos que el motivo HTH se encarga de la unión al DNA y todas estas proteínas reconocen la misma secuencia de DNA.

Comparando las secuencias de las proteínas LexA de *E. coli*, y los microorganismos cercanos filogenéticamente, con las secuencias de la proteínas LexA de microorganismos más alejados se aprecia que la mayor homología se encuentra en la región carboxi-terminal que, recordemos, es la que tiene la función de hidrolizar al represor. La zona amino-terminal es diferente en función de la caja SOS que reconocen.

### **1.2.1.3. Los genes *uvr* en diferentes especies bacterianas**

En algunos microorganismos también se ha estudiado el sistema de reparación por escisión de nucleótido. En estos trabajos se han encontrado desde regulaciones diferentes a la de *E. coli*, hasta la carencia de un sistema de reparación por escisión. En el caso de los genes *uvr* comentaremos algunos ejemplos por separado en función de su pertenencia al grupo *γ* o *α* de las Proteobacterias.

Grupo *γ*. En este grupo se han caracterizado algún o algunos genes de varios microorganismos. Un ejemplo es *S. typhimurium*, de quien se han secuenciado los genes *uvrA* y *uvrB*. Los dos genes son inducibles por lesión, y ambos tienen la misma posición en el cromosoma que los genes de *E. coli* (Smith *et al.*, 1991; Alberti *et al.*, 1992).

Otro ejemplo sería *S. marcescens*. En este caso *ssb* y *uvrA* tienen la misma disposición que en *E. coli*, con dos cajas SOS en la zona que queda entre los dos genes (de Vries y Wackernagel, 1993). No se ha estudiado su regulación. Este sería también el caso de *P. mirabilis* (de Vries y Wackernagel, 1994).

Grupo *α*. Dentro de este grupo se ha estudiado a *Neisseria gonorrhoeae* (Black *et al.*, 1995). En este microorganismo se ha descrito la carencia de reparación tendente al error (Campbell y Yasbin, 1984). Se ha secuenciado el gen *uvrB*. En su región promotora no se ha encontrado una caja SOS similar a la de *E. coli*.

Grupo. En este grupo solo se ha estudiado *Brucella abortus*. Se ha encontrado la misma disposición de los genes *ssb* y *uvrA* que en los microorganismos pertenecientes al grupo de las Proteobacterias (Zhu *et al.*, 1993).

#### **1.2.1.4. La caja SOS en las bacterias gramnegativas**

Como hemos comentado anteriormente, la secuencia consenso de la caja SOS de *E. coli* es CTG-(TA)<sub>5</sub>-CAG. *E. coli* forma parte del grupo de las Proteobacterias, que es el grupo en el que se han estudiado más microorganismos. Excepto en el caso de *Xantomonas campestris* (una bacteria no entérica), todas las bacterias de este grupo estudiadas tienen esta misma caja.

También se ha estudiado la secuencia a la cual se une la proteína LexA en algunos miembros del grupo de las Proteobacterias. Dentro de este grupo nos encontramos con bacterias que, en general, son de vida libre, con una elevada diversidad metabólica (desde fijadores de nitrógeno hasta fotosintéticos) y morfológica. Todos ellos tienen como hábitat el suelo (Woese *et al.*, 1984; Stackenbrandt *et al.*, 1988). En nuestro laboratorio se ha demostrado que la caja SOS de la bacteria fototrófica *Rhodobacter sphaeroides* responde a la secuencia GTTCN<sub>7</sub>GTTC. Hay que destacar el hecho de que se trata de una repetición directa.

### **1.2.2. El sistema SOS en bacterias grampositivas**

#### **1.2.2.1. El sistema SOS en *Bacillus subtilis***

*Bacillus subtilis* es una bacteria grampositiva, aeróbica, con capacidad para formar esporas y que habita en medios terrestres. Es el microorganismo grampositivo que más se utiliza a nivel de laboratorio. Hace ya muchos años que se sabía que *B. subtilis* podía

tener un sistema análogo al sistema SOS de *E. coli* (Yasbin, 1977a; Yasbin, 1977b). La homología funcional del sistema SOS de *B. subtilis* con el de *E. coli* es clara: presenta inducción por lesión al DNA, vías reparativas homólogas (escisión de nucleótido, por recombinación), reparación tendente al error, inducción de profagos y filamentación celular (Love y Yasbin, 1984). Aunque en algunos aspectos hay diferencias a nivel de regulación y función. Por ejemplo, la filamentación celular no depende en el caso de *B. subtilis* de RecA (Love y Yasbin, 1984). Otro aspecto a tener en cuenta es que *B. subtilis* puede desarrollar un estado de competencia de forma natural y esto afecta a la regulación de los genes SOS.

Se han clonado varios genes del sistema SOS de *B. subtilis*:

-*recA* (Marrero y Yasbin, 1988). La proteína RecA tiene un 50% de homología con la de *E. coli*. Se ha comprobado que es capaz de catalizar la autohidrólisis de la proteína LexA de *E. coli* (Wojciechowski *et al.*, 1991)

-*dinR* (Raymond-Denise y Guillén, 1991). Codifica la proteína análoga a LexA. Presenta homología con el gen de *E. coli*. Esta homología se concentra en el extremo carboxi-terminal. Existe una elevada conservación entre los residuos Ser-119 y Lys-156. A nivel amino-terminal son bastante diferentes sobretodo en la hélice 3, lo cual es lógico ya que reconocen una caja SOS diferente

Además de estos dos genes se conocen más genes *din* de *B. subtilis* (Love *et al.*, 1985; Gillespie y Yasbin, 1987; Cheo *et al.*, 1991).

El análisis de las zonas promotoras de los genes *din* llevó a la identificación de una secuencia promotora consenso relacionada con la regulación del sistema SOS (Cheo *et al.*, 1991). Esta secuencia consenso es conocida como la "Cheo box". Estudios recientes han permitido afinar más en la definición de esta secuencia que sería: CGAACRNRYGTTCG (Winterling *et al.*, 1998) (tabla 1.6). Se ha confirmado de forma experimental que DinR se une a esta caja así como a varios promotores *din* (Miller *et al.*, 1996).

DinR es el represor del sistema en *B. subtilis*. En condiciones normales esta proteína se une a las "Cheo box", presentes también en los promotores de *recA* y *dinR*. DinR inhibe la transcripción de estos genes impidiendo la formación del complejo RNA polimerasa-

**Tabla 1.6.** Análisis comparativo de los operadores SOS de diferentes bacterias grampositivas y otras especies relacionadas.

Microorganismo	Gen	Secuencia
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>recA</i>	C G A A T A T G C G T T C G
	<i>dinA</i>	C G A A C T T T A G T T C G
	<i>dinB</i>	A G G A C T C A T G T T C G
	<i>dinC</i>	C G A A C G T A T G T T C G
	<i>dinC</i>	A G A A C A A G T G T T C G
	<i>dinR</i>	C G A A C C T A T G T T T G
	<i>dinR</i>	C G A A C A A A C G T T T C
	<i>dinR</i>	G G A A C G T T T G T T C G
	<i>uvrB</i>	A A A A C A A A C G T T C G
	<i>dnaX</i>	C G A A C C A A G G T T C A
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>recA</i>	A G A A C T T A T G T T C G
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	<i>recA</i>	C G T A G G A A T T T T C G
<i>C. pseudotuberculosis</i>	<i>recA</i>	A G A A T G G T C G T T A G
<i>Mycobacterium leprae</i>	<i>recA</i>	C G A A C A G A T G T T C G
	<i>recA</i>	C G T A C T G C G A T T C G
	<i>lexA</i>	C G A A C A C A T G T T T G
	<i>lexA</i>	C G A A C A T T C G A T C G
<i>M. smegmatis</i>	<i>recA</i>	C G A A C A G G T G T T C G
	<i>recA</i>	G G A A C A C C G G T C A G
<i>M. tuberculosis</i>	<i>recA</i>	C G A A C A G G T G T T C G
	<i>lexA</i>	C G A A C A C A T G T T C G
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>recA</i>	C G A A C A A A T A T T C G
<i>Streptococcus mutans</i>	<i>recA</i>	C G A A C A T G C C C T T G
<i>S. pneumoniae</i>	<i>recA</i>	G G A T C A T T A G A A T G
	<i>dinF</i>	T G A A C T T G A A A T C G
<i>S. pyogenes</i>	<i>recA</i>	C G A T T A G G A G A A C G
<i>Spiroplasma melliferum</i>	<i>recA</i>	X G A T C A C G A G A A C G
<i>S. citri</i>	<i>recA</i>	T G A T C A C G A G A A C A
<i>Lactococcus lactis</i>	<i>recA</i>	T G A T A G A A A G T T C C
<i>Bifidobacterium breve</i>	<i>recA</i>	C G T T C A C C C G C A T C
	<i>recA</i>	C G A A C A A A T G T T C G
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>recA</i>	C G A A T T A A A C T T T G
	<i>recA</i>	C G A A C G G A T C A T C G
<i>Streptomyces lividans</i>	<i>recA</i>	C G A A C A T C C A T T C T
<i>S. coelicolor</i>	<i>recA</i>	A G A A T G G A T G T T C G
	<i>lexA</i>	C A A A C A C A C G T T C G
<i>S. clavuligenes</i>	<i>lexA</i>	C G T T C G A G T G A A A A
<i>S. rimosus</i>	<i>recA</i>	C G A A C G T C T A T T C A
<i>S. ambofaciens</i>	<i>recA</i>	C G A A C A T C C A T T C T
<b>Secuencia consenso</b>		<b>C G A A C R N R Y G T T C G</b>

Esta tabla se ha construido a partir de los artículos de Yasbin *et al.*, (1992); Durbach *et al.*, (1997); Winterling *et al.*, (1998).

promotor (Miller *et al.*, 1996). Cuando el sistema se induce, se produce la autohidrólisis de DinR a nivel de los aminoácidos Ala-91 y Gly-92. Esta hidrólisis está catalizada por RecA, DinR al igual que LexA puede autohidrolizarse en condiciones de pH básico.

El sistema SOS de *B. subtilis* presenta algunas diferencias con el de *E. coli*. Una de ellas es que en *B. subtilis* es normal la presencia de múltiples cajas SOS en los genes controlados por DinR (sobre todo en la región operadora de *recA*). Se consideraría que las proteínas reguladoras interactuarían formando un bucle regulador (Gralla, 1989; Lobell y Schleif, 1990). En teoría, la molécula represora actuaría formando un tetrámero. Esta hipótesis no se ha conseguido demostrar y, de hecho, DinR se une al DNA como dímero (Winterling *et al.*, 1998).

Otra cuestión que diferencia el sistema de *B. subtilis* del de *E. coli* es el hecho de que *B. subtilis* puede desarrollar un estado natural de competencia. Cuando las células pasan a ser competentes se produce una inducción del sistema SOS independiente de lesiones en el DNA. Para el éxito del proceso de transformación se necesita que la recombinación sea eficiente, y se ha argumentado que este sería el motivo por el cual se induciría el sistema. En estas condiciones, la inducción de la red SOS ocurriría a través del factor de transcripción de competencia (CTF), producto del gen *comK* (Haijema *et al.*, 1996). RecA se activaría como consecuencia de la presencia de regiones de ssDNA fruto del estado de competencia, y a partir de aquí el sistema funcionaría tal y como se ha comentado anteriormente.

Hay que destacar que *B. subtilis* es la única bacteria capaz de adoptar un estado de competencia de forma natural que tiene un sistema de reparación tendente al error. Esto, quizás, sea debido a que en una población de *B. subtilis* solo el 20% de las células adquiere el estado de competencia.

Finalmente destacar que, hasta el momento, la caja SOS de *B. subtilis* se ha encontrado en todos los microorganismos grampositivos en los que se ha estudiado este aspecto (Tabla 2.2). Este sería el caso de: *Clostridium perfringens*, *Corynebacterium glutamicum*, *Micobacterium leprae*, *M. tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptomyces lividans* y *S. coelicolor* entre otros (Yasbin *et al.*, 1992; Durbach *et al.*, 1997 y Winterling *et al.*, 1998).

### 1.2.3. El sistema SOS en eucariotas y arqueobacterias

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se han estudiado mecanismos de reparación y se han hallado proteínas con homología con la proteína RecA de *E. coli*. Los mutantes en estas proteínas son deficientes en los procesos de recombinación y reparación. Un ejemplo de estas proteínas estudiadas serían Rad51, Rad55, Rad57 (Prakash *et al.*, 1993). Rad51 es la que más se parece a la proteína RecA de *E. coli* y además se induce en respuesta a lesiones en el DNA (Basile *et al.*, 1992).

En eucariotas superiores y en el hombre se han encontrado proteínas homólogas a Rad51 (Shirobara *et al.*, 1993; Gupta *et al.*, 1997). De todas formas, lo que parece claro es que, tanto en *S. cerevisiae* como en eucariotas superiores, la función de la proteína RecA procariota la desempeña un grupo de proteínas.

Dentro de las arqueobacterias se han estudiado 3 especies: *Sulfolobus solfataricus* (termófila), *Methanococcus jannaschii* (termófila metanógena), *Haloferax volcanii* (halófila). En los 3 casos sus proteínas son más parecidas a Rad51 que no a RecA (Sandler *et al.*, 1996).

Se ha conseguido un mutante Rad en *H.volcanii* y se ha comprobado que es deficiente en procesos de recombinación y reparación, pero el gen no se induce por lesiones en el DNA (Woods y Dyall-Smith, 1997).



## **2. Resultados y discusión**

---

## 2. Resultados y discusión

Como se ha comentado en la introducción, en los últimos años se ha producido un incremento notable en el conocimiento del sistema SOS de *E. coli* (Friedberg *et al.*, 1995). También a raíz de los estudios realizados en este periodo de tiempo, se ha podido constatar la existencia de un sistema análogo al sistema SOS de *E. coli* en todas las eubacterias en las que se ha buscado. Alguno de ellos, como, por ejemplo, el sistema *dinR- recA* de *B. subtilis* mantiene el esquema básico: la presencia de un represor, la proteína RecA y la inducción de un regulón. Pero el hecho de que los sistemas sean análogos no quiere decir que sean idénticos y los diferentes microorganismos o grupos filogenéticos pueden tener modelos diferentes al de *E. coli*.

El principal objetivo de este trabajo ha sido la caracterización de la caja SOS de *Paracoccus denitrificans* y *Rhodobacter capsulatus*, que se enmarca dentro del estudio de la regulación SOS en el grupo de las Proteobacterias que se lleva a cabo en nuestro laboratorio.

Para ello, en este trabajo nos propusimos:

- i) La clonación y secuenciación del gen *recA* de *P. denitrificans* para posteriormente obtener un mutante RecA<sup>-</sup> de *P. denitrificans*.
- ii) Aislar la zona promotora del gen *recA* y *uvrA* de *P. denitrificans* para así poder determinar la caja SOS de este microorganismo.
- iii) La obtención de los genes *recA* y *uvrA* de *R. capsulatus* para identificar la secuencia de la caja SOS de esta especie bacteriana.

## 2.1 Identificación de la caja SOS de *Paracoccus denitrificans*.

### (Artículos I y II).

*Paracoccus denitrificans* es una bacteria gramnegativa aeróbica cuyo hábitat es el suelo. Forma parte del grupo de las Proteobacterias, constituyendo un subgrupo junto con *Rhodobacter sphaeroides* y *R. capsulatus* (Woese *et al.*, 1984). La versatilidad fisiológica de *P. denitrificans* hace que su estudio a nivel genético y molecular sea muy interesante. Varios de sus genes han sido aislados y caracterizados (Steinrücke y Ludwig, 1993). También se han generado mutantes y vectores que facilitan la manipulación genética en *P. denitrificans* (Steinrücke y Ludwig, 1993). A la hora de hacer estudios genéticos es interesante poder contar con mutantes a nivel de recombinación (Rec<sup>-</sup>), para, por ejemplo, en el caso de estudios de complementación asegurar la estabilidad del vector de expresión. En otros microorganismos, como sería el caso *E. coli*, esto se consigue mediante la construcción de mutantes RecA<sup>-</sup>.

Por lo tanto, en nuestro laboratorio nos planteamos, la secuenciación del gen *recA* de *P. denitrificans* y la obtención de un mutante RecA<sup>-</sup> que facilitara su manipulación genética así como el análisis de la expresión del gen *recA* de *P. denitrificans*.

### 2.1.1. Clonación y secuenciación del gen *recA* de *P. denitrificans*

Las proteínas RecA estudiadas hasta la fecha presentan una gran similitud en cuanto a secuencia de aminoácidos (Karlín y Brocchieri, 1996). *P. denitrificans* y *Rhodobacter sphaeroides* son dos especies bacterianas muy cercanas a nivel filogenético y además sus genomas presentan el mismo rango de contenido en G+C (64-67%). Por lo tanto, asumimos que sus respectivos genes *recA* tendrían una elevada identidad a nivel de secuencia de nucleótidos. Para confirmarlo, elaboramos una sonda marcada con un fragmento *Sma*I de 1,7 Kb del cromosoma de *R. sphaeroides* y que contenía su gen *recA*. A continuación se llevo a cabo un Southern a elevada estringencia con DNA

cromosómico de la cepa PD1222 de *P. denitrificans* digerido de forma individual con *EcoRI*, *PstI* o *SmaI*. En todos los casos se comprobó la presencia de bandas de hibridación. Este resultado sugería que en *P. denitrificans* existía un gen similar al gen *recA* de *R. sphaeroides*.

Posteriormente se procedió a construir una genoteca de *P. denitrificans* en el vector GEM1 y se hibridó esta genoteca con la sonda anteriormente comentada. Uno de los clones que dió positivo se digirió con diversos enzimas de restricción y a partir de estas digestiones se hizo un Southern. Una banda *EcoRI* de 3 Kb hibridó con la sonda proveniente de *R. sphaeroides*. Se recuperó esta banda y se ligó en la única diana *EcoRI* del plásmido pBluescript SK(+), de esta manera se obtuvo el plásmido pUA617.

La secuenciación del fragmento *EcoRI* de 3 Kb reveló la presencia de un ORF a 4 nucleótidos de distancia de una secuencia Shine-Dalgarno (GAGGA). El ORF del gen *recA* de *P. denitrificans* tiene 1071 nucleótidos (3 más que el de *R. sphaeroides*) que codifican una proteína de 356 aminoácidos y un peso molecular estimado de 38 kDa.

La comparación de la secuencia de aminoácidos de la proteína RecA de *P. denitrificans* con las proteínas de *R. sphaeroides*, *R. capsulatus*, *Rhizobium etli* y *E. coli* muestra unos niveles de identidad del 88,6%, 85,6%, 72,9% y 64,3% respectivamente. El extremo carboxi-terminal es la zona que presenta una mayor divergencia. En la proteína RecA de *P. denitrificans* se conservan las regiones de la proteína RecA de *E. coli* con actividad funcional como la de unión a ATP, actividad coproteasa y recombinación homóloga, así como la secuencia característica de la proteína RecA. En la zona promotora del gen *recA* de *P. denitrificans* no se ha encontrado ninguna secuencia homóloga a la caja SOS de *E. coli*, sugiriendo que la regulación de este gen debía ser diferente a la de su homólogo de *E. coli*.

### 2.1.2. Construcción de un mutante *recA*

Para obtener el mutante *recA* se clonó el gen *recA* de *P. denitrificans* en el plásmido pSUP202 y posteriormente se insertó una cassette de resistencia a kanamicina de 2 Kb en la diana interna *BstXI* de dicho gen *recA* de *P. denitrificans*. De esta manera se obtuvo el plásmido pUA618. Dicho plásmido se conjugó en una cepa Rif<sup>R</sup> derivada de *P. denitrificans* PD1222. Se seleccionaron aquellos conjugantes resistentes a Km que habían perdido la resistencia a tetraciclina producida por el vector, lo que indicaba que se había producido una pérdida del vector debido a un proceso de doble recombinación y que los clones seleccionados eran mutantes que han sustituido su gen *recA* salvaje por el gen *recA* inactivado por la cassette Km. Se seleccionó un clon (UAP10) y se comprobó que era realmente un mutante haciendo un Southern en el que se usó como sonda marcada el fragmento *EcoRI* de 3 Kb que contiene el gen *recA* de *P. denitrificans*.

Como era de esperar, el mutante *recA* de *P. denitrificans* era más sensible a la radiación ultravioleta que la cepa salvaje. Así, a una dosis de 40 Jm<sup>-2</sup>, la supervivencia de la cepa salvaje era 10<sup>4</sup> veces mayor que la de la cepa mutante.

### 2.1.3. Expresión del gen *recA* de *P. denitrificans*

Para analizar la expresión del gen *recA* de *P. denitrificans* se obtuvo, a partir de PCR, un fragmento de 251 pb que contenía 228 pb de la zona promotora y 23 pb de la zona codificante. El fragmento se amplificó a partir del plásmido pUA617 y estaba flanqueado por las dianas *EcoRI* y *BamHI* añadidas artificialmente gracias al diseño de los primers utilizados. El fragmento resultante se clonó en el plásmido pUJ8 previamente digerido con *EcoRI* y *BamHI*. De esta manera se obtiene una fusión entre el promotor del gen *recA* y el gen *trp'-lacZ* que no tiene promotor. Esta construcción, designada como pUA620, fué la base de los siguientes pasos. Un fragmento *NotI* con extremos rellenos proveniente de pUA620 y que contenía la fusión *recA-lacZ* se

clonó en la única diana *SmaI* del plásmido de amplio espectro de huesped pLV106, dando lugar al pUA621. Dicho plásmido se conjugó en las cepas RecA<sup>+</sup> y RecA<sup>-</sup> de *P. denitrificans*.

Tras un tratamiento con mitomicina C, se produjo un incremento en la expresión del gen *recA* de *P. denitrificans* en la cepa salvaje pero no así en la cepa RecA<sup>-</sup>. Este hecho indicaba la existencia de un elemento regulador en la zona anterior a la región codificante del gen *recA* de *P. denitrificans* y que este microorganismo debe poseer un represor similar a LexA que bloquea la expresión de *recA* en células no dañadas y que se inactiva por la actividad coproteasa de RecA.

#### **2.1.4. Caracterización del punto de inicio de transcripción del gen *recA* de *P. denitrificans***

Se ha descrito que el gen *recA* en algunas especies bacterianas forma parte de un transcrito policistrónico (Martin *et al.*, 1995). Para saber si era el caso del gen *recA* de *P. denitrificans* se procedió a caracterizar el punto de inicio de su transcripción. Además, este experimento nos permitió situar en el promotor las secuencias reguladoras. Se realizó un experimento de extensión de primer a partir de RNA total obtenido de la cepa PD1222 de *P. denitrificans* previo tratamiento con mitomicina C. El punto de inicio de transcripción corresponde a una A situada 72 pb antes del codón de inicio de traducción. También nos permitió deducir que las regiones -35 y -10 podrían corresponder respectivamente a las secuencias TTTGCAT y CCAAATA.

### 2.1.5. Clonación del gen *uvrA* de *P. denitrificans*

Para saber si una secuencia determinada es el elemento regulador de un regulón como, por ejemplo, puede ser el sistema SOS, conviene saber si dicha secuencia se halla presente en todos los genes del regulón. Por consiguiente nos propusimos aislar el gen *uvrA* de *P. denitrificans* para así poder comparar su promotor con el del gen *recA*, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Para clonar el gen *uvrA* de *P. denitrificans* elaboramos una genoteca de *P. denitrificans* en el vector GEM12 y la hibridamos con una sonda de 0,3 Kb *SacII* correspondiente a un fragmento interno del gen *uvrA* de *R. sphaeroides* (Mackenzie *et al.*, 1995). De esta forma aprovechamos la proximidad filogenética de estas dos especies bacterianas.

Uno de los fagos de la genoteca que dio positivo se digirió con diversos enzimas de restricción y mediante un Southern se pudo comprobar que un fragmento *SmaI* de 5 Kb hibridaba con la sonda originaria de *R. sphaeroides*. Este fragmento se clonó en el plásmido pBluescript SK(+). A partir de ese plásmido pudimos obtener la secuencia de la región promotora y del extremo 5' de la región codificante del gen *uvrA* de *P. denitrificans*.

No todos los genes *uvrA* son inducibles por lesiones en el DNA. Por ejemplo, los de *Pseudomonas aeruginosa* y *Neisseria gonorrhoeae* no lo son (Rivera *et al.*, 1997; Black *et al.*, 1998). Para comprobar si el gen *uvrA* de *P. denitrificans* se inducía o no construimos el plásmido pUA694 que contiene una fusión *uvrA-lacZ* y lo introdujimos en una cepa de *P. denitrificans* Rif<sup>R</sup>. El tratamiento con mitomicina C inducía la expresión de la fusión en células RecA<sup>+</sup> y no lo hacía en células RecA<sup>-</sup>, indicando que la inducción era dependiente de *recA*.

### 2.1.6. Movilidad electroforética de los promotores *recA* y *uvrA* de *P. denitrificans*

Se ha comprobado que el motivo GAACN<sub>7</sub>GAAC presente en la región promotora del gen *recA* de *R. sphaeroides* controla su inducción por lesiones en el DNA (Fernández de Henestrosa *et al.*, 1998). En el gen *recA* de *P. denitrificans* se encuentra esta misma secuencia solapada con la posición +1 anteriormente establecida. Por este motivo nos dispusimos a hacer ensayos de retraso electroforético para comprobar si alguna proteína se unía a la secuencia GAACN<sub>7</sub>GAAC del promotor del gen *recA* de *P. denitrificans*. Si añadimos extracto celular de *P. denitrificans* a fragmentos de DNA que contenían la secuencia GAACN<sub>7</sub>GAAC observábamos un cambio en la movilidad, cambio que no se detecta si el fragmento de DNA no contenía la secuencia en cuestión. El complejo DNA-proteína que se formaba no se debía a una unión proteica inespecífica sino a una unión dependiente de secuencia, ya que si a la reacción se le añadía DNA del plásmido pBSK sin marcar no se afectaba a la formación del complejo DNA-proteína, pero si lo que se añadía era el promotor *recA* de *P. denitrificans* salvaje sin marcar sí que se inhibía la formación de dicho complejo. Si el competidor añadido era el promotor del gen *recA* de *P. denitrificans* mutado en alguna de las dos subcajas de GAACN<sub>7</sub>GAAC desaparecía el retraso electroforético. La proteína que se unía al promotor del gen *recA* de *P. denitrificans* debía ser la misma que se unía al promotor del gen *uvrA* de *P. denitrificans*, ya que si añadimos este último promotor sin marcar se inhibía la formación del complejo.

En el promotor del gen *uvrA* de *P. denitrificans* entre la posición -66 y -91 respecto al inicio de traducción nos encontramos con la secuencia GTTCN<sub>7</sub>GTTC, que es la reversa complementaria de GAACN<sub>7</sub>GAAC, el motivo presente en el gen *recA* de *P. denitrificans*. El gen *uvrA* de *R. sphaeroides* también presenta la secuencia GTTCN<sub>7</sub>GTTC en su zona promotora, y es este el motivo que controla su inducción por lesiones en el DNA. Fragmentos de DNA que contienen el promotor del gen *uvrA* de *P. denitrificans* mutado en la primera o en la segunda repetición de GTTCN<sub>7</sub>GTTC no afectan al cambio de movilidad que sufre el promotor del gen *recA* de *P. denitrificans* cuando se incuba con extracto celular de *P. denitrificans*.



### 2.1.7. Efecto de mutaciones en su zona operadora sobre la expresión de los genes *recA* y *uvrA* de *P.denitrificans*

Además de los estudios *in vitro*, pretendíamos comprobar *in vivo* si las secuencias GAACN<sub>7</sub>GAAC y GTTCN<sub>7</sub>GTTC de los genes *recA* y *uvrA* respectivamente son las secuencias reguladoras de estos genes. Para ello analizamos la expresión de los promotores *recA* y *uvrA* de *P. denitrificans*, salvajes y mutados. Se construyeron fusiones de fragmentos derivados de ambos promotores con el gen *lacZ*. Los promotores mutados llevaban las mismas mutaciones que los fragmentos que se habían utilizado en los experimentos de movilidad electroforética. Las fusiones, que estaban en el plásmido pLV106, se introdujeron por conjugación en *P. denitrificans*. Las fusiones de promotores mutados mostraron una síntesis constitutiva y elevada de -galactosidasa. Este resultado indica que el control de los genes *recA* y *uvrA* de *P. denitrificans* necesita las secuencias GAACN<sub>7</sub>GAAC y GTTCN<sub>7</sub>GTTC respectivamente. También se comprobó que el nivel basal de los mutantes desregulados *recA* era más elevado que el nivel al cual llega la fusión salvaje después del tratamiento con mitomicina C. Las razones de este comportamiento se desconocen por el momento aunque una situación similar se ha descrito en *E. coli* (Krueger *et al.*, 1983; Wertman y Mount, 1985).

Debe dejarse constancia de que se introdujeron en células de *R. sphaeroides* una fusión salvaje y otra mutante del promotor del gen *recA* de *P. denitrificans*. La fusión salvaje se indujo, mientras que la mutante presentó una actividad constitutiva.

Todo este conjunto de datos nos permite afirmar que la caja SOS de *P. denitrificans* responde a la secuencia GTTCN<sub>7</sub>GTTC. Podemos considerar que el mecanismo por el cual el represor LexA de *P. denitrificans* se une al operador del gen *recA* (GAACN<sub>7</sub>GAAC) o al del gen *uvrA* (GTTCN<sub>7</sub>GTTC) debe ser el mismo, ya que las secuencias son complementarias y reversas. En el caso de *R. sphaeroides*, las cajas SOS de los genes *recA* y *uvrA* también están en la orientación contraria (Fernández de Henestrosa *et al.*, 1998).

## 2.2. Identificación de la región SOS de *Rhodobacter capsulatus* (Artículo III)

### 2.2.1. Análisis mutacional del promotor del gen *recA* de *R. capsulatus*

En nuestro laboratorio se había demostrado previamente que la secuencia GTTCN<sub>7</sub>GTTC es la caja SOS de *R. sphaeroides*. En el gen *recA* de *R. sphaeroides* encontramos dos copias de esta caja, en orientación contraria. Si analizamos la región promotora del gen *recA* de *R. capsulatus* se pueden apreciar dos repeticiones directas que son prácticamente idénticas a las que controlan la expresión del gen *recA* de *R. sphaeroides*.

Las secuencias que encontramos en la región promotora del gen *recA* de *R. capsulatus* son: GTTCN<sub>7</sub>GTTC (1ª repetición directa) y GAACN<sub>7</sub>GAAC (2ª repetición directa). Para analizar su función *in vivo*, procedimos a la creación de fusiones del gen *lacZ* con fragmentos de DNA que contenían, o bien el promotor salvaje del gen de *R. capsulatus*, o bien el promotor mutado. Estas fusiones se introdujeron por conjugación en *R. capsulatus* gracias al plásmido pLV106. La expresión del gen *recA* se indujo tras un tratamiento con mitomicina C. Si mutamos una de las dos repeticiones directas del promotor, el nivel basal es mayor, y el factor de inducción menor que en el caso de una fusión que contiene el promotor del gen *recA* de *R. capsulatus* salvaje. Cuando el promotor fusionado contiene las dos repeticiones directas mutadas, la expresión es constitutiva y su nivel basal es el mismo nivel que se obtiene con fusiones del promotor salvaje después de tratar las células con mitomicina C.

### 2.2.2. Caracterización de la expresión del gen *uvrA* de *R. capsulatus*

Como ya se ha comentado con anterioridad, para identificar secuencias reguladoras de un sistema genético es interesante comparar las regiones promotoras de varios genes que forman parte de este sistema. Por este motivo clonamos el gen *uvrA* de *R. capsulatus*, para poder comparar su región promotora con la del gen *recA* de *R. capsulatus*. Para aislar el gen *uvrA* de *R. capsulatus*, construimos una genoteca en el vector GEM12 y aprovechando la proximidad filogenética con *R. sphaeroides*, hibridamos esta genoteca con una sonda marcada de 0,3 Kb correspondiente a un fragmento interno *SacII* del gen *uvrA* de *R. sphaeroides* (Mackenzie *et al.*, 1995). Uno de los fagos que dio positivo fue digerido con diferentes enzimas de restricción y a partir de estas digestiones hicimos un Southern. Un fragmento de 6 Kb *BamHI* hibridó con la sonda anterior. Posteriormente se clonó este fragmento de 6 Kb *BamHI* en la única diana *BamHI* del plásmido pBluescript SK(+). A partir del inserto contenido en este plásmido pudimos secuenciar la región promotora y el extremo 5' de la región codificante del gen *uvrA* de *R. capsulatus*.

Analizando la secuencia se detectó que 66 nucleótidos antes del inicio de traducción del gen *uvrA* de *R. capsulatus* se hallaba la repetición directa GTTCN<sub>7</sub>GTTC. Para confirmar su participación en la regulación de la expresión del gen *uvrA* de *R. capsulatus* se construyeron fusiones del gen *lacZ* con el promotor salvaje y con promotores mutados en uno de los dos submotivos de la repetición o en los dos. Las células de *R. capsulatus* que portaban las fusiones mutantes presentaban una síntesis de -galactosidasa constitutiva y elevada. Estos resultados confirmaban que la secuencia GTTCN<sub>7</sub>GTTC controla la expresión del gen *uvrA* de *R. capsulatus*.

### 2.2.3. Definición de la caja SOS del grupo $\alpha$ de las Proteobacterias

La caracterización de la región operadora de los genes SOS de otros miembros del grupo de las Proteobacterias es un proyecto que estaba desarrollando nuestro laboratorio. En concreto se han realizado trabajos a este respecto con *R. sphaeroides* y *R. etli*.

En la Tabla 2.1 se recoge un análisis comparativo de las secuencias operadoras de dichos genes SOS en diferentes miembros del grupo. Estas secuencias corresponden tanto a operadores cuya implicación real en la regulación se ha demostrado experimentalmente, como a regiones obtenidas de bancos de datos.

Se ha cogido la dirección de la secuencia operadora como GTTCN<sub>7</sub>GTTC dado que ésta es la que se encuentra en la mayoría de los promotores portadores de una única copia del motivo regulador.

La alineación de las secuencias operadoras nos permite definir una secuencia consenso GTTC-YYYTTTTT-GTTC. Para elaborar esta secuencia consenso consideramos que para una posición determinada de la secuencia, la base consenso es aquella que está presente en esa posición en el 50% de las secuencias analizadas.

Las repeticiones GTTC se hallan altamente conservadas. Conviene destacar que la segunda de ellas se halla más conservada que la primera y solo en 4 de las secuencias operadoras analizadas presenta alguna variante. La base que presenta más variaciones es la T (3), perteneciente a la primera repetición. Estas observaciones parecen indicar que las bases que forman parte de la repetición directa son las responsables de la interacción directa con la proteína reguladora.

En la región central se observa como en el caso de las bases que van de la posición 8 a la 11, podemos establecer una secuencia consenso de 4 T, aunque la variabilidad es

**Tabla 2.1.** Análisis comparativo de los operadores SOS de diferentes bacterias del grupo de las Proteobacterias.

Microorganismo	Gen <sup>a</sup>	Secuencia														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	<i>recA1</i>	G	T	T	C	G	C	C	T	T	A	T	G	A	T	C
<i>R. sphaeroides</i>	<i>recA2*</i>	G	T	T	C	G	C	C	C	T	A	A	G	T	T	C
<i>R. sphaeroides</i>	<i>lexA1*</i>	G	T	T	C	T	G	C	C	C	G	C	G	T	T	C
<i>R. sphaeroides</i>	<i>lexA2*</i>	G	T	T	C	A	C	C	G	C	C	T	G	T	T	C
<i>R. sphaeroides</i>	<i>uvrA</i>	G	T	T	C	A	T	A	C	T	A	T	G	T	T	C
<i>R. sphaeroides</i>	<i>uvrB1</i>	G	C	T	C	C	G	C	C	C	T	T	G	T	T	C
<i>R. sphaeroides</i>	<i>uvrB2*</i>	G	A	T	C	C	G	T	T	T	T	T	G	T	T	C
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	<i>recA1</i>	G	T	T	C	C	G	A	A	A	T	T	G	T	T	C
<i>R. capsulatus</i>	<i>recA2*</i>	G	T	T	C	T	G	C	T	T	T	C	G	T	T	C
<i>R. capsulatus</i>	<i>uvrA</i>	G	T	T	C	C	T	G	T	T	C	C	G	T	T	C
<i>Rhodopseudomonas viridis</i>	<i>recA1</i>	G	T	T	C	T	C	T	T	C	T	T	G	T	T	C
<i>R. viridis</i>	<i>recA2*</i>	G	T	A	C	A	C	G	A	T	T	T	G	T	T	C
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	<i>recA1*</i>	G	T	T	C	G	C	A	A	T	A	T	G	T	T	C
<i>R. palustris</i>	<i>recA2*</i>	G	T	A	C	C	C	T	A	T	T	T	G	T	T	C
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>recA1*</i>	G	T	T	C	T	G	C	T	T	T	C	G	T	T	T
<i>A. tumefaciens</i>	<i>recA2*</i>	G	T	A	C	T	C	T	A	T	T	T	G	T	T	C
<i>Rhizobium etli</i>	<i>recA1*</i>	G	T	T	C	T	A	T	A	T	T	T	G	T	T	T
<i>R. etli</i>	<i>recA2*</i>	G	T	A	C	C	C	T	A	T	T	T	G	T	T	C
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	<i>recA1*</i>	G	T	T	C	G	A	T	T	C	T	T	G	T	T	C
<i>S. meliloti</i>	<i>recA2*</i>	G	T	A	C	A	T	G	T	T	T	T	G	T	T	C
<i>S. meliloti</i>	<i>uvrA</i>	G	T	T	C	T	T	T	T	T	T	T	G	T	T	C
<i>Mesorhizobium loti</i>	<i>recA1*</i>	G	T	T	C	T	T	T	T	T	T	C	G	T	A	C
<i>M. loti</i>	<i>recA2*</i>	G	T	A	C	C	T	T	T	T	T	T	G	T	T	C
<i>Brucella abortus</i>	<i>recA1</i>	G	T	T	C	G	T	G	G	A	T	A	G	T	T	C
<i>B. abortus</i>	<i>recA2*</i>	G	T	T	C	C	A	T	T	C	T	T	G	T	T	C
<i>B. abortus</i>	<i>uvrA</i>	G	T	T	C	G	A	T	A	T	T	T	G	T	T	C
<i>B. abortus</i>	<i>ssb*</i>	G	T	T	C	C	T	G	T	T	T	T	G	T	T	C
<i>Paracoccus denitrificans</i>	<i>recA*</i>	G	T	T	C	A	C	G	G	G	T	T	G	T	T	C
<i>P. denitrificans</i>	<i>uvrA</i>	G	T	T	C	C	T	G	T	G	A	T	G	T	T	C
<i>Aquaspirillum magnetotacticum</i>	<i>recA</i>	G	T	T	C	T	C	C	T	C	T	C	G	T	T	C
<i>Acidiphilium facilis</i>	<i>recA*</i>	G	T	T	T	T	G	T	C	A	A	C	G	T	T	C
<i>Zynomonas mobilis</i>	<i>recA</i>	G	T	T	C	A	C	C	T	T	A	T	G	T	T	C
<i>Z. mobilis</i>	<i>uvrA1</i>	A	T	T	C	C	C	C	C	T	T	T	G	T	T	C
<i>Z. mobilis</i>	<i>uvrA2</i>	A	T	T	C	T	G	C	T	A	C	C	G	T	T	C
<i>Sphingomonas aromaticivorans</i>	<i>recA1</i>	G	T	T	C	C	C	C	C	C	T	T	G	T	T	C
<i>S. aromaticivorans</i>	<i>recA2*</i>	G	T	A	C	T	C	G	T	T	G	T	G	T	T	C
<i>Caulobacter crescentus</i>	<i>recA*</i>	G	T	A	C	A	C	T	C	T	T	T	G	T	T	C
<i>C. crescentus</i>	<i>lexA1*</i>	G	T	T	C	T	C	C	T	G	G	T	G	T	T	C
<i>C. crescentus</i>	<i>lexA2*</i>	G	T	T	T	G	C	G	G	T	T	T	G	T	T	C
<b>Secuencia consenso</b>		<b>G</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>C</b>

a. 1 y 2 indican el número del operador.

\*. Indica aquellos casos en los que se ha utilizado la secuencia reversa complementaria para realizar este análisis comparativo.

mucho más elevada que en el caso de las repeticiones. En las bases que van de la posición 5 a la 7 no se puede establecer una base consenso concreta.

Probablemente la función de esta región central debe ser la de establecer un contexto favorable a la interacción de la proteína con las dos secuencias GTTC.

Es importante resaltar que tanto la única región operadora perteneciente a un gen *uvrB*, las dos conocidas de genes *lexA* así como el 66% de los operadores pertenecientes a genes *recA* presentan una doble copia del motivo operador. En cambio, solo 1 de los 6 genes *uvrA* analizados presenta esta doble copia. Quizá la presencia de una o dos copias del motivo operador obedezca a una intensidad diferencial de la represión de los genes que presentan estos motivos. También debe destacarse que en los casos en los que nos encontramos con dos motivos operadores, éstos no siempre presentan la misma orientación. En la familia *Rhizobiaceae* se observa una uniformidad total y todos los genes *recA* analizados presentan dos copias del motivo, teniendo ambas la misma orientación.

Del estudio de las cajas SOS de las bacterias del grupo de las Proteobacterias podemos deducir:

1. A diferencia de las cajas SOS de otras especies bacterianas analizadas anteriormente, la región reguladora de los miembros del grupo de las Proteobacterias es una repetición directa y no un palíndromo.
2. La existencia de una cierta similitud con uno de los motivos (GTTC) de la caja SOS de *B. subtilis* y del resto de bacterias grampositivas en general. Esta similitud puede ser producto, o bien de un ancestro común, o bien de un proceso de evolución convergente.

### **3. Conclusiones**

---

### 3. Conclusiones

1. Se han clonado los genes *recA* y *uvrA* de *Paracoccus denitrificans* y *Rhodobacter capsulatus* mediante la utilización como sonda de sus correspondientes genes homologos de *Rhodobacter sphaeroides*.
2. El inicio de transcripción del gen *recA* de *P.denitrificans* es una A situada a 72 pares de bases de su codón de inicio de transcripción. Las posibles regiones -10 y -35 de este gen corresponden a las secuencias TTGCAT y CAAATA.
3. Los genes *recA* y *uvrA* de *P. denitrificans* se inducen por lesiones en el DNA. Esta inducibilidad es dependiente del producto de su gen *recA*.
4. Mediante ensayos de movilidad electroforética con extractos crudos de *P. denitrificans* se ha demostrado que la secuencia GAACN<sub>7</sub>GAAC es necesaria para que se forme un complejo específico entre el promotor del gen *recA* de este microorganismo y una proteína citoplasmática.
5. La presencia de esta secuencia GAACN<sub>7</sub>GAAC es imprescindible para que el promotor *recA* de *P. denitrificans* se induzca in vivo cuando se lesiona su DNA. Este hecho nos permite afirmar que la repetición directa GAACN<sub>7</sub>GAAC es la región operadora del gen *recA* de *P. denitrificans*.
6. La movilidad electroforética del promotor del gen *uvrA* de *P. denitrificans* disminuye en presencia de extractos crudos de este microorganismo al formarse un complejo específico DNA-proteína. Experimentos de competitividad han puesto de manifiesto que esta proteína es la misma que lo hace a su propio promotor *recA*.
7. La formación del complejo entre el promotor *uvrA* y la proteína reguladora requiere la presencia en éste del motivo GTTCN<sub>7</sub>GTTC, que es la secuencia reversa y complementaria del operador *recA* de *P. denitrificans*. Dado que esta misma secuencia es imprescindible para la correcta inducción del gen *uvrA* por lesiones en el DNA, se puede afirmar que GTTCN<sub>7</sub>GTTC es la región operadora de dicho gen.
8. En la región promotora del gen *recA* de *Rhodobacter capsulatus* se ha identificado la presencia de los motivos GTTCN<sub>7</sub>GTAC y GAACN<sub>7</sub>GAAC separados por 11 pares de bases. Así mismo, en el promotor *uvrA* de este microorganismo se ha demostrado la presencia de la secuencia GTTCN<sub>7</sub>GTTC. Dichos motivos son imprescindibles para la normal inducción de los genes *recA* y *uvrA* de *R capsulatus* por lesiones en el DNA.



9. El conjunto de datos obtenido a lo largo del presente trabajo nos permite establecer que la caja SOS de *P. denitrificans* y *R. capsulatus* responde al motivo GTTCN<sub>7</sub>GTTC.
10. El análisis comparativo entre los promotores de posibles genes SOS de bacterias del Grupo filogenético existentes en la actualidad en los bancos de datos nos ha permitido definir la secuencia GTTCYYYTTTTGTTC como su operador SOS.

## **4. Bibliografía**

---

## 4. Bibliografía

**Alberti, M., Li, Y., Sancar, A. y Hearst, J. E.** 1992. *Salmonella typhimurium* single-stranded DNA-binding protein (*ssb*) gene, 5' end, *uvrA* gene, complete coding sequence. GenBank accession nº M93014.

**Anderson, D. G. y Kowalczykowski, S. C.** 1998. Reconstitution of an SOS response pathway: derepression of transcription in response to DNA breaks. *Cell* **95**: 975-979.

**Angov, E. y Camerini-Otero, R. D.** 1994. The *recA* gene from the thermophile *Thermus aquaticus*: cloning, expression, and characterization. *J. Bacteriol.* **176**: 1405-1412.

**Arthur, H. M., Bramhill, D., Eastlake, P. B. y Emerson, P.T.** 1982. Cloning of the *uvrD* gene of *E. coli* and identification of the product. *Gene* **19**: 285-295.

**Basile, G., Aker, M. y Mortimer, R. K.** 1992. Nucleotide sequence and transcriptional regulation of the yeast recombinational repair gene *rad51*. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 3235-3246.

**Battista, J. R., Ohta, J., Nohmi, T., Sun, W. y Walker, G. C.** 1990. Dominant negative *umuD* mutations decreasing RecA-mediated cleavage suggest roles for intact UmuD in modulation of SOS mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 7190-7194.

**Bebenek, A. y Pietrzykowska, I.** 1995. A new mutation in *Escherichia coli* K12, *isfA*, which is responsible for inhibition of SOS functions. *Mol. Gen. Genet.* **248**: 103-113.

**Black, C. G., Fyfe, J. A. M. y Davies, J. K.** 1995. A promoter associated with the neisserial repeat can be used to transcribe the *uvrB* gene from *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* **177**: 1952-1958.

---

**Black, C. G., Fyfe, J. A. M. y Davies, J. K.** 1998. Absence of an SOS-like system in *Neisseria gonorrhoeae*. *Gene* **208**: 61-66.

**Brenner, S. L., Zlotnic, A. y Griffith, J. D.** 1988. RecA self-assembly. Multiple discrete aggregation states. *J. Mol. Biol.* **204**: 959-972.

**Brenner, S. L., Zlotnic, A. y Stanford, W. F.** 1990. RecA protein self assembling II. Analytical equilibrium ultracentrifugation studies of the entrophy-driven self-association. *J. Mol. Biol.* **216**: 949-964.

**Calero, S., Garriga, X. y Barbe, J.** 1991. One-step cloning system for isolation of bacterial *lexA*-like genes. *J. Bacteriol.* **173**: 7345-7350.

**Calero, S., R. Fernández de Henestrosa, A. y Barbé, J.** 1994. Molecular cloning, sequence and regulation of expression of *recA* gene of the phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol. Gen. Genet.* **242**: 116-120.

**Campbell, L. A. y Yasbin, R. E.** 1984. Mutagenesis of *Neisseria gonorrhoeae*: absence of error-prone repair. *J. Bacteriol.* **160**: 288-293.

**Chaudhury, A. M. y Smith, G. R.** 1985. Role of *Escherichia coli* RecBC enzyme in SOS induction. *Mol. Gen. Genet.* **201**: 525-528.

**Chen, C. y Michel, H.** 1998. Cloning, sequencing, and characterization of the *recA* gene from *Rhodospseudomonas viridis* and construction of a *recA* strain. *J. Bacteriol.* **180**: 3227-3232.

**Cheo, D. L., Bayles, K. W. y Yasbin, R. E.** 1991. Cloning and characterization of DNA damage-inducible promoter regions from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **173**: 1696-1703.

**Cheo, D. L., Bayles, K. W. y Yasbin, R. E.** 1992. Molecular characterization of regulatory elements controlling expression of *Bacillus subtilis recA*<sup>+</sup> gene. *Biochimie* **74**: 755-762.

**Cohen, S. P., Resnick, J. y Sussman, R.** 1983. Interactions of single-strand binding protein and RecA protein at the single-stranded DNA site. *J. Mol. Biol.* **167**: 901-909.

**Cole, S.T.** 1983. Characterization of the promoter for the LexA regulated *sulA* gene in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **189**: 400-404.

**Dai, K. y Luthenkaus, J.** 1991. *ftsZ* is an essential cell division gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**: 3500-3506.

**D'Ari, R. y Huisman, O.** 1983. Novel mechanism of cell division inhibition associated with the SOS response in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **156**: 243-250.

**Demple, B.** 1991. Regulation of bacterial oxidative stress genes. *Annu. Rev. Genet.* **25**: 315-337.

**De Vries, J. y Wackernagel, W.** 1993. Cloning and sequencing of the *Serratia marcescens* gene encoding a single-stranded DNA-binding protein (SSB) and its promoter region. *Gene* **127**: 39-45.

**De Vries, J. y Wackernagel, W.** 1994. Cloning and sequencing of the *Proteus mirabilis* gene for a single-stranded DNA-binding protein (SSB) and complementation of *Escherichia coli* *ssb* point and deletion mutations. *Microbiology* **140**: 889-895.

**Di Capua, E., Engel, A., Stasiak, A. y Koller, T.** 1982. Characterization of complexes between RecA protein and duplex DNA by electron microscopy. *J. Mol. Biol.* **157**: 87-103.

**Dreyfus, L. A.** 1989. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of the *recA* gene of *Legionella pneumophila*. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 3097-3107.

**Dry, A. M. y Moureau, P. L.** 1994. Control of the *lexA* regulon by pH: evidence for a reversible inactivation of the LexA repressor during the growth cycle of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **12**: 621-629.

---

**Durbach, S.I., Andersen, S. J. y Mizrahi, V.** 1997. SOS induction in mycobacteria: analysis of the DNA-binding activity of a LexA-like repressor and its role in DNA damage induction of the *recA* gene from *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Microbiol.* **26**: 643-653.

**Duwat, P., Ehrlich, S. D. y Gruss, A.** 1992. Use of degenerate primers for polymerase chain reaction. Cloning and sequencing of the *Lactococcus lactis* subsp *lactis* *recA* gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2674-2678.

**Egelman, E. H.** 1998. Bacterial helicases. *J. Struc. Biol.* **124**: 123-128.

**Eisen, J. A. y Hannawalt, P. C.** 1999. A phylogenomic study of DNA repair genes, proteins and processes. *Mutation Res.* **435**: 71-213.

**Eitner, G., Solonin, A. S. y Tanyashin, V. I.** 1981. Cloning of *recA*-like gene of *Proteus mirabilis*. *Gene* **14**: 301-308.

**Fernández de Henestrosa, A. R., Rivera, E., Tapias, A. y Barbé, J.** 1998. Identification of the *Rhodobacter sphaeroides* SOS box. *Mol. Microbiol.* **28**: 991-1003.

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

**Garriga, X., Calero, S. y Barbé, J.** 1992. Nucleotide sequence analysis comparison of the *lexA* genes from *Salmonella typhimurium*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Pseudomonas putida*. *Mol. Gen. Genet.* **236**: 125-134.

**Gillespie, K. y Yasbin, R. E.** 1987. Chromosomal locations of three *Bacillus subtilis* *din* genes. *J. Bacteriol.* **169**: 3372-3374.

**Gonda, D. K. y Radding, C. M.** 1986. The mechanism of the search for homology promoted by RecA protein: facilitated diffusion within nucleoprotein networks. *J. Biol. Chem.* **261**: 13087-13096.

- Gralla, J. D.** 1989. Bacterial gene regulation from distant sites. *Cell* **57**: 193-195.
- Granger-Schnarr, M., Schnarr, M. y Van Sluis, C. A.** 1986. *In vitro* study of the interaction of the LexA repressor and the UvrC protein with a *uvrC* regulation region. *FEBS Lett.* **198**: 61-65.
- Gregg-Jolly, L. A. y Ornston, L. N.** 1994. Properties of *Acinetobacter calcoaceticus recA* and its contribution of intracellular gene conversion. *Mol. Microbiol.* **12**: 985-992.
- Grossman, L. y Thiagalingam, S.** 1993. Nucleotide excision repair, a tracking mechanism in search of damage. *J. Biol. Chem.* **268**: 16871- 16874.
- Gruber, T. M., Eisen, J. A., Gish, K. y Bryant, D. A.** 1999. The phylogenetic relationships of *Clorobium tepidum* and *Cloroflexus auranticus* based upon their RecA sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* **162**: 53-60.
- Gupta, R. C., Bazemore, L. R., Golub, E. I. y Radding, C. M.** 1997. Activities of human recombination protein Rad51. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 463-468.
- Haganese, M. E., Timme, T. L., Bryan, S. K. y Moses, R. E.** 1987. DNA polymerase III of *Escherichia coli* is required for UV and methyl methanesulfonate mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 4195-4199.
- Haijema, B. J., Van Sinderen, D., Winterling, K., Kooistra, J., Venema, G. y Hamoen, L. W.** 1996. Regulated expression of the *dinR* and *recA* genes during competence development and SOS induction in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **22**: 75-85.
- Harrison, S. C. y Aggarwal, A. K.** 1990. DNA recognition by proteins with the helix-turn-helix motif. *Annu. Rev. Biochem.* **59**: 933-969.

---

**Hedge, S., Sandler, S. J., Clark, A. J. y Madiraju, M. V.** 1995. *recO* and *recR* mutations delay induction of the SOS response in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **246**: 254-258.

**Heuser, J. y Griffith, J.** 1989. Visualization of RecA protein and its complexes with DNA by quick-freeze/ deep-etch electron microscopy. *J. Mol. Biol.* **210**: 473-484.

**Horii, T., Ogawa, T. y Ogawa, H.** 1980. Nucleotide sequence of the *lexA* gene of *E. coli*. *Cell* **23**, 689-697.

**Hurstel, S., Granger-Schnarr, M., Daune, M. y Schnarr, M.** 1986. *In vitro* binding of LexA repressor to DNA. Evidence for the involvement of amino-terminal domain. *EMBO J.* **5**: 793-798.

**Johnston, J. L., Sloan, J., Kyfe, J. A. M., Davies, J. K. y Rood, J. I.** 1997. The *recA* gene from *Clostridium perfringens* is induced by methyl methansulphonate and contains an upstream Cheo box. *Microbiology* **143**: 885-890.

**Kacinski, B. M. y Rupp, W. D.** 1982. *E. coli* UvrB protein binds to DNA in the presence of UvrA protein. *Nature* **294**: 480-481.

**Karlin, S., Weinstock, G. M. y Brendel, V.** 1995. Bacterial classifications derived from RecA protein sequence comparisons. *J. Bacteriol.* **177**: 6881-6893.

**Karlin, S. y Brocchieri, L.** 1996. Evolutionary conservation of *recA* genes in relation to protein structure and function. *J. Bacteriol.* **178**: 1881-1894.

**Keener, S. L., McNamee, K. P. y McEntee, K.** 1984. Cloning and characterization of *recA* genes from *Proteus vulgaris*, *Erwinia carotovora*, *Shigella flexnei*, and *Escherichia coli* B/r. *J. Bacteriol.* **169**: 153-160.

**Kim, B. y Little, J. W.** 1992. Dimerization of a specific DNA-binding protein on DNA. *Science* **255**: 203-206.



**Kim, B. y Little, J. W.** 1993. LexA and cI repressors as enzymes: Specific cleavage in an intermolecular reaction. *Cell* **73**: 1165-1173.

**Kitagawa, Y., Akaboshi, E., Shinagawa, H., Horii, T., Ogawa, H. y Kato, T.** 1985. Structural analysis of the *umu* operon required for inducible mutagenesis in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 4336-4340.

**Koch, W. H. y Woodgate, R.** 1998. The SOS response. DNA damage and repair. Eds: J. A. Nickoloff y M. F. Hoekstra. Humana Press, Totowa, NJ. Pag. 107-134.

**Kogoma, T.** 1997. Stable DNA replication: interplay between DNA replication, homologous recombination, and transcription. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 212-238.

**Kowalczykowski, S. C., Dixon, D. A., Eggleston, A. K., Lauder, S. D. y Rehauer, W. M.** 1994. Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **58**: 401-465.

**Krueger, J. H., Elledge, S. J. y Walker, G. C.** 1983. Isolation and characterization of Tn5 insertion mutations in the *lexA* gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **153**: 1368-1378.

**Kuzminov, A.** 1999. Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage  $\lambda$ . *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 715-813.

**Lee, J. W. y Cox, M. M.** 1990a. Inhibition of RecA protein-promoted ATP hydrolysis. I. ATP S and ADP are antagonistic inhibitors. *Biochemistry* **29**: 7666-7676.

**Lee, J. W. y Cox, M. M.** 1990b. Inhibition of RecA protein-promoted ATP hydrolysis. II. Longitudinal assembly and disassembly of RecA protein filaments mediated by ATP and ADP. *Biochemistry* **29**: 7677-7683.

**Lee, M. H., Guzzo, A. y Walker, G. C.** 1996. Inhibition of RecA-mediated cleavage in covalent dimers of UmuD. *J. Bacteriol.* **178**: 7304-7307.

---

**Lewis, L. K., Harlow, G. R., Gregg-Jolly, L. A. y Mount, D. W.** 1994. Identification of high affinity binding sites for LexA which define new DNA damage-inducible genes in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **241**: 507-523.

**Liao, C. L. y Liu, Y. T.** 1989. Cloning of the *Serratia marcescens recA* gene and construction of a *Serratia marcescens recA* mutant. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 3319-3327.

**Lin, L. L. y Little, J. W.** 1988. Isolation and characterization of noncleavage (Ind<sup>-</sup>) mutants of the LexA repressor of *Escherichia coli* K12. *J. Bacteriol.* **170**: 2163-2173.

**Lin, J. J. y Sancar, A.** 1990. Reconstitution of nucleotide excision nuclease with UvrA and UvrB proteins from *Escherichia coli* and UvrC protein from *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **265**: 21337-21341.

**Lin, J. J., Phillips, A. M., Hearst, J. E. y Sancar, A.** 1992. Active site of (A)BC excinuclease. Binding, bending, and catalysis mutants of UvrB reveal a direct role in 3' and an indirect role in 5' incision. *J. Biol. Chem.* **267**: 17693-17700.

**Little, J. W.** 1984. Autodigestion of LexA and phage repressors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 1375- 1379.

**Little, J. W. y Hill, S. A.** 1985. Deletions within a hinge region of a specific DNA-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 2301-2312.

**Little, J. W.** 1991. Mechanism of specific LexA cleavage: autodigestion and role of RecA coprotease. *Biochimie* **73**: 411-422.

**Little, J. W.** 1993. LexA cleavage and other Self-processing reactions. *J. Bacteriol.* **175**: 4943-4950.

**Livneh, Z., Cohen-Fix, O., Skaliter, R. y Elizur, T.** 1993. Replication of damaged DNA and the molecular mechanism of ultraviolet light mutagenesis. *CRC Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **28**: 465-513.

- Llobès, R., Granger-Schnarr, M., Lazdunski, C. y Schnarr, M.** 1991. Interaction of a regulatory protein with a DNA target containing two overlapping binding sites. *J. Biol. Chem.* **266**: 2303-2312.
- Lobell, R. B. y Schleif, R. F.** 1990. DNA looping and unlooping by AraC protein. *Science* **250**: 528-532.
- Love, P. E. y Yasbin, R. E.** 1984. Genetic characterization of the inducible SOS-like system of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **160**: 910-920.
- Love, P. E., Lyle, M. J. y Yasbin, R. E.** 1985. DNA damage-inducible (*din*) loci are transcriptionally activated in competent *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 6201-6205.
- Mackenzie, C., Chidambaran, M., Sodergren, E. J., Kaplan, S. y Weinstock, G. M.** 1995. DNA repair mutants of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* **177**: 3027-3035.
- Maples, V. F. y Kushner, S. R.** 1982. DNA repair in *Escherichia coli*: identification of the UvrD gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 5616-5620.
- Marrero, R. y Yasbin, R. E.** 1988. Cloning of the *Bacillus subtilis* *recE*<sup>+</sup> gene and functional expression of *recE*<sup>+</sup> in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **170**: 335-344.
- Martin, B., García, P., Castanie, M. P. y Claverys, J. P.** 1995. The *recA* gene of *Streptococcus pneumoniae* is part of a competence-induced operon and controls lysogenic induction. *Mol. Microbiol.* **15**: 367-379.
- Michel, B., Ehrlich, S. D. y Uzest, M.** 1997. DNA double-strand breaks caused by replication arrest. *EMBO J.* **16**: 430-438.
- Michiels, J. A., Broek, A. V. y Vanderleyden, J.** 1991. Molecular cloning and nucleotide sequence of the *Rhizobium phaseoli* *recA* gene. *Mol. Gen. Genet.* **228**: 486-490.

- Miller, R. V. y Kokjohn, T. A.** 1990. General microbiology of *recA*: environmental and evolutionary significance. *Annu. Rev. Microbiol.* **44**: 365-394.
- Miller, M. C., Resmich, J. B., Smith, B. T. y Lovett, C. M.** 1996. The *Bacillus subtilis* *dinR* gene codes for the analogue of *Escherichia coli* *lexA*. *J. Biol. Chem.* **271**: 33502-33508.
- Nohmi, T., Battista, J. R., Dodson, L. A. y Walker, G. C.** 1988. RecA-mediated cleavage activates UmuD for mutagenesis: mechanistic relationship between transcriptional derepression and postranslational activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 1816-1820.
- Oeda, K., Horiuchi, T. y Sekiguchi, M.** 1981. Molecular cloning of the *uvrD* gene of *Escherichia coli* that controls ultraviolet sensitivity and spontaneous mutation frequency. *Mol. Gen. Genet.* **184**: 191-199.
- Oertel-Buchheit, P., Reinbolt, J., Matthias, J., Granger-Schnarr, M. y Schnarr, M.** 1998. A LexA mutant repressor with a relaxed inter-domain linker. *Prot. Sci.* **7**: 512-515.
- Ogawa, T., Wabiko, H., Tsurimoto, T., Horii, T., Masukata, H. y Ogawa, H.** 1979. Characteristics of purified RecA protein and the regulation of its synthesis *in vitro*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **43**: 909.
- Oh, E. Y. y Grossman, L.** 1989. Characterization of the helicase activity of the *Escherichia coli* UvrAB protein complex. *J. Biol. Chem.* **246**: 1336-1343.
- Pabo, C. O. y Sauer, R. T.** 1984. Protein-DNA recognition. *Annu. Rev. Biochem.* **53**: 293-321.
- Perry, K. L., Elledge, S. J., Mitchell, B. B., Marsh, L. y Walker, G. C.** 1985. *umuDC* and *mucAB* operons whose products are required for UV light- and chemical-induced mutagenesis: UmuD, MucA and LexA proteins share homology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 4331-4335.

**Pogson, C. A., Simmons, C. P., Strugnell, R. A. y Hodgson, A. L. M.** 1996. Cloning and manipulation of the *Corynebacterium pseudotuberculosis recA* gene for live vaccine vector development. FEMS Microbiol. Lett. **142**: 139-145.

**Prakash, S., Sung, P. y Prakash, L.** 1993. DNA repair genes and proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. Annu. Rev. Genet. **27**: 33-70.

**Raymond-Denise, A. y Guillén, N.** 1991. Identification of *dinR*, a DNA damage-inducible regulator gene of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **173**: 7084-7091.

**Relan, N. K., Jenuwine, E. S., Gumbs, O. H. y Shaner, S. L.** 1997. Preferential interactions of the *Escherichia coli* LexA repressor with anions and protons are coupled to binding the *recA* operator. Biochemistry **36**: 1077-1084.

**Riera, J. y Barbé, J.** 1993. Sequence of the *Providencia rettgeri lexA* gene and its control region. Nucleic Acids Res. **21**:2256.

**Riera, J. y Barbé, J.** 1995. Cloning, sequence and regulation of expression of the *lexA* gene of *Aeromonas hydrophila*. Gene **154**: 71-75.

**Rivera, E., Vila, L. y Barbé, J.** 1997. Expression of the *Pseudomonas aeruginosa uvrA* gene is constitutive. Mutat. Res. **377**: 149-155.

**Roberts, J. W., Phizicky, E. M., Burbee, D. G., Roberts, C. W. y Moreau, P. L.** 1982. A brief consideration of the SOS inducing signal. Biochimie **64**: 805-807.

**Roca, A. I. y Cox, M. M.** 1990. The RecA protein: structure and function. CRC Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol. **25**: 415-456.

**Roland, K. L. y Little, J. W.** 1990. Reaction of LexA repressor with Disopropyl Fluorophosphate. A test of the serine protease model. J. Biol. Chem. **265**: 12828-12835.

---

**Sancar, A. y Rupp, W. D.** 1979. Cloning of *uvrA*, *lexC*, and *ssb* genes of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **90**: 123-129..

**Sancar, A., Staachelek, C., Konigsberg, W. y Rupp, W. D.** 1980. Sequences of the *recA* gene and protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 2611-2615.

**Sancar, A., Wharton, R. P., Seltzer, S., Kacinski, B., Clarke, N. D. y Rupp, W. D.** 1981. Identification of the *uvrA* gene product. *J. Mol. Biol.* **148**: 45-62.

**Sancar, A.** 1996. DNA excision repair. *Annu. Rev. Biochem.* **65**: 43-81.

**Sancar, G. B., Sancar, A. y Rupp, W. D.** 1984. Sequences of the *E. coli uvrC* gene and protein. *Nucleic Acids Res.* **12**: 4593-4608.

**Sandler, S. J., Satin, L. H., Samra, H. S. y Clark, A. J.** 1996. *recA*-like genes from three archaean species with putative protein products similar to Rad51 and Dmc1 proteins of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic acids Res.* **24**: 2125-2132.

**Sano, Y. y Kageyama, M.** 1987. The sequence and function of the *recA* gene and its protein in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Mol. Gen. Genet.* **208**: 412-419.

**Sauer, R. T., Yocum, R. R., Doolittle, R. F., Lewis, M. y Pabo, C. O.** 1982. Homology among DNA binding proteins suggests use of a conserved super-secondary structure. *Nature* **298**: 447-451.

**Schnarr, M., Pouyet, J., Granger-Schnarr, M. y Daune, M.** 1985. Large-scale purification, oligomerization equilibria and specific interaction of the LexA repressor of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **24**: 2812-2818.

**Schnarr, M., Oertel-Buchheit, P., Kazmaier, M. y Granger-Schnarr, M.** 1991. DNA binding properties of the LexA repressor. *Biochimie* **73**: 4223-431.

**Seeberg, E. y Steinum, A. L.** 1982. Purification and properties of the *uvrA* protein from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 988-992.

**Shepley, D. P. y Little, J. W.** 1996. Mutant LexA proteins with specific defects in autodigestion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 11528-11533.

**Shibata, T., Cunningham, R. P., DasGupta, C. y Radding, C. M.** 1979. Homologous pairing in genetic recombination: complexes of RecA protein and DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 5100-5104.

**Shinohara, A., Ogawa, H., Matsuda, Y, Ushio, N., Ikeo, K. y Ogawa, T.** 1993. Cloning of human, mouse and fission yeast recombination genes homologous to *rad51* and *recA*. *Nature Genet.* **4**: 239-243.

**Slilaty, S. N. y Little, J. W.** 1987. Lysine-156 and Serine-119 are required for LexA repressor cleavage: a possible mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 3987-3991.

**Smith, C. M., Arany, Z., Orrego, C. y Eisenstadt, E.** 1991. DNA damage-inducible loci in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **173**: 3587-3590.

**Sommer, S, Bailone, A. y Devoret, R.** 1993a. The appearance of the UmuD'C protein complex in *Escherichia coli* switches repair from homologous recombination to SOS mutagenesis. *Mol. Microbiol.* **10**: 963-971.

**Sommer, S., Knezevic, J., Bailone, A. y Devoret, R.** 1993b. Induction of only one SOS operon, *umuDC*, is required for SOS mutagenesis in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **239**: 137-144.

**Stackendrandt, E., Murray, R. G. E. y Trüper, H. G.** 1988. Proteobacteria classis nov., a name for phylogenetic taxon that includes the "purple bacteria and their relatives". *Inter. J. Syst. Bacteriol.* **38**: 321-325.

**Steinrücke, P. y Ludwig, B.** 1993. Genetics of *Paracoccus denitrificans*. *FEMS Microbiol. Rev.* **104**: 83-118.

---

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

**Tang, M., Shen, X., Frank, E. G., O'Donnell, M., Woodgate, R. y Goodman, M. F.** 1999. UmuD' <sub>2</sub>C is an error-prone DNA polimerase, *Escherichia coli* pol V. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 8919-8924.

**Taylor, A. F. y Smith, G. R.** 1985. Substrate specificity of the DNA unwinding activity of the RecBC enzyme in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **185**: 431-443.

**Thliveris, A. T., Little, J. W. y Mount, D. W.** 1991. Repression of the *E. coli recA* gene requires at least two LexA protein monomers. *Biochimie* **73**: 449-455.

**Thoms, B. y Wackernagel, W.** 1987. Regulatory role of *recF* in the SOS response of *Escherichia coli*: impaired induction of SOS genes by UV irradiation and nalidixic acid in a *recF* mutant. *J. Bacteriol.* **169**: 1731-1736.

**Wardham, H., McPherson, M. J., Harris, C. A., Sharma, E. y Sastry, G. R. K.** 1992. Molecular analysis of the *recA* gene of *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Gene* **121**: 133-136.

**Wertman, K. F. y Mount, D.** 1985. Nucleotide sequence binding specificity of the LexA repressor of *Escherichia coli* K12. *J. Bacteriol.* **163**: 376-384.

**Wertmur, J., Wong, D. M., Ortiz, B., Tong, J., Reichert, F. y Gelfand, D. H.** 1994. Cloning, sequencing, and expression of RecA proteins from three distantly related thermophilic eubacteria. *J. Biol. Chem.* **269**: 2598-25935.

**Whitby, M. C. y Lloyd, R. G.** 1995. Altered SOS induction associated with mutations in *recF*, *recO* and *recR*. *Mol. Gen. Genet.* **246**: 174-179.



- Winterling, K. W., Levine, A. S., Yasbin, R. E. y Woodgate, R.** 1997. Characterization of DinR, the *Bacillus subtilis* SOS repressor. *J. Bacteriol.* **179**: 1698-1703.
- Winterling, K. W., Chafin, D., Hayes, J. J., Sun, J., Levine, A. S., Yasbin, R. E. y Woodgate, R.** 1998. The *Bacillus subtilis* DinR binding site. Redefinition of the consensus sequence. *J. Bacteriol.* **180**: 2201-2211.
- Woese, C. R., Stackenbrandt, E., Weisburg, W. G., Paster, B. J., Madigan, M. T., Fowler, V. J., Malin, C. M., Blanz, P., Gupta, R., Nealson, K. H. y Fose, G. E.** 1984. The phylogeny of purple bacteria. The alpha subdivision. *System Appl. Microbiol.* **5**: 315-326.
- Wojciechowski, M. F., Peterson, K. R. y Love, P. E.** 1991. Regulation of the SOS response in *Bacillus subtilis*: evidence for a *lexA* repressor homology. *J. Bacteriol.* **173**: 6489-6498.
- Woods, W. G. y Dyall-Smith, M. L.** 1997. Construction and analysis of a recombination-deficient (*radA*) mutant of *Haloferax volcanii*. *Mol. Microbiol.* **23**:791-797.
- Yasbin, R. E.** 1977a. DNA repair in *Bacillus subtilis*. I. The presence of an inducible system. *Mol. Gen. Genet.* **153**: 211-218.
- Yasbin, R. E.** 1977b. DNA repair in *Bacillus subtilis*. II. Activation of the inducible system in competent bacteria. *Mol. Gen. Genet.* **153**: 219-225.
- Yasbin, R. E., Cheo, D. L. y Bayles, K. W.** 1992. Inducible DNA repair and differentiation in *Bacillus subtilis*. Interactions between global regulons. *Mol. Microbiol.* **6**: 1263-1270.
- Yu, X. y Egelman, E. H.** 1993. The LexA repressor binds within the deep helical groove of the activated RecA filament. *J. Mol. Biol.* **231**: 29-40.

**Yu, X. y Egelman, E. H.** 1997. The RecA hexamer is a structural homologue of ring helicases. *Nat. Struc. Biol.* **4**: 101-104.

**Zhu, Y., Oliveira, S. C. y Splitteer, G. A.** 1993. Isolation of *Brucella abortus* *ssb* and *uvrA* genes from a genomic library by use of lymphocytes as probes. *Infect. Immun.* **61**: 5339-5344.

## **5. Artículos**

## **Artículo I**

## **Artículo II**

## **Artículo III**