

3. Resultados

3.1. Identificación de la caja SOS de *R. metallidurans*

En esta parte del trabajo, el objetivo fue identificar y caracterizar la caja SOS de *R. metallidurans* y estudiar el funcionamiento del sistema de reparación SOS en este microorganismo. Para ello, dado que las dos proteínas más importantes en este sistema son RecA y LexA, en primer lugar se procedió a realizar el aislamiento y secuenciación de los genes *recA* y *lexA* y de sus regiones promotoras, se identificó dentro de dichas regiones una posible caja SOS. Seguidamente, se construyeron mutantes RecA(Def) y LexA(Def) de *R. metallidurans* para analizar la expresión del gen *recA* en estas cepas y también en *E. coli*, en presencia y en ausencia de lesiones en el DNA. Se realizaron experimentos para determinar si la caja SOS de *R. metallidurans* era funcional y cumplía las mismas funciones que en *E. coli*, en cuanto al mecanismo de regulación de genes del sistema y se identificaron los genes que están bajo el control de LexA.

3.1.1. Clonación y secuenciación del gen *recA* de *R. metallidurans*

Las proteínas RecA de diferentes bacterias tienen secuencias de aminoácidos muy conservadas (Karlin y Brocchieri, 1996), basándose en esta característica y sabiendo que los genomas de *A. tumefaciens* y *R. metallidurans* tienen un contenido parecido de G+C (aproximadamente 59-67%), en este estudio se planteó que podía existir una elevada similitud entre sus secuencias. El gen *recA* de *A. tumefaciens* había sido previamente descrito y caracterizado (Wardhan *et al.*, 1992), por lo que la estrategia que se utilizó para aislar el gen *recA* de *R. metallidurans* fue localizar y aislar dicho gen mediante hibridación del DNA cromosómico de *R. metallidurans*, digerido con enzimas de restricción, con una sonda del gen *recA* de *A. tumefaciens*.

Para tal fin, en primer lugar se escogió una región altamente conservada del gen *recA* de *A. tumefaciens*. Seguidamente se amplificó dicha región,

utilizando los oligonucleótidos UprecA Agro y LorecA Agro, a partir de DNA del plásmido pAgrR4, que contiene el gen *recA* de esta especie. En dicha amplificación se obtuvo un producto de PCR de aproximadamente 500 pb (+181 a +678). Para poder utilizar este fragmento como sonda, se marcó con digoxigenina y se llevaron a cabo *southern blots* a alta y baja astringencia con DNA cromosómico de la cepa de *R. metallidurans*, digerido previamente con *XhoI* y también con *Clal*. Se obtuvo una marca de hibridación de un fragmento de aproximadamente 3.5-4 kb con el DNA digerido con *XhoI* y de un fragmento de aproximadamente 8-9 kb con el DNA digerido con *Clal* (Fig. 3.1).

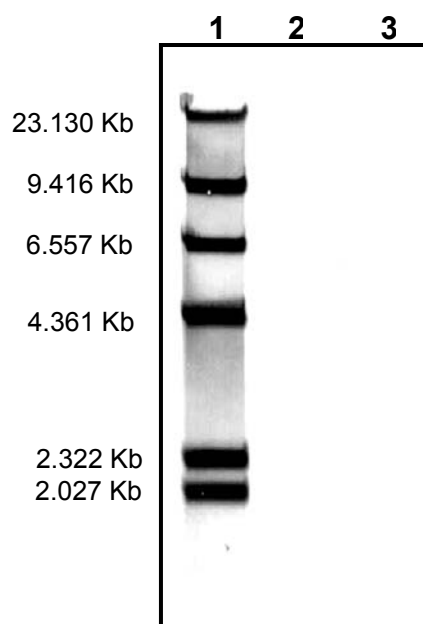


Figura 3.1. Hibridación por *southern blotting* del DNA cromosómico de *R. metallidurans*, digerido con las enzimas de restricción *Clal* (carril 2) y *XhoI* (carril 3). Se utilizó como sonda de hibridación un fragmento interno de aproximadamente 500 pb del gen *recA* de *A. tumefaciens*. El marcador de peso molecular fue el λ *HindIII* (carril 1).

Para los subsiguientes estudios se eligió el fragmento mayor, a partir del cual se preparó una subgenoteca. Para ello, se realizó un escalado de la restricción del DNA cromosómico para tener mayor cantidad y se recuperaron tres fragmentos diferentes de entre 6 y 9 kb. Mediante hibridación con la misma sonda y a baja astringencia, se observó marca de

hibridación con los diferentes fragmentos, si bien la señal fue más intensa con el fragmento de menor tamaño (Fig. 3.2).

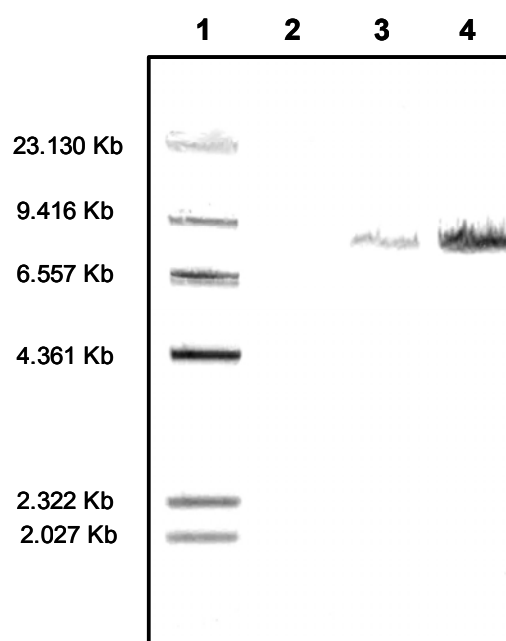


Figura 3.2. Hibridación por *southern blotting* de diferentes fracciones del DNA cromosómico de *R. metallidurans*, digerido con la enzima de restricción *Cla*I, Fracción 1 (carril 2), Fracción 2 (carril 3) y Fracción 3 (carril 4). Se utilizó como sonda de hibridación un fragmento interno de aproximadamente 500 pb del gen *recA* de *A. tumefaciens*. El marcador de peso molecular fue el λ \perp *Hind*III (carril 1).

Dicho fragmento se clonó en el vector pBSK y se electrotransformó en la cepa de *E. coli* HB101*immE3* (RecA⁻). Los clones obtenidos fueron sembrados en placas de LB que contenían MMS al 0.02% y aquellos clones que crecían en presencia de este agente mutagénico, fueron sometidos a una prueba de resistencia a la radiación ultravioleta, mediante el test de la gota. Se extrajo el DNA plasmídico de los clones positivos y se digirió con la enzima *Cla*I. Los plásmidos que tenían un tamaño superior a 6 kb fueron retransformados en células HB101*immE3* y comprobados de nuevo por crecimiento en 0.02% de MMS y por el test de la gota.

Tras realizar dichas pruebas se obtuvo el plásmido pUA980, de un tamaño aproximado de 6.5 kb, que contenía un fragmento *Clal* de 3.5 kb, el cual fue secuenciado, utilizando los oligonucleótidos Direct-Cy5 y Reverse-Cy5 (Sanger *et al.*, 1977). Las secuencias obtenidas no se correspondieron con un posible gen *recA*, por lo que se procedió a realizar un mapa de restricción del plásmido. Basándose en los datos obtenidos, se procedió a realizar una recircularización de un fragmento más pequeño, de unas 5.8 kb, que se había obtenido de una digestión con la enzima *HindIII*. Este fue retransformado en células competentes de DH5 α y HB101*immE3*, para volver a realizar las pruebas de crecimiento en MMS al 0.02% y el test de la gota, obteniéndose en ambos casos resultados positivos. De nuevo se secuenció el fragmento, pero no se localizó un posible gen *recA*. Teniendo en cuenta las dianas de restricción encontradas en los fragmentos secuenciados, se procedió a realizar una digestión con *KspI* y con *SphI*, obteniéndose cuatro fragmentos: uno correspondía al vector pBSK y los otros tres a fragmentos del inserto. El fragmento de mayor tamaño (aproximadamente 2 kb) se clonó en el vector pBSK, se transformó en células competentes de HB101*immE3* y se realizaron de nuevo las pruebas de crecimiento en MMS al 0.02% y el test de la gota con los clones recombinantes obtenidos. El fragmento se secuenció, utilizando los oligonucleótidos Direct-Cy5 y Reverse-Cy5 (Sanger *et al.*, 1977). En este caso, en la secuenciación obtenida con el oligonucleótido Reverse-Cy5 se localizó la presencia de un ORF a 6 nucleótidos de distancia de una típica secuencia Shine-Dalgarno (GAAGGA). Este ORF de 1059 nucleótidos codifica una proteína de 353 aminoácidos. Además, en la región promotora (a 168 nucleótidos), se localizó una secuencia idéntica a la caja SOS de *E. coli* (CTGT-N₈-ACAG) (Fig. 3.3). Por comparación y mediante la ayuda de programas informáticos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), se determinó que podía tratarse de la proteína RecA de *R. metallidurans*. Por otra parte, al analizar la secuencia obtenida con el oligonucleótido Direct-Cy5 y utilizando programas informáticos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), se pudo determinar que dicha región se correspondía con la proteína RecX, la cual está ubicada en la región flanqueante a la proteína RecA de algunas β -Proteobacterias.

Figura 3.3. A: Secuencia de la región promotora del gen *recA* de *R. metallidurans*. El inicio de traducción está señalado en negrita y subrayado, la posible caja SOS está indicada en negrita (CTGT-N₃-ACAG) y el RBS (*Ribosome Binding Site*) o secuencia Shine-Dalgarno en cursiva. **B:** Comparación de las secuencias de la proteína RecA de *R. metallidurans*, *R. solanacearum* y *E. coli*.

A.

GCCGGTGGGGCTTGCCAAGCATA**CTGT**TTTTTTTAT**ACAG**TACCCGACATTCGGGGCGAGCTACCATGA
AAGGTGATCGCACCATGCCGGGTTGGGCGTTCGTGGCCTGGAGAATCCATCCCGGAAAAGGGCTTTGGG
TTCAGGGCGTTCGCGCCGTATGCGGCCTATTTATACACCATTGACTGAAGGACGACC**ATG**

B.

<i>R. metallidurans</i>	MDDKKAGAGVSAEKQKALAAALSQIEKQFGKGSIMRLGDGEIEQDIQVSTGSLGLDIAL	60
<i>R. solanacearum</i>	MEDGKKAASMSAEKQKALAAALAQIEKQFGKGSIMKMGDAEVEP-VQVVSTGSLGLDVAL	59
<i>E. coli</i>	-----MAIDENKQKALAAALGQIEKQFGKGSIMRLGE-DRSMDVETISTGSLSLDIAL	52
 :*****.*****:*. :*****.***:**	
<i>R. metallidurans</i>	GVGGLPRGRVVEIYGPESSGKTTTLTLQVVAEMQKLGGTCAFIDAEHALDVQYAGKLGVDV	120
<i>R. solanacearum</i>	GVGGLPRGRVVEIYGPESSGKTTTLTLQVVAEMQKLGGTCAFIDAEHALDVYADKLGKVV	119
<i>E. coli</i>	GAGGLPMGRIVEIYGPESSGKTTTLTLQVIAAAQREGKTCAFIDAEHALDPIYARKLGVDI	112
	*.**** *.*****:* * : * ***** ** ****.:	
<i>R. metallidurans</i>	GNLLISQPDGTGEQALEITDALVRSGSIDLIVIDSVAALVPKAEIEGEMGDSLPLGQARLM	180
<i>R. solanacearum</i>	PDLLISQPDGTGEQALEIADALVRSGSVDLIVIDSVAALVPKAEIEGEMGDALPGLQARLM	179
<i>E. coli</i>	DNLLCSQPDGTGEQALEICDALARSGAVDVIVVDSVAALTPKAEIEGEIGDSHMGLAARM	172
	:** ***** ***.***:*.***:*****.*****:** * ** *:	
<i>R. metallidurans</i>	SQGLRKLGTIKRTNCLVIFINQIRMKIGVMFGSPETTGGNALKFYASVRLDIRRIGSI	240
<i>R. solanacearum</i>	SQALRKLGTIKRTNCLVIFINQIRMKIGVMFGSPETTGGNALKFYASVRLDIRRIGSI	239
<i>E. coli</i>	SQAMRKLGNLQSNNTLLIFINQIRMKIGVMFGNPETTGGNALKFYASVRLDIRRIGAV	232
	.:*.*.:*:* *.*****.*****.*****::	
<i>R. metallidurans</i>	KKGDEVVGNETKVKVVKVKNVSPFPREAFDILYQGQISRQGEIIDLGVDKIVEKAGAWY	300
<i>R. solanacearum</i>	KKGDEVVGNETKVKVVKVKNVAPPREAFDILYGAGVSREGEIIDLGVEAKVVEKSGAWY	299
<i>E. coli</i>	KEGENVVGSETRVKVVKVKNKIAAPFKQAEFQILYGEINIFYGELVDLGVEKELIEKAGAWY	292
	*.:***.***:*****:*.***:* *:* ** * * . **.:***. **:***:***	
<i>R. metallidurans</i>	SYNGEKIGQKDNAREYLRENPDIADEIENKVRLALGVAPLNTVAGAPAEVEG-----	353
<i>R. solanacearum</i>	SYNGERIGQGRDNCREFLRENAELAREIENKVREHLGVTMPGAVTLAAEEVEE-----	352
<i>E. coli</i>	SYKGEKIGQKANATAWLKDNPETAKEIEKKVRELLLSNPSTPDFSVDDSEGVVAETNED	352
	::***: * . :*:*.*: * **:* ** * * . : * .	
<i>R. metallidurans</i>	-	
<i>R. solanacearum</i>	-	
<i>E. coli</i>	F 353	

La secuencia de nucleótidos correspondiente al gen *recA* de *R. metallidurans* fue introducida en el NCBI/GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>), bajo el número de acceso AF312928. La comparación de la secuencia deducida de dicha proteína, mediante programas informáticos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), permitió determinar que tenía una alta similitud con la *recombination protein RecA* de *Burkholderia cepacia* y otras especies de *Burkholderia* (identidad del 81%), *Bordetella pertussis* (identidad del 76%), *Ralstonia solanacearum* (identidad del 78%) y *Methylobacillus flagellatus* (identidad del 74%), todos ellos

microorganismos cercanos a nivel filogenético y miembros del grupo β -*Proteobacteria*. Se realizó un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas RecA de *R. metallidurans*, *R. solanacearum* y *E. coli*, utilizando un programa informático (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) (Fig. 3.3). Mediante dicho alineamiento se encontraron los siguientes porcentajes de identidad entre dichas proteínas.

- RecA de *R. metallidurans* vs. RecA de *R. solanacearum*: 84%
- RecA de *R. metallidurans* vs. RecA de *E. coli*: 68%
- RecA de *R. solanacearum* vs. RecA de *E. coli*: 65%

3.1.2. Clonación y secuenciación del gen *lexA* de *R. metallidurans*

El genoma de *R. metallidurans* está siendo secuenciado por el DOE-JGI (*Department of Energy, Joint Genome Institute, University of California*), disponiéndose en este momento de una secuencia parcial en la dirección http://www.jgi.doe.gov/JGI_microbial/html/ralstonia/ralston_homepage.html.

El gen *lexA* de esta especie fue identificado en dicha secuencia buscando, mediante programas informáticos, regiones de dicha secuencia parcial con elevada similitud al gen *lexA* de *E. coli*.

Así, se localizó una posible secuencia que podía corresponder al gen *lexA*. Mediante los oligonucleótidos LexA Rals1 y LexA Rals2 se amplificó la región que podía contener al gen *lexA* y a su promotor, obteniéndose un fragmento de 1.2 kb que fue clonado en el vector pGEM-T[®] y secuenciado utilizando los oligonucleótidos Direct-Cy5 y Reverse-Cy5 (Sanger *et al.*, 1977). Este plásmido fue denominado pUA986.

La secuencia amplificada contiene un ORF de 654 nucleótidos a 10 nucleótidos de distancia de una típica secuencia Shine-Dalgarno (AAGA) que codifica una proteína de 218 aminoácidos. Además, en la región promotora (a -61 nucleótidos y a -41), se encontraron dos secuencias idénticas a la caja SOS de *E. coli* (Fig. 3.4).

Figura 3.4. A: Secuencia de la región promotora del gen *lexA* de *R. metallidurans*. El inicio de traducción está señalado en negrita y subrayado, las posibles cajas SOS están indicadas en negrita (CTGT-N₈-ACAG) y el RBS (*Ribosome Binding Site*) o secuencia Shine-Dalgarno en cursiva. **B:** Comparación de las secuencias de la proteína LexA de *R. metallidurans*, *R. solanacearum* y *E. coli*. Están señalados en negrita los residuos Ala₈₄, Gly₈₅, Ser₁₁₉ y Lys₁₅₆, de la proteína LexA de *E. coli*, los cuales se mantienen muy conservados en muchas especies.

A.

CTGGCCGAACCCGTGACAAACCCGTGGGCCTCACCCACAGAACTACTCGTGTGAGCCGGCTGCGCA
AAATGTGCTTGCACCTTACCCCGATA**CTGT**TATAAAAAT**ACAG**CATA**CTGT**TAAACAT**ACAG**TGCTTCG
GCACAAGACCTGCGACCC**ATG**

B.

<i>R. metallidurans</i>	MATLTPRQQQIFDLIRDITRNTGFPPTRAEIAAEFGFSSPNSAEHLRALARKGVIELTP 60
<i>R. solanacearum</i>	MATLTTRQQQIYDLIHQTIQRTGFPPTRAEIAAEFGFSSPNSAEHLRALARKGVIELTP 60
<i>E. coli</i>	MKALTARQQEVFDLIRDHISQTMGPPTRAEIAQRLGFRSPNSAEHLKALARKGVIEIVS 60
	* :*.***:.:***: * .*:***** .:* **:*****:*****:..
<i>R. metallidurans</i>	GASRGIRLKVTRSDSERPDQFSLPMPGVLQTLPLVGRVA AG SPILAAEHIDRQYQVDAS 120
<i>R. solanacearum</i>	GASRGIRLRAEGGAS--PHQFSLPSMGLMQLTLPLVGRVA AG SPILAAEHIDRQYQVDPS 118
<i>E. coli</i>	GASRGIRLLQEEEEG-----LPLVGRVA AG EPPLAQQHIEGHYQVDPS 103
	***** : . . . :*****.*:* :*: :****.*
<i>R. metallidurans</i>	VFDERPDYLLRVRGL SM RDAGILDGDLAVKKASEAANGKVVVVARLGDDVTV KRL KKRGD 180
<i>R. solanacearum</i>	LFSSRPDFLLKVRG MS RDAGILDGDLAVQRAAEAANGKIVVARLGDDVTV KRF QRKGR 178
<i>E. coli</i>	LFKPNADFLRVSG SM KDIGIMDGDLLAVHKTQDVRNGQVVVARIDDEVTV KRL KKQGN 163
	:* . .*.***: * :***: * **:******: : . **:*****:.*:*****: : :*
<i>R. metallidurans</i>	TIELIAENPDFQNIVLHAGRDEFSLEGIAVGLIRSSGF- 218
<i>R. solanacearum</i>	QVELIAENPDFEPIHVDLDRDEFQLEGLAVGLIRPAAP- 216
<i>E. coli</i>	KVELLPENSEFKPIVVDLRQQSFTIEGLAVGVIRNGDWL 202
	:**:.**.:*: * .. :.:* :**:*****.* .

La secuencia de nucleótidos correspondiente al gen *lexA* de *R. metallidurans* está introducida, bajo el número de acceso AF330820, en el NCBI/GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>). Mediante programas informáticos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), la comparación de la secuencia deducida de dicha proteína, permitió determinar que tenía una alta similitud con un hipotético represor de la regulación de la transcripción de *R. solanacearum* (identidad del 78%), y una menor similitud con la proteína LexA de *Providencia rettgeri* (identidad del 58%), con la proteína LexA de *Erwinia carotovora* (identidad del 56%) y con la proteína LexA de *E.*

coli (identidad del 56%), entre otras. Se realizaron comparaciones de las secuencias de aminoácidos de la proteína LexA de *R. metallidurans*, *R. solanacearum* y *E. coli* utilizando un programa informático (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) (Fig. 3.4). El alineamiento permitió determinar los siguientes porcentajes de identidad entre dichas proteínas.

- LexA de *R. metallidurans* vs. LexA de *R. solanacearum*: 77%
- LexA de *R. metallidurans* vs. LexA de *E. coli*: 60%
- LexA de *R. solanacearum* vs. LexA de *E. coli*: 61%

Habiendo aislado los genes *recA* y *lexA* de *R. metallidurans* y sabiendo que los dos tienen en su región promotora una secuencia idéntica a la caja SOS de *E. coli*. (CTGT-N₈-ACAG), la siguiente pregunta que se planteó fue saber si esa teórica caja SOS era funcional o no en este microorganismo y en otros microorganismos con este tipo de caja SOS, como la propia *E. coli*. Por ello, el siguiente objetivo fue analizar su expresión en mutantes RecA(Def) y LexA(Def) de *R. metallidurans*, para lo cual se obtuvieron dichos mutantes, se construyó una fusión del promotor del gen *recA* con el gen *lacZ* y se estudió su expresión en ambos mutantes.

3.1.3. Construcción del mutante RecA(Def) de *R. metallidurans*

Para obtener el mutante RecA(Def) de *R. metallidurans*, la estrategia que se siguió fue la de clonar un fragmento interno de dicho gen en el plásmido pSUP202 e introducirlo mediante conjugación en una cepa de *R. metallidurans* resistente a rifampicina, esperando que se realice una recombinación simple y el plásmido quede integrado en el cromosoma de la cepa, interrumpiendo así el gen *recA*.

El primer paso fue amplificar, mediante PCR, un fragmento interno del gen *recA* de *R. metallidurans* de aproximadamente 300 pb, utilizando los oligonucleótidos Baint1 y Baint2. Este fragmento fue clonado en el vector pGEM-T[®], obteniéndose el plásmido pUA982. Se comprobó mediante secuenciación la presencia del fragmento, se liberó el fragmento por

restricción con *Apal* y *Sacl* y se clonó en el vector pSUP202 (Ap^r , Tc^r , Cm^r). Este plásmido fue denominado pUA983 y fue electrotransformado en la cepa MC1061, dando origen a la cepa UA6187.

Paralelamente, se obtuvo un mutante espontáneo resistente a rifampicina de *R. metallidurans*. Dicha cepa, a la que se denominó UA12000, fue conjugada con la cepa de *E. coli* UA6187, utilizando el plásmido movilizador pRK2013. Los clones recombinantes se seleccionaron por resistencia a rifampicina, ampicilina y tetraciclina. Se analizó si dichos clones contenían el gen *recA* interrumpido, estudiando su sensibilidad a la radiación ultravioleta. Se seleccionaron los clones sensibles a la radiación ultravioleta o aquellos cuyo crecimiento se veía afectado por este tratamiento, y se extrajo su DNA cromosómico para realizar un experimento de *southern blot*.

Para ello, el DNA cromosómico obtenido fue digerido con *ClaI*, enzima para la cual el plásmido pSUP202 presenta una diana única. Dicho DNA fue hibridado con un fragmento marcado con digoxigenina, que contiene íntegro el gen *recA* de *R. metallidurans* más sus regiones flanqueantes. Esta sonda fue obtenida por amplificación por PCR, utilizando los oligonucleótidos FrecA3 y BandaA2. Tal como era de esperar, se visualizaron dos bandas de hibridación en aquellos clones en los que estaba interrumpido el gen, mientras que con el DNA de la cepa salvaje se obtuvo una única banda (Fig. 3.5). Se escogió uno de dichos clones y se le denominó UA12003.

Adicionalmente, se determinó la supervivencia de dicho clon frente a diferentes dosis de radiación ultravioleta. Como se observa en la Tabla 3.1, la supervivencia de la cepa salvaje es mayor que la de la cepa mutante RecA(Def), la cual a partir de 20 J/m² es ya inviable.

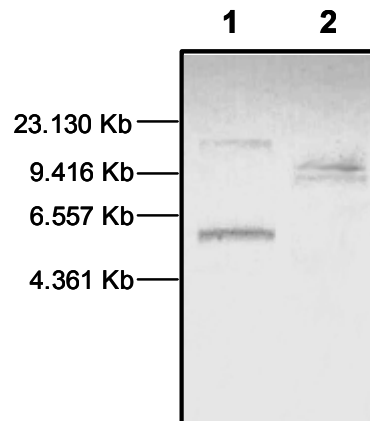


Figura 3.5. Hibridación por *southern blotting* del DNA cromosómico de la cepa salvaje de *R. metallidurans* (carril 2) y del mutante RecA(Def) (carril 1), digeridos con la enzima de restricción *ClaI*. Se utilizó como sonda de hibridación un fragmento de aproximadamente 1.7 kb que contenía el gen *recA* de *R. metallidurans*. El marcador de peso molecular fue el $\lambda \perp$ *HindIII*.

Tabla 3.1. Supervivencia de la cepa salvaje de *R. metallidurans* y de los mutantes RecA(Def) y LexA(Def) frente a la radiación ultravioleta

Dosis (J/m ²)	Supervivencia (%)		
	Salvaje	RecA(Def)	LexA(Def)
0	100	100	100
5	93.86	1.99	N D
10	55.94	0.28	49.14
20	30.71	0	20.103
40	7.086	0	3.296
60	0.602	0	0.176
80	0.018	0	0

N D: no determinado

3.1.4. Construcción del mutante LexA(Def) de *R. metallidurans*

Para la construcción del mutante LexA(Def) se siguió la siguiente estrategia. Se insertó una cassette tetraciclina (Ω Tc) en una región interna del gen *lexA* de *R. metallidurans*. Seguidamente, esta construcción se clonó en el plásmido suicida pJQ200KS y se introdujo por conjugación en la cepa de *R. metallidurans* UA12000 (Rif^r), esperando que se produjera una doble recombinación entre el gen *lexA* interrumpido con la cassette y el gen *lexA* salvaje.

Para esto se ligó la cassette de la resistencia a la tetraciclina en la diana única *EcoRI* del plásmido pUA986, que contiene el gen *lexA* de *R. metallidurans* y se electrotransformó en células competentes de *E. coli* DH5 α . Dicha cassette se obtuvo desde el plásmido pHP45 Ω Tc, tras una restricción con *SmaI*. Los clones obtenidos fueron seleccionados por resistencia a ampicilina y tetraciclina y comprobados mediante restricciones de los plásmidos con enzimas que cortan en el MCS (*Multiple Cloning Site*) del vector pGEM-T[®]. Se eligió uno de estos plásmidos y se le denominó pUA987. Dicho plásmido es de aproximadamente 3.2 kb y contiene el gen *lexA* de *R. metallidurans* interrumpido por la cassette tetraciclina (*lexA::* Ω Tc).

El siguiente paso fue introducir el fragmento del gen *lexA* con la Ω Tc en el plásmido suicida pJQ200KS. Dicho plásmido contiene el gen *sacB*, inducible por sacarosa y su expresión es letal en un amplio rango de bacterias gramnegativas, cuando crecen en un medio que contenga un 5% de sacarosa (Quandt y Hynes, 1993). Por lo tanto, los clones portadores del plásmido pJQ200KS no podrán crecer en medios con un 5% de sacarosa. El proceso que se siguió fue el siguiente. Se ligó el plásmido pJQ200KS con el fragmento deseado y se electrotransformó en células competentes de *E. coli* DH5 α . Los clones fueron seleccionados por su crecimiento en placas de LB con tetraciclina y, posteriormente, se hicieron réplicas en placas que contenían sacarosa y en otras que carecían de ella. Los clones que no crecieron en presencia de sacarosa fueron comprobados mediante

restricciones con *Hind*III y amplificación por PCR del fragmento *lexA::ΩTc*. A uno de los plásmidos recombinantes que tenía el fragmento *lexA::ΩTc*, se le denominó pUA988 y a la cepa que lo contiene UA6186.

Se introdujo el plásmido pUA988 en la cepa de *R. metallidurans* UA12000 mediante conjugación triparental desde la cepa UA6186 y con el plásmido movilizador pRK2013. Los clones obtenidos se seleccionaron por resistencia a rifampicina y tetraciclina y, posteriormente, se replicaron en placas que contenían sacarosa al 5%. En este caso se esperaba que los clones fueran capaces de crecer en presencia de sacarosa, ya que si se ha producido la doble recombinación, el plásmido pJQ200KS debe perderse. Se extrajo DNA cromosómico de los clones que habían sido capaces de crecer en presencia de sacarosa al 5% para confirmar la construcción del mutante mediante hibridación. Para esto, se digirió el DNA cromosómico de los posibles clones mutantes LexA(Def) con la enzima *Cla*I y se hibridó a baja astringencia, utilizando como sonda un fragmento del gen *lexA* de *R. metallidurans* marcado con digoxigenina. Dicho fragmento se obtuvo mediante una amplificación por PCR utilizando los oligonucleótidos LexA Rals1 y LexA Rals2. El resultado del *southern blot* fue la visualización con el DNA del mutante LexA(Def), de una banda de un tamaño superior a unas 2 kb respecto a la banda de la cepa salvaje (Fig. 3.6). Al mutante obtenido se le denominó UA12002.

Como en el caso del mutante RecA(Def), también se determinó la supervivencia de este clon frente a diferentes dosis de radiación ultravioleta. Como se observa en la Tabla 3.1, la supervivencia de la cepa salvaje fue similar a la del mutante LexA(Def).

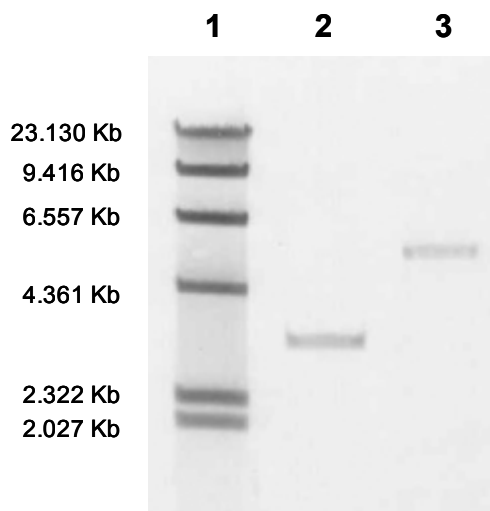


Figura 3.6. Hibridación por *southern blotting* del DNA cromosómico de la cepa salvaje de *R. metallidurans* (carril 2) y de un mutante LexA(Def) (carril 3), digeridos con la enzima de restricción *ClaI*. Se utilizó como sonda de hibridación un fragmento de aproximadamente 1.2 kb que contenía el gen *lexA* de *R. metallidurans*. El marcador de peso molecular fue el λ \perp *HindIII* (carril 1).

3.1.5. Expresión del gen *recA* de *R. metallidurans* en *E. coli* y en los mutantes RecA(Def) y LexA(Def) de *R. metallidurans*

El siguiente punto de este estudio, fue el análisis de la expresión del gen *recA* de *R. metallidurans*, en presencia y ausencia de lesiones en el DNA de la cepa MC1061 de *E. coli* y en los mutantes RecA(Def) y LexA(Def) de *R. metallidurans*. Dicha expresión se analizó, utilizando como control la cepa salvaje de este microorganismo. Para esto, se construyó una fusión del promotor del gen *recA* de *R. metallidurans* con el gen *lacZ* sin su promotor y se la introdujo en las diferentes cepas, determinando los niveles de β -galactosidasa en cultivos no tratados y tratados con mitomicina C.

El primer paso consistió en amplificar por PCR un fragmento de 557 pb que contiene parte del mencionado gen *recA* y su región promotora (-477 a +80), utilizando los oligonucleótidos FrecA3 y FrecAdw. Se clonó dicho fragmento en el vector pGEM-T[®] y se secuenció para comprobar que no hubiera ninguna mutación. Este fragmento estaba flanqueado por las dianas *EcoRI* y

*Bam*HI que habían sido añadidas a los oligonucleótidos usados. Ello permitió obtener dicho fragmento por restricción para su posterior clonación en el plásmido pUA949. Los clones obtenidos al electrotransformar células de *E. coli* DH5 α fueron seleccionados por su resistencia a ampicilina y a kanamicina. Dichos recombinantes fueron comprobados por digestión con diferentes enzimas de restricción. Posteriormente, digiriendo con las enzimas *Bam*HI y *Sall*, se obtuvo el fragmento que contenía el *recA* junto con la cassette Km del plásmido pUA949 (orientados en posición divergente). Esta nueva construcción fue introducida utilizando estas mismas dianas en el plásmido pHRP309, que es de bajo número de copias, tiene un amplio rango de huésped y contiene el gen *lacZ* sin su promotor. El producto de la ligación se transformó en la cepa de *E. coli* DH5 α y los clones fueron seleccionados en placas de LB suplementadas con kanamicina, gentamicina y X-gal, lo que permitió seleccionarlos, tanto por resistencia a antibióticos, como por la actividad β -galactosidasa. De esta manera, se obtuvo una fusión entre el gen *recA* y el gen *lacZ*, orientados en el mismo sentido, en el plásmido pHRP309. Al plásmido portador de dicha fusión se le denominó pUA985. Para poder analizar la expresión del promotor *recA* en las cepas anteriormente mencionadas, se introdujo el plásmido pUA985 a las diferentes cepas, por transformación en *E. coli* y por conjugación en las diferentes cepas de *R. metallidurans*.

En el caso de la electroporación del pUA985 a *E. coli* MC1061, los clones recombinantes se seleccionaron en placas de LB que contenían kanamicina, gentamicina y X-gal, obteniéndose la cepa UA6185.

Para introducir el plásmido en las diferentes cepas de *R. metallidurans*, primero se transformó el plásmido pUA985 en la cepa de *E. coli* S17 λ pir, que permite realizar conjugaciones biparentales sin la necesidad de utilizar un plásmido movilizador. Seguidamente y por este método, dicho plásmido fue introducido en las cepas UA12000 (Rif^r), UA12003 [RecA(Def)] y UA12002 [LexA(Def)] de *R. metallidurans*.

Los clones recombinantes se seleccionaron sembrando en placas de LB suplementadas con rifampicina, gentamicina, kanamicina y X-gal a las concentraciones adecuadas para este microorganismo (Tabla 2.3). Para el mutante RecA(Def) se añadió también la ampicilina a las placas. De esta forma se obtuvieron los transconjugantes UA12001, UA12005 y UA12004, derivados de la cepa salvaje y de los mutantes RecA(Def) y LexA(Def) de *R. metallidurans*, respectivamente.

Para analizar la expresión del gen *recA* en las diferentes cepas obtenidas, se realizaron cultivos de todas ellas en medio LB con agitación y a la temperatura óptima para cada microorganismo, hasta alcanzar la mitad de la fase exponencial. Seguidamente, cada cultivo fue dividido en dos, y a uno de ellos se le añadió mitomicina C, como agente inductor, a una concentración de 0.4 y 1.2 $\mu\text{g/ml}$ para *E. coli* y *R. metallidurans*, respectivamente. Se prosiguió la incubación en las mismas condiciones durante 2 h. Pasado dicho tiempo se determinaron las unidades de β -galactosidasa en cada caso y se calculó el factor de inducción de la expresión de dicha enzima debida al tratamiento con mitomicina C.

Los resultados obtenidos (Tabla 3.2) mostraron que hay un aumento de la expresión del *recA* de *R. metallidurans* al lesionar el DNA con mitomicina C en las cepas salvajes de ambas especies. Así, la expresión aumentó del orden de 4.8 veces en *E. coli*, mientras que dicho aumento fue sólo de 1.8 veces en la cepa salvaje de *R. metallidurans*. Como era de esperar en los mutantes RecA(Def) y LexA(Def) no se observa un aumento de la expresión, la cual se mantiene al nivel basal propio de cada cepa. Estos resultados indican que la expresión del gen *recA* de *R. metallidurans* es inducible por lesiones en el DNA y que esta inducción tiene lugar tanto en esta especie como en *E. coli*.

Tabla 3.2. Expresión del gen *recA* de *R. metallidurans* en *E. coli*, en la cepa salvaje de *R. metallidurans* y en sus mutantes LexA(Def) y RecA(Def)

Cepa	Factor de Inducción*
<i>E. coli</i> MC1061	4.8
<i>R. metallidurans</i> salvaje	1.8
<i>R. metallidurans</i> LexA(Def)	1.02
<i>R. metallidurans</i> RecA(Def)	0.99

* El factor de inducción es el cociente entre la actividad específica de β -galactosidasa de los cultivos tratados con mitomicina C y los no tratados.

3.1.6. Regulación de la expresión de diferentes genes de reparación del DNA de *R. metallidurans* por la proteína LexA

Los resultados obtenidos hasta el momento indicaron que la caja SOS que se había identificado en el promotor de los genes *recA* y *lexA* de *R. metallidurans* es funcional y además que podría ser reconocida por el propio represor LexA de *E. coli*. Según todo ello, podría pensarse que el sistema SOS de *R. metallidurans* es muy similar al de *E. coli* y por tanto que dicho sistema debe regular diferentes genes que intervienen en reparación del DNA, al igual que ocurre en *E. coli*. Dado que el genoma de *R. metallidurans* está parcialmente secuenciado y que dichas secuencias pueden consultarse en la base de datos TIGR (*The Institute for Genomic Research, DOE/JGI*) http://www.jgi.doe.gov/JGI_microbial/html/ralstonia/ralston_homepage.html, se buscaron secuencias que presentaran similitud con las de algunos genes que forman parte de la red SOS de *E. coli* (Fernández de Henestrosa *et al.*, 2000). En esta búsqueda también se incluyó el genoma de *R. solanacearum*, el cual está secuenciado completamente y puede consultarse en la base de datos TIGR (*The Institute for Genomic Research, Genoscope*) http://www.genoscope.cns.fr/externe/English/Projets/Projet_Y/Y.html). El objetivo de esta búsqueda era seleccionar algunos genes, que pudieran formar parte de la red SOS de *R. metallidurans*, para estudiar si estaban regulados por el represor LexA de *R. metallidurans* y analizar su expresión al lesionar el DNA.

El resultado de esta búsqueda fue localizar en el genoma de *R. metallidurans* las secuencias de una hipotética proteína de la familia ImpB/SamB/MucB, y unas hipotéticas proteínas RuvAB, UvrA y DinG, que se correspondían, respectivamente, con las proteínas DinP, RuvAB, UvrA1 y *Probable ATP-dependent DNA helicase related protein* de *R. solanacearum*.

En la Tabla 3.3 se muestran los *contigs* y las regiones que codifican dichas proteínas, además de las ya conocidas LexA y RecA, tanto en el genoma parcialmente secuenciado de *R. metallidurans*, como en el genoma completo de *R. solanacearum*.

Tabla 3.3. *Contigs* y regiones codificantes de las proteínas RecA y LexA y de otras hipotéticas proteínas de la red SOS de *R. metallidurans* y *R. solanacearum*

<i>R. metallidurans</i>			<i>R. solanacearum</i>	
Proteína	Contig	Región Codificante ¹	Proteína	Región Codificante ²
RecA	677	15416 - 16477	RecA	596177 - 597235
LexA	653	12 719 - 12063	LexA	1391833 - 1391233
Familia ImpB/ SamB/MucB ³	710	8889 - 7882	DinP	1702478 - 1703566
RuvAB ³	509	8597 - 8016 6879 - 7946	RuvAB	535969 - 535388 535324 - 534257
UvrA ³	669	23 809 - 20 957	UvrA1	449166 - 446302
DinG ³	668	6390 - 8762	<i>Probable ATP- dependent DNA helicase related protein</i> ⁴	1745815 - 1747956

¹ Posición según el *contig* donde se encuentra el gen.

² Posición con respecto a la secuencia completa de *R. solanacearum*.

³ Hipotéticas proteínas de *R. metallidurans*.

⁴ Hipotética proteína de *R. solanacearum*.

Se analizaron las regiones promotoras de todos estos genes y se observó que, a parte de *recA* y *lexA* en las dos especies de *Ralstonia*, solamente el hipotético gen de la familia *impB/samB/mucB* de *R. metallidurans*, presentaba la secuencia CTGT-N₈-ACAG en la posición -74 con respecto a su inicio de la traducción. En los otros tres genes de *R. metallidurans* no se localizó ningún tipo de secuencia palindrómica como la que se esperaba, ni tampoco en los de *R. solanacearum*. Ello sugería que la red SOS del género *Ralstonia*, y específicamente de *R. metallidurans*, podía ser diferente a la de *E. coli*.

3.1.6.1. Unión de la proteína LexA de *E. coli* a diferentes genes de *R. metallidurans* que codifican proteínas de reparación del DNA

Para averiguar si la red SOS de *R. metallidurans* era diferente a la de *E. coli*, se realizaron ensayos de movilidad electroforética con el objetivo de conocer si la proteína LexA era capaz de unirse a la región promotora de los genes descritos en el apartado anterior. Dado que se disponía de un extracto de la proteína LexA de *E. coli* [Extracto purificado al 95%, según el método descrito por Little y colaboradores (1994) y gentilmente proporcionado por el Dr. Roger Woodgate (*National Institute of Child Health and Human Development, National Institute of Health*)] y que la probable caja SOS de los genes *lexA* y *recA* de *R. metallidurans* es igual a la de *E. coli*, se optó por utilizar la proteína LexA de *E. coli* frente al gen *lexA* de *R. metallidurans* en ensayos EMSA. Los resultados obtenidos mostraron que el represor LexA de *E. coli* se une específicamente al gen *lexA* de *R. metallidurans*. En atención a estos datos, los ensayos de EMSA con todos los genes elegidos se realizaron con la proteína LexA de *E. coli*.

A partir de las secuencias de los diferentes genes, se diseñaron oligonucleótidos para amplificar fragmentos de entre 200 y 300 pb que incluyeran la región promotora y parte de la región codificante de cada uno de ellos. Utilizando los oligonucleótidos indicados en la Tabla 2.2 se amplificaron los diferentes fragmentos y se clonaron en el vector pGEM-T[®], obteniéndose los plásmidos pUA989, pUA990, pUA991, pUA992, pUA993 y pUA994 que contenían, respectivamente, las regiones promotoras de los genes *lexA* (posiciones -240 a +38 respecto al inicio de traducción del gen), *recA* (-193 a +80) y de los hipotéticos genes de la familia *impB/samB/mucB* (-222 a +39), *uvrA* (-224 a +43), *ruvAB* (-194 a +34) y *dinG* (-216 a +43). Los fragmentos clonados en los mencionados plásmidos fueron secuenciados por el método dideoxi (Sanger *et al.*, 1977), utilizando los oligonucleótidos Direct-Cy5 y Reverse Cy5 en el *ALF Sequencer* (Amersham Pharmacia Biotech), para confirmar que no había cambios en las secuencias.

Posteriormente, se amplificaron dichos fragmentos utilizando uno de los oligonucleótidos propios del gen y los oligonucleótidos directo o inverso universal del vector pGEM-T[®], marcados con digoxigenina en su extremo 5' (Dir-dig o Rev-dig), y se purificaron a partir de geles de agarosa (2%).

Una vez conseguidos todos los fragmentos marcados, se realizaron las mezclas de reacción proteína-DNA, como se han descrito en la sección de Materiales y Métodos, utilizando en cada caso, 20 ng de fragmento de DNA marcado y 90 ng de proteína LexA de *E. coli* purificada. Los resultados obtenidos mostraron una clara banda de retraso en los ensayos con el DNA de los genes *lexA*, *recA* y el hipotético gen de la familia *impB/samB/mucB*. Por el contrario, con el DNA de los hipotéticos genes *uvrA*, *ruvAB* y *dinG*, no se observó ningún cambio de movilidad (Fig. 3.7).

<i>recA</i>	CTGTTTTTTTATACA G ----153pb----ATG
<i>lexA(a)</i>	CTGTATAAATCACA G ----45pb----ATG
<i>lexA(b)</i>	CTGTTTAAACATACA G ----25pb----ATG
<i>impB/samB/mucB</i>	CTGTACGTTTATACA G ----58pb----ATG

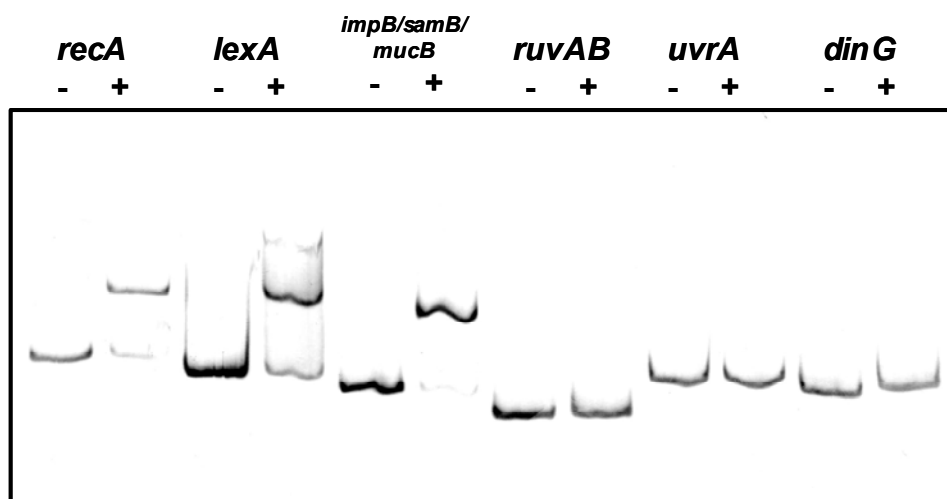


Figura 3.7. Movilidad electroforética de los fragmentos de DNA que contienen la región promotora de los genes *recA* y *lexA* y de los hipotéticos genes de la familia *impB/samB/mucB*, *ruvAB*, *uvrA* y *dinG* de *R. metallidurans* en ausencia (-) y presencia (+) de la proteína purificada LexA de *E. coli*. Se indican las secuencias de la región del palíndromo CTGT-N₈-ACAG y la distancia al codón de inicio de traducción de cada fragmento que presenta banda de retraso electroforético.

3.1.6.2. Expresión de algunos genes de reparación del DNA de *R. metallidurans* en la cepa salvaje y en el mutante LexA(Def)

Los resultados presentados en el apartado anterior están de acuerdo con el hecho de que en las secuencias promotoras de los hipotéticos genes *uvrA*, *ruvAB* y *dinG* no se hubiera encontrado la secuencia palindrómica CTGT-N₈-ACAG. Además, también sugieren que la red SOS de *R. metallidurans* no debe ser igual a la de *E. coli*. Por ello, el siguiente paso fue analizar el nivel de expresión de todos estos genes en la cepa salvaje de *R. metallidurans* y en el mutante LexA(Def) en respuesta al daño al DNA.

En primer lugar, se obtuvo RNA total de la cepa salvaje y del mutante LexA(Def) de *R. metallidurans* tanto de cultivos tratados como no tratados con mitomicina C, durante 2 horas a 30°C a una concentración de 1.2 µg/ml. Las extracciones de RNA se realizaron con el sistema de *QUIAGEN*, *RNeasy®MiniKit*, obteniéndose un rendimiento de entre 1.2 y 3.5 µg/µl, al cuantificarlo espectrofotométricamente. Se realizó un tratamiento con DNasa (Roche Diagnostics S.L.) para no tener ningún tipo de contaminación de DNA en las muestras, lo cual se comprobó por PCR, utilizando como molde el RNA extraído.

La cuantificación de la expresión se realizó mediante experimentos de RT-PCR, utilizando el sistema *LightCycler–RNA Master SYBR Green I* de Roche Diagnostics S.L. en el equipo *LightCycler Instrument* (Roche Diagnostics S.L.), que permite una amplificación a tiempo real de cada gen y una posterior cuantificación del producto amplificado, mediante el software del equipo. Las condiciones de la RT-PCR fueron las descritas en el punto 2.6.3.

Se diseñaron los oligonucleótidos adecuados para amplificar las regiones internas de los diferentes genes, mediante la ayuda del programa informático DNASTAR (PrimerSelect). Los oligonucleótidos debían amplificar un fragmento de entre 200 y 300 pb, dentro de la región codificante del gen, tener temperaturas de anillamiento similares en todos los casos y no formar dímeros de oligonucleótido entre sí. Para realizar la curva patrón que permite

la cuantificación, se utilizó el hipotético gen *hisS* de *R. metallidurans*, dado que su expresión no se ve afectada por lesiones en el DNA. En la Tabla 2.2 se han indicado los oligonucleótidos escogidos y cada par de oligonucleótidos (up y rv) amplifica la región escogida de los genes *recA*, *lexA* y de los hipotéticos genes *impB/samB/mucB*, *ruvAB*, *uvrA*, *dinG* y *hisS*.

Los datos obtenidos se presentan en la Tabla 3.4, en la que puede observarse un alto nivel de inducción de los genes *recA* y *lexA* en la cepa salvaje en respuesta al tratamiento con mitomicina C. Asimismo, los restantes genes estudiados también se inducen tras dicho tratamiento, si bien el nivel de inducción es menor. Como era esperable, en la cepa LexA(Def), el gen *recA* no se indujo, ni tampoco el hipotético gen de la familia *impB/samB/mucB*. Por el contrario, los hipotéticos genes *uvrA* y *dinG* se indujeron en dicho mutante, tras el tratamiento con mitomicina C. Asimismo, no se obtuvo producto de amplificación del gen *lexA* en el mutante LexA(Def) ya que dicho mutante tiene insertada la cassette tetraciclina en este gen.

Tabla 3.4. Expresión de genes de reparación de *R. metallidurans*

Gen	Salvaje			LexA(Def)		
	- Mit C ¹	+ Mit C ¹	F.I.	- Mit C ¹	+ Mit C ¹	F.I.
<i>lexA</i>	8.4	144.3	17.2	N.D.	N.D.	N.D.
<i>recA</i>	8.4	249.5	29.6	35.18	32.02	0.91
<i>impB/samB/mucB</i> ²	0.31	1.58	5.04	3.91	2.94	0.75
<i>uvrA</i> ²	4.9	25	5.1	0.55	1.83	3.31
<i>dinG</i> ²	4.7	11.6	2.5	0.27	0.76	2.83
<i>ruvAB</i> ²	3.6	9.7	2.7	N.D.	N.D.	N.D.
<i>hisS</i> ²	1	1	1	1	1	1

F.I.: Factor de inducción

N.D.: No detectado

¹Valor obtenido en unidades arbitrarias respecto a la curva patrón realizada con el gen *hisS*.

²Hipotéticos genes de *R. metallidurans*

Por otra parte, es de señalar que no fue posible obtener un producto de amplificación del hipotético gen *ruvAB* que fuera cuantificable en el mutante LexA(Def), en los diferentes ensayos que se realizaron. Ello podría sugerir que en dicho mutante el nivel de expresión de este gen es extraordinariamente bajo.

3.1.6.3. Unión al gen *lexA* y al hipotético gen *uvrA* de extractos crudos de proteínas de la cepa salvaje y del mutante LexA(Def) de *R. metallidurans*

Los resultados obtenidos hasta el momento, claramente indicaban que los genes *recA*, *lexA* y el hipotético gen de la familia *impB/samB/mucB* de *R. metallidurans* son inducibles por lesiones en el DNA y regulables por el represor LexA. Por el contrario, los hipotéticos genes *uvrA* y *dinG*, si bien son inducibles por lesiones en el DNA, no parecen estar regulados por la proteína LexA. Para corroborar estos datos, se decidió estudiar la unión del promotor del hipotético gen *uvrA* a extractos crudos de proteínas, obtenidos de la cepa salvaje y del mutante LexA(Def) de la propia *R. metallidurans*, incluyendo también el promotor del gen *lexA* como control. Para ello, se realizaron ensayos EMSA, introduciendo los controles adecuados que permitieran determinar la especificidad de la unión.

Se prepararon extractos crudos de proteínas de la cepa salvaje y del mutante LexA(Def) de *R. metallidurans* y, previo a la realización de los ensayos con los diferentes fragmentos, se determinó la concentración óptima de proteína que debía utilizarse. Para ello, se utilizaron diferentes diluciones de los extractos de proteínas frente a los fragmentos de DNA marcados de los genes *lexA* y *uvrA* y se determinó que la dilución a la que se visualizaba más claramente la unión extracto de proteína-DNA era 1:4.

En estas condiciones de ensayo se realizaron los experimentos EMSA y, como puede observarse en la Fig. 3.8, el extracto crudo de la cepa salvaje de *R. metallidurans* produce un claro retraso de la movilidad electroforética del fragmento de DNA del gen *lexA* (carril 2). Por el contrario, esto no ocurre

cuando el extracto proteico procede del mutante LexA(Def) (carril 6). Estos datos indican que la proteína LexA de *R. metallidurans* se une a la región promotora del gen *lexA*. Asimismo, se demostró que la unión es específica, al incorporar a los ensayos realizados con el extracto crudo de la cepa salvaje de *R. metallidurans* competidores 100 veces concentrados. Así, en el carril 3 se observa que al utilizar como competidor inespecífico DNA del plásmido pBSK se mantiene el retraso, mientras que al utilizar un competidor

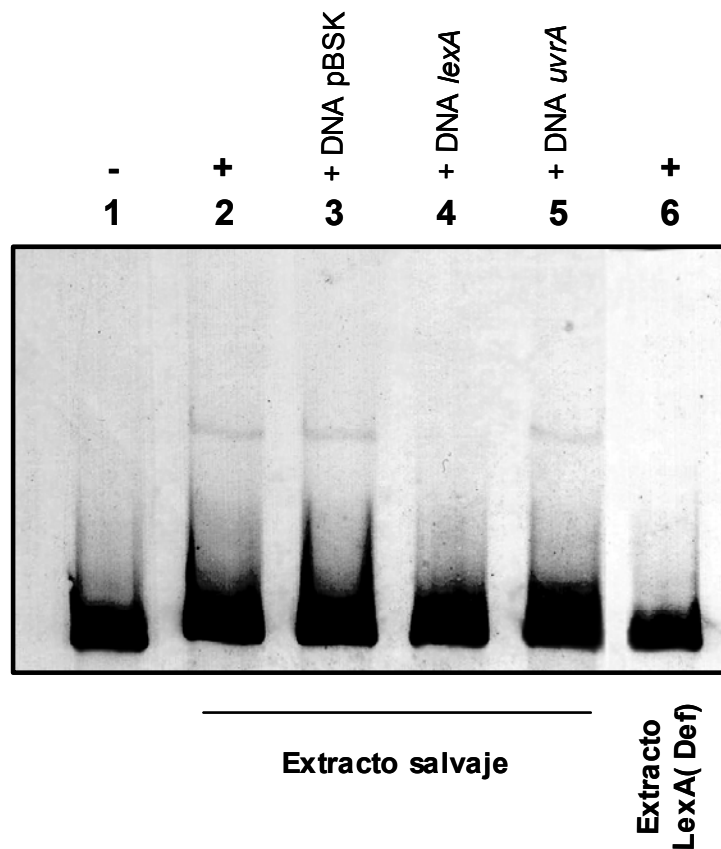


Figura 3.8. Movilidad electroforética del fragmento de DNA que contiene la región promotora del gen *lexA* de *R. metallidurans* en ausencia (carril 1) y presencia (carriles 2-5) de extracto crudo de proteína de la cepa salvaje de *R. metallidurans* y en presencia de extracto crudo del mutante LexA(Def) (carril 6). En los carriles 2, 3, 4 y 5, respectivamente, se visualizan las pruebas realizadas sólo con extracto crudo y con la adición de competidor inespecífico (DNA plasmídico de pBSK, x100), competidor específico (fragmento sin marcar de DNA del promotor del gen *lexA*, x100) y un fragmento sin marcar de DNA del promotor del hipotético gen *uvrA*, x100).

específico, como el mismo fragmento *lexA* de *R. metallidurans* no marcado (carril 4), la banda de retraso se pierde. Adicionalmente se utilizó como competidor un fragmento no marcado del promotor del gen *uvrA* de *R. metallidurans* (carril 5). Como puede observarse este fragmento no altera la unión del gen *lexA* al extracto, lo cual es una evidencia más de que el gen *uvrA* debe estar regulado por un sistema independiente al de LexA.

En la Fig. 3.9 se presentan los resultados obtenidos al realizar el ensayo con el fragmento de DNA del hipotético gen *uvrA*. Se observa un similar comportamiento del DNA frente a los extractos crudos de proteína de la cepa salvaje y del mutante LexA(Def). Así, en ambos casos, se produce un claro retraso en la movilidad electroforética del fragmento de DNA del hipotético gen *uvrA* (carriles 2 y 6), de lo que se puede deducir que existe algún otro tipo de control, diferente a la proteína LexA, para este gen. Se comprobó también la especificidad de la unión proteína-DNA, utilizando como competidor inespecífico DNA del plásmido pBSK, 100 veces concentrado, (carriles 3 y 7). En este caso el retraso electroforético se mantiene, mientras que al utilizar como competidor específico, el mismo fragmento del hipotético gen *uvrA* de *R. metallidurans* no marcado 100 veces concentrado (carriles 4 y 8), desaparece casi totalmente la banda de retraso.

Los datos de los ensayos EMSA y de expresión génica indican claramente que el hipotético gen *uvrA* debe estar regulado por algún tipo de control alternativo al de la proteína LexA en respuesta a lesiones en el DNA.

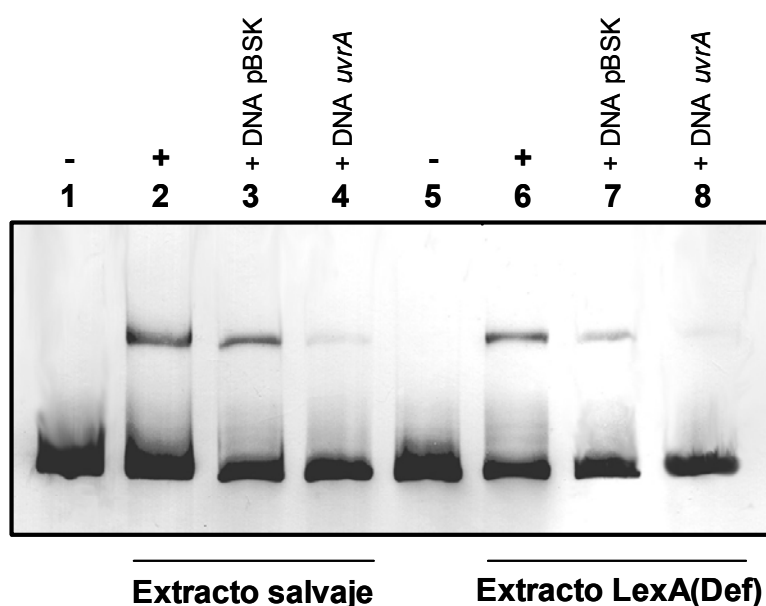


Figura 3.9. Movilidad electroforética del fragmento de DNA que contiene la región promotora del hipotético gen *uvrA* de *R. metallidurans* en ausencia (carril 1) y presencia (carriles 2-4) de extracto crudo de proteína de la cepa salvaje de *R. metallidurans*. En los carriles 2, 3 y 4, respectivamente, se visualizan las pruebas realizadas solo con extracto crudo, con la adición de competidor inespecífico (DNA plasmídico de pBSK, x100) y de competidor específico (fragmento sin marcar de DNA del promotor del hipotético gen *uvrA*, x100) y, en ausencia (carril 5) o presencia (carriles 6-8) del extracto de proteína crudo del mutante LexA(Def). En los carriles 6, 7 y 8, respectivamente, se visualizan las pruebas realizadas con extracto crudo y con la adición de competidor inespecífico (DNA plasmídico de pBSK, x100) y de competidor específico (fragmento sin marcar de DNA del promotor del hipotético gen *uvrA*, x100).

3.2. Identificación de la caja SOS de *D. radiodurans*

El principal objetivo de esta parte del trabajo ha sido la identificación y caracterización de la caja SOS de *D. radiodurans* implicada en la regulación de este sistema de reparación. Para ello, el primer paso fue la clonación y secuenciación del gen *recA*. Luego se procedió a la identificación y caracterización de la mencionada región reguladora, mediante ensayos EMSA y mutagénesis dirigida, utilizando un extracto proteico de dicho microorganismo con la proteína LexA sobreexpresada.

3.2.1. Clonación y secuenciación del gen *lexA* de *D. radiodurans*

Para poder clonar y secuenciar el gen *lexA* de *D. radiodurans* se partió del hecho de que la secuencia de este gen se encuentra en la base de datos del NCBI-GenBank en la dirección:

http://www.ncbi.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=nucleotide&list_uids=2257473&dopt=GenBank

A partir de la secuencia obtenida se diseñaron oligonucleótidos para amplificar un fragmento de unos 1200 pb que contenía el gen *lexA* con sus regiones flanqueantes (oligonucleótidos LexA Dei1 y LexA Dei2). El fragmento obtenido fue recuperado y clonado en el vector pGEM-T[®], dando origen al plásmido pUA996. Éste fue secuenciado para comprobar que no tuviera ningún tipo de mutación, mediante el método dideoxi (Sanger *et al.*, 1977), utilizando los oligonucleótidos Direct-Cy5 y Reverse Cy5 en el *ALF Sequencer* (Amersham Pharmacia Biotech).

En la Fig. 3.10 se muestra la organización génica de la región que contiene el gen *lexA*, según la secuencia encontrada en el GenBank del NCBI. Dado que el gen *lexA* está muy cerca al orf 144c, se creyó conveniente determinar que ambos no forman una única unidad transcripcional. Para ello, se utilizaron los oligonucleótidos señalados en la Fig. 3.10, cuyas secuencias y características se indican en la Tabla 2.2, para amplificar por RT-PCR. Los oligonucleótidos LexA Dei7 y LexA Dei6 amplifican un fragmento dentro de la región codificante del gen *lexA* (+1 a +105). En cambio, con los oligonucleótidos LexA Dei7 y LexA Dei4 se amplificaría un fragmento que incluiría parte de la región codificante de *lexA* y parte del gen anterior, lo cual únicamente sería posible si ambos genes formaran una unidad transcripcional.

Se realizó una extracción de RNA de *D. radiodurans*, utilizando el sistema de QUIAGEN, *RNeasy[®] MiniKit* y se trató con DNasa (Roche Diagnostics S.L.) para evitar cualquier tipo de contaminación de DNA en las muestras. Se

comprobó que no hubiera contaminación con DNA, mediante PCR, con los oligonucleótidos elegidos y utilizando como molde el RNA obtenido. Los resultados obtenidos se presentan en la Fig. 3.10, en la que se observa que solamente se obtiene un producto de amplificación cuando se utilizan los oligonucleótidos de la región codificante del gen *lexA*, por lo que se puede deducir que su promotor debe estar en la región inmediatamente anterior al gen *lexA* y que éste no está formando un operón con otros genes anteriores.

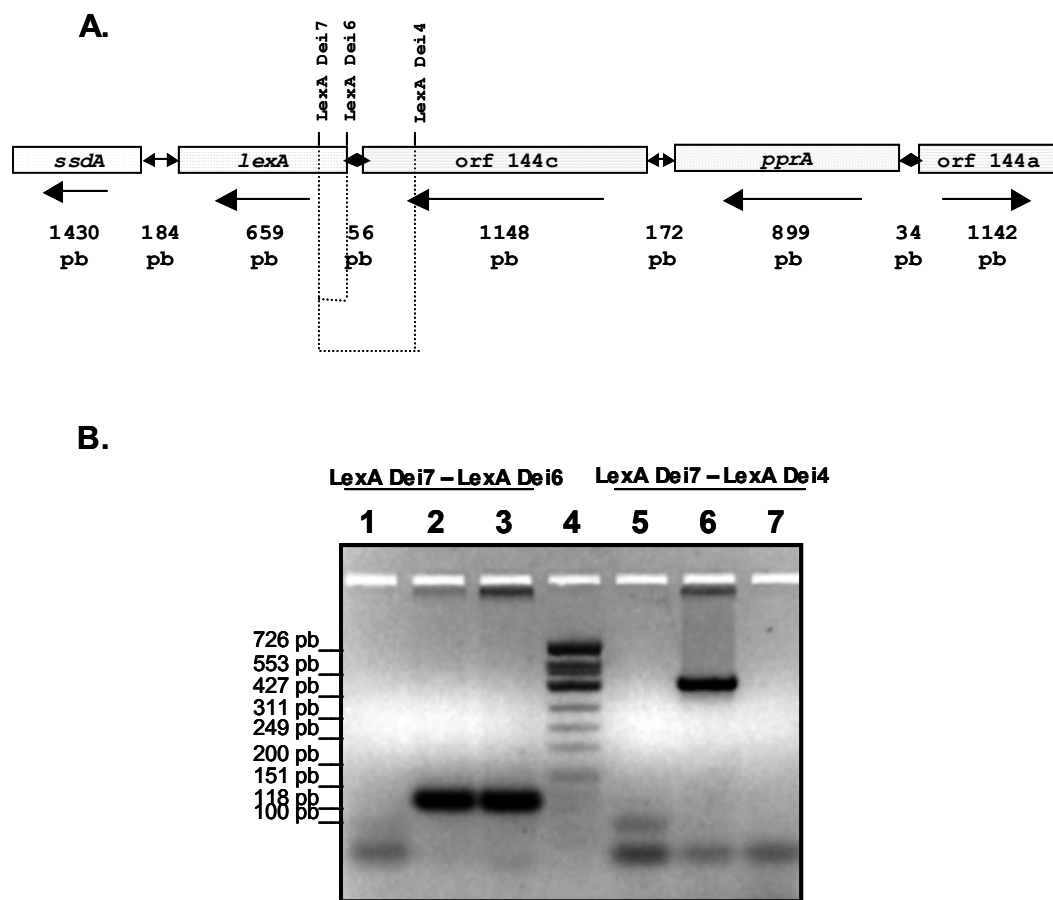


Figura 3.10. A: Diagrama que muestra el gen *lexA* de *D. radiodurans* y sus genes flanqueantes. Se indican los oligonucleótidos LexA Dei7, LexA Dei6 y LexA Dei4 que fueron utilizados para amplificar un fragmento interno de dicho gen (LexA Dei7, LexA Dei6) y un fragmento de este gen y parte del anterior (LexA Dei7, LexA Dei4). Las flechas señalan la orientación de cada uno de los genes y las flechas dobles las regiones intergénicas. **B:** Amplificación por RT-PCR de los fragmentos LexA Dei7 - LexA Dei6 y LexA Dei7 - LexA Dei4 (carriles 3 y 7, respectivamente) del gen *lexA* de *D. radiodurans*. En ambos casos se realizó un control negativo sin molde (carriles 1 y 5), y un control positivo utilizando como molde DNA cromosómico de *D. radiodurans* (carriles 2 y 6). Se utilizó como marcador de peso molecular el $\phi 174 \perp$ *HinfI* (carril 4).

3.2.2. Unión al gen *lexA* de un extracto proteico que contiene la proteína LexA sobreexpresada de *D. radiodurans*

El siguiente propósito del trabajo fue estudiar el gen *lexA* de este microorganismo e intentar localizar en su región promotora algún motivo de unión de la proteína LexA. Dado que para la realización de este tipo de trabajo se requiere gran cantidad de proteína LexA, se procedió a su sobreexpresión, utilizando el vector de expresión pET22b(+) (Novagen). Se amplificó por PCR el fragmento +1 a +777 del gen *lexA* de *D. radiodurans*, con los oligonucleótidos LexA Dei2 y LexA Dei6. El oligonucleótido LexA Dei6 tenía la diana de restricción *NdeI* (CATATG) que coincide con el inicio de la región codificante del gen (ATG). Este fragmento fue clonado en el vector pGEM-T[®] y se secuenció para comprobar que no tuviera ningún tipo de mutación mediante el método dideoxi (Sanger *et al.*, 1977), utilizando los oligonucleótidos Direct-Cy5 y Reverse-Cy5 en el *ALF Sequencer* (Amersham Pharmacia Biotech). Este plásmido fue denominado pUA997.

Seguidamente, se liberó el fragmento que contenía el gen *lexA*, utilizando las enzimas de restricción *NdeI* (del oligonucleótido) y *NotI* (del MCS del vector pGEM-T[®]) y se ligó con el vector de expresión pET22b(+), digerido con las mismas enzimas, de manera que se generaban extremos cohesivos. El producto de la ligación se electrotransformó en células competentes de *E. coli* DH5 α y los clones recombinantes se seleccionaron en placas de LB suplementadas con ampicilina y X-gal. Se comprobó que tenían el fragmento, mediante restricción con las enzimas *NdeI* y *NotI*. El plásmido pET22b(+) que contiene el fragmento *NdeI-NotI* del gen *lexA* de *D. radiodurans* fue denominado pUA998. Se secuenció el mencionado fragmento, utilizando el oligonucleótido T7prom-Cy5, confirmándose que la secuencia era la correcta. El plásmido pUA998 fue transformado en células competentes de *E. coli* BL21(DE3) y se seleccionaron los clones capaces de crecer en placas de LB suplementadas con ampicilina y X-gal, obteniéndose la cepa UA6188, que fue utilizada para sobreexpresar la proteína LexA.

Se realizó primero una prueba de sobreexpresión a pequeña escala en 10 ml de cultivo y posteriormente un escalado hasta 1 l, con el objetivo de obtener una mayor cantidad de proteína. Seguidamente, se extrajo la proteína sobreexpresada mediante el protocolo de sonicación. La proteína sobreexpresada se visualizó mediante electroforesis de proteínas en un minigel desnaturizante de SDS-poliacrilamida al 15%, previa desnaturización de las muestras, observándose una banda intensa de entre 20 y 30 kDa, lo cual se corresponde con el tamaño de la proteína LexA.

Una vez obtenido el extracto proteico que contenía la proteína LexA sobreexpresada, el siguiente paso fue realizar ensayos de movilidad electroforética (EMSA) para detectar si se producía la unión de esta proteína al gen *lexA*. En primer lugar, se determinó la concentración óptima del extracto de proteína. Para esto se realizó un ensayo preliminar utilizando diferentes diluciones del extracto de proteínas (1:2, 1:4, 1:8, 1:40, 1:400, 1:800 y 1:1600) y un fragmento de la región promotora del gen *lexA* de 532 pb (LexA1), obtenido por amplificación utilizando los oligonucleótidos LexA Dei1 y otro marcado en su extremo 5' con digoxigenina, denominado Dig LexA Dei, situado en la posición +105 con respecto al inicio de traducción del gen *lexA*.

Los resultados obtenidos mostraron que a partir de la dilución 1:40 se apreciaba claramente una banda de retraso con respecto al control negativo. Esa banda se seguía observando en las siguientes diluciones. Por ello, se escogió como concentración de trabajo la dilución 1:1600 del extracto proteico, lo que evitaría uniones inespecíficas con otras proteínas. En este estudio preliminar ya se pudo apreciar que había una unión entre la proteína LexA y la región promotora del gen *lexA*. El siguiente punto fue determinar si esta unión era específica, para lo cual se utilizaron en el ensayo, competidores 100 veces concentrados. En el carril 2 de la Fig. 3.11, puede observarse claramente la banda de retraso correspondiente a la unión de la

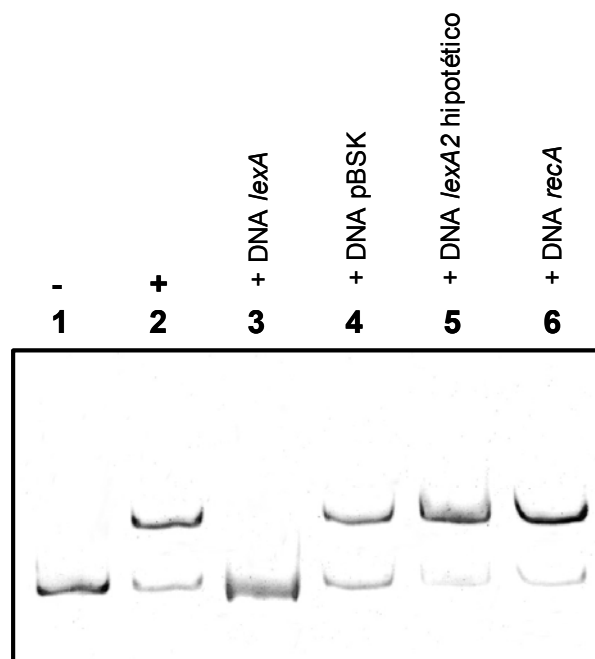


Figura 3.11. Movilidad electroforética del fragmento LexA1 de 523 pb, que contiene la región promotora del gen *lexA* de *D. radiodurans* en ausencia (carril 1) y presencia (carriles 2-6) del extracto proteico de *D. radiodurans*. En los carriles 2, 3, 4, 5 y 6, respectivamente, se visualizan las pruebas realizadas sólo con extracto de la proteína LexA sobreexpresada y con la adición de competidor inespecífico (DNA plasmídico de pBSK, x100), competidor específico (fragmento sin marcar de DNA LexA1, x100) y otros competidores (fragmento sin marcar de DNA del hipotético gen *lexA2* de *D. radiodurans*, x100) y fragmento sin marcar de DNA del promotor del gen *recA* de *D. radiodurans*, x100).

proteína LexA con la región promotora del gen *lexA*. Asimismo, en dicha figura se aprecia como al incorporar un competidor no específico (carril 4: DNA del plásmido pBSK) se mantiene la banda de retraso, mientras que al añadir un competidor específico (carril 3: el mismo fragmento sin marcar del gen *lexA* de *D. radiodurans*), la banda de retraso electroforético desaparece. Adicionalmente, se utilizaron como competidores fragmentos de dos genes que podían estar relacionados con el sistema de regulación de LexA en este microorganismo, *recA* y *lexA2*. El gen *recA* codifica la proteína RecA presente en *D. radiodurans* al igual que en la mayoría de especies, mientras que el gen *lexA2* ha sido descrito como un hipotético gen que codifica la proteína LexA2, que tiene una estructura similar a LexA y podría tener funciones parecidas a esta. Las secuencias de estos genes y de sus

regiones promotoras se encuentran en la base de datos del NCBI-GenBank en las direcciones:

http://www.ncbi.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=nucleotide&list_uids=2251086&dopt=GenBank

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=protein&list_uids=6460658&dopt=GenPept

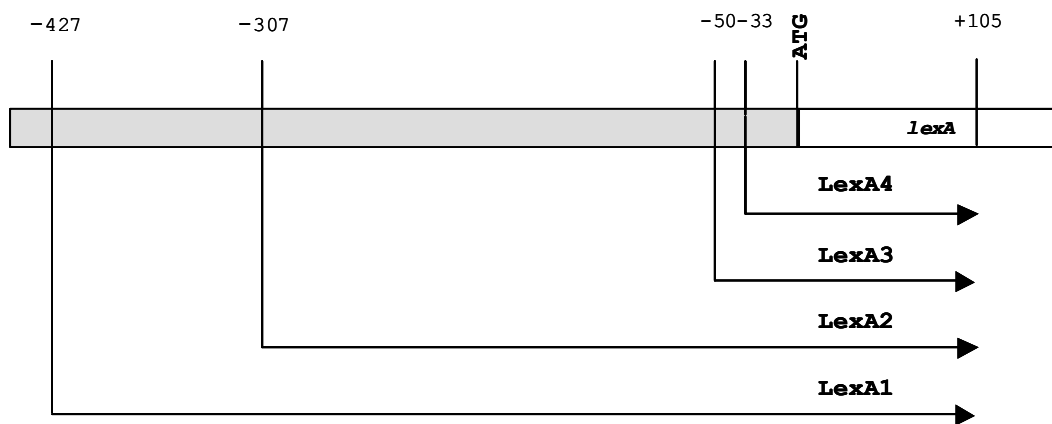
Para poder realizar los ensayos de movilidad electroforética, anteriormente comentados, se obtuvieron mediante PCR un fragmento de 785 pb que contiene el promotor y parte del gen *recA* (oligonucleótidos RecA Dei3 y RecA Dei2) de *D. radiodurans* y un fragmento de 1 kb que incluye el promotor y el hipotético gen *lexA2* (oligonucleótidos LexA2 Dei5 y LexA2 Dei6) de *D. radiodurans*. En la Fig. 3.11 se puede observar que al utilizar estos competidores, 100 veces concentrados, la banda de retraso se mantiene, tanto con el fragmento de *recA* (carril 6) como con el fragmento de *lexA2* (carril 5). Con esto se comprobó que el retraso que se observa es debido a una unión específica entre la región promotora del gen *lexA* y la proteína LexA de *D. radiodurans* y, además, que tanto en el caso del hipotético gen *lexA2* como en el del *recA*, no hay ningún tipo de unión con dicha proteína, por lo que se puede decir que ambos genes no estarían regulados del mismo modo que el gen *lexA*.

3.2.3. Determinación de la caja SOS de *D. radiodurans* mediante mutagénesis dirigida de la región promotora del gen *lexA*

Una vez demostrado que existe una unión específica entre la proteína LexA y la región -427 y +105 del gen *lexA* (fragmento LexA1), se procedió a su acotamiento, para determinar en qué lugar exactamente se realiza dicha unión. Para conseguir este objetivo se amplificaron por PCR los fragmentos LexA2, LexA3 y LexA4, que se indican en la Fig. 3.12. Dichos fragmentos se obtuvieron utilizando el oligonucleótido Dig LexA Dei marcado con

digoxigenina y los oligonucleótidos LexA Dei4, LexA Dei10 y LexA Dei5, con lo que se obtuvieron fragmentos de 412, 155 y 138 pb, respectivamente.

A.



B.

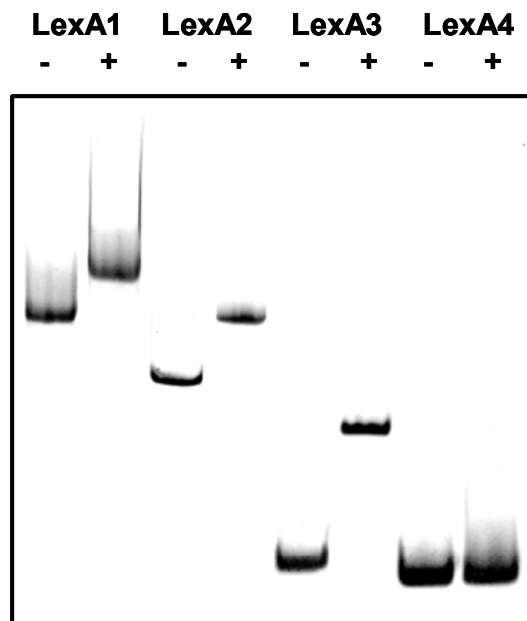


Figura 3.12. A: Diagrama representativo de los fragmentos amplificados del promotor del gen *lexA* de *D. radiodurans*, usados en ensayos EMSA. Los fragmentos LexA1, LexA2, LexA3 y LexA4 fueron generados por amplificación por PCR. Las posiciones señaladas son con respecto al inicio de traducción del gen. **B.** Movilidad electroforética de los fragmentos LexA1, LexA2, LexA3 y LexA4 en ausencia (-) y presencia (+) del extracto de proteínas de *D. radiodurans*.

Los resultados obtenidos al realizar ensayos EMSA utilizando dichos fragmentos frente al extracto de proteínas se visualizan en la Fig. 3.12. En ella se aprecia que la banda de retraso electroforético se mantiene al utilizar los fragmentos de DNA LexA1, LexA2 y LexA3, mientras que ya no se observa unión con el fragmento LexA4. Estos resultados indican que la región en la que se produce la unión específica entre la proteína LexA y el promotor del gen *lexA* de *D. radiodurans*, está comprendida entre el nucleótido -50 y el inicio de traducción del gen.

Partiendo de estos datos, se realizó un análisis buscando un hipotético motivo de unión (repeticiones inversas o directas) en la región comprendida entre las posiciones -50 y el codón ATG, inicio de la traducción del gen. Se encontró un motivo palindrómico CTTG-N₈-CAAG en la posición -38. Para intentar demostrar si realmente este motivo podría corresponder a una posible caja SOS, se diseñaron oligonucleótidos para introducir mutaciones y analizar su efecto en la unión entre esta región mutada y la proteína LexA. Se estableció que las mutaciones serían las siguientes: A→G, C→T, G→T y T→G, evitando así, que cada base fuera substituida por su complementaria.

En el fragmento LexA3 se cambiaron todos los nucleótidos del submotivo izquierdo en la posición -38 (CTTG por TGGT), utilizando los oligonucleótidos LexA Dei26 y Dig LexA Dei. Igualmente se cambiaron todos los nucleótidos del motivo derecho de este fragmento en la posición -26 (CAAG por TGGT), utilizando los oligonucleótidos LexA Dei15 y Dig LexA Dei. Asimismo se insertaron 4 timinas en la posición -27, flanqueando el brazo derecho del motivo propuesto, utilizando los oligonucleótidos LexA Dei14 y Dig LexA Dei. Con todos estos fragmentos, obtenidos por PCR, se realizaron ensayos EMSA y tal como puede verse en la Fig. 3.13, en todos los casos, se observó la pérdida de unión proteína-DNA.

Teniendo en cuenta estos resultados, se continuó con la caracterización de esta región y la determinación de la importancia de cada una de las bases del motivo en la unión a la proteína LexA. Para ello, se obtuvieron, por PCR, fragmentos de DNA que contenían mutaciones puntuales en cada uno de los

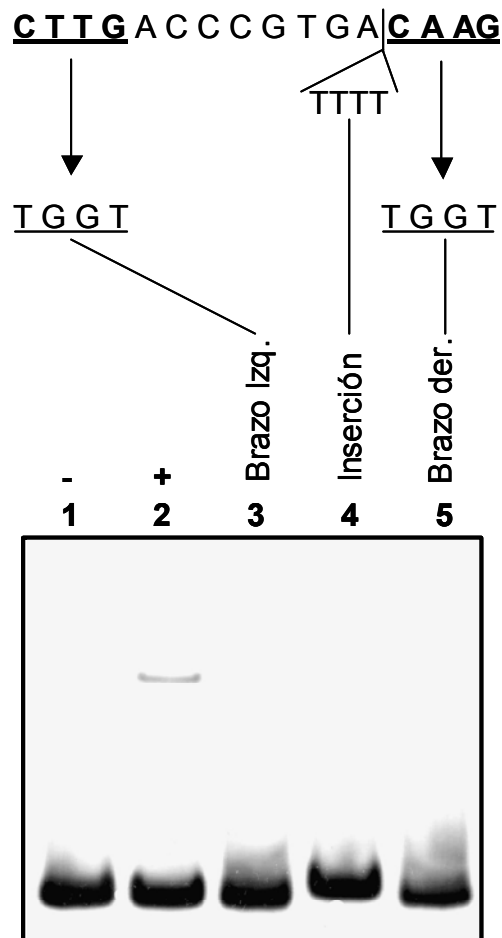


Figura 3.13. Movilidad electroforética de diversos mutantes del fragmento LexA3 de la región promotora del gen *lexA* de *D. radiodurans*. Se presenta una sustitución de CTTG por TGGT en el brazo izquierdo (carril 3), una sustitución de CAAG por TGGT en el brazo derecho (carril 4) y una inserción de 4 nucleótidos (TTTT), flanqueando el brazo derecho (carril 5) del palíndromo propuesto CTTG-N₈-CAAG. Se utilizan como controles de movilidad la sonda LexA3 en ausencia (carril 1) y presencia (carril 2) del extracto de proteínas.

nucleótidos del palíndromo y en sus bases colindantes y, se realizaron ensayos EMSA con dichos fragmentos. Las mutaciones puntuales se obtuvieron utilizando el oligonucleótido Dig LexA Dei y diferentes oligonucleótidos que contienen un cambio en su secuencia. Así, estos oligonucleótidos para el brazo derecho fueron del LexA Dei16 al LexA Dei21 y para el brazo izquierdo del LexA Dei30 al LexA Dei35 (Tabla 2.2). En la Fig. 3.14 se puede ver el efecto de cada una de estas mutaciones en la unión a la proteína LexA. Ninguna de las mutaciones introducidas en las

bases adyacentes a los dos motivos tuvo efecto en la unión, tampoco se observó efecto al cambiar la C, la segunda T o la G del submotivo izquierdo o la segunda A o la G del submotivo derecho. En cambio, se observó que se pierde el retraso electroforético, cuando se realizan cambios en la primera T del submotivo izquierdo o en la C o la primera A del submotivo derecho (**CTTG-N₈-CAAG**).

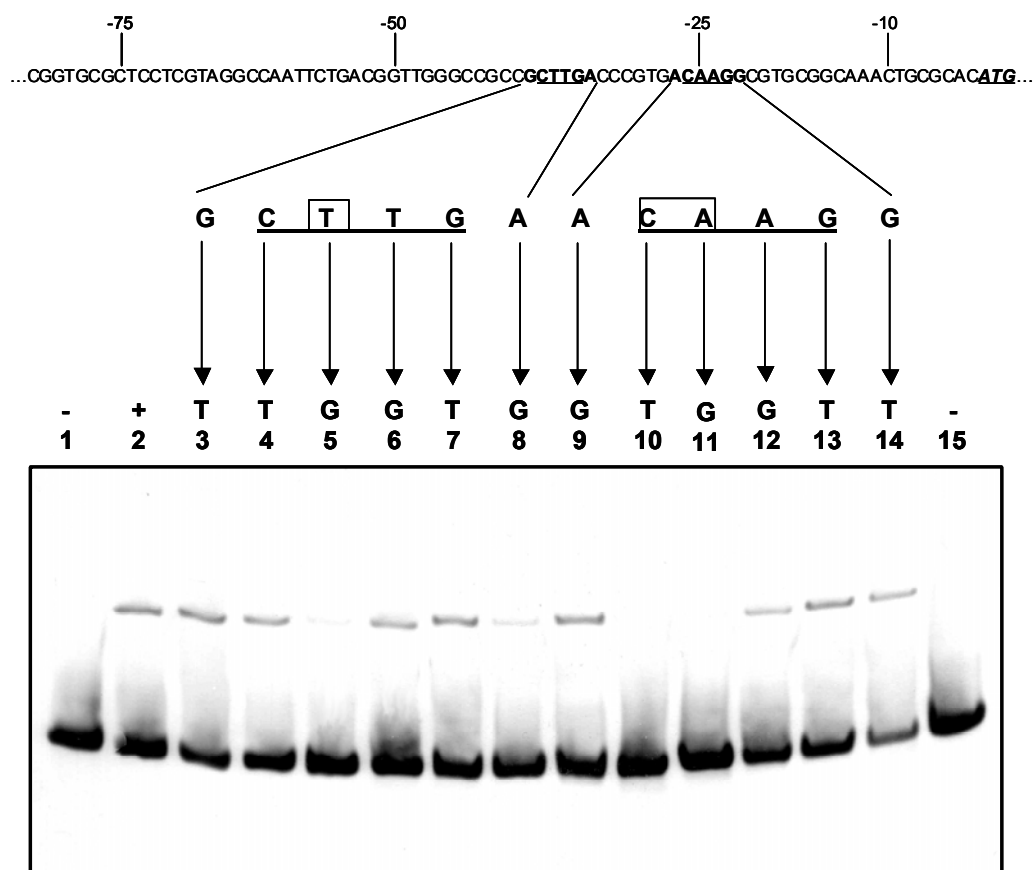


Figura 3.14. Movilidad electroforética de diversos mutantes del fragmento LexA3 de la región promotora del gen *lexA* de *D. radiodurans*, en presencia del extracto de proteína de *D. radiodurans* con LexA sobreexpresada. Se observa el efecto de mutaciones puntuales en los brazos izquierdo (carriles 3-8) y derecho (carriles 9-14) y en las respectivas bases flanqueantes del palíndromo propuesto como posible región reguladora (**GCTTGACCCGTGACAAGG**). Se utilizó como control de movilidad el fragmento LexA3 en ausencia (carriles 1 y 15) y en presencia (carril 2) del extracto de proteínas. En el fragmento que contiene la región promotora del gen *lexA* están señalados el inicio de traducción (en cursiva, negrita y subrayado), la teórica región reguladora palindrómica (en negrita y subrayado) y las bases en que se realizaron las mutaciones puntuales (en negrita). Se indica además cada uno de los cambios efectuados y las bases, en las que la sustitución elimina la unión proteína-DNA, están en recuadro.

Para confirmar los datos obtenidos se realizaron pruebas adicionales en los nucleótidos que aparentemente no eran importantes en la unión extracto de proteínas-DNA. Así, se obtuvieron mutantes del fragmento LexA3, cambiando dos de estos nucleótidos cada vez, utilizando los oligonucleótidos LexA Dei36, LexA Dei37, LexA Dei38 y LexA Dei39 y el oligonucleótido marcado Dig LexA Dei. Asimismo, se obtuvo un mutante de inserción con el oligonucleótido LexA Dei43 y el Dig LexA Dei. Con dichos fragmentos mutantes se realizó un ensayo EMSA (Fig. 3.15), donde se observa que hay una disminución en la unión proteína-DNA si la mutación consiste en cambiar GC por TT del brazo izquierdo (primera base y su base colindante, carril 3), al igual que al cambiar GG por TT del brazo derecho (última base y su base colindante, carril 5), por otro lado se observa también que se pierde totalmente la unión al cambiar el par TG del brazo izquierdo por GA (carril 2). Estos datos demuestran que estas dos bases también deben tener importancia en dicha unión. Igualmente, se puede apreciar una pérdida parcial de la unión al insertar TTT entre CA y AG y al cambiar AG por GT del brazo derecho (carriles 6 y 4, respectivamente), demostrando así la importancia de la segunda mitad del submotivo derecho de la región palindrómica.

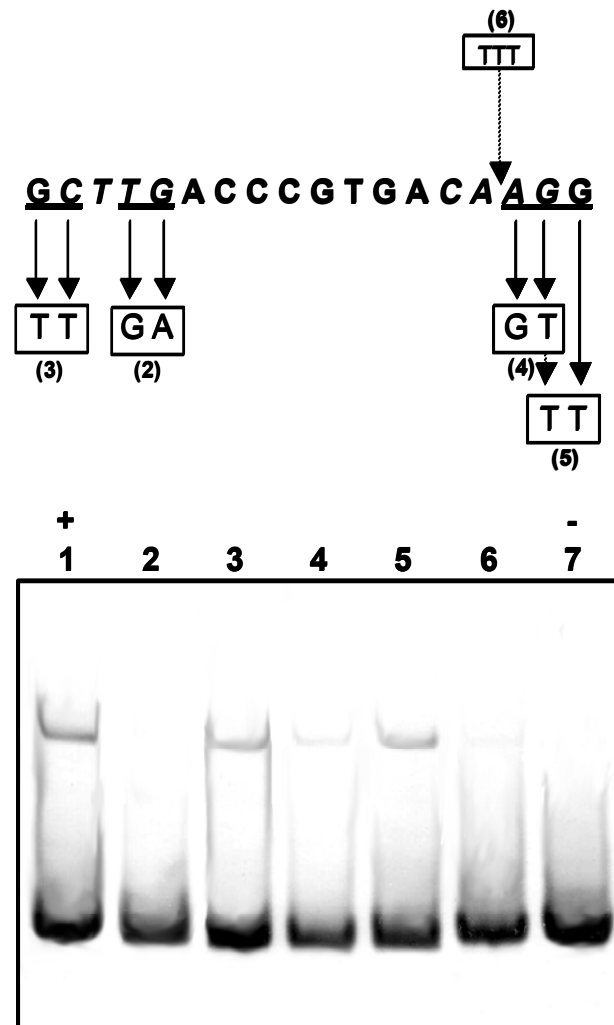


Figura 3.15. Movilidad electroforética de diversos mutantes del fragmento LexA3 de la región promotora del gen *lexA* de *D. radiodurans*, en presencia del extracto de proteína de *D. radiodurans* con LexA sobreexpresada. Se observa el efecto de diferentes mutaciones [cambios dobles (flechas continuas) e inserción de bases (flecha discontinua)] en los brazos izquierdo (carriles 2 y 3) y derecho (carriles 4, 5 y 6) y las bases flanqueantes del palíndromo propuesto como posible región reguladora (GCTTGACCCGTGACAAGG). Se utilizó como control de movilidad el fragmento LexA3 en ausencia (carril 7) y en presencia (carril 1) del extracto de proteínas. Las bases que fueron cambiadas de dos en dos están subrayadas y los cambios que se han realizado están recuadrados.

4. Discusión

Una de las líneas de investigación en las que nuestro grupo de trabajo se ha centrado desde hace ya más de 20 años es la identificación y el estudio de las cajas SOS y la regulación de este sistema en diferentes grupos filogenéticos, tales como las bacterias verdes no sulfúreas y las γ -, α -y δ -Proteobacterias, entre otros (Calero *et al.*, 1991; Garriga *et al.*, 1992; Calero *et al.*, 1994; Riera y Barbé, 1995; Fernández de Henestrosa *et al.*, 1998; Tapias y Barbé, 1999; del Rey *et al.*, 1999; Campoy *et al.*, 2002; Fernández de Henestrosa *et al.*, 2002; Jara *et al.*, 2003). En estos estudios se han aislado y secuenciado diferentes genes de la red SOS, tanto reguladores (*recA* y *lexA*) como otros (*uvrA* y *uvrB*), utilizando diferentes metodologías para caracterizar sus regiones reguladoras y estudiar el control de su expresión. Últimamente, el desarrollo de proyectos de secuenciación de los genomas de varios microorganismos ha significado una gran aportación a este tipo de estudios, ya que el disponer de nuevas secuencias completas y parciales de varias especies permite realizar una minería genómica buscando, mediante programas informáticos de comparación, genes análogos a los descritos en el sistema SOS de diversos organismos. El análisis de dichas secuencias permite la identificación de las regiones reguladoras y su comparación con las variantes de las cajas SOS definidas previamente. Hasta el presente se han definido las siguientes regiones reguladoras, o cajas SOS:

Proteobacteria

- γ -*Proteobacteria*
 - *Enterobacteriales, Aeromonadales, Pseudomonadales, Pasteurellales,*
entre otras TACTGT-N₈-ACAGTA
 - *Xanthomonadales* TTAG-N₆-TACTA
- α -*Proteobacteria*
 - *Rhodobacterales y Rhizobiales* GTTC-N₇-GTTC

- *δ-Proteobacteria*
 - *Geobacter* GGTT-N₂-C-N₄-G-N₃-ACC
- Proteobacterias no clasificadas
 - MC-1 (Bacteria magnetotáctica) CCT-N₁₀-AGG

Bacterias grampositivas CGAACRNRYGTTYG

Bacterias no clasificadas

- *D. ethenogenes* AGAAC-N₄-GTTCT

La bacteria magnetotáctica MC-1 está relacionada filogenéticamente con el *phyllum* α -*Proteobacteria* y a *D. ethenogenes* se la incluye dentro de las bacterias verdes no sulfúreas (Hugenholtz *et al.*, 1998)

En estos diferentes motivos se conserva la característica de ser estructuras palindrómicas o repeticiones directas, como sucede en otros motivos reguladores de varios sistemas. Tanto el tipo y número de motivos como su ubicación son variables e importantes en la diferente expresión y regulación de los genes SOS. En este marco, este trabajo se ha centrado en la identificación y caracterización de las cajas SOS de dos grupos filogenéticos no estudiados hasta este momento: la β -*Proteobacteria* *R. metallidurans* y la bacteria *D. radiodurans* del grupo *Deinococci*.

4.1. Identificación de la caja SOS de *R. metallidurans*

R. metallidurans CH34 (Goris *et al.*, 2001), anteriormente denominada *Alcaligenes eutrophus* (Davis, 1969) y *Ralstonia eutropha* (Yabuuchi *et al.*, 1995), es un bacilo gramnegativo, quimolitotrofo facultativo, del grupo β -*Proteobacteria* y perteneciente al orden *Burkholderiales*, capaz de crecer en medios con concentraciones relativamente elevadas de determinados metales pesados (Zn, Cd, Co, Pb, Hg, Ni y Cr). Su temperatura óptima de crecimiento es 30°C y se la puede encontrar normalmente en sedimentos y en suelos que contengan metales pesados. Su resistencia a estos compuestos está ligada a la presencia de dos megaplásmidos pMOL28 y

pMOL30 que contienen genes que codifican una maquinaria de reflujo de cationes a través de su membrana. Además, *R. metallidurans* se caracteriza por ser una buena receptora de otros plásmidos que portan diferentes genes que codifican funciones de degradación, resistencia a metales, etc., presentando una alta frecuencia de transferencia. Por ello, esta especie tiene una alta plasticidad genómica que se ha relacionado con su capacidad de adaptarse al estrés y a severas condiciones en biotopos industriales, por lo que hay, actualmente, un gran interés en sus posibles aplicaciones en el área de la biotecnología ambiental (Goris *et al.*, 2001).

En el primer punto del estudio se logró realizar la clonación del gen *recA* de *R. metallidurans* y al secuenciar dicho gen se identificó en su región promotora un motivo palindrómico idéntico a la caja SOS de *E. coli*. Dicho motivo está situado a 168 pares de bases del inicio de traducción del gen. De igual manera, tras clonar y secuenciar el gen *lexA* de *R. metallidurans* se localizaron dos motivos palindrómicos como el de *E. coli*, a 61 y 41 pares de bases, respectivamente, antes del inicio de traducción de este gen. Según estos resultados *R. metallidurans*, al igual que lo descrito en otras especies, incluida *E. coli*, contiene dos cajas SOS en el gen *lexA* (Schnarr *et al.*, 1991). Según se ha indicado la presencia de múltiples sitios de unión de la proteína LexA a la región promotora del gen *lexA* debe permitir un nivel de control de la expresión de este gen más preciso que si únicamente hubiera un sitio de unión (Movahedzadeh *et al.*, 1997a).

La presencia de estos palíndromos en los genes *lexA* y *recA* claramente sugería que la caja SOS de *R. metallidurans* debía de ser la misma que la de *E. coli* y, probablemente, que ambos genes debían ser funcionales en esta última especie. Dicha hipótesis se comprobó al estudiar la expresión de una fusión del promotor del gen *recA* de *R. metallidurans* con el gen *lacZ* de *E. coli*, en presencia y ausencia de lesiones, en una cepa salvaje de *E. coli*. En este estudio se determinó que dicho gen se inducía en respuesta a las lesiones en el DNA, por lo que se determinó que la secuencia reguladora del gen *recA* de *R. metallidurans* es reconocida *in vivo* por la proteína LexA de *E. coli*, habiendo una regulación cruzada del sistema SOS entre las dos

especies, similar a la descrita en otros gramnegativos (Fernández de Henestrosa *et al.*, 1991). Es de destacar que las γ -Proteobacterias no forman un grupo homogéneo por lo que se refiere al tipo de caja SOS que contienen, pudiendo distinguirse dos grupos. Así, mientras que las especies estudiadas *S. typhimurium*, *E. carotovora*, *P. putida*, *P. aeruginosa* (Garriga *et al.*, 1992; Calero *et al.*, 1993), *P. rettgeri* (Riera y Barbé, 1993) y *A. hydrophila* (Riera y Barbé, 1995) presentan una caja SOS como la de *E. coli*, las dos especies estudiadas del orden *Xanthomonadales* contienen como motivo regulador la secuencia TTAG-N₆-TACTA. Nuestros resultados indican que *R. metallidurans*, a pesar de ser una β -Proteobacteria, contiene la caja SOS del primer grupo de los indicados anteriormente en las γ -Proteobacterias.

Del mismo modo, se analizó la expresión del gen *recA* de *R. metallidurans* en su propia especie, para lo cual fue necesaria la construcción de mutantes RecA y LexA defectivos, en los cuales se analizó la expresión del gen *recA* desde la fusión mencionada anteriormente. Los resultados obtenidos en la cepa salvaje fueron similares a los de *E. coli*, si bien el nivel de inducción fue menor y, como era de esperar, en los mutantes LexA(Def) y RecA(Def) la expresión fue constitutiva. Se analizó también la supervivencia de dichos mutantes frente al tratamiento con radiación ultravioleta, observándose un comportamiento similar al descrito para este tipo de mutantes en otras especies bacterianas. Así, frente a iguales dosis de radiación, la viabilidad del mutante LexA(Def) es similar a la de la cepa salvaje, mientras que el mutante RecA(Def) presenta una baja supervivencia. Esto se debe a que un microorganismo deficiente en la expresión de su gen *recA* no es capaz de realizar diferentes funciones vitales, tales como la recombinación, la reparación y la inducción del sistema SOS (Friedberg *et al.*, 1995; Kogoma, 1997). Por el contrario, un mutante LexA(Def) presenta el sistema SOS totalmente desreprimido y es capaz de actuar frente a una lesión, reparando su DNA y permaneciendo viable una vez recuperado del daño.

El conjunto de estos resultados mostraron que la regulación del sistema SOS de *R. metallidurans* debía ser muy similar a la descrita en *E. coli* y en muchas otras γ -Proteobacterias. Como ya se ha comentado en esta memoria, el regulón SOS de *E. coli* está integrado como mínimo por 40 genes, cuya expresión se ve incrementada frente a diferentes tipos y niveles de lesiones del DNA. Para avanzar en el conocimiento de los genes que integran este regulón en *R. metallidurans* se realizó una búsqueda de posibles genes SOS en las bases de datos de TIGR (*The Institute for Genomic Research*), tanto en el genoma parcialmente secuenciado de *R. metallidurans* como en el genoma totalmente secuenciado de *R. solanacearum*, comparándolas con las secuencias conocidas de genes que forman parte del sistema SOS de *E. coli*. El resultado de este proceso fue la selección de los hipotéticos genes *ruvAB*, *uvrA*, *dinG* y de uno perteneciente a la familia *impB/samB/mucB*. Se encontró que entre dichos genes, solamente este último tenía una secuencia reguladora igual a la de los genes *recA* y *lexA*, la cual estaba localizada 74 pb antes de su inicio de traducción. En los otros hipotéticos genes, *ruvAB*, *uvrA* y *dinG*, no se localizó dicho motivo. Los ensayos de movilidad electroforética confirmaron que no se produce una unión específica entre la proteína LexA de *E. coli* purificada y los promotores de aquellos genes de *R. metallidurans* en los cuales no se había localizado la secuencia palindrómica CTGT-N₈-ACAG, mientras que el hipotético gen de la familia *impB/samB/mucB* es regulado por dicha proteína. Además, estos resultados se confirmaron *in vivo* al analizar la expresión de todos estos genes mediante experimentos de RT-PCR *on-line*, cuantificando su inducción en respuesta al tratamiento con mitomicina C. Así, en la cepa salvaje de *R. metallidurans* se observó que todos estos genes eran inducibles en respuesta al daño en el DNA, mientras que en el mutante LexA(Def) no se induce el gen *recA*, ni el hipotético gen de la familia *impB/samB/mucB*, que justamente son los que presenta la región palindrómica CTGT-N₈-ACAG, aumentado, en cambio, la expresión de los que carecen de dicha región. Es de señalar que el nivel de inducción de la expresión de *recA* y *lexA* en la cepa salvaje es muy superior al de los otros genes analizados. Esto contrasta con los resultados obtenidos al estudiar la expresión del gen *recA* de *R. metallidurans* desde la fusión *recA::lacZ* en la

cepa salvaje. Dado que el método empleado para cuantificar los transcritos de un RNA es muy sensible, puede considerarse que el aumento de la expresión de *recA* y también de *lexA* es realmente muy elevado en respuesta a las lesiones en el DNA. Por otra parte, debe señalarse también que el nivel de expresión de los hipotéticos genes *uvrA* y *dinG* es menor en el mutante LexA(Def) que en la cepa salvaje, siendo indetectable la del hipotético gen *ruvAB*. Por tanto, según estos resultados de entre todos los genes estudiados, únicamente el hipotético gen de la familia *impB/samB/mucB*, además de los reguladores *recA* y *lexA*, formarían parte del regulón SOS. Esto indica que debe existir una vía alternativa o varias, independientes de LexA, regulando la expresión de los hipotéticos genes *ruvAB*, *uvrA* y *dinG* y probablemente otros, como respuesta al daño en el DNA.

En base a esta hipótesis se realizaron ensayos EMSA con extractos crudos de proteínas tanto de la cepa salvaje como del mutante LexA(Def) de *R. metallidurans* frente al gen *lexA* y al hipotético gen *uvrA*. Los resultados obtenidos indicaron que la región promotora del gen *lexA* se une específicamente al extracto crudo de la cepa salvaje, mientras que no se observó ningún retraso electroforético frente al extracto crudo del mutante LexA(Def). Por el contrario, los extractos crudos de la cepa salvaje y del mutante LexA(Def) se unen específicamente a la región promotora del hipotético gen *uvrA*. Estos datos fuertemente sugieren que la expresión de dicho gen debe estar regulada por alguna proteína, diferente de LexA y, a pesar de que no se ha realizado este tipo de estudios con los hipotéticos genes *ruvAB* y *dinG* podrían esperarse resultados parecidos.

Hay microorganismos que a pesar de tener la misma secuencia reguladora que *E. coli*, CTGT-N₈-ACAG, no tienen regulones SOS tan amplios como el de esta bacteria y dentro de las propias γ -Proteobacterias se han descrito muchas variaciones. El regulón SOS de *P. aeruginosa* incluye algunos genes que forman el regulón SOS de *E. coli*. No obstante, y a diferencia de *E. coli*, los genes *uvrA* y *uvrB* no contienen una caja SOS ni son inducibles frente al daño, lo cual indica que su expresión es constitutiva e

independiente de LexA-RecA (Rivera *et al.*, 1996; Rivera *et al.*, 1997). Dentro del mismo grupo γ -*Proteobacteria*, en el genoma de *X. fastidiosa* solamente se han identificado 10 genes (*lexA*, *recA*, *uvrA*, *uvrB*, *ssb*, *recN*, *ruvAB*, *dinG*, *ftsK* y *yigN*) de los pertenecientes al regulón SOS en *E. coli* y tan sólo en el operón *lexA-recA* se encontró el motivo de unión de la proteína LexA. Al realizar un análisis buscando esta secuencia reguladora en todo el genoma de este microorganismo, se localizó dicha secuencia en otros marcos abiertos de lectura y se comprobó que solamente el orf XF2313 era inducible por lesiones en el DNA (Campoy *et al.*, 2002).

En el grupo α -*Proteobacteria* se ha determinado que los genes *lexA*, *recA* y *uvrA-ssb* tienen una caja SOS GTTC-N₈-GTTC y están regulados por las proteínas LexA y RecA (Tapias *et al.*, 1997; del Rey *et al.*, 1999; Labazi *et al.*, 1999). Sin embargo, en la bacteria marina magnetotáctica MC-1, una proteobacteria no clasificada, pero relacionada filogenéticamente con este grupo y que presenta el motivo CCT-N₁₀-AGG, la proteína LexA es capaz de unirse únicamente a la caja SOS de las regiones promotoras del gen *lexA* y del operón *umuDC*, lo que no sucede en genes como *recA*, *recN* o *uvrA* (Fernández de Henestrosa *et al.*, 2003). Algo similar se ha descrito en *G. sulfurreducens*, perteneciente al grupo δ -*Proteobacteria*, ya que solamente en las regiones promotoras de los operones *lexA1-dinB1* y *lexA2-dinB2* se han encontrado cajas SOS y que hay una regulación por parte de su proteína LexA, mientras que esto no se observa en los genes *recA*, *recN*, *ruvAB*, *ssb*, *umuDC*, *uvrA* y *uvrB* (Jara *et al.*, 2003).

También en los microorganismos grampositivos se han descrito situaciones semejantes. *M. tuberculosis* tiene la misma caja reguladora, CGAACRNRYGTTYC (Davis *et al.*, 2002), que la de *B. subtilis* (Cheo *et al.*, 1991; Winterling *et al.*, 1998). En *M. tuberculosis* se han encontrado genes que son inducibles por lesiones en el DNA y que tienen dicha caja como *recA*, *lexA* y el operón *ruvCAB*, sin embargo otros genes inducibles como *ssb* y *uvrA* no presentan dicha caja en su región promotora, *dinP* y *recN* se inducen a bajo nivel y su secuencia reguladora no es muy conservada y

dinG no contiene la secuencia reguladora y su expresión es constitutiva. Además, la red SOS de *M. tuberculosis* está integrada por genes como *ruvC* y *recC*, que no forman parte de este regulón en *E. coli* (Brooks *et al.*, 2001). La bacteria verde no del azufre *D. ethenogenes*, que tiene el mismo motivo regulador y una regulación cruzada con DinR de *B. subtilis*, presenta una proteína LexA que únicamente es capaz de unirse a la región promotora de los genes *lexA* y *uvrA*, desconociéndose si los genes *recA*, *recN*, *ruvA* y *ruvB* están sometidos a algún tipo de regulación (Fernández de Henestrosa *et al.*, 2002).

Los resultados obtenidos en este trabajo, así como los estudios realizados en diferentes grupos de microorganismos difieren significativamente del sistema SOS de *E. coli* y apuntan cada vez más a que este sistema de reparación en este microorganismo debe ser una situación particular en el mundo bacteriano. Sin embargo, la mayoría de trabajos muestran que, a pesar de las variaciones existentes, muchos de los genes de reparación que integran la red SOS de *E. coli* son inducibles por lesiones en el DNA y que su expresión está regulada por algún mecanismo independiente de LexA. La caracterización y el estudio de estos mecanismos en el mundo bacteriano es uno de los aspectos claves para conocer los sistemas de reparación del DNA en los diferentes grupos filogenéticos y comprender su significado en términos evolutivos.

4.2. Identificación de la caja SOS de *D. radiodurans*

D. radiodurans (Brooks y Murray, 1981), anteriormente denominada *Micrococcus radiodurans* (Raj *et al.* 1960), fue aislada por primera vez en 1956 en enlatados de carne esterilizados mediante rayos X. Pertenece al *phylum Deinococci*, que se supone muy antiguo filogenéticamente y presenta un alto contenido de GC. Dentro del género *Deinococcus*, solamente se han descrito siete especies, siendo todas radioresistentes. Sus células son cocos que se agrupan en tétradas, aeróbicos, no móviles, ni esporulados, productores de carotenos y grampositivos, a pesar de tener una pared celular compuesta por una membrana externa, una gruesa capa

de péptidoglicano y una capa multilaminar compartimentalizada, parecida a la de los gramnegativos. Las especies de este género están ampliamente distribuidas, colonizando tanto ambientes con alto contenido en materia orgánica, como suelos o heces animales, como pobres en nutrientes y secos, como muestras de granito en valles antárticos, polvo, instrumentos médicos irradiados, etc. Son extremadamente resistentes a productos químicos, tóxicos y genotóxicos, capaces de reducir metales y radionucleótidos, además de ser resistentes al daño oxidativo, a la desecación (Mattimore y Battista, 1996) y a altos niveles de ionización, pudiendo sobrevivir a exposiciones agudas de radiación gamma de hasta 1,7 Mrads y dosis crónicas de 6 kilorads/h (Minton, 1994; Daly *et al.*, 1994; Daly y Minton, 1996; Venkateswaran *et al.*, 2000). También son resistentes a la radiación ultravioleta, pudiendo llegar a soportar dosis de 600-1000 J/m² sin que se afecte su total supervivencia.

La elevada resistencia de *D. radiodurans* a uno de los efectos más letales de las radiaciones, como es la rotura de la doble cadena del DNA, se debe a que este microorganismo posee determinadas estrategias de prevención, tolerancia y reparación del daño que le permiten reparar cromosomas severamente fragmentados. Así, tras recibir altas dosis de radiación ionizante (1.5 Mrad) es capaz de reparar más de 100 roturas de doble cadena por cromosoma, con una supervivencia del 100% y prácticamente sin que se produzcan mutaciones (Kitayama *et al.*, 1983; Minton, 1994; Minton y Daly, 1995). Entre algunas de las características que contribuyen a esta resistencia cabe citar:

- pigmentos carotenoides
- pared celular compleja
- enzimas de detoxificación de las especies reactivas de oxígeno (catalasas y superóxido dismutasas)
- capacidad de eliminar radicales oxígeno
- mecanismos complejos que le otorgan un eficiente sistema de reparación de DNA

Entre los mecanismos de reparación, se sabe que *D. radiodurans* cuenta con la reparación por escisión de nucleótidos mediada por el sistema de la UV endonucleasa- α , producto de los genes *uvrA1* y *uvrA2*, que podría constituir una vía análoga a la de Uvr(A)BC de *E. coli* (Minton, 1994, Agostini *et al.*, 1996; Narumi *et al.*, 1997; Battista, 1997). Este mecanismo es además complementado por la acción de la UV endonucleasa- β , producto de los genes *uvsC*, *uvsD* y *uvsE*, que es una vía alterna de reparación por escisión que actúa ante la pérdida de la reparación por escisión de nucleótidos (Udupa *et al.*, 1994; Battista, 1997; Earl *et al.*, 2002a). Además, posee también un mecanismo de reparación por escisión de bases, realizado por nueve glicosilasas y una endonucleasa apurínica-apirimidínica y de reparación de apareamientos erróneos, gracias a la actividad de las proteínas MutL y MutS. Finalmente, dispone también de una eficiente reparación por recombinación homóloga en la que intervienen las proteínas RecA, RuvABC y SbcCD (White *et al.*, 1999; Makarova *et al.*, 2001). En este último mecanismo de reparación, *D. radiodurans* tiene una ventaja adicional, ya que posee varias copias de genoma por célula, 4 de ellas en fase estacionaria y hasta 10 en fase exponencial. Además, se ha propuesto que habría un alineamiento entre las regiones homólogas de estas copias, lo cual facilitaría su reparación (Hansen, 1978; Targari y Moseley, 1980; Daly y Minton, 1995; Minton y Daly, 1995; Minton, 1996). Presenta también elementos repetitivos localizados en todo su genoma y dispone de un sistema de regulación que controla la replicación y la división celular, según el nivel de daño presente y el proceso reparativo llevado a cabo por la célula. Junto a ello, es capaz de transportar nucleótidos dañados fuera de la célula, lo que impide su posible reincorporación al genoma (Daly *et al.*, 1994; Minton, 1994; Battista, 1997). Todos estos mecanismos son muy poco comprendidos todavía, deben ser diferentes de los conocidos y con una capacidad especial para potenciar la eficiencia de los sistemas reparativos convencionales. Se ha señalado que todas estas características se regulan probablemente por mecanismos altamente específicos y propios de este microorganismo, lo que explica su elevada resistencia al daño del DNA. Así, a pesar de que otras especies pueden tener algunas de estas propiedades

especiales, carecen de la capacidad reparativa de *D. radiodurans* (Battista, 1997; Battista, 2000).

Debido a sus especiales características y a que son fácilmente cultivables y no patógenas, las especies del género *Deinococcus* tienen un gran interés biotecnológico por su posible utilización en biorremediación de zonas contaminadas con tóxicos químicos y con radiación. Además, dentro de este género, *D. radiodurans* puede ser transformada y por tanto es genéticamente manipulable (Tirgari y Moseley, 1980). Todo ello condujo a que se la escogiera en el Proyecto de Secuenciación de Genomas, finalizándose la secuenciación del genoma de la cepa R1 de *D. radiodurans* en 1999 por TIGR (The Institute for Genome Research (<http://www.tigr.org/tigr-scripts/CMR2/GenomePage3.spl?database=gdr>)). Su genoma está compuesto por cuatro moléculas circulares: el cromosoma I (2648638 pb), el cromosoma II (412348 pb), un megaplásmido (177466 pb) y un plásmido (45704 pb) (White *et al.*, 1999). De los 3187 marcos abiertos de lectura encontrados, solamente 1493 se pueden asignar a productos génicos conocidos en otras especies bacterianas y de las 1694 proteínas de función desconocida, 1002 están presentes únicamente en *D. radiodurans*. De hecho y sorprendentemente este microorganismo tiene un menor número de enzimas de reparación que *E. coli* (Makarova *et al.*, 2001) y la mayoría de sus genes de reparación no se expresan a altos niveles (Karlín y Mrázek, 2001). Varios genes relacionados con la reparación como *recA*, *uvrA*, *polA*, *ruvB* se encuentran en el cromosoma I, mientras que el gen *lexA* y el posible gen *lexA2*, descrito por Makarova y colaboradores (2001), están localizados en el cromosoma II (Kikuchi *et al.*, 1999).

La proteína RecA de *D. radiodurans* ha sido muy estudiada y tiene varias características especiales. El gen que la codifica forma parte de un operón policistrónico (Narumi *et al.*, 1999) junto con los genes *cinA* y *ligT*, los cuales no cumplen ningún papel en el funcionamiento y regulación de dicha región (Bonacossa de Almeida *et al.*, 2002). La proteína RecA tiene un alto nivel de expresión, especialmente frente a daños a nivel del DNA, llegando a aumentar su expresión entre 50 y 100 veces (Carrol, *et al.*, 1996). Presenta

mucha similitud con otras proteínas RecA de varias especies, pero también diferencias significativas. Así, al igual que en otros microorganismos forma filamentos estriados sobre el DNA, puede hidrolizar ATP y dATP, tiene actividad coproteasa y es la responsable de una eficiente reacción de intercambio entre cadenas (Kim *et al.*, 2002; Satoh *et al.*, 2002). En cambio, y a diferencia de la proteína RecA de *E. coli*, es capaz de competir más eficientemente con la proteína SSB por los sitios de unión al DNA de cadena sencilla y se une más rápidamente al DNA de doble cadena, aún en presencia de ssDNA (Kim *et al.*, 2002). Igualmente, la vía de intercambio de cadenas de DNA se realiza de forma inversa a la de *E. coli*, ya que el filamento se une en primer lugar al DNA de doble cadena y desde ahí es capaz de unirse a su dúplex homólogo de cadena sencilla y realizar el intercambio (Kim y Cox, 2002). Es un elemento crítico en la reparación de roturas de doble cadena (Daly *et al.*, 1994) mediante recombinación homóloga y se ha visto que es muy importante en este punto la recombinación intercromosómica (Daly y Minton, 1995). Por otra parte, se ha descrito una vía de reparación del daño por recombinación independiente de RecA, que consiste en un anillamiento de la cadena sencilla y que se produce en la fase inicial de la reparación, si bien este mecanismo no parece ser muy eficiente (Daly y Minton, 1996).

La proteína LexA de *D. radiodurans* no ha sido tan estudiada y no presenta una conservación demasiado alta con respecto a las de otras especies. La región más conservada es la C-terminal, implicada en la autohidrólisis, manteniéndose especialmente conservados los residuos Ala₈₃ y Gly₈₄, sitio exacto en que se produce la rotura y otros residuos importantes en este proceso como la Ser₁₁₉ y la Lys₁₅₈. En contraste, la región N-terminal, implicada en el proceso de unión al DNA, tiene una estructura de tres α -hélices, de las cuales la II y la III forman una variante del motivo de unión al DNA típico, *helix-turn-helix* descrito en las proteínas LexA conocidas y está muy poco conservada (Narumi *et al.*, 2001).

La hipotética proteína LexA2 de *D. radiodurans* no ha sido muy caracterizada, tan sólo se conoce que tiene un dominio de unión a DNA con

la estructura *helix-turn-helix* y un dominio de autohidrólisis, de ahí que se ha determinado que podría cumplir funciones similares a la proteína LexA (Makarova *et al.*, 2001, Narumi *et al.*, 2001). El gen *lexA2* que la codifica no es tan parecido a *lexA1*, a diferencia de lo que sucede en especies que contienen dos genes *lexA* como *G. sulfurreducens* (Jara *et al.*, 2003).

Las especiales características de *D. radiodurans* justifican el creciente interés en dilucidar si posee un sistema de reparación SOS y en estudiar su regulación. Teniendo en cuenta que esta especie está muy alejada filogenéticamente de otros grupos en los que ha sido descrito este sistema y todo lo comentado anteriormente, se podría esperar que la caja SOS fuera distinta de las ya conocidas.

En el trabajo que se presenta, se utilizó la secuencia obtenida de la base de datos del NCBI-GenBank para clonar el gen *lexA* de *D. radiodurans* y tras su secuenciación se determinó que la secuencia clonada era idéntica a la proporcionada por el banco de datos. El análisis de su región promotora no permitió encontrar ningún motivo regulador similar a los ya descritos para otros grupos de microorganismos, pero se localizó un hipotético gen (orf 144c) tan sólo 56 pb antes de su región codificante. Mediante un ensayo con RT-PCR se descartó la posibilidad de que el gen *lexA* estuviera formando un operón con otros genes, por lo que se esperaba que el promotor de dicho gen estuviera en la región inmediatamente anterior al mismo. Así, mediante ensayos EMSA de la posible región promotora del gen *lexA* frente a un extracto proteico que contenía LexA sobreexpresada, se determinó que dicha proteína era capaz unirse específicamente a una región comprendida entre el nucleótido -50 y el inicio de traducción. Esta región contenía el palíndromo CTTGACCCGTGACAAG, localizado 38 pb antes del codón de inicio de traducción, el cual podría corresponder a una teórica caja SOS. Tras la mutagénesis dirigida del mismo se llegó a establecer que, efectivamente, la secuencia propuesta CTTG-N₈-**CAAG** es la caja LexA del gen *lexA* de *D. radiodurans*, siendo las bases señaladas en negrita las más importantes dentro del motivo regulador. Este motivo es diferente a los anteriormente descritos para otros microorganismos y concuerda con el

hecho de que la región de la proteína LexA menos conservada sea la N-terminal que es la zona de interacción con el DNA.

Las pruebas realizadas para probar la especificidad de la unión extracto proteico-promotor del gen *lexA*, en las que se usaron como competidores fragmentos de DNA de los promotores del gen *recA* y del posible gen *lexA2*, determinaron que el extracto proteico utilizado en los ensayos no era capaz de unirse a los promotores de dichos genes. Estos resultados concuerdan también con el hecho de que no se encuentre la secuencia reguladora de *lexA*, o alguna variante de la misma, en la región promotora de ambos genes. Además estos resultados confirman los datos de Narumi y colaboradores (2001) que indican que la proteína LexA no está implicada en la regulación de la expresión del gen *recA*. Resultados similares han sido descritos también para la bacteria verde no del azufre *D. ethenogenes* (Fernández de Henestrosa *et al.*, 2002), la bacteria marina magnetotáctica MC-1 (Fernández de Henestrosa *et al.*, 2003) y la δ -Proteobacteria *G. sulfurreducens*. Cabe destacar que en esta última especie se ha determinado que *recA* tiene un nivel de expresión basal muy alto y que no es inducible por el daño del DNA (Jara *et al.*, 2003). En *D. radiodurans* se sabe que la expresión del gen *recA* es inducible por lesiones en el DNA, habiéndose sugerido una posible autorregulación (Bonacossa de Almeida *et al.*, 2002) y también que estaría controlada por la proteína IrrE, codificada en el gen *irrE* que se encuentra en el cromosoma I de *D. radiodurans* y descrita hasta el momento solamente en este microorganismo (Earl *et al.*, 2002b). Posiblemente esta regulación alternativa y otras funciones de la proteína RecA en *D. radiodurans* que le permiten mejorar sus formas de acción frente a las roturas cromosómicas son una consecuencia evolutiva de la exposición de este microorganismo a ambientes extremos (Kim y Cox, 2002).

A pesar de que la expresión de *recA* sea independiente de LexA se ha comprobado que la actividad coproteasa de RecA es capaz de inducir la autohidrólisis de LexA *in vivo* (Narumi *et al.*, 2001). Según los estudios realizados por Satoh y colaboradores (2002) la actividad coproteasa de esta

proteína sería un factor muy importante en la resistencia a la radiación que presenta este microorganismo.

Analizando los datos obtenidos en este estudio y lo que se conoce sobre la reparación de *D. radiodurans* se puede afirmar que este microorganismo no tiene un sistema de reparación SOS como los que se han definido anteriormente. En esta especie, la proteína LexA regula la expresión del gen *lexA* y podría regular la expresión de otros genes, pero no la del *recA* ni la del hipotético gen *lexA2*. Sin embargo, la proteína RecA que se induce en respuesta al daño en el DNA, puede catalizar la autorrotura de LexA. Ello sugiere que RecA cumpliría un papel en la regulación de los genes que estuvieran bajo el control de LexA. Por otro lado, y dado que la expresión de RecA, además de ser autorregulada, está controlada por IrrE, esta proteína podría regular indirectamente la expresión de los posibles genes controlados por LexA

Dados los resultados de los que se dispone hasta el momento, es necesario proseguir este tipo de estudios para definir los genes que están bajo el control de LexA y determinar el papel de las proteínas IrrE y LexA2. Todo ello puede colaborar en dilucidar los complejos mecanismos que confieren a *D. radiodurans* su excepcional capacidad para reparar el daño del DNA tan eficientemente.

5. Conclusiones

1. El aislamiento y secuenciación de los genes *recA* y *lexA* de la β -*Proteobacteria*, *R. metallidurans*, ha permitido identificar en su región promotora un motivo regulador idéntico a la caja SOS consenso de *E. coli*: CTGT-N₈-ACAG.
2. El análisis de la inducibilidad del gen *recA* de *R. metallidurans* por lesiones en el DNA, realizado mediante fusiones de este gen y el gen *lacZ* de *E. coli*, ha permitido demostrar que dicho gen es inducible, tanto en *R. metallidurans* como en *E. coli*, por lo tanto la caja SOS encontrada es funcional en ambas especies.
3. La proteína LexA de *R. metallidurans* controla su propia expresión ya que la proteína LexA de *E. coli* y un extracto crudo de *R. metallidurans* se unen específicamente a la región promotora del gen *lexA*.
4. Los genes *recA*, *lexA* y el hipotético gen de la familia *impB/samB/mucB* de *R. metallidurans* presentan el motivo CTGT-N₈-ACAG en su región promotora y están bajo el control de LexA, lo cual se ha demostrado mediante ensayos de movilidad electroforética utilizando la proteína LexA de *E. coli* y mediante el análisis de la inducción de la expresión de estos genes frente a la mitomicina C, tanto en la cepa salvaje como en el mutante LexA(Def) de *R. metallidurans*.
5. Los hipotéticos genes *uvrA*, *ruvAB* y *dinG* de *R. metallidurans* son inducibles por daño en el DNA, pero no presentan una caja CTGT-N₈-ACAG, y además, en ensayos de movilidad electroforética se ha demostrado que la proteína LexA de *E. coli* no se une a la región promotora de estos genes.
6. El hipotético gen *uvrA* de *R. metallidurans* está sometido a un control independiente de LexA, ya que tanto los extractos crudos de la cepa salvaje como los del mutante LexA(Def) de *R. metallidurans* se unen a la región promotora de dicho gen.
7. Tras la clonación y secuenciación del gen *lexA* de *D. radiodurans* se determinó que este gen no forma un operón con otros genes

anteriores y que su motivo regulador debe estar en la región inmediatamente anterior. Mediante ensayos de movilidad electroforética se ha demostrado que la proteína LexA controla su propia expresión.

8. Mediante el acotamiento de la región promotora del gen *lexA* de *D. radiodurans* se encontró un motivo palindrómico que podría ser la secuencia reguladora de dicho gen y, a través de ensayos de movilidad electroforética y mutagénesis dirigida se determinó que el motivo CTTG-N₈-**CAAG** corresponde a la región de unión proteína-DNA para *D. radiodurans*, siendo las bases en negrita las más importante para esta unión.
9. El análisis de los promotores de los genes *recA* y del hipotético gen *lexA2* de *D. radiodurans* mostró que no presentan el motivo regulador CTTG-N₈-CAAG y mediante ensayos de movilidad electroforética se ha demostrado que su regulación es independiente de LexA.

6. Bibliografía

Agostini, H. J., J. D. Carroll, y K. W. Minton. 1996. Identification of *uvrA*, a DNA repair gene of *Deinococcus radiodurans*. *J. Bacteriol.* **178**:6759-6765.

Ames, B. N., F. D. Lee, y W. E. Durston. 1973. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**:782-786.

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

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

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

Battista, J. R. 1997. Against all odds: the survival strategies of *Deinococcus radiodurans*. *Annu. Rev. Microbiol.* **51**:203-224.

Battista, J. R. 2000. Radiation resistance: the fragments that remain. *Curr. Biol.* **10**:R204-205.

Bianco, P. R., y S. C. Kowalczykowski. 2001. RecA protein. (http://microbiology.ucdavis.edu/sklab/PDF_Files/Bianco%20&%20Kowalczykowski%20ELS,%20RecA.pdf).

Birboim, H. C., y J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**:1513-1523.

Bonacossa de Almeida, C., G. Coste, S. Sommer, y A. Bailone. 2002. Quantification of RecA protein in *Deinococcus radiodurans* reveals involvement of RecA, but not LexA, in its regulation. *Mol. Genet. Genomics* **268**:28-41.

Bork, J. M., M. M. Cox, y R. B. Inman. 2001. RecA protein filaments disassemble in the 5' to 3' direction on single-stranded DNA. *J. Biol. Chem.* **276**:45740-45743.

Brent, R., y M. Ptashne. 1981. Mechanism of action of the *lexA* gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:4204-4208.

Brooks, B. W., y R. G. E. Murray. 1981. Nomenclature for *Micrococcus radiodurans* and other radiation-resistant cocci: Deinococcaceae fam. nov. and *Deinococcus* gen. nov., including five species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **31**:353-360.

Brooks, P. C., F. Movahedzadeh, y E. O. Davis. 2001. Identification of some DNA damage-inducible genes of *Mycobacterium tuberculosis*: apparent lack of correlation with LexA binding. *J. Bacteriol.* **183**:4459-4467.

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

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

Campoy, S., G. Mazón, A. R. Fernández de Henestrosa, M. Llagostera, P. B. Monteiro, y J. Barbé. 2002. A new regulatory DNA motif of the Gamma Proteobacteria Class: identification of the LexA protein binding site of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Microbiology* **148**:3583-3597.

Cárdenas, M., A. R. Fernández de Henestrosa, S. Campoy, A. M. Pérez de Rozas, J. Barbé, I. Badiola, y M. Llagostera. 2001. Virulence of *Pasteurella multocida recA* mutants. *Vet. Microbiol.* **80**:53-61.

Carroll, J. D., M. D. Daly, y K. W. Minton. 1996. Expression of *recA* in *Deinococcus radiodurans*. *J. Bacteriol.* **178**:130-135.

Casadaban, M. J., y S. N. Cohen. 1979. Lactose genes fused to exogenous promoters in one step using a Mu-lac bacteriophage: *in vivo* probe for transcriptional control sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:4530-4535.

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

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

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

Churchill, J. J., D. G. Anderson, y S. C. Kowalczykowski. 1999. The RecBC enzyme loads RecA protein onto ssDNA asymmetrically and independently of χ resulting in constitutive recombination activation. *Genes Dev.* **13**:901-911.

Daly, M. J., L. Ouyang, P. Fuchs, y K. W. Minton. 1994. *In vivo* damage and *recA*-dependent repair of plasmid and chromosomal DNA in the radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *J. Bacteriol.* **176**:3508-3517.

Daly, M. J., y K. W. Minton. 1995. Interchromosomal recombination in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. J. Bacteriol. **177**:5495-5505.

Daly, M. J., y K. W. Minton. 1996. An alternative pathway of recombination of chromosomal fragments precedes *recA*-dependent recombination in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. J. Bacteriol. **178**:4461-4471.

Davis, D. H., M. Doudoroff, R. Y. Stainer, y M. Mandel. 1969. Proposal to reject the genus *Hydrogenomonas*: taxonomic implications. Int. J. Syst. Bacteriol. **19**:375-390.

Davis, E. O., E. M. Dullaghan, y L. Rand. 2002. Definition of the Mycobacterial SOS box and use to identify LexA-regulated genes in *Mycobacterium tuberculosis*. J. Bacteriol. **184**:3287-3295.

de Lorenzo, V., M. Herrero, U. Jakubzik, y K. N. Timmis. 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. J. Bacteriol. **172**:6568-6572.

del Rey, A., J. Diestra, A. R. Fernández de Henestrosa, y J. Barbé. 1999. Determination of the *Paracoccus denitrificans* SOS box. Microbiology **145**:577-584.

Demple, B. 1997. Study of redox-regulated transcription factors in prokaryotes. Methods Enzymol. **11**:267-278.

Díaz, E., M. Munthall, V. de Lorenzo, y K. N. Timmis. 1994. Universal barrier to lateral spread of specific genes among microorganisms. Mol. Microbiol. **13**:855-861.

Ditta, G., T. Schmidhauser, E. Yakobson, P. Lu, X. W. Liang, D. R. Finlay, D. Guiney, y D. R. Helinsky. 1985. Plasmids related to the broad host range vector, pRK290, useful for gene cloning and for monitoring gene expression. *Plasmid* **13**:149-153.

Dower, W. J., J. F. Miller, y C. W. Ragsdale. 1988. High efficient transformation of *Escherichia coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**:6127-6145.

Durbach, S. I., S. J. Andersen, y V. Mizrahi. 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., S. D. Ehrlich, y A. Gruss. 1992. Use of degenerate primers for polymerase chain reaction. Cloning and sequencing of the *Lactococcus lactis* sbsp *lactis recA* gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2674-2678.

Earl, A. M., S. K. Rankin, K.-P. Kim, O. N. Lamendola, y J. R. Battista. 2002a. Genetic evidence that the *uvrE* gene product of *Deinococcus radiodurans* R1 is a UV damage endonuclease. *J. Bacteriol.* **184**:1003-1009.

Earl, A. M., M. M. Mohundro, I. Saira Mian, y J. R. Battista. 2002b. The IrrE protein of *Deinococcus radiodurans* R1 is a novel regulator of *recA* expression. *J. Bacteriol.* **184**:6216-6224.

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

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

Ekaterina, G. F., J. Hauser, A. S. Levine, y R. Woodgate. 1993. Targeting of the UmuD, UmuD', and MucA' mutagenesis proteins to DNA by RecA protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**:8169-8173.

Fellay, R., J. Frey, y H. Kirsch. 1987. Interposon mutagenesis of soil and water bacteria: a family of DNA fragments designed for in vitro insertional mutagenesis of Gram-negative bacteria. Gene **52**:147-154

Fernández de Henestrosa, A. R., S. Calero, y J. Barbé. 1991. Expression of the *recA* gene of *Escherichia coli* in several species of gram-negative bacteria. Mol. Gen. Genetics **226**:503-506.

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

Fernández de Henestrosa, A. R., T. Ogi, S. Aoyagi, D. Chafin, J. J. Hayes, H. Ohmori, y R. Woodgate. 2000. Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. **35**:1560-1572.

Fernández de Henestrosa, A. R., J. Cuñé, I. Erill, J. K. Magnuson, y J. Barbé. 2002. A green nonsulfur bacterium, *Dehalococcoides ethenogenes*, with the LexA binding sequence found in gram-positive organisms. J. Bacteriol. **184**:6073-6080.

Fernández de Henestrosa, A. R., J. Cuñé, G. Mazón, D. A. Bazylnski, y J. Barbé. 2003. Characterization of a new LexA binding motif in the marine, magnetotactic bacterium, strain MC-1. J. Bacteriol., en prensa.

Fogh, R. H., G. Otteleben, H. Rüterjans, M. Schnarr, R. Boelens, y R. Kaptein. 1994. Solution structure of the LexA repressor DNA binding domain determined by NMR spectroscopy. EMBO J. **13**:3936-3944.

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

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

Gonzalez, M., y R. Woodgate. 2002. The “tale” of UmuD and its role in SOS mutagenesis. BioEssays **24**:141-148.

Goris, J., P. De Vos, T. Coenye, B. Hoste, D. Janssens, H. Brim, L. Diles, M. Mergeay, K. Kersters, y P. Vandamme. 2001. Classification of metal-resistant bacteria from industrial biotopes as *Ralstonia campinensis* sp. nov., *Ralstonia metallidurans* sp. nov. and *Ralstonia basilensis* Steinle *et al.* 1998 emend. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **51**:1773-1782.

Gralla, J. D. 1989. Bacterial gene regulation from distant sites. Cell **57**:193-195.

Gruber, T. M., J. A. Eisen, K. Gish, y D. A. Bryant. 1999. The phylogenetic relationships of *Chlorobium tepidum* and *Cloroflexus auranticus* based upon their RecA sequences. FEMS Microbiol. Lett. **162**:53-60.

Hajjema, B. J., D. van Sinderen, K. Winterling, J. Koositra, G. Venema, y L. W. Hamoen. 1996. Regulated expression of the *dinR* and *recA* genes during competence development and SOS induction in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. **22**:75-85.

Hanahan. D. 1988. Techniques for transformation of *Escherichia coli*. DNA cloning. Volume I. A practical approach. Practical Approach Series IRL Press. Oxford-Washington DC. Ed. D. M. Glover.

Hansen, M. T. 1978. Multiplicity of genome equivalents in the radiation-resistant bacterium *Micrococcus radiodurans*. J. Bacteriol. **134**:71-75.

Harmon, F. G., W. M. Rehrauer, y S. C. Kowalczykowski. 1996. Interaction of *Escherichia coli* RecA protein with LexA repressor. II. Inhibition of DNA strand exchange by the uncleavable LexA S119A repressor argues that recombination and SOS induction are competitive processes. J. Biol. Chem. **271**:23874-23883.

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

Herrero, M., V. de Lorenzo, y K. N. Timmis. 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. J. Bacteriol. **172**:6557-6567.

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

Horii, T., T. Ogawa, T. Nakatani, T. Hase, H. Matsubara, y H. Ogawa. 1981. Regulation of SOS functions: purification of *E. coli* LexA protein and determination of its specific site cleaved by the RecA protein. Cell **27**:515-522.

Hugenholtz, P., B. M. Goebel, y N. R. Pace. 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. J. Bacteriol. **180**:4765-4774.

Huisman, O., y R. D'Ari. 1981. An inducible DNA replication-cell division coupling mechanism in *Escherichia coli*. Nature **290**:797-799.

Jara, M., C. Núñez, S. Campoy, A. R. Fernández de Henestrosa, D. R. Lovely, y J. Barbé. 2003. The *Geobacter sulfurreducens recA* gene is not DNA damage inducible. *J. Bacteriol.* **185**, en prensa.

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

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

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

Karlin, S., y J. Mrázek. 2001. Predicted highly expressed and putative alien genes of *Deinococcus radiodurans* and implications for resistance to ionizing radiation damage. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**:5240-5245.

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

Kikuchi, M., I. Narumi, S. Kitayama, H. Watanabe, y K. Yamamoto. 1999. Genomic organization of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*: physical map and evidence for multiple replicons. *FEMS Microbiol. Lett.* **174**:151-157.

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

Kim, J.-I., A. K. Sharma, S. N. Abbott, E. A. Wood, D. W. Dwyer, A. Jambura, K. W. Minton, R. B. Inman, M. J. Daly, y M. M. Cox. 2002. RecA protein from the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus*

radiodurans: expression, purification, and characterization. J. Bacteriol. **184**:1649-1660.

Kim, J.-I., y M. M. Cox. 2002. The RecA proteins of *Deinococcus radiodurans* and *Escherichia coli* promote DNA strand exchange via inverse pathways. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99**:7917-7921.

Kitayama, S., S. Asaka, y K. Totsuka. 1983. DNA double-strand breakage and removal of cross-links in *Deinococcus radiodurans*. J. Bacteriol. **155**:1200-1207.

Knegtel, R. M. A., R. H. Fogh, G. Otteleben, H. Rüterjans, P. Dumoulin, M. Schnarr, R. Boelens, y R. Kaptein. 1995. A model for the LexA repressor DNA complex. Proteins **21**:226-236.

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

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

Kuzminov, A. 1999. Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage λ . Microbiol. Mol. Biol. Rev. **63**:751-813.

Labazi, M., A. del Rey, A. R. Fernández de Henestrosa, y J. Barbé. 1999. A consensus sequence for the *Rhodospirillaceae* SOS operators. FEMS Microbiol. Lett. **171**:37-42.

Landini, P., y M. Volkert. 1995. Transcriptional activation of the *Escherichia coli* adaptive response gene *aidB* is mediated by binding of methylated Ada protein. Evidence for a new consensus sequence for Ada-binding sites. J. Biol. Chem. **270**:947-955.

Landini, P., y M. Volkert. 2000. Regulatory responses of the adaptive response to alkylation damage: a simple regulon with complex regulatory features. *J. Bacteriol.* **182**:6543-6549.

Lee, T. C., N. T. Lin, y Y. H. Tseng. 1996. Isolation and characterization of the *recA* gene of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **221**:459-465.

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

Little, J. W., D. W. Mount, y C. R. Yanisch-Perron. 1981. Purified LexA protein is a repressor of the *recA* and *lexA* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:4199-4203.

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

Little, J. W., B. Kim, K. L. Roland, M. H. Smith, L.-L. Lin, y S. N. Slilaty. 1994. Cleavage of LexA repressor. *Methods Enzymol.* **244**:266-284.

Lobell, R. B., y R. F. Schleif. 1990. DNA looping and unlooping by AraC protein. *Science* **250**:528-532.

Love, P. E., M. J. Lyle, y R. E. Yasbin. 1985. DNA damage-inducible (*din*) loci are transcriptionally activated in competent *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:6201-6205.

Makarova, K. S., L. Aravind, Y. I. Wolf, R. L. Tatusov, K. W. Minton, E. V. Koonin, y M. J. Daly. 2001. Genome of the extremely radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* viewed from the perspective of comparative genomics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**:44-79.

Mattimore, V., y J. R. Battista. 1996. Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation. *J. Bacteriol.* **178**:633-637.

McDonald, J. P., G. F. Ekaterina, A. S. Levine, y R. Woodgate. 1998. Intermolecular cleavage by UmuD-like mutagenesis proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:1478-1483.

Michán, C., M. Machado, G. Dorado, y C. Pueyo. 1999. *In vivo* transcription of the *Escherichia coli oxyR* regulon as a function of growth phase and in response to oxidative stress. *J. Bacteriol.* **181**:2759-2764.

Miller, J. 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor N. Y.

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

Miller, M. C., J. B. Resnick, B. T. Smith, y C. M. Lovett Jr. 1996. The *Bacillus subtilis dinR* gene codes for the analogue of *Escherichia coli lexA*. *J. Biol. Chem.* **271**:33502-33508.

Minton, K. W. 1994. DNA repair in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Mol. Microbiol.* **13**:9-15.

Minton, K. W. 1996. Repair of ionizing damage in the radio resistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Mutat. Res.* **363**:1-7.

Minton, K. W., y M. J. Daly. 1995. A model for repair of radiation-induced DNA double-strand breaks in the extreme radiophile *Deinococcus radiodurans*. *BioEssays* **17**:457-464.

Movahedazdeh, F., M. J. Colston, y E. O. Davis. 1997a. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* LexA: recognition of a Cheo (*Bacillus*-type SOS) box. *Microbiology* **143**:929-936.

Movahedazdeh, F., M. J. Colston, y E. O. Davis. 1997b. Determination of DNA sequences required for regulated *Mycobacterium tuberculosis* RecA expression in response to DNA-damaging agents suggests that two modes of regulation exist. *J. Bacteriol.* **179**:3509-3518.

Mustard, J. A., y J. W. Little. 2000. Analysis of *Escherichia coli* RecA interactions with LexA, λ CI, and UmuD by site-directed mutagenesis of *recA*. *J. Bacteriol.* **182**:1659-1670.

Narumi, I., K. Cherdchu, S. Kitayama, y H. Watanabe. 1997. The *Deinococcus radiodurans* *uvrA* gene: identification of mutation sites in two mitomycin-sensitive strains and the first discovery of insertion sequence element from deinobacteria. *Gene* **198**:115-126.

Narumi, I., K. Satoh, M. Kikuchi, T. Funayama, S. Kitayama, T. Yanagisawa, H. Watanabe, y K. Yamamoto. 1999. Molecular analysis of the *Deinococcus radiodurans* *recA* locus and identification of a mutation site in a DNA repair-deficient mutant, *rec30*. *Mutat. Res.* **435**:233-243.

Narumi, I., K. Satoh, M. Kikuchi, T. Funayama, T. Yanagisawa, Y. Kobayashi, H. Watanabe, y K. Yamamoto. 2001. The LexA protein from *Deinococcus radiodurans* is not involved in RecA induction following γ irradiation. *J. Bacteriol.* **183**:6951-6956.

Nohmi, T., J. R. Battista, L. A. Dodson, y G. C. Walker. 1988. RecA-mediated cleavage activates UmuD mutagenesis: mechanistic relationship between transcriptional derepression and posttranslational activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:1816-1820.

Ogawa, T., H. Wabiko, T. Tsurimoto, T. Horii, H. Masukata, y H. Ogawa. 1979. Characteristics of purified RecA protein and the regulation of its synthesis *in vitro*. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **43**:909-915.

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

Parales, R. E., y C. S. Harwood. 1993. Construction and use of a new broad-host-range *lacZ* transcriptional fusion vector, pHRP309, from gram-bacteria. Gene **133**:23-30.

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

Quandt, J., y M. F. Hynes. 1993. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. Gene **127**:15-21.

Raj, H. D., F. L. Duryee, A. M. Deeney, C. H. Wang, A. W. Anderson, y P. R. Elliker. 1960. Utilization of carbohydrates and amino acids by *Micrococcus radiodurans*. Can. J. Microbiol. **6**:289-298.

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

Rehrauer, W. M., P. E. Lavery, E. L. Palmer, R. N. Singh, y S. C. Kowalczykowski. 1996. Interaction of *Escherichia coli* RecA protein with LexA repressor. I. LexA repressor cleavage is competitive with binding of a secondary DNA molecule. J. Biol. Chem. **271**:23865-23873.

Rehrauer, W. M., I. Bruck, R. Woodgate, M. F. Goodman, y S. C. Kowalczykowski. 1998. Modulation of RecA nucleoprotein function by the mutagenic UmuD'C protein complex. J. Biol. Chem. **273**:32384-32387.

Reuven, N. B., G. Arad, A. Z. Stasiak, A. Stasiak, y Z. Livneh. 2001. Lesion bypass by the *Escherichia coli* DNA polymerase V requires assembly of a RecA nucleoprotein filament. *J. Biol. Chem.* **276**:5511-5517.

Riera, J., y J. Barbé. 1993. Sequence of the *Providencia rettgeri* *lexA* gene and its control region. *Nucleic Acids Res.* **25**:2256.

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

Rivera, E., L. Vila, y J. Barbé. 1996. The *uvrB* gene of *Pseudomonas aeruginosa* is not DNA damage inducible. *J. Bacteriol.* **178**:5550-5554.

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

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

Roland K. L., M. H. Smith, J. A. Rupley, y J. W. Little. 1992. *In vitro* analysis of mutant LexA protein with an increased rate of specific cleavage. *J. Mol. Biol.* **228**:395-408.

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

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

Sanger, J., S. Nicklen, y S. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:5463-5467.

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

Sassanfar, M., y J. W. Roberts. 1990. Nature of the SOS-inducing signal in *Escherichia coli*. The involvement of DNA replication. *J. Mol. Biol.* **212**:79-96.

Satoh. K., I, Narumi, M. Kikuchi, S. Kitayama, T. Yanagisawa, K. Yamamoto, y H. Watanabe. 2002. Characterization of RecA424 and RecA 670 proteins from *Deinococcus radiodurans*. *J. Biochem.* **131**:121-129.

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

Schnarr, M., P. Oertel-Buchheit, M. Kazmaier, y M. Granger-Schnarr. 1991. DNA binding properties of the LexA repressor. *Biochimie* **73**:423-431.

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

Shigekawa, K., y W. J. Dower. 1988. Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: a general approach to the introduction of macromolecules into cells. *BioTechniques* **6**:742-751.

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

Slilaty, S. N., y H. K. Vu. 1991. The role of electrostatic interactions in the mechanism of the peptide bond hydrolysis by Ser-Lys catalytic dyad. *Protein Eng.* **4**:919-922.

Simon, R., U. Priefer, y A. Pühler. 1983. A broad host range mobilization systems for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/technology* **1**:784-791.

Smith, B. T., y G. C. Walker. 1998. Mutagenesis and more: *umuDC* and the *Escherichia coli* SOS response. *Genetics* **148**:1599-1610.

Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**:503-517.

Story, R. M., I. T. Weber, y T. A. Steitz. 1992. The structure of the *Escherichia coli* RecA protein monomer and polymer. *Nature* **355**:318-325.

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

Tapias, A., A. R. Fernández de Henestrosa y J. Barbé. 1997. Characterization of the promoter of the *Rhizobium etli* *recA* gene. *J. Bacteriol.* **179**:1573-1579.

Tapias, A., y J. Barbé. 1999. Regulation of divergent transcription from the *uvrA-ssb* promoters in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol. Gen. Genet.* **262**:121-130.

Tapias, A., S. Fernández, J. C. Alonso, y J. Barbé. 2002. *Rhodobacter sphaeroides* LexA dual activity: optimising and repressing *recA* gene transcription. *Nucleic Acids Res.* **30**:1539-1546.

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

Thliveris, A. T., y D. W. Mount. 1992. Genetic identification of the DNA binding domain of *Escherichia coli* LexA protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:4500-4504.

Tirgari, S., y B. E. B. Moseley. 1980. Transformation in *Micrococcus radiodurans*: measurements of various parameters and evidence for multiple, independently segregating genomes per cell. *J. Gen. Microbiol.* **119**:287-296.

Udupa, K. S., P. A. O'Cain, V. Mattimore, y J. R. Battista. 1994. Novel ionizing radiation-sensitive mutants. *J. Bacteriol.* **176**:7439-7446.

Venkateswaran, A., S. C. McFarlan, D. Ghosal, K. W. Minton, A. Vasilenko, K. Makarova, L. P. Wackett, y M. J. Daly. 2000. Physiologic determinants of radiation resistance in *Deinococcus radiodurans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:2620-2626.

Volodin, A. A., y R. D. Camerini-Otero. 2002. Influence of DNA sequence on the positioning of RecA monomers in RecA-DNA cofilaments. *J. Biol. Chem.* **277**:1614-1618.

Voloshin, O. N., B. E. Ramirez, A. Bax, y R. D. Camerini Otero. 2001. A model for the abrogation of the SOS response by an SOS protein: a negatively charged helix in DinI mimics DNA in its interaction with RecA. *Genes Dev.* **15**:415-427.

Von Gabin, A., J. G. Belasco, J. L. Schottel, A. C. Y. Chang, y S. N. Cohen. 1983. Decay of mRNA in *Escherichia coli*: investigation of the fate of specific segments of transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:653-657.

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

Walker, G. C. 1996. The SOS response of *Escherichia coli*, p. 1400-1416. En F. C. Neidhardt, R. Curtis III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, y H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, 2a. ed. American Society of Microbiology Press, Washington D. C.

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

Wertman, K. F., y D. Mount. 1985. Nucleotide sequence binding specificity of the LexA repressor of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **163**:376-384.

Wetmur, J., D. M. Wong, B. Ortiz, J. Tong, F. Reichert, y D. H. Gelfand. 1994. Cloning, sequencing, and expression of RecA proteins from three distantly related thermophilic eubacteria. *J. Biol. Chem.* **269**:25928-25935.

Whitby, M. C., y R. G. Loyd. 1999. Altered SOS induction associated with mutations in *recF*, *recO* and *recR*. *Mol. Gen. Genet.* **246**:174-179.

White, O., J. A. Eisen, J. F. Heidelberg, E. K. Hickey, J. D. Peterson, R. J. Dodson, D. H. Haft, M. L. Gwinn, W. C. Nelson, D. L. Richardson, K. S. Moffat, H. Qin, L. Jiang, W. Pamphile, M. Crosby, M. Shen, J. J. Vamathevan, P. Lam, L. McDonald, T. Utterback, C. Zalewski, K. S. Makarova, L. Aravind, M. J. Daly, K. W. Minton, R. D. Fleischmann, K. A. Ketchum, K. E. Nelson, S. Salzberg, H. O. Smith, J. C. Venter, y C. M. Fraiser. 1999. Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Science* **286**:1571-1577.

Winterling, K. W., A. S. Levine, R. E. Yasbin, y R. Woodgate. 1997. Characterization of DinR, the *Bacillus subtilis* SOS repressor. *J. Bacteriol.* **179**:1698-1703.

Winterling, K. W., D. Chafin, J. J. Hayes, J. Sun, A. S. Levine, R. E. Yasbin, y R. Woodgate. 1998. The *Bacillus subtilis* DinR binding site: redefinition of the consensus sequence. *J. Bacteriol.* **180**:2201-2211.

Yabuuchi, E., Y. Kosako, I. Yano, H. Hotta, y Y. Nishiuchi. 1995. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb.

nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. Microbiol. Immunol. **39**:897-904.

Yasbin, R. E., D. L. Cheo, y K. W. Bayles. 1992. Inducible DNA repair and differentiation in *Bacillus subtilis*. Interactions between global regulons. Mol. Microbiol. **6**:1263-1270.

Yasuda, T., K. Morimatsu, R. Kato, J. Usukura, M. Takahashi, y H. Ohmori. 2001. Physical interactions between DinI and RecA nucleoprotein filament for the regulation of SOS mutagenesis. EMBO J. **20**:1192-1202.

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

Zheng, M., B. Doan, T. D. Schneider, y G. Stolz. 1999. OxyR and SoxRS regulation of *fur*. J. Bacteriol. **181**:4639-4643.

Agradecimientos

Llegado a este punto realmente me doy cuenta de lo afortunada que he sido al haber tenido la oportunidad de poder cumplir esta ilusión, y no solamente me refiero a poder haber concluido esta importante etapa de formación sino de haber comprobado por mis propios ojos que siempre hay algo más que conocer en este mundo, lo cual no habría sido más que un sueño sin la ayuda y apoyo de muchísima gente.

La realización de este trabajo ha sido en parte gracias a la concesión de una beca dentro del programa Mutis de la Agencia Española de Cooperación Internacional, para realizar estudios de Doctorado en España.

Quiero agradecer sinceramente a la Dra. Montserrat Llagostera, Directora de esta Tesis y la persona que me dio la oportunidad de entrar a formar parte de este grupo de investigación y que ha permitido la prolongación de mi estancia aquí hasta haber conseguido, con su valiosa ayuda, el objetivo de concluir este trabajo.

Al Dr. Jordi Barbé que junto con la Dra. Llagostera dirigen el grupo de investigación de Microbiología Molecular del Departament de Genètica i Microbiologia de la Universitat Autònoma de Barcelona, por haberme concedido la oportunidad de introducirme en este tema y realizar el presente trabajo.

Mi profundo agradecimiento a todas las personas con las que he compartido tantas cosas en el Grupo de Microbiología Molecular.

En primer lugar a Montse Bosch, la persona más lista e inteligente que he conocido en mi vida y que ha estado desde mis primeros días en este laboratorio ayudándome y enseñándome constantemente de una forma totalmente desinteresada, con quien he compartido algunos de los mejores momentos durante estos años. Gracias de corazón Montse creo que sin tu ayuda, amistad, sinceridad y presencia las cosas hubieran sido muy diferentes.

Ahora, quiero agradecer a toda la gente con la que compartí desde mis primeros años en el laboratorio. Raül y Maribel, siempre dispuestos a ayudar y de los que aprendí tantas cosas dentro y fuera del laboratorio. Susana, gracias por tu amistad y apoyo y por haber permitido que me sienta como en mi casa junto a TODA tu familia. Alfonso, que pena no haberme atrevido a conocerte antes y gracias por dejarme aprovechar estos últimos años para ver tu lado "humano" y por supuesto por tu valioso tiempo empleado para introducirme en el mundo de los retards y de las prácticas. Toni, que casi siempre encuentra una solución para las cosas, gracias por tus consejos y ayuda, que tengas suerte en Madrid.

Los más antiguos con los que coincidí menos tiempo pero que siempre estuvieron dispuestos a compartir sus conocimientos y experiencia en el laboratorio como José Antonio (con quien empecé), Àngels (con todo lo que sabe de tantos temas), Rodri (que me introdujo en el mundo de los Ames), Calín (el peruano al que más cariño tengo), David (y su alegría) y Mar (siempre taaaan buena).

Y ahora, a los que fueron llegando después de mí. Gracias Núria por todo el apoyo que me has dado desde que nos conocimos, sobretodo en estos últimos momentos de la tesis; ya sabes que siempre habrá algún destino esperándonos, conserva tus ilusiones y mira el lado más positivo de las cosas. Eleni, la hija que toda madre quisiera tener, sigue así que lo haces estupendamente, gracias por tu dulzura.

Gerard por tu apoyo y consejos en mis crisis, no solamente, con los geles. Montse R., con quien he estado hombro a hombro mucho tiempo, en la poyata, en las colas cap a l'Autònoma, revelando a obscuras, marcando en Genética, en Veterinaria, etc., ya lo tienes! Gracias a la Dra. Cortés, Pilar para los amigos, por el trabajo realizado en parte de esta tesis y lástima no tener más tiempo para absorber tus conocimientos. Mirle un ejemplo de decisión y de saber aprovechar lo que se tiene, manteniendo en todo momento esa fuerza y buen humor (Viva Latinoamérica y Silvio!). Anna, la ALEGRIA DEL LAB!!!!., estás en unas buenas manos y tienes todo por delante. José, espero que puedas alcanzar tu fin lo más pronto posible. A Mónica (en su mundo, pero presente cuando hace falta), Jordi Cuñé tan tímido y tan poco tímido y los fichajes más recientes Vanessa, Marc y René.

Un agradecimiento especial a Joan, no solamente por ser el más eficiente técnico especialista que he conocido, sino por TODO lo que has hecho por mí.

No puedo dejar de acordarme de gente que estuvo en el laboratorio y que dejaron buenos recuerdos especialmente Xavi (tu alcanzarás lo que quieras, siendo como eres) y también Ricardo, Susana Escribano, Mohamed, Sandra, Manel y por su puesto, la Sra. Virginia. Gracias también al resto de la gente de la Unidad, en especial a Isabel (por aquel año viviendo en Sant Cugat), todos los profes de prácticas: Marc, Teresa, Olga, Raquel, Ana, Maira, Esther, Toni, etc.... a Núria y Lidia y a las secres Julia y Conchi.

A mis amigas Katya, Peggy y Nati que están tan lejos pero es como que estuvieran aquí siempre y nunca me dejan sola, a Pat y Munsa por tantas locuras juntas, quienes estuvieron siempre a mi lado desde que llegué! Y a Karla y Maite, por este último tiempo en el piset.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador y a todos los profesores y amigos con los que me inicié en el mundo de la ciencia, así como a la gente de la Escuela Politécnica Nacional, especialmente al Ing. Ricardo Muñoz y Jacqueline Estévez.

Por último y más que a nadie en el mundo a toda mi familia, a mis abuelitos, a mis tíos y primos y sobretodo a mis hermanos Pablo (siempre tan pendiente de que no me falte nada) y Juan Carlos (nada puede romper lo que hay desde que éramos chiquitos) y prácticamente también Estela; a Olga y Myriam; a mis sobrinos Mateo y Emilia, Mae e Isabela (espero que valga la pena haberme perdido el verlos crecer); como no, gracias también a Marian, Gabriel (por dejarme ir para cumplir mi sueño) y sus familias; y todo mi agradecimiento a mis papis, Pedro y Cecilia, que han sabido darnos todo sin pensar ni un momento en sí mismos, por su paciencia, cariño, ejemplo, apoyo y amor a todas horas.

Danke Bernd für alles was Du mir in diese Monaten gegeben hast. Obwohl wir noch nicht ganz zusammen sein können, wird alles in meinem Leben immer einfacher, schöner und sinnvoller, wenn Du mit mir bist.

Aunque esto no suene muy científico no puedo dejar de dar gracias a Dios por darme la oportunidad de vivir cada día.....y de que manera! Finalmente, sólo un pequeño pensamiento a mis montañas, los Andes, y a mi Quito en Ecuador; i quina sort poder haber viscut a Catalunya, per tot el que significa per mi i perquè és molt més que un petit país entre els Pirineus i el Mediterrani.