

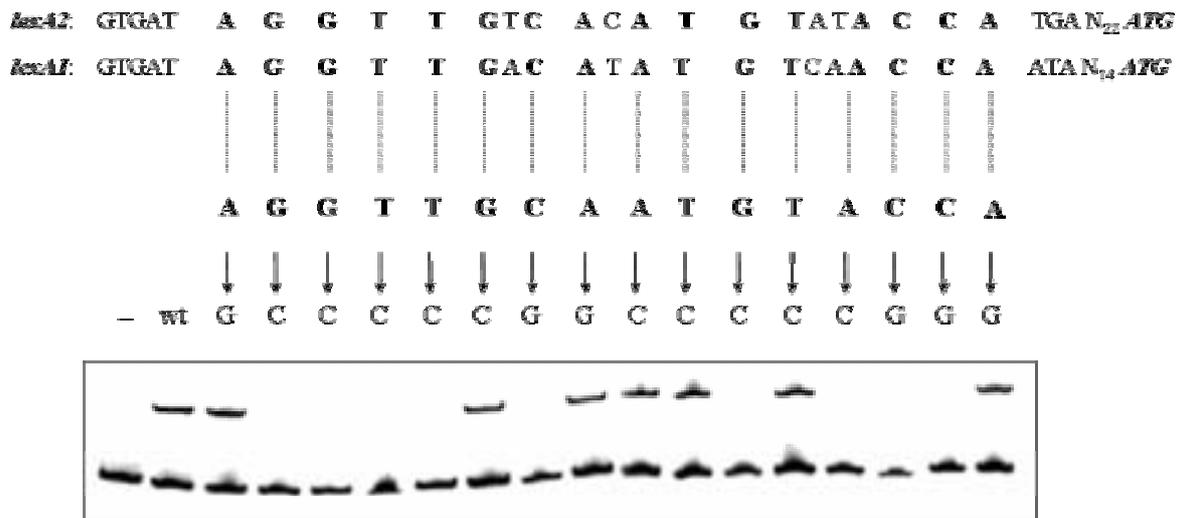
Figura 3.4. (A) Diagrama donde se representan los fragmentos amplificados del promotor *lexA1* de *G. sulfurreducens* usados en los experimentos de movilidad electroforética. En todos los casos, las posiciones se indican con respecto al punto de inicio de traducción del gen *lexA* de *G. sulfurreducens*. (B) Movilidad electroforética de los fragmentos LexA1.1, LexA1.2, LexA1.3, LexA1.4 y LexA1.3mut en presencia (+) o ausencia (-) de 40 ng de la proteína LexA1 de *G. sulfurreducens* purificada.

Partiendo de estos datos, se realizó un análisis buscando un hipotético motivo de unión (repeticiones inversas o directas) en la región comprendida entre la posición -34 y el codón ATG de inicio de traducción del gen y se encontró un motivo palindrómico GGTTGACATATGTCAACC situado a 44 pb del codón iniciador. Para estudiar si este motivo formaba parte de la caja LexA se amplificó el fragmento LexA1.3mut, mediante los oligonucleótidos LexA1-41+CCCC, que introducía cuatro citosinas entre los submotivos internos GACAT y ATGTC, y el LexA1+48dig, marcado con digoxigenina. Como resultado se

obtuvo un fragmento de 93 pb con el que se realizó el ensayo EMSA (Fig.3.4B). Este fragmento no retardó en presencia de la proteína, lo que indicaba que la inserción de cuatro citosinas en medio del palíndrome mencionado deshacía la unión. Esto junto al hecho de que una secuencia muy parecida a este palíndrome está presente en la región anterior del gen *lexA2* (Fig.3.5) nos señaló a este motivo como posible caja LexA.

A continuación se usó el fragmento LexA1.3 para introducir mutaciones puntuales en cada nucleótido del palíndrome conservado en ambos promotores *lexA* y en las bases circundantes, para determinar cuales estaban implicados en la reacción de unión de LexA1 (Fig.3.5). Para introducir las mutaciones se usaron los oligonucleótidos del LexA1.1 al LexA1.16 indicados en la Tabla 2.2.

Los datos obtenidos indicaron que LexA1 de *G. sulfurreducens* y, consecuentemente, LexA2, se unen al motivo GGTTNNCNNNNGNNNACC. Además, un examen de la región anterior al promotor *lexA* de *G. metallireducens* reveló la presencia de esta misma secuencia. Todos estos datos permitieron designar a este palíndrome imperfecto como la caja LexA del género *Geobacter*.



Secuencia consenso: GGTTNNCNNNNGNNNACC

Figura 3.5. Efecto de la mutagénesis en la posible caja LexA de *G. sulfurreducens* y sus nucleótidos circundantes en la movilidad electroforética del fragmento LexA1.3 en presencia de 40 ng de proteína LexA1 purificada. La movilidad del fragmento LexA1.3 salvaje en ausencia (-) o en presencia (+) de la misma cantidad de proteína LexA de *G. sulfurreducens* purificada también se muestra como control. Los codones de inicio de la traducción de los genes *lexA1* y *lexA2* se indican en cursiva y negrita.

3.2. La caja LexA de *Fusobacterium nucleatum*

A pesar de tratarse de un bacilo gram negativo algunos autores le han atribuido características típicas de bacterias gram positivas (Kapatral *et al.*, 2002). Por este motivo, y de cara a averiguar si su regulón LexA era similar a gram positivos o negativos, se propuso clonar su gen *lexA* e identificar su secuencia de unión al DNA.

3.2.1. Clonación y secuenciación del gen *lexA*

El gen *lexA* de *F. nucleatum* se identificó mediante búsqueda TBLASTN a partir de su secuencia genómica preliminar (<http://www.tigr.org>) usando la proteína LexA de *E. coli* como muestra. Se detectó una secuencia con homología significativa y se procedió a su amplificación mediante los oligonucleótidos LexAup y LexAdw, con los que se obtuvo una región que contenía el gen *lexA* y 345 pb de su región promotora. A continuación el fragmento resultante, de 1005 pb, fue clonado en el vector pGEM-T³ y, al igual que en los casos anteriores, secuenciado utilizando los oligonucleótidos Direct-Cy5 y Reverse-Cy5.

El siguiente paso fue estudiar el gen *lexA* de este microorganismo e intentar localizar en su región promotora algún motivo de unión de la proteína LexA. Al igual que en el caso de *G. sulfurreducens*, para la realización de este tipo de trabajo se requería gran cantidad de proteína LexA, por lo que se procedió a su sobreexpresión y purificación mediante el vector pGEX-4T-1.

Para conseguirlo se amplificó la secuencia codificante mediante los plásmidos LexA*EcoRI* y LexA*Sall* y, de forma análoga a lo descrito para *G. sulfurreducens*, se obtuvo la proteína purificada (Fig.3.6).

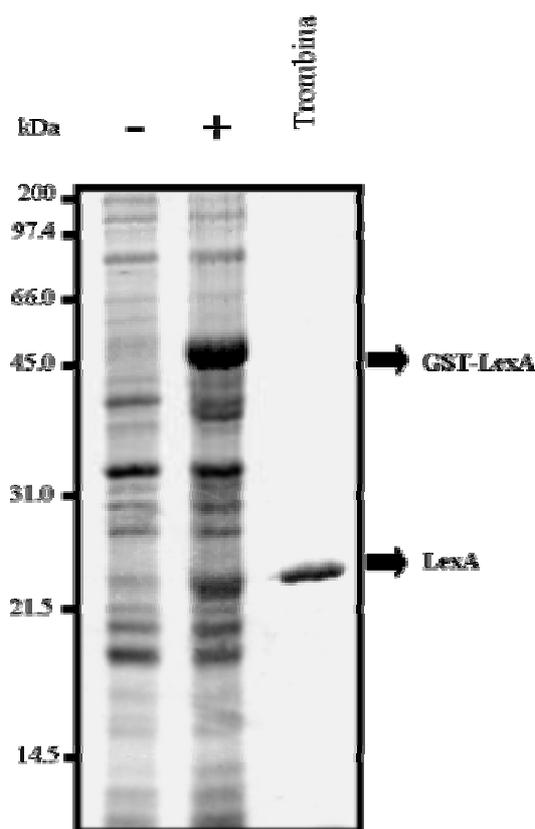


Figura 3.6. Sobreexpresión y purificación de la proteína de *F. nucleatum* en *E. coli*. Las muestras fueron visualizadas en un gel de poliacrilamida SDS al 13%. En la imagen se presentan extractos crudos de células de *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) llevando el plásmido pGEX-4T-1LexA en ausencia (-) o en presencia (+) de IPTG. También se observa la proteína LexA purificada. El marcador de peso molecular está indicado en el lado izquierdo de la imagen en kilodaltons.

3.2.2. Identificación de la caja de unión a DNA de la proteína LexA

Una vez obtenida la proteína LexA purificada, se procedió a amplificar parte de la región promotora del gen *lexA* de *F. nucleatum* mediante los oligonucleótidos LexA-188 y LexA+65dig marcado con digoxigenina. El fragmento resultante, llamado LexA1, se usó en ensayos de movilidad electroforética en presencia y en ausencia de la proteína, así como en presencia de competidor tanto específico (el mismo fragmento del promotor *lexA* pero sin marcar con digoxigenina) como inespecífico (pGEM-T) (Fig.3.7).

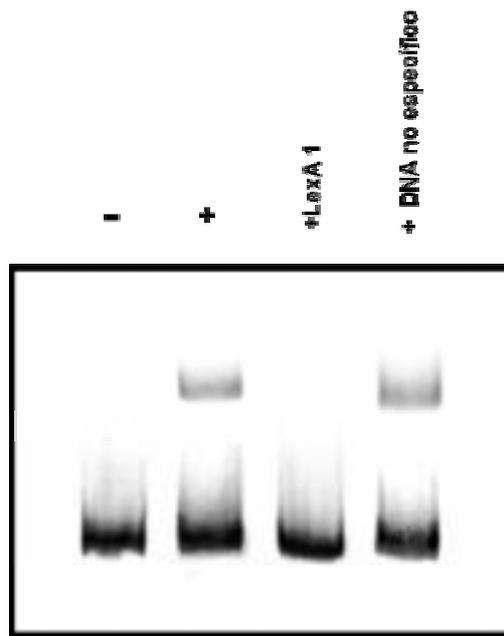


Figura 3.7. Movilidad electroforética del promotor *lexA* en presencia de 40 ng de la proteína LexA purificada. Asimismo, se observa el efecto en la migración del promotor de un exceso tanto de fragmento LexA1 (competidor específico), como de pGEM-T (competidor no específico).

Tal y como se observa en la Figura 3.7, la proteína LexA se une específicamente a su propio promotor. A continuación, se procedió, como en el caso de *G. sulfurreducens*, a acotar y definir en detalle el motivo de unión mediante la obtención de fragmentos del promotor de diferente longitud. Para ello se amplificaron por PCR los fragmentos LexAA, LexAB, LexAC, LexAD y LexAE (Fig.3.8) mediante los oligonucleótidos LexA-188, LexA-113, LexA-63, LexA-40, LexA-24 y LexA+65dig, y cuyos productos, fragmentos de 253, 178, 128, 105 y 89 pb respectivamente, se utilizaron en ensayos EMSA (Fig.3.8).

Dichos ensayos muestran que la banda de retraso electroforético se mantiene al utilizar los fragmentos de DNA LexA1, LexA2, LexA3 y LexA4. En cambio, dicho retraso deja de existir con el fragmento LexAC, lo que nos indica que éste ya no contiene el motivo de unión completo.

Una vez delimitada la región de unión se procedió a realizar un ensayo de protección de la DNAsal o *footprinting*, usando un fragmento del promotor de *lexA* comprendido entre la posición -100 y la +65 (Fig.3.9). Dicho fragmento se obtuvo mediante los oligonucleótidos LexA-100 y LexA+65, dando como resultado una banda de 165 pb. Tal y como se observa en la Figura 3.9, el ensayo mostró protección en la región comprendida entre las posiciones -41 y -13 de ambas cadenas. Una búsqueda de motivos de unión potenciales (repeticiones inversas o directas) en esta zona reveló la presencia de la repetición invertida TGTA N₁₂ TACA.