

2. RESULTATS I DISCUSSIÓ

2. Resultats i discussió

2.1. Identificació de la caixa d'unió de LexA a *Xylella fastidiosa* (Article I)

2.1.1. Clonació del gen *lexA* de *X. fastidiosa* i sobreexpressió del seu producte

El gen *lexA* de *X. fastidiosa* va ser amplificat utilitzant els oligonucleòtids LexAup (-273 a -252) i LexAdw (+706 a +726) en una reacció de PCR sobre DNA cromosòmic total de la soca de *Xylella fastidiosa* CVC 9a5c. Es va obtenir un producte de PCR de 999 pb, que va ser clonat al vector pGEM-T i comprovat per seqüenciació. El plàsmid resultant (pUA945) va ser utilitzat com a motlle per a posteriors reaccions d'amplificació.

Per procedir a la sobreexpressió del gen *lexA* de *X. fastidiosa*, aquest es va amplificar amb els oligonucleòtids LexANdeI i LexABamHI i es va clonar el producte de la PCR a pGEM-T. El triplet origen de traducció de la proteïna LexA (ATG) forma part de la diana NdeI de l'oligonucleòtid LexANdeI i ens permet que el marc de lectura de LexA estigui en fase amb una cua d'histidines codificada al vector pET15b (Novagene). Aquesta cua permet la purificació de la proteïna amb columnes d'afinitat. Mitjançant la restricció amb NdeI i BamHI es va obtenir l'ORF de *lexA* flanquejat per aquestes dues dianes de restricció i es va construir el derivat de pET15b amb l'ORF de *lexA* en fase amb la cua de 6 histidines (pUA973). Un cop transformada a *E. coli* DH5 i comprovada la seqüència de la construcció, aquesta es va utilitzar per sobreexpressar la proteïna de fusió de LexA en les cèl·lules d'*E. coli* BL21 (λ DE3) Codon Plus amb l'addició d'IPTG a una concentració final de 10 mM en un cultiu a la densitat òptica de 0,8. Després d'una incubació addicional de 2 hores, les cèl·lules es van recollir per centrifugació, descartant el sobrenedant, i van ser resuspeses en tampó “washing buffer” (pH 7.4) amb la presència d'inhibidors de proteases “Complete mini sense EDTA” (Roche). Aquesta suspensió es va sonicar, obtenint-se un sobrenedant de sonicació amb la proteïna LexA soluble. Posteriorment, la proteïna obtinguda va ser purificada utilitzant el sistema d'afinitat de columna “TalonTM Metal Affinity Resin Kit (Clontech)”. Seguint aquest procediment i com es va

determinar en gels de SDS-PAGE al 15% (Fig. 2.1), es va aconseguir una proteïna LexA amb un 95 % de puresa.

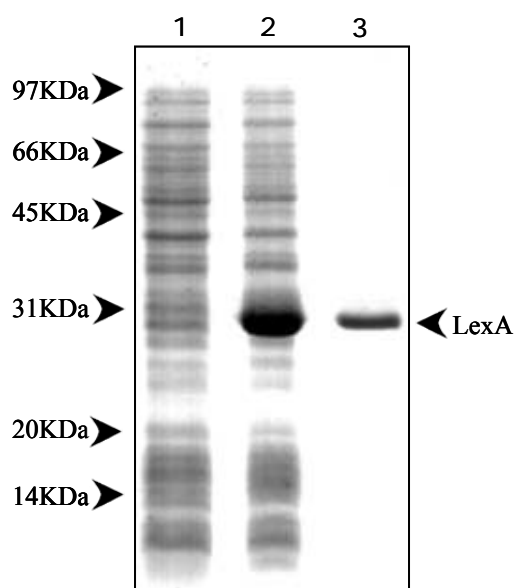


Fig. 2.1. Sobreexpressió i purificació de la proteïna LexA de *X. fastidiosa*. Gel SDS-PAGE al 15% on es poden veure les mostres de l'extracte de la soca BL21(λ DE3)/pUA973 en absència o presència d'IPTG (carrils 1 i 2 respectivament). Al carril 3 es pot veure la proteïna LexA purificada mitjançant una columna d'afinitat amb Co^{2+} . A l'esquerra del gel es mostren les masses moleculars del marcador.

2.1.2. Anàlisi transcripcional de *lexA* a *X. fastidiosa*

A *X. fastidiosa* el gen *lexA* es troba just davant del gen *recA*. Per establir si ambdós gens formen una unitat transcripcional i, per tant, són regulats des del mateix promotor, es van realitzar estudis de RT-PCR de l'operó *lexA-recA*. Aquests estudis ens van permetre determinar que ambdós gens constitueixen una unitat policistrònica. Una reacció de RT-PCR amb els primers RecAup i RecAdw (situats 111 pb per sobre del codó stop de *lexA* i 60 pb per sota de l'inici de traducció de *recA* respectivament) utilitzant com a motlle RNA total de *X. fastidiosa* dona lloc a l'amplificació d'una banda, que evidencia la presència d'un únic missatger per ambdós gens. (Fig. 2.2)

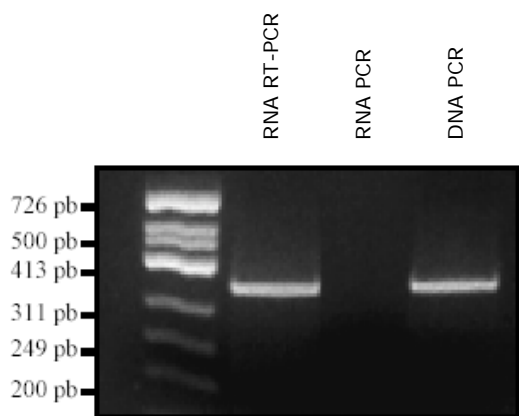


Fig. 2.2. Assaig de RT-PCR per estudiar la transcripció de l'operó *lexA-recA*. Es pot veure el gel d'agarosa al 3% on es mostra el resultat de la RT-PCR utilitzant els primers RecAup i RecAdw en presència de RNA total (RNA RT-PCR) i així mateix, com a controls, la reacció de PCR amb el mateix RNA total (RNA PCR) o utilitzant DNA cromosòmic com a motlle (DNA PCR). A l'esquerra està indicat el tamany dels fragments del marcador.

2.1.3. Estudis de la mobilitat electroforètica del promotor *lexA* de *X. fastidiosa*

Amb la proteïna LexA purificada de *X. fastidiosa* es van realitzar assaigs de mobilitat electroforètica (EMSAs) del promotor de l'operó *lexA-recA*. Un primer assaig ens va permetre determinar la presència d'un retard electroforètic de la mobilitat del promotor, amb l'aparició d'una banda d'intensitat creixent de manera proporcional a les concentracions de proteïna afegides a la reacció. L'addició d'un excés molar de competidor específic, promotor de *lexA* sense marcar, és capaç de desplaçar la banda de retard electroforètic deguda a la unió de LexA, efecte que no s'observa quan utilitzem un DNA inespecífic com ara el plàsmid pBSK+ (Fig. 2.3). Per tant, la unió es produeix a un motiu present al promotor de *lexA* i no de manera inespecífica amb el DNA.

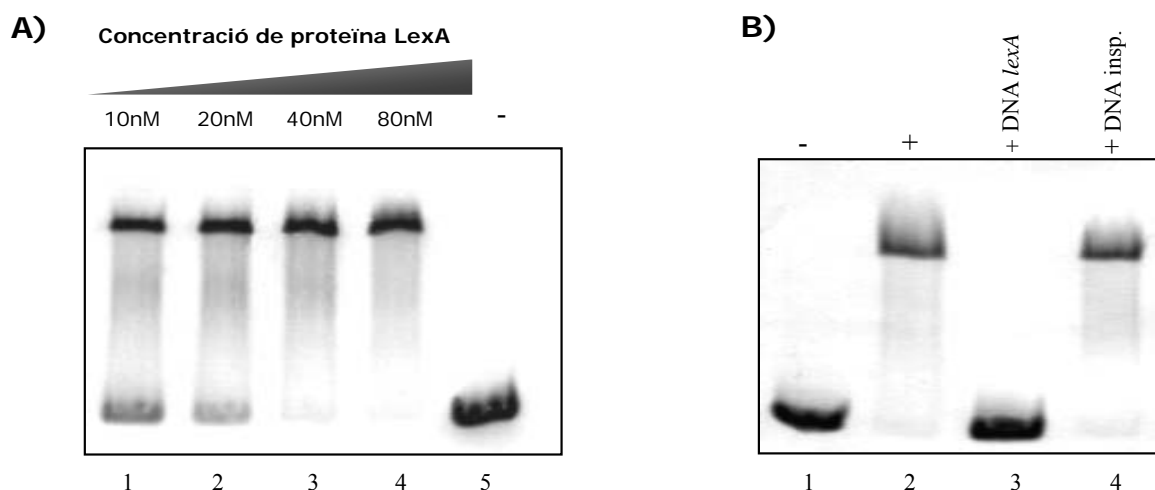


Fig. 2.3. A) EMSA amb un fragment del promotor del gen *lexA* de *X. fastidiosa* en presència de quantitats creixents de proteïna (carrils 1 a 4) i mobilitat del fragment sense l'addició de proteïna LexA (carril 5). Es pot observar l'aparició d'una banda de mobilitat retardada. B) Efecte de l'addició d'un excés molar de competidor específic a la mobilitat del fragment de promotor de *lexA* de *X. fastidiosa* (carril 3) així com de l'addició de DNA inespecífic (carril 4). També es mostra com a controls la mobilitat del fragment en absència de proteïna (-) i en presència d'aquesta a 40 nM (+).

Un cop determinada la capacitat d'unió de LexA al promotor de l'operó *lexA-recA*, es van dirigir els assaigs a l'acotament de la regió mínima d'aquest promotor necessària per a la unió estable de LexA a la seva regió operadora. Amb aquest objectiu, es va fraccionar el promotor en 4 fragments de diferents tamanys (LexA1 a LexA4) i es va provar la seva capacitat d'unió a la proteïna. Aquesta unió es va detectar tan sols als tres primers fragments, desapareixent la banda

de retard electroforètic quan el fragment utilitzat era LexA4 (situat a -10 de l'inici de traducció) (Fig. 2.4). Per tant, tenint en compte que la unió es produeix al fragment LexA3 (situat a -25 de l'inici de traducció) i ja no es detecta al fragment LexA4, la regió a la qual es situa la caixa d'unió de LexA a *X. fastidiosa* està compresa, almenys en part, entre aquestes dues posicions (-25 i -10).

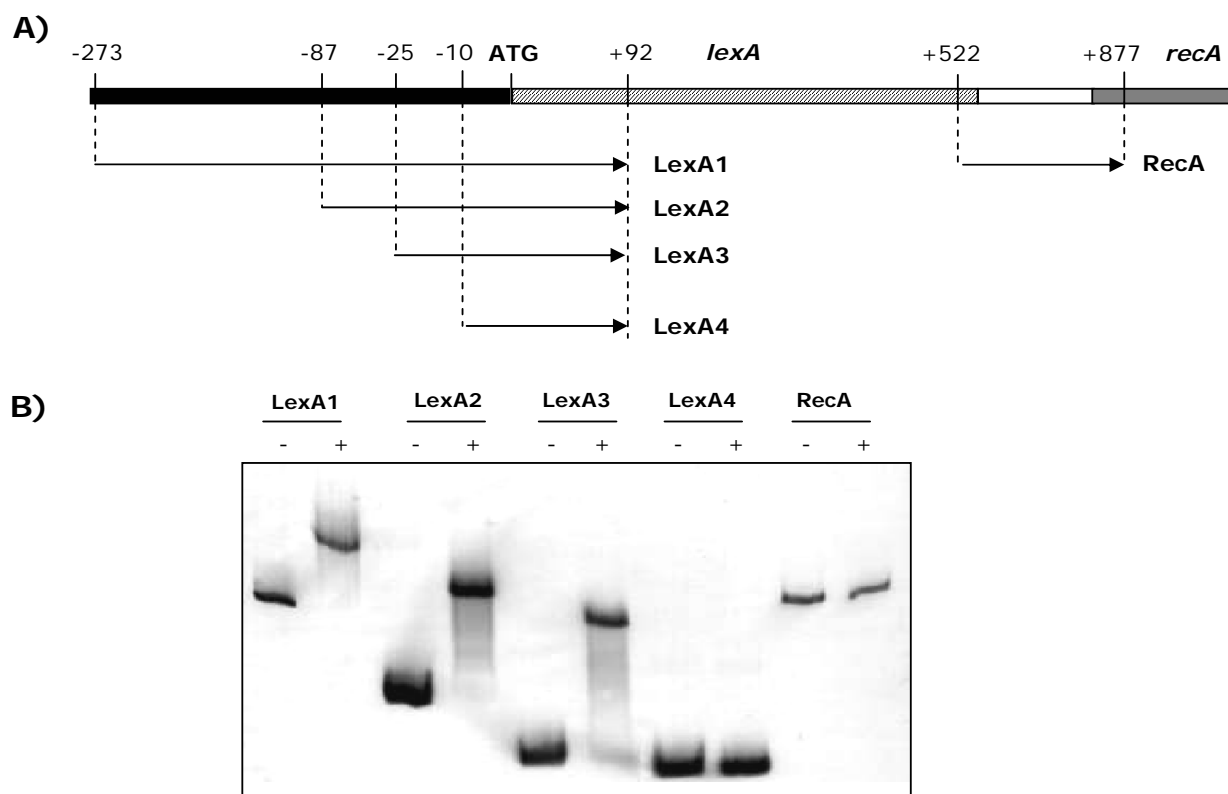


Fig. 2.4. A) Diagrama explicatiu on trobem representats els fragments utilitzats als EMSA amb les seves posicions respecte l'inici de traducció de *lexA*. B) EMSA amb els fragments LexA1-LexA4 i RecA en presència (+) o absència (-) de proteïna LexA pura de *X. fastidiosa* a 40 nM.

Una inspecció visual d'aquesta regió mínima ens va mostrar la presència d'un motiu palindròmic (TTAGTAATAACTAA) centrat a la posició -11. Per determinar si aquest motiu era realment la caixa LexA de *X. fastidiosa*, es van dissenyar oligonucleòtids per realitzar mutacions tant a la dreta com a l'esquerra de l'eix de simetria del palíndrom (TTAG → ACCA i CTA → AAGG) i, així mateix, es va dissenyar una inserció per incrementar la distància entre els seus dos motius. L'EMSA amb aquests fragments va mostrar la pèrdua total de la unió de

LexA quan es realitzen aquests canvis al palíndrom (Fig. 2.5). Per tant aquest palíndrom és el motiu reconegut per LexA de manera específica.

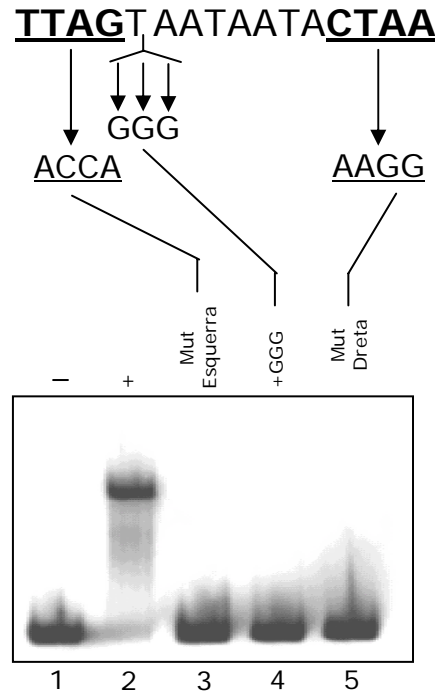


Fig. 2.5. Mobilitat electroforètica dels fragments mutants derivats de LexA3 amb les substitucions TTAG → ACCA (Mut esquerra) i CTAA → AAGG (Mut Dreta) al motiu palindròmic així com la inserció de 3pb (+GGG). Es mostra també la mobilitat del fragment LexA3 en presència (+) i en absència (-) de proteïna LexA a 40 nM.

2.1.4. Efecte a la unió de la proteïna LexA de mutacions puntuals a la zona operadora

Un cop determinat el palíndrom TTAGTAATAACTAA com a motiu d'unió de LexA, es va voler analitzar amb més detall quines de les seves bases són les implicades en el reconeixement de la caixa per part de LexA. Amb aquest objectiu es van dissenyar oligonucleòtids amb mutacions puntuals en cadascuna de les posicions del palíndrom. No tots els canvis van afectar la capacitat de LexA per reconèixer la caixa, com podem veure als EMSA realitzats (Fig. 2.6), només les bases TTAG i TACTA a esquerra i dreta respectivament de l'eix de simetria van generar la pèrdua d'unió de LexA quan van ser substituïdes. D'aquesta manera, podem establir el motiu TTAG-N₆-TACTA com la caixa d'unió de LexA a *X. fastidiosa*.

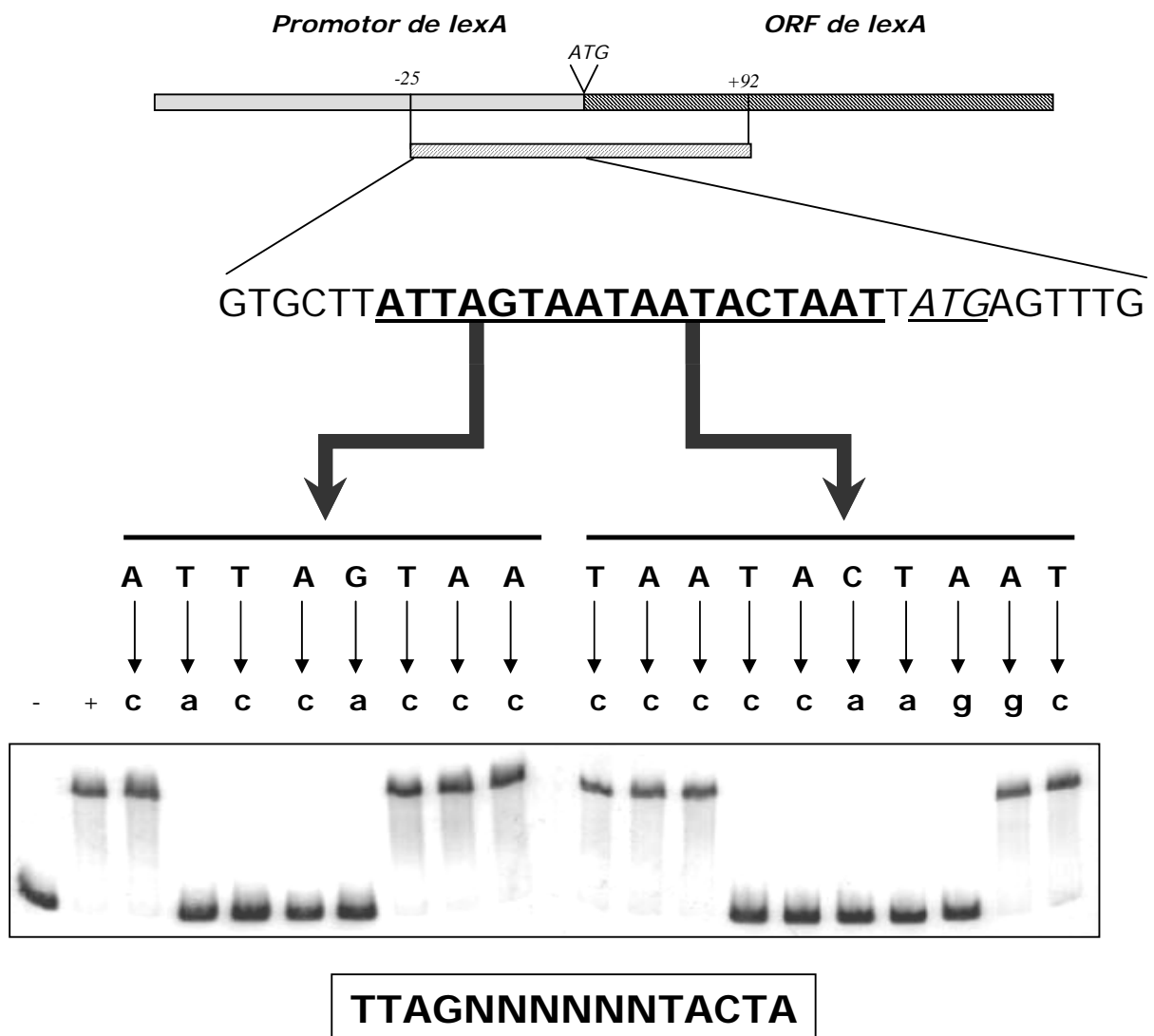


Fig. 2.6. Efecte a la mobilitat electroforètica de LexA3 de substitucions en el motiu palindròmic ATTAGTAATAACTAAT (en negreta i subratllat) en presència de 40 nM de proteïna pura LexA de *X. fastidiosa*. Es mostra també la mobilitat del fragment salvatge LexA3 en presència (+) i absència (-) de la proteïna LexA. Enquadrades i en negreta s'indiquen les bases que, en ser substituïdes, provoquen la pèrdua de la capacitat d'unió de la proteïna LexA. L'inici de traducció de LexA està subratllat i en cursiva.

2.1.5. Caracterització del reguló LexA a *X. fastidiosa*

Un cop establerta la seqüència que és reconeguda per la proteïna LexA al promotor de l'operó *lexA-recA*, es va buscar aquest motiu al genoma de *X. fastidiosa* amb el programa Findpatterns del Genetic Computer Group package (Devereux *et al.*, 1984). La presència del motiu

TTAG-N₆-TACTA es va trobar davant de cinc gens a part del motiu caracteritzat davant l'operó *lexA-recA*. De totes maneres, estudis de mobilitat electroforètica utilitzant els promotors d'aquests gens com a competidors van provar tan sols la capacitat d'un d'ells per unir-se a la proteïna LexA i desplaçar així la unió detectada al promotor de *lexA* (Fig. 2.7). Aquest gen, *xf2313*, presenta homologia amb una DNA-metilasa d'*S. coelicolor*, que tanmateix no presenta cap caixa SOS en aquest microorganisme grampositiu.

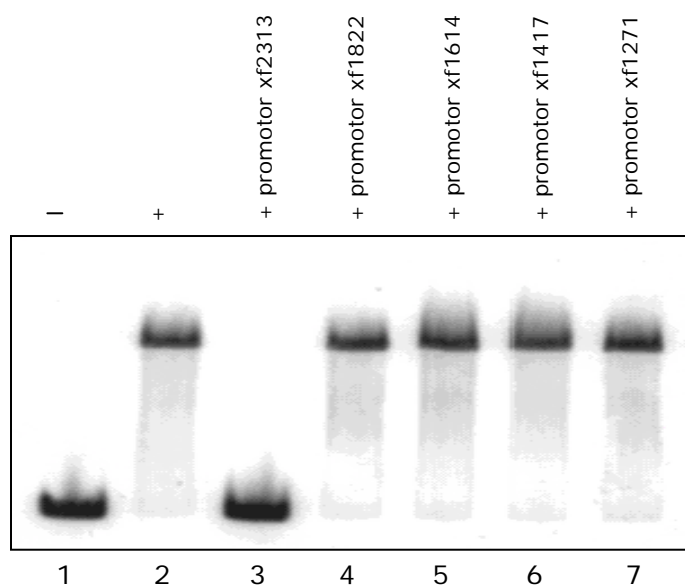


Fig. 2.7. Efecte de l'addició d'un excés molar de DNA competidor no marcat dels promotors dels gens *xf2313* (carril 3), *xf1822* (carril 4), *xf1614* (carril 5), *xf1417* (carril 6) i *xf1271* (carril 7) en la mobilitat del fragment LexA3 en presència de proteïna LexA a 40 nM. Es mostra també la mobilitat del fragment en presència (+) i absència (-) de proteïna.

El palíndrom TTAG-N₆-TACTA ha estat trobat, així mateix, davant dels homòlegs de *lexA* a altres representants de l'ordre *Xanthomonadales* (*Xanthomonas citri*, *X. campestris*, *X. oryzae* i les varietats oleander i almond de *X. fastidiosa*). També s'han trobat gens similars a *xf2313* a les dues soques de *X. fastidiosa* diferents de la utilitzada en aquest estudi, i ambdues presenten el motiu regulador (Taula 2.1). Alineant totes aquestes seqüències, es va poder establir la caixa consens TTAGTARWAWTACTA com el motiu d'unió de LexA a l'ordre *Xanthomonadales*.

Taula 2.1. Caixes d'unió de LexA a l'ordre Xanthomonadals.

Microorganisme	Gen	Seqüència
<i>X. fastidiosa</i> CVC	<i>lexA-recA</i>	TTAGTAATAAATACTA
	<i>xf2313</i>	TTAGTAATTTTACTA
<i>X. fastidiosa</i> oleander	<i>lexA-recA</i>	TTAGTAATAAATACTA
	<i>xf2313</i>	TTAGTAAAATTACTA
<i>X. fastidiosa</i> almond	<i>lexA-recA</i>	TTAGTAATAAATACTA
	<i>xf2313</i>	TTAGTAAAATTACTA
<i>Xanthomonas citri</i>	<i>lexA</i>	TTAGTAGTAATACTA
<i>Xanthomonas campestris</i>	<i>lexA</i>	TTAGTAGTAATACTA
<i>Xanthomonas oryzae</i>	<i>lexA</i>	TTAGTAATAAATACTA
Consens		TTAGTARWAWTACTA

* Les bases que eliminen la unió de LexA en ser substituïdes es mostren ombrejades.

W=A o T, R= A o G.

2.1.6. Estudi de la inducció dels gens regulats per LexA a *X. fastidiosa*

Per caracteritzar el comportament de *X. fastidiosa* davant del dany al DNA, es va estudiar l'expressió sota l'efecte de la mitomicina C dels gens regulats per LexA (*lexA-recA* i *xf2313*) i d'aquells que tot i no tenir caixa SOS a *X. fastidiosa* formen part del reguló SOS a *E. coli*. Després d'una exposició de 16 h a la mitomicina C (20 µg/ml), es va extreure RNA de cèl·lules tractades i no tractades i, mitjançant estudis de RT-PCR *on line*, es van determinar els nivells de mRNA de cadascun dels gens en relació al nivell de mRNA detectat per un gen no afectat per l'addició de mitomicina C (el gen de la threonina sintetasa codificat per *thrA*). D'aquesta manera es va poder detectar quins gens presenten una inducció de la seva expressió davant de la mitomicina C (Taula 2.2). Com esperàvem, tant l'operó *lexA-recA* com el gen *xf2313* són induïbles per aquest agent lesiu del DNA però, tot i no ser regulats per LexA, altres gens que són induïbles a *E. coli* (com *uvrA*, *recN* o *ruvAB*) també ho són a *X. fastidiosa*, ja sigui per un mecanisme independent de LexA o per efecte d'un regulador adicional controlat per LexA.

Taula 2.2. Inducció davant la mitomicina C de gens de *X. fastidiosa*.

Gens	Factor d'inducció
<i>lexA</i>	3,91
<i>xf2313</i>	15,98
<i>uvrA</i>	2,27
<i>ruvAB</i>	6,67
<i>uvrB</i>	6,11
<i>ssb</i>	1,36
<i>ftsK</i>	4,3
<i>recN</i>	6,4
<i>yigN</i>	6,52
<i>dinG</i>	7,27
<i>xf1375</i>	1,27
<i>xf2223</i>	1,66

2.2. Identificació de la caixa d'unió de LexA a *Anabaena sp. PCC7120* (Article II)

Anabaena sp. PCC7120 és un bacteri de la divisió dels cianobacteris, un grup de procariotes fotoautotròfics que habiten una àmplia gamma d'hàbitats i, per tant, estan sotmesos a gran varietat d'agents lesius del DNA. En el cas concret d'*Anabaena*, prèviament s'havia caracteritzat l'existència d'un gen *recA* (Owtrim *et al.*, 1987), encara que fins al moment no hi ha cap estudi més ampli del reguló SOS en aquest microorganisme.

2.2.1 Clonació del gen *lexA* d'*Anabaena* i sobreexpressió del seu producte

El gen *lexA* d'*Anabaena* (localitzat al banc de dades <http://www.kazusa.jp/cyanobase>) va ser amplificat utilitzant els oligonucleòtids LexAup (-174 a -156) i LexABamHI (+665 a +647). Es va obtenir un producte de PCR de 839 pb que va ser clonat al vector pGEM-T i comprovat per seqüenciació. El vector resultant (pUA1050) va ser utilitzat com a motlle per a posteriors reaccions d'amplificació. Per sobreexpressar el producte de *lexA* es va dissenyar un nou oligonucleòtid (*lexANdeI*) per situar la regió codificant en el vector de sobreexpressió pET15b. El triplet ATG, origen de traducció de la proteïna LexA, forma part de la diana *NdeI* de l'oligonucleòtid *lexANdeI* i ens permet que el marc de lectura de LexA estigui en fase amb una

cua d'histidines codificada al vector pET15b. Després d'obtenir el fragment de restricció amb *NdeI* i *BamHI* del vector pUA1051 (on havíem clonat la banda obtinguda per PCR amb els oligonucleòtids que contenen les dues dianes), aquest va ser clonat just darrera del promotor T7 del vector pET15b amb la cua de 6 histidines (pUA1052). Es va comprovar la seqüència de la construcció i aquesta es va utilitzar per sobreexpressar la proteïna fusió LexA en les cèl·lules d'*E. coli* BL21 (λ DE3) Codon Plus. La proteïna obtinguda va ser purificada utilitzant el sistema d'afinitat de columna "*TalonTM Metal Affinity Resin Kit (Clontech)*", seguint el mateix procediment que vam utilitzar per purificar la proteïna LexA de *X. fastidiosa*. Es va obtenir la proteïna LexA amb un grau de puresa del 95% com es va poder comprovar en gels de SDS-PAGE al 15% (Fig. 2.8).

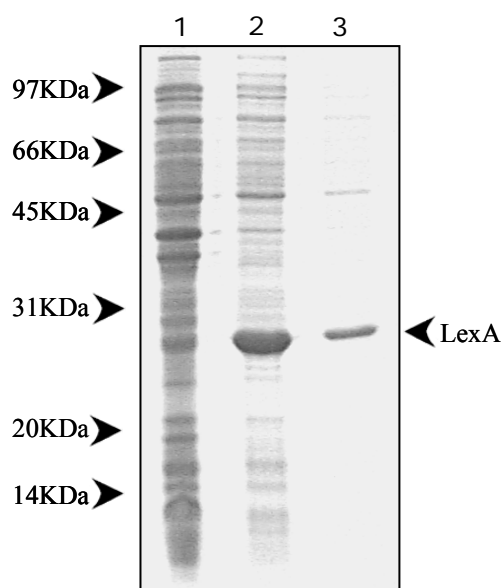


Fig. 2.8. Sobreexpressió i purificació de la proteïna LexA d'*Anabaena*. Gel SDS-PAGE al 15% on es poden veure les mostres de l'extracte de la soca BL21(DE3)/pUA1052 en absència o presència d'IPTG (carrils 1 i 2 respectivament). Al carril 3 podem veure la proteïna LexA purificada mitjançant una columna d'afinitat amb Co^{2+} . A l'esquerra del gel es mostren les masses moleculars del marcador.

2.2.2 Estudis de la mobilitat electroforètica del promotor *lexA* d'*Anabaena*

La proteïna LexA purificada d'*Anabaena* va servir per realitzar EMSAs del promotor del gen *lexA* d'*Anabaena*. Per establir la capacitat d'unió de LexA al seu propi promotor es va realitzar un primer EMSA amb concentracions creixents de proteïna i una concentració constant d'un fragment del promotor (-174 a +94) amplificat per PCR i marcat amb digoxigenina. En aquest estudi preliminar es va poder observar l'aparició d'una banda de retard electroforètic en presència de la proteïna LexA, amb una intensitat proporcional a la concentració de proteïna

utilitzada (Fig. 2.9). L'addició d'un excés molar de fragment del promotor sense marcar va donar lloc a la desaparició de la banda de retard. Aquest efecte inhibitori no es va observar quan el DNA competidor afegit era el plàsmid pBSK+. Per tant, la unió de la proteïna està relacionada amb una seqüència present al promotor de *lexA* i no a unions inespecífiques amb el DNA (Fig. 2.9).

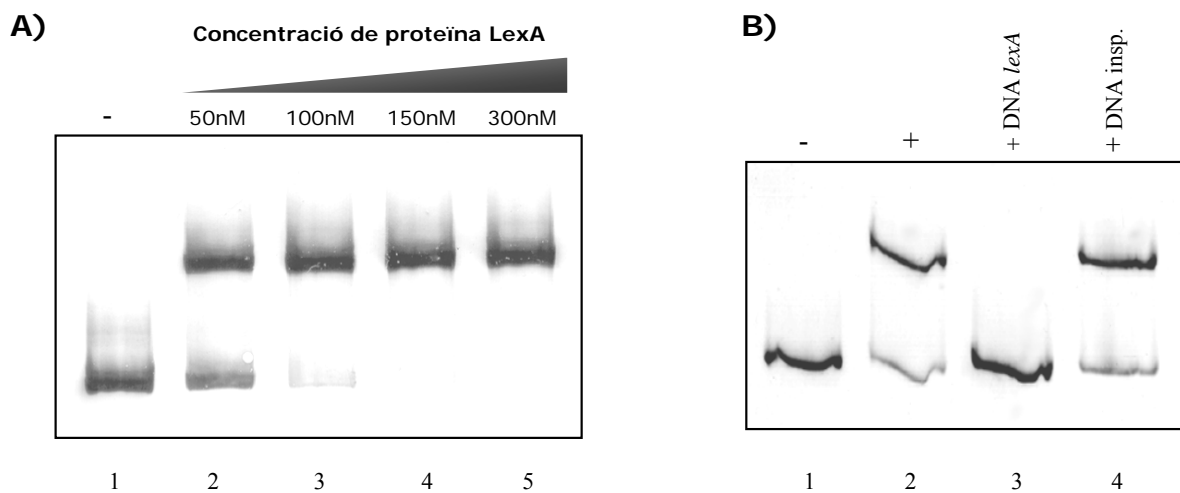


Fig. 2.9. A) EMSA amb un fragment del promotor del gen *lexA* d'*Anabaena* en presència de quantitats creixents de proteïna (carrils 2 a 4) i mobilitat del fragment sense l'addició de proteïna LexA (carril 1, fletxa en blanc). Es pot observar l'aparició d'una banda de mobilitat retardada. B) Efecte de l'addició d'un excés molar de competidor específic a la mobilitat del fragment de promotor de *lexA* d'*Anabaena* (carril 3) així com de l'addició de DNA inespecífic (carril 4). També es mostra la mobilitat del fragment en absència de proteïna (-) i en presència d'aquesta a 50 nM (+).

Per localitzar aquesta regió de manera més precisa, es va dividir el fragment del promotor de *lexA* en quatre subfragments (FrgL1-4) i es va analitzar la capacitat d'unió de LexA de cadascun d'ells. Es va observar unió en els tres primers fragments i la desaparició de la banda de retard electroforètic quan el fragment utilitzat era FrgL4 (Fig. 2.10). La caixa d'unió de *lexA* ha d'estar situada, per tant, i almenys en part, entre les posicions -53 i -34.

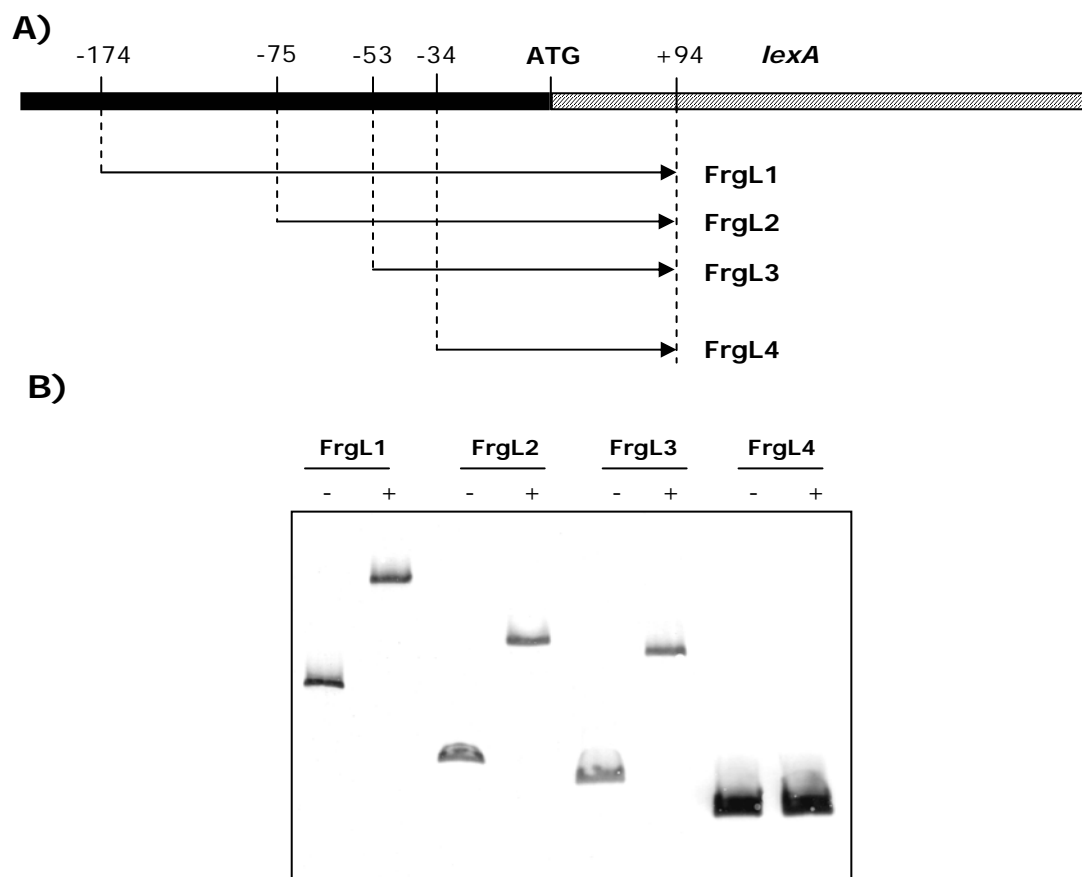


Fig. 2.10. A) Diagrama explicatiu on trobem representats els fragments utilitzats als EMSA amb les seves posicions respecte l'inici de traducció de *lexA*. B) EMSA amb els fragments FrgL1-FrgL4 en presència (+) o absència (-) de proteïna LexA pura de *Anabaena* a 50 nM.

2.2.3 Estudi de protecció (“footprinting”) de la regió promotora de *lexA* d'*Anabaena*

Un cop determinada la posició aproximada en el promotor de *lexA* de la caixa d'unió de la proteïna LexA d'*Anabaena*, es va procedir a definir de manera més precisa les bases directament implicades. En una primera aproximació es va realitzar un assaig de protecció a la digestió amb DNasa I o “footprinting”. Aquest assaig es va realitzar utilitzant el seqüenciador automàtic *ALF Sequencer* (Amersham biosciences) i seguint els protocols descrits anteriorment per Patzer i Hantke (2001) que s'han posat a punt en el nostre laboratori recentment (Campoy *et al.*, 2003).

Es va amplificar per PCR un fragment amb la regió on hi ha la caixa centrada i es va analitzar la protecció tant a la cadena codificant com a la no codificant. En ambdós experiments, es va

comprovar que l'addició de LexA protegia de la digestió de la DNasaI una regió de 16 nucleòtids (TAGTACTAATGTTCTA) (Fig. 2.11). Aquesta regió presenta una naturalesa palindròmica clara, que ens va permetre identificar una possible caixa pràcticament idèntica davant del gen *recA* (TAGTATATCTGTTCTA). Per confirmar la possibilitat de que *recA* tingués també un motiu d'unió a LexA a *Anabaena*, es va amplificar un fragment del seu promotor amb els oligonucleòtids RecAup i RecAdw i es va dur a terme un EMSA. Aquest assaig ens va confirmar la capacitat d'unió de LexA al promotor de *recA*.

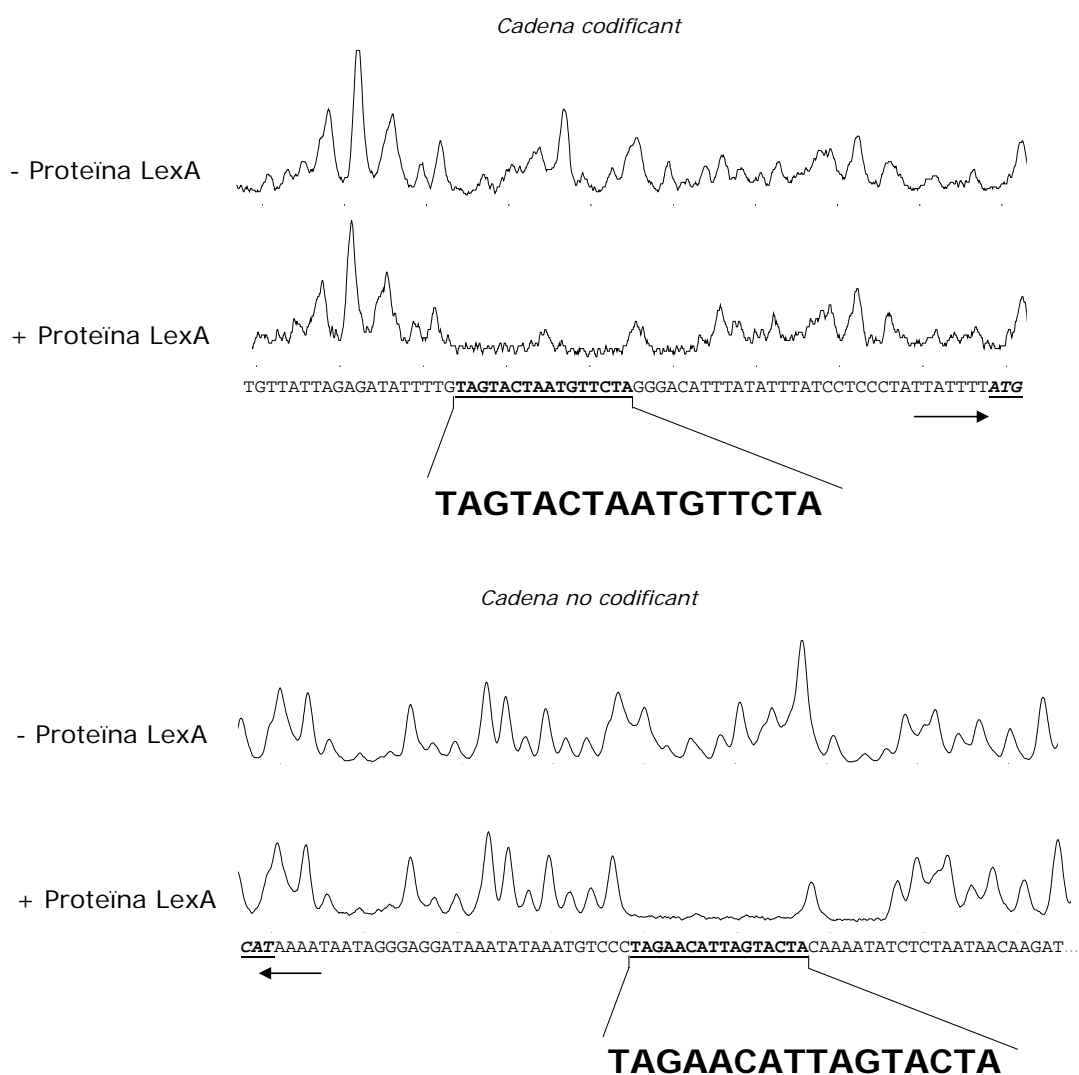


Fig. 2.11. Anàlisi de protecció a la digestió amb DNasaI utilitzant fragments del promotor de *lexA* tant de la cadena codificant com de la no codificant, marcats amb Cy5 i obtinguts per PCR utilitzant els primers UpLexAAb i LowLexAAb respectivament. Es mostra el resultat en absència i en presència de LexA a la concentració de 200 nM. La seqüència protegida a ambdues cadenes es mostra subratllada i ampliada.

2.2.4 Efecte a la unió de la proteïna LexA de mutacions puntuals a la zona operadora

Per acabar de definir de manera més acurada el motiu d'unió de la proteïna LexA, es va estudiar la importància en la unió del repressor de cadascun dels nucleòtids de la seqüència de 16 pb identificada per *footprinting*. Partint del fragment FrgL3, es van demanar els 3 canvis possibles per a cadascuna de les posicions de la teòrica caixa. Un cop amplificats els respectius fragments de PCR marcats amb digoxigenina, es van realitzar diferents assaigs de mobilitat electroforètica per avaluar la capacitat d'unió de LexA a cadascun dels fragments mutants. El resultat dels assaigs ens mostra una diferent implicació dels 16 residus, alguns d'ells són essencials, i els canvis a la seva posició afecten dràsticament a la unió de LexA. Tenint en compte aquestes dades podem definir la seqüència RGTACNNNDGTWCB com la caixa d'unió de LexA a *Anabaena*. (Fig. 2.12)

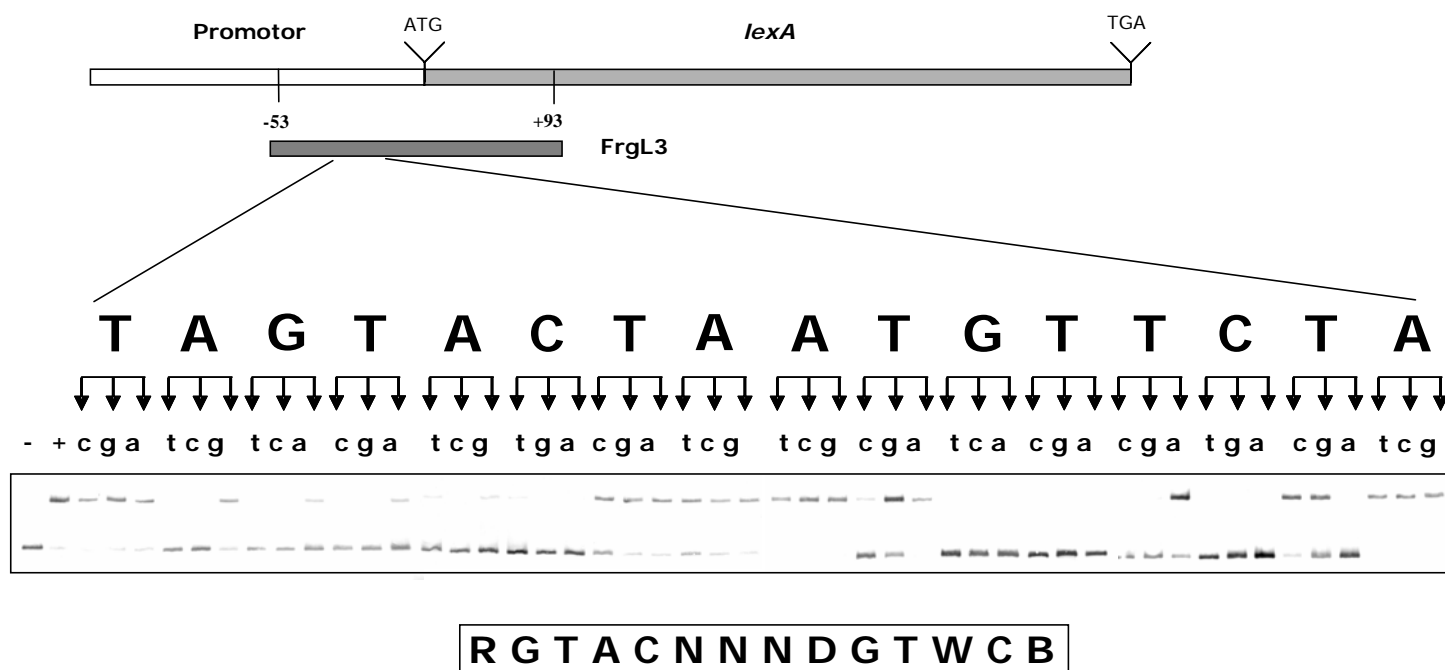


Fig. 2.12. Efecte a la mobilitat electroforètica de substitucions en el motiu TAGTACTAATGTTCTA (en negreta) del fragment FrgL3 en presència de 150 nM de proteïna LexA d'*Anabaena*. Es mostra també la mobilitat del fragment salvatge FrgL3 en presència (+) i absència (-) de LexA. Enquadrada i en negreta es presenta la seqüència d'unió definida, tenint en compte les substitucions que provoquen una disminució $\geq 75\%$ en la capacitat d'unió de LexA. R=A o G, D=A o G o T, W=A o T, B=C o G o T.

2.2.5 Caracterització del reguló LexA a *Anabaena*

Un cop obtinguda la seqüència de la caixa d'unió de LexA a *Anabaena*, es va determinar també la composició del seu reguló. Per aconseguir-ho, es va realitzar una recerca *in silico* de motius d'unió de LexA al seu genoma amb el programa RCGScanner (Erill *et al.*, 2003). Aquesta recerca ens va permetre trobar motius reguladors davant dels gens *uvrA*, *ssb*, *all4790* i *alr4905* a part dels prèviament caracteritzats davant de *lexA* i *recA*. Quan s'utilitzen fragments no marcats dels promotors que les contenen, totes aquestes caixes són capaces de desplaçar la unió de LexA al promotor de *lexA* (Fig.2.13). Contràriament, altres gens regulats per LexA a *E. coli* (*uvrB*, *ruvA*, *sulA*, *ftsK* i *recN*) no ho estarien a *Anabaena*. Això ens indica una notable diferència a nivell de composició entre ambdós regulons. Aquesta heterogènia en la composició dels regulons SOS ja ha estat descrita anteriorment per a *D. ethenogenes*, *M. tuberculosis* i alguns proteobacteris del grup gamma (Davis *et al.* 2002; Fernández de Henestrosa *et al.* 2002; Erill *et al.* 2003).

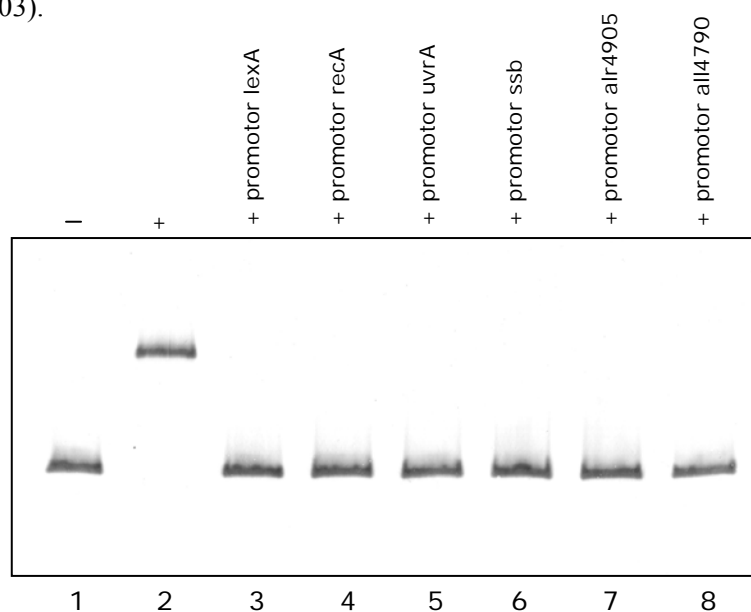


Fig. 2.13. Efecte de l'addició d'un excès molar de DNA competidor no marcat dels promotors dels gens *lexA* (carril 3), *recA* (carril 4), *uvrA* (carril 5), *ssb* (carril 6), *alr4905* (carril 7) i *all4790* (carril 8) en la mobilitat del fragment FrgL3 en presència de proteïna LexA a 150 nM. Es mostra també la mobilitat del fragment en presència (+) i absència (-) de proteïna

A part d'*Anabaena*, la recerca amb RCGScanner ens ha permès detectar el mateix motiu regulador a cinc gens de *Nostoc punctiforme* (*lexA*, *recA*, *uvrA*, *ssb*, i *npun5119*), un cianobacteri molt pròxim filogenèticament. En canvi, a *Synechocystis sp.* PCC6803 tan sols s'ha pogut detectar una caixa similar a la d'*Anabaena* davant del gen *lexA*, que amb estudis de mobilitat electroforètica s'ha determinat que és funcional i capaç d'unir-se a la proteïna LexA d'*Anabaena*. L'alineament de les caixes SOS detectades a *Anabaena*, *N. punctiforme* i *Synechocystis* (Taula 2.3.) ens permet obtenir la seqüència consens AGTACNNNGTTC, que és compatible amb la que prèviament s'ha determinat a *Anabaena* mitjançant assaigs *in vitro*.

Taula 2.3. Gens regulats per LexA a diferents cianobacteris.

Microorganisme	Gen	Seqüència
<i>Anabaena</i> PCC7120	<i>lexA</i>	TAGTACTAATGTTCTA
	<i>recA</i>	TAGTATATCTGTTCTA
	<i>uvrA</i>	CAGTACTATTGTTCTA
	<i>ssb</i>	AAGTACTTATGTTCTA
	<i>alr4905</i>	TAGTACTCATGTTCTA
	<i>all4790</i>	GCGTTCATTTGTACCA
<i>Nostoc punctiforme</i> ATCC29133	<i>lexA</i>	TAGTACTAATGTTCTA
	<i>recA</i>	TAGTATATCTGTTCTA
	<i>uvrA</i>	CAGTACGATTGTTCTA
	<i>ssb</i>	AAGTACACCTGTACTG
	<i>npun5119</i>	TCGTACATTTGTACTA
<i>Synechocystis</i> PCC6803	<i>lexA</i>	TAGTCCTAGAGTCCTA
Consens		TAGTACTWATGTTCTA

* Les bases que eliminen la unió de LexA en ser substituïdes es mostren ombrejades. W=A o T.

Així mateix, s'ha trobat el gen *lexA* en diferents cianobacteris, el genoma dels quals està disponible als bancs de dades. La similitud entre els dominis N-terminals de les proteïnes LexA, on hi ha les hèlixs implicades en el reconeixement de la caixa, suggereixen un mateix motiu regulador per a tots ells (Fig. 2.14). Tanmateix, a *Synechocystis* hi ha canvis en els residus implicats en el procés d'autohidròlisi que podrien explicar l'absència de caixes d'unió a altres gens diferents de *lexA*.

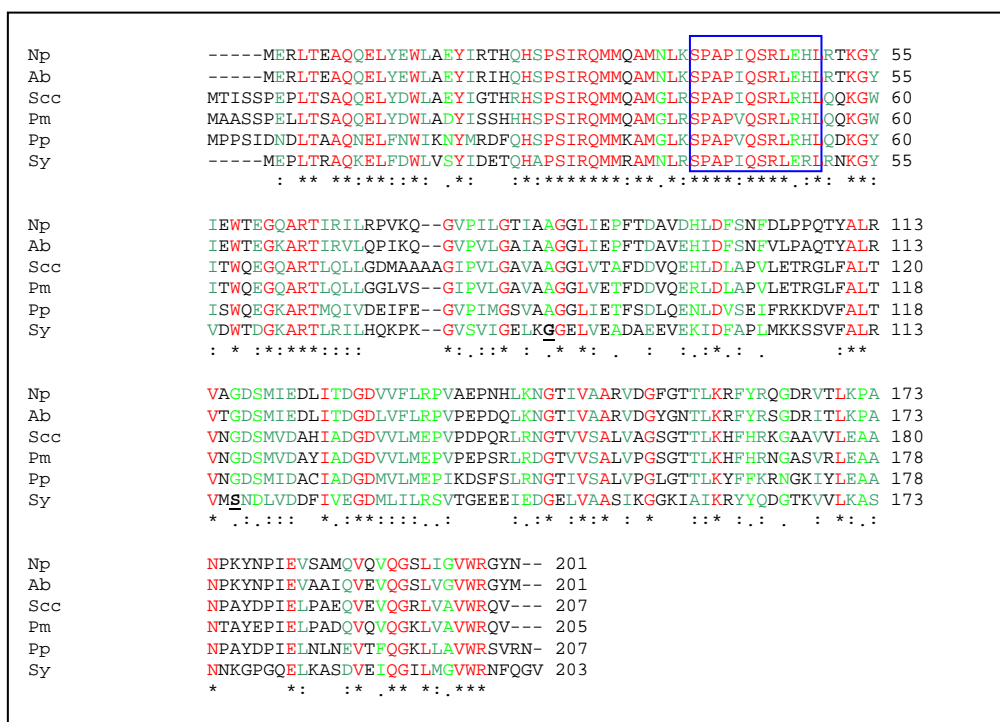


Fig. 2.14. Alineament de les diferents proteïnes LexA identificades a la divisió Cianobacteris. Np (*Nostoc punctiforme*), Ab (*Anabaena*), Scc (*Synechococcus*), Pm (*Prochlorococcus marinus*), Pp (*Prochlorococcus pastoris*), Sy (*Synechocystis*). En negreta i subratllat canvis a la proteïna LexA de Sy. En vermell es mostren els residus conservats (*) i en verd els canvis conservatius(. :). La hèlix α_3 es presenta encuadrada en blau.

2.2.6 Estudis de mutagènesi dirigida per analitzar la proximitat entre els motius d'unió de la proteïna LexA d'*Anabaena* i *B. subtilis*

La inspecció visual de la caixa d'unió de LexA d'*Anabaena* (RGTACNNNDGTWCB) ha permès detectar una clara similitud entre aquest motiu i el que és reconegut en els bacteris grampositius fins ara estudiats (CGAACRNRYGTTYC). Si la relació entre ambdós grups és tan pròxima com sobre el paper sembla evident, petits canvis a la seqüència de reconeixement de LexA a *Anabaena* haurien de permetre el reconeixement creuat amb la proteïna LexA de *B. subtilis*. Per provar aquesta hipòtesi, es va generar un fragment mitjançant mutagènesi dirigida, on la primera T del motiu GTAC present a la caixa SOS del promotor *lexA* d'*Anabaena* es va substituir per una A (Fig. 2.15).

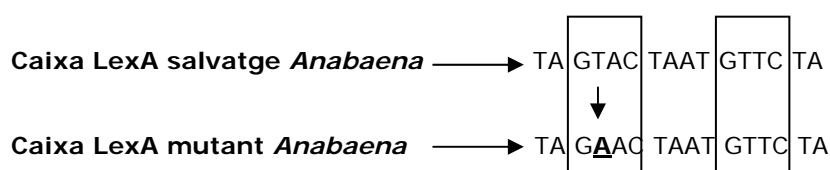
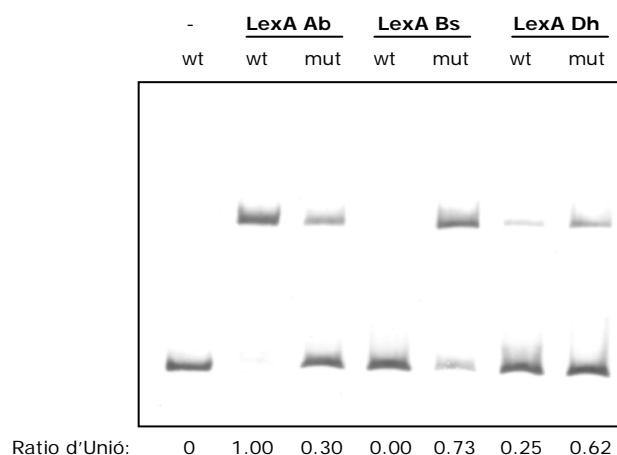


Fig. 2.15. Disseny de la mutació a la caixa d'unió de la proteïna LexA d'*Anabaena* per analitzar la unió de la proteïna LexA de *B. subtilis*.

Després d'aquesta substitució, la capacitat d'unió de la proteïna LexA de *B. subtilis* al promotor mutant d'*Anabaena* va ser posada a prova en assaigs de mobilitat electroforètica, observant-se una banda de retard. Així mateix, la proteïna LexA de *D. ethenogenes*, que reconeix una caixa similar a *B. subtilis* (Fernández de Henestrosa *et al.*, 2002), presentava una petita afinitat pel promotor salvatge d'*Anabaena*, afinitat que s'incrementa amb la mutació puntual al motiu GTAC. Per últim, es pot observar que la proteïna LexA d'*Anabaena* segueix presentant una certa afinitat pel promotor mutant amb la caixa dels bacteris grampositius (Fig. 2.16). La proximitat entre els dos motius reguladors, per tant, és molt elevada. Tot i aquesta proximitat entre els motius d'unió, l'alineament de les regions amino terminals de les tres proteïnes LexA abans esmentades no ens mostra una similitud evident entre els residus situats en les posicions que a *E. coli* han estat determinades com les responsables de la unió amb el DNA.

Fig. 2.16. EMSA per determinar la capacitat d'unió al fragment mutant del promotor de *lexA* d'*Anabaena* (mut) de la proteïna LexA d'*Anabaena* (Ab), *B. subtilis* (Bs) o *D. etenogenes* (Dh). Es mostra també la mobilitat del fragment salvatge (wt) en absència (-) i en presència de les tres proteïnes, i la ratio d'unió de cada reacció.



Tanmateix, la proximitat entre els motius reguladors de *B. subtilis*, *D. ethenogenes* i *Anabaena* sí que concorda amb la proposta d'ordre d'embranchament de l'arbre filogenètic proposada recentment per Gupta i Griffiths (2002) després de l'estudi i comparació d'*indels* de diferents proteïnes conservades. D'aquesta hipòtesi es deriva que els bacteris grampositius van divergir d'un ancestre comú amb els Bacteris verds no del sofre (grup al que pertany *D. ethenogenes*), que al seu torn van divergir immediatament abans de l'aparició dels cianobacteris. L'estudi dels motius d'unió de LexA sembla que ens pot ajudar a definir de manera més acurada aquests

punts d'embranchament de l'arbre filogenètic o, si més no, ajudar-nos a establir la filogènia del reguló LexA.

2.3. Identificació de la caixa d'unió de LexA a *Fibrobacter succinogenes* S85 (Article III)

F. succinogenes és un bacteri anaerobi gram negatiu que habita el rumen i cecum dels herbívors. Aquest microorganisme sempre havia estat considerat membre del gènere *Bacteroides*. Recentment, estudis amb 16S rRNA han apuntat la pertinença d'aquest bacteri de la comunitat ruminal a un nou *Phylum* (Maidak *et al.*, 1999 ; Ludwig i Schleifer, 1999). Estudis comparatius de diferents proteïnes conservades de *F. succinogenes* utilitzant els *indels* (Griffiths i Gupta, 2001) han confirmat la consistència biològica d'aquest nou *Phylum* que tindria, tanmateix, una forta relació amb les bacteries del grup CFB (*Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*), havent divergit tots plegats d'un mateix ancestre comú.

2.3.1. Clonació del gen *lexA* de *F. succinogenes* i sobreexpressió del seu producte

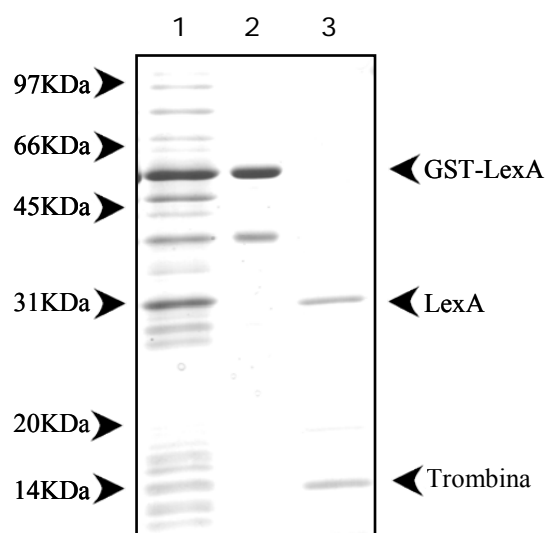
El gen *lexA* de *F. succinogenes* es va identificar mitjançant una recerca amb TBLASTN de la seqüència incompleta del seu genoma (<http://www.tigr.org>) usant la proteïna LexA d'*E. coli* com a motlle. Es va detectar una regió d'homologia significativa amb LexA. Per amplificar aquesta regió, es van dissenyar dos oligonucleòtids per clonar tant el promotor com l'ORF de *lexA*, LexA up (-276 a -249) i LexA dw (+653 a +678). El fragment de 954 pb obtingut es va clonar a pGEM-T donant lloc al plàsmid pUA1033, que va ser comprovat per seqüenciació.

Després d'intentar la seva purificació mitjançant l'addició d'una cua d'histidines, i veient la insolubilitat del producte del gen *lexA* de *F. succinogenes*, es va utilitzar el sistema de sobreexpressió de proteïnes utilitzant una fusió amb la Glutatió-S-Transferasa (GST). Es va clonar el gen *lexA* de *F. succinogenes* sense promotor al vector pGEX-4T1 utilitzant el fragment de 678 pb, obtingut de la restricció amb els enzims *EcoRI* i *SalI* del plàsmid pUA1037 (on

haviem clonat el fragment de PCR amplificat amb els primers LexA *EcoRI* i LexAdw, que conté la diana *Sall*). En aquest fragment, la diana *EcoRI* ha estat dissenyada per situar en fase el triplet d'inici de traducció amb l'ORF de la GST del vector pGEX-4T1.

Per sobreexpressar la proteïna fusió i poder purificar LexA, es va transformar el plàsmid resultant de la lligació de *lexA* al vector pGEX-4T1, pUA1038, a *E. coli* BL21 (λ DE3)-Codon Plus (Stratagene). La soca resultant va ser cultivada en 50 ml de medi Luria-Bertani a 37°C fins arribar a una densitat òptica a 550 nm de 0,6. A aquesta densitat es va induir la producció de la proteïna fusió GST-LexA mitjançant l'addició de IPTG a una concentració final de 10 mM. Després d'una incubació addicional de 2 hores, les cèl·lules es van recollir per centrifugació, descartant el sobrenedant. El pellet bacterià va ser resuspès en tampó PBS (10 mM Na₂HPO₄, 1,7 mM KH₂PO₄, 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7.4) amb els inhibidors de proteases "Mini protease inhibitor cocktail" (Roche). La suspensió resultant es va llisar per sonicació. Les cèl·lules no llisades i restes cel·lulars es van separar per centrifugació a 14000 x g. El sobrenedant de sonicació es va incubar en presència de "Gutathione-Sepharose 4B beads" (Amersham-Pharmacia) en tampó PBS i es va procedir a una sèrie de rentats amb el mateix tampó. Per alliberar la proteïna LexA de la fusió es va utilitzar la diana per a la Trombina localitzada immediatament per sota de la seqüència codificant de la GST en el plàsmid pGEX-4T1. L'addició de 25 U d'aquesta proteasa a la resina provinent dels rentats en un volum final de 1 ml de PBS va permetre l'alliberació de la proteïna LexA amb la cua restant de la diana de la trombina, amb un grau aproximat del 90% de puresa (Fig. 2.17)

Fig. 2.17. Sobreexpressió i purificació de la proteïna LexA de *F. succinogenes*. Gel SDS-PAGE al 15% on es pot veure el sobrenedant de sonicació de la soca d'*E. coli* BL21(λ DE3)/pUA1038 després de la inducció amb IPTG (carril 1), una mostra dels beads de Glutatió-Sepharosa amb la fusió GST-LexA (carril 2) i la proteïna LexA eluïda (carril 3).



2.3.2. Estudis de la mobilitat electroforètica i assaig de protecció (“footprinting”) de la regió promotora de *lexA* de *F. succinogenes*

Un cop obtinguda la proteïna LexA purificada, es van realitzar EMSAs utilitzant un fragment del promotor de 319 pb (-154 a +169) marcat amb digoxigenina. En presència de proteïna LexA, s’observa l’aparició d’una banda de retard electroforètic amb mobilitat clarament diferenciada. Aquesta banda de retard és específica, ja que podem veure la seva desaparició en presència de DNA competidor específic (promotor no marcat amb digoxigenina) que desplaça la unió de la proteïna LexA. Aquest efecte no s’observa quan utilitzem un competidor no específic com ara el plàsmid pBSK+ (Fig. 2.18).

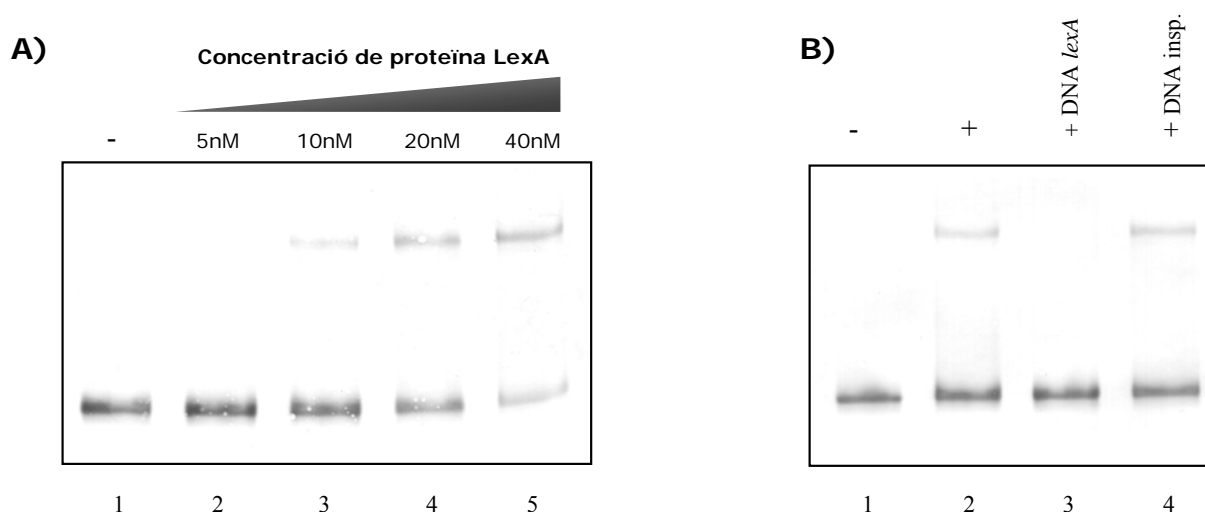


Fig. 2.18. A) EMSA amb un fragment del promotor del gen *lexA* de *F. succinogenes* en presència de quantitats creixents de proteïna (carrils 2 a 5) i mobilitat del fragment sense l’addició de proteïna LexA (carril 1). B) Efecte de l’addició d’un excés de competidor específic a la mobilitat del fragment del promotor de *lexA* en presència de LexA a 20 nM (carril 3) així com de l’addició de DNA inespecífic (carril 4). També es mostra la mobilitat del fragment en absència de proteïna (-) i en presència d’aquesta a 20 nM (+).

Per intentar acotar el fragment mínim de promotor necessari per observar la unió de la proteïna LexA i acostar-se a la definició del motiu d’unió, es va fraccionar el promotor en 4 fragments de diferents mides. Mitjançant EMSAs amb aquests fragments, es va determinar que la unió de

LexA es produïa en una regió compresa, almenys en part, entre les posicions -72 i -57 del promotor.

Un cop definida la regió aproximada on LexA estableix la seva unió es va determinar la llargada d'aquesta regió i els seus límits més precisos mitjançant un assaig de “*footprinting*” amb un fragment de promotor de 160 pb (-154 a +6), que té situada la caixa aproximadament al centre. L'assaig, realitzat tant amb la cadena codificant com amb la no codificant, ens va permetre definir una regió protegida de l'acció de la DNasaI que conté el palíndrom imperfecte de 14 pb amb la seqüència TGCCAGTTGTGCA a la cadena codificant (Fig. 2.19).

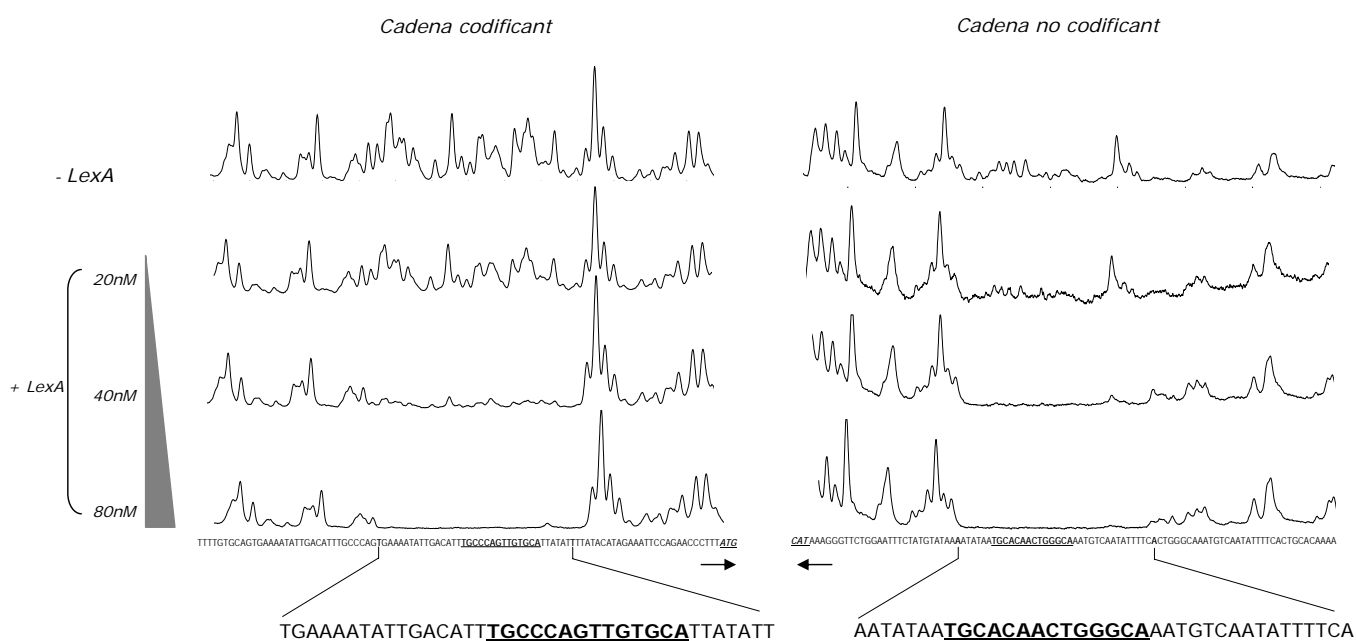


Fig. 2.19. Anàlisi de protecció a la digestió amb DNasaI utilitzant fragments del promotor de *lexA* tant de la cadena codificant com de la no codificant, marcats amb Cy5. Es mostra el resultat en absència i en presència de LexA a diferents concentracions. La seqüència protegida d'ambdues cadenes es presenta ampliada. El motiu palindròmic contingut en aquesta seqüència està indicat en negreta i subratllat. Les fletxes indiquen la direcció de la traducció. El triplet d'inici de traducció està indicat subratllat i en negreta a ambdues cadenes.

2.3.3. Efecte a la unió de LexA de mutacions puntuals a la zona operadora

Per confirmar que el palíndrom identificat en els assaigs de “*footprinting*” és la caixa d'unió de LexA a *F. succinogenes* i quines bases concretes són les implicades en aquesta unió, es van

fer una sèrie de mutacions puntuals en aquesta seqüència i es va provar el seu efecte a la mobilitat electroforètica del fragment en presència de LexA. Les mutacions en algunes de les bases, concretament TGC, la tercera C a l'esquerra de l'eix de simetria i GTGCA a la dreta d'aquest, van abolir totalment la presència de la banda de retard (Fig. 2.20), indicant la seva importància en la formació d'un complex estable entre la proteïna LexA i el promotor. Tenint en compte aquestes noves dades, podem afirmar que el motiu TGCNCNNNNGTGCA és la caixa d'unió de LexA a *F. succinogenes*.

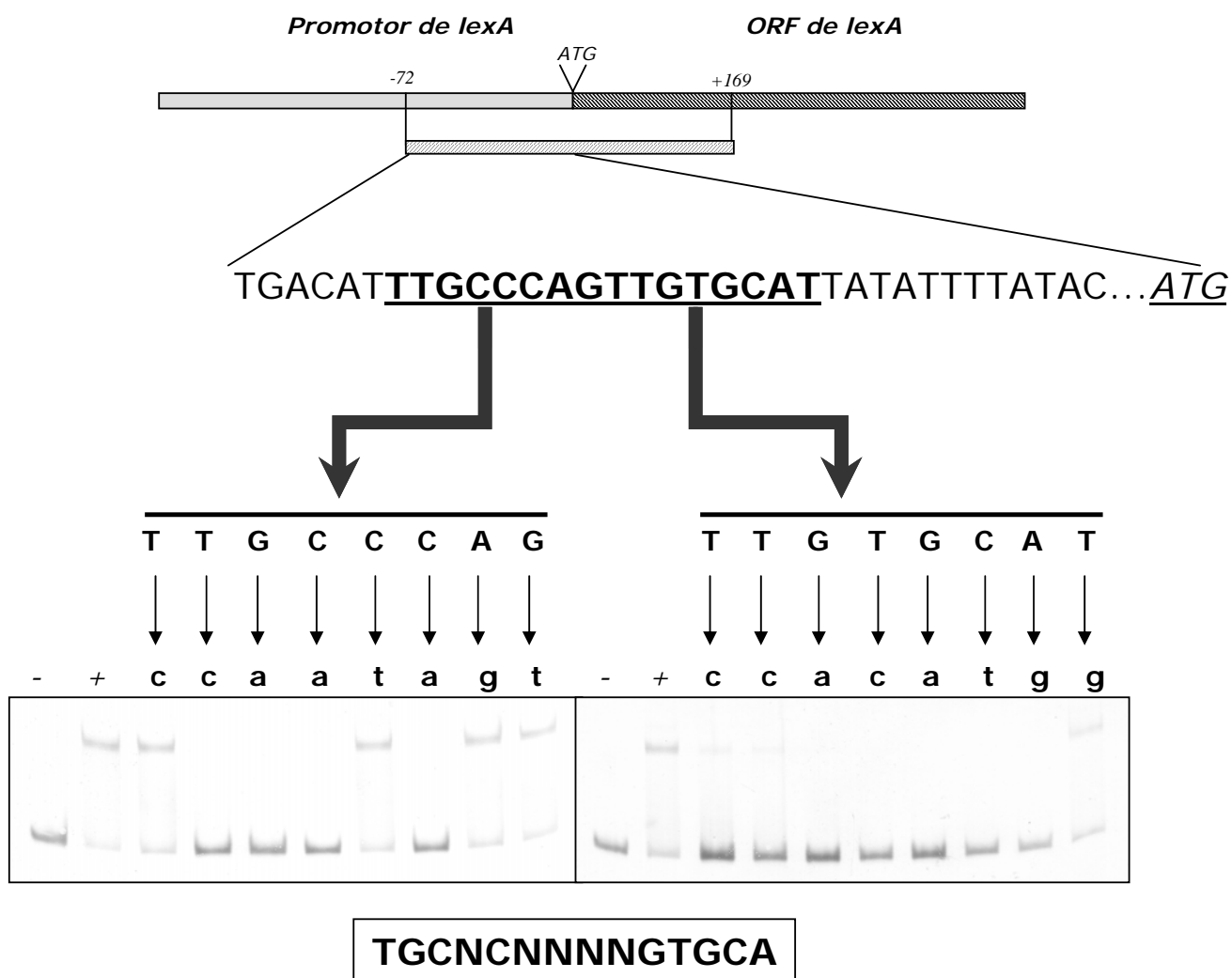


Fig. 2.20. Efecte a la mobilitat electroforètica de substitucions en el motiu palindròmic TGCCCAGTTGTGCAT (en negreta i subratllat) en presència de 40 nM de proteïna pura LexA de *F. succinogenes*. Es mostra també la mobilitat del fragment salvatge en presència (+) i absència (-) de la proteïna LexA. Enquadrades i en negreta es mostren les bases que en ser substituïdes provoquen la pèrdua de la capacitat d'unió de la proteïna LexA. L'inici de traducció de LexA està subratllat i en cursiva.

2.3.4. Caracterització del reguló LexA a *F. succinogenes*

Per determinar la composició del reguló SOS a *F. succinogenes* es va realitzar una cerca *in silico* de motius d'unió de LexA al seu genoma amb el programa RCGScanner (Erill *et al.*, 2003). Aquesta cerca, complementada amb una inspecció acurada de les caixes detectades, ha permès trobar motius reguladors davant dels gens *recA*, *uvrA*, *ssb* i *ruvAB* (Taula 2.4.) que, tot i no ser 100% idèntics al que es troba al promotor de *lexA*, presenten afinitat per la proteïna LexA, ja que són capaços de competir per la unió de LexA al seu promotor abolint completament la banda de retard electroforètic (Fig.2.21). En el cas de *recA* es va provar també la seva capacitat d'unió mitjançant un EMSA, utilitzant aquest promotor marcat amb digoxigenina, que va donar lloc a una banda específica de retard electroforètic en presència de proteïna LexA.

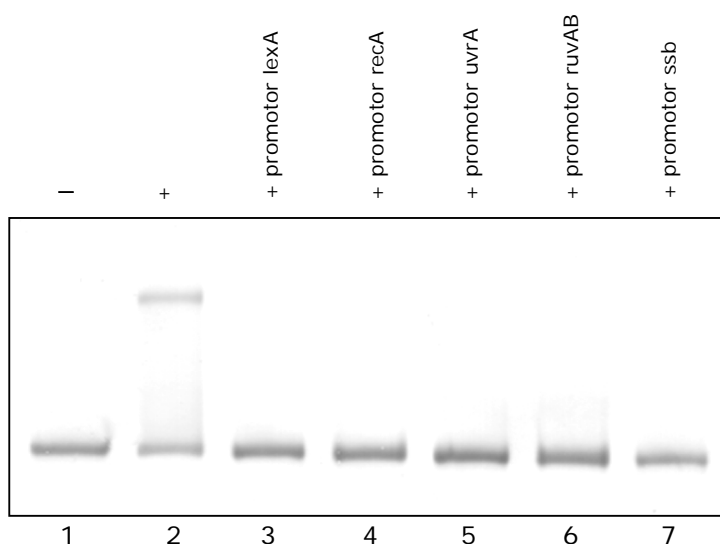


Fig.2.21. Efecte de l'addició d'un excès molar de DNA competidor no marcat dels promotors dels gens *lexA* (carril 3), *recA* (carril 4), *uvrA* (carril 5), *ruvAB* (carril 6) i *ssb* (carril 7) a la mobilitat del fragment FrgL3 en presència de proteïna LexA a 40 nM. Es mostra també la mobilitat del fragment en presència (+) i absència (-) de proteïna.

Taula 2.4. Gens regulats per LexA a *F. succinogenes*.

Gens	Caixa LexA
<i>lexA</i>	TTGCCCAGTTGTGCAT
<i>recA</i>	TTGCACAAAAGTTCAC
<i>uvrA</i>	CTATTCAAATGTTTAC
<i>ruvAB</i>	TAGCACAAAAGTGCAT
<i>Ssb</i>	CTGCCTCCTCGAGCAG
Consens	TTGCMCAAAWGTGCAY

*Les bases que eliminen la unió de LexA en ser substituïdes es mostren ombrejades. M=A o C, W=A o T, Y=T o C.

2.4. Anàlisi comparatiu de les caixes d'unió de LexA al Domini *Bacteria* (Article III)

La caracterització de les dues noves seqüències reguladores, que omplen el buit existent entre el motiu d'unió de LexA a Grampositius i el que es troba a *M. xanthus* permet realitzar una hipòtesi sobre l'evolució de la caixa LexA. Partint de la caixa més ancestral que, seguint la classificació descrita anteriorment per Gupta i col·laboradors (2000) seria la dels bacteris grampositius, podríem descriure una línia evolutiva a partir d'aquests que acabaria generant la caixa d'unió de LexA d'*E. coli*, tot passant per dos estadis intermitjos: les caixes trobades a *F. succinogenes* i *M. xanthus*. Per altra banda, el grup dels α -proteobacteris presenta un motiu que sembla derivar directament dels cianobacteris sense haver passat per la línia evolutiva que abans hem esmentat. Això es podria explicar com una pèrdua del gen *lexA* al grup alfa o en un ancestre d'aquests, i una adquisició horitzontal posterior d'una còpia amb una caixa derivada directament d'algun cianobacteri o microorganisme relacionat. (Fig. 2.22)

Per demostrar aquesta hipòtesi, es va decidir fer experiments addicionals partint del promotor situat en una posició més intermitja, en aquest cas el promotor de *F. succinogenes*, per generar-hi mutacions i obtenir les diferents caixes LexA dels altres grups filogenètics.

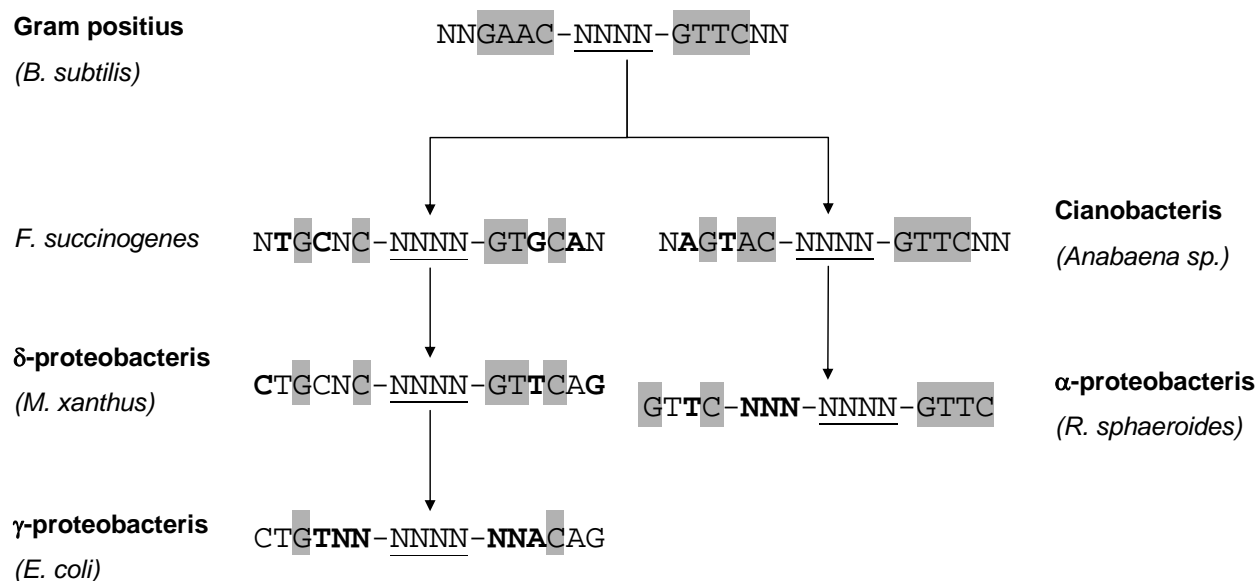


Fig. 2.22. Hipòtesi d'evolució del motiu d'unió de LexA al domini *Bacteria*. El diagrama presenta la similitud de les diferents caixes d'unió de LexA. Les bases que coincideixen amb la caixa de *B. subtilis* es mostren ombrejades i els canvis que s'introdueixen a cada divisió es mostren en negra.

2.4.1 Estudi comparatiu entre els arbres filogenètics generats amb les proteïnes RecA i LexA

Abans de començar l'estudi dels motius d'unió, es va comprovar el fonament de la hipòtesi comparant els arbres filogenètics generats amb la proteïna LexA amb els que es generen utilitzant com a marcador una proteïna altament conservada com RecA. En aquests dos arbres es pot veure clarament la diferent situació del grup alfa dels proteobacteris, que en l'arbre basat en proteïnes LexA es situa en un mateix "cluster" amb els cianobacteris (Fig.2.23), mentre que quan s'utilitza la proteïna RecA es situa a la posició que li pertoca dins dels Proteobacteris d'acord amb els anàlisis filogenètics duts a terme per diferents mètodes com ara l'alineament d'rRNA i la comparació dels *indels* (Woese, 1987; Karlin *et al.*, 1995).

2.4.2 Estudis de mutagènesi dirigida per analitzar l'evolució del motiu d'unió de LexA al domini *Bacteria*

El disseny de les mutacions encaminades a generar els diferents llocs d'unió de la proteïna LexA a partir del promotor de *F. succinogenes* va seguir la lògica d'introduir el menor nombre de canvis per aconseguir generar una caixa amb capacitat d'unió per part de la proteïna LexA del següent grup filogenètic. Per provar la hipòtesi de la segona línia evolutiva, que ens portaria al motiu d'unió del grup alfa dels proteobacteris, es van realitzar canvis al promotor salvatge del gen *lexA* d'*Anabaena* per generar-hi la caixa de *R. sphaeroides*. Els resultats dels EMSAs amb les diferents proteïnes i els fragments obtinguts estan resumits a la Fig. 2.24.

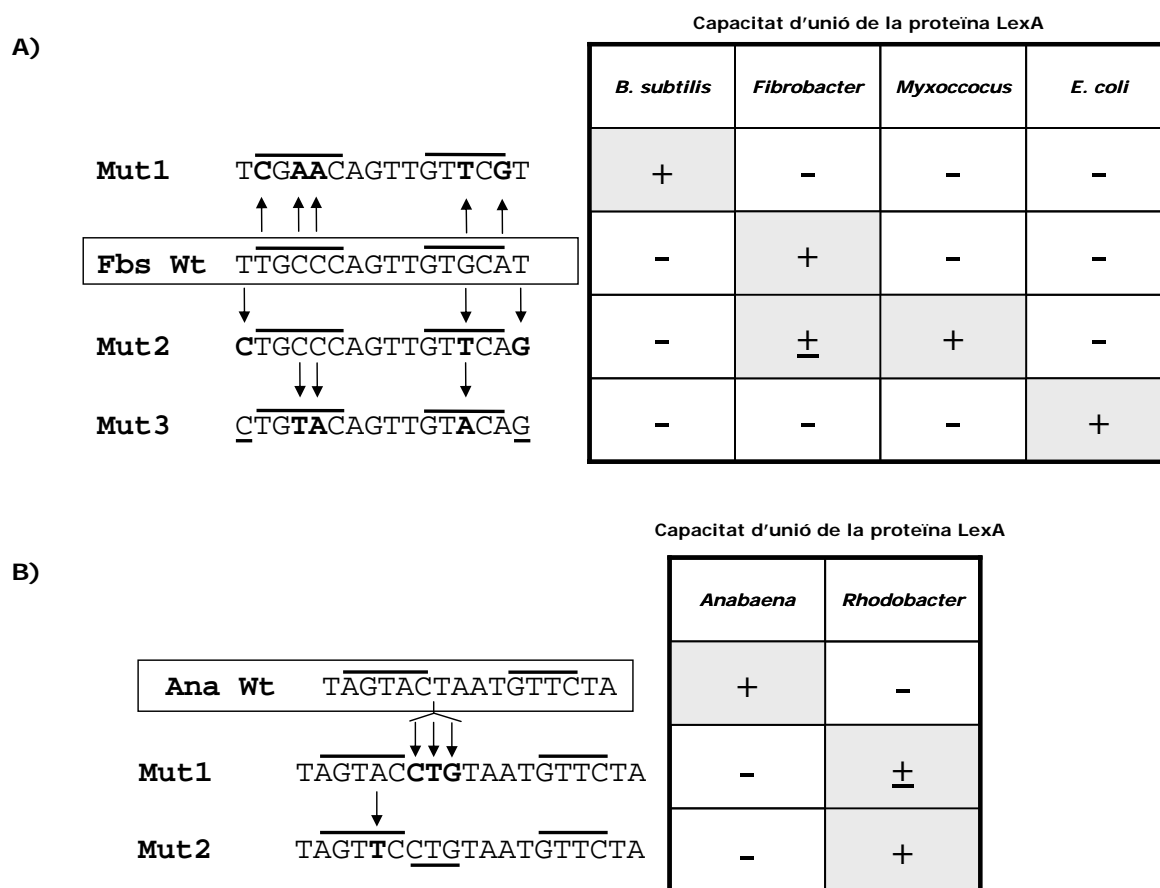


Fig. 2.24. Capacitat d'unió de les diferents proteïnes LexA a promotors derivats de *lexA* de *F. succinogenes* o *Anabaena*. Amb una línia per sobre del text es mostren els motius d'unió de LexA dels promotors salvatges de *F. succinogenes* i *Anabaena*. Les fletxes indiquen els canvis introduïts, que es presenten en negreta en el fragment en que s'introdueixen i subratllats en aquells fragments on s'acumulen a partir d'anteriors modificacions. Al quadre adjunt es recull la capacitat d'unió de LexA (+) o l'absència d'aquesta (-); (±) equival a una unió $\leq 25\%$.

Aquests resultats indiquen una relació molt estreta del motiu d'unió de LexA dels proteobacteris Alfa amb el motiu present als cianobacteris i reforcen la possibilitat esmentada anteriorment d'una adquisició per intercanvi horitzontal per part de la classe Alfa dels Proteobacteris d'una còpia de *lexA* provinent d'un microorganisme relacionat amb els cianobacteris i no per herència vertical dels ancestres immediats, que presenten motius reguladors clarament emparentats amb els que trobem al grup Gamma dels Proteobacteris exceptuant l'ordre Xanthomonadales.
