

---

### 2.8.3. Métodos analíticos

Utilizando esta metodología base, los estudios aquí llevados a cabo se dividieron en dos fases para minimizar el error cometido al imponer la asunción de que la estructura del regulón se halla conservada en especies de clases diferentes. En una primera fase, y a partir de los genes pertenecientes al regulón LexA de *E. coli*, se realiza la búsqueda primero sobre un microorganismo ya estudiado como control. En el caso de las proteobacterias Alfa el microorganismo escogido fue *S. melloti*, y en el caso de gram positivas *B. subtilis*. En esta fase el programa realizó una búsqueda BLAST de los genes de *E. coli* sobre los microorganismos a estudiar. En caso de homología superior al 60%, consideró el gen como conservado y buscó una caja tipo Alfa (por ejemplo, GAAC N<sub>7</sub> GAAC) o gram positiva (por ejemplo, GAAC N<sub>4</sub> GTTC) en el promotor de cada gen conservado, según el estudio que se estuviera llevando a cabo. A partir de las cajas encontradas, el programa creó un motivo consenso y filtró, mediante los dos tipos de filtro anteriormente mencionados, las cajas encontradas en el genoma de la bacteria en cuestión.

Los parámetros utilizados se muestran a continuación:

Parámetro	Valor
Distancia máxima entre cajas	50
Distancia mínima entre el final de la caja y el 1 codón de inicio del ORF	
Distancia máxima entre el final de la caja y el 300 codón de inicio del ORF	
Longitud mínima del ORF	235
Identidad proteica mínima entre la muestra génica y el resultado BLAST	60%
Número máximo de ORFs del BLAST utilizados en el filtro de genes base	35

En una segunda fase, a partir de los resultados de la primera se extrajo un núcleo de genes que parecían manifiestamente regulados (con cajas conservadas) entre las diferentes bacterias analizadas. A partir de aquí, y juntamente con datos experimentales, se creó una matriz consenso inter-especie, con la cual se procedió a hacer un nuevo estudio más astringente de los organismos sin recurrir, esta vez, a los genes base de *E. coli*.

Después de cada fase tuvo lugar una comprobación manual de las cajas encontradas, descartando las incorrectas.

---

## 3. Resultados

### 3.1. La caja LexA de *Geobacter sulfurreducens*

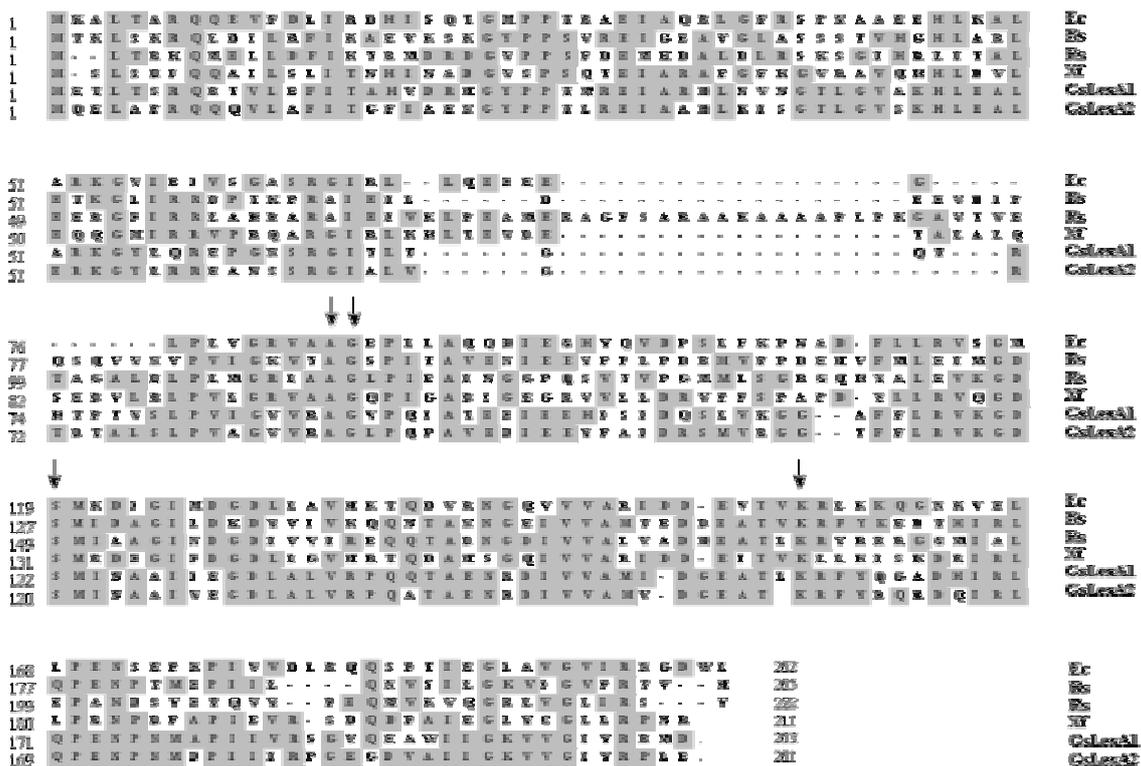
*Geobacter sulfurreducens* es un microorganismo que oxida completamente compuestos orgánicos a dióxido de carbono con fumarato, Fe(III), azufre elemental o malato como aceptores finales de electrones (Lovley, 2000). A pesar del hecho que vive bajo condiciones proclives a provocar daño en el DNA, no se conocía nada a cerca de sus mecanismos de reparación. De hecho, no había información disponible sobre el sistema de reparación del DNA de ninguna Proteobacteria delta. Debido a esto y aprovechando que se estaba secuenciando el genoma de *G. sulfurreducens* nos propusimos clonar su gen *lexA* e identificar su secuencia de unión al DNA.

#### 3.1.1. *G. sulfurreducens* tiene dos genes *lexA*

Se usó la proteína LexA de *E. coli* como muestra para un análisis TBLASTN en la base de datos NCBI y se obtuvo la secuencia de dos proteínas homólogas. Ambas proteínas, llamadas LexA1 y LexA2, constaban de 201 y 203 aminoácidos respectivamente, y ambas contenían los dos dominios característicos de los represores LexA. Además del motivo Ala-Gly, donde tiene lugar la autohidrólisis, también conservaban los motivos Lys y Ser implicados en la misma (Fig.3.1).

Mediante los oligonucleótidos LexA1up, LexA1dw, LexA2up y LexA2dw (Tabla 2.2) se amplificaron las regiones que contenían ambos genes *lexA* y sus respectivas regiones promotoras, obteniéndose dos fragmentos de 1037 pb y 710 pb que fueron clonados en el vector pGEM-T<sup>2</sup> y secuenciados utilizando los oligonucleótidos Direct-Cy5 y Reverse-Cy5 (Sanger *et al.*, 1977). Estos plásmidos se denominaron pUA1021 y pUA1022 respectivamente.

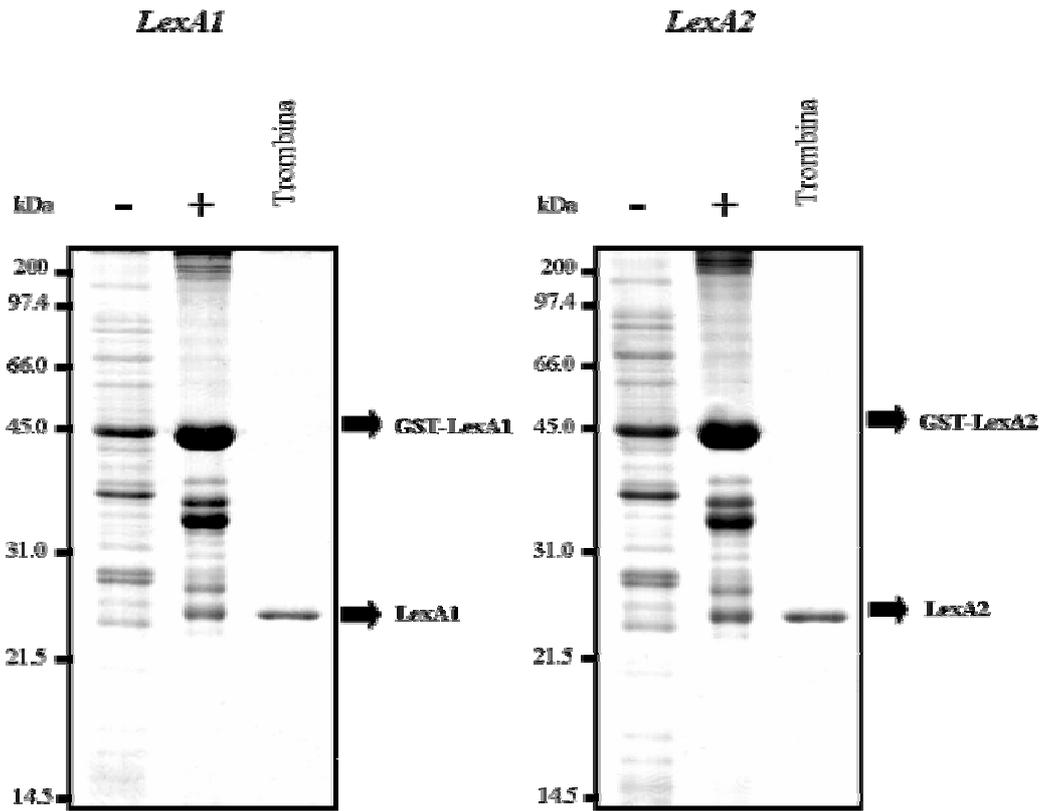
A partir de los plásmidos pUA1021 y pUA1022 y usando los oligonucleótidos LexA1EcoRI, LexA1Sall, LexA2EcoRI, y LexA2Sall (Tabla 2.2) se construyeron los plásmidos pUA1023, con un fragmento de 639 pb de *lexA1*, y pUA1024, con un fragmento de 606 pb de *lexA2*. En ambos casos los fragmentos de *lexA* estaban flanqueados por las dianas *EcoRI* y *Sall*. Ambos fragmentos fueron liberados utilizando las enzimas de restricción mencionadas y se clonaron en un vector de expresión pGEX-4T-1 inmediatamente después del promotor T7, dando lugar a los plásmidos pUA1025 y pUA1026. El codón de inicio de las proteínas LexA1 y LexA2 se encontraba después del sitio *EcoRI* en los oligonucleótidos LexA1EcoRI y LexA2EcoRI, para que los genes *lexA1* y *lexA2* pudieran ser fusionados a GST en el mismo marco de lectura. Los insertos de pUA1025 y pUA1026 fueron secuenciados para asegurarse de que no se habrían introducido mutaciones durante la amplificación.



**Figura 3.1.** Alineamiento de proteínas LexA bacterianas. Bs, *B. subtilis*; Ec, *E. coli*; Rs, *R. sphaeroides*; Xf, *X. fastidiosa*; GsLexA1, proteína LexA1 de *G. sulfurreducens*, GsLexA2, proteína LexA2 de *G. sulfurreducens*. Las flechas indican los residuos implicados en la hidrólisis autocatalítica de LexA.

Para sobreexpresar las proteínas de fusión LexA-GST, los plásmidos pUA1025 y pUA1026 fueron transformados en *E. coli* BL21-CodonPlus. Las dos cepas resultantes fueron inoculadas en 0.5 Ls de medio LB a 37°C hasta que llegaron a una DO<sub>600</sub> de 0.8. A continuación se siguió el protocolo indicado en el punto 2.6.1. El vector pGEX-4T-1 tiene una disposición estructural tal que la adición de IPTG al medio de las células de *E. coli* BL21 con esta construcción provoca la sobreexpresión de la proteína que codifica el gen insertado fusionada a GST. Esta GST es capaz de unirse a la sefarosa de una matriz, con lo que quedará atrapada y con ella la proteína a la que se encuentra fusionada.

La secuencia Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser se halla inmediatamente después de la región codificante de GST en el vector pGEX-4T-1 y sirve de unión entre LexA y GST. Este hexapéptido es reconocido por la proteasa trombina, que rompe la unión Ala-Gly. Esto permitió liberar las proteínas LexA de *G. sulfurreducens* de las bolitas de sefarosa incubándolas en un volumen final de 700 µl de PBS con 25 unidades de trombina. De esta manera se obtuvieron sobrenadantes con las proteínas LexA1 y LexA2 unidas a cinco aminoácidos adicionales en su extremo N-terminal (Gly-Ser-Pro-Glu-Phe). Ambas proteínas fueron visualizadas en un gel de electroforesis SDS-PAGE al 13% teñido con solución Coomassie (Fig. 3.2).



**Figura 3.2.** Sobreexpresión y purificación de las proteínas LexA1 y LexA2 de *G. sulfurreducens* en *E. coli*. Las muestras fueron visualizadas en un gel de poliacrilamida SDS al 13%. En ambas imágenes se presentan extractos crudos de células *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) llevando el plásmido pUA1025 (a la izquierda) o el pUA1026 (a la derecha) en ausencia (-) o en presencia (+) de IPTG (isopropyl- $\eta$ -D-thiogalactopyranoside). También se observan las proteínas LexA1 y LexA2 purificadas. Los marcadores de peso molecular están indicados en el lado izquierdo de cada imagen en kilodaltons.

### 3.1.2. Identificación de la caja de unión a DNA de la proteína LexA1 y LexA2

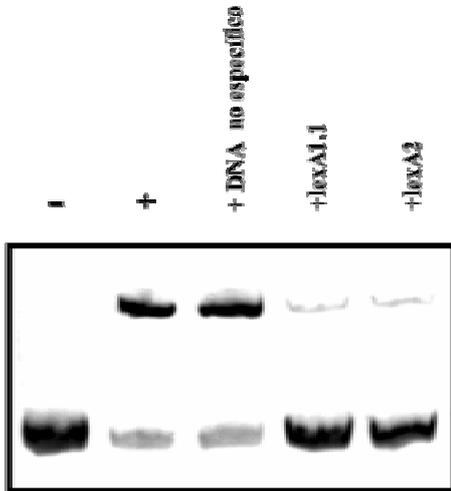
Mediante los oligonucleótidos LexA1up, LexA1+48dig, LexA2up y LexA2+65dig (Tabla 2.2) se amplificaron fragmentos marcados con digoxigenina del promotor de ambos genes a partir de los plásmidos pUA1021 y pUA1022. Con estos fragmentos se realizaron ensayos de movilidad electroforética (EMSA) para detectar si se producía la unión de ambas proteínas LexA a ambos promotores (Fig.3.3).

Los resultados obtenidos mostraron que ambas proteínas se unen a ambos promotores indistintamente y de forma específica, ya que la adición de pGEM-T en exceso no modifica el retraso observado en el gel, ni, por lo tanto, la unión entre el DNA y la proteína LexA. En cambio, al añadir un competidor específico (los mismos fragmentos de los promotores *lexA* utilizados con digoxigenina pero sin marcar) la banda de retraso electroforético desaparece.

---

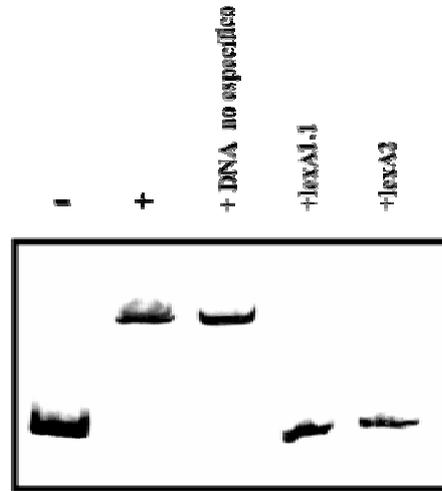
A)

Proteína: LexA1  
Fragmento de DNA: Promotor de *lexA1*



B)

Proteína: LexA2  
Fragmento de DNA: Promotor de *lexA2*



---

**Figura 3.3.** Movilidad electroforética de los promotores *lexA1* y *lexA2* en presencia de 40 ng de la proteína LexA1 purificada (A) y de LexA2 purificada (B). En cada caso también se observa el efecto en la migración de ambos promotores de un exceso tanto de plásmido pGEM-T (DNA no específico), como de los promotores *lexA1* y *lexA2*, todos ellos no marcados con digoxigenina.

---

Ya que los resultados evidenciaban que ambas proteínas se unían al mismo motivo, se escogió la proteína LexA1 para acotar y definir en detalle su caja LexA. Para conseguirlo, primero se procedió a obtener fragmentos del promotor con deleciones seriadas de su región 5' (Fig.3.3A).

Se amplificaron por PCR los fragmentos LexA1.1, LexA1.2, LexA1.3, LexA1.4 que se indican en la Figura 3.4A. Dichos fragmentos se obtuvieron utilizando el oligonucleótido LexA1+48dig marcado con digoxigenina y los oligonucleótidos LexA1-95, LexA1-74, LexA1-41 y LexA1-34, con lo que se obtuvieron fragmentos de 143, 122, 89 y 82 pb, respectivamente.

Los resultados obtenidos al realizar ensayos EMSA utilizando dichos fragmentos se muestran en la Figura 3.4B, en la que se aprecia que la banda de retraso electroforético se mantiene al utilizar los fragmentos de DNA LexA1.1, LexA1.2 y LexA1.3, mientras que ya no se observa unión con el fragmento LexA1.4. Estos resultados indican que la región en la que se produce la unión específica entre la proteína LexA1 y su promotor está situada entre las posiciones -34 y -41.