

La RT cuantitativa mostró que la transcripción del *recA* de *G. sulfurreducens* no está estimulada por la mitomicina C, mientras que ésta si que estimula la expresión de la unidad transcripcional *lexA2-dinB2*.

3.3.2. Análisis en *F. nucleatum*

3.3.2.1. Contenido del regulón LexA

Al igual que en el caso de *G. sulfurreducens*, una vez definida su caja LexA, se propuso analizar su distribución en otros promotores del genoma de *F. nucleatum*. En primer lugar y con la finalidad de descartar que el LexA estudiado fuera un represor fágico se estudió su entorno (Fig.3.15) en el que se encontraron diversos genes “house-keeping”, lo que confirmó que la proteína no tenía un origen fágico.

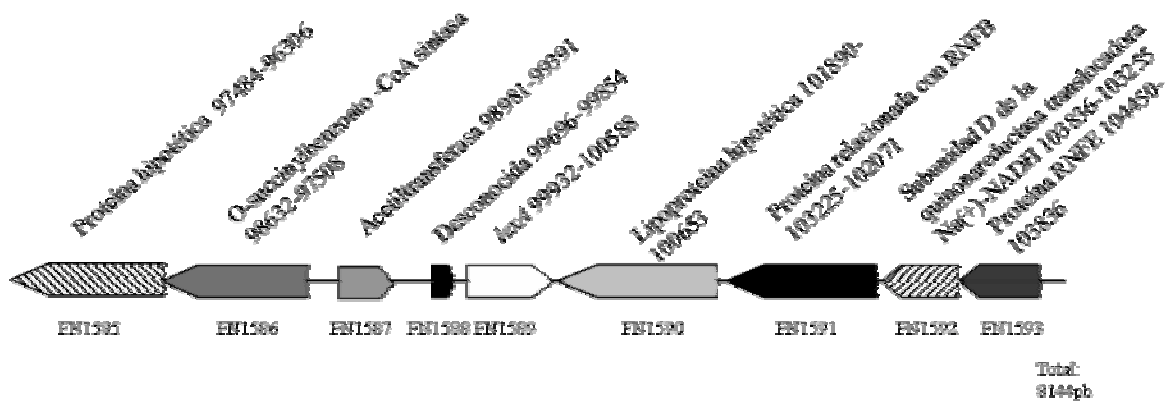


Figura 3.15. Distribución estructural del entorno del gen *lexA* de *F. nucleatum*. La definición de cada ORF (puntos inicial y final) y su situación están indicadas. Por debajo del dibujo se muestra el código de cada gen según www.tigr.org. La dirección de cada flecha indica el sentido de transcripción.

Seguidamente se buscó el motivo TGTA N12 TACA en las regiones promotoras de genes que pertenecen al regulón LexA en *E. coli* y tan solo se encontró una secuencia muy similar entre las posiciones -43 y -24, con respecto al inicio de traducción, de la región promotora del gen *dinB*. Tal y como se indica en la figura, este gen expresa una DNA polimerasa IV y está rodeada de genes “house-keeping” (Fig. 3.16).

Para determinar si la secuencia encontrada (Fig.3.17A) es reconocida por la proteína LexA se amplificó por PCR un fragmento del promotor del gen *dinB* mediante los oligonucleótidos DinB+89 y DinB+62, obteniendo un fragmento de 151 pb que, fue clonado en pGEM-T³ y secuenciado. Seguidamente se amplificó el mismo fragmento pero marcado con digoxigenina en su extremo 5' gracias a la pareja de oligonucleótidos DinB+89 y DinB+62dig. A continuación se realizó un ensayo EMSA con el fragmento obtenido, el fragmento LexA3 marcado con digoxigenina y la proteína LexA de *F. nucleatum* (Fig.3.17B).

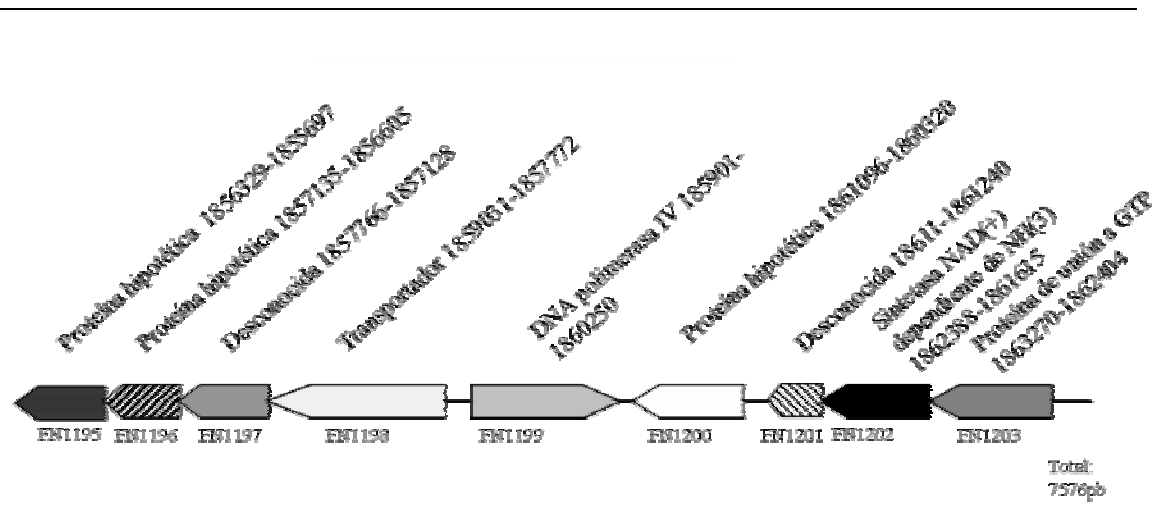


Figura 3.16. Distribución estructural del entorno del gen *dinB* de *F. nucleatum*. La definición de cada ORF (puntos inicial y final) y su situación están indicadas. Por debajo del dibujo se muestra el código de cada gen según www.tigr.org. La dirección de cada flecha indica el sentido de transcripción.

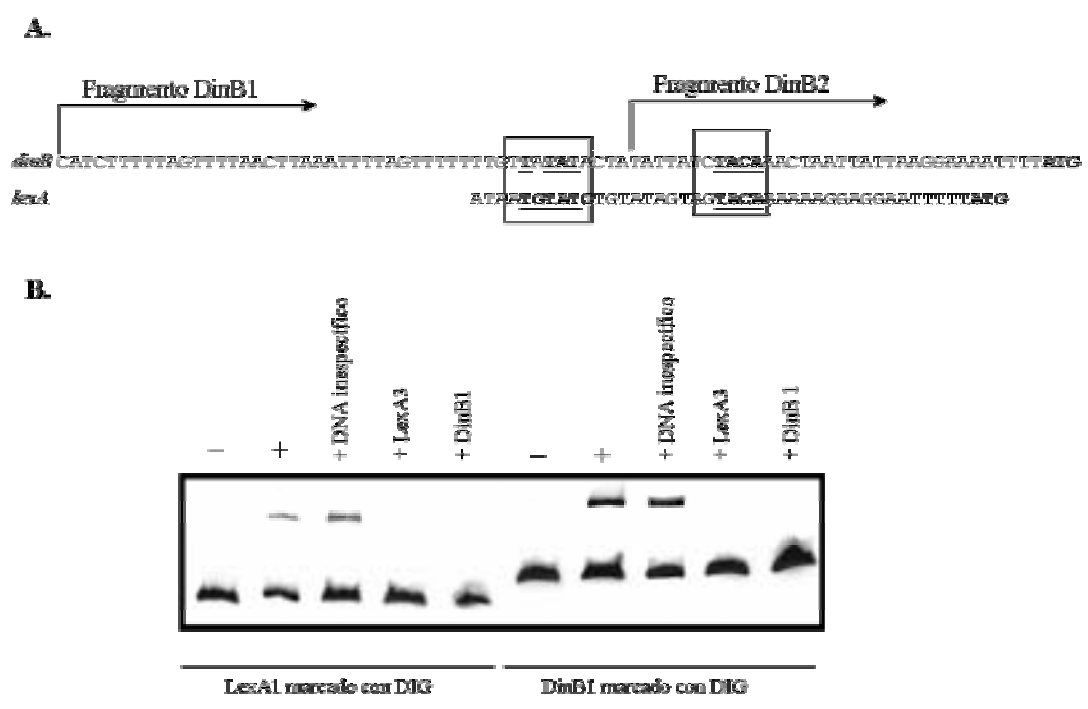


Figura 3.17. (A) Alineamiento de las regiones promotoras de los genes *lexA* y *dinB* de *F. nucleatum*. El motivo común de ambos promotores está encuadrado. Las bases idénticas se muestran en negrita. Las flechas indican el principio de los diferentes fragmentos amplificados a partir del promotor *dinB* utilizados en los ensayos EMSA posteriores. (B) Movilidad electroforética de los promotores *lexA* y *dinB* en presencia de proteína LexA purificada. En cada caso se muestra un control sin proteína (-) y los efectos que en la movilidad de cada fragmento tiene la adición de pGEM-T en exceso (DNA inespecífico), y de los fragmentos LexA1 y DinB1 sin marcar con digoxigenina.

Tal y como se observa en la Figura 3.17B, el fragmento DinB1 se une a la proteína LexA de forma específica, ya que la adición de DNA inespecífico no compite con la unión y, en cambio, si que lo hacen los fragmentos LexA3 y DinB1, siendo esto último prueba inequívoca de que ambos fragmentos se unen a la misma proteína.

Una vez demostrado que la proteína LexA de *F. nucleatum* se une de forma específica al promotor de su gen *dinB*, se procedió a su acotamiento para determinar si la

región de estudio podía tratarse del motivo de unión. Por este motivo se amplificó un segundo fragmento del promotor *dinB*, más corto que DinB1, y que no contenía el motivo similar a la caja LexA. Este nuevo fragmento, llamado DinB2, se obtuvo por PCR mediante los oligonucleótidos DinB-32 y DinB+62dig. Una vez obtenido el fragmento marcado con digoxigenina, se procedió a observar su movilidad electroforética en presencia de la proteína LexA de *F. nucleatum* (Fig.3.18). Tal y como se muestra, este último fragmento no es reconocido por LexA, por lo que el hipotético motivo de unión TATAT N11 TACA podría ser el correcto. El hecho de que este motivo caiga dentro de la zona de protección en el ensayo de *footprinting* llevado a cabo con el fragmento DinBA del promotor de *dinB* reforzó tal posibilidad (Fig.3.19), consolidando el motivo TRTATM N₁₀ TACA como la caja LexA de *F. nucleatum* (siendo R, G ó A, y M, C ó A).

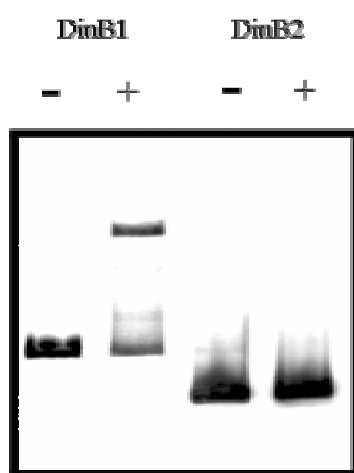


Figura 3.18. Movilidad de los fragmentos DinB1 y DinB2 en presencia (+) y ausencia (-) de la proteína LexA de *F. nucleatum*.

A continuación se propuso estudiar la presencia de la caja LexA de *F. nucleatum* en su gen *recA*. Este gen, al igual que en los casos anteriores, fue detectado mediante búsqueda TBLASTN con el gen *recA* de *E. coli* como muestra. Al estudiar su región promotora se encontró un motivo muy similar a la caja LexA, TGTT N12 TACA (Fig.3.20).

Con la finalidad de detectar unión entre el promotor de dicho gen *recA* y la proteína LexA purificada se llevaron a cabo ensayos EMSA con un fragmento del promotor *recA* que contenía el motivo encontrado. Este fragmento se amplificó mediante los oligonucleótidos RecA-251 y RecA+73 dando lugar a una banda de 324 pb que fue clonada en el vector pGEMT-T² y secuenciada. A continuación se amplificó la misma banda pero marcada con digoxigenina gracias al oligonucleótido RecA+73dig y se procedió con el ensayo de movilidad electroforética (Fig.3.20).

En dicho ensayo se observó que, al igual que en el caso de *G. sulfurreducens*, la proteína LexA no se une al promotor de *recA*, ni éste compete con otros promotores por la unión.

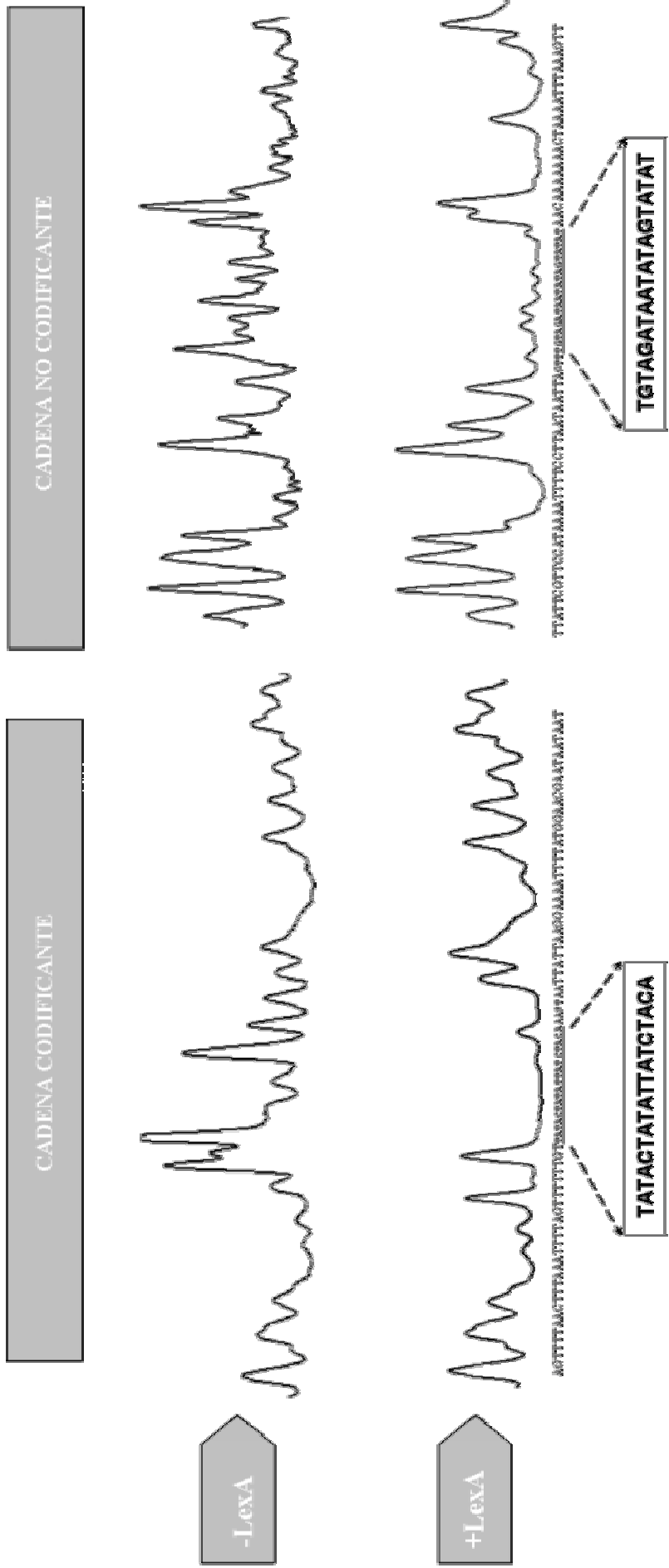


Figura 3.19. Ensayo de protección frente a la DNasa I o footprinting con las cadenas codificante y no codificante de un fragmento del promotor dinB marcado con Cy-5 en ausencia (-LexA) y en presencia (+LexA) de proteína LexA purificada. La región protegida ha sido enmarcada.

A.

<i>recA</i>	TTGAC	TGT	CCTCCTTGTAGTT	TACA	TGG	N93	ATG
<i>lexA</i>	ATAA	TGTAT	CTGTATAGT	TACA	AAA	N14	ATG

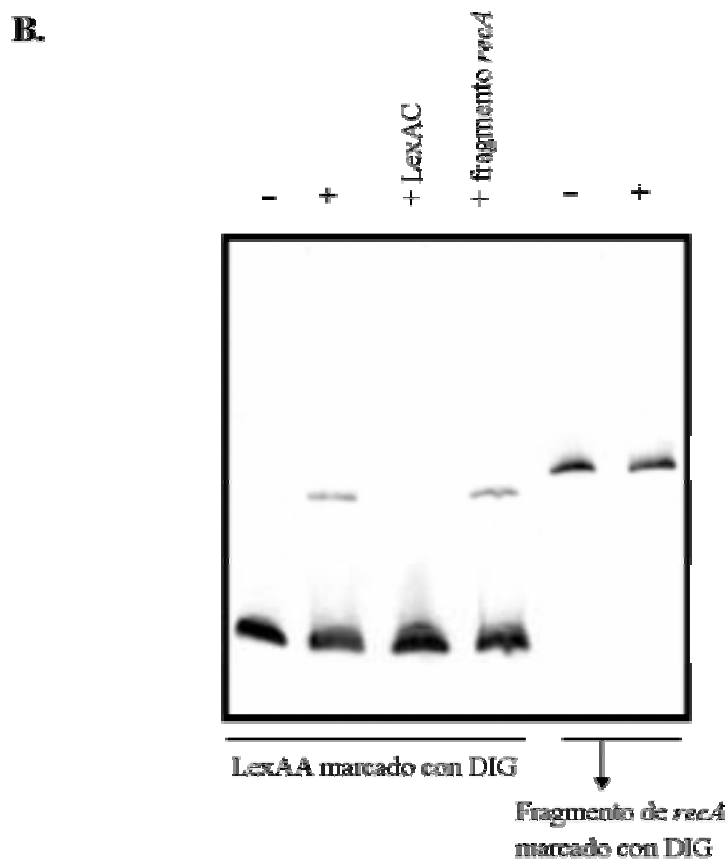


Figura 3.20. (A) Alineamiento del motivo encontrado en el promotor del gen *recA* con la caja LexA situada en el promotor del gen *lexA*. Las bases coincidentes se indican en negrita. (B) Ensayo EMSA del fragmento LexA1 y de un fragmento del promotor de *recA* que contiene el motivo de estudio. Se muestra la movilidad electroforética de ambos fragmentos en presencia (+) y en ausencia (-) de proteína LexA purificada. Además se añade fragmento de *recA* sin marcar con digoxigenina para evaluar si compete en la unión y LexA1 sin marcar como control de competición.

3.3.2.2. Estudio de la expresión de los genes *lexA*, *recA* y *dinB* mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real

Se llevó a cabo una inducción de *F. nucleatum* con 40µg/ml de mitomicina C durante 2 horas. Tras este periodo de tiempo se procedió a extraer su RNA total mediante el método de Tris Reagent™ LS (punto 2.5.1.1). Paralelamente se diseñaron las parejas de oligonucleótidos LexAup/LexArv, RecAup/RecArv y DinBup/DinBrv. Éstos amplificaban regiones internas de los genes mencionados con la finalidad de obtener fragmentos para su cuantificación en una RT a tiempo real.