



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Genètica i Microbiologia

**Coexistència de dos regulons LexA a
*Pseudomonas putida***

Marc Abella Rusiñol

2007

Universitat Autònoma de Barcelona
Departament de Genètica i Microbiologia

Coexistència de dos regulons LexA a
Pseudomonas putida

Memòria redactada per Marc
Abella Rusiñol per optar al Grau
de Doctor en Microbiologia per la
Universitat Autònoma de
Barcelona.

Vist i plau
Els Directors de la tesi

Dr. Jordi Barbé i García

Dr. Susana Campoy i Sánchez

Bellaterra 2007

*“Il faut faire de la vie un rêve
et faire d'un rêve une réalité”*

Pierre Curie

*“Science is a wonderful thing
if one does not have to earn one's living at it”*

Albert Einstein

Resum

El sistema SOS és una xarxa multigènica controlada negativament per la proteïna LexA, i està format per un conjunt de gens implicats en el manteniment de la viabilitat cel·lular davant de lesions en el DNA. Aquest sistema es troba en la majoria d'espècies bacterianes, malgrat que existeixen diferències tant en la seqüència d'unió de la proteïna LexA, com en el contingut genètic del reguló.

En la present memòria es descriu el sistema SOS de *Pseudomonas putida*, un bacteri gramnegatiu pertanyent al grup Gamma. Primerament s'han clonat els dos gens *lexA*, anomenats *lexA1* i *lexA2*, i s'han obtingut els seus productes gènics mitjançant sobreexpressió i purificació per columnes d'afinitat. Ambdues proteïnes s'han utilitzat en assaigs de mobilitat electroforètica (EMSA) amb els promotors de cada un dels gens *lexA*. Així s'ha pogut identificar la seqüència d'unió de la proteïna LexA1 (CTGTN₈ACAG) i de la proteïna LexA2 (AGTACN₄GTGCT). Posteriorment, utilitzant RT-PCR, s'ha vist com el gen *lexA2* constitueix una única unitat transcripcional amb els gens que el segueixen, formant el casset *lexA2-imuA-imuB-dnaE2*. Aquest casset s'ha vist que és induïble per danys en el DNA, i que es troba àmpliament distribuït en el domini *Bacteria*.

Seguidament, s'han obtingut dues soques mutants defectives pels gens *lexA1* i *lexA2*, i s'ha analitzat l'expressió gènica de cada una d'elles, respecte la soca salvatge, utilitzant xips de DNA (*microarrays*). Els resultats obtinguts han demostrat que la proteïna LexA1 controla la majoria de gens del sistema SOS, que a més corresponen amb la resposta convencional del seu grup filogenètic; mentre que la proteïna LexA2 només regula l'expressió de la seva pròpia unitat transcripcional, i la d'un gen (PP3901) pertanyent a un profag resident de *P. putida*. A més, aquest gen també es troba controlat per la proteïna LexA1, essent l'únic que comparteix les dues regulacions. L'obtenció d'un mutant defectiu pel gen PP3901 ha demostrat que l'expressió d'aquest és necessària per a la transcripció dels gens del profag resident. L'expressió d'aquest profag, però, no origina cap efecte deleteri apreciable sobre el creixement de *P. putida*.

Agraïments

Aquesta tesi no hauria estat possible sense la intervenció de tots aquells que heu estat al meu costat, així que voldria agrair-vos a tots plegats el vostre suport.

Primer de tot al Jordi Barbé, per convèncer-me de fer una tesi doctoral després d'acabar la carrera, i per donar-me els mitjans i els coneixements per a poder-la fer. També vull fer extensiu aquest agraïment a la Montserrat Llagostera i a tot el departament de Genètica i Microbiologia de la UAB.

Vull recordar aquí també, als meus companys i companyes de laboratori, els que ja no hi són i els que acaben d'arribar. Començant per la Susana, per ensenyar-m'ho tot i guiar-me. I tota la "*vieja escuela*" la Mònica, sempre corrent i estressada, però sempre amb bon humor. La Núria, la sirena del laboratori, disposada a ajudar o a ser ajudada! Al Cuñé, un *mega crack* amb un sentit de l'humor una mica àcid. L'Anna Hervàs, una noia molt vital, que ara busca bacteris als llacs mentre pren el sol a la platja! I molt especialment al Gerard, un autèntic *gurú* que em va ensenyar moltes coses i que ben segur que arribarà molt lluny! I finalment a les meves nenes, la Noe, que vam trigar a descobrir-la, però que va resultar ser una gran persona sempre disposada a organitzar viatges *low cost*, i la meva post-doc, la Sonia, quants disgusts i alegries compartides intentant que sortís alguna cosa amb el Sulfo! Espero que li vagi molt bé en la seva nova etapa americana. I l'Anna Bigas, coetània meva, que recentment ha migrat al lab 1, i amb qui hem compartit el dia a dia al laboratori que, sovint, pot ser molt frustrant! I les noves incorporacions, la Laura i la Neus, que ens amenitzen les tardes amb converses picants! I al Raúl Mesa, un altre coetani meu, sempre disposat a defensar a l'Alonso! I com no, al Joan, sense el qual no podríem fer res! I que, pobret, ara es quedarà envoltat de noies!! I també a l'Andrés, que m'ha ajudat molt (no només fent retards) en la fase final de la meva tesi.

També vull recordar a tota la gent del lab 2, molt especialment a l'Elena, una noia molt vàlida, que segur que li espera una gran carrera científica! I també a la Pilar, quants mal de caps ens han donat els RNAs!!! Moltes gràcies per les mil RTs que t'he fet fer! I la Vanessa (miss Tamarite), també companya meva de carrera i de doctorat, i amb un gran temperament. I a la Carlota, i als nois del lab 2, el Jesús i el Gerard, que han d'aguantar un ambient hostil ple de noies! I per últim la Susana i la Isabel que ens han fet la vida més fàcil al lab!

També vull agrair-vos a tots aquells que, sense formar part del laboratori, m'heu ajudat a arribar fins aquí. Principalment al Lluís, per acompanyar-me a dinar a la clínica, per les discussions científiques, per ajudar-me sempre sense pensar-ho, per l'amistat. També a l'Anna Barceló i a la Laia Viladevall per ajudar-me amb els microarrays. I a l'Olga Zafra, el meu contacte a Madrid, per la paciència i per enviar-me les soques tan ràpidament. I finalment a la gent de l'IBB, la Sílvia Bronsoms i el Mario Ferrer per ajudar-nos amb el Sulfo i donar-nos consell.

Finalment, i molt especialment, vull donar les gràcies a la meva família pel seu suport incondicional i per donar-me la millor educació! I al meu germà amb qui sempre puc comptar. I a la Loli i el Mateo, sempre disposats a convidar-me a dinar! Però sobretot a la Paqui, sense la qual no hauria arribat fins on he arribat, per compartir els patiments i les alegries, per ser com ets, per estimar-me.

ÍNDIX

1. Introducció	3
1.1. El sistema SOS a <i>Escherichia coli</i>	6
1.1.1. Inductors del sistema SOS	8
1.1.2. Inducció del sistema SOS	8
1.1.3. La proteïna LexA	11
a) Estructura de la proteïna LexA	13
b) Unió a la caixa SOS	14
c) Autohidròlisi	15
1.1.4. La proteïna RecA	18
a) Estructura	18
b) Funcions	20
1.1.5. Funcions SOS	20
a) Reparació per escissió de nucleòtid	21
b) Reparació per recombinació	22
c) Mutagènesi SOS	24
d) Altres funcions SOS	26
1.2. El sistema SOS en altres microorganismes	27
1.2.1. Sistema SOS als bacteris gramnegatius	27
a) Grup dels proteobacteris Alfa	27
b) Grup dels proteobacteris Beta	29
c) Grup dels proteobacteris Gamma	29
d) Grup dels proteobacteris Delta	29
1.2.2. Sistema SOS als bacteris grampositius	30
2. Materials i mètodes	37
2.1. Soques, plasmidis i oligonucleòtids	37
2.2. Medis i solucions de cultiu	46
2.3. Mètodes microbiològics	48
2.3.1. Preparació de cultius	48
2.3.2. Conservació de soques	48
2.3.3. Corba de creixement	49
2.3.4. Taxa de mutagènesi i càlcul del nombre de viables	49
2.3.5. Assaig de <i>fitness</i>	50
2.3.6. Transformació amb clorur càlcic	50
a) Preparació de cèl·lules competents	50
b) Transformació per xoc tèrmic	51
2.3.7. Electrotransformació	51
a) Preparació de les cèl·lules competents	52
b) Electrotansformació	52
2.4. Mètodes de manipulació del DNA	53
2.4.1. Extracció de DNA cromosòmic	54
2.4.2. Extracció de DNA plasmídic	55
a) Miniextracció de DNA plasmídic	55
b) Maxiextracció de DNA plasmídic	56
2.4.3. Digestió amb enzims de restricció i tampons	61
2.4.4. Electroforesi de DNA	61
a) Preparació dels gels d'agarosa	61
b) Marcadors	63

c)	Purificació de fragments de DNA	64
2.4.5.	Quantificació del DNA	65
2.4.6.	Clonació en vectors plasmídics. Preparació dels vectors i dels inserts	65
a)	Reompliment d'extrems	66
b)	Defosforilació de l'extrem 5'	66
c)	Precipitació del DNA.....	67
d)	Reacció de lligació.....	67
2.4.7.	Amplificació del DNA: PCR	68
2.5.	Obtenció de mutants de gens de <i>P. putida</i>	69
a)	Inactivació del gen amb el casset Km.....	69
b)	Conjugació i selecció dels dobles recombinants	70
2.6.	Mètodes de manipulació de l'RNA	71
2.6.1.	Extracció d'RNA.....	71
2.6.2.	Tractament amb DNAsal	72
2.6.3.	Quantificació de l'RNA	73
2.6.4.	Purificació de l'RNA utilitzant el kit <i>RNeasy® Mini</i>	73
2.6.5.	Amplificació de l'RNA: RT-PCR	74
2.6.6.	RT-PCR quantitativa a temps real	75
2.6.7.	<i>Microarrays</i>	76
a)	RT (retrotranscripció)	76
b)	Hidròlisi de l'RNA.....	77
c)	Purificació del cDNA.....	77
d)	Incorporació dels fluorocroms	78
e)	Bloqueig del <i>microarray</i>	78
f)	Hibridació	79
g)	Rentat.....	79
2.6.8.	Anàlisi dels resultats del <i>microarray</i>	82
2.7.	Obtenció de proteïnes purificades.....	83
2.7.1.	Clonació i sobreexpressió de proteïnes	83
a)	Preparació del vector de sobreexpressió	83
b)	Sobreexpressió de proteïnes.....	84
c)	Purificació de proteïnes	85
2.7.2.	Gels d'electroforesis de proteïnes SDS-PAGE.....	86
2.7.3.	Assaig de mobilitat electroforètica (EMSA).....	90
a)	Marcatge de fragments de DNA.....	90
b)	Reacció d'unió proteïna-DNA	91
c)	Preparació del gel de poliacrilamida i electroforesi	91
d)	Transferència	92
e)	Revelat i detecció.....	93
3.	Resultats.....	99
3.1.	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440.....	99
3.2.	<i>P. putida</i> posseeix dos gens <i>lexA</i>	100
3.2.1.	Clonació dels gens <i>lexA1</i> i <i>lexA2</i>	101
3.2.2.	Identificació de la caixa d'unió al DNA de les proteïnes <i>LexA1</i> i <i>LexA2</i>	103
3.2.3.	Anàlisi de la caixa reconeguda per la proteïna <i>LexA2</i>	107
3.3.	Organització gènica de l'entorn dels gens <i>lexA1</i> i <i>lexA2</i>	110
3.4.	Patró d'expressió dels gens <i>lexA1</i> i <i>lexA2</i>	111
3.4.1.	Construcció d'un mutant <i>lexA2(Def)</i>	112

3.4.2. Construcció d'un mutant <i>lexA1</i> (Def).....	116
3.5. La resposta global SOS de <i>P. putida</i>	117
3.5.1. Gens regulats per LexA1.....	120
3.5.2. Gens regulats per LexA2.....	125
3.5.2.1. Construcció d'un mutant <i>lexA1</i> (Def) <i>lexA2</i> (Def).....	127
3.5.3. Gens no regulats per LexA.....	129
3.6. Anàlisi comparativa de la resposta SOS de <i>P. putida</i>	129
3.7. Funcions del gen PP3901.....	132
3.7.1. Construcció d'un mutant PP3901(Def).....	132
3.8. Regulació dels gens fàgics.....	136
4. Discussió.....	141
5. Conclusions.....	149
6. Bibliografia.....	153
7. Annex.....	183

1. Introducció

1. Introducció

Els éssers vius es troben contínuament exposats a situacions que poden provocar danys en el seu material genètic. Aquestes agressions poden ser tant de caràcter endogen (derivat del propi metabolisme), com de tipus exogen (deguts a l'exposició a agents físics o químics mediambientals). Per tant, és especialment important que els organismes vius posseeixin mecanismes de defensa contra aquests agents lesius, per així mantenir estable la informació genètica de l'espècie. Malgrat això, petits canvis en la seqüència del DNA d'una espècie permeten l'evolució. Així, l'evolució té més a veure amb la supervivència que amb la transmissió precisa del genoma. D'aquesta manera, existeix un equilibri entre els sistemes de reparació, que permeten la supervivència de la cèl·lula i l'estabilitat del DNA, i la incorporació d'un grau sostenible de mutacions que faciliten una millor adaptació al medi. Així el que pot ser nociu a nivell d'un organisme pot ser beneficiós a nivell poblacional.

Cadascun dels diferents agents mutagènics que actuen sobre el DNA poden causar un tipus diferent de lesió. Si el dany causat no és reparat correctament, es poden incorporar mutacions en el genoma. De la mateixa manera que existeixen diferents tipus de lesions, també hi ha diversos mecanismes de reparació, que s'activen en funció de la quantitat de danys presents en la molècula de DNA, i que estan especialitzats en la reparació de cadascuna d'elles.

Els diferents mecanismes de reparació que posseeixen les espècies bacterianes es poden classificar, segons el tipus de lesió, el grau en el que aquestes es produeixen i el moment en el qual s'activen. Així podem parlar de reparació per reversió directa, per escissió, per recombinació i síntesi de translesió.

- a) Hi ha dos tipus de **reparació per reversió directa**: la fotoreactivació i la transferència de grups alquil. En aquests sistemes hi ha una sèrie d'enzims (fotoliasas en el primer cas i alquil transferases en el segon) que són capaços de detectar la lesió i reparar-la per revertir el canvi. Això es dona principalment abans de la replicació, ja que les lesions

reconegudes per aquest mecanisme no distorsionen excessivament l'estructura del DNA i les bases afectades poden ser reconegudes de manera errònia per la polimerasa replicativa sense que la forquilla de replicació s'aturi. Si no són reparades abans, la polimerasa replicativa reconeixerà un aparellament erroni i introduirà una mutació a la cadena complementària, que pot fixar-se en successives rondes de replicació com una mutació impossible de diferenciar de la seqüència original.

- b) En la **reparació per escissió** els enzims implicats reconeixen la lesió i se substitueix la seqüència afectada. Si només s'elimina la base afectada es parla d'escissió de base (BER, de l'anglès *base excision repair*), i si s'elimina una zona més àmplia de la cadena afectada s'anomena escissió de nucleòtid (NER, de l'anglès *nucleotide excision repair*). Els enzims implicats en la NER són la família UvrABC. Quan el nivell de lesions no és molt gran, aquest sistema pot actuar prereplicativament (Friedberg *et al.*, 2005).
- c) La **reparació per recombinació** actua quan les lesions introduïdes en la cadena de DNA presenten un major grau de dificultat de reparació: enllaços entre les dues cadenes de DNA, talls monocatenaris o bicatenaris i alteracions de la cadena motlle durant la replicació. En aquest tipus de reparació hi han implicades les vies RecFOR i RecBCD i diferents proteïnes, però totes elles utilitzen la proteïna RecA en el pas d'aparellament de les cadenes o sinapsis. Aquest és el principal mecanisme que actua quan es produeix una aturada de la forquilla de replicació (Courcelle *et al.*, 2003).
- d) La **síntesi de translesió** (TLS) és un mecanisme que s'activa només quan hi ha moltes lesions en el DNA, i per tant, han d'entrar en funcionament mecanismes de reparació d'emergència que garanteixin la supervivència de la cèl·lula. Aquest no és un mecanisme reparatiu, ja que és un procés de replicació que tendeix a l'error. Per mitjà de la TLS, la cèl·lula canvia la polimerasa replicativa per una polimerasa especialitzada a replicar a través de bases alterades. D'aquesta manera es produeix un *bypass* sobre el nucleòtid lesionat, permetent així que no quedin zones de DNA no replicades (Lehmann *et al.*, 2007). En aquest procés també hi intervé la proteïna RecA (Fuchs *et al.*, 2007). La

tendència a introduir errors d'aquestes polimerases fa que a aquest mecanisme també se l'anomeni mutagènesi SOS. A més, s'ha vist que també té un paper important en la introducció de variabilitat genètica en cèl·lules en fase estacionària.

El microorganisme procariota que es coneix més és *Escherichia coli*, un bacteri gramnegatiu del grup dels Gamma proteobacteris. Els mecanismes de reparació presents en aquest bacteri s'han estudiat àmpliament i s'ha vist que la resposta d'*E. coli* davant de lesions del seu DNA implica l'activació d'entre el 0,7% i el 10% dels seus gens (Fernandez de Henestrosa *et al.*, 2000; Courcelle *et al.*, 2001; Khil *et al.*, 2002). Els productes d'aquests gens estan implicats en reparació del DNA, però també intervenen en la replicació i en el control del cicle cel·lular. Aquests gens es troben formant xarxes multigèniques capaces d'activar-se selectivament segons el tipus de dany i el nivell d'aquest. Les xarxes millor estudiades són:

- 1. Resposta adaptativa a agents alquilants.** Aquest mecanisme s'activa com a resposta a la presència d'agents alquilants del DNA com ara la N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), el metil metanosulfonat (MMS) o l'etil metanosulfonat (EMS). Els integrants del reguló són els gens *ada*, *alkA*, *alkB* i *aidB*. La proteïna Ada n'és el regulador positiu, alhora que també té funcions de reparació a l'igual que la resta dels gens del reguló (Landini *et al.*, 2000).
- 2. Resposta a l'estrès oxidatiu.** L'estrès oxidatiu el produeixen compostos químics anomenats espècies reactives de l'oxigen. Són radicals químics com el peròxid d'hidrogen (H_2O_2), radicals superòxid (O_2^-) o nitrils (NO), que normalment es produeixen de manera endògena pel propi metabolisme aeròbic cel·lular, tot i que també poden ser d'origen exogen. S'han caracteritzat dos regulons l'OxyR i el SoxR que contenen més de 20 gens. OxyR regula catalases i reductases que actuen en presència de peròxid d'hidrogen. En canvi el SoxR regula l'expressió de diferents enzims com la superòxid dismutasa (Demple, 1997a; Demple, 1997b; Michan *et al.*, 1999; Zheng *et al.*, 1999)

3. Resposta SOS o sistema de reparació d'emergència. Aquest sistema està format per un conjunt de gens que actuen de forma coordinada, l'expressió dels quals s'activa davant la presència de lesions al DNA que provoquen una aturada de la replicació (Fernandez de Henestrosa *et al.*, 2000; Courcelle *et al.*, 2001). Els gens d'aquesta xarxa es troben, en situació basal, reprimits per la unió de la proteïna LexA a una seqüència palindròmica del seu promotor. Aquesta regió s'anomena caixa SOS o caixa d'unió de LexA. Quan apareixen les lesions, aquestes provoquen l'aparició de zones de cadena senzilla de DNA (ssDNA) que són reconegudes per la proteïna RecA. L'activació de la proteïna RecA fa que el repressor LexA no pugui unir-se al promotor dels gens del sistema SOS permetent-ne l'expressió. En ser aquest sistema de reparació l'objecte de la present tesi, a continuació es farà una descripció més detallada.

1.1. El sistema SOS a *Escherichia coli*

Aquest sistema es va descriure per primera vegada a *E. coli*, de manera que és en aquest microorganisme on es coneix més bé el seu funcionament (Walker, 1984).

El sistema SOS d'*E. coli* implica almenys 40 gens (Fernandez de Henestrosa *et al.*, 2000), però podrien ser més, ja que estudis més recents utilitzant *microarrays* en descriuen fins a 1000 (Courcelle *et al.*, 2001; Khil *et al.*, 2002) (Taula 1.1). Els gens que formen part d'aquesta resposta estan implicats en diferents funcions cel·lulars: reparació del DNA, divisió cel·lular, tolerància al dany, recombinació, etc. Cal destacar que els gens *recA* i *lexA*, que són els responsables de la regulació del sistema, també formen part del reguló SOS.

La seqüència nucleotídica de la caixa d'unió de la proteïna LexA posseeix certa variabilitat entre els diferents gens SOS, fet que permet una expressió basal major o menor de cada gen, ja que hi ha gens SOS que són tòxics per la cèl·lula i d'altres que juguen una funció general en el metabolisme cel·lular en condicions en les quals el sistema no està induït. D'aquesta manera es pot establir una seqüència SOS consens a partir dels diferents gens SOS.

Aquesta seqüència és característica de cada espècie, existint força diferències entre grups filogenèticament separats.

Taula 1.1. Gens d'*E. coli* regulats per LexA¹.

Gens	Funció
(a) Cromosòmics	
<i>polB</i>	DNA polimerasa II
<i>dinP</i>	DNA polimerasa IV
<i>dinD</i>	Desconeguda
<i>dinF</i>	Desconeguda. Està en el mateix operó que <i>lexA</i>
<i>dinG</i>	Desconeguda
<i>dinI</i>	Inhibició de la proteïna UmuD. Estabilitzador dels filaments de RecA
<i>dinJ</i>	Desconeguda
<i>dinK</i>	Desconeguda
<i>dinL</i> (<i>yjiW</i>)	Desconeguda
<i>dinM</i> (<i>ydjQ</i>)	Posible homòleg a <i>uvrC</i>
<i>dinN</i>	Desconeguda
<i>dinO</i>	Desconeguda
<i>dinQ</i>	Desconeguda
<i>dinS</i>	Possible transposasa
<i>ftsK</i>	Divisió cel·lular i segregació cromosòmica
<i>hokE</i>	Possible proteïna assassina
<i>lexA</i>	Repressor del sistema SOS
<i>recA</i>	Recombinació i coproteasa. Regulador positiu del sistema SOS
<i>recN</i>	Recombinació per la via RecF, reparació de trencaments de cadena doble i senzilla
<i>recX</i>	Modulador del sistema: inhibició funcions RecA
<i>ruvAB</i>	Recombinació per la via RecF
<i>sbmC</i>	Resistència a la microcina B17
<i>ssb</i>	Unió a DNA de cadena senzilla
<i>sulA</i> (<i>sfiA</i>)	Inhibició de la divisió cel·lular
<i>umuDC</i>	Mutagènesi SOS. DNA polimerasa V
<i>uvrA</i>	Reparació per escissió de nucleòtid
<i>uvrB</i>	Reparació per escissió de nucleòtid
<i>uvrD</i>	Helicasa II
<i>ybfE</i>	Desconeguda
<i>ydjM</i>	Desconeguda
<i>yebG</i>	Desconeguda
<i>ysdAB</i>	Desconeguda
(b) Extracromosòmics	
<i>colA</i> (<i>caa</i>)	Producció de colicina ColA
<i>colE</i> (<i>cea</i>)	Producció de colicina Col E1
<i>impAB</i>	Homòleg d' <i>umuDC</i> . Mutagènesi SOS
<i>mucAB</i>	Homòleg d' <i>umuDC</i> . Mutagènesi SOS
<i>samAB</i>	Homòleg d' <i>umuDC</i> . Mutagènesi SOS
<i>tum</i>	Inducció del fag ϕ 186

¹ S'han inclòs únicament els gens regulats directament per LexA. Modificat de Friedberg (2005); Walker (1996); Koch i Woodgate (1998); Fernández de Henestrosa *et al.* (2000); Courcelle *et al.* (2001).

1.1.1. Inductors del sistema SOS

Existeixen múltiples inductors exògens que provoquen la inducció del sistema SOS: quinolones, mutàgens orgànics, radiació UV, mitomicina C, etc. (Friedberg *et al.*, 2005). Aquests inductors són els que s'han estudiat més i els que provoquen l'activació del sistema a través de l'aparició de regions de cadena senzilla en el DNA (ssDNA) (Sassanfar *et al.*, 1990). A més també es coneix la capacitat d'induir el sistema a través d'un estrès físic com és la pressió hidrostàtica, gràcies a l'actuació d'una endonucleasa de tipus IV (Aertsen *et al.*, 2005). Recentment s'ha descrit la capacitat que tenen certs antibiòtics d'induir també el sistema quan s'apliquen en concentracions subinhibitòries (Miller *et al.*, 2004). El mecanisme pel qual antibiòtics com les β -lactamases poden induir el sistema SOS no està clar, però se sap que és dependent de RecA (Maiques *et al.*, 2006). Existeixen també inductors endògens, tot i que estan menys estudiats. S'han identificat diversos gens que produeixen la desregulació del sistema SOS quan són inactivats (O'Reilly *et al.*, 2004).

1.1.2. Inducció del sistema SOS

Quan apareixen lesions en el DNA per l'efecte d'agents mutagènics, el procés de còpia del DNA es veu alterat, ja que la DNA polimerasa III no és capaç de reconèixer la base lesionada i es produeix una aturada de la forca de replicació (Sassanfar *et al.*, 1990; Labib *et al.*, 2007). Els models més actuals postulen que la replicació es reinicia més enllà de la zona danyada deixant forats en la nova cadena sintetitzada (Lehmann *et al.*, 2006). Quan es bloqueja la polimerasa tant de la cadena líder com de la cadena retardada, hi ha un desacoblament dels dos enzims que condueix a l'aparició de ssDNA en una o altra cadena, en funció de quina polimerasa hagi trobat la lesió (Pages *et al.*, 2003). Posteriorment, tot i que la polimerasa hagi saltat de la cadena lesionada, ambdues cadenes poden recarregar l'holoenzim DNA polimerasa III, ja sigui per reciclatge d'un nou fragment d'Okazaki (cadena retardada) o bé per un mecanisme que utilitza PriA (Heller *et al.*, 2007). També s'ha vist que és necessari DnaC per carregar la helicasa replicativa DnaB (Rudolph *et al.*,

2007). Aquestes regions d'ssDNA, poden ser recobertes per la proteïna Ssb o per RecA, en un procés de substitució on possiblement intervien les proteïnes RecFOR (Pages *et al.*, 2003; McInerney *et al.*, 2004). Aquesta unió de RecA porta a la formació d'un nucleofilament, que és alhora senyal inductor de la resposta SOS i intermediari de processos de recombinació que poden dur a la replicació fidel (McGlynn *et al.*, 2002). Una altra forma per la qual es generarà aquest nucleofilament de RecA, és per l'acció del complex RecBCD (holoenzim exonucleasa V), que té activitat helicasa sobre dsDNA, i incrementa la presència de regions de ssDNA quan hi ha trencaments de cadena (Churchill *et al.*, 1999). En el procés d'activació de la proteïna RecA, aquesta s'uneix al voltant del ssDNA formant nucleofilaments helicoidals i així adopta la seva conformació activa. Això es produeix amb consum d'energia en forma d'ATP (Yu *et al.*, 1993). Els filaments consten de 6 monòmers de RecA per volta (Egelman, 1998) que s'agrupen de manera cooperativa (Sattin *et al.*, 2004). En aquest procés hi intervien altres proteïnes com Ssb (que facilita l'accés de RecA a les zones de ssDNA) i el complex RecFOR (que millora l'eficiència del procés) (Kuzminov, 1999; Rangarajan *et al.*, 2002).

El complex nucleoproteic de RecA (RecA*) actua com una coproteasa sobre la proteïna LexA. En estat basal (quan no hi ha lesions en el DNA) el repressor del sistema SOS, la proteïna LexA, es troba unida (en forma de dímer) a una seqüència específica del promotor dels gens SOS (caixa SOS). Això fa que hi hagi només una expressió basal de tots els gens de la xarxa. La interacció de RecA* amb LexA porta a l'autohidròlisi d'aquest últim, produint-se un trencament de l'enllaç Ala₈₄-Gly₈₅ que fa que sigui incapaç de reconèixer el lloc d'unió i per tant queda inactivat com a repressor (Little, 1991).

Aquest trencament fa que quedin exposades regions reconegudes per la proteasa ClpXP que no eren accessibles quan la proteïna estava sencera i així els fragments de LexA són ràpidament degradats (Neher *et al.*, 2003). D'aquesta manera, els gens que es trobaven reprimits per la unió de LexA augmenten la seva transcripció, que es mantindrà elevada fins que desaparegui el senyal inductor. Això succeeix quan les lesions són reparades, de manera que ja no queden zones de ssDNA, i RecA* passa a l'estat inactiu al

deixar de formar nucleofilaments. Quan això succeeixi, la proteïna LexA sintetitzada *de novo* no serà hidrolitzada i podrà unir-se de nou als promotors dels gens SOS, recuperant la situació basal del sistema (Koch *et al.*, 1998; Friedberg *et al.*, 2005) (Figura 1.1)

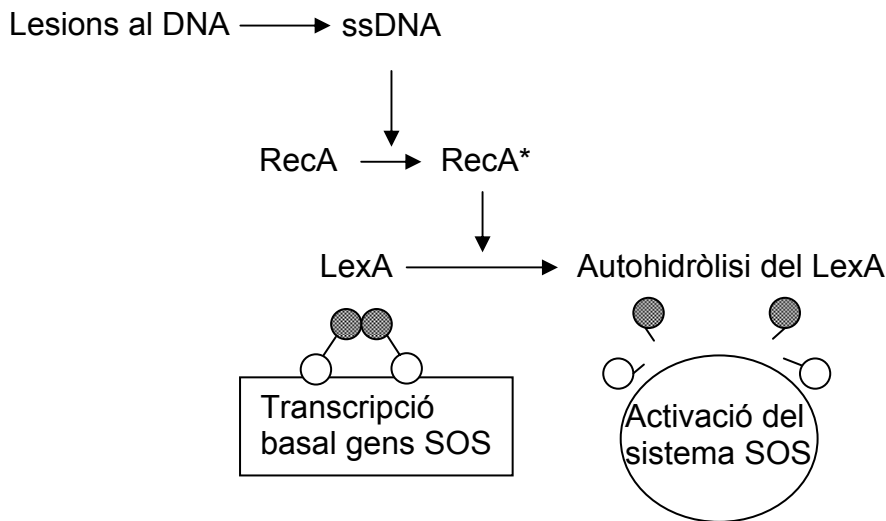


Figura 1.1. Model esquemàtic del procés d'activació del sistema SOS. Modificat de Ronen *et al.* (2002).

Dins dels gens del reguló SOS n'hi ha dos, *dinI* i *recX*, que s'han descrit com a moduladors de l'activitat de la proteïna RecA. Al principi de la resposta SOS quan DinI es troba en baixes concentracions, estableix la unió dels nucleofilaments de RecA* al ssDNA. Posteriorment, quan la resposta arriba a la seva fase final i DinI es troba en major concentració, juga el paper contrari desestabilitzant la unió del RecA* al ssDNA (Lusetti *et al.*, 2004b). Per la seva banda RecX a elevades concentracions inhibeix la funció coproteasa de RecA* i per tant ajuda a limitar els nivells d'inducció del sistema i a recuperar-ne l'estat basal (Drees *et al.*, 2004; Lusetti *et al.*, 2004a).

Existeix una regulació temporal precisa pel que fa a l'activació dels gens SOS, primer s'expressen els gens necessaris en els primers passos de reparació i no és fins més endavant que s'activen els que són necessaris en els últims passos de recuperació i adaptació (Ronen *et al.*, 2002; Friedman *et al.*, 2005). La resposta SOS sincronitza el procés de reparació i es troba molt ben

estructurada. Un dels sistemes que s'ha descrit que és un element clau en aquesta precisió temporal és l'operó *umuDC*, ja que funciona com a *checkpoint* inhibint la divisió cel·lular (Opperman *et al.*, 1999). A més s'ha vist que dins d'una població una petita fracció de cèl·lules indueixen el sistema SOS de forma espontània (McCool *et al.*, 2004). Això reflecteix la presència d'inductors endògens que són font de mutagènesi i que permeten incrementar l'heterogeneïtat dins de la població.

1.1.3. La proteïna LexA

La proteïna LexA d'*E. coli* està formada per 202 aminoàcids i té un pes molecular de 22,7 KDa (Horii *et al.*, 1981). El gen que la codifica a *E. coli* es troba formant unitat transcripcional amb el gen *dinF* (Heide *et al.*, 1993).

Aquesta proteïna és un repressor transcripcional i controla l'expressió del reguló SOS, en el que s'inclou el propi gen *lexA* (Brent *et al.*, 1981). Això ho fa gràcies a la seva capacitat d'unir-se al DNA en una regió palindròmica del promotor dels gens SOS anomenada caixa SOS. A *E. coli* aquesta caixa és 5'-CTGT(AT)₄ACAG-3' (Walker, 1984; Wertman *et al.*, 1985). La unió es produeix en forma d'homodímer, reconeixent cada monòmer de LexA un dels dos motius palindròmics. Aquesta unió impedeix el correcte accés de l'RNA polimerasa al promotor dels gens SOS, permetent només una expressió basal dels mateixos. Com ja s'ha mencionat, una de les altres característiques del LexA és la capacitat d'autohidrolitzar-se gràcies a l'acció de RecA*, tot i que també ho pot fer a causa d'un pH bàsic (Little, 1984; Little *et al.*, 1994).

Les bases de la caixa SOS més importants pel reconeixement de la proteïna són CTGT i ACAG. És per això que aquestes són les bases més conservades de la caixa SOS d'*E. coli* (Taula 1.2). El grau de repressió que exerceix la proteïna LexA és variable en funció de l'especificitat del reconeixement de la caixa en els diferents gens. Aquesta especificitat dependrà de la proximitat de la caixa SOS a la seqüència consens (Schnarr *et al.*, 1991) i de la seva localització respecte les regions d'unió de l'RNA polimerasa. Generalment existeix una única caixa SOS en el promotor dels gens del

sistema SOS, però no és estrany trobar dues o més regions operadores en alguns d'ells. En aquests casos la repressió serà més gran.

Taula 1.2. Gens cromosòmics d'*E. coli* regulats per LexA i les seqüències de les seves caixes SOS¹.

Gens	Caixa SOS ¹
<i>polB</i>	G ACTGT TATAAA ACCACAG CC
<i>dinP</i>	CA CTGT TACTTT ACCAG TG
<i>dinD</i>	AA CTGT ATATAA ATACAG TT
<i>dinG</i>	TAT TGG CTGTTT ATACAG TA
<i>dinI</i>	AC CTGT TATAA ATAAC CAGTA
<i>dinL (yjiW)</i>	T ACTG ATGATAT ATACAG GT
<i>dinM (ydjQ)</i>	CA CTG GATAGATA ACCAG CA
<i>dinO</i>	AA CTG GATAAA ATTACAG GG
<i>dinQ</i>	T ACTGT ATGAT TATC AGTT
<i>dinS</i>	AG CTGT ATTTGTCT C AGCA
<i>ftsK</i>	TC CTGT TAATCC ATACAG CA
<i>hokE</i>	CA CTGT TATAA ATAAAC AGCT
<i>lexA/dinF (1)</i>	TG CTGT TATA ACTCACAG CA
<i>lexA/dinF (2)</i>	TG CTGT TATA CACCCAG GG
<i>recA</i>	T ACTGT ATGCTC ATACAG TA
<i>recN (1)</i>	T ACTGT ATATA AAAAC AGTT
<i>recN (2)</i>	T ACTGT ACACA ATAAC AGTA
<i>recN (3)</i>	TA ATGG TTTTT CATACAG GA
<i>ruvAB</i>	CG CTG GATGTCT ATC AGCA
<i>sbmC</i>	T ACTGT ATATA AAAAAC AGTA
<i>Ssb</i>	AC CTG AATGA ATATAC AGTA
<i>sulA (sfiA)</i>	T ACTGT ACATCC ATACAG TA
<i>umuDC</i>	T ACTGT ATATA AAAAAC AGTA
<i>uvrA</i>	T ACTGT ATAT TCATC AGGT
<i>uvrB</i>	AA CTGT TTTTTT TATC AGTA
<i>uvrD</i>	AT CTGT ATAT ATACC AGCT
<i>ybfE</i>	AA CTG AT AAAAACC AGCG
<i>ydjM (1)</i>	T ACTGT ACGTATCG ACAG TT
<i>ydjM (2)</i>	CA CTGT TATA AAAATC TATA
<i>yebG</i>	T ACTGT TATA AAATC AGTT
<i>ysdAB</i>	CA CTGT TTATTT ATACAG TA
Consens	T ACTGT ATATAT ATACAG TA

¹Les bases en negreta corresponen als motius més conservats. Les bases subratllades corresponen a desviacions dels motius conservats CTGT i ACAG. Modificat de Fernández de Henestrosa *et al.* (2000.)

a) Estructura de la proteïna LexA

Aquesta proteïna posseeix tres regions estructurals i funcionals (Figura 1.2):

- i. El **domini N-terminal** està format pels residus aminoacídics de la posició 1 a la 72. És el domini implicat en la unió de la proteïna al DNA i per tant, reconeix la caixa SOS. Té una estructura similar a la d'una hèlix-gir-hèlix (*helix-turn-helix* o HTH), típic dels reguladors transcripcionals (Harrison *et al.*, 1990; Schnarr *et al.*, 1991). L'estructura tridimensional d'aquest domini ha estat caracteritzada per ressonància magnètica nuclear (RMN) (Fogh *et al.*, 1994) i s'ha vist que està formada per tres hèlix alfa (residus 6-21, 28-35 i 40-52) connectades per regions "gir" (*turn*). També s'hi han trobat dues regions beta antiparal·leles (residus 50-58 i 66-68). Les regions hèlix alfa s'anomenen $\alpha 1$, $\alpha 2$ i $\alpha 3$. Les dues últimes són les que tenen una estructura més semblant a la de HTH, i és la $\alpha 3$ la de major importància en el reconeixement de la caixa. És per això que aquesta regió és la més variable entre les espècies en funció de la seqüència de la seva caixa SOS (Thliveris *et al.*, 1992; Groban *et al.*, 2005).
- ii. La **regió connectora** (*hinge region*) comprèn els residus del 73 al 94 i és la regió central de la proteïna. És on es troba l'enllaç Ala₈₄-Gly₈₅, per on es produeix el trencament en l'autohidròlisi. Presenta un cert plegament necessari per poder entrar en contacte amb el domini C-terminal i permetre l'autohidròlisi (Little, 1984; Luo *et al.*, 2001).
- iii. El **domini C-terminal** està format pels aminoàcids de la posició 95 a la 202. La seva funció és la de dimerització, interacció amb RecA* i està implicat en la reacció d'autohidròlisi. És el domini més conservat en les diferents espècies i posseeix força similitud amb la proteïna umuD i el repressor del cicle lític de diversos bacteriòfags (Battista *et al.*, 1990a),

tot i que realitzen funcions d'autohidròlisi sensiblement diferents (Mustard *et al.*, 2000). Posseeix una estructura secundària en forma de làmines beta (Hurstel *et al.*, 1986).

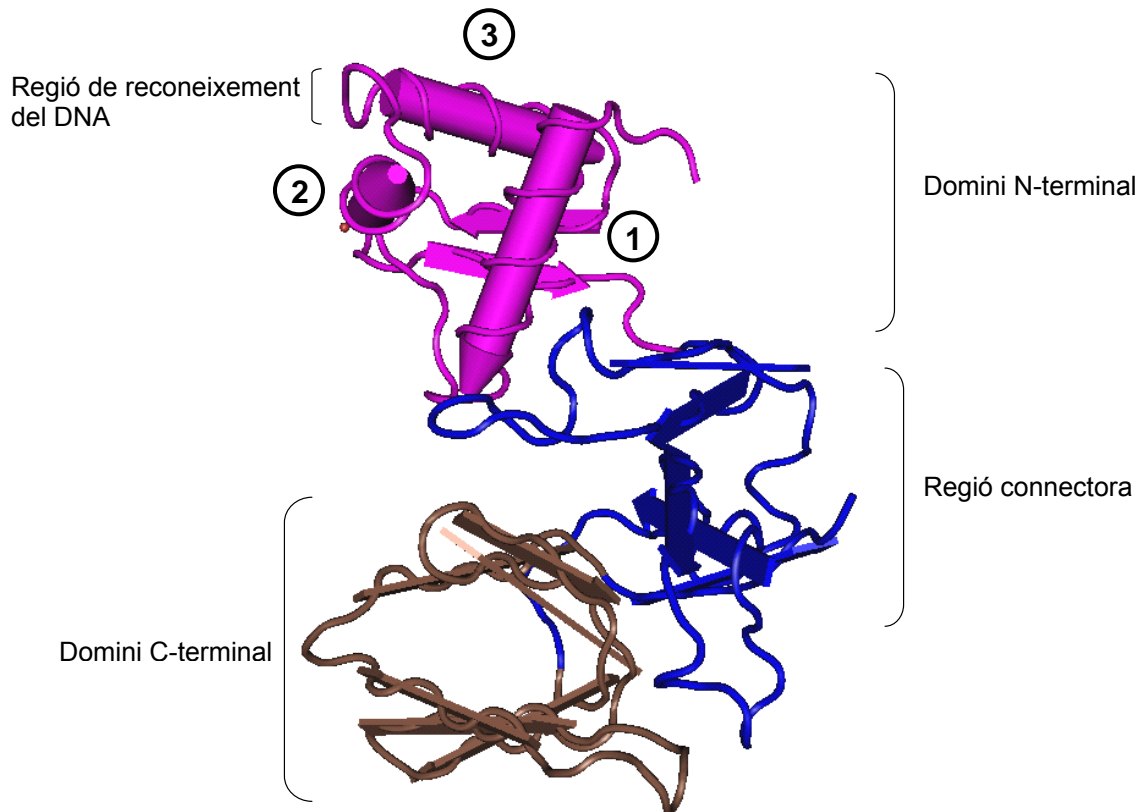


Figura 1.2. Estructura tridimensional de la proteïna LexA. Els números 1, 2 i 3 indiquen les tres regions en hèlix alfa del domini N-terminal.

b) Unió a la caixa SOS

La interacció de la proteïna LexA amb el DNA es dona pel domini N-terminal. Aquesta unió és un procés dinàmic i reversible i es produeix en forma de dímer, cadascun dels monòmers reconeix una de les dues seqüències palindròmiques de la caixa SOS. Experimentalment s'ha vist que és un procés seqüencial. Primer s'uneix un monòmer al motiu CTGT i posteriorment, un segon monòmer interacciona amb el motiu CTGC de l'altra cadena a través de

la interacció proteïna-proteïna amb la regió C-terminal del primer monòmer (Kim *et al.*, 1992; Mohana-Borges *et al.*, 2000) (Figura 1.3).

Es coneix que la regió compresa entre els aminoàcids 40 i 52 (anomenada $\alpha 3$) és la responsable del reconeixement de la seqüència 5'-CTGT(AT)₄ACAG-3', ja que mutacions puntuals o delecions en aquesta hèlix tenen alterada la capacitat d'unir-se al DNA (Oertel-Buchheit *et al.*, 1990; Oertel-Buchheit *et al.*, 1992). Més concretament, els aminoàcids de les posicions 42-47 són essencials per la interacció amb el DNA; els aminoàcids Asn₄₁, Glu₄₄, Glu₄₅ formen ponts d'hidrogen amb les bases CTGT i els aminoàcids Ser₃₉, Asn₄₁ i Ala₄₂ estableixen interaccions hidrofòbiques amb la primera timina de la caixa. A més, existeixen interaccions inespecífiques amb els aminoàcids Arg₇, Glu₈, Arg₃₈, Ser₆₀ i Arg₆₄. (Thliveris *et al.*, 1992; Knegtel *et al.*, 1995).

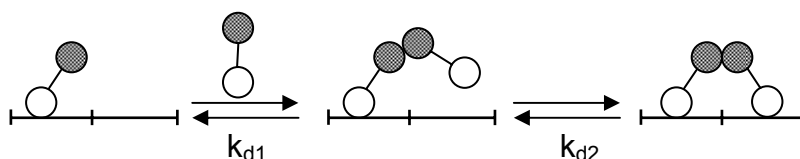


Figura 1.3. Dimerització de la proteïna LexA. El domini N-terminal del LexA es presenta en blanc i el C-terminal en gris. Modificat de Kim i Little (1992)

c) Autohidròlisi

El trencament de la proteïna és induït per RecA*, però s'anomena autohidròlisi perquè tant el substrat de la reacció (lloc de trencament) com el centre catalític (residus que intervenen en el procés químic que porta al trencament de l'enllaç peptídic) es troben en la proteïna LexA (Figura 1.4). En condicions fisiològiques (pH neutre) es necessita la catàlisi de RecA*, però *in vitro* s'ha vist que a pH bàsic es produeix un trencament espontani del LexA sense la intervenció de cap altre element (Little, 1984; Little *et al.*, 1994)

El lloc de trencament es troba en la regió connectora entre els aminoàcids Ala₈₄ i Gly₈₅, mentre que el centre catalític està format pels aminoàcids Ser₁₁₉ i Lys₁₅₆ (Slilaty *et al.*, 1987; Roland *et al.*, 1992). La distància entre el lloc de trencament i el centre catalític, així com els aminoàcids implicats en la reacció es manté constant (amb petites variacions en la distància de com a molt dos aminoàcids) i serveix per identificar aquesta proteïna com a tal.

La reacció d'autohidròlisi consisteix en una desprotonització del grup amino de la Lys₁₅₆ (amb un pK de 9,5) deguda a una pujada del pH o, *in vivo*, a l'efecte catalític del RecA*. Com a conseqüència es produeix un atac nucleofílic d'aquest grup amino sobre l'hidroxil de la Ser₁₁₉. Això desencadena un nou atac, per neutralitzar la seva reducció, sobre l'enllaç Ala₈₄-Gly₈₅, produint així el trencament de la proteïna (Figura 1.4).

Aquest mecanisme recorda al de les serin-proteases, amb les quals posseeix una elevada homologia en l'extrem C-terminal de LexA (Roland *et al.*, 1992). Altres estudis apunten a que el mecanisme de trencament és més similar al de les β -lactamases (Little, 1993). Així sembla, doncs que la proteïna LexA té dues conformacions: una seria compatible amb el mecanisme esmentat anteriorment, mentre que l'altra no. RecA* tindria un paper important en aquest procés estabilitzant la conformació que facilita el trencament (Oertel-Buchheit *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 2001).

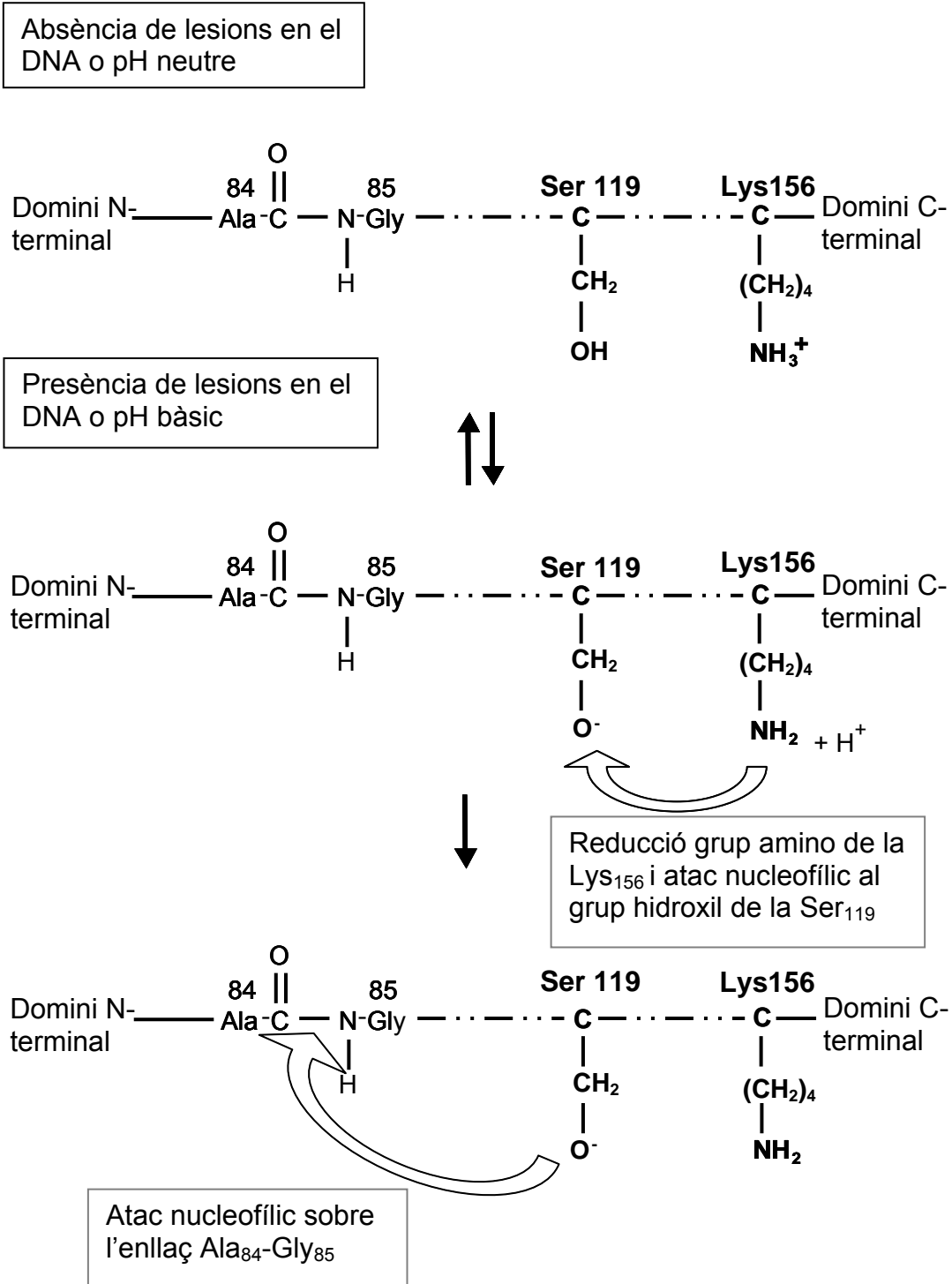


Figura 1.4. Procés d'autohidròlisi de la proteïna LexA

1.1.4. La proteïna RecA

La proteïna RecA d'*E. coli* està formada per 352 aminoàcids i té un pes molecular de 38 KDa i el seu pI és de 5,6 (Cox, 2003). Aquesta proteïna intervé en diversos processos cel·lulars i es troba molt conservada al llarg de l'evolució; cosa que ha fet que s'utilitzés com a marcador filogenètic molecular (Eisen, 1995).

a) Estructura

La unitat funcional de la proteïna està formada per sis monòmers de RecA disposats helicoïdalment (Story *et al.*, 1992). Aquesta estructura envolta el DNA formant el complex de filament nucleoproteic activat (Sattin *et al.*, 2004). Aquest filament presenta un solc helicoïdal llarg, en el qual un dels costats és llis, mentre que l'altre és irregular a causa de les prominències dels monòmers individuals. És precisament en aquest costat per on interacciona amb la proteïna LexA, però també ho fa amb DNA de doble cadena. És per això que les activitats de coproteasa i de recombinació de la proteïna RecA competeixen entre si (Harmon *et al.*, 1996; Rehrauer *et al.*, 1996b).

Aquesta proteïna s'ha pogut cristalitzar (Xing *et al.*, 2004) i utilitzant eines de resolució atòmica s'han determinat diferents dominis (Figura 1.5). El més important és el domini central (que correspon als aminoàcids del 36 fins al 266 ± 4), que conté la regió d'unió a nucleòtids i dues regions de baixa densitat electrònica: el *bucle 1* i el *bucle 2* implicat en la unió al DNA. Els altres dominis són a l'extrem N-terminal (aminoàcids $1-36 \pm 8$) i al C-terminal (aminoàcids 266-352) (Story *et al.*, 1992; Rehrauer *et al.*, 1996a).

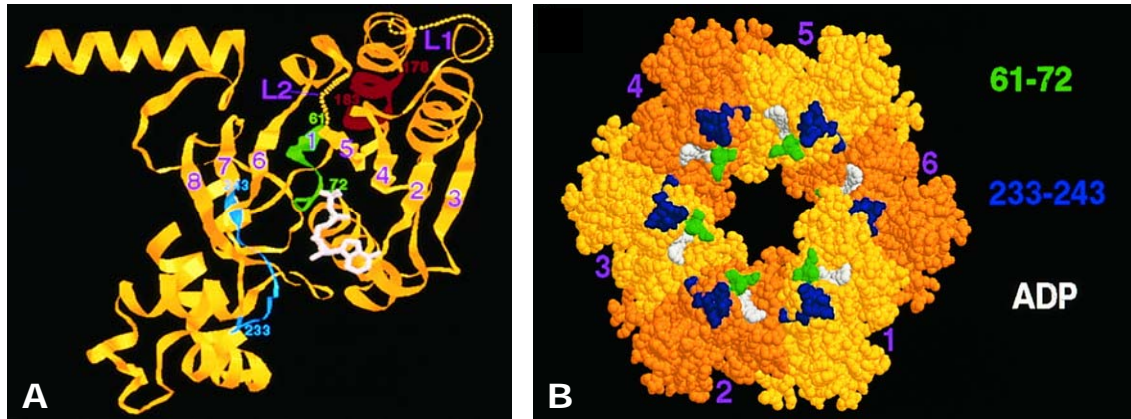


Figura 1.5. Estructura de la proteïna RecA. A) Estructura tridimensional d'un monòmer de la proteïna RecA. Les cadenes β estan numerades de l'1 al 8 i s'indiquen els *bucles* entre els aminoàcids 157-164 (L1) i 195-209 (L2). La posició de l'ADP està representada en blanc. B) Estructura d'una sola volta del solc helicoidal de la proteïna RecA, format per sis monòmers. Modificat de Rehrauer *et al.* (1996a).

A nivell funcional trobem els següents dominis:

- I. **Dominis d'unió a nucleòtids i hidròlisi.** Són dos dominis altament conservats que es troben en la regió d'unió A (aminoàcids del 66 i 77) i la regió B (aminoàcids del 140 al 144). La primera s'encarrega d'unir-se a ribonucleòsids trifosfat (NTPs) i la segona de la hidròlisi de l'ATP.
- II. **Dominis d'unió al DNA.** La unió al DNA es fa mitjançant els *bucles* 1 i 2 de la regió central de la proteïna, que a més formen plegaments. De totes maneres existeixen altres residus que també estan implicats en la unió (aminoàcids de la posició 61 a la 72, de la 178 a la 183 i de la 233 a la 243) (Rehrauer *et al.*, 1996a).
- III. **Dominis d'interacció entre monòmers i entre filaments.** La interacció entre monòmers es fa per interaccions hidrofòbiques al llarg de tota la proteïna, i es compon de sis monòmers per volta de l'hèlix de DNA. La interacció entre els filaments es dona en els extrems de la molècula. A l'extrem N-terminal els aminoàcids implicats són el 37 i el 38, mentre que al C-terminal és la regió compresa entre els aminoàcids 233 i 243.
- IV. **Dominis d'unió a LexA i a altres proteïnes.** Els dominis d'unió a LexA, i a altres proteïnes com UmuD o repressors fàgics, són els

aminoàcids del 229 al 243 (Karlin *et al.*, 1996). L'aminoàcid 243 és per on es produeix la competència per la unió del DNA o del LexA. A més, la regió del *bucle* 1 també està involucrada en la unió a la proteïna LexA (Yu *et al.*, 1993).

b) Funcions

La proteïna RecA intervé en nombroses funcions cel·lulars que són molt importants per la supervivència. Així doncs trobem que participa en els processos bioquímics següents:

- I. Recombinació homòloga. Aparellament i intercanvi de bases
- II. Activitat coproteàsica dependent d'ATP i del DNA. Així regula l'expressió dels gens SOS.
- III. Mutagènesi SOS. Interaccions amb factors proteics mutagènics que faciliten la reparació tendent a error (Tang *et al.*, 1998).

A causa de la seva participació en aquests importants processos cel·lulars, el seu nivell basal és elevat (entre 1.000 i 10.000 monòmers per cèl·lula), podent augmentar entre 20 i 50 vegades en l'estat induït del sistema SOS (Kuzminov, 1999).

1.1.5. Funcions SOS

El reguló SOS comprèn múltiples gens, que permeten dur a terme majoritàriament funcions relacionades amb la reparació del DNA per garantir la supervivència cel·lular. Cal destacar, però, que els gens de l'operó *lexA* no són els mateixos en tots els microorganismes, sinó que trobem diferències importants entre els diferents grups filogenètics i també en funció de les necessitats particulars d'adaptació de cada espècie. A *E. coli*, aquests gens els podem classificar en tres grups: reparació, mutagènesi SOS i altres funcions no relacionades amb la reparació. A continuació es detallen les funcions integrades en cada un dels grups.

a) Reparació per escissió de nucleòtid

Aquest mecanisme de reparació és capaç de detectar un mal aparellament de nucleòtids, eliminar les bases danyades i substituir-les per d'altres, utilitzant com a motlle la cadena inalterada. D'aquesta manera es pot reparar la lesió sense introduir mutacions. La radiació UV i alguns productes químics poden causar el tipus de lesió que és reconegut per aquest sistema (Friedberg *et al.*, 2005). Els gens implicats en aquest procés són: *uvrA*, *uvrB*, *uvrC* i *uvrD*. Aquests gens no formen una única unitat transcripcional ni tenen la mateixa regulació, ja que l'*uvrC* no forma part del reguló *lexA*. Altres proteïnes que també intervenen en aquest procés són la DNA polimerasa I i la DNA ligasa. Aquest sistema funciona de la següent manera:

- i. **Reconeixement de la lesió.** La proteïna UvrA en forma de dímer (UvrA₂) recorre la cadena de DNA fins que detecta una lesió (variació en l'estructura del DNA). Quan això ocorre, la proteïna UvrB verifica la presència d'una lesió (es forma el complex UvrA₂B) gràcies a la seva estructura de *β-hairpin*. Posteriorment, la seva activitat helicasa i amb consum d'energia (ATP) li permet unir-se de forma estable en el punt de la lesió (Moolenaar *et al.*, 1994). Això porta a l'alliberament de la proteïna UvrA.
- ii. **Escissió de la cadena lesionada.** La proteïna UvrC interacciona amb el complex UvrB-DNA i produeix un tall de l'enllaç fosfodiester de la cadena lesionada. UvrC talla a vuit nucleòtids de la lesió, a l'extrem 5'; per la seva banda, l'UvrB talla a quatre nucleòtids de la lesió, en l'extrem 3'. Així s'elimina el fragment de DNA que contenia la lesió i es desprèn la proteïna UvrC, permetent l'entrada de la proteïna UvrD (helicasa II) (Van Houten *et al.*, 1993; Zou *et al.*, 1997).
- iii. **Síntesi de la nova cadena.** L'activitat helicasa de la UvrD, juntament amb la polimerasa I, intervenen en la fase final de la reparació, usant com a motlle la cadena complementària inalterada (Moolenaar *et al.*, 2000). UvrB és desplaçat per la DNA polimerasa I i gràcies a la presència de dNTPs i a l'acció de les ligases, el dany serà reparat.

S'ha descrit també que el producte del gen *ydjQ*, una proteïna anomenada Cho, presenta una funció anàloga a UvrC. La proteïna Cho, juntament amb UvrB, forma un complex actiu que sembla ser important en la reparació de determinades lesions, juntament amb la proteïna UvrC. A diferència de *UvrC*, aquest gen forma part del reguló *lexA* (Moolenaar *et al.*, 2002).

Aquest sistema aquí descrit, és el que es coneix com a *short patch repair* i actua eliminant fragments de longitud no superiors a 12 nucleòtids. Existeix, però, un altre sistema, el *long patch repair*, que actua quan l'altre no és capaç d'eliminar la lesió. Aquest últim pot eliminar fragments de fins a 1.500 nucleòtids.

b) Reparació per recombinació

Quan les lesions produïdes no poden ser resoltes per escissió, actua la reparació per recombinació (Cox, 2001). El tipus de lesions que desencadenen aquest procés són enllaços entre les dues cadenes del DNA, trencaments de cadena, discontinuïtats o danys en la cadena motlle. Els més habituals són els trencaments de doble cadena i els derivats del bloqueig de la replicació. En aquest últim cas, a causa de la presència de lesions, la DNA polimerasa fa un salt deixant un espai (discontinuitat) que pot ser de milers de nucleòtids (Figura 1.6). Quan la discontinuïtat es produeix en la cadena líder, hi ha un desacoblament de les dues polimerases (líder i retardada) que porta a la unió de RecA en aquesta cadena (Pages *et al.*, 2003; McInerney *et al.*, 2004).

El mecanisme de reparació per recombinació no està destinat a reparar les lesions per si sol, sinó que va encaminat a generar un substrat susceptible de ser reparat posteriorment per altres mecanismes. Així, la cèl·lula aconsegueix que un dany que afecta a les dues cadenes passi a estar representat tan sols en una i pugui ser, per tant, solucionat pels mitjans habituals de reparació (Kuzminov, 1999; Dronkert *et al.*, 2001; Dudas *et al.*, 2004).

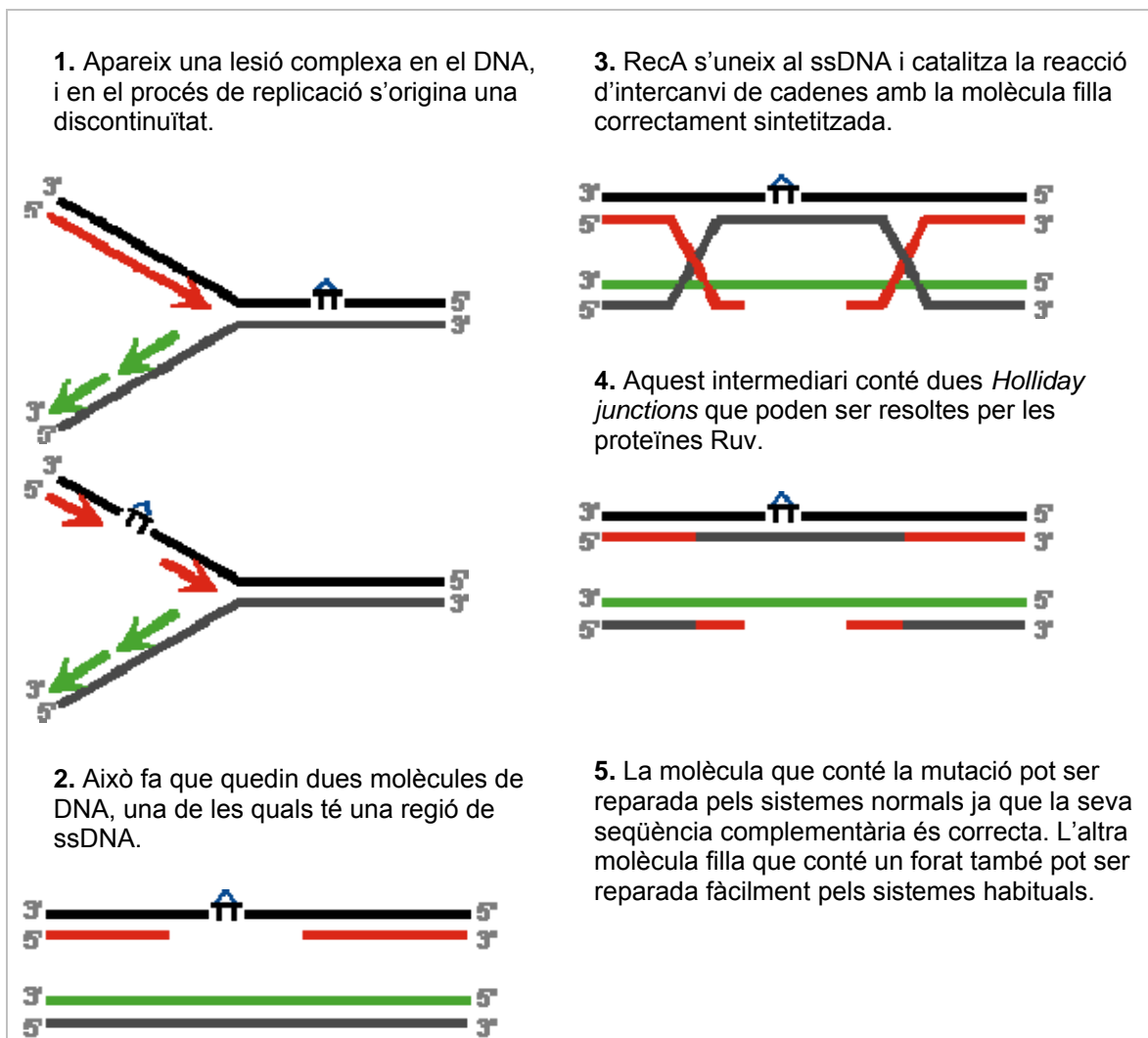


Figura 1.6. Esquema general del mecanisme de recombinació davant d'una discontinuïtat.

Hi ha dues grans vies de reparació per recombinació: la via *recBCD* i la via *recFOR*. La primera n'és la principal i està implicada en la reparació de la majoria dels trencaments de doble cadena, mitjançant la formació d'un holoenzim amb funció mixta exonucleasa-helicasa (Anderson *et al.*, 1998). Pel que fa la via *recFOR*, s'activa quan *recBCD* no és funcional (Ivancic-Bace *et al.*, 2003) i també està implicat en els casos de bloqueig de la replicació. Aquesta via està formada pels gens *recF*, *recJ*, *recO*, *recR*, *recQ* i *recN*, dels quals només *recN* es troba sota control de LexA a *E. coli* (Kuzminov, 1999). Pel funcionament de les dues vies són necessàries també les proteïnes RecA i Ssb (Roca *et al.*, 1990; Cox, 1999). En les fases de migració de cadena i

postsinàptica hi ha implicades altres proteïnes, com ara RecG (funció helicasa) i els productes dels gens *ruvABC*. D'aquests, només els gens *ruvA* i *ruvB* estan regulats per LexA (Kogoma, 1997; Kuzminov, 1999).

Existeixen altres vies menys importants que tan sols intervenen en casos especials, com la via RecE. Aquesta actua en relació a un fag críptic i mutacions en el gen *sbcaA*, generalment, juntament amb el producte del gen *recT* (Kolodner *et al.*, 1994; Kusano *et al.*, 1994; Silberstein *et al.*, 1995).

c) Mutagènesi SOS

La mutagènesi SOS s'anomena també síntesi de translesió (TLS) o reparació tendent a l'error. Es troba fortament regulada, i només s'activa quan el sistema SOS es troba molt induït. En la majoria de casos la via de reparació prioritària és la recombinació, però quan hi ha una elevada acumulació de lesions, s'activa la síntesi de translesió (Courcelle *et al.*, 2006). La seva funció és la de permetre la replicació tot i l'elevada presència de danys en el DNA. Mitjançant la TLS la cèl·lula canvia la polimerasa replicativa per una altra especialitzada a replicar a través de bases alterades, aquestes polimerases pertanyen principalment a la família Y (polimerasa IV i V). Tot i no tenir una gran processivitat poden estendre una curta seqüència allà on la polimerasa replicativa ha estat incapaç d'incorporar un nucleòtid (davant la base alterada). Si la seqüència incorporada durant la síntesi de translesió és suficientment llarga, la polimerasa replicativa podrà reprendre la síntesi sense que l'activitat de correcció detecti la base alterada. La taxa de mutació s'incrementa durant la síntesi translesió, però s'ha vist que aquestes polimerases son força fidels a l'hora d'introduir una base davant d'algunes bases alterades (Jarosz *et al.*, 2007). Això permet d'una banda, seguir amb el cicle cel·lular esperant a reparar les lesions en etapes posteriors, però també afavoreix l'aparició de mutacions en el genoma que podrien ser beneficioses per escapar de la pressió selectiva a la que està sotmesa la cèl·lula. És per tant, un mecanisme evolutiu molt important.

Els elements principals d'aquest sistema són els gens *umuD* i *umuC*, que a *E. coli* formen una única unitat transcripcional sota control del LexA. La proteïna UmuD presenta un domini C-terminal similar al del LexA, amb un punt

de trencament entre l'enllaç Cys₂₄-Gly₂₅ (Sutton *et al.*, 2000; Sutton *et al.*, 2001). L'activació del sistema SOS porta a la producció de UmuD i UmuC que, en un primer moment, formen el complex UmuD₂C que actua com a *checkpoint* inhibint la divisió cel·lular fins que els processos de reparació actuïn (Opperman *et al.*, 1999). Posteriorment, el complex nucleoproteic de RecA* catalitza l'autohidròlisi de l'UmuD, fent que aquest perdi 24 aminoàcids del seu extrem N-terminal formant l'UmuD' (Nohmi *et al.*, 1988). Seguidament es forma el complex (UmuD')₂C, anomenat polimerasa V (Tang *et al.*, 1999), que és l'encarregat de la síntesi de translesió o mutagènesi SOS juntament amb la proteïna RecA* (Frank *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1998; Gonzalez *et al.*, 2002). L'estructura cristal·logràfica d'ambdós complexos, UmuD₂C i (UmuD')₂C, ha estat també resolta (Ferentz *et al.*, 2001).

La proteïna Ssb també juga un paper important en facilitar la intervenció de la proteïna RecA*. De fet, sembla que ambdues proteïnes són essencials en la realització del *bypass* sobre la lesió (Reuven *et al.*, 2001).

Com ja s'ha dit, el control d'aquest sistema és molt estricte donada la perillositat que comporta per la cèl·lula. Així, la caixa SOS de l'operador dels gens *umuD* i *umuC*, és de les que presenten més afinitat per LexA (Lewis *et al.*, 1994); a més la proteïna RecA actua més eficientment sobre LexA que sobre UmuD; finalment, la formació d'homodímers UmuD'₂ es veu estequiomètricament desfavorida davant la formació d'heterodímers UmuD-UmuD' (Battista *et al.*, 1990b). Per últim, la proteïna DinI també regula el procés de translesió, ja que la proteïna RecA* presenta més afinitat d'unió per ella que per la proteïna UmuD, limitant així la possibilitat d'activació d'aquesta última en un cas de gran inducció del sistema SOS (Yasuda *et al.*, 2001).

Una altra polimerasa pertanyent a la família Y és la codificada pel gen *dinB*. Tot i que aquesta polimerasa no sembla ser responsable de la mutagènesi espontània (Kuban *et al.*, 2004), sí que té un paper important en la mutagènesi del fag λ (Brotcorne-Lannoye *et al.*, 1986). A més, també és important en el fenomen de la mutagènesi adaptativa (Hersh *et al.*, 2004), en la qual també hi participen gens com ara *rpoS*, *groES*, *groEL* i *ppk* (Layton *et al.*, 2003; Lombardo *et al.*, 2004; Layton *et al.*, 2005; Stumpf *et al.*, 2005). En la Figura 1.7 es mostra un esquema del procés en general.

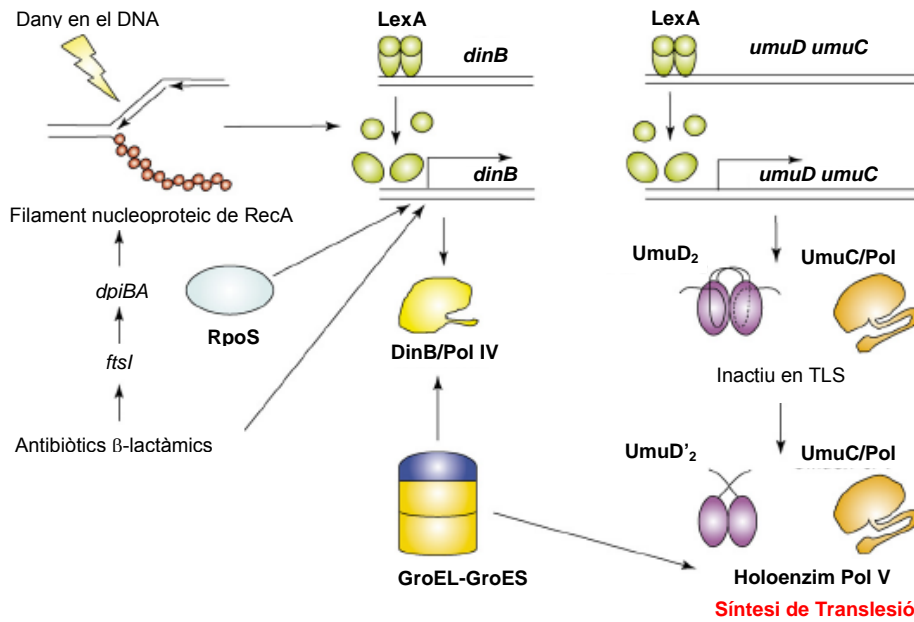


Figura 1.7. Procés d'activació de la síntesi de translesió (TLS). Modificat de Jarosz *et al.* (2007).

d) Altres funcions SOS

De les funcions no reparatives d'aquest sistema podem trobar la inhibició de la divisió cel·lular, per l'acció del producte del gen *sulA* (Huisman *et al.*, 1981). Aquest és un inhibidor de la septació actuant sobre la proteïna FtsZ i produeix un fenotip anomenat filamentació (Bi *et al.*, 1993). D'aquesta manera es retarda la divisió cel·lular fins que les lesions puguin ser reparades. SulA és una proteïna molt inestable i només es pot observar la filamentació en casos d'inducció molt elevada (Walker, 1996).

Un altre fenomen derivat de l'activació del sistema SOS és la inducció de profags (Sauer *et al.*, 1982), gràcies a l'homologia existent entre el repressor del cicle lític (proteïna cl) i el repressor LexA (Mustard *et al.*, 2000). Així, els nucleofilaments de RecA* catalitzen l'autohidròlisi de la proteïna cl.

Recentment s'ha vist que la utilització de certs antibiòtics que indueixen la resposta SOS, causa, a *E. coli*, un increment en la propagació de resistències a antibiòtics a través de la inducció d'elements mòbils (Beaber *et al.*, 2004; Giuliadori *et al.*, 2007). La utilització d'antibiòtics, que indueixen la resposta SOS, ha estat també estudiada en el cas d'infeccions causades per

Staphylococcus aureus. S'ha vist que l'activació del sistema SOS, afecta també l'expressió de factors de virulència que es troben codificats en elements mòbils (Ubeda *et al.*, 2005; Goerke *et al.*, 2006; Maiques *et al.*, 2006) o bé són gens cromosòmics (Bisognano *et al.*, 2004). Això és d'especial importància, perquè no només incrementa l'expressió d'aquests factors sinó que també n'incrementa la freqüència de transferència horitzontal, ja que es troben en illes de patogènia controlades per profags residents (Ubeda *et al.*, 2005). Recentment s'ha demostrat que la transcripció d'aquestes illes està regulada directament per la proteïna LexA (Ubeda *et al.*, 2007).

1.2. El sistema SOS en altres microorganismes

El sistema SOS es troba àmpliament distribuït dins el món bacterià, trobant-se homòlegs de LexA en la majoria de microorganismes coneguts (Eisen *et al.*, 1999). De totes maneres, i a diferència del que passa amb la proteïna RecA que es troba de manera ubiqua en tot el domini *Bacteria*, hi ha divisions que no presenten LexA. De la mateixa manera, no hi ha homogeneïtat del sistema SOS a nivell de funcionament existint una certa variabilitat en la seva regulació i sobretot en la composició del reguló. De fet, el d'*E. coli* sembla ser un dels regulons més extensos dels estudiats fins ara.

1.2.1. Sistema SOS als bacteris gramnegatius

a) Grup dels proteobacteris Alfa

Pertanyen a aquest grup les famílies *Caulobacterales*, *Rhizobiales* i *Rhodobacterales*. Són principalment, bacteris de vida lliure que habiten al sòl i posseeixen una gran varietat metabòlica. S'han dut a terme estudis sobre la regulació del sistema SOS en aquest grup, utilitzant les espècies *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodobacter capsulatus*, *Sinorhizobium meliloti* i *Paracoccus denitrificans* (Tapias *et al.*, 1997; Fernandez de Henestrosa *et al.*, 1998; del Rey *et al.*, 1999; Labazi *et al.*, 1999; Tapias *et al.*, 1999; Erill *et al.*, 2004). Aquests estudis van identificar una caixa SOS diferent de la de *E. coli*: 5'-GTTCN₇GTTC-3' o 5'-GAACN₇GAAC-3'. No només són diferents les bases de

la seqüència, sinó que presenta una repetició directa, enlloc d'un palíndrom. Una altra diferència important és que un mutant *lexA(Def)* de *R. sphaeroides* és completament viable sense necessitat que hi hagi una mutació compensatòria del gen *sulA* (Tapias *et al.*, 2000). A *E. coli*, un mutant *lexA(Def)* no és viable a causa de la inhibició de la divisió cel·lular produïda per *sulA* (Huisman *et al.*, 1981). Això fa que pugui ser fàcilment explicable l'evolució de la caixa SOS, ja que una desregulació temporal del sistema a causa de la introducció d'una mutació en la seqüència SOS, no donaria lloc a un fenotip letal a causa del *sulA*. A més en aquest microorganisme s'ha vist que la proteïna LexA pot actuar tant de repressor com d'activador del gen *recA*, en funció del nombre de caixes ocupades al promotor (Tapias *et al.*, 2000).

Anàlisis bioinformàtics combinats amb tècniques *in vitro*, van poder determinar amb més exactitud la seqüència consens de la caixa SOS (Figura 1.7) i també el nucli de gens canònics del reguló dels proteobacteris Alfa: *lexA*, *recA*, *uvrA*, *ssb*, *sulA* i *dinP* (Erill *et al.*, 2004).

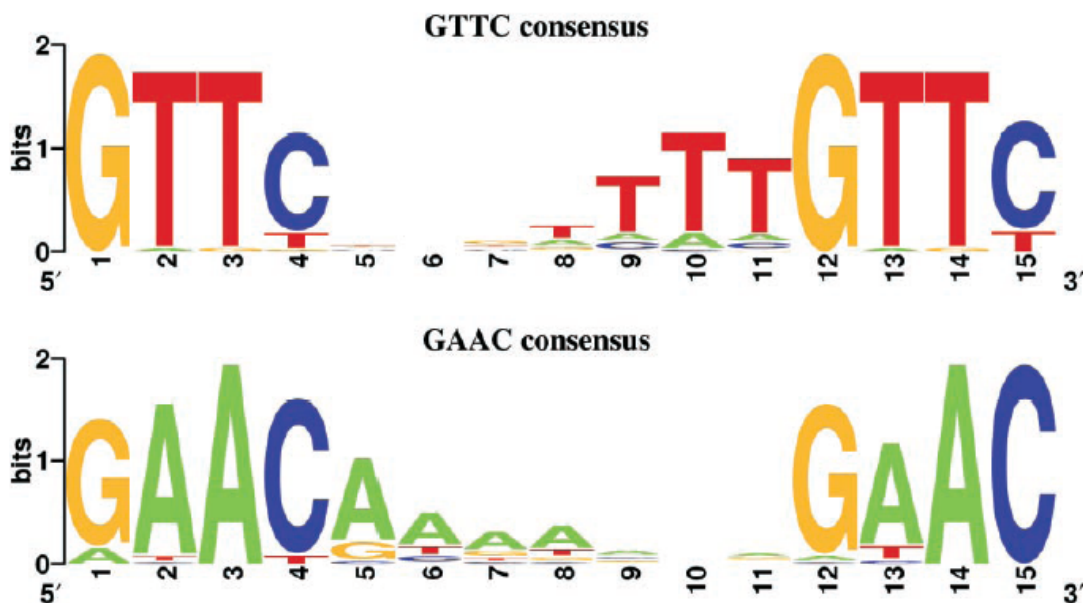


Figura 1.7. Caixa SOS consens del grup dels proteobacteris Alfa. Modificat de Erill *et al.* (2004).

b) Grup dels proteobacteris Beta

Els membres d'aquest grup, com per exemple *Ralstonia metallidurans*, comparteixen una caixa SOS com la dels proteobacteris Gamma, amb un sistema homòleg de regulació. Malgrat tot hi ha diverses famílies, com ara *Neisseriaceae* (Fyfe *et al.*, 1990; Black *et al.*, 1998) o el gènere *Chromobacterium* (Duarte *et al.*, 2004), caracteritzades per l'absència de *lexA*.

c) Grup dels proteobacteris Gamma

El principal representant d'aquest grup és *E. coli*. En aquest grup existeixen dues subclasses ben diferenciades: patògens de vertebrats, sovint entèrics, i bacteris que habiten al sòl. Existeix, però una estreta relació filogenètica entre els seus membres, de manera que la seqüència d'unió del LexA concorda amb la consens establerta per *E. coli*. No obstant això, hi ha una substancial heterogeneïtat a nivell de composició gènica del reguló com s'ha vist en estudis *in silico* utilitzant la caixa SOS per trobar gens regulats (Erill *et al.*, 2003). Això es podrà veure més endavant en aquest treball, en la qual s'ha estudiat el reguló de *Pseudomonas putida*, un dels representants d'aquest grup. Altres membres dels proteobacteris Gamma en els quals s'ha pogut veure que comparteixen la mateixa caixa SOS són: *Salmonella sp.*, *Erwinia sp.*, *Providentia rettgeri* i *Aeromonas sp.* (Calero *et al.*, 1991; Garriga *et al.*, 1992; Riera *et al.*, 1993; Riera *et al.*, 1995). Excepcionalment s'ha descrit un motiu d'unió diferent en el patògen vegetal *Xylella fastidiosa* (Campoy *et al.*, 2002). Aquest mateix motiu és reconegut pel LexA de *Xanthomonas axonopodis* (Yang *et al.*, 2002). A més, diverses espècies de *Xanthomonas* i *Pseudomonas* posseeixen dues còpies del gen *lexA* (Abella *et al.*, 2004).

d) Grup dels proteobacteris Delta

Els organismes pertanyents a aquest grup presenten una gran diversitat tant pel que fa als seus hàbitats com als seus cicles vitals. Això es veu també reflectit en el seu sistema SOS, presentant disparitat en la caixa SOS i en el funcionament del reguló en general.

El primer representant d'aquest grup que es va estudiar va ser *Myxococcus xanthus*. És un microorganisme força peculiar, presentant en el seu cicle vital, un estadi de cossos fructífers. La caixa SOS descrita per aquest bacteri és 5'-CTRHAMRYBYGTTTCAGS-3' (Campoy *et al.*, 2003). Aquesta seqüència presenta certa similitud amb la caixa SOS dels proteobacteris Gamma, però el LexA d'*E. coli* no és capaç d'unir-s'hi. A més *M. xanthus*, presenta dues còpies del gen *recA*, però només una d'elles (*recA2*) és induïble per danys en el DNA i és regulada per LexA. Estudis amb un mutant *lexA(Def)*, han permès veure que un mutant defectiu en *lexA* és viable, i que gens que normalment estan regulats per LexA com *ssb* i *recN*, semblen estar regulats per un altre factor tot i continuar essent induïbles per lesions al DNA (Campoy *et al.*, 2003).

Un altre membre d'aquest grup que ha estat estudiat és *Geobacter sulfurreducens*. Presenta la peculiaritat de tenir dues còpies del gen *lexA* en el seu genoma, cada una de les quals es troba formant unitat transcripcional amb un gen homòleg al *dinB* d'*E. coli* (Jara *et al.*, 2003). Les dues proteïnes LexA reconeixen la mateixa seqüència palindròmica 5'-GGTTN₂CN₄GN₃ACC-3', que podem trobar en el promotor d'ambdós gens *lexA*, així com en el del gen *lexA* de *Geobacter metallireducens*.

Finalment, l'últim membre d'aquest grup que ha estat estudiat és *Bdellovibrio bacteriovorus*, un bacteri en forma de vibri que s'alimenta d'altres microorganismes. En aquest cas la proteïna LexA reconeix la seqüència 5'-TTACN₃GTAA-3' (Campoy *et al.*, 2005), però no sembla controlar els gens SOS habituals. Sembla que a part d'autocontrolar-se només és capaç de regular el gen *recA* i un operó format pels gens *imuA-imuB-dnaE2* (Erill *et al.*, 2004).

1.2.2. Sistema SOS als bacteris grampositius

Dins del grup dels bacteris grampositius, on s'ha estudiat més el sistema SOS ha estat en *Bacillus subtilis* (Winterling *et al.*, 1997; Au *et al.*, 2005). Presenta un sistema SOS molt semblant al d'*E. coli*, en el qual el LexA (també anomenat DinR) s'autohidrolitza per induir el sistema (Wojciechowski *et al.*, 1991; Miller *et al.*, 1996), produint-se el trencament entre els residus Ala₉₁ i

Gly₉₂. Comparant els dominis estructurals i funcionals de la proteïna LexA amb la d'altres bacteris, es pot veure que la regió C-terminal és la més conservada. Aquesta és la responsable de la dimerització i autohidròlisi (residus Ser₁₁₉ i Lys₁₅₆). Pel que fa a la regió N-terminal és on hi ha més diferències a nivell de seqüència primària, especialment en la zona d'unió al DNA (Knegtel *et al.*, 1995), cosa que explica que reconegui una seqüència de DNA diferent a la de *E. coli*. Aquesta caixa SOS s'anomena *Cheo box* (Cheo *et al.*, 1991; Yasbin *et al.*, 1992) i la seva seqüència consens ha estat revisada diverses vegades (Miller *et al.*, 1996; Winterling *et al.*, 1998) fins que finalment, gràcies a estudis de *microarrays*, s'han pogut identificar totes les caixes i així obtenir la consens 5'-CGAACATATGTTTCG-3' (Au *et al.*, 2005). En aquests estudis s'han identificat 54 gens organitzats en 34 operons que presenten una caixa SOS funcional. Dels 54 gens però, només 33 mostren inducció posterior al tractament amb UV i mitomicina C (MMC). Aquests gens estan implicats en funcions com la reparació per escissió, recombinació, filamentació (per mitjà del producte del gen *yneA*), mutagènesi SOS, i altres (Taula 1.3). Curiosament també hi ha gens sense cap motiu d'unió hipotètic, però que la seva inducció és dependent de RecA; i de la mateixa manera, hi ha gens que posseeixen una caixa SOS i que no són dependents de RecA (Au *et al.*, 2005).

Un tret característic de *B. subtilis* és que el seu sistema SOS també s'indueix quan les cèl·lules presenten l'estat de competència natural (Love *et al.*, 1985). Aquesta inducció es fa a través de la proteïna CTF, codificada en el gen *comK*. És un procés, per tant, independent de RecA

Altres membres d'aquest grup en els que s'ha estudiat el sistema SOS més detalladament són *Mycobacterium tuberculosis* (Davis *et al.*, 2002) i *S. aureus* (Anderson *et al.*, 2006; Cirz *et al.*, 2007). També es coneix la caixa SOS d'altres grampositius (Durbach *et al.*, 1997; Movahedzadeh *et al.*, 1997; Winterling *et al.*, 1998).

M. tuberculosis presenta una caixa SOS lleugerament diferent a la caixa *Cheo*: 5'-TCGAACN₄GTTTCGA-3' (Davis *et al.*, 2002). Això fa que s'estableixi una subdivisió dins dels grampositius entre els que tenen alt contingut en GC i els de baix contingut en GC. Estudis posteriors en *M. tuberculosis*, demostraren que existeixen força gens que són induïbles per dany en el DNA, però que funcionen independentment del LexA (Rand *et al.*, 2003).

Taula 1.3 Gens SOS de *B. subtilis*

Gen ^a	Caixa SOS ^b	Factor d'inducció
ybaK	aGAACATtTGTTcC	2,3
<i>cwlD</i>		2,1
dinB	aGAACtcATGTTcCG	55
ydiO	aGAACATtcGTTcT	3,5
<i>ydiP</i>		3,6
pcrA	aGAACgTATGTTt	2,0
<i>ligA</i>		2,0
yhaZ	aGAACgTAcaTTCc	11
yhaO	aGAACgTgcaTTCG	3,9
<i>yhaN</i>		1,6
<i>yhaM</i>		2,0
yhjD	aGAACAaAcGTTcC	16
<i>yhjC</i>		2,9
<i>yhjB</i>		3,8
xkdA	aGAACAcAcGTTcCG	3,8
recA	CGAAtATgcGTTcCG	9,4
aprX	CGAACAaAcGTTcT	2,7
ymaC^c		4,0
ymaD^c		2,5
lexA	(1) gGAAtgTtTGTTcCG (2) CGAACAaAcGTTtc (3) CGAACcTATGTTtG	3,4
yneA	(1) CaAACATAgGTTcCG (2) gaAACgTtTGTTcCG (3) CGAACAaAcaTTCc	37
<i>yneB</i>		44
<i>ynzC</i>		8,1
parE	CaAACATAcGTTcT	2,9
<i>parC</i>		3,0
yqjW	(1) CGAACATAcTTcCG (2) CGAACATAaGTTcT	3,5
<i>yqjX</i>		5,7
<i>yqjY</i>		1,8
<i>yqjZ</i>		1,9
ruvA	CGAACATATGTTaa	2,2
<i>ruvB</i>		2,2
uvrC	aaAACAaAcGTTcCG	1,6
yvsG^c		2,3
uvrB	CGAACtTtaGTTcCG	11
<i>uvrA</i>		12
dinC	(1) aGAACAagTGTTcT (2) CGAACgTATGTTtG	175
licA^c		3,3

^aEls gens llistats són els induïts pel tractament amb MMC i dependents de RecA. El primer gen de l'operó es mostra en negreta, i en estil normal els següents.

^bLes bases en majúscula són les que coincideixen amb la seqüència consens.

^cAquests gens no tenen el lloc d'unió del LexA en el seu promotor.

Modificat de Au *et al.* (2005)

Recentment s'han publicat dos estudis sobre el sistema SOS de *S. aureus*, en els quals es detalla la resposta a diferents antibiòtics (Anderson *et*

al., 2006; Cirz *et al.*, 2007). En el primer es descriu la inducció de 73 gens després de tractar el cultiu amb MMC. Entre aquests gens podem trobar gens relacionats amb la resposta SOS: *lexA*, *uvrA*, *uvrB*, *ssb*, *sbcC*, *sbcD* i un gen homòleg a *umuC*. A més, cal destacar també la inducció d'elements fàgics i de factors de virulència. Aquest estudi és especialment interessant ja que correlacionen aquesta resposta amb la vida mitja del mRNA (Anderson *et al.*, 2006). Per la seva banda, Cirz *et al.* (2007) han analitzat la resposta SOS utilitzant un mutant *lexA* que no pot autohidrolitzar-se. Així, han trobat que hi ha 16 gens que són controlats directament per LexA (Taula 1.4), que té com a caixa SOS consens la seqüència: 5'-CGAACAAATGTTTCG-3'. Aquesta és essencialment la mateixa que trobem a *B. subtilis*.

Taula 1.4 Gens SOS de *S. aureus*

ORF	Gen	Caixa SOS	Factor d'inducció ^a
SACOL0436		CGAAC GCAT GTTCT	2,5
SACOL0823	<i>uvrB</i>	CGAAC AAAC GTTTG	2,7
SACOL0824	<i>uvrA</i>	Mateix operó amb <i>uvrB</i>	3,0
SACOL1304	<i>recA</i>	CGAAC AAAT ATTCG	5,8
SACOL1374	<i>lexA</i>	CGAAC AAAT GTTTG	5,4
SACOL1375		Divergent de <i>lexA</i>	7,9
SACOL1381	<i>sbcD</i>	CGAAC AAAT GTTCT	2,8
SACOL1382	<i>sbcC</i>	Mateix operó amb <i>sbcD</i>	2,1
SACOL1389	<i>parE</i>	CGAAC GTAC GTTTG	2,0
SACOL1390	<i>parC</i>	Mateix operó amb <i>parE</i>	2,3
SACOL1400		CGAAC ACGT GTTCT ^c	9,6
SACOL1986		CGAAC ATGT GTTCT ^c	16,7
SACOL1999		CGAAC ATAT GTTCT	5,9
SACOL2160		Mateix operó amb SACOL2162	3,0
SACOL2161		Mateix operó amb SACOL2162	2,3
SACOL2162		CGAAC ATAT TTTCG ^c	2,7
Consensus		CGAAC AAAT GTTTCG^b	

a Factor d'inducció de la soca salvatge respecte al mutant *lexA* als 120 minuts de tractament amb ciprofloxacina.

b Els residus en negreta estan conservats al 100%.

c La caixa SOS mostrada està en la orientació inversa.

Modificat de Cirz *et al.* (2007).

2. Materials i mètodes

2. Materials i mètodes

2.1. Soques, plasmidis i oligonucleòtids

Les soques bacterianes i plasmidis utilitzats, les seves característiques més importants i la seva procedència es resumeixen a la Taula 2.1 i Taula 2.2, respectivament. La llista d'oligonucleòtids utilitzats s'indica a la Taula 2.3.

Taula 2.1 Soques utilitzades.

Soques	Característiques	Procedència
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	<i>supE4</i> Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i> λ^-	Clontech
MC1061 λ pir	Δ <i>lacX74</i> <i>hsdR2</i> <i>mcrB</i> <i>araD139</i> Δ (<i>araABC-leu</i>)7679 <i>galU</i> <i>galk</i> <i>rpsL</i> <i>thi</i> Str ^r	Casadaban i Cohen, 1979
S17 λ pir	<i>recA</i> <i>RP4</i> <i>Tc::Mu</i> <i>Km::Tn7</i> λ pir	de Lorenzo <i>et al.</i> , 1990
AR23	BL21 λ (DE3) <i>lexA</i>	Fernandez de Henestrosa <i>et al.</i> , 2000
HB101	Híbrid K12/B, Sm ^r <i>recA</i> <i>thi</i> <i>pro</i> <i>leu</i> <i>hsdRM</i> ⁺	ATTC33694
<i>Pseudomonas putida</i>		
KT2442	<i>hsdR</i> Rif ^r	ATTC47054
UA11086	KT2442 <i>lexA1</i>	Aquest estudi
UA11085	KT2442 <i>lexA2</i>	Aquest estudi
UA11087	KT2442 <i>PP3901</i>	Aquest estudi
UA11088	KT2442 Δ <i>lexA1</i>	Aquest estudi
UA11089	KT2442 Δ <i>lexA1</i> <i>lexA2</i>	Aquest estudi

Taula 2.2 Plasmidis utilitzats.

Plasmidis	Característiques	Procedència
pGEM-T	Vector de clonació dels productes de PCR, Ap ^r	Promega
pET15b(+)	Vector de sobreexpressió de proteïnes recombinants, Ap ^r	Novagen
pHP45ΩKm	Font del casset de resistència a Km	Fellay <i>et al.</i> , 1997
pUA658	Vector suïcida derivat del pGP704 Mob+, Ap ^r , Gm ^r	Fernandez de Henestrosa <i>et al.</i> , 1997
pRK600	Cm ^r ColE1oriV RP4tra+ RP4oriT plasmidi <i>helper</i> en les conjugacions triparentals	Herrero <i>et al.</i> , 1990
pCK217	Ap ^r Km ^r , font del casset <i>res-npt-res</i>	Kristensen <i>et al.</i> , 1995
pJMSB8	Ap ^r R6KoriV RP4oriT, que conté el casset <i>lacI^q</i> P _{A1/04/03} :: <i>parA</i>	Kristensen <i>et al.</i> , 1995
pUA1069	pGEMT amb un fragment de 609 pb obtingut per PCR amb els oligonucleòtids NdelexA1 i BamlexA1, corresponent a l'ORF del gen <i>lexA1</i>	Aquest estudi
pUA1070	pGEMT amb un fragment de 609 pb obtingut per PCR amb els oligonucleòtids NdelexA2 i BamlexA2, corresponent a l'ORF del gen <i>lexA2</i>	Aquest estudi
pUA1096	pGEMT amb un fragment de 222 pb obtingut per PCR amb els oligonucleòtids plexA1up i plexA1dw, corresponent al promotor del gen <i>lexA1</i>	Aquest estudi
pUA1097	pGEMT amb un fragment de 239 pb obtingut per PCR amb els oligonucleòtids plexA2up i plexA2dw, corresponent al promotor del gen <i>lexA2</i>	Aquest estudi
pUA1071	pET15b amb un fragment <i>NdeI</i> , <i>BamHI</i> de 609 pb que conté la regió codificant del <i>lexA1</i>	Aquest estudi
pUA1072	pET15b amb un fragment <i>NdeI</i> , <i>BamHI</i> de 609 pb que conté la regió codificant del <i>lexA2</i>	Aquest estudi
pUA1052	pET15b amb un fragment de 665 pb que conté el gen <i>lexA</i> d' <i>Anabaena</i> sp.	Mazon <i>et al.</i> , 2004
pUA1050	pGEMT amb un fragment de 839pb que conté el promotor i el gen <i>lexA</i> d' <i>Anabaena</i> sp.	Mazon <i>et al.</i> , 2004
pUA1073	pUA658 amb un fragment de 2,8 kb que conté el gen <i>lexA2</i> amb la inserció del casset Km en la posició +301	Aquest estudi

pUA1098	pUA658 amb un fragment de 2,8 kb que conté el gen <i>lexA1</i> amb la inserció del casset Km en la posició +299	Aquest estudi
pUA1099	pGEMT amb un fragment de 2,6 kb obtingut per PCR amb els oligonucleòtids -1000lexA1 i +1609lexA1 que conté l'ORF del <i>lexA1</i> i 1 kb de les regions <i>upstream</i> i <i>downstream</i> del gen	Aquest estudi
pUA1100	Vector obtingut per PCR amb els oligonucleòtids +100lexA1 i +487lexA1 sobre el pGEMTlexA1G, i lligat al casset <i>res-npt-res</i>	Aquest estudi
pUA1101	pUA658 amb un fragment <i>NotI ApaI</i> de 4,4 kb obtingut del pGEMTΔlexA1Ωnpt	Aquest estudi
pUA1102	pGEMT amb un fragment de 182 pb obtingut per PCR amb els oligonucleòtids -118PP3901 i +64PP3901, corresponent al promotor del gen <i>PP3901</i>	Aquest estudi
pUA1103	pGEMT amb un fragment de 2,2 kb obtingut per PCR amb els oligonucleòtids 1241PP3901 i -96PP3901 que conté l'ORF <i>PP3901</i> i 1 kb de les regions <i>upstream</i> i <i>downstream</i> del gen <i>PP3901</i>	Aquest estudi
pUA1104	pUA658 amb un fragment de 4,4 kb que conté el gen PP3901 amb la inserció del casset Km	Aquest estudi

Taula 2.3. Oligonucleòtids utilitzats en el present treball.

Oligonucleòtid	Seqüència (5'-3')	Posició ^a	Aplicació
Direct-Dig	dig-GTAAAACGACGGCCAGT	+2964 ^b	Oligonucleòtid universal del vector pGEM-T marcat amb digoxigenina a l'extrem 5', utilitzat per a l'obtenció dels fragments per als assaigs EMSA.
Reverse-Dig	dig-GGAAACAGCTATGACCATG	+175 ^b	Oligonucleòtid universal del vector pGEM-T marcat amb digoxigenina a l'extrem 5', utilitzat per a l'obtenció dels fragments per als assaigs EMSA.
Direct-Cy5	Cy5-CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT	+2957 ^b	Oligonucleòtid universal del vector pGEM-T marcat amb Cy5 a l'extrem 5', utilitzat per seqüenciació.
Reverse-Cy5	Cy5-CAGGAAACAGCTATGAC	+177 ^b	Oligonucleòtid revers del vector pGEM-T marcat amb Cy5 a l'extrem 5', utilitzat per seqüenciació.
T7 prom-Cy5	Cy5-TAATACGACTCACTATAGGG	+2987 ^b	Oligonucleòtid T7 promotor amb Cy5 a l'extrem 5', utilitzat per seqüenciació.
NdelexA1	CATATGTTGAAACTGACGCCACG	+1	Oligonucleòtid que conté la diana <i>NdeI</i> , per clonar el gen <i>lexA1</i> al vector pET15b
BamlexA1	GGATCCTGACGCCTCCTGGATCAG	+623	Oligonucleòtid que conté la diana <i>BamHI</i> per clonar el gen <i>lexA1</i> al vector pET15b
NdelexA2	CATATGGACACTCTTACCCCCAA	+1	Oligonucleòtid que conté la diana <i>NdeI</i> , per clonar el gen <i>lexA2</i> al vector pET15b
BamlexA2	GGATCCTCAGTCGCGCCTCAGCAAGC	+609	Oligonucleòtid que conté la diana <i>BamHI</i> per clonar el gen <i>lexA2</i> al vector pET15b
plexA1up	AGGCTCGGTGACTGGGCG	-149	Oligonucleòtid per clonar el promotor del gen <i>lexA1</i> al vector pGEM-T
plexA1dw(-dig)	GGAAGCCGTTGTCTTCCAGG	+73	Oligonucleòtid per clonar el promotor del gen <i>lexA1</i> al vector pGEM-T
plexA2up	CTGCAGGTGCAGGGTGTC	-167	Oligonucleòtid per clonar el promotor del gen <i>lexA2</i> al vector pGEM-T

Oligonucleòtid	Seqüència (5'-3')	Posició ^a	Aplicació
plexA2dw(-dig)	CTGACCATGCTCGGCAATGC	+72	Oligonucleòtid per clonar el promotor del gen <i>lexA2</i> al vector pGEM-T
Mut1LexA1	CAGTACTGTATATAATTAACATCATCTAACAAAAAGAC	-52	Oligonucleòtid per obtenir el fragment mutant M1 del promotor del <i>lexA1</i>
Mut2LexA1	CAGTACTGTATAGGGTAATTCCAGTCACTGTACAAAA GGGAGAC	-52	Oligonucleòtid per obtenir el fragment mutant M2 del promotor del <i>lexA1</i>
-140lexA2	AGGGTACCGTCAAGGTCG	-140	Oligonucleòtid per obtenir el fragment <i>lexA2.1</i>
-70lexA2	GATCATAACCAAAGCTGAC	-70	Oligonucleòtid per obtenir el fragment <i>lexA2.2</i>
-26lexA2	CTCCGAAAAGAGTACAAATGTGCTCC	-26	Oligonucleòtid per obtenir el fragment <i>lexA2.3</i>
-14lexA2	TACAAATGTGCTCCATGG	-14	Oligonucleòtid per obtenir el fragment <i>lexA2.4</i>
mut1lexA2	CTCCGAAAAGATGGTAAATGTGCTCC	-26	Oligonucleòtid per obtenir el fragment mutant mut1 del promotor del <i>lexA2</i>
mut2lexA2	CTCCGAAAAGAGTACAAATACAATCCATGGACTC	-26	Oligonucleòtid per obtenir el fragment mutant mut2 del promotor del <i>lexA2</i>
mut3lexA2	CTCCGAAAAGAGTACAAGGGATGTGCTCCATGGAC	-26	Oligonucleòtid per obtenir el fragment mutant mut3 del promotor del <i>lexA2</i>
Mut-19T	CTCCGAATAGAGTACAAATGTGCTCC	-26	Oligonucleòtid per obtenir mutants puntuals del promotor del <i>lexA2</i>
Mut-17T	CTCCGAAAATAGTACAAATGTGCTCC	-26	Oligonucleòtid per obtenir mutants puntuals del promotor del <i>lexA2</i>
Mut-16C	CTCCGAAAAGCGTACAAATGTGCTCCATG	-26	Oligonucleòtid per obtenir mutants puntuals del promotor del <i>lexA2</i>

Oligonucleòtid	Seqüència (5'-3')	Posició ^a	Aplicació
Mut-15C	CTCCGAAAAGACTACAAATGTGCTCCATG	-26	Oligonucleòtid per obtenir mutants puntuals del promotor del <i>lexA2</i>
Mut-14G	CTCCGAAAAGAGGACAAATGTGCTCCATG	-26	Oligonucleòtid per obtenir mutants puntuals del promotor del <i>lexA2</i>
Mut-13C	CTCCGAAAAGAGTCCAAATGTGCTCCATG	-26	Oligonucleòtid per obtenir mutants puntuals del promotor del <i>lexA2</i>
Mut-12A	CTCCGAAAAGAGTAAAAATGTGCTCCATG	-26	Oligonucleòtid per obtenir mutants puntuals del promotor del <i>lexA2</i>
Mut-11T	CTCCGAAAAGAGTACTAATGTGCTCCATG	-26	Oligonucleòtid per obtenir mutants puntuals del promotor del <i>lexA2</i>
Mut-10T	CTCCGAAAAGAGTACATATGTGCTCCATG	-26	Oligonucleòtid per obtenir mutants puntuals del promotor del <i>lexA2</i>
Mut13G	TTTTGTAGTACTAATGTGCTAGGGACATT	-56	Oligonucleòtid per obtenir mutants puntuals del promotor del <i>lexA</i> d' <i>Anabaena</i> sp.
LexA2up	CGCCGATCGATGTGCAGC	+553	Oligonucleòtid utilitzat en una RT-PCR per comprovar la unitat transcripcional <i>lexA2-imuA</i>
ImuAdw	TGTTTCGGCAGCCCACAGG	+362	Oligonucleòtid utilitzat en una RT-PCR per comprovar la unitat transcripcional <i>lexA2-imuA</i>
ImuAup	GTGGGCTGCCGAACAGTG	+365	Oligonucleòtid utilitzat en una RT-PCR per comprovar la unitat transcripcional <i>imuA-imuB</i>
ImuBdw	CGTGATGGGCATGCCAAG	+504	Oligonucleòtid utilitzat en una RT-PCR per comprovar la unitat transcripcional <i>imuA-imuB</i>
ImuBup	AAGGCAACATGCCGGTTG	+1178	Oligonucleòtid utilitzat en una RT-PCR per comprovar la unitat transcripcional <i>imuB-dnaE2</i>
DnaE2dw	GCTCAGCGAACACACTGC	+457	Oligonucleòtid utilitzat en una RT-PCR per comprovar la unitat transcripcional <i>imuB-dnaE2</i>

Oligonucleòtid	Seqüència (5'-3')	Posició ^a	Aplicació
lexA1upRT	GCCTACCCGCGCCGAGATTG	+75	Oligonucleòtid per obtenir la regió interna del gen <i>lexA1</i> en assaigs de RT-PCR quantitativa
lexA1dwRT	GGTGAAGAAGGCAGGGTTGATGT	+331	Oligonucleòtid per obtenir la regió interna del gen <i>lexA1</i> en assaigs de RT-PCR quantitativa
lexA2upRT	GCCTCAGCAAGCCGCAGAAC	+325	Oligonucleòtid per obtenir la regió interna del gen <i>lexA2</i> en assaigs de RT-PCR quantitativa
lexA2dwRT	TTCCGCCGTACCCCGACTA	+601	Oligonucleòtid per obtenir la regió interna del gen <i>lexA2</i> en assaigs de RT-PCR quantitativa
trpAupRT	TGCCGAGCCCACCACCACAC	+705	Oligonucleòtid per obtenir la regió interna del gen <i>trpA</i> en assaigs de RT-PCR quantitativa I
trpAdwRT	CCGCAGGCATCGACTTCATCC	+434	Oligonucleòtid per obtenir la regió interna del gen <i>trpA</i> en assaigs de RT-PCR quantitativa
LexA2Int up	GTATGCCCCGCGCCTGGTTT	+28	Oligonucleòtid per obtenir la regió interna del gen <i>lexA2</i> en assaigs de RT-PCR quantitativa
LexA2Int dw	GCCATTTTCGAATTCATCCGTGAG	+199	Oligonucleòtid per obtenir la regió interna del gen <i>lexA2</i> en assaigs de RT-PCR quantitativa
recAupRT	AGGCATTCCGGCCATCTCCAC	+120	Oligonucleòtid per obtenir la regió interna del gen <i>recA</i> en assaigs de RT-PCR quantitativa
recAdwRT	TGCCGGCGTACTCAGGGTCAA	+293	Oligonucleòtid per obtenir la regió interna del gen <i>recA</i> en assaigs de RT-PCR quantitativa
SmalexA1d	TCCCCGGGTCTGCAACATCAACCCT	+299	Oligonucleòtids per fer una PCR inversa sobre el pGEMTLexA1 per obtenir diana <i>SmaI</i> en la posició +299
SmalexA1r	TCCCCGGGTTGCTCGATGTGCTGTTC	+299	Oligonucleòtids per fer una PCR inversa sobre el pGEMTLexA1 per obtenir diana <i>SmaI</i> en la posició +299

Oligonucleòtid	Seqüència (5'-3')	Posició ^a	Aplicació
SmalexA2r	TCCCCCGGGCTCGTGGATGCCAGGTC	+301	Oligonucleòtids per fer una PCR inversa sobre el pGEMTLexA2 per obtenir diana <i>SmaI</i> en la posició +301
SmalexA2d	TCCCCCGGGCAGTTGCTGCTCGACCCC	+301	Oligonucleòtids per fer una PCR inversa sobre el pGEMTLexA2 per obtenir diana <i>SmaI</i> en la posició +301
-118PP3901	GCGATGCTATGACAGGTC	-118	Oligonucleòtids per clonar el promotor del PP3901 al vector pGEM-T
+64PP3901	CAAGGAGGTCGAAGGATG	+64	Oligonucleòtids per clonar el promotor del PP3901 al vector pGEM-T
PP3901upRT	GCTCCCGTCGCCACATCCTT	+34	Oligonucleòtid per obtenir la regió interna del gen PP3901 en assaigs de RT-PCR quantitativa
PP3901dwRT	ACACGAACGCCGCCATCATCTT	+233	Oligonucleòtid per obtenir la regió interna del gen PP3901 en assaigs de RT-PCR quantitativa
1241PP3901	GGAACAAAAGAACTTGC	+1241	Oligonucleòtid per obtenir l'ORF PP3901 i 1 kb de les regions <i>upstream</i> i <i>downstream</i> del gen
-996PP3901	CTTTCCTCGATGTATATG	-996	Oligonucleòtid per obtenir l'ORF PP3901 i 1 kb de les regions <i>upstream</i> i <i>downstream</i> del gen
PP3873upRT	TCAAGGTCTCGCGGGCTGGATT	+212	Oligonucleòtid per obtenir la regió interna del gen PP3873 en assaigs de RT-PCR quantitativa
PP3873dwRT	CGGCGGCGAAGGCTGCTCT	+505	Oligonucleòtid per obtenir la regió interna del gen PP3873 en assaigs de RT-PCR quantitativa
PP3894upRT	ACCCCTGCCACTGTGTTGAAAA	+376	Oligonucleòtid per obtenir la regió interna del gen PP3894 en assaigs de RT-PCR quantitativa

Oligonucleòtid	Seqüència (5'-3')	Posició ^a	Aplicació
PP3894dwRT	CGGGCATAACGGGGTCTTGTC	+560	Oligonucleòtid per obtenir la regió interna del gen PP3894 en assaigs de RT-PCR quantitativa
+100lexA1	CCTGAGCAATCTCGGCGC	+100	Oligonucleòtids per fer una PCR inversa (amb la polimerasa <i>Pwo</i>) sobre el pGEMTlexA1G per obtenir una deleció de 400 pb d'aquest gen
+487lexA1	AAGCGCGAAGGCAGCAAAG	+487	Oligonucleòtids per fer una PCR inversa (amb la polimerasa <i>Pwo</i>) sobre el pGEMTlexA1G per obtenir una deleció de 400 pb d'aquest gen
-1000lexA1	TCCCCCGGGCAAGGGAGATGCGAAGTAGATC	-1000	Oligonucleòtid amb la diana <i>SmaI</i> , per obtenir l'ORF del <i>lexA1</i> i 1 kb de les regions <i>upstream</i> i <i>downstream</i> del gen
+1609lexA1	TCCCCCGGGCGGTCGCCAGAAAAGCGCCGAAAAC	+1609	Oligonucleòtid amb la diana <i>SmaI</i> , per obtenir l'ORF del <i>lexA1</i> i 1 kb de les regions <i>upstream</i> i <i>downstream</i> del gen

- a. La posició correspon a l'extrem 5' de l'oligonucleòtid respecte del punt d'inici de traducció del gen esmentat, si no s'indica cap característica addicional.
- b. La posició correspon a l'extrem 5' de l'oligonucleòtid respecte del punt d'inici de la seqüència del plasmidi.

2.2. Medis i solucions de cultiu

Els medis i solucions utilitzats en aquest treball han estat els següents:

Medi LB líquid (Luria Bertani) (Miller, 1992). Pel creixement d'*E.coli* (37°C) i *P. putida* (30°).

- A 950 ml d'aigua destil·lada s'hi afegeixen:
 - 10 g de bacto-triptona (DIFCO)
 - 5 g d'extracte de llevat (DIFCO)
 - 10 g de clorur sòdic (NaCl) (Panreac)
- Es barregen els components fins a una total dissolució i s'ajusta el pH a 7 amb NaOH 5 N.
- S'arrasa a un volum final de 1 L amb aigua destil·lada.
- S'esterilitza a l'autoclau (121°C 15 min).

Medi Agar LB. Pel creixement d'*E.coli* (37°C) i *P. putida* (30°).

- S'afegeixen a 950 ml d'aigua destil·lada:
 - 10 g de bacto-triptona (DIFCO)
 - 5 g d'extracte de llevat (DIFCO)
 - 10 g de clorur de sodi (NaCl) (Panreac)
 - 17 g d'agar (DIFCO)
- Es barregen els components fins a una total dissolució i s'ajusta el pH a 7 amb NaOH 5 N.
- S'arrasa a un volum final d'1 L amb aigua destil·lada.
- S'esterilitza a l'autoclau (121°C 15 min).
- Es deixa refredar, se li afegeix antibiòtic si s'escau, i es reparteix en plaques de Petri (Sterilin) (20ml/placa).

5-Brom-4-clor-3-indolil- β -D-galactopiranòsid (X-gal) (Apollo)

La solució X-gal s'ha utilitzat per complementar plaques de LB agar, a una concentració de 40 mg/l, dissolt en *N,N* dimetil formamida.

Medi TB (Terrific Broth) (Tartof i Hobbs, 1987). Per fer el creixement de les soques de les quals es vol obtenir el DNA plasmídic (Miniprep o Maxiprep).

- S'afegeixen a 900 ml d'aigua destil·lada:
 - 12 g de bacto-triptona (DIFCO)
 - 24 g d'extracte de llevat (DIFCO)
 - 4 ml de glicerol (Scharlau)
- Es barregen els components fins a una total dissolució.
- S'esterilitza a l'autoclau (121°C 15 min).
- Es deixa refredar fins a 50-60 °C.
- S'hi afegeixen 100 ml de solució salina estèril KH_2PO_4 0.17 M i K_2HPO_4 0.72 M.

Solució salina pel medi TB

- A 100 ml d'aigua destil·lada se li afegeixen:
 - 2,312 g de (KH_2PO_4) (Panreac)
 - 16,432 g de ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (Merck)
- Es barregen els components fins a una total dissolució.
- S'esterilitza a l'autoclau (121°C 15 min).
- Es deixa refredar fins a 50-60 °C.
- S'afegeix al medi líquid TB preparat anteriorment.

BHI (*Brain heart infusion*) (OXOID). Per a l'expressió fenotípica dels cultius electrotransformats.

- S'afegeix a 1 L d'aigua destil·lada 37 g de BHI (OXOID)
- Es barreja fins a una total dissolució.
- S'esterilitza a l'autoclau (121°C 15 min).

NaCl (solució salina 0,9%) o "solució Ringer". Per fer bancs de dilucions.

- A 1L d'aigua destil·lada se li afegeixen 9 g de NaCl (Panreac)
- Es barreja fins a una total dissolució.
- Es reparteix en ampolles de 100 ml.
- S'esterilitza a l'autoclau (121°C 15 min).

2.3. Mètodes microbiològics

2.3.1. Preparació de cultius

- i. A partir de colònies aïllades, s'inoculen 10 ml de medi ric Luria-Bertani (LB) (Miller, 1992), amb els antibiòtics adequats per a cada microorganisme (Taula 2.4.), i s'incuba a 37°C (*E. coli*) o a 30°C (*P. putida*) en agitació de 110 rpm.
- ii. Per obtenir cultius en la fase exponencial s'ha fet una ressebra 1:100 del cultiu en medi fresc i s'incubà en les mateixes condicions fins a arribar a la concentració esperada.
- iii. El creixement es controlà mitjançant un espectrofotòmetre que mesura la densitat òptica del cultiu a una longitud d'ona de 550 nm (DO₅₅₀).

Taula 2.4. Concentracions dels antibiòtics utilitzats en aquest treball.

Antibiòtic	Conc. estoc	Concentració final (µg/ml)	
	(mg/ml)	<i>E. coli</i>	<i>P. putida</i>
Ampicil·lina (Ap) (Roche Diagnostics SL)	50	50	-
Kanamicina (Km) (Sigma)	50	50	100
Gentamicina (Gm) (Sigma)	40	40	40
Cloramfenicol (Cm) (Sigma)	34	34	-
Rifampicina (Rif) (Roig Farma)	15	75	100

2.3.2. Conservació de les soques

La conservació de les soques d'*E. coli* i de *P. putida*, s'ha fet en plaques de LB complementades adequadament, que es mantenen a 4°C i es ressembren cada mes, o congelades a -20 °C, en forma de vials de cultius glicerins amb glicerol (Scharlau) al 50% com a agent crioprotector.

Per a l'emmagatzemament perllongat s'utilitzà el sistema de crioconservació de bacteris amb perles poroses (Protect), i es mantingueren a -70 °C.

2.3.3. Corba de creixement

- i. A partir d'un cultiu de nit es fa una ressebra 1/100 en medi líquid.
- ii. Es mesura la DO_{550} del cultiu a diferents temps, per exemple cada 30 min.
- iii. Es representa en un gràfic el logaritme les lectures de DO_{550} en funció del temps.

2.3.4. Taxa de mutagènesi i càlcul del nombre de viables

- i. A partir d'un cultiu de nit es fa una ressebra 1/100 en 10 ml de medi líquid.
- ii. Quan el cultiu arriba a una DO_{550} al voltant d'1, se centrifuga 10 min a 8.000 rpm.
- iii. Es ressuspèn el pellet en 5 ml de solució salina NaCl al 0,9%.
- iv. Es pren una mostra del cultiu sense irradiar i la resta s'irradia a les dosis desitjades, per exemple 20, 40 i 60 Joules, prenent mostres de cada dosi.
- v. Se sembren, per triplicat, 100 μ l de les mostres preses per cada dosi en plaques de medi agar LB amb antibiòtic. Les colònies aparegudes seran mutants.
- vi. Paral·lelament, per determinar la concentració de cèl·lules viables de la suspensió, es fan dilucions seriades de les mostres preses per cada dosi, utilitzant NaCl al 0,9%. Se sembra 100 μ l de la dilució desitjada en plaques de medi agar LB.
- vii. Els resultats s'expressen en cfu/ml, on les cfu són les unitats formadores de colònies.
- viii. La taxa de mutagènesi, per a cada dosi d'irradiació, es calcula dividint les cfu/ml de les colònies mutants respecte les viables.

2.3.5. Assaig de *fitness*

- i. A partir d'un cultiu de nit de cada soca a comparar es fa una ressebra 1/100 en medi líquid i es barregen els cultius.
- ii. Es deixen créixer durant 15 dies, prenent mostres cada 24 hores.
- iii. De cada mostra, es fan dilucions seriades utilitzant NaCl al 0,9%.
- iv. Se sembren 100 µl de la dilució desitjada, en plaques de medi agar LB amb l'antibiòtic adequat.
- v. Es calculen les cfu/ml per cada soca.
- vi. Es representa en un gràfic el logaritme de les cfu/ml en funció del temps.

2.3.6. Transformació amb clorur càlcic (CaCl₂)

El mètode que s'utilitza és el descrit per Hanahan (1983), amb unes lleugeres modificacions. Aquest mètode es basa en l'exposició del cultiu bacterià en fase exponencial a una solució hipotònica de CaCl₂ 100 mM a una temperatura de 0°C, això provoca la formació de cèl·lules competents, capaces de captar DNA exogen. Aquest mètode s'ha utilitzat per transformar les soques d'*E. coli* AR23 i S17λ*pir*.

a. Preparació de cèl·lules competents

- i. Cal fer una ressebra 1:50, a partir d'un cultiu de nit de la soca d'*E. coli* desitjada, en 100 ml de medi LB.
- ii. S'incuba a 37°C en agitació (110 rpm) fins a arribar a una DO₅₅₀ de 0,4, corresponent a la meitat de la fase exponencial del cicle de creixement cel·lular.
- iii. Se centrifuga el cultiu en un tub de propilè estèril, a 5.000 rpm durant 10 min a una temperatura de 4 °C.
- iv. S'elimina el sobrenedant en condicions d'esterilitat i es ressuspèn el pellet en 100 ml de CaCl₂ (100 mM) fred.
- v. Es manté el tub en gel durant 1 hora.

- vi. Se centrifuga el tub a 5.000 rpm durant 10 min a 4 °C.
- vii. Es ressuspèn el sediment suaument en 5 ml de CaCl₂ (100 mM) fred.
- viii. Es manté el tub en gel durant 1 hora.
- ix. S'hi afegeixen 0,6 ml de glicerol estèril al 100%.
- x. Cal fer alíquotes de 200 µl i congelar-les a -80°C.

b. Transformació per xoc tèrmic

- i. Es barreja en un tub de vidre 200 µl de cèl·lules competents amb 10-100 ng de DNA plasmídic i es manté en gel durant 30 min, permetent l'adhesió del DNA a la superfície de les cèl·lules competents.
- ii. Per introduir el DNA a les cèl·lules, s'incuba el tub a 42°C durant 90 seg.
- iii. Es manté el tub en gel durant 5 min.
- iv. S'hi afegeixen 0,8 ml d'LB al tub i s'incuba en agitació a 37°C durant 45-60 min, per permetre l'expressió fenotípica.
- v. Se sembra el cultiu del tub en les plaques selectives adequades, i s'incuba a 37°C durant 12-18 hores.

2.3.7. Electrotransformació

El mètode que s'utilitza és el descrit per Dower *et al.* (1988) amb unes lleugeres modificacions. S'ha utilitzat el *Gene Pulser II* i el *Pulse Controller Electroporation System* de BIORAD i els protocols recomanats pel fabricant. És més eficaç que la transformació amb clorur càlcic, però és necessari que les cèl·lules i el DNA que es transforma presentin un baix contingut en sals. El mètode es basa en l'aplicació d'un pols elèctric d'alt voltatge que despolaritza la membrana cel·lular, amb la qual cosa es formen canals transitoris, a través dels quals pot entrar el DNA a l'interior cel·lular (Shigekawa i Dower, 1988).

Els cultius es preparen en medi LB amb una concentració del 0,5% de NaCl. Aquest procés s'ha utilitzat per transformar les soques d'*E.coli* DH5α i MC1061λpir.

a. Preparació de les cèl·lules competents

- i. Es fa un cultiu de nit en 10 ml d'LB preparat amb NaCl al 0.5%.
- ii. Cal fer una ressebra 1:100 en 1 L d'LB (0.5% de NaCl).
- iii. S'incuba a 37°C, a 110 rpm d'agitació, fins a arribar a una DO₅₅₀ de 0,4 (DH5α) o de 0,6 (MC1061λpir).
- iv. Es manté el cultiu en gel durant 15 min. A partir d'aquest pas, tot el material i les solucions que s'utilitzen estan temperades a 4 °C.
- v. Se centrifuga el cultiu, en tubs de propilè de 250 ml estèrils, a 6.000 rpm durant 10 min a 4°C.
- vi. Se n'elimina el sobrenedant en condicions d'esterilitat i es ressuspenden el sediment en un 1 L d'aigua milli Q estèril.
- vii. Es torna a centrifugar en les mateixes condicions i es repeteix el rentat amb aigua milli Q.
- viii. Es ressuspenden les cèl·lules en 20 ml de glicerol 10% fred i estèril.
- ix. Se centrifuga en un tub de polipropilè de 30 ml estèril, a 6.000 rpm durant 15 min a 4°C.
- x. Se n'elimina el sobrenedant en condicions d'esterilitat i es ressuspenden el sediment en 1 ml de glicerol al 10% fred.
- xi. Es fan al·lquotes de 50 µl del cultiu de competents en tubs eppendorf, i es congelen en neu carbònica.
- xii. Cal conservar les al·lquotes a -80°C.

b. Electrotansformació

- i. Es descongelen en gel les cèl·lules competents.
- ii. S'hi afegeix el DNA.
- iii. S'ajusten les condicions del *Gene Pulser II* i del *Pulse Controller Electroporation System* a 125 µFD de capacitància i a 200 Ω de resistència en paral·lel.
- iv. Es transfereix la barreja de cèl·lules i DNA a una cubeta d'electrotansformació de 2 mm de pas, refredada prèviament i estèril.
- v. Es col·loca en la càmera del *Gene Pulser*.

- vi. S'aplica un pols elèctric de $2,0 \text{ kV/cm}^2$ de potencial elèctric.
- vii. Es treu ràpidament la cubeta i s'hi afegeix 1 ml de medi BHI fred. Seguidament, es barreja suaument i es passa tot el contingut de la cubeta a un tub estèril de vidre.
- viii. S'incuba el tub a 37°C en agitació durant 45 min (temps d'expressió fenotípica).
- ix. Se sembra en plaques selectives adequades i s'incuba a 37°C durant 12-18 hores.

Solucions

Solució de CaCl_2 100 mM

- Dissoldre 1,47 g de CaCl_2 (Merck) en 90 ml d'aigua milli Q.
- Es barreja fins a la seva total dissolució i s'arrasa a un volum final de 100 ml.
- S'esterilitza a l'autoclau.

Solució de glicerol al 10%

- A 90 ml d'aigua destil·lada, afegir 10 ml Glicerol (Scharlau)
- S'agita fins a una total dissolució.
- S'esterilitza a l'autoclau (121°C 15 min).
- Es conserva a 4°C .

2.4. Mètodes de manipulació del DNA

La majoria de tècniques utilitzades es basen en les descrites als protocols de *Molecular cloning: a laboratory manual* (Sambrook *et al.*, 1989) i *Current protocols in molecular biology* (Ausubel *et al.*, 1995) amb unes lleugeres modificacions.

2.4.1. Extracció de DNA cromosòmic

Durant aquest procés es duu a terme una lisi cel·lular suau utilitzant un detergent, seguida d'un tractament amb proteïnasa K. Les restes cel·lulars, proteïnes i polisacàrids són segregats i precipitats amb un tractament amb CTAB (hexadecil trimetil bromur d'amoni de SIGMA). S'extrauen amb fenol/cloroform/isoamílic i, finalment, es recupera el DNA cromosòmic per precipitació amb 2-isopropanol (Panreac).

- i. Es comença l'extracció de DNA cromosòmic a partir d'un cultiu de nit, realitzat a les condicions òptimes per la soca.
- ii. Se centrifuga 1,5 ml del cultiu en un tub eppendorf a 12.000 rpm durant 1-2 min.
- iii. Se n'elimina el sobrenedant i es ressuspèn el sediment en 567 μ l d'aigua milli Q.
- iv. S'hi afegeixen 30 μ l de SDS 10% (sal sòdica de dodecilsulfat de Merck) i 3 μ l de proteïnasa K a una concentració de 20 mg/ml (Roche Diagnostics SL).
- v. Es barreja per inversió el tub i s'incuba a 37°C durant 1 hora o fins que es produeixi la lisi cel·lular.
- vi. S'hi afegeixen 100 μ l de NaCl 5M (AppliChem), es barreja per inversió vigorosament, i s'afegeixen 80 μ l de solució CTAB/NaCl preescalfada a 65°C.
- vii. Es barreja i s'incuba a 65°C durant 10 min.
- viii. S'afegeix 1 volum de solució cloroform/isoamílic, es barreja vigorosament per inversió i se centrifuga a 12.000 rpm durant 5 min.
- ix. Es transfereix la fase aquosa (normalment la superior) a un altre tub eppendorf, utilitzant puntes de micropipeta prèviament tallades, evitant així la ruptura mecànica del DNA.
- x. S'afegeix un volum de fenol/cloroform/isoamílic i es barreja vigorosament.
- xi. Se centrifuga a 12.000 rpm durant 5 min i es recupera el sobrenedant en un altre tub d'eppendorf.
- xii. Cal repetir des del pas viii fins que desaparegui la interfase.

- xiii. S'afegeix un volum de cloroform/isoamílic a la fase recuperada a fi d'eliminar les restes de fenol.
- xiv. Se centrifuga a 12.000 rpm durant 1 min i se'n recupera el sobrenedant en un altre tub eppendorf.
- xv. S'afegeixen 0,6 volums de 2-isopropanol (Panreac) absolut i es barreja per inversió. S'observa la formació de filaments de DNA cromosòmic precipitat.
- xvi. Se centrifuga a 12.000 rpm durant 10 min.
- xvii. S'elimina el sobrenedant i es renta el precipitat amb 1 ml d'etanol 70% fred.
- xviii. Se centrifuga durant 5 minuts a 12.000 rpm.
- xix. S'elimina el sobrenedant i s'asseca el precipitat al *Speed Vac*[®] (Savant).
- xx. Afegir de 50 a 100 µl de tampó TE+RNAsa i es deixa resuspenent a 37°C.
- xxi. Una vegada ressuspès pot conservar-se a 4°C o a -20°C.

2.4.2. Extracció de DNA plasmídic

a) Miniextracció de DNA plasmídic (Miniprep)

Aquesta tècnica es basa en el protocol de lisi alcalina (Birnboim i Doly, 1979), que utilitza SDS i NaOH. Es neutralitza amb acetat potàssic, es desproteïnitza amb clorur de liti i es precipita el DNA plasmídic amb etanol.

- i. Es comença l'extracció de DNA plasmídic a partir d'un cultiu de nit, realitzat a les condicions òptimes per la soca.
- ii. Se centrifuguen 1,5 ml de cultiu en un d'eppendorf a 12.000 rpm durant 1-2 min.
- iii. Se n'elimina el sobrenedant i es ressuspèn el pellet en 100 µl de solució I freda.
- iv. Afegir 200 µl de solució II i es barreja per inversió fins obtenir una solució viscosa resultat de la lisi cel·lular.
- v. Es manté el tub en gel durant 5 min.

- vi. Afegir 150 µl de solució III i es barreja per inversió vigorosament fins que es forma un precipitat blanquinós.
- vii. Es manté el tub de 5 a 10 min en gel.
- viii. Se centrifuga 5 min a 12.000 rpm.
- ix. Es transfereix la fase aquosa a un altre tub amb cura de no arrossegar-ne la interfase.
- x. S'hi afegeix 1 volum d'isopropanol absolut (Panreac) i es barreja.
- xi. Es manté el tub de 5 a 10 min a temperatura ambient.
- xii. Se centrifuga durant 5 min a 12.000 rpm.
- xiii. S'elimina el sobrenedant i es ressuspèn el pellet en 150 µl de TE+RNAsal.
- xiv. S'incuba a 37°C durant 20 min.
- xv. Afegir 400 µl de LiCl 5M i 400 µl de cloroform i agitar vigorosament.
- xvi. Se centrifuga durant 10 min a 12.000 rpm.
- xvii. Es transfereix la fase superior aquosa a un altre tub i s'hi afegeixen 2 volums d'etanol absolut fred, es barreja per inversió i es deixa precipitant a -80°C durant 20-30 min.
- xviii. Se centrifuga el tub a 12.000 rpm a 4°C durant 10 min.
- xix. Se n'elimina el sobrenedant i es fa un rentat amb etanol 70% fred.
- xx. Se n'elimina el sobrenedant i s'asseca a l'*Speed Vac*[®] (Savant).
- xxi. Es ressuspèn el DNA plasmídic obtingut en 20-30 µl de tampó TE o aigua milli Q.
- xxii. Un cop ressuspès es conserva a -20°C.

b) Maxiextracció de DNA plasmídic (Maxiprep)

Quan es van necessitar quantitats majors de DNA plasmídic, es van realitzar extraccions a partir de volums de cultiu més grans, adaptant les proporcions de les solucions utilitzades. L'extracció es va purificar utilitzant un sistema de columna (Wizard[®] Promega).

- i. Se segueix el mateix procediment que en la miniextracció de l'apartat 2.5.2.1, però augmentant els volums de les solucions I, II i III proporcionalment al volum del cultiu fins al punt vii.
- ii. Es posa tota la barreja en un tub de vidre de 30 ml.
- iii. Se centrifuga el tub a 8.000 rpm durant 15 min.
- iv. Es transfereix la fase aquosa a un altre tub amb cura a fi de no arrossegar-ne la interfase.
- v. S'afegeixen 0,6 volums d'isopropanol absolut (Panreac), es barreja per inversió i es deixa el tub 15 min a temperatura ambient. S'observa la formació d'un precipitat blanquinós.
- vi. Se centrifuga el tub durant 15 min a 8.000 rpm.
- vii. Se n'elimina el sobrenedant i es deixa que l'isopropanol s'evapori totalment.
- viii. Es ressuspen el precipitat de DNA plasmídic en el tampó TE amb RNasal, incubant a 37°C.
- ix. Es reparteixen 500 µl de solució de DNA plasmídic en diversos tubs d'ependorf.
- x. S'afegeix 1 ml de terra de diatomees a cada tub, es barreja per inversió i s'espera 5 min, fins que s'observen dues fases.
- xi. Es barreja i es transfereix tot el contingut a una xeringa, col·locada sobre una columna de purificació *Wizard Minicolumn* (Promega).
- xii. Es passa la solució a través del filtre de la columna mitjançant la pressió exercida per l'èmbol de la xeringa.
- xiii. S'extrau la xeringa de la columna, se'n separa l'èmbol. Es torna a connectar la xeringa a la columna i es fan passar 2 ml d'etanol al 70% .
- xiv. Se centrifuga la columna, a 12.000 rpm durant 5 min, per tal d'eliminar les restes d'etanol.
- xv. S'afegeix 50 µl d'aigua milli Q calenta a la columna i s'espera 5 min per eluir el DNA fins que l'aigua mulla tot el filtre de la columna.
- xvi. Se centrifuga la columna a 12.000 rpm durant 5 min. En el volum eluït es trobarà el DNA plasmídic purificat.

Solucions

RNasal

- A 987 µl d'aigua milli Q s'hi afegeixen:
 - 0,01 g de RNasa (Roche Diagnostics S.L.)
 - 10 µl de solució de Tris-Cl 1 M pH 7.4 (AppliChem)
 - 3 µl de solució NaCl 5M (AppliChem)
- Es barreja fins a la total dissolució i s'escalfa durant 15 min a 100°C.
- Es deixa refredar i es fan alíquotes de 25 µl que es conserven a -20°C. Aquestes alíquotes s'utilitzen ressuspeses amb 500 µl de TE.

Tampó TE

- A 97 ml d'aigua milli Q s'hi afegeixen:
 - 2 ml de solució d'EDTA 0.5M pH 8 (18,6125 g/100 ml) (SIGMA)
 - 1 ml de solució de Tris-Cl 1 M pH 7,4 (Applichem)
- Es barreja i s'esterilitza a l'autoclau (121°C, 15 min).

Solució cloroform/isoamílic

- 480 ml de cloroform (Carlo Erba Reagenti)
- 20 ml de 3-metil-1-butanol (Etanol isoamílic) (Panreac)

Fenol bidestil·lat

- Per preparar el fenol bidestil·lat, aquest ha d'estar equilibrat a un pH superior a 7,8.
- S'escalfa el fenol amb la 8-hidroxiquinoleïna fins que es líquüi.
- S'hi afegeix un volum de tampó tris-HCl 0.5 M (pH 8) i es deixen separar les dues fases
- Se n'elimina la fase aquosa superior i es fan rentats afegint-hi un volum de tampó tris-HCl 0,1 M (pH 8) fins a arribar a un pH més elevat de 7.8.
- Es conserva el fenol amb 0.1 volums de tampó Tris-HCl 0,1 M (pH 8), que contingui 0.2% de β-mercaptoetanol, a 4°C en una ampolla de vidre fosca.

Solució fenol/cloroform/isoamílic

- Es mesuren 250 ml de fenol (Panreac) bidestil·lat i es deixa que se separin dues fases i s'aspira la fase superior.
- Afegir 250 ml de solució cloroform isoamílic.
- Deixar a 37°C durant 12-18 hores, perquè s'homogeneïtzi la barreja.
- Es conserva a 4°C a una ampolla de vidre fosca.

Acetat sòdic 3 M

- Pesar 40,81 g d'acetat sòdic $\times 3 \text{ H}_2\text{O}$.
- Arrasa fins a un volum de 100 ml amb aigua milli Q i ajustar el pH a 5,2 amb àcid acètic glacial.
- Esterilitzar-ho a l'autoclau (121°C 15 min).

Etanol 70%

- 70 ml d'etanol absolut (Carlo Erba Reagenti).
- 30 ml d'aigua destil·lada.

Proteïnasa K

- Pesar 20 mg de proteïnasa K (Roche)
- Afegir 1 ml d'aigua milli Q
- Es barreja fins a la total dissolució.
- Es reparteix en alíquotes de 50 μl i es conserven a -20°C.

Solució CTAB/NaCl

- A 80 ml d'aigua milli Q s'hi afegeixen:
 - 4,1 g de NaCl (Panreac)
 - 10 g de CTAB (hexadecil trimetil bromur d'amoni) (SIGMA)
- Es barreja i si és necessari, s'escalfa a 65°C fins a la seva total dissolució.
- S'arrasa a 100 ml amb aigua milli Q.
- Es conserva a temperatura ambient.

Solució I

La solució I de treball es prepara a partir d'una solució 2× per dilució a la meitat amb aigua milli Q.

Per preparar la solució 2×, que es manté a temperatura ambient:

- A 910 ml d'aigua milli Q, s'hi afegeixen:
 - 50 ml de solució de tris-Cl 1 M pH 8 (AppliChem)
 - 40 ml de solució d'EDTA 0.5 M pH 8 (18,6125 g/100 ml) (SIGMA)
- Es barregen els components i s'esterilitza a l'autoclau (121°C 15 min).

Solució II

- A 44 ml d'aigua milli Q, s'hi afegeixen:
 - 5 ml de SDS 10% (Merck)
 - 1 ml de NaOH 10 N (40 g/ 100 ml) (Panreac)

Solució III

- A 200 ml d'aigua milli Q, s'hi afegeixen:
 - 600 ml d'acetat potàssic 5 M (294.4 g/600 ml) (Panreac)
 - 115 ml d'àcid acètic glacial (Panreac)
- Es barregen els components i s'ajusta el pH a 4,8.
- S'arrasa a un volum final d'1 L amb aigua milli Q.

Terra de diatomees

- Diluir 3,5 g de la terra de diatomees (SIGMA) en 50 ml d'aigua milli Q.
- Deixar precipitant durant 3 hores com a mínim. Una vegada la terra de diatomees ha sedimentat completament, se n'elimina el sobrenedant.
- S'afegeixen a 50 ml d'aigua milli Q:
 - 100 g d'hidroclorur de guanidina (SIGMA)
 - 8,75 ml Solució de tris-Cl 1M a pH 7,4 (Appllichem)
 - 14 ml de solució de EDTA 0,5 M a pH 8 (18,6125 g/100 ml) (SIGMA)
- Es dissol completament i s'arrasa a un volum final de 175 ml amb aigua milli Q.
- S'afegeix aquesta solució al sediment de la terra de diatomees i es barreja.

- Es desa el contingut resultant en una ampolla protegida de la llum i a temperatura ambient.

Abans d'utilitzar la resina s'ha d'agitar vigorosament, a fi que la suspensió sigui el més homogènia possible.

2.4.3. Digestió amb enzims de restricció i tampons

Els enzims utilitzats en aquest treball es van adquirir a Roche Diagnostics S L, i per fer-los servir es van seguir les recomanacions del fabricant.

2.4.4. Electroforesi de DNA

L'electroforesi de DNA s'utilitza per a la separació i la identificació de fragments de DNA d'orígens diversos. També permet l'aïllament d'un fragment dins d'una barreja heterogènia de fragments de diverses grandàries. Es basa en el fet que la càrrega negativa que presenta del DNA a pH neutre li permet migrar cap al pol positiu quan es troba dins d'un camp elèctric. La concentració d'agarosa dels gels permet intervals de discriminació dels fragments de DNA en funció de la seva grandària i conformació. Gràcies a l'addició d'agents intercalants com el bromur d'etidi (BrEt) (Roche Diagnostics S L) és possible la visualització de la migració del DNA per exposició a la llum ultraviolada, ja que aquesta provoca la seva fluorescència.

a) Preparació dels gels d'agarosa

- i. Es pesa la quantitat d'agarosa en pols desitjada. La concentració recomanada d'agarosa, segons el rang de resolució dels fragments lineals de DNA (kb), és la següent:

% Agarosa	kb del fragment de DNA
0,3	60 - 5
0,5	30 - 1
0,7	12 - 0,8
1,0	10 - 0,5
1,2	7 - 0,4
1,5	3 - 0,2
2	3 - 0,1

- ii. Es barreja l'agarosa pesada en tampó d'electroforesis (1× TAE). Per fer-ho, s'ha d'escalfar fins a dissoldre-la, evitant que la solució arribi a l'ebullició.
- iii. Es tempera la solució a 50°C i afegir BrEt (Roche Diagnostics S. L.), a una concentració final de 0,5 µg/ml, partint d'una solució concentrada de 10 mg/ml.
- iv. Es diposita la solució a un suport del gel, amb els extrems segellats.
- v. Es col·loca una o més pintes segons la quantitat de pous que s'hagin de carregar, i esperar que se solidifiqui.
- vi. Es treuen les pintes i es col·loca el suport en una cubeta d'electroforesi, plena de tampó 1 × TAE.
- vii. Es carreguen les mostres de DNA als pous del gel. Per carregar les mostres s'utilitza una solució transportadora 6 × en una relació 1:5 respecte del volum final de la mostra de DNA.
- viii. S'aplica un voltatge constant de 100 V. El temps i el voltatge de l'electroforesi dependrà de la grandària dels fragments de DNA que es volen visualitzar.
- ix. S'observa el gel amb un transil·luminador de llum ultraviolada (302 nm).
- x. Una vegada acabada l'electroforesi, es pot fotografiar el gel utilitzant un digitalitzador d'imatges.

Solucions

Tampó 50× TAE

- A 750 ml d'aigua milli Q s'hi afegeixen:
 - 242 g de trizma Base (SIGMA)
 - 100 ml de solució de EDTA 0,5 M a pH 8 (18,6125 g/100 ml) (SIGMA)
 - 57 ml d'àcid acètic glacial (Panreac)
- Es barreja fins a una completa dissolució.
- S'arrasa amb aigua milli Q fins a un volum final d'1 L.

Solució transportadora 6 x

- A 90 ml d'aigua milli Q s'hi afegeixen:
 - 30 g de glicerol (Scahlau)
 - 0,25 g de xilencianol (Clontech)
 - 0,25 g de blau de bromofenol (Panreac)
- Es dissol el glicerol i els colorants.
- Afegir 2 ml de solució EDTA 0,5 M a pH 8 (18,6125 g/100 ml) (SIGMA).
- S'esterilitza a l'autoclau (121°C 15 min).

b) Marcadors

Els marcadors utilitzats són DNA fàgic (λ o ϕ) digerit amb algun enzim:

Marcador	Mida de les bandes que presenta en pb
$\lambda \perp HindIII$	23.130, 9.416, 6.557, 4.361, 2.322, 2.027, 564, 125
$\lambda \perp BstEII$	8.543, 7.242, 6.369, 5.687, 4.822, 4.234, 3.675, 2.323, 1.929, 1.371, 1.264, 702, 224, 117
$\phi \perp HinfI$	726, 713, 553, 500, 427, 417, 413, 311, 249, 200, 151, 140, 118, 100, 82, 66, 48, 42, 40, 24

c) Purificació de fragments de DNA

Aquesta tècnica va ser utilitzada per recuperar fragments de DNA, com per exemple: productes de PCR, fragments de restriccions, etcètera. Aquests es carreguen en un gel d'agarosa i se separen mitjançant electroforesi. Una vegada s'aïllen les bandes de DNA, es retallen del gel, es fonen i l'agarosa es retira mitjançant la utilització de la resina *Wizard PCR Preps DNA Purification Resin* (Promega) i columnes *Wizard*[®], per bandes menors de 500 pb, o el kit *illustra GFX*[®] *PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences), per fragments de més de 500 pb.

El protocol seguit per la resina de Promega és el següent:

- i. Es retalla la regió del gel d'agarosa que conté el fragment de DNA desitjat, es pesa i s'introdueix en un tub eppendorf, prèviament taxat.
- ii. S'afegeixen de 2 a 3 volums de solució de NaI 6 M (Panreac) respecte del pes de la banda.
- iii. S'incuba el tub en un bany d'aigua a 55-65°C, fins que l'agarosa estigui completament fosa.
- iv. Es reparteix el contingut en tubs d'eppendorf (màxim 500 µl/tub).
- v. S'afegeix 1 ml de resina a cada eppendorf, i es barreja per inversió.
- vi. Passats 5 min, es transfereix el contingut de l'eppendorf a una xeringa muntada sobre una columna de purificació de DNA *Wizard*[®] (Promega). Amb l'ajut de l'èmbol es passa el contingut a través de la columna.
- vii. Es passen 3 ml d'isopropanol (Panreac) 80%, per la columna que conté el complex DNA-resina.
- viii. Se centrifuga durant 5 min en un tub d'eppendorf.
- ix. S'afegeixen de 15 a 40 µl d'aigua milli Q escalfada a 55°C.
- x. Passat 1 min se centrifuga 5 min per eluir el DNA.

Per la purificació de bandes amb el kit d'Amersham Biosciences es va seguir el protocol descrit pel fabricant.

Solucions

Nal 6 M (Panreac)

- Pesar 8,9 g NaI
- S'arrasa a 10 ml amb aigua destil·lada.
- S'agita fins a la total dissolució.

2.4.5. Quantificació del DNA

Es van utilitzar dos mètodes de quantificació:

- **Fluorescència dels gels d'agarosa.** Mètode basat en el fet que la intensitat de la fluorescència deguda l'agent intercalant bromur d'etidi (BrEt) utilitzat per tenyir el gel d'electroforesi és proporcional a la concentració de DNA. El mètode consisteix a carregar diferents dilucions de la solució problema de DNA en un gel d'agarosa. Paral·lelament, es carrega un patró de concentració coneguda i es compara amb la mostra.
- **Espectrofotometria.** La quantificació de la concentració de DNA, amb l'espectrofotòmetre *GeneQuant*, s'ha fet seguint les instruccions del fabricant Amersham Bioscience. Aquest instrument està controlat per un microprocessador que utilitza equacions i factors emmagatzemats (*Ultrospec 1100 pro*) per quantificar els àcids nucleics.

2.4.6. Clonació en vectors plasmídics. Preparació dels vectors i dels inserts

Els vectors i els inserts que s'utilitzen es digereixen prèviament amb un o més enzims de restricció. Segons la compatibilitat de les dianes entre el vector i l'insert, pot caldre el reompliment dels extrems cohesius generats per les endonucleases de restricció utilitzades. D'altra banda, per tal d'evitar possibles recircularitzacions del vector, abans de realitzar la lligació amb l'insert, es poden eliminar els grups fosfat de l'extrem 5' del vector.

a) Reompliment d'extrems

L'aplicació d'aquesta tècnica permet obtenir fragments de DNA amb extrems roms.

- i. En un tub eppendorf s'hi afegeixen:
 - 50 µl de DNA en solució o del producte de la restricció de DNA
 - 20 µl del tampó 5 × de la DNA polimerasa del fag T4 (Roche Diagnostics SL)
 - 20 µl d'una barreja de dNTP 5 × (Roche Diagnostics SL)
 - 5 µl de la DNA polimerasa del fag T4 (1 unitat/µl) (Roche Diagnostics SL)
 - 5 µl d'aigua milli Q
- ii. S'incuba el tub a 37°C durant 15 min.
- iii. S'inactiva la reacció per calor, incubant a 70°C durant 10 min.
- iv. Es precipita el DNA amb etanol (veure més endavant).

b) Defosforilació de l'extrem 5'

- i. S'afegeixen en un tub eppendorf:
 - 100 µl del producte que caldrà defosforilar
 - 20 µl del tampó 10 × de la fosfatasa alcalina (Roche Diagnostics S L)
 - 79 µl d'aigua milli Q
 - 1 µl de fosfatasa alcalina (1 unitat/µl) (Roche Diagnostics S L)
- ii. S'incuba a 37°C durant 30 min.
- iii. S'hi afegeix 1 µl més d'enzim i es torna a incubar a 37°C durant 30 min més.
- iv. S'atura la reacció incubant el tub a 70°C durant 10 min.
- v. Es precipita el DNA amb etanol (veure més endavant).

c) Precipitació del DNA

Aquesta tècnica permet obtenir DNA purificat, després que aquest hagi estat defosforilat o els seus extrems reomplerts.

- i. S'augmenta el volum de la reacció de reompliment o de defosforilació amb aigua milli Q fins a 400 μ l.
- ii. Es realitza un tractament amb 400 μ l de la solució fenol/cloroform/isoamílic.
- iii. Es barreja per inversió i se centrifuga a 12.000 rpm durant 5 min.
- iv. Es recupera la fase aquosa i s'afegeix 400 μ l de la solució cloroform/isoamílic.
- v. Es barreja per inversió i se centrifuga a 12.000 rpm durant 3 min.
- vi. Es recupera la fase aquosa i s'afegeixen 2,5 volums d'etanol absolut i 0,1 volums d'acetat sòdic 3 M (Merck).
- vii. Es deixa precipitant el DNA a -80°C de 1-12 hores.
- viii. Se centrifuga el tub a 12.000 rpm a 4°C durant 10 min.
- ix. S'elimina el sobrenedant i es renta el sediment de DNA afegint-hi 1 ml d'etanol 70%.
- x. Se centrifuga el tub a 12.000 rpm a 4°C durant 5 min.
- xi. S'asseca el sediment de DNA amb el *Speed Vac*[®] (Savant).
- xii. Es ressuspèn el DNA en 20 μ l d'aigua milli Q.

d) Reacció de lligació

Les diferents reaccions de lligació es van fer utilitzant la DNA ligasa del fag T4 (Promega).

La reacció de lligament permet unir fragments que tinguin extrems compatibles. Aquesta reacció depèn de la concentració relativa d'extrems de vector i d'insert. Quan es tracta d'una reacció entre fragments amb extrems cohesius, la relació d'extrems vector-insert van ser 1:2, mentre que si eren extrems roms era d'1:1.

Per calcular les quantitats de vector i d'insert necessaris s'utilitza la següent fórmula:

$$\text{ng d'insert} = \frac{\text{ng de vector} \times \text{kb d'insert}}{\text{kb de vector}} \times \text{relació insert/vector}$$

- i. S'afegeixen en un tub eppendorf:
 - 2,5 µl de tampó 2 x de la lligasa (Promega)
 - Els volums de vector i d'insert necessaris
 - 0,5 µl de DNA lligasa del fag T4 (Promega)
 - Aigua milli Q necessària fins a un volum final de 5 o 10 µl
- ii. S'incuba la barreja de reacció un mínim de 2 hores a temperatura ambient.
- iii. S'inactiva la reacció, incubant a 70°C durant 10 min.

2.4.7. Amplificació del DNA: PCR

Per fer les PCR dutes a terme en aquest treball es van utilitzar les DNA polimerases *Taq Expand High Fidelity* i *Pwo* (Roche Diagnostics SL).

El protocol utilitzat per a un volum final de 25 µl de reacció de PCR és el següent:

- i. S'irradia el material amb llum ultraviolada durant 15 min, en una càmera de flux vertical per PCR (FLV60 Euro Aire).
- ii. Es barregen en un tub de 0,5 ml de capacitat:
 - 2,5 µl de tampó 10 x de PCR (Roche Diagnostics SL)
 - 2,5 µl d'una barreja de dNTPs (2 mM c/dNTP) (Roche Diagnostics SL)
 - 1,25 µl de cada un dels oligonucleòtids (10 pmol/µl)

- 0,2 µl de l'enzim *Taq* (3,5 unitats/µl) o 0,125 µl de l'enzim *Pwo* (5 unitats/µl) (Roche Diagnostics SL)
 - 200 ng de DNA motlle o 2 µl d'una colònia dissolta en 100 µl d'aigua milli Q i bullida 5 min.
 - Aigua milli Q fins arribar a un volum final de 25 µl.
- iii. Es barreja i es fa un pols de centrífuga.
 - iv. Es programa el termociclador segons la reacció de PCR que es vol realitzar.
 - v. Es col·loquen els tubs en el termociclador i es posa en marxa el programa.

2.5. Obtenció de mutants de gens de *P. putida*

L'obtenció de mutants de *P. putida* es va fer per intercanvi de marcadors. Es va inactivar el gen que es volia mutagenitzar amb el casset de resistència a kanamicina (Km) i es clonà al vector suïcida pUA658. Finalment s'introduí a *P. putida* mitjançant conjugació. Per l'obtenció de dobles mutants s'utilitzà el sistema descrit per Kristensen, *et al.* (1995) per tal d'eliminar el casset de resistència a Km de la soca mutant, i així poder introduir noves mutacions pel mateix sistema utilitzat per obtenir mutants simples.

a) Inactivació del gen amb el casset Km

- i. S'amplifica, per PCR, el gen que es vol inactivar amb els oligonucleòtids adequats. Es poden afegir dianes als oligonucleòtids per poder alliberar el fragment per restricció. Si el gen és petit es poden agafar part de les regions *upstream* i *downstream* del gen.
- ii. Es lliga el producte de la PCR al vector plasmídic pGEM-T.
- iii. Es transforma la lligació a les cèl·lules competents *E.coli* DH5α.
- iv. Es comprova la clonació del gen d'interès per PCR de les colònies obtingudes, o del DNA obtingut mitjançant miniprep.
- v. Es seqüència el clon que contingui el fragment clonat.

- vi. Es fa una PCR inversa, sobre el pGEM-T amb l'insert clonat, amb uns oligonucleòtids que incorporin una diana de restricció. Alternativament es pot fer la PCR utilitzant la polimerasa *Pwo* (Roche), que deixa extrems roms. Si és així, continuar amb el pas ix.
- vii. Es fa la restricció amb l'enzim adequat (segons la diana incorporada en els oligonucleòtids) del producte de la PCR inversa.
- viii. Es reomplen els extrems, si és necessari, i es defosforila.
- ix. Es lliga amb el casset de resistència a la kanamicina (Km), obtingut del vector pHP45ΩKm pels mutants simples, o del vector pCK217 si es vol eliminar posteriorment de la soca mutant.
- x. Es transforma la lligació a les cèl·lules competents DH5α.
- xi. Es comprova la clonació del gen d'interès per PCR de les colònies obtingudes, o del DNA obtingut mitjançant miniprep.
- xii. Es fa una restricció per obtenir tota la construcció amb el gen interromput pel casset Km. Es poden utilitzar les dianes del *polylinker* del pGEM-T si no s'havien afegit dianes als oligonucleòtids de la primera PCR.
- xiii. Es reomplen els extrems, si és necessari, i es lliga al vector pUA658.
- xiv. Es transforma la lligació a les cèl·lules competents MC1061λpir.
- xv. Es comprova la clonació del gen d'interès per PCR de les colònies obtingudes, o del DNA obtingut mitjançant miniprep.
- xvi. Es transfereix, per conjugació, el vector suïcida a la soca que es vol mutagenitzar.

b) Conjugació i selecció dels dobles recombinants

- i. Es prepara un cultiu de nit de la soca receptora (*P. putida* KT2442), la soca donadora (MC1061λpir que porta el vector suïcida pUA658 amb el gen a mutar interromput pel casset Km) i la soca *helper* (HB101 amb el plasmidi pRK600). Alternativament es pot transformar el vector pUA658 a la soca S17λpir, i així no es necessita la soca *helper*. Això no es pot fer si el casset Km prové del vector pCK217.
- ii. Es fa una ressebra 1/100 del cultiu de nit de la soca donadora i la *helper*.

- iii. Quan la DO_{550} dels cultius arriba a 0,8, es barregen 5 μ l del cultiu de nit de *P. putida* amb 50 μ l de la soca donadora i 50 μ l de la *helper*.
- iv. Es diposita la barreja de cultius en un filtre de 0,45 μ m.
- v. Es deixa assecat i s'incuba el filtre en una placa d'agar LB a 30°C tota la nit.
- vi. L'endemà es ressuspèn el filtre en 1 ml de solució salina NaCl 0,9%. Se sembren 100 μ l (o més, segons l'eficiència de la recombinació) en plaques d'agar LB amb rifampicina i kanamicina.
- vii. S'incuba tota la nit a 30°C.
- viii. Les colònies resultants es ressembren en plaques d'agar LB amb, i sense, gentamicina (Gm).
- ix. S'incuba tota la nit a 30°C.
- x. Els clons sensibles a Gm són els que han fet la doble recombinació, incorporant la resistència a Km, però perdent la resistència a Gm.
- xi. Si el casset de resistència a Km prové del vector pCK217, es pot eliminar fent una conjugació amb el vector pJMSB8, i seleccionant els clons que han perdut la resistència a Km.

2.6. Mètodes de manipulació de l'RNA

Tots els mètodes de manipulació d'RNA impliquen una sèrie de mesures per evitar la seva degradació. Tot el material i les solucions que es van utilitzar estaven lliures de RNAses. El material de vidre va ser tractat a 150°C durant un mínim de 3 h, i l'aigua milli Q es va tractar prèviament amb DEPC. El material fungible és lliure de RNAses i la manipulació es va fer utilitzant sempre guants.

2.6.1. Extracció d'RNA

L'extracció de l'RNA bacterià implica un primer pas de lisi cel·lular, seguit de la separació de l'RNA de les proteïnes i del DNA. Es va fer una extracció orgànica i finalment, una precipitació de l'RNA amb alcohols i sals.

- i. Se centrifuga el cultiu a la DO_{550} desitjada durant 10 min a 8.000 rpm.

- ii. Es ressuspèn les cèl·lules en 1 ml de TriPure Isolation Reagent (TRI REAGENT-LS, Sigma).
- iii. S'incuba 5 min a temperatura ambient (lisi de les cèl·lules).
- iv. Se centrifuga a 13.000 rpm durant 10 min a 4°C.
- v. Es recupera tot el sobrenedant.
- vi. S'afegeixen 200 µl de cloroform. Agitar vigorosament durant 15 segons.
- vii. S'incuba 15 min a temperatura ambient.
- viii. Se centrifuga a 13.000 rpm durant 15 min a 4°C.
- ix. Es recupera la fase aquosa (incolora) amb cura de no agafar la interfase.
- x. S'afegeixen 500 µl d'isopropanol.
- xi. S'incuba 10 min a temperatura ambient.
- xii. Se centrifuga a 13.000 rpm durant 10 min a 4°C.
- xiii. Es descarta el sobrenedant i s'afegeix 1 ml d'etanol 70%.
- xiv. Se centrifuga a 13.000 rpm durant 5 min a 4°C.
- xv. Es descarta el sobrenedant i deixar assecar.
- xvi. Es ressuspèn el pellet en 89 µl d'aigua milli Q tractada amb DEPC.

2.6.2. Tractament amb DNAsa I

Per eliminar les possibles restes de DNA que hi pugui haver, es fa un tractament amb DNAsa I.

- i. Al tub eppendorf on hi ha l'RNA s'hi afegeixen:
 - 10 µl de tampó DNAsa (10 ×) (Roche Diagnostics SL)
 - 1 µl de DNAsa I lliure de RNases (Roche Diagnostics SL)
- ii. S'incuba a 37°C durant 1 hora.
- iii. S'afegeixen 300 µl d'aigua milli Q tractada amb DEPC
- iv. S'afegeix un volum (400 µl) de fenol àcid. Es barreja per inversió i se centrifuga a 13.000 rpm durant 3 min.
- v. Se'n recupera la fase aquosa.
- vi. Es repeteix el pas iv i v un mínim de dues vegades fins que s'elimini la interfase.
- vii. S'afegeix 1 ml d'etanol absolut.
- viii. Es deixa precipita l'RNA a -80°C un mínim de 30 min.

- ix. Se centrifuga a 13.000 rpm durant 10 min a 4°C, per pelletejar l'RNA precipitat.
- x. S'elimina l'etanol i s'hi afegeix 1 ml d'etanol 70%
- xi. Se centrifuga durant 5 min.
- xii. Es descarta el sobrenedant i es deixa assecar.
- xiii. Es ressuspèn el pellet en 100 µl d'aigua milli Q tractada amb DEPC.
- xiv. Es quantifica a l'espectrofotòmetre i es comprova per PCR l'absència de DNA.

2.6.3. Quantificació de l'RNA

Es mesura la DO_{260} de la mostra o d'una dilució seva, utilitzant l'espectrofotòmetre *Gene Quant* (Amersham Biosciences). Les mesures de DO_{230} o DO_{280} , permeten determinar la puresa d'una mostra. S'estableixen com a paràmetres de puresa vàlids les proporcions:

$$DO_{260}/DO_{280} \geq 1,8$$

$$DO_{260}/DO_{230} > 2$$

Per comprovar que no hi ha contaminació de DNA, es fa una PCR utilitzant oligonucleòtids propis del microorganisme del qual s'ha extret l'RNA. Si apareix producte d'amplificació es deu a la presència de DNA contaminant i s'ha de tornar a sotmetre l'RNA a un tractament amb DNasa I.

2.6.4. Purificació de l'RNA utilitzant el kit *RNeasy[®]Mini* (QUIAGEN)

Per tal d'eliminar la major part de l'RNA ribosòmic de la mostra, s'utilitzaren les columnes del kit d'extracció d'RNA de QUIAGEN *RNeasy[®]Mini*. El protocol seguit fou el corresponent al *RNA cleanup*. Cada columna només accepta 100 µg d'RNA, de manera que s'ha de dividir la mostra per tal que no superi aquesta concentració total.

- i. S'ajusta la mostra a 100 µl.
- ii. S'afegeixen 350 µl de la solució RLT i s'agita.
- iii. S'afegeixen 250 µl d'etanol absolut i es barreja amb la micropipeta.

- iv. Es col·loca el contingut del tub a una columna del kit.
- v. Se centrifuga la columna a 12.000 rpm durant 15 s i se'n descarta el líquid sobrant.
- vi. S'afegeixen 500 µl de la solució RPE.
- vii. Se centrifuga la columna a 12.000 rpm durant 15 s i se'n descarta el líquid sobrant.
- viii. S'afegeixen 500 µl de la solució RPE.
- ix. Se centrifuga la columna a 12.000 rpm durant 3 min.
- x. S'elimina el tub i es col·loca la columna a un tub eppendorf.
- xi. S'afegeixen 50 µl d'aigua milli Q lliure d'RNAses directament sobre la membrana de la columna.
- xii. Se centrifuga la columna a 12.000 rpm durant 1 min, per tal d'obtenir l'RNA en solució.

2.6.5. Amplificació de l'RNA: RT-PCR

Per fer els experiments d'RT-PCR es va fer servir el kit *Titan One Tube RT-PCR System* (Roche Diagnostics SL) que permet la realització de les reaccions de retrotranscripció i PCR en un únic pas.

Aquest mètode permet una anàlisi ràpida, sensible i reproducible de l'RNA, utilitzant una barreja d'enzims de l'*Expand High Fidelity PCR System* (Roche Diagnostics SL) i l'*AMV Reverse Transcriptase*. La reacció produeix la transcripció inversa de l'RNA, generant cDNA, i la posterior amplificació del cDNA per PCR.

Per fer les RT-PCR s'han seguit les instruccions i recomanacions del fabricant i s'han utilitzat oligonucleòtids interns de la regió codificant de diferents gens (Taula 2.3).

El protocol habitual utilitzat per a un volum final de 50 µl de reacció de RT-PCR és el següent:

- i. Cal irradiar, prèviament, tot el material que s'utilitzarà mantingut en gel, amb llum ultraviolada, en una càmera de flux vertical per PCR (FLV60 Euro Aire).
- ii. S'han de preparar per separat 2 barreges mare:

Barreja 1:

- 5 µl de dNTP (10 mM c/dNTP)
- 2 µl oligonucleòtid *up* (10 pmol/µl)
- 2 µl oligonucleòtid *down* (10 pmol/µl)
- 2.5 µl solució DTT (100 mM)
- 13,5 µl d'aigua milli Q tractada amb DEPC

Barreja 2:

- 10 µl del tampó 5 x RT-PCR amb Mg²⁺
- 1 µl de la barreja d'enzims (AMV+Expand High Fidelity PCR-System)
- 14 µl d'aigua milli Q tractada amb DEPC

- iii. Cal unir els 25 µl de cada una de les barreges mare.
- iv. S'hi afegeix l'RNA (100 ng).
- v. Es barreja i es fa un pols de centrífuga.
- vi. Es programa el termociclador segons la reacció de PCR que es vol fer. El programa ha de tenir un pas previ d'incubació a 50°C durant 30 min, durant el qual tindrà lloc la retrotranscripció. Posteriorment s'utilitza un programa normal de PCR.
- vii. Es col·loquen els tubs al termociclador i es posa en marxa el programa.

2.6.6. RT-PCR quantitativa a temps real

Aquest mètode s'utilitza per a quantificar l'expressió de gens mitjançant l'anàlisi del mRNA. En aquest estudi s'ha utilitzat el kit per a RT-PCR en un pas *LightCycler-RNA Master SYBR Green I* de Roche Diagnostics S.L., usant el *LightCycler Instrument* (Roche Diagnostics S.L.).

El *LightCycler-RNA Master SYBR Green I* realitza una amplificació a alta temperatura, utilitzant la Tth DNA polimerasa. Aquesta polimerasa és termoestable, té activitat de transcriptasa inversa dependent d'RNA, i DNA polimerasa dependent del DNA, pel que permet la realització de la RT i la PCR en una sola reacció. El *SYBR Green I* és un fluorocrom específic per a DNA de doble cadena i està inclòs en la barreja de reacció del kit. L'equip *LightCycler*

permet quantificar i analitzar a temps real els productes de la PCR, monitoritzant la fluorescència, a una longitud d'ona de 521 nm, durant cada cicle de l'amplificació. És un termociclador ràpid combinat amb un fluorímetre de microvolum, que permet canvis de temperatura molt ràpids, entre els diferents cicles. Amb les dades que s'obtenen a temps real (*on-line*) es pot fer una anàlisi pas a pas de l'amplificació, que permet quantificar l'RNA que ens interessa. A més, es pot determinar el punt de fusió dels fragments amplificats i descartar amplificacions inespecífiques. Les dades obtingudes s'analitzen en un ordinador amb el *Light Cycler Software version 3*, de Roche Diagnostics S.L. utilitzant un sistema operatiu Windows NT. Tots els protocols que es van utilitzar en aquest treball són els descrits per Roche Diagnostics S.L.

2.6.7. Microarrays

Per tal d'analitzar l'expressió gènica de tots els gens de *P. putida* es van utilitzar els xips de DNA (*microarrays*) desenvolupats per Yuste *et al.* (2005). En aquesta tècnica s'utilitza l'RNA, transformat a cDNA, per hibridar els xips que contenen oligonucleòtids que corresponen a tots els ORF trobats al genoma de *P. putida* KT2440.

a) RT (retrotranscripció)

El primer pas és transformar l'RNA a cDNA:

- i. S'ajusten 20 µg d'RNA a 13,5 µl amb aigua tractada amb DEPC.
- ii. S'afegeixen 3 µl de 10 mg/ml pd(N₆) per mostra (*Random hexamers*; pd (N₆) *sodium salt* diluït en aigua, Amersham).
- iii. S'incuba 10 min a 70°C i es posa en gel.
- iv. S'afegeixen 16,5 µl de *RT mix* per mostra.
- v. S'incuba 2 hores a 42°C.

RT mix per una mostra:

- 4,9 µl d'aigua tractada amb DEPC
- 6 µl de tampó de RT

- 3 µl de DTT 0,1 M
- 0,6 µl de 50x dNTPs/aa-dUTP mix*
- 1 µl de RTII (200U) (SuperScript II Rnase H⁻ Reverse Transcriptase (Invitrogen))
- 1 µl RNase-OUT (*Rnase-OUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor*) (Invitrogen)

* 50x dNTPs/aa-dUTP mix: 25 mM dATP, 25 mM dCTP, 25 mM dGTP, 5 mM dTTP (dNTP set 1, Lovora biochemie) i 20 mM aa-dUTP (Sigma).

b) Hidròlisi de l'RNA

- A 30 µl de cDNA afegir:
 - 10 µl de NaOH 1N
 - 10 µl d'EDTA 0,5 N
- S'incuba 15 min a 65°C.
- Es neutralitza amb 25 µl d'HEPES 1 M pH 7,5

c) Purificació del cDNA

La purificació es fa mitjançant les columnes del kit *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN). El procediment és el següent:

- S'afegeixen 12,5 µl de NaAc 3 M pH 5,2.
- S'afegeixen 400 µl de tampó PB (kit de Qiagen) i es passa per la columna.
- Se centrifuga 1 min a 13.000 rpm i es torna a passar per la columna.
- Se centrifuga 1 min a 13.000 rpm.
- S'afegeixen 700 µl de tampó PE (kit de Qiagen).
- Se centrifuga 1 min a 13.000 rpm i descartar el sobrenedant.
- Es passa a un eppendorf nou i s'afegeixen al filtre de la columna 50 µl de tampó fosfat 4 mM pH 8,5.
- S'incuba 5 min a temperatura ambient.
- Se centrifuga 1 min a 13.000 rpm.
- Es mesura la concentració al *Nano-Drop*. La concentració ha de ser major de 5ng/µl.
- S'asseca el cDNA al *Speed Vac*.

d) Incorporació dels fluorocroms

- i. Es ressuspèn bé el precipitat de cada cDNA en 9 μ l de NaHCO_3 0,1 M pH 9.
- ii. Es dissol el fluorocrom (100 μ g, prèviament dissolt en DMSO i evaporat al *Speed Vac*) amb el cDNA (un dels cDNAs a comparar amb Cy3 i l'altre amb Cy5). S'utilitzen quantitats equivalents de cada un dels cDNAs.
- iii. S'incuba 2 hores a la foscor a temperatura ambient.
- iv. S'afegeixen 4,5 μ l d'hidroxilamina 4 M.
- v. S'incuba 15 min a la foscor a temperatura ambient.
- vi. Es purifiquen els cDNAs amb una columna del kit *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN). Per fer-ho, s'afegeixen 60 μ l d'aigua i 600 μ l de tampó PB i es col·loquen en una columna del kit.
- vii. Se centrifuga 1 min a 13.000 rpm. Es torna a passar l'eluit per la columna i se centrifuga de nou 1 min a 13.000 rpm.
- viii. Es descarta l'eluit i s'afegeixen a la columna 700 μ l de tampó PE.
- ix. Se centrifuga 1 min a 13.000 rpm i es descarta l'eluit.
- x. Es passa a un eppendorf nou i s'afegeixen al filtre de la columna 50 μ l de tampó fosfat 4 mM pH 8,5.
- xi. S'incuba 5 min a temperatura ambient a la foscor.
- xii. Se centrifuga 1 min a 13.000 rpm.
- xiii. Es mesura la incorporació del fluorocrom al *Nano Drop*. S'han d'obtenir entre 130 i 300 pmol totals de cDNA-fluorocrom (mesurat en termes de fluorocrom incorporat).
- xiv. Es barregen quantitats iguals de Cy3-cDNA i Cy5-cDNA, i s'asseca al *Speed Vac* a la foscor.

e) Bloqueig del *microarray*

- i. Es renta el xip amb aire comprimit net.
- ii. Es posa el xip en un tub *Falcon* de 50 ml amb la solució de bloqueig prèviament escalfada a 42°C. S'incuba durant 45 min a 42°C.

- iii. Es renta lleugerament en un tub *Falcon* amb aigua milli Q, a temperatura ambient.
- iv. Es renta lleugerament en un tub *Falcon* amb isopropanol (grau HPLC), a temperatura ambient.
- v. Es deixa assecar a l'aire.

f) Hibridació

- i. S'afegeixen 35 μ l de tampó d'hibridació a la barreja de Cy3/Cy5-cDNA, temperat a 42°C. Es ressuspèn bé.
- ii. Es desnaturalitza a 95°C durant 2 min.
- iii. S'aplica en el cubre (24x60 mm, Menzel-Glaser), previament netejat amb aire comprimit.
- iv. Es posa amb cura el xip sobre el cubre (la part impresa cap al cubre), evitant la formació de bombolles.
- v. Es posa a la cambra d'hibridació. Es deixa 18 hores a la foscor a 50°C en un bany d'aigua. La cambra d'hibridació ha de tenir 5 μ l d'aigua per preservar la humitat.

g) Rentat

- i. Es posar el xip en un *Falcon* que contingui la solució WB1 a temperatura ambient, i es treu amb cura el cubre.
- ii. Es renta el *Falcon* 5 min amb agitació a temperatura ambient.
- iii. Es passa a un altre *Falcon* amb la solució WB1, i es repeteix el rentat.
- iv. Es renta el *Falcon* amb WB2 durant 5 min amb agitació a temperatura ambient.
- v. Es passa a un altre *Falcon* amb la solució WB2, i es repeteix el rentat.
- vi. Es renta el *Falcon* amb WB3 durant 5 min amb agitació a temperatura ambient.
- vii. Es submergeix el xip 15 seg en solució WB4 a temperatura ambient.
- viii. Es passa a un altre *Falcon* amb una mica de paper al fons, i se centrifuga 5 min a 3.500 rpm.

Solucions

Aigua amb DEPC

- A 1 L d'aigua milli Q afegir 1 ml de DEPC (pirocarbonat dietílic, Sigma).
- Agitar durant 8 hores i autoclavar.

Tampó fosfat 4 mM pH 8,5

- Barrejar 9,5 ml de K_2HPO_4 1 M i 0,5 ml KH_2PO_4 1 M. Així s'obté la solució 1 M.
- Diluir amb aigua milli Q per obtenir la solució al 4 mM.

$NaHCO_3$ 0,1 M, pH 9

- A 100 ml d'aigua milli Q afegir-li 0,84 g de $NaHCO_3$. Dissoldre bé i ajustar el pH amb NaOH fins a 9,0.

HEPES 1 M, pH 7,5

- A 50 ml d'aigua milli Q afegir-li 11,91 g d'HEPES. Dissoldre bé i ajustar el pH a 7,5

Hidroxilamina 4 M

- Dissoldre 13,9 g d'hidroxilamina en 50 ml d'aigua milli Q. Repartir en alíquotes de 8,5 μ l i guardar a $-80^\circ C$.

Fluorocroms Microarray

- Cy3 mono-reactive dye pack (Amersham)
- Cy5 mono-reactive dye pack (Amersham)
- A cada tub d'1 mg de fluorocrom afegir 40 μ l de DMSO. Fer alíquotes de 4 μ l i assecar al *Speed Vac* a la foscor. Guardar a $4^\circ C$ a la foscor amb gel de sílice.

aa-dUTP 100 mM

- Dissoldre 1 mg de aa-dUTP (Sigma) en 17 μ l d'aigua milli Q i 0,68 μ l de NaOH 1 M.

50x dNTPs/aa-dUTP mix

- Preparar la barreja:
 - 10 µl de dATP 100 mM (dNTP set 1, Lavora biochemie)
 - 10 µl de dCTP 100 mM (dNTP set 1, Lavora biochemie)
 - 10 µl de dGTP 100 mM (dNTP set 1, Lavora biochemie)
 - 8,5 µl de aa-dUTP 100 mM (Sigma)
 - 2 µl de dTTP 100 mM (dNTP set 1, Lavora biochemie)
- Fer alíquotes i guardar a -80°C.

Random hexamers

- A la barreja de pd(N₆) sodium salt (Amersham) afegir 132,5 µl d'aigua milli Q perquè quedi a 10 mg/ml.
- Guardar en alíquotes a -80°C.

Tampó d'hibridació

- Preparar la barreja:
 - 2 ml d'aigua milli Q
 - 500 mg de dextransulfat
 - 1,5 ml de 20x SSC
 - 500 µl de SDS 20%
 - 1 ml de 50x solució Denhart's
 - 5 ml formamida (desionitzada)
- Filtrar per eliminar partícules.

Solució de bloqueig

- Preparar la barreja:
 - 50 ml de 20 x SSC
 - 2 ml de SDS 10%
 - 2% de BSA
- Arrasar amb aigua milli Q fins a un volum final de 200 ml.

Tampons de rentat

- WB1 (2 x SSC, 0,1% SDS):

- 50 ml de 20 x SSC
- 1,5 ml de 20% SDS
- Arrasar amb aigua milli Q fins a un volum final de 500 ml.
- WB2 (1 x SSC):
 - 25 ml de 20 x SSC
 - Arrasar amb aigua milli Q fina a un volum final de 500 ml
- WB3 (0,2 x SSC):
 - 5 ml de 20 x SSC
 - Arrasar amb aigua milli Q fina a un volum final de 500 ml
- WB4 (0,1 x SSC):
 - 2,5 ml de 20 x SSC
 - Arrasar amb aigua milli Q fina a un volum final de 500 ml

Tampons PB i PE

Són els que venen amb el *QIAquick PCR Purification Kit* de QIAGEN.

2.6.8. Anàlisi dels resultats del *microarray*

En cada experiment es van utilitzar un mínim de dos xips, ja que cada cDNA primer es va marcar amb Cy3 i després amb Cy5. Els xips es van escanear amb l'escàner de fluorescència *ScanArray* 4000, i les imatges foren analitzades amb el programari *QuantArray*. Els factors d'inducció resulten de la comparació entre el cultiu tractat i no tractat o bé mutant respecte el salvatge no tractat. El factor d'inducció és el logaritme en base 2 del coeficient d'inducció obtingut per cada gen en el *microarray*. Un gen es considerarà induït quan la mitja dels factors d'inducció era igual o superior a 2 ($P \leq 0,05$).

2.7. Obtenció de proteïnes purificades

2.7.1. Clonació i sobreexpressió de proteïnes

Aquest sistema s'utilitza per clonar i expressar proteïnes recombinants en *E. coli* seguint les instruccions del fabricant. Els gens que ens interessaven van ser clonats en el plasmidi pET15b (Novagene) sota el control d'un promotor reconegut per l'RNAP del fag T7 i sota un *Ribosome Binding Site* (RBS) molt eficient de la proteïna majoritària de la càpside del fag T7. L'hoste escollit per a l'expressió i producció de la proteïna desitjada va ser la soca AR23, un derivat de la soca d'*E. coli* BL21 (λ DE3), que és *lexA*(Def) (Fernandez de Henestrosa *et al.*, 1997). Aquesta soca conté el bacteriòfag híbrid λ DE3. Aquest bacteriòfag conté un fragment de DNA amb el gen *lacI* i el gen de l'RNAP del T7 sota el control del promotor *lacUV5*. En una soca lisogènica per λ DE3, l'únic promotor capaç de produir la transcripció de l'RNA polimerasa del T7 és el *lacUV5*, induïble per IPTG. D'aquesta manera, quan s'afegeix IPTG al cultiu, s'indueix l'RNA polimerasa del T7, aquesta transcriurà el DNA clonat al vector pET15b i la seva traducció serà massiva a causa de l'eficiència del seu RBS. A més, aquesta soca es caracteritza, per ser deficient en la proteasa Lon i en la proteasa de membrana OmpT; d'aquesta manera s'evita la degradació de la proteïna.

D'altra banda, el vector pET15b permet la clonació en fase del gen a sobreexpressar amb una cua de sis histidines "His•Tag" a l'extrem amino terminal de la proteïna sobreexpressada, que facilita la seva purificació. A més, presenta codons STOP de traducció en els tres possibles marcs de lectura a continuació de la regió de clonació i un terminador de la transcripció del fag T7.

a) Preparació del vector de sobreexpressió

- i. S'amplifica, per PCR, l'ORF del gen que es vol sobreexpressar, utilitzant els oligonucleòtids adients que a més continguin a la seva seqüència les dianes de restricció *NdeI* i *BamHI*, per a una posterior clonació.
- ii. Es lliga el producte de la PCR al vector plasmídic pGEM-T.
- iii. Es transforma la lligació a les cèl·lules competents *E.coli* DH5 α .

- iv. Es fa una miniprep plasmídica de diversos clons obtinguts de la transformació.
- v. Es comprova la clonació del gen d'interès en els plasmidis obtinguts en el pas iv, mitjançant restricció o PCR.
- vi. Se seqüenciar el clon que contingui el fragment clonat.
- vii. Per restricció amb els enzims *NdeI* i *BamHI*, s'obté el fragment clonat en el vector plasmídic pGEM-T.
- viii. Es clona del fragment al vector pET15b, que ha estat prèviament tallat amb els enzims *NdeI* i *BamHI*.
- ix. Es repeteixen els passos del iii al vi amb aquest vector.
- x. Es transforma el vector pET15b amb l'insert d'interès a la soca de sobreexpressió *E. coli* BL21 (λ DE3).

b) Sobreexpressió de proteïnes

Primerament, es comprova la sobreexpressió a petita escala.

- i. Es fa ressembla 1/100, de 4 cultius de nit dels transformants de BL21/pET15b problema, en 20 ml de medi LB (Difco) amb ampicilina (50 μ g/ml).
- ii. S'incuba en agitació constant de 110 rpm a 37°C fins a una DO₅₅₀ de 0,6.
- iii. Es divideixen els cultius i a un d'ells s'hi afegixen 10 μ l de IPTG 1 M.
- iv. Es mantenen tots dos cultius 3 hores en agitació a 37°C.
- v. Se centrifuga 9 ml dels diferents cultius a 8.000 rpm durant 10 min a 4°C.
- vi. Se'n descarta el sobrenedant i es congelen els pellets a -20°C.
- vii. Se centrifuga 1 ml dels diferents cultius a 12.000 rpm durant 3 min.
- viii. S'extrauen les proteïnes totals del pellet d'1 ml, ressuspenen en 90 μ l d'aigua milli Q i 5 μ l de tampó de càrrega de proteïnes 4 x, per diversos tractaments de congelació (-80°C) /descongelació (95°C) i per l'efecte de l'SDS del tampó de càrrega de proteïnes.

- ix. L'extracte obtingut es visualitza en un gel d'electroforesi de proteïnes (apartat 2.7.2.) per saber si la proteïna s'ha sobreexpressat i en quin clon.

Una vegada s'ha comprovat que la proteïna es pot sobreexpressar quan es tracta amb IPTG, es fa una sobreexpressió a gran escala del clon adequat, utilitzant 1 L de medi LB líquid, i seguint el protocol anterior, mantenint les proporcions i les condicions per purificar la proteïna desitjada.

c) Purificació de proteïnes

La purificació de proteïnes es va fer amb el kit *Talon™ Metal Affinity Resin* (Clontech) seguint les instruccions del fabricant. Aquesta tècnica es basa en la interacció reversible entre la cua d'histidines inserida a la proteïna clonada en el vector pET15b i l'ió Co^{+2} immobilitzat en la resina *Talon™*. La proteïna purificada s'elueix mitjançant columnes de flux gravitatori amb una lleugera disminució del pH.

- i. Es neteja la resina *Talon™* afegint 750 μl de resina a un tub eppendorf, per obtenir 500 μl de resina (*beds*).
- ii. Se centrifuga a 12.000 rpm durant 2 min per pelletejar la resina.
- iii. Se n'elimina el sobrenedant.
- iv. S'afegeix 10 vegades el volum de *beds* d'*Extraction/Wash buffer* i es barreja.
- v. Se centrifuga a 12.000 rpm durant 2 min.
- vi. Se n'elimina el sobrenedant.
- vii. Es repeteix des del pas iv per netejar la resina *Talon™* i es tampona al pH adient.
- viii. Se centrifuga 1 L de cultiu sobreexpressat, i es reparteix en 4 tubs, a 8.000 rpm durant 10 min.
- ix. Se n'elimina el sobrenedant.
- x. Es ressuspenen les cèl·lules de cada pellet en 6 ml d'*Extraction buffer* + inhibidors de proteïnases.
- xi. Se soniquen els quatre tubs fins a obtenir la lisi cel·lular.
- xii. Se centrifuga a 8.000 rpm durant 10 min a 4 °C.

- xiii. Se'n recupera el sobrenedant i s'afegeixen 500 µl de resina *Talon™* neta.
- xiv. Es deixa la barreja en agitació suau a 4°C durant tota la nit.
- xv. Es compacta la resina unida a la proteïna en una columna de flux gravitatori a 4°C.
- xvi. Es neteja la resina de la columna amb 15 ml d'*Extraction/Wash buffer*.
- xvii. S'elueix la proteïna amb 500 µl d'*Elution buffer*, i es recull el tampó amb la proteïna eluïda en diferents alíquotes.
- xviii. Es carreguen les diferents fraccions de l'elució en un gel SDS-PAGE per poder determinar el grau de purificació.

2.7.2. Gels d'electroforesis de proteïnes SDS-PAGE

Es van fer minigels desnaturalizants d' SDS-poliacrilamida (15% d'acrilamida), (Sambrook *et al.*, 1989). L'aparell d'electroforesi utilitzat és l'*Hoefler MINIVE Complete (Vertical electrophoresis system)* i els vidres, suports, pintes, etc., són d'Amersham Pharmacia, utilitzant com a font d'electroforesi el model APELEX ST304 (*Electrophoresis power supply*).

Primerament es prepara el gel d'acrilamida i les mostres que s'han de carregar:

- i. Es neteja l'aparell d'electroforesi.
- ii. Es munten correctament els vidres amb els espaiadors en el suport on es farà el gel.
- iii. Es polimeritza la part inferior (gel separador) del gel de proteïnes.

Barreja del gel separador 15% (volum final 15 ml):

- 7,5 ml de 30% *Acrylamide/Bis solution* 37.5:1 (Biorad)
 - 3,75 ml de tampó separador 4 x
 - 50 µl d'APS (*Ammonium persulphate*) 10% (AMRESCO)
 - 10 µl de temed (AMRESCO)
 - 3,75 ml d'aigua milli Q
- iv. Es transfereix la barreja del gel separador al suport del vidre fins a arribar a omplir-lo aproximadament $\frac{3}{4}$ parts de la longitud dels vidres.

- v. Es posen algunes gotes d'SDS a l'1% en la superfície del gel per definir nítidament el límit de la superfície del gel, i es deixa polimeritzar durant 30 min aproximadament.
- vi. Se n'eliminen les gotes d'SDS.
- vii. Es polimeritza el gel compressor.
Barreja del gel compressor (volum final 6 ml):
 - 0,78 ml de 30% *Acrylamide/Bis solution 37.5:1* (Biorad)
 - 1,5 ml de tampó compressor 4 x
 - 30 µl d'APS (*Ammonium persulphate*) 10% (AMRESCO)
 - 6 µl de temed (AMRESCO)
 - 3.66 ml d'aigua milli Q
- viii. Es posa la pinta dels pous a la part superior.
- ix. Es deixa polimeritzant durant 30 min.
- x. Es preparen les mostres de proteïnes que s'han de carregar i els marcadors de pes molecular (*SDS-PAGE Molecular Weight Standard Low Range* BIO-RAD) (0,5 µl/10 µl). Les mostres es carreguen utilitzant el tampó de càrrega de proteïnes (transportador Laemmli 4 ×) i es preparen segons el volum de mostra que s'ha de carregar. Generalment, el volum de càrrega és de 15 a 20 µl.
- xi. Es desnaturalitzen les mostres a 95°C durant 5 min.
- xii. Es col·loca el suport a la cubeta d'electroforesi, i s'hi afegeix el tampó d'electroforesi TGS 1 x.
- xiii. L'electroforesi es fa a 20 mA i 200 V per un gel.
- xiv. Una vegada ha finalitzat l'electroforesi, es treu el suport de la cubeta, i es treu el gel del suport acuradament.
- xv. Es col·loca el gel en la solució de comassie de tinció de proteïnes en agitació lenta durant 10 min.
- xvi. S'elimina la solució de tinció i es destenyeix el gel amb solució d'àcid acètic glacial 10%, canviant-la quan estigui blavosa.
- xvii. Una vegada destenyit el gel se n'elimina l'àcid acètic i s'hi afegeix aigua destil·lada.

El marcador de pes molecular *SDS-PAGE Molecular Weight Standard, Low Range* BIO-RAD permet veure les bandes següents:

Proteïnes	Pes molecular (Da)
Fosforilasa b	97.400
Albúmina del sèrum	66.200
Ovoalbúmina	45.000
Anhidrasa carbònica	31.000
Inhibidor de tripsina	21.500
Lisozim	14.400

Solucions

IPTG 1M

- A 10 ml d'aigua milli Q s'hi afegeix 2,38 g IPTG (isopropil β -D-tiogalotopiranòsid) (Roche Diagnostics SL).
- Es barreja fins a aconseguir a una total dissolució i s'esterilitza per filtració.

Tampó de càrrega de proteïnes (Tampó transportador Laemmli 4 x)

- Es prepara la barreja següent:
 - 25 ml de tampó compressor 4 x
 - 20 ml de glicerol (Scharlau)
 - 4 g de SDS (Merck)
 - 0.2 g de blau de bromofenol (Panreac)
- S'arrasa fins a 50 ml amb aigua milli Q.
- Es fan alíquotes de 900 μ l i es conserven a 4°C.
- En el moment d'utilització, s'afegeixen 36 μ l de 2-mercaptoetanol (Merck) i 64 μ l de la solució DTT (6,25 M) (9,64 g/10 ml aigua milli Q) (Roche Diagnostics SL).

Tampó de Sonicació

- Es dilueix el tampó *Extraction buffer* del kit *Talon™* a 1 x amb aigua milli Q.
- S'afegeix, en el moment del seu ús, un comprimit *Complete®Mini, protease inhibitor cocktail* (Roche Diagnostics S.L.) per cada 10 ml de tampó.

Tampó separador 4 x

- A 300 ml d'aigua milli Q s'hi afegeix 91 g de tris Base (SIGMA).
- Es barreja fins que es dissolgui completament i s'ajusta el pH a 8,8 amb HCl 37% (Panreac).
- S'arrasa a 500 ml amb aigua milli Q.
- S'esterilitza per filtració.
- S'hi afegeixen 2 g de SDS (Merck).
- Es barreja i es conserva a 4°C.

Tampó compressor 4 x

- A 40 ml d'aigua milli Q s'hi afegeix 6.05 g tris Base (SIGMA).
- Es barreja fins que es dissolgui completament i s'ajusta el pH a 6,8 amb HCl 37% (Panreac).
- S'arrasa fins a un volum final de 100 ml amb aigua milli Q.
- S'esterilitza per filtració.
- S'hi afegeixen 0,4 g d' SDS (Merck).
- Es barreja i es conserva a 4°C.

Tampó d'electroforesi TGS 1 x

- Es dilueix 1:10 el tampó TGS 10 x (tris glicina SDS, pH 8,3 de BIO-RAD) amb aigua milli Q.

Solució de tinció

- A 180 ml d'aigua milli Q s'hi afegeix:
 - 0,5 g de *Comassie Brilliant Blue* (BIO-RAD)
 - 50 ml d'àcid acètic glacial (Panreac)
 - 250 ml de metanol (Panreac)

- Es barregen els components i s'arrasa a un volum final de 500 ml amb aigua milli Q.

Solució àcid acètic glacial 10% (solució per destenyir)

- A 450 ml d'aigua milli Q s'hi afegeix 50 ml d'àcid acètic glacial (Panreac).
- Es barreja fins a obtenir una solució completament homogènia.

2.7.3. Assaig de mobilitat electroforètica (EMSA)

L'assaig de mobilitat electroforètica (*Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA)) en gels de poliacrilamida (PAGE) és un mètode ràpid, simple i extremament sensible per detectar la unió de les proteïnes a unes seqüències específiques de DNA. Permet determinar l'afinitat, la quantitat i l'especificitat de la unió entre la proteïna i el DNA.

El protocol es divideix en diferents fases, que inclouen: la preparació dels fragments de DNA, la preparació de la barreja de la proteïna amb el DNA marcat, la preparació del gel d'acrilamida, l'electroforesi, la transferència i, finalment, el revelat, on es veurà la unió.

El protocol que s'utilitza és el descrit en el *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, 1995), amb algunes modificacions.

a) Marcatge de fragments de DNA

- i. S'amplifica per PCR el fragment de DNA utilitzat en l'estudi de mobilitat, prèviament clonat en el vector pGEMT i seqüenciat, utilitzant un dels oligonucleòtids marcat amb digoxigenina.
- ii. Es realitza una electroforesi del producte de la PCR en un gel d'agarosa.
- iii. Es recupera la banda de DNA utilitzant el mètode que utilitza les columnes *Wizard* (Promega).
- iv. Es quantifica el fragment de DNA marcat utilitzant l'espectrofotòmetre.

b) Reacció d'unió proteïna-DNA

i. Es preparen les barreges d'unió:

Les barreges d'unió de la proteïna al fragment de DNA es fan a 4°C, i contenen els components següents:

- 12 µl d'aigua milli Q
- 1 µl del fragment de DNA marcat (20 ng/µl)
- 4 µl del tampó d'unió
- 2 µl de DNA inespecífic (Herring Testes Carrier DNA (10 mg/ml) (Beckton & Dickinson)
- 1 µl de proteïna

Quan es fan assaigs amb competidors s'afegeix a la barreja els diferents fragments específics o inespecífics a una concentració 300 vegades superior a la del DNA marcat, mantenint les proporcions dels altres components i el volum final de 20 µl.

ii. Es fa un pols de centrifuga.

iii. S'incuba els tubs a 30°C durant 30 min. A aquesta temperatura disminueix l'acció de les DNases i proteases, i és suficient per a la unió proteïna-DNA.

c) Preparació del gel de poliacrilamida i electroforesi

Els gels de poliacrilamida utilitzats en els EMSA es van fer utilitzant vidres, suports, espaiadors, pintes i cubetes d'electroforesi BIO-RAD. La font d'electroforesi és de *GROC Instruments G-201* i la concentració de poliacrilamida a la qual es va treballar va ser del 6%.

i. Es neteja l'aparell d'electroforesi.

ii. Es col·loquen correctament els vidres i els espaiadors al suport.

iii. Es prepara el gel de poliacrilamida al 6%:

- 3 ml de 30% *Acrylamide/Bis solution 37.5:1* (BIO-RAD)
- 3 ml de tampó glicina 5 x
- 9 ml d'aigua milli Q
- 69 µl (o doble) d'APS (*Ammonium persulphate*) 10% (AMRESCO)

- 19 μ l (o doble) de temed (AMRESCO)
- iv. Es transfereix la barreja del gel al suport de vidre i es col·loca la pinta a la part superior.
 - v. Es deixa que polimeritzi durant 30 min.
 - vi. Es col·loca el suport amb el gel fet a l'aparell d'electroforesi.
 - vii. S'afegeix a la cubeta el tampó glicina 1 x.
 - viii. Es fa una pre-carrera per estabilitzar l'amperatge de la font, connectant la font a 150 V durant 15 min sense carregar cap mostra.
 - ix. Es carreguen les barreges d'unió..
 - x. Es fa córrer el gel a una potència molt baixa, a 10 mA, fins que les mostres han sortit dels pous durant 10 min aproximadament.
 - xi. S'incrementa el voltatge fins a 100 V, sense que l'amperatge superi els 20 mA.
 - xii. Una vegada realitzada l'electroforesi, es treu el suport i es prepara el gel per a la transferència.

d) Transferència

Per poder fer el revelat i la detecció es van transferir les bandes del DNA marcat corregudes en el gel d'electroforesi a una membrana de biodina (Pall).

El procediment de transferència és el següent:

- i. Es retalla una membrana de biodina carregada positivament (*Biodyne[®]B Membrane*, 0.45 μ m de PALL Gelman Laboratories) de manera que tingui la mateixa grandària del gel.
- ii. Es treu un dels vidres del suport del gel, de manera que quedi exposada tota la superfície del gel.
- iii. Es col·loca la membrana sobre el gel d'acrilamida, evitant la formació de bombolles d'aire entre la membrana i el gel. La membrana ha de contactar perfectament amb tota la superfície del gel.
- iv. Es col·loquen tres trossos de paper 3MM de la mateixa grandària que el gel sobre la membrana.
- v. Es col·loca el vidre que s'havia enretirat anteriorment, i es posa un pes damunt perquè es pugui produir la transferència del DNA des del gel a la membrana per capil·laritat.

- vi. Passats 30 min, se n'extreu la membrana acuradament, i es fixa el DNA utilitzant l'equip *UV Stratalinker 2400* (Stratagene).
- vii. Es pot conservar la membrana a 4°C si el revelat és posterior.

e) Revelat i detecció

Els fragments de DNA marcats amb digoxigenina es detecten amb una reacció colorimètrica, utilitzant els reactius del kit *DIG DNA Labeling and Detection kit Nonradiactive* (Roche Diagnostics S. L.) i seguint el protocol descrit pel fabricant.

- i. Es bloqueja la membrana amb tampó 2, durant 30-60 min a agitació lenta.
- ii. Es prepara la solució d'anticòs, diluint l'anticòs (*Antidigoxigenina-AP Fab Fragment*) 1:5.000 (2 µl d'anticòs/ 10 ml de tampó 2)
- iii. S'elimina el tampó 2 i s'afegeix la solució d'anticòs. Mantenir en agitació lenta la membrana durant 30 min.
- iv. S'elimina la solució d'anticòs i es fan tres rentats de 10 min amb tampó 1 a agitació ràpida, per eliminar l'anticòs no unit.
- v. S'elimina el Tampó 1 i s'equilibra el pH de la membrana amb el tampó 3 durant 5 min a agitació ràpida.
- vi. S'elimina el tampó 3 i es cobreix la membrana amb solució colorimètrica.
- vii. Es manté a la foscor sense agitació fins que es visualitzin les bandes.
- viii. Rentar la membrana amb aigua destil·lada per aturar la reacció.
- ix. S'asseca la membrana i es desa.

Solucions

Tampó d'unió

- Cal afegir per 100 ml de tampó els components següents:
 - 30 ml d'aigua milli Q
 - 10 ml d'HEPES 1 M (4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etan-sulfonàcid
 - 238,3 g/l aigua milli Q) (Roche Diagnostics SL)
 - 10 ml de solució tris HCl 1 M pH 7,4 (AppliChem)

- 25 ml de glicerol (Scharlau)
- 25 ml de solució KCl 1 M (74,56 g/l aigua milli Q) (Panreac)
- 0.2 ml Solució EDTA 0.5 M pH 8 (18,6125 g/100 ml) (SIGMA)
- S'ajusta el pH a 7,5 i es conserva a 4°C.
- En el moment en què s'utilitzi, cal afegir per cada 500 µl de tampó els components següents:
 - 1 µl de DTT 0.5 M (1,4 *Dithiothreitol* 0,0765g/ml) (Roche Diagnostics SL)
 - 4,16 µl BSA (6 mg/ml) (*Bovine Serum Albumine*) (SIGMA)

Tampó glicina 5 x

- A 500 ml d'aigua milli Q s'hi afegeixen:
 - 192.7 g de glicina (Roche Diagnostics S.L.)
 - 30.28 g de tris Base (SIGMA)
 - 3.92 g d'EDTA (SIGMA)
- Es dissolen tots els components i s'ajusta a pH 8,5.
- S'arrasa a un volum final d'1 L amb aigua milli Q.
- La solució de treball és 1 x.

Tampó 1

- A 1.500 ml d'aigua milli Q s'hi afegeixen:
 - 17,5 g de NaCl (Panreac)
 - 23,2 g d'àcid malèic (Merk)
 - 16,0 g de NaOH (Panreac)
- Es barreja fins a dissoldre completament i s'ajusta a pH 7,5.
- S'arrasa fins a 2 L amb aigua milli Q.
- S'esterilitza a l'autoclau (121°C 15 min).

Tampó 2

- A 100 ml de Tampó 1 s'hi afegeix 1 g d'agent bloquejant (llet en pols Nestlé).
- S'ha de dissoldre totalment.

Tampó 3

- A 1.500 ml d'aigua milli Q s'hi afegeixen:
 - 11,68 g de NaCl (Panreac)
 - 1,60 g de trizma HCl (SIGMA)
 - 20 g de MgCl₂·6H₂O (Merck)
 - 23,16 g de tris-Base (SIGMA)
- S'ha de dissoldre totalment tots els components i ajustar-ho a pH 9,5.
- S'arrasa fins a 2 L amb aigua milli Q.

Solució colorimètrica

- A 10 ml de tampó 3 s'hi afegeixen:
 - 45 µl de solució NBT
 - 35 µl de solució BCIP (5-brom-4-clor-3-indolfosofat)
- Aquesta solució es prepara just al moment d'utilitzar-la, i només la quantitat necessària, ja que és fotosensible.

NBT

- Per preparar 1 ml de solució cal afegir a un tub eppendorf:
 - 75 mg d'NBT (*4-nitroblue tetrazolium chloride crystals*) (Roche Diagnostics S.L.)
 - 700 µl d'N, N dimetilformamida (Panreac)
 - 300 µl d'aigua milli Q
- Es barreja per agitació al vòrtex i conservar a -20 °C.

BCIP

- Per preparar 1 ml de solució cal afegir a un tub eppendorf:
 - 50 mg de BCIP (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate 4-toluidine salt powder*) (Roche Diagnostics S.L.)
 - 1 ml d'N, N-dimetilformamida (Panreac)
- Barrejar per agitació al vòrtex i conservar a -20 °C.

3. Resultats

3. Resultats

3.1. *Pseudomonas putida* KT2440

En el present treball es vol estudiar la resposta de *Pseudomonas putida* en front de danys en el DNA, i més concretament, el seu sistema SOS. L'estudi d'aquest microorganisme és especialment interessant ja que la soca *P. putida* KT2440 ha estat acceptada com a soca segura pel Comité Assesor del DNA Recombinant, fet que fa que sigui molt utilitzada en experimentació i biorremediació (Wackett, 2003; Pieper *et al.*, 2004).

P. putida és un bacteri gramnegatiu en forma de bacil, amb flagelació polar. És un quimioorganotròfic aerobi, amb un metabolisme principalment respiratori (Garrity, 2005). El podem trobar al sòl o a l'aigua, a on juga un paper molt important en la descomposició, biodegradació, i també en els cicles del carboni i del nitrogen. També es pot trobar associat a plantes. Presenta un metabolisme molt versàtil i s'utilitza en processos de bioremediació gràcies a la seva habilitat de degradar solvents orgànics generats en múltiples processos de la indústria química i que són molt contaminants pel medi ambient (Timmis, 2002). La majoria de les vies degradatives estan codificades en un plasmidi anomenat TOL (Marques *et al.*, 1993). És especialment útil la seva capacitat de degradar hidrocarburs aromàtics, fet pel qual la indústria petrolera n'investiga el seu ús en la neteja de zones contaminades per petroli. Alguns dels compostos que pot degradar són: naftalè, toluè, TNT, etc. Recentment s'ha descrit la capacitat que té *P. putida* de convertir l'escuma de poliestirè (un producte que fins ara no es podia reciclar) en PHA, un plàstic biodegradable (Ward *et al.*, 2006). A més també s'ha fet servir com a biocontrol de plagues contra patògens de plantes com *Pythium* i *Fusarium* (Amer *et al.*, 2000; Validov *et al.*, 2007).

El gènere *Pseudomonas* és un grup taxonòmic extens, pertanyent al grup dels proteobacteris Gamma, i els seus membres posseeixen gran diversitat metabòlica, fisiològica i genètica. *P. putida* no és un bacteri patògen, però altres *Pseudomonas*, com *Pseudomonas aeruginosa*, causen infeccions oportunistes nosocomials (Fick, 1993). També n'hi ha que són patògens de

plantes com ara *Pseudomonas syringae*. Recentment s'han seqüenciat diversos membres d'aquest gènere, fet que permet un millor coneixement d'aquestes espècies bacterianes (Stover *et al.*, 2000; Nelson *et al.*, 2002; Joardar *et al.*, 2005).

La seqüenciació del genoma de *P. putida* KT2440 ha permès veure que aquesta espècie, tot i ser força semblant a *P. aeruginosa*, no conté els gens de virulència (Nelson *et al.*, 2002); fet que confirma de nou que és una soca adequada per treballar-hi de forma segura.

3.2. *P. putida* posseeix dos gens *lexA*

Una característica interessant descoberta en la seqüenciació del genoma de *P. putida*, fou la presència de dues còpies del gen *lexA* anomenades *lexA1* (PP2143) i *lexA2* (PP3116). Analitzant les seqüències d'ambdues proteïnes, i comparant-les amb la proteïna LexA d'*E. coli*, vam poder veure que l'homologia entre elles era força gran, conservant-se els residus relacionats amb l'autohidròlisi: Ala i Gly, en la regió connectora de la molècula; i Ser i Lys en l'extrem C-terminal (Figura 3.1).

Tal i com succeeix en la majoria de proteïnes LexA, el domini més conservat era el que es trobava en l'extrem C-terminal. A més, els dos LexA de *P. putida* tenien una inserció de quatre aminoàcids en la posició 70, comparant-los amb el LexA d'*E. coli*. Això fa que les posicions dels aminoàcids responsables de l'autohidròlisi siguin: Ala₈₈-Gly₈₉ i Ser₁₂₃-Lys₁₆₀.

A partir de la comparació de les tres proteïnes poguérem veure com el LexA1 era el més semblant al LexA d'*E. coli*. De fet, els aminoàcids de l'extrem N-terminal, relacionats amb la unió a la caixa SOS, són idèntics als d'*E. coli* (Figura 3.1). No va ser així, però, en el cas del LexA2. Això va fer pensar per tant, que aquest LexA2 reconeixia un motiu diferent al descrit pels bacteris del grup Gamma.

```

PP1 MLKLTFRQAEILAFIKRCLEDNGFPPTRAEIAQELGFKSPNAAEEHLKALARKGAIEMTP 60
Ec  MKALTARQQEVFDLIRDHISQTGMPPTRAEIAQRLGFRSPNAAAEEHLKALARKGVIEIVS 60
PP2 MDTLTPKRRRAIFEFIRERIAEHGQPPSLADIATRFGFASRSVARKHITALCQAGYIDVTP 60
*  **.: : :*: : : * **: :** .:** * ..*.:*:*.*.: * *::..

PP1 GASRGIRIPGLEAKAEFEAGLP IIGRVAAGAPILAEQHIEQSCNINPAFFHPQADYLLRVH 120
Ec  GASRGIRLL----QEEEEGLPLVGRVAAGEPLLAQQHIEGHYQVDPSLFKPNADFLLRVS 116
PP2 NQARGIRLAEPLRRPEILEIPVLGQVAAGAPIGPDLGIHEQLLLDPSLFRRTPDYLLKVR 120
.  :****: : * :*:*:**** *: .: * . :*:*: : .*:*:*

PP1 GMSMKDVGIFDGDLLAVHTCREARNGQIVVARIGDEVTVKRFKREGSKVWLLAENPEFAP 180
Ec  GMSMKDIGIMDGDLLAVHKTQDVRNGQVVVARIDDEVTVKRLKKQGNKVELLPENSEFKP 176
PP2 GDSMIDDGIFDGDVLVGILQQADARDGQIVVARLDGEVTIKRLQRQGGTYRLLPRNPAYAP 180
*  ** * **:****: .: :*:*:****: .:****:****: :*.. **..* . : *

PP1 IEVDLKEQELVIEGLSVGVIRR---- 202
Ec  IVVDLRQQSFTIEGLAVGVIRNGDWL 202
PP2 IDVQP-EQDFFIEGVFCGLLRD--- 202
*  *: :*.: ***: *::*.

```

Figura 3.1. Alineament de la seqüència de les proteïnes LexA1 (PP1) i LexA2 (PP2) de *P. putida* amb el LexA d'*E. coli* (Ec). Ombrejats en gris hi ha els aminoàcids implicats en l'autohidròlisi. En negreta els residus implicats en el reconeixement de la caixa SOS del LexA d'*E. coli*. Per fer l'alineament s'ha utilitzat el programa ClustalW del servidor EBI (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>).

3.2.1. Clonació dels gens *lexA1* i *lexA2*

Per comprovar quina era la seqüència de DNA que reconeixia cada un d'aquests LexA, es va procedir al clonatge d'ambdós gens utilitzant els oligonucleòtids NdelexA1, BamlexA1 i NdelexA2, BamlexA2 respectivament. Fent una PCR amb aquests oligonucleòtids s'obtingué una banda que corresponia a la regió codificant (ORF) de cada *lexA*. Les bandes es clonaren al vector pGEM-T (Promega) i foren seqüenciades utilitzant els oligonucleòtids Direct-Cy5 i Reverse-Cy5 (Sanger *et al.*, 1977). Un cop comprovat que la seqüència era la mateixa que l'obtinguda del banc de dades (TIGR), es recuperaren ambdues bandes utilitzant els enzims de restricció *NdeI* i *BamHI*. Les bandes obtingudes per restricció foren lligades al vector de sobreexpressió pET15b (Novagene). El triplet d'origen de traducció (ATG) formava part de la diana *NdeI* dels oligonucleòtids NdelexA1 i NdelexA2 respectivament. Així

l'expressió de l'insert clonat quedà controlada per un promotor fort induïble per IPTG (Ptac) i a més, el marc de lectura quedà en fase amb una seqüència que codifica per 6 histidines. S'obtingueren d'aquesta manera els vectors pUA1071 i pUA1072, que foren de nou seqüenciats per assegurar-se que no havien incorporat cap mutació.

Els plasmidis de sobreexpressió van ser transformats a *E. coli* AR23. Aquesta soca és una *E. coli* BL21 (DE3) *lexA*(Def), i s'utilitzà en aquest cas, perquè no hi pogués haver restes del LexA d'*E. coli* en la proteïna recombinant. Els cultius inoculats amb les soques portadores de cada un dels plasmidis es van fer créixer a 37°C fins a una densitat òptica (DO₅₅₀) de 0,6. En aquest punt s'afegí IPTG al medi per tal d'activar la sobreexpressió de la proteïna recombinant que quedà fusionada en el seu extrem N-terminal amb una cua d'His. Gràcies a la cua d'His es van poder purificar les dues proteïnes LexA, ja que en una matriu de cobalt la cua d'His és retinguda i així es pot separar la proteïna d'interès de la resta de proteïnes de l'extracte cel·lular d'*E. coli*. Per eluir la proteïna retinguda s'utilitzà una solució amb imidazol. Les proteïnes així purificades foren visualitzades en un gel de SDS-PAGE al 15% tenyit amb una solució de Comasie (Figura 3.2).

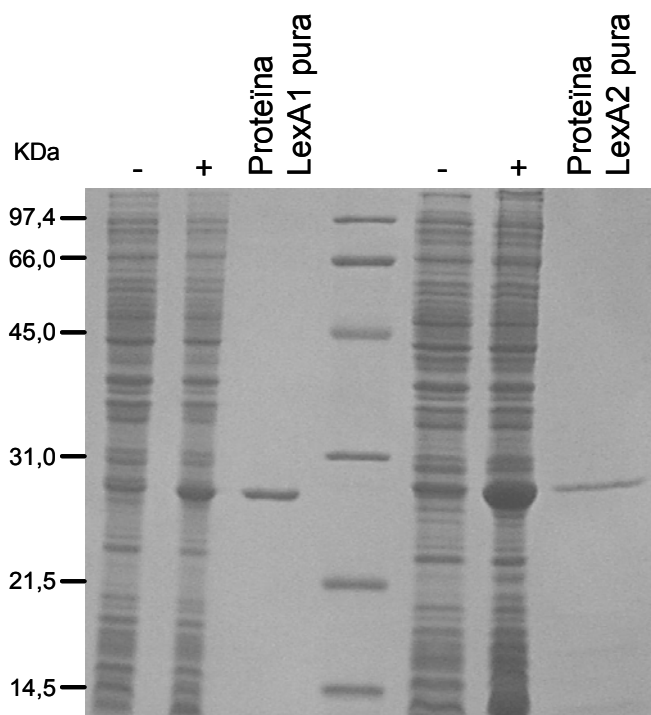


Figura 3.2. Sobreexpressió de les proteïnes LexA1 i LexA2 de *P. putida*. Gel SDS-PAGE al 15% on es poden veure les mostres de l'extracte de la soca AR23 en absència (-) o presència (+) d'IPTG, i la proteïna LexA purificada mitjançant una columna d'afinitat amb Co²⁺. A l'esquerra es mostren les masses moleculars del marcador.

3.2.2. Identificació de la caixa d'unió al DNA de les proteïnes LexA1 i LexA2

Paral·lelament, s'utilitzaren en una PCR els oligonucleòtids plexA1up, plexA1dw i plexA2up, plexA2dw i s'obtingueren dos fragments de 222 i 239 bases respectivament, del promotor d'ambdós gens. Les bandes corresponents a cada promotor es clonaren al vector pGEM-T obtenint-se així els plasmidis pUA1096 i pUA1097, que foren seqüenciats per comprovar que contenien la seqüència correcta. Aquests vectors s'utilitzaren com a motlle per obtenir, per mitjà d'una PCR, amb els oligonucleòtids ja mencionats, un fragment de cada promotor marcat amb digoxigenina. Això fou possible gràcies a la utilització dels oligonucleòtids plexA1dw-dig i plexA2dw-dig, en els que se'ls hi havia unit covalentment aquesta molècula. Amb aquests fragments es van realitzar assaigs de mobilitat electroforètica (EMSA) per comprovar si hi havia unió d'ambdues proteïnes al seu propi promotor (Figura 3.3).

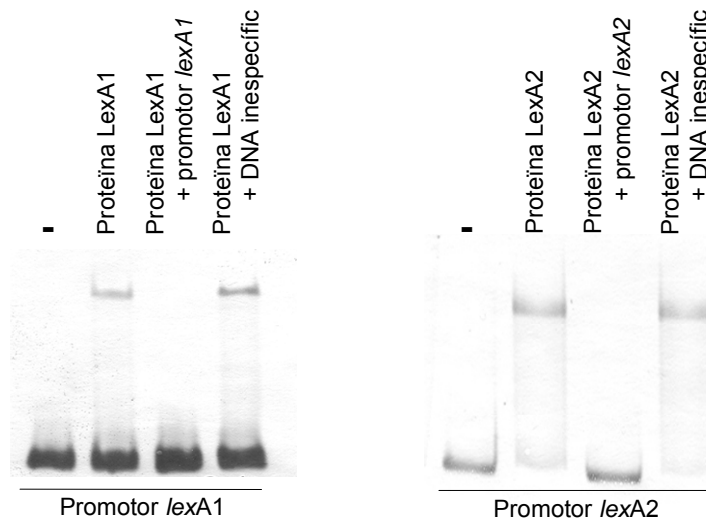


Figura 3.3. EMSA dels promotors dels gens *lexA1* o *lexA2* en presència de 80 ng de proteïna LexA1 o LexA2 purificades, excepte en el primer carril (-) en el que no s'hi ha afegit cap proteïna. Es pot observar l'efecte de l'addició d'un excés molar (300 vegades més) d'un competidor específic (promotor *lexA1* o *lexA2*) i d'un inespecífic (pGEM-T).

L'assaig d'EMSA va evidenciar que ambdues proteïnes eren capaces d'unir-se específicament al seu promotor. Això ho demostrà el fet que l'addició de pGEM-T en excés (300 vegades més que de DNA marcat), no modificava la banda de retard produïda per la unió de la proteïna. Així mateix, quan el DNA

competidor afegit era específic (el mateix fragment del propi promotor sense marcar amb digoxigenina) feia desaparèixer per complet la banda de retard electroforètic. Aquestes dues dades demostraren que la unió que hi havia entre les proteïnes LexA i el fragment de DNA era específica, i que per tant, la caixa SOS es trobava en la seqüència del promotor que s'havia utilitzat.

A continuació es va voler veure si la seqüència d'unió d'ambdues proteïnes era la mateixa. Així doncs, es va provar el promotor del *lexA2* amb la proteïna LexA1 i a la inversa (Figura 3.4). Tal i com podem veure en la Figura 3.4, cap de les dues proteïnes era capaç de reconèixer el promotor del gen que codificava l'altra. Com ja s'ha dit, la seqüència aminoacídica de la proteïna LexA1 era la que s'assemblava més al LexA d'*E. coli* i de fet, en el promotor del *lexA1* es van poder detectar dues seqüències palindròmiques que corresponien perfectament amb la caixa SOS descrita per *E. coli*: 5'-**CTGTATATAATTCCAG**-3' i 5'-**CTGTACAAAAGACAG**-3' (en negreta les bases importants per la unió). En canvi, en el promotor del gen *lexA2* no es van poder identificar aquestes seqüències. Això, es correlaciona perfectament amb el fet que aquesta proteïna conté aminoàcids diferents als del LexA1 en la zona de reconeixement del DNA (Figura 3.1).

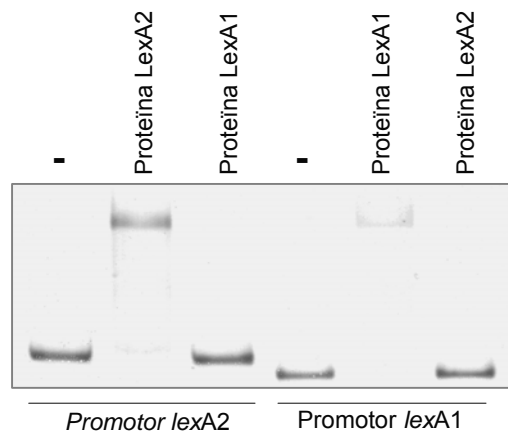
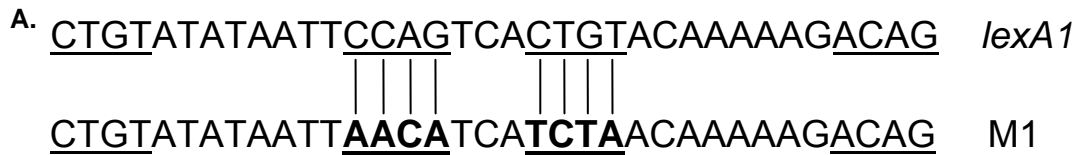


Figura 3.4. Efecte de l'addició de proteïna LexA1 o LexA2 sobre el retard electroforètic dels promotors dels gens *lexA2* i *lexA1*. Els carrils marcats amb un (-) no contenen proteïna.

Per tal de confirmar que la proteïna LexA1 reconeixia les dues seqüències 5'-**CTGTATATAATTCCAG**-3' i 5'-**CTGTACAAAAGACAG**-3' vam obtenir diversos fragments d'aquest promotor que contenien mutacions en

aquesta regió. Aquests fragments els obtindrem per PCR utilitzant els oligonucleòtids Mut1LexA1 i Mut2LexA1, que incorporaven les mutacions en la seva seqüència, en combinació amb l'oligonucleòtid plexA1dw-dig. Els resultats ens confirmaren que, efectivament, aquesta era la regió del promotor que era reconeguda per la proteïna LexA1, ja que les mutacions abolien per complet la unió DNA-proteïna (Figura 3.5).



B.

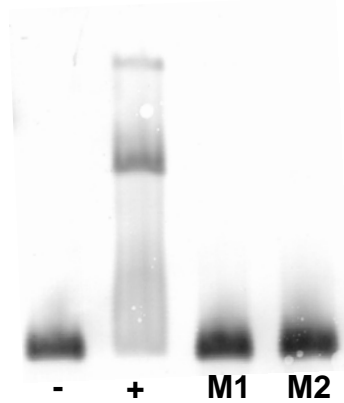


Figura 3.5. A. Seqüència del promotor *lexA1* salvatge i mutant (M1). B. Mobilitat electroforètica dels fragments mutants del promotor del *lexA1*. M1 té el canvi CCAGT per AACA i CTGT per TCTA ; M2 afegeix 3 nucleòtids (GGG) al mig de cada seqüència palindròmica. També es mostra la mobilitat electroforètica del promotor salvatge sense mutacions (+) i sense afegir-li proteïna (-).

A continuació, per tal d'ubicar la seqüència de DNA que era reconeguda per la proteïna LexA2, es van construir diferents fragments del promotor *lexA2* anomenats *lexA2.1*, *lexA2.2*, *lexA2.3* i *lexA2.4* (Figura 3.6A). Aquests fragments s'obtingueren per PCR utilitzant l'oligonucleòtid plexA2dw-dig (marcat amb digoxigenina) i els oligonucleòtids -140*lexA2*, -70*lexA2*, -26*lexA2* i -14*lexA2*, obtenint-se així fragments de 212, 142, 98 i 86 pb, respectivament (Figura 3.6A). Els assaigs de mobilitat electroforètica duts a terme amb aquests fragments ubicaren la regió de reconeixement de la proteïna LexA2 entre les posicions -26 i -14 respecte l'origen de traducció (Figura 3.6B). Analitzant detalladament aquesta seqüència es va trobar un palíndrom imperfecte (5'-GTACAAATGTGC-3') que podia ser la seqüència reconeguda per la proteïna LexA2. De nou, utilitzant els oligonucleòtids mut1*lexA2*, mut2*lexA2* i mut3*lexA2*, juntament amb l'oligonucleòtid plexA2dw-dig, es va obtenir, per PCR, tres fragments que contenien mutacions en aquesta seqüència. La primera mutació

canviava les quatre primeres bases del palíndrom per TGGT, la segona insertava tres nucleòtids (GGG) al mig de la caixa, i la tercera canviava la segona part del palíndrom per ACAA. Com era d'esperar la proteïna LexA2 no va produir bandes de retard sobre els fragments mutants (Figura 3.6C). D'aquesta manera establírem que la regió compresa per les bases 5'-GTAC-3' i 5'-GTGC-3' pertanyien a la seqüència d'unió de la proteïna LexA2.

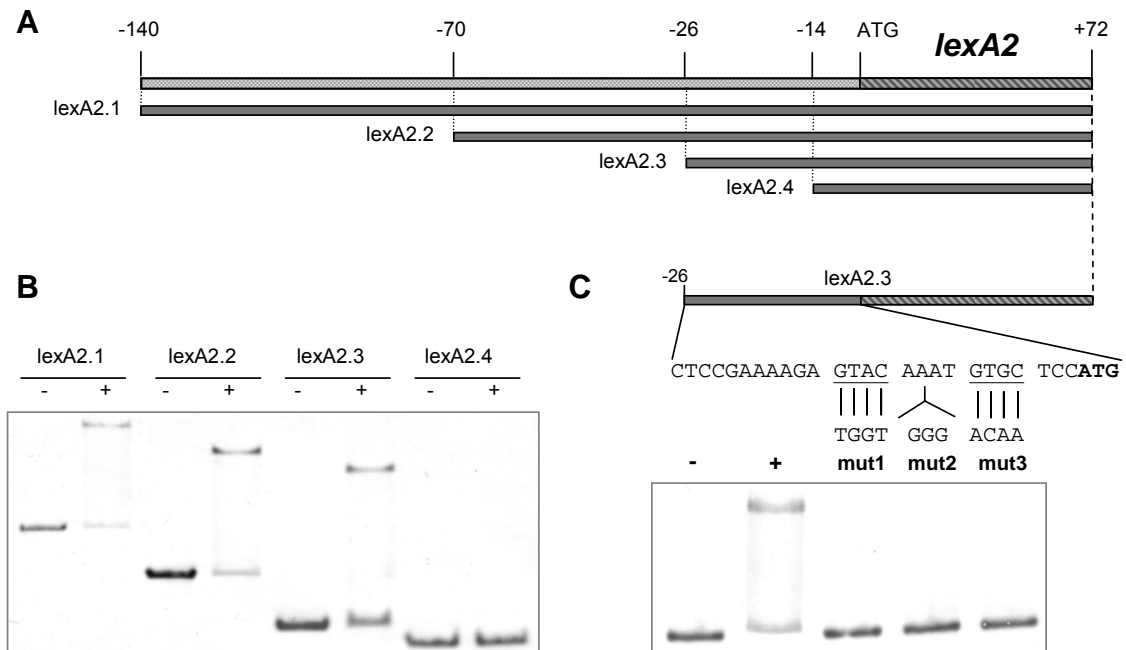


Figura 3.6. A. Esquema dels fragments lexA2.1, lexA2.2, lexA2.3 i lexA2.4, obtinguts per PCR del promotor del gen *lexA2*. B. EMSA amb els diferents fragments del promotor del gen *lexA2*, en absència (-) o presència (+) de proteïna LexA2. C. Efecte sobre la mobilitat electroforètica del fragment lexA2.3 que conté les mutacions GTAC→TGGT, GTGC→ACAA i la inserció de tres nucleòtids (GGG). Es mostra també la mobilitat del fragment lexA2.3 amb (+) i sense (-) proteïna LexA2.

Un cop es conegué la regió de DNA que era reconeguda específicament per la proteïna LexA2, es va estudiar la importància relativa de cada una de les bases de la seqüència implicades en la unió. Així, es construïren diversos fragments del promotor que contenien mutacions puntuals de la primera regió palindròmica del motiu d'unió. Els oligonucleòtids utilitzats per obtenir aquests fragments (en combinació amb plexA2dw-dig) van ser: Mut-17T, Mut-16C, Mut-15C, Mut-14G, Mut-13C, Mut-12A i Mut-11T. Els retards obtinguts amb aquests fragments (Figura 3.7) demostraren que el motiu GTAC era el principal implicat en la unió, tal i com pensàvem, però que a més també és important el nucleòtid

que es troba en la posició -16. Així la seqüència necessària per la unió inclou tot el motiu AGTAC, i per tant la caixa SOS reconeguda per la proteïna LexA2 és 5'-AGTACN₄GTGCT-3'.

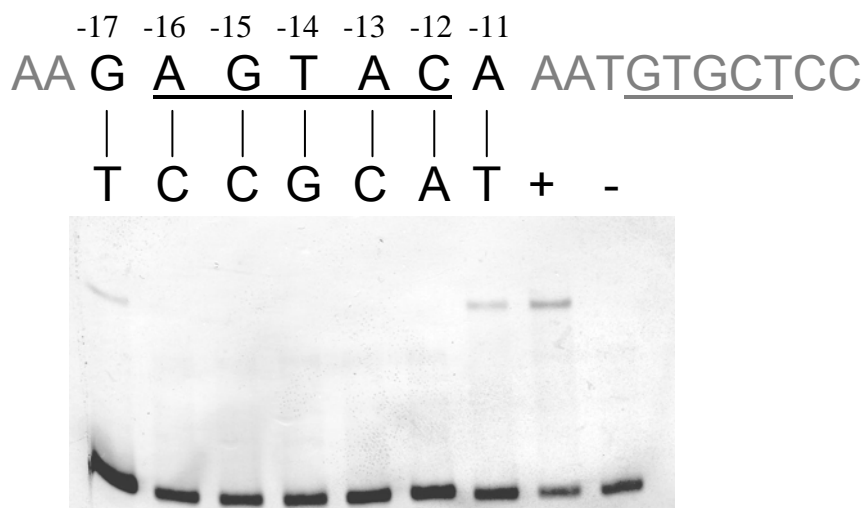


Figura 3.7. Efecte de diverses mutacions puntuals del motiu GAGTACA sobre la mobilitat electroforètica del fragment *lexA2.3*, en presència de 80 ng de proteïna LexA2. Es mostra també la mobilitat del fragment *lexA2.3* salvatge en absència (-) i presència (+) de la proteïna LexA2. S'ha subratllat les bases més importants pel reconeixement de la proteïna LexA2 i s'ha numerat les posicions de les bases mutades, respecte l'ATG del gen *lexA2*.

3.2.3. Anàlisi de la caixa reconeguda per la proteïna LexA2

La seqüència de DNA que reconeix la proteïna LexA2 és força semblant a la descrita pel LexA dels cianobacteris. Estudis de mutagènesi puntual duts a terme en el cianobacteri *Anabaena* sp. definiren que la caixa SOS reconeguda pel seu LexA correspon a la seqüència 5'-RGTACNNNDGTWCB-3' (Mazon *et al.*, 2004). Aquesta seqüència és gairebé igual a la caixa SOS del LexA2, i és per això que es va voler provar si la proteïna LexA d'*Anabaena* sp. era capaç de reconèixer el promotor del *lexA2* (Figura 3.8A). La proteïna LexA d'*Anabaena* sp. havia estat prèviament purificada, utilitzant el vector pUA1052, mitjançant el mateix sistema descrit anteriorment per les proteïnes LexA de *P. putida* (Mazon *et al.*, 2004). Els assaigs d'EMSA realitzats sobre el promotor del *lexA2* ens demostraren que el LexA d'*Anabaena* sp. produïa una banda de retard electroforètic sobre el fragment *lexA2.3* salvatge, però no era així quan aquest fragment contenia mutacions (Figura 3.8B). Això, permeté veure clarament que la seqüència que reconeixia el LexA d'*Anabaena* sp. era la

mateixa descrita pel LexA2 de *P. putida*. Aquest fet implicà que ambdues proteïnes semblaven estar relacionades. De totes maneres la similitud entre les seves seqüències està al voltant del 50%, fet que fa pensar que si tenen un origen comú, aquest és força antic.

Posteriorment es va utilitzar un fragment del promotor del *lexA* d'*Anabaena* sp. per provar si el LexA2 de *P. putida* era capaç de reconèixer-lo. Aquest promotor (posicions -56 a +94 respecte l'ATG) fou amplificat per PCR i marcat amb digoxigenina (Mazon *et al.*, 2004). Les dades demostren que la proteïna LexA2 de *P. putida* no fou capaç d'unir-se a aquest fragment, que si que era reconegut per la proteïna LexA d'*Anabaena* sp. (Figura 3.8C).

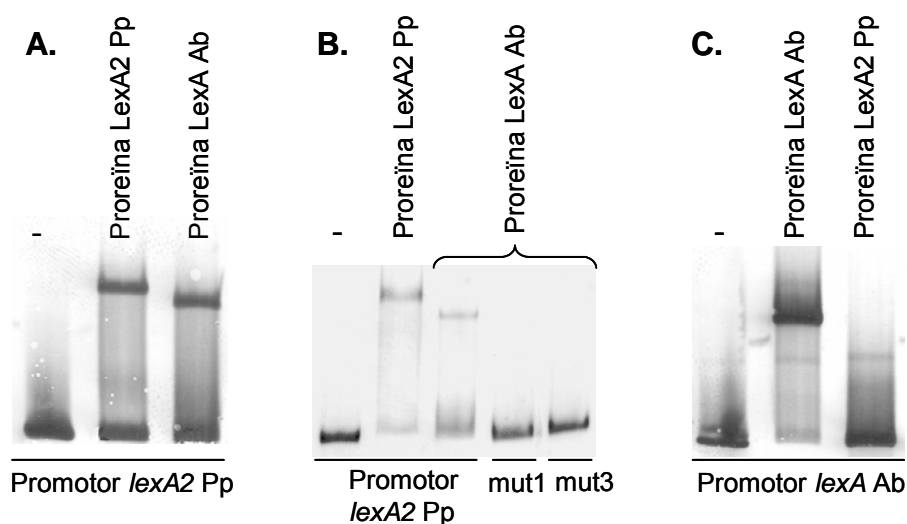


Figura 3.8. A. EMSA amb el fragment *lexA2.3* del promotor del *lexA2* de *P. putida* en presència de proteïna LexA2 de *P. putida* (Pp) i proteïna LexA d'*Anabaena* sp. (Ab). B. EMSA amb el fragment *lexA2.3* salvatge i mutant segons la Figura 3.6. C. EMSA amb un fragment del promotor del LexA d'*Anabaena* sp.. S'han utilitzat 80 ng de proteïna LexA2 de *P. putida* i 60 ng de proteïna LexA d'*Anabaena* sp..

Comparant la seqüència present en el promotor del *lexA* d'*Anabaena* sp. amb la del *lexA2*, poguérem veure que aquesta presentava quatre canvis respecte a la del promotor del *lexA2* (Figura 3.9). Un d'aquests canvis es troba en la regió palindròmica que és necessària pel reconeixement de la proteïna LexA2. Un altre dels canvis es troba en la regió central, i els altres dos són externs al palíndrom. Això, va fer pensar que la mutació que es trobava al mig de la segona part del palíndrom era la responsable que el LexA2 de *P. putida*

no fos capaç de reconèixer aquesta caixa. D'aquesta manera, es va utilitzar l'oligonucleòtid Mut13G per fer una PCR sobre el fragment del promotor del LexA d'*Anabaena* sp., per tal de canviar-li la seqüència, i fer-la més semblant a la del *lexA2*. Aquest oligonucleòtid canviava la seqüència GTTCT per GTGCT. De nou, aquest fragment no va ser reconegut per la proteïna LexA2 de *P. putida*. Aquest fet evidencià que, tot i que les bases més importants pel reconeixement eren les del palíndrom, també ho eren les del voltant. Probablement, això es deu a que es necessita un plegament especial del DNA per tal que hi hagi el reconeixement DNA-proteïna, que només es dona en la seqüència del promotor del *lexA2* de *P. putida*.

A.



B.

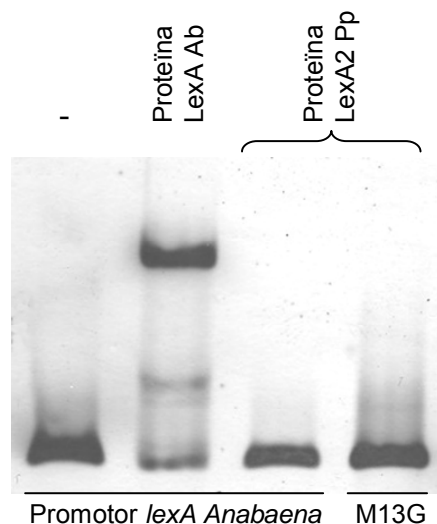


Figura 3.9. A. Esquema de les regions d'unió de les proteïnes LexA2 de *P. putida* (Pp) i LexA d'*Anabaena* sp. (Ab). Es mostren subratllades les bases més importants per la unió; i ombrejades en gris les bases que es conserven a *P. putida* i a *Anabaena* sp.. B. EMSA del promotor del *lexA* d'*Anabaena* sp. i del seu derivat M13G en presència de proteïna LexA d'*Anabaena* sp. i LexA2 de *P. putida*.

3.3. Organització gènica de l'entorn dels gens *lexA1* i *lexA2*

Analitzant els gens que es trobaven al voltant del gen *lexA1* es va detectar que just a continuació d'aquest es troba el gen *sulA* (Weinel *et al.*, 2002). Aquest gen és un homòleg del *sulA* d'*E. coli* i està relacionat amb la inhibició de la divisió cel·lular. Així aquest gen a *P. putida* sembla compartir la mateixa unitat transcripcional que el *lexA1*. Per la seva banda, el *lexA2* es troba seguit de tres gens que foren inicialment anotats com a *sulA2*, *dinP*, *dnaE* (Weinel *et al.*, 2002). Ara bé, ja que existeixen altres còpies d'aquests gens en el genoma de *P. putida* i recentment s'ha vist que tenen un paper important en el procés de la mutagènesi en altres bacteris, se'ls ha renombrat com a *imuA*, *imuB* i *dnaE2* (Galhardo *et al.*, 2005). Per tal de comprovar si aquests tres gens es trobaven formant una única unitat transcripcional s'utilitzà la tècnica de RT-PCR. Per poder-ho fer, primer es va aïllar RNA de *P. putida* d'un cultiu en fase exponencial. Posteriorment aquest RNA s'utilitzà com a motlle en una RT-PCR amb els oligonucleòtids LexA2up, ImuAdw, ImuAup, ImuBdw, ImuBup, DnaE2dw. Cada parella d'aquests oligonucleòtids amplifica la regió compresa entre el *lexA2* i l'*imuA*; l'*imuA* i l'*imuB*; l'*imuB* i el *dnaE2*, respectivament, segons es mostra en la Figura 3.10A.

Aquests experiments de RT-PCR demostraren que els quatre gens formaven la mateixa unitat transcripcional (Figura 3.10B). Aquest casset multigènic s'ha pogut trobar també en múltiples famílies de proteobacteris gramnegatius, però existeixen variacions en el seu contingut genètic i en la seqüència d'unió del LexA (Abella *et al.*, 2004; Erill *et al.*, 2006). Tot i la relació que sembla haver-hi entre el LexA2 de *P. putida* i el LexA d'*Anabaena* sp., no es va trobar aquest casset en cap dels genomes dels cianobacteris seqüenciats, ni tampoc en cap grampositiu.

L'origen i evolució d'aquest casset ha estat àmpliament estudiat. Hi ha dades que suggereixen que la presència d'aquest casset a *P. putida* es deu a una transferència gènica horitzontal (LGT) a partir d'un organisme relacionat amb els cianobacteris (Abella *et al.*, 2004). Però anàlisis filogenètics més recents apunten a que el seu origen es deu a una duplicació gènica, que

posteriorment s'ha anat reestructurant, i que per tant, l'origen del casset en els proteobacteris Gamma és per herència vertical (Erill *et al.*, 2006).

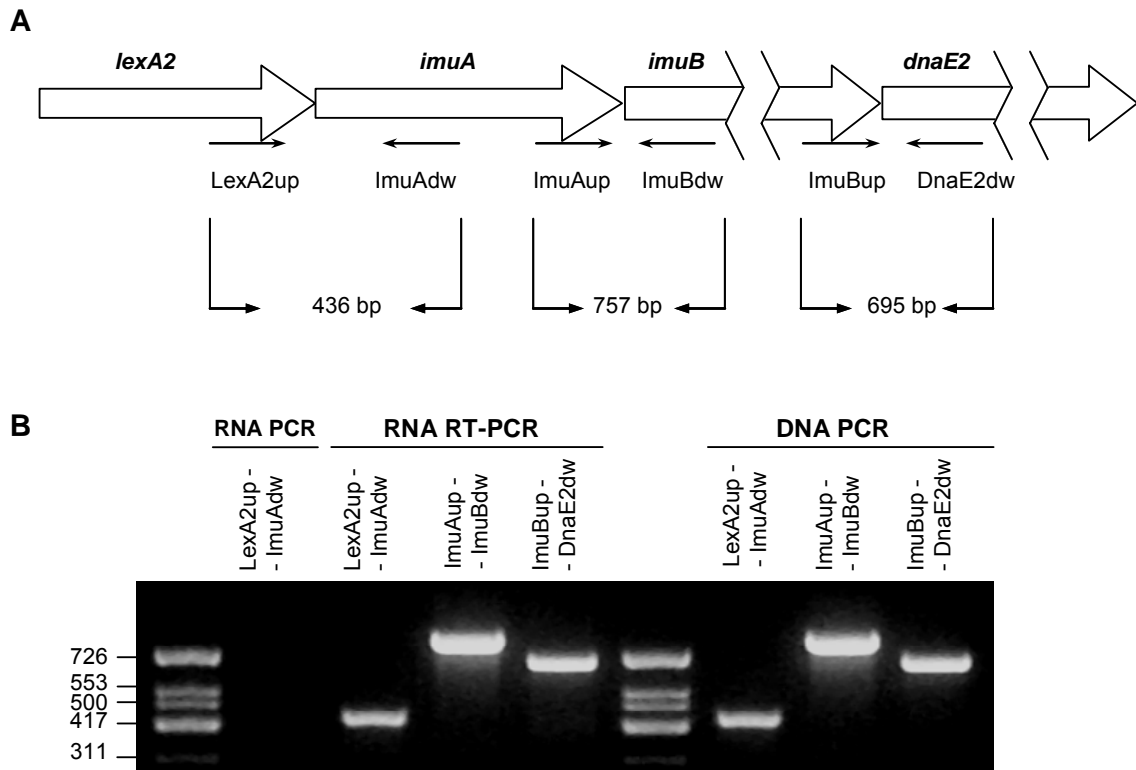


Figura 3.10. A. Organització estructural dels gens *lexA2-imuA-imuB-dnaE2*. Les fletxes mostren els oligonucleòtids usats per determinar els trànscrips. B. RT-PCR sobre RNA total de *P. putida* per determinar si els quatre gens formen el mateix trànscrip. Com a control es dugueren a terme experiments de PCR fent servir DNA (DNA PCR) o RNA (RNA PCR). El marcador de pes molecular es mostra a l'esquerra (els valors corresponen a parells de bases).

3.4. Patró d'expressió dels gens *lexA1* i *lexA2*

Tal i com s'ha mencionat a la introducció, el gen *lexA* acostuma a estar autoregulat, i la seva expressió augmenta quan hi ha lesions al DNA. D'aquesta manera, es va voler comprovar si l'expressió dels dos gens *lexA* de *P. putida* depenia de la presència de danys en el DNA. Per fer-ho, es van fer dos cultius de *P. putida* i es deixaren créixer fins a una DO_{550} entre 0,3 i 0,4. En aquest punt a un dels dos cultius se li va afegir mitomicina C (MMC) a una concentració de 20 $\mu\text{g/ml}$, i es deixaren incubant durant dues hores més. La mitomicina C s'utilitza com a activador del sistema SOS perquè que és un agent lesiu molt potent, ja que produeix enllaços creuats entre les cadenes del

DNA (Tomasz,1995). Posteriorment s'extragué l'RNA d'ambdós cultius i s'utilitzà en un assaig de RT-PCR quantitativa a temps real. En aquest assaig s'utilitzaren els oligonucleòtids *lexA1upRT*, *lexA1dwRT* i *lexA2upRT*, *lexA2dwRT*, per mesurar l'expressió del gen *lexA1* i *lexA2* respectivament. A més també s'utilitzaren els oligonucleòtids *trpAupRT* i *trpAdwRT*. Aquests oligonucleòtids hibriden en la zona codificant del gen triptòfan sintetasa (*trpA*), i foren utilitzats com a estàndard de l'assaig, per tal de relativitzar les concentracions d'RNA obtingudes pels gens problema (*lexA1* i *lexA2*) a la d'aquest gen. Això es fa, perquè l'expressió d'aquest gen no varia per l'efecte de la MMC (Courcelle *et al.*, 2001). Tal i com es mostra en la Figura 3.11, l'expressió d'ambdós gens *lexA* es va veure incrementada per l'efecte de l'agent mutagènic (MMC) afegit en el cultiu. A més també poguérem veure com l'expressió del gen *lexA1* és major a l'observada pel gen *lexA2*.

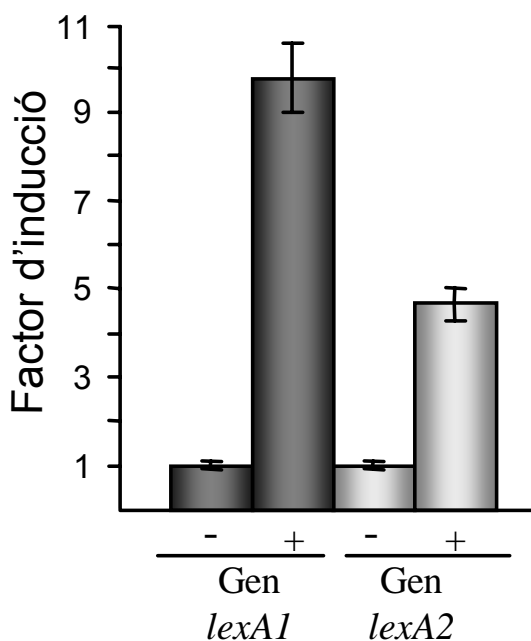


Figura 3.11 Factor d'inducció dels gens *lexA1* i *lexA2* de *P. putida* mesurat per RT-PCR quantitativa a temps real. El factor d'inducció és el coeficient entre la concentració relativa d'RNA de cada gen *lexA* en el cultiu tractat, respecte la del cultiu no tractat. Els símbols (+) o (-) representen addició o no de MMC respectivament.

3.4.1. Construcció d'un mutant *lexA2*(Def)

Veient aquests resultats, semblava que els gens *lexA2*, *imuA*, *imuB* i *dnaE2* es trobaven regulats per LexA2, i que a més la seva expressió depenia de la presència de danys en el DNA. Per comprovar definitivament aquest fet, es va construir una soca de *P. putida* defectiva pel gen *lexA2*. Això s'aconseguí utilitzant un vector suïcida que contenia el gen *lexA2* interromput pel casset de resistència a kanamicina (Km). Aquest vector fou introduït a la soca salvatge de

P. putida per conjugació, i es van seleccionar els conjugants que havien incorporat el gen *lexA2* interromput, perdent la còpia salvatge.

A continuació es van fer dos cultius d'aquesta soca mutant, un dels quals es va tractar amb MMC, tal i com s'havia fet abans amb la soca salvatge. Es va extreure l'RNA d'ambdós cultius i es va analitzar per RT-PCR, utilitzant els oligonucleòtids ImuAup i ImuBdw, per veure si hi havia transcripció dels gens que es trobaven darrera del *lexA2*. Els resultats indicaren que no hi havia transcripció d'aquests gens, fet que evidenciava que no existien pseudopromotors en la regió posterior al gen *lexA2*, i per tant, la seva transcripció estava regulada únicament pel promotor ja descrit davant del gen *lexA2*. La transcripció d'aquests gens no era possible perquè la incorporació del casset de resistència a Km en el gen *lexA2*, incorporava un senyal de fi de transcripció, que feia que l'RNA polimerasa no pogués continuar transcribint els gens posteriors al *lexA2*.

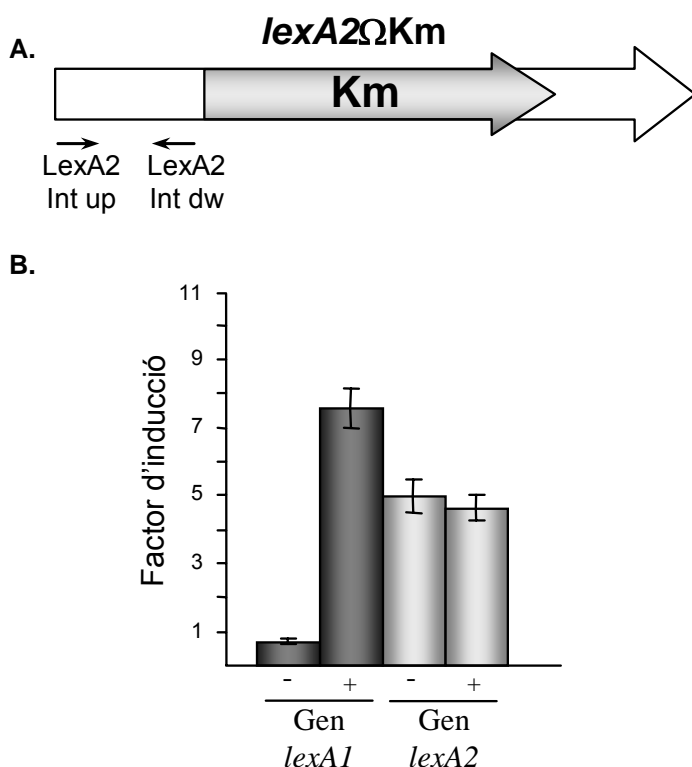


Figura 3.12 A. Organització estructural del gen *lexA2* interromput pel casset Ω Km. Les fletxes mostren els oligonucleòtids usats per determinar el transcrit. B. Factor d'inducció dels gens *lexA1* i *lexA2* del mutant *P. putida lexA2(Def)* mesurat per RT-PCR quantitativa a temps real. El factor d'inducció és el coeficient entre la concentració relativa d'RNA de cada gen en el cultiu tractat, respecte la del cultiu salvatge no tractat. Els símbols (+) o (-) representen presència o no de MMC respectivament.

Aquests RNAs també foren utilitzats en un experiment de RT-PCR quantitativa a temps real en el qual es va analitzar l'expressió del gen *lexA2*. Aquest gen, tot i estar interromput pel casset Km, podia transcriure els 301 primers parells de bases de la seva seqüència, ja que el casset havia estat introduït just en aquest punt (Figura 3.12A). Això ens va permetre utilitzar els

oligonucleòtids LexA2Int up i LexA2Int dw, que hibridaven just en aquesta regió, per poder analitzar l'expressió del gen *lexA2*. Els resultats indicaren que l'expressió d'aquest gen no variava per l'efecte de la MMC en el mutant *lexA2(Def)* (Figura 3.12B). I que a més, l'expressió basal d'aquest gen en el mutant era similar a l'obtinguda en un cultiu salvatge tractat amb MMC (Figures 3.11 i 3.12B). Com a control, també es va mesurar l'expressió del gen *lexA1*, i es va veure que es comportava igual que en la soca salvatge de *P. putida*, demostrant-se de nou que ambdós gens (*lexA1* i *lexA2*) no tenen una regulació creuada, sinó que funcionen independentment.

Paral·lelament es van analitzar algunes característiques fisiològiques d'aquest mutant, per veure si el seu comportament diferia del de la soca salvatge de *P. putida*. Així es van comparar les cinètiques de creixement d'ambdues soques en dos cultius crescuts en paral·lel. El creixement dels dos cultius es va mesurar a través de l'increment de la terbolesa del cultiu (DO_{550}) que s'esdevé per l'increment de la massa cel·lular (Figura 3.13).

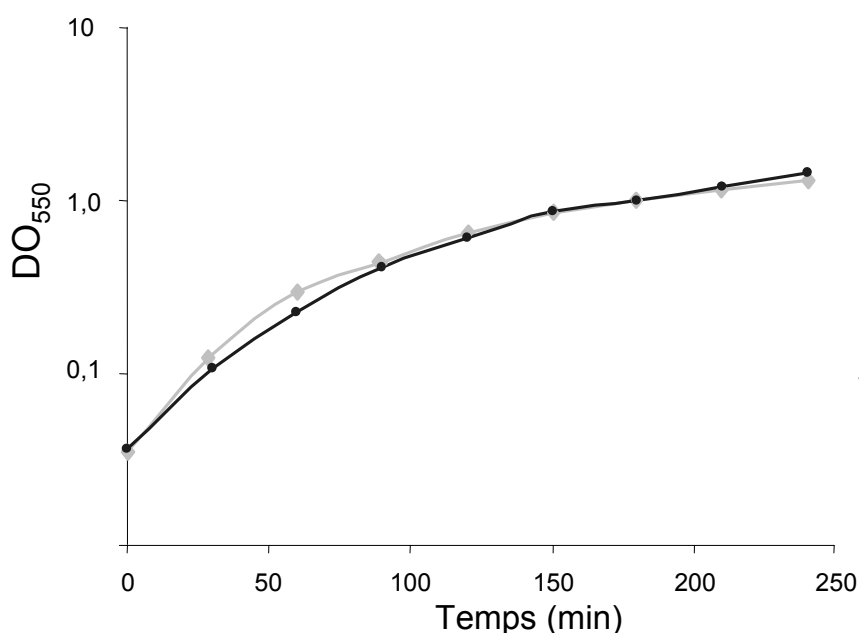


Figura 3.13 Corva de creixement d'un cultiu salvatge de *P. putida* (◆) i d'un cultiu mutant *lexA2(Def)* (●).

Tal i com es mostra en la Figura 3.13, el creixement de la soca mutant *lexA2(Def)* fou similar a l'observat per la soca salvatge, de manera que la desregulació dels gens controlats per LexA2 no provocava cap efecte important sobre el creixement.

Un altre experiment dut a terme amb aquest mutant, fou un assaig per veure l'efecte de la llum UV sobre la soca *lexA2(Def)*. Així es va irradiar un cultiu mutant i un de salvatge de *P. putida*, amb diferents dosis de llum UV. Els

cultius irradiats es van sembrar en medi sense antibiòtic i en medi amb estreptomicina (Str). *P. putida* és sensible a l'estreptomicina, però per mutacions en el gen que codifica la proteïna ribosomal S12 (*rpsL*) pot esdevenir resistent (Springer *et al.*, 2001). Amb aquest experiment, primer es va poder comprovar si la soca mutant era més sensible o no a la radiació ultraviolada; això es va poder veure comparant la viabilitat d'ambdues soques sembrades en el medi sense antibiòtic. I per una altra banda, es va calcular la taxa de mutagènesi per veure si era diferent en cada soca. Aquesta taxa es calcula comparant la quantitat de colònies resistents a estreptomicina, observades en les plaques que contenien aquest antibiòtic, en funció de les cèl·lules viables. Les dosis que es van utilitzar van ser 20, 40 i 60 joules (J), i els resultats es mostren en la Figura 3.14.

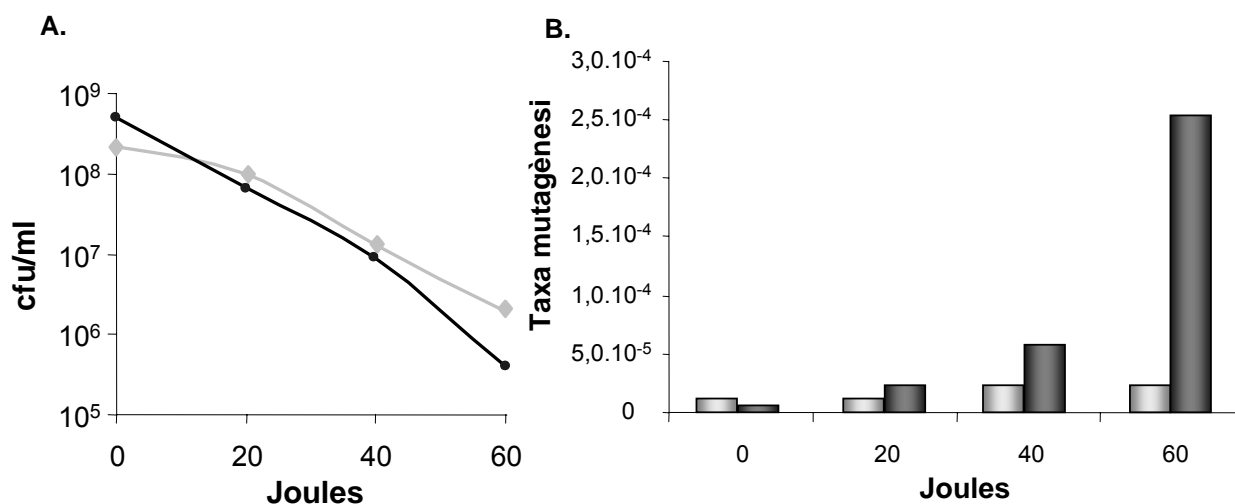


Figura 3.14. A. Logaritme de les cèl·lules viables (cfu/ml) en funció de la dosi de llum ultraviolada d'un cultiu salvatge de *P. putida* (◇) i d'un cultiu mutant *lexA2(Def)* (●). B. Taxa de mutagènesi calculada a partir del nombre de colònies resistents a Str en funció de la quantitat de cèl·lules viables (cfu/ml), per cada dosi d'UV. La soca salvatge de *P. putida* es representa en gris i la mutant *lexA2(Def)* en negre.

Pel que fa a la viabilitat d'ambdues soques no s'apreciaren diferències importants (Figura 3.14A). Però en canvi, la taxa de mutagènesi de la soca mutant era lleugerament major a elevades dosis de radiació (Figura 3.14B). A la dosi més alta de llum ultraviolada (60J), es pogué apreciar com la soca mutant *lexA2(Def)* incrementava la seva taxa de mutagènesi en un ordre de magnitud respecte la salvatge. Aquest fet es podria deure a que els gens del casset controlat per LexA2 que en el mutant no s'expressen, podrien tenir un

paper important en el control de la taxa de mutagènesi. De fet s'ha vist que la DnaE2 té un paper important disminuint aquesta la taxa (Koorits *et al.*, 2007). De totes maneres en l'estudi de Koorits *et al.* (2002) van veure que un doble mutant en *imuB* i *dnaE2* recuperava la taxa de mutagènesi normal. Per tant, en el nostre cas, també podria ser que hi hagués altres gens, controlats per LexA2, que estiguessin implicats en la taxa de mutagènesi observada.

3.4.2. Construcció d'un mutant *lexA1*(Def)

Per tal de poder estudiar els gens que es trobaven regulats per la proteïna LexA1, es va construir una soca defectiva per aquest gen. Per fer-ho, es va utilitzar la mateixa tècnica utilitzada per obtenir el mutant *lexA2*(Def). Així, es va interrompre el gen *lexA1* amb un casset de resistència a Km, i es clonà en un vector suïcida obtenint-se el vector pUA1098. Aquest es va introduir a *P. putida* per conjugació i se seleccionaren els conjugants que havien incorporat el gen mutant, perdent la còpia salvatge.

De nou, es van fer dos cultius d'aquesta soca, i un d'ells fou tractat amb MMC. S'extragué l'RNA d'ambdós cultius i s'analitzà per RT-PCR quantitativa a temps real. En aquest cas es va utilitzar com a control el gen *recA*, ja que es troba normalment regulat per LexA (Erill *et al.*, 2003). Mitjançant els oligonucleòtids *recA*upRT i *recA*dwRT es va poder analitzar l'expressió d'aquest gen comparant-la amb l'expressió que té en un cultiu salvatge (Figura 3.15). Tal i com es mostra en la figura, vam poder veure que la soca era, efectivament, defectiva pel gen *lexA1*, ja que l'expressió del gen *recA* es trobava desregulada i no variava per l'addició de MMC al medi.

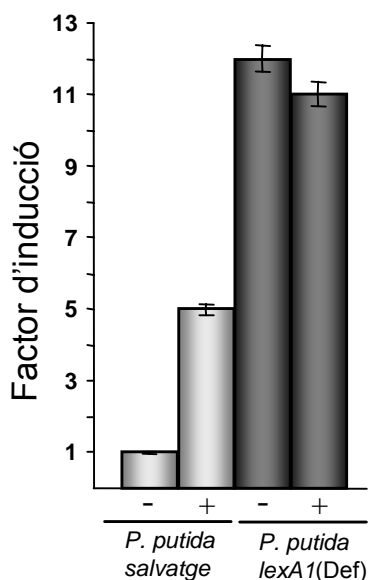


Figura 3.15. Factor d'inducció del gen *recA* de la soca salvatge i de la mutant *lexA1*(Def) de *P. putida* mesurat per RT-PCR quantitativa a temps real. El factor d'inducció és el coeficient entre la concentració relativa d'RNA del gen *recA* en el cultiu tractat, respecte la del cultiu salvatge no tractat. Els símbols (+) o (-) representen presència o no de MMC respectivament.

A més, a l'igual que passava amb el mutant *lexA2*(Def), el gen que es trobava darrera del *lexA1* no s'expressava per l'efecte de la inserció del casset de resistència a Km. Aquest gen és el *sulA*, l'expressió del qual, porta a la inhibició de la divisió cel·lular, i a l'aparició d'un fenotip molt característic anomenat filamentació (Bi *et al.*, 1993). Aquest fenotip no va ser observat en el mutant *lexA1*(Def), fet que demostrà que el gen *sulA* no s'expressava en aquesta soca. Per una altra banda, també es va comparar la corba de creixement d'aquest mutant respecte a la soca salvatge de *P. putida* i no s'observaren diferències apreciables (resultats no presentats).

3.5. La resposta global SOS de *P. putida*

L'obtenció de dos mutants defectius en els gens *lexA1* i *lexA2*, ens va permetre estudiar els regulons de cada un d'ells. Per poder veure quins eren els gens controlats per LexA1 i LexA2, s'utilitzaren xips de DNA o *microarrays*. Aquesta tècnica permet veure l'expressió de tots els gens que es troben en el genoma de la cèl·lula.

Amb aquesta finalitat, es va extreure l'RNA de les soques salvatge i mutants de *P. putida*. Per obtenir els de la soca salvatge, es va fer créixer un cultiu inicial, i quan va arribar a una DO₅₅₀ entre 0,3 i 0,4, es va separar en quatre cultius de 80 ml. A dos d'ells se'ls va afegir MMC, i tots quatre cultius es van deixar créixer durant dues hores més. Passat aquest temps, els dos cultius tractats amb MMC es van ajuntar, així com els dos sense tractar, per fer-ne l'extracció de l'RNA. Aquest procés es va repetir dos cops, i els RNAs obtinguts es van combinar. Aquests foren transformats a cDNA i marcats amb un fluorocrom per tal d'hibridar un mínim de dos *slides* (Figura 3.16). D'aquesta manera es va voler incrementar la fiabilitat estadística i biològica dels resultats de l'experiment. Pel que fa a les soques mutants, es va dur a terme el mateix protocol que per la soca salvatge, però només es va hibridar en el xip el cDNA corresponent al cultiu no tractat. Aquest es va comparar al de la soca salvatge sense tractar amb MMC. D'aquesta manera volíem detectar els gens que es trobaven induïts en aquests mutants, que corresponien als gens controlats per

LexA1 o LexA2. A més, cal destacar, que cada *slide* posseïa dues còpies de cada gen del genoma de *P. putida*, per incrementar encara més la precisió de la tècnica en cada hibridació.

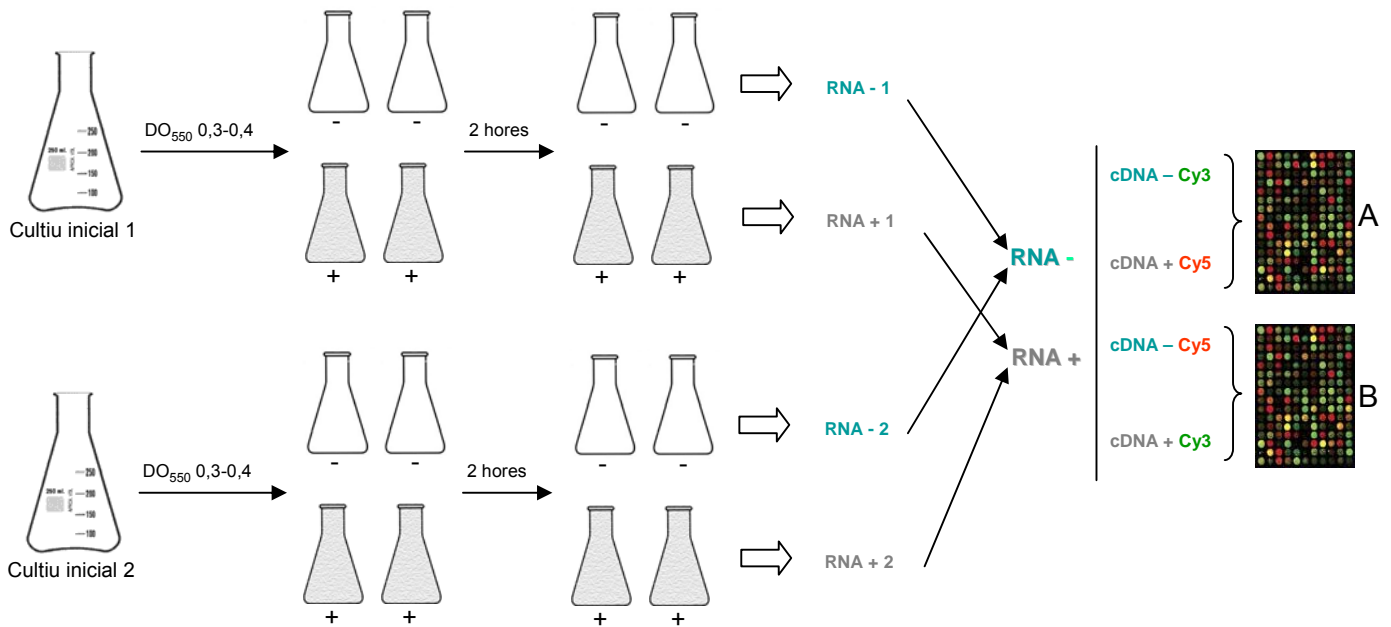


Figura 3.16. Representació esquemàtica del protocol dut a terme per obtenir els RNAs de la soca salvatge de *P. putida*, per hibridar els *microarrays*. Per les soques mutants només s'obtingué l'RNA dels cultius no tractats, i es va comparar amb el de la soca salvatge sense tractar. El símbol (+) representa addició de MMC a una concentració de 20µg/ml. El resultat final és la mitja dels valors obtinguts en el xip A i B.

Cada RNA fou marcat primer amb Cy3 i després amb Cy5, ja que l'afinitat per un o altre fluorocrom pot ser diferent, i per tant, es va fer el doble marcatge per evitar possibles errors causats per la tècnica utilitzada (Figura 3.16). Així, es procedí a la hibridació del *microarray*, tal i com es descriu en l'apartat de materials i mètodes, i s'obtingué, per a cada gen, quatre valors d'inducció. Aquests valors s'obtingueren gràcies al fet que a l'hibridar el xip de DNA, el cDNA marcat s'uneix als oligonucleòtids complementaris, que es troben en els *spots* del xip. D'aquesta manera, si un gen determinat s'expressa més per l'efecte del tractament, tindrà més còpies del seu mRNA i per tant també hi haurà més cDNA d'aquest gen. Si el cDNA estava marcat amb Cy3, aquell *spot* es veurà de color verd. En canvi, si el gen no varia el seu patró d'expressió degut al tractament, hi haurà la mateixa quantitat de mRNA tant en el cultiu no tractat com en el tractat, i per tant, els dos cDNAs s'uniran a l'*spot*

per igual i el color resultant serà groc (de la combinació del verd del Cy3 i del vermell del Cy5). Les intensitats colorimètriques es llegiren amb un escàner d'alta precisió i foren interpretades per un programa informàtic, que les va convertir en valors numèrics, el logaritme del qual, fou el valor de factor d'inducció amb el qual nosaltres treballàrem. Així, teòricament, un gen que no varia la seva expressió tindrà un factor d'inducció igual a 1, mentre que si la seva expressió és més gran a causa del tractament serà més gran d'1. En el nostre cas, però, per assegurar que els resultats eren fiables, es va considerar que un gen es trobava induït quan la mitja dels factors d'inducció era igual o superior a 2, amb un valor de P igual o inferior a 0,05. Possiblement, dels gens descartats n'hi havia algun que realment podria estar induït, però l'experiència indica que existeixen molts falsos positius en valors d'inducció menors de 2.

Un cop obtingut el llistat de gens induïts, tant en el salvatge com en els mutants, es procedí a l'anàlisi per RT-PCR quantitativa a temps real d'algun d'aquests gens per assegurar que els resultats del *microarray* eren fiables. Així es pogueren validar els resultats obtinguts (Taula 3.1). Els gens que es van examinar foren el *recA* i el *lexA2*, ja que el primer està regulat per LexA1 i l'altre per LexA2. Per fer aquestes RT-PCR, s'utilitzaren els oligonucleòtids ja mencionats anteriorment (Apartat 3.4).

Taula 3.1 Comparació dels factors d'inducció obtinguts per *microarrays* i per RT-PCR quantitativa a temps real¹

Assaig	<i>recA</i>			<i>lexA2</i>		
	Salvatge ²	<i>lexA1</i> (Def)	<i>lexA2</i> (Def)	Salvatge ²	<i>lexA1</i> (Def)	<i>lexA2</i> (Def)
<i>Microarray</i>	5,4	12,1	1,2	2,3	1,0	4,6
RT-PCR	5,0	12,2	1,1	4,7	1,1	5,0

¹ El factor d'inducció és el coeficient entre la concentració relativa d'RNA de cada gen respecte la del cultiu salvatge no tractat.

² Cultiu salvatge tractat amb 20 µg/ml de MMC.

Tal i com podem veure en la Taula 3.1, els resultats del *microarray* són força semblants als obtinguts per RT-PCR. Així vam agrupar tots els gens que es trobaven induïts, segons si formaven part o no del reguló LexA1 o LexA2. A més, es va buscar en la regió promotora dels gens induïts la seqüència d'unió

d'una o altra proteïna, ja que en els experiments anteriors havíem pogut definir aquesta caixa d'unió (Apartat 3.2.2). Així obtinguérem quatre grups de gens:

- **Gens regulats per LexA1.** Aquests gens es trobaven induïts en el cultiu salvatge tractat amb MMC, i en el mutant *lexA1(Def)*. En el seu promotor es va trobar una seqüència similar a la caixa SOS d'*E. coli*.
- **Gens regulats per LexA2.** Aquests gens es trobaven induïts en el cultiu salvatge tractat amb MMC i en el mutant *lexA2(Def)*. En el seu promotor es va trobar la caixa SOS del LexA2.
- **Gens no regulats per cap dels dos LexAs.** Aquests gens només es trobaven induïts en el cultiu salvatge tractat amb MMC.
- **Gens doblement regulats.** Aquests gens es trobaven induïts en el cultiu salvatge tractat amb MMC, en el mutant *lexA1(Def)* i en el mutant *lexA2(Def)*. En el seu promotor hi havia la seqüència d'unió d'ambdues proteïnes LexA.

En les Taules 3.2, 3.3 i 3.4 es mostra el llistat de gens que corresponen a cada grup. El gen que posseeix la doble regulació per LexA1 i LexA2 és el que correspon al locus PP3901, no s'ha fet una taula a part per aquest gen, sinó que es mostra tant en la taula del reguló LexA1 (Taula 3.2) com en la del LexA2 (Taula 3.3). Més endavant es parlarà àmpliament d'aquest gen i la seva regulació.

3.5.1. Gens regulats per LexA1

El grup de gens descrits en la Taula 3.2 eren els que pertanyien al reguló LexA1, i per tant, la seva expressió es trobava controlada negativament per la proteïna LexA1. La majoria d'aquests gens es trobaven relacionats amb la reparació del DNA: *uvrB*, *uvrD*, *topB*, *endA-1*, *recA*, *recX*, *recN* i *dinP*. La resta eren proteïnes hipotètiques de funció desconeguda. Un dels gens amb un factor d'inducció més gran fou el *recA*. Com ja s'ha comentat anteriorment, la proteïna RecA és un element clau en el procés de reparació del DNA, ja que participa en la majoria de vies reparatives, a més de ser la responsable de l'activació del sistema SOS. A *P. putida* aquest gen semblava compartir la mateixa unitat transcripcional amb el gen *recX*, el producte gènic del qual, modula l'activitat de la proteïna RecA*.

Taula 3.2 Gens que incrementen el seu patró d'expressió en una soca *lexA1(Def)* de *P. putida*.

Locus ^a	Gen	Nom comú	Factor d'inducció ^b <i>lexA1(Def)</i>	Factor d'inducció ^b Salvatge + MMC	Possible seqüència reguladora	Bases fins l'ATG ^c
PP1203	dinP	DNA polimerasa IV	2,7	2,6	CTGTATGAATTTACAG	16
PP4729	recN	Proteïna de reparació del DNA, RecN	17,5	12,3	CTGTATAAATAACCAG	24
PP1974	uvrB	Excinucleasa ABC, subunitat B	3,4	2,2	CTGGCTAAATTTACAG	23
PP5352	uvrD	DNA helicasa II	3,0	2,3	GTGAATATTCATACAG	43
PP4019	topB	DNA topoisomerasa III	4,7	2,1	CTGTACATCCATCCAG	70
PP3901		Proteïna hipotètica conservada	25,7	21,5	CTGTCTATGCATACAG	20
PP2109		Proteïna hipotètica conservada	10,0	5,4	CTGTATATAAATAACAG	16
PP4616		Proteïna hipotètica conservada	8,6	7,1	CTGTATATAGATACAG	42
PP5393		Proteïna hipotètica conservada	6,6	2,1	CTGTAAATGCGGCGAG	30
↑ PP3773		Proteïna hipotètica conservada	21,0	17,0	CTGTATATTCGTACAG	17
↓ PP3774		Proteïna hipotètica conservada	3,0	5,6	CTGTATATTCGTACAG	202
PP1629	recA	Proteïna RecA	12,1	5,4	CTGGCTACTTATACAG	44
PP1630	recX	Proteïna RecX	2,1	1,9		
PP2452		Proteïna hipotètica conservada	3,6	2,7	CTGTATGTGCATACAG	20
PP2451	endA-1	Endonucleasa I	7,5	4,4		
PP2143	lexA	Repressor LexA	10,4	8,6	(1) CTGTACAAAAAGACAG	11
PP2142	sulA	Inhibidor de la divisió cel·lular	ND ^d	4,0	(2) CTGTATATAAATTCAG	30
PP2924		Proteïna hipotètica conservada	15,1	5,2	CTGTATGAATACTCAG	18
PP2923		Proteïna hipotètica conservada	4,8	3,3		
PP1110		Possible serina O-acetiltransferasa	3,5	2,5	CTGAAGTCCACTGCAG	432
PP1111		Possible sintetasa	3,0	2,9		
PP1112		Proteïna hipotètica conservada	2,5	2,4		
PP1113		Enzim de la família dependent de piridoxal-fosfat	1,8	1,9		

^a El primer gen dels possibles operons es mostra en negreta; els següents es mostren a continuació. Les fletxes indiquen gens que es transcriuen divergentment.

^b Factor d'inducció de la soca *lexA1(Def)* o de la salvatge tractada amb MMC, respecte la soca salvatge no tractada.

^c Distància de la seqüència reguladora fins al codó d'inici de traducció de cada gen (ATG).

^d (ND) indica que no s'ha detectat expressió d'aquest gen a causa de l'efecte polar de la inactivació del gen *lexA1*.

Taula 3.3 Gens que incrementen el seu patró d'expressió en una soca *lexA2(Def)* de *P. putida*.

Locus ^a	Gen	Nom comú	Factor d'inducció ^b <i>lexA2(Def)</i>	Factor d'inducció ^b Salvatge + MMC	Possible seqüència reguladora	Bases fins l'ATG ^c
PP3901		Proteïna hipotètica conservada	1,7	21,5	AGTACAAATGTGCT	72
PP3116	<i>lexA2</i>	Repressor LexA	4,6	2,3	AGTACAAATGTGCT	4
PP3117	<i>imuA</i>	Hipotètic SulA	ND ^d	1,8		
PP3118	<i>imuB</i>	Proteïna hipotètica conservada	ND	2,7		
PP3119	<i>dnaE2</i>	DNA polymerasa III, subunitat alfa	ND	2,0		

^a El primer gen dels possibles operons es mostra en negreta; els següents es mostren a continuació.

^b Factor d'inducció de la soca *lexA2(Def)* o de la salvatge tractada amb MMC, respecte la soca salvatge no tractada.

^c Distància de la seqüència reguladora fins al codó d'inici de traducció de cada gen (ATG).

^d (ND) indica que no s'ha detectat expressió d'aquests gens a causa de l'efecte polar de la inactivació del gen *lexA2*.

Taula 3.4 Gens que només incrementen el seu patró d'expressió en una soca de *P. putida* tractada amb MMC.

Locus	Nom comú	Factor d'inducció ^a
		Salvatge + MMC
PP3855	Proteïna hipotètica	2,0
PP3856	Proteïna hipotètica	2,7
PP3860	Fag FluMu, proteïna gp47	2,0
PP3864	Fag FluMu, proteïna de circularització del DNA	2,3
PP3869	Proteïna de l'embolcall	4,1
PP3870	Fag FluMu, proteïna gp38	2,2
PP3871	Proteïna hipotètica	2,2
PP3873	Proteïna hipotètica	6,8
PP3874	Proteïna hipotètica	2,4
PP3875	Proteïna hipotètica	4,0
PP3876	Proteïna hipotètica	2,4
PP3878	Proteïna fàgica menor de la càpside C	4,9
PP3879	Proteïna fàgica portal, de la família HK97	2,7
PP3880	Proteïna hipotètica	3,2
PP3881	Fag terminasa, subunitat gran	3,6
PP3882	Fag terminasa, subunitat petita	2,9
PP3883	Holina fàgica	2,6
PP3884	Holina fàgica, família lambda	2,7
PP3885	Proteïna hipotètica	2,5
PP3887	Proteïna hipotètica	2,1
PP3889	Integrasa fàgica	2,5
PP3890	Proteïna hipotètica	2,0
PP3891	Proteïna hipotètica conservada	3,0
PP3892	Proteïna hipotètica	1,8
PP3893	DNA helicasa fàgica	3,0
PP3894	Proteïna replicativa fàgica O	3,4
PP3895	Proteïna reguladora Cro	6,7
PP3903	Proteïna hipotètica	10,3
PP3907	Proteïna hipotètica	4,5
PP3908	Proteïna hipotètica	2,1
PP3910	Proteïna hipotètica	2,4
PP3911	Proteïna hipotètica	5,8
PP3912	Metiltransferasa DNA-citosina	3,0
PP3913	Proteïna hipotètica	2,8
PP3915	Proteïna hipotètica	2,2
PP3916	Proteïna hipotètica	2,7
PP3917	Proteïna hipotètica	2,5

^a Factor d'inducció de la soca salvatge tractada amb MMC, respecte la soca salvatge no tractada.

Altres gens regulats per LexA1 eren els gens *uvrB* i *uvrD*, que estan implicats en la via de reparació per escissió. Un altre gen important del reguló era el *recN*, ja que pertany a la via RecFOR que intervé en el procés de formació del

nucleofilament de RecA*, entre d'altres funcions. El gen *dinP* codifica la polimerasa IV, un dels membres de la família Y, caracteritzada per la capacitat de replicar DNA danyat (TLS), introduint mutacions en la seqüència. Altres gens com *topB* i *endA-1*, participen en el restabliment de la replicació un cop s'han reparat les lesions. Finalment, el gen *sulA* controla el cicle cel·lular inhibint la divisió, i el gen *lexA1* és el regulador de tot el sistema SOS. Dels gens que codificaven proteïnes hipotètiques, es van buscar dominis conservats per intentar conèixer el seu paper en la resposta SOS. Així es va trobar que el PP5393 posseïa un domini d'unió a metalls pesants, mentre que el PP2924 semblava ser una proteïna d'unió al DNA ja que presentava un domini en forma de *helix-hairpin-helix*. Per la seva banda el PP4616 presentava homologia amb la proteïna YebG d'*E. coli*, una proteïna de funció desconeguda, però també relacionada amb la resposta SOS en aquest organisme (Lomba *et al.*, 1997). La resta de proteïnes hipotètiques posseïen homòlegs dins del grup de les *Pseudomonas* però no es van trobar dominis característics ni se'n coneixia la funció.

La identificació de la caixa SOS en el promotor dels gens regulats per LexA1, va permetre construir una seqüència consens per a *P. putida* (Figura 3.17). Comparant aquesta seqüència amb la descrita per *E. coli*, es pogué veure que eren gairebé iguals.

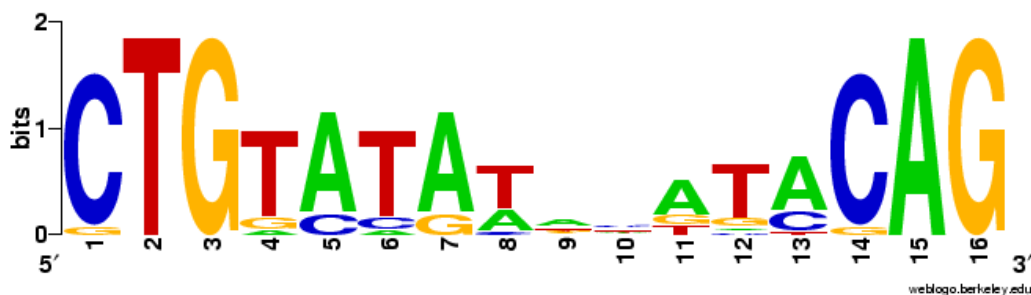


Figura 3.17. Seqüència consens de la caixa SOS reconeguda per la proteïna LexA1 de *P. putida*. La imatge s'ha fet utilitzant el servei WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu>).

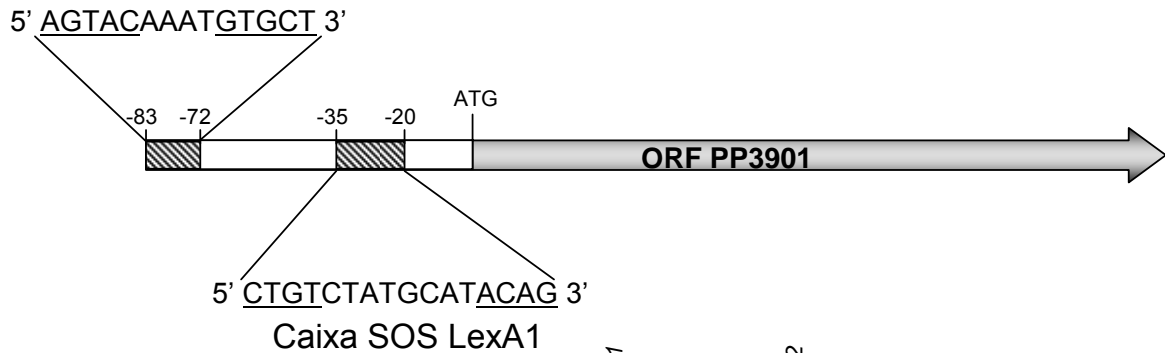
Aquesta seqüència consens es va utilitzar a posteriori per buscar en el genoma de *P. putida* per veure quants gens posseïen aquesta seqüència en el seu promotor i comparar-los amb els obtinguts per mitjà del *microarray*. Per fer aquesta recerca es va utilitzar el servei Predict Regulon (Yellaboina *et al.*, 2004). Els resultats indicaren que seqüències similars a la consens es poden

trobar en el promotor de múltiples gens però, mirant el seu comportament en el *microarray* del mutant *lexA1*(Def), es pogué veure que la seva expressió no variava. Aquest fet demostrà que l'anàlisi *in silico* pot aportar una idea dels gens regulats però que tendeix a sobreestimar els resultats.

3.5.2. Gens regulats per LexA2

Els gens regulats negativament per LexA2 (Taula 3.3) eren els que formaven el casset ja descrit (*lexA2*, *imuA*, *imuB* i *dnaE2*) i a més un altre gen que també estava regulat per LexA1, el PP3901. Tot i que el factor d'inducció d'aquest gen en el mutant *lexA2*(Def) no arribava al dos, el fet que en el seu promotor existís una seqüència reguladora del LexA2, va portar a pensar que la proteïna LexA2 era també important en la seva regulació (Figura 3.18A).

A. Caixa SOS LexA2



B.

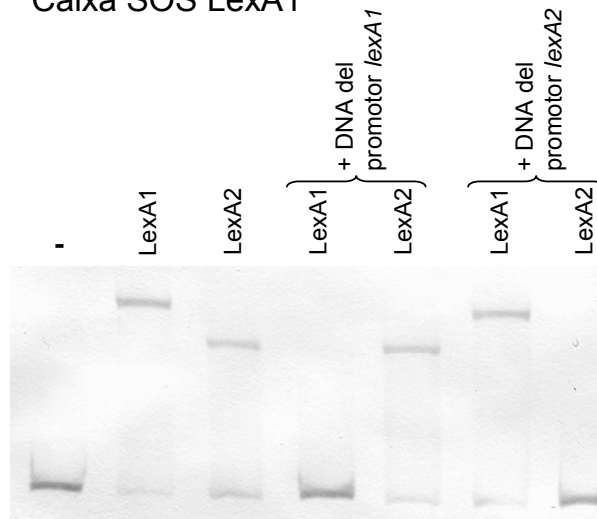


Figura 3.18. A. Representació esquemàtica del promotor i el gen del PP3901. Es mostren les seqüències de les caixes SOS de les proteïnes LexA1 i LexA2 corresponents a aquest promotor. B. EMSA sobre el promotor del PP3901 utilitzant 80 ng de proteïna purificada LexA1 (LexA1) o LexA2 (LexA2), excepte en el primer carril (-) en el que no s'hi ha afegit proteïna. Es pot observar l'efecte de l'addició d'un excés molar (300 vegades més) d'un DNA competidor (promotor *lexA1* o *lexA2*).

Per tal de comprovar si ambdues proteïnes LexA eren capaces d'unir-se al promotor del PP3901, es va procedir a fer un assaig d'EMSA. Mitjançant una PCR amb els oligonucleòtids -118PP3901 i +64PP3901, es va clonar al vector pGEM-T un fragment de 182 pb que contenia el promotor d'aquest gen. Un cop es va haver seqüenciat aquest plasmidi, es va utilitzar com a motlle per fer una PCR amb els oligonucleòtids -118PP3901 i Reverse-dig, per obtenir el fragment del promotor marcat amb digoxigenina. Aquest promotor es va utilitzar en un assaig d'EMSA tant amb proteïna LexA1 com LexA2 (Figura 3.18B). Els resultats ens indicaren que la proteïna LexA2 s'unia específicament al promotor del PP3901, demostrant-se que juga un paper en la seva regulació. A més, com era d'esperar, la proteïna LexA1 també s'unia específicament en aquest promotor, confirmant-se que aquest gen posseeix una doble regulació. Com a DNA competidor, tant específic com inespecífic, es va utilitzar el promotor del *lexA1* o del *lexA2* sense marcar amb digoxigenina, ja que cada una d'aquestes proteïnes només s'uneix al seu propi promotor.

La proteïna LexA1, sembla que tenia un efecte més gran sobre la regulació d'aquest gen, ja que el factor d'inducció del PP3901 en un mutant *lexA1*(Def) era molt gran comparat amb el del mutant *lexA2*(Def). Això es pot explicar, perquè la caixa del LexA1 es troba entre les posicions -35 i -20 pb respecte l'origen de traducció, mentre que la caixa del LexA2 es troba més lluny (entre -83 i -72 pb). Això faria que, en el mutant *lexA2*(Def), la unió del LexA1 impediria una bona transcripció del gen, mentre que en el mutant *lexA1*(Def), la unió del LexA2 no seria un impediment tan gran alhora de transcriure el gen. Per poder comprovar aquest fet, es va utilitzar l'RNA de la soca *lexA1*(Def), tant tractada amb MMC com sense tractar, en un assaig de RT-PCR quantitativa a temps real. En aquest assaig es va analitzar l'expressió del gen PP3901 (Figura 3.19). Els oligonucleòtids utilitzats foren el PP3901upRT i PP3901dwRT. Els resultats indicaren que l'expressió del PP3901 incrementava quan es tractava la soca mutant *lexA1*(Def) amb MMC. Aquest augment en la transcripció del PP3901 es deuria a l'efecte de la proteïna LexA2. Per confirmar que l'efecte observat era causat per la proteïna LexA2, es va construir un doble mutant *lexA1*(Def) *lexA2*(Def).

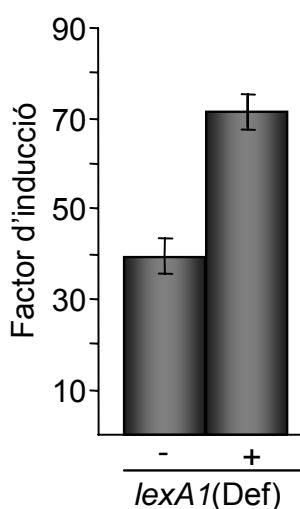


Figura 3.19 Factor d'inducció del gen PP3901 de la soca mutant *lexA1(Def)* de *P. putida* mesurat per RT-PCR quantitativa a temps real. El factor d'inducció és el coeficient entre la concentració relativa d'RNA del gen PP3901 en el cultiu tractat, respecte la del cultiu salvatge no tractat. Els símbols (+) o (-) representen presència o no de MMC respectivament.

3.5.2.1. Construcció d'un mutant *lexA1(Def) lexA2(Def)*.

Per tal de construir una soca que fos mutant en els dos gens *lexA*, es va obtenir primer una soca que contenia una deleció en el gen *lexA1*. Per aconseguir aquesta deleció, es va fer una PCR inversa, sobre el pGEM-T que contenia el gen *lexA1* (pUA1099), amb els oligonucleòtids +100*lexA1* i +487*lexA1*, i així s'obtingué un nou plasmidi al qual se li havien eliminat 400 pb de la zona central del gen *lexA1*. Posteriorment es clonà al vector suïcida pUA658 i es conjugà a *P. putida* per tal d'obtenir el mutant Δ *lexA1*.

El mutant Δ *lexA1* posseïa la peculiaritat de no tenir el casset de resistència a Km, fet pel qual, no s'impedia la transcripció del gen *sulA* que es troba a continuació del gen *lexA1*. Aquest fet produïa en la soca Δ *lexA1*, un fenotip anomenat filamentació, que es produeix per la inhibició de la divisió cel·lular produïda per l'efecte de la proteïna SulA. La filamentació fou observada al microscopi òptic i la transcripció del gen *sulA* es va confirmar per mitjà d'una RT-PCR sobre l'RNA d'aquesta soca. Això, però, no impedia que aquesta soca creixés normalment, al contrari del que passa a *E. coli*, on l'efecte de la desregulació del gen *sulA* desencadena un fenotip letal (Figura 3.20).

A continuació, per obtenir el doble mutant, es va fer una conjugació amb el plasmidi pUA1073 sobre la soca Δ *lexA1* de *P. putida* i se seleccionaren els dobles recombinants. Així, s'obtingué la soca doble mutant *lexA1(Def) lexA2(Def)*. Per tal d'obtenir l'RNA d'aquesta soca tractada o no amb MMC, es va seguir el protocol descrit en l'Apartat 3.2. Els RNAs es van analitzar per RT-PCR quantitativa a temps real per veure l'expressió del gen PP3901 (Figura 3.21). Els resultats ens indicaren que, en aquest mutant, l'expressió basal (la

soca sense tractar amb MMC) del PP3901 era més gran que en el mutant *lexA1*(Def), i que a més, l'addició de MMC no feia incrementar-ne l'expressió de la mateixa manera que ho fa en el mutant simple; confirmant-se d'aquesta manera, que l'expressió del PP3901 està regulada per ambdues proteïnes LexA.

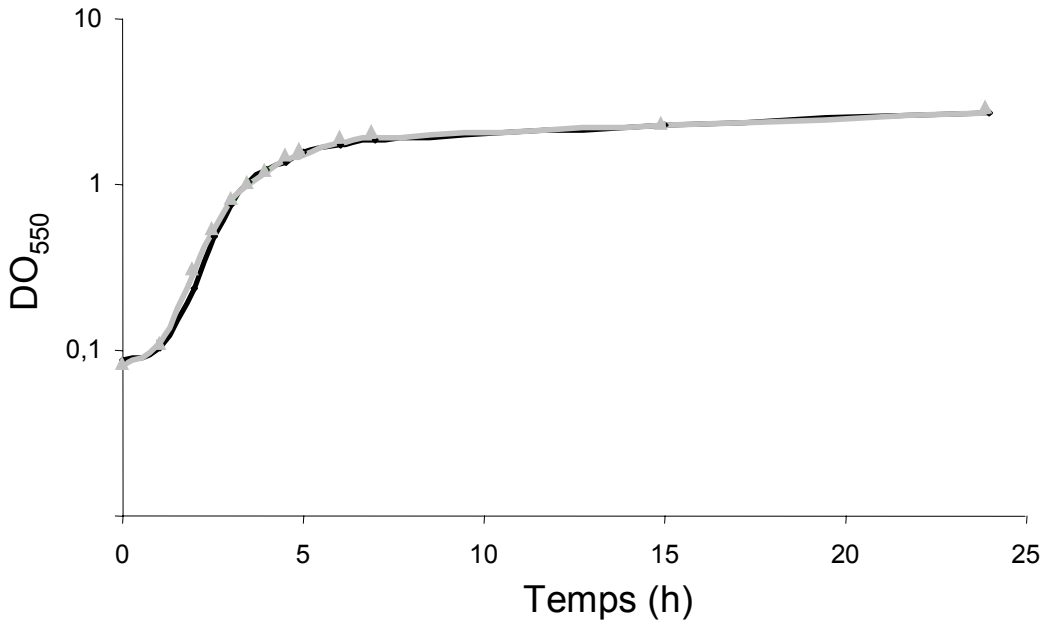


Figura 3.20. Corba de creixement d'un cultiu salvatge de *P. putida* (▲) i d'un cultiu mutant Δ *lexA1* (●).

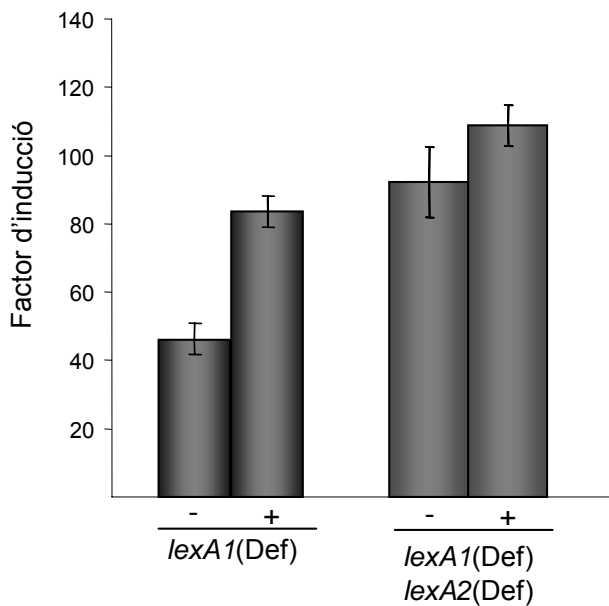


Figura 3.21. Factor d'inducció del gen PP3901 de les soques mutants *lexA1*(Def) i *lexA1*(Def)*lexA2*(Def) de *P. putida* mesurat per RT-PCR quantitativa a temps real. El factor d'inducció és el coeficient entre la concentració relativa d'RNA del gen PP3901 en el cultiu tractat, respecte la del cultiu salvatge no tractat. Els símbols (+) o (-) representen presència o no de MMC respectivament.

3.5.3. Gens no regulats per LexA

Finalment, en els resultats del *microarray* de la soca salvatge tractada amb MMC, existien una sèrie de gens que no semblaven formar part de la resposta SOS de *P. putida* (Taula 3.4). Aquests gens només incrementaven la seva expressió en un cultiu tractat amb MMC, però no en cap dels dos mutants LexA. Aquests gens es trobaven tots en la mateixa regió del genoma i s'han descrit com a pertanyents a l'illa número 79 de seqüències atípiques, formada per gens relacionats amb funcions fàgiques (Weinel *et al.*, 2002). Aquest fet no és estrany, ja que l'activació de molts bacteriòfags depèn de la presència de danys en el DNA: la proteïna RecA* reconeix a la proteïna reguladora del cicle lític (cl), produint-se l'autohidròlisi d'aquesta, que porta a l'activació dels gens fàgics (Oppenheim *et al.*, 2005). La regulació d'aquest profag fou estudiada més profundament, i els resultats s'exposen més endavant en aquesta memòria.

3.6. Anàlisi comparativa de la resposta SOS de *P. putida*

Els resultats obtinguts permeteren comparar la resposta SOS de *P. putida* amb la d'altres membres del seu grup, els proteobacteris Gamma. Com ja s'ha mencionat, els primers estudis de la resposta SOS utilitzant xips de DNA es van fer a *E. coli* (Courcelle *et al.*, 2001; Khil *et al.*, 2002), però recentment s'han publicat estudis similars en *P. aeruginosa* (Brazas *et al.*, 2005) i *P. fluorescens* (Jin *et al.*, 2007). D'aquesta manera, primer s'analitzà si els gens que es trobaven controlats pel LexA1 i el LexA2 a *P. putida*, també formaven part del reguló SOS a *E. coli* (Taula 3.5). A continuació, es van buscar homòlegs d'aquests gens a *P. aeruginosa*, i es va comprovar si també es trobaven induïts en un cultiu d'aquesta soca tractat amb ciprofloxacina (Brazas *et al.*, 2005).

Taula 3.5 Comparació de la resposta SOS de *P. putida* amb la de *E. coli* i *P. aeruginosa*.

<i>P. putida</i>				<i>E. coli</i>				<i>P. aeruginosa</i>			
Locus ^a	gen	Caixa	FI ^b	Locus ^a	gen	Caixa	FI ^c	Locus ^a	Caixa	FI ^d	
PP1203	<i>dinP</i>	+	2,7	b0231	<i>dinB</i>	+	5,8	PA0923	<i>dinB</i>	+	NI
PP4729	<i>recN</i>	+	17,5	b2616	<i>recN</i>	+	26,2	PA4763	<i>recN</i>	+	2,11
PP1974	<i>uvrB</i>	+	3,4	b0779	<i>uvrB</i>	+	4,42	PA3138	<i>uvrB</i>	-	NI
PP5352	<i>uvrD</i>	+	3,0	b3813	<i>uvrD</i>	+	1,02	PA5443	<i>uvrD</i>	-	NI
PP1629	<i>recA</i>	+	12,1	b2699	<i>recA</i>	+	6,28	PA3617	<i>recA</i>	+	4,55
PP1630	<i>recX</i>	+	2,1	b2698	<i>oraA</i>	+	5,99	PA3616	<i>recX</i>	+	3,09
PP2143	<i>lexA1</i>	+	10,4	b4043	<i>lexA</i>	+	3,07	PA3007	<i>lexA</i>	+	3,58
PP2142	<i>sulA1</i>	+		b0958	<i>sulA</i>	+	11,7	PA3008	<i>sulA</i>	+	6,50
PP4616		+	8,6	b1848	<i>yebG</i>	+	4,51	PA3413	<i>yebG</i>	+	4,18
PP3116	<i>lexA2</i>	+	4,6*					PA0671	<i>imuA</i>	+	1,52
PP3117	<i>imuA</i>							PA0670	<i>imuB</i>		1,96
PP3118	<i>imuB</i>							PA0669	<i>dnaE2</i>		NI
PP3119	<i>dnaE2</i>										
PP4019	<i>topB</i>	+	4,7	b1763	<i>topB</i>	-	NI				
PP3901		+	25,7					PA0922		-	NI
PP2109		+	10,0								
PP5393		+	6,6								
PP3773		+	21,0					PA1784		-	NI
PP3774		+	3,0					PA2381		-	NI
PP2452		+	3,6					PA2749	<i>endA</i>	-	NI
PP2451	<i>endA-1</i>	+	7,5	b2945	<i>endA</i>	-	NI				
PP2924		+	15,1								
PP2923		+	4,8								
PP1216	<i>ruvA</i>	-	NI	b1861	<i>ruvA</i>	+	4,6	PA0966	<i>ruvA</i>	-	NI
				b1860	<i>ruvB</i>	+	2,9				
PP0483	<i>uvrA</i>	-	NI	b4058	<i>uvrA</i>	+	1,8	PA4234	<i>uvrA</i>	-	1,47
PP1694		-	NI	b3832	<i>yigN</i>	+	2,4	PA1031	<i>yigN</i>	-	NI
PP2393	<i>polB</i>	-	NI	b0060	<i>polB</i>	+	1,7	PA1886	<i>polB</i>	+	NI
				b1728	<i>ydjM</i>	+	3,1	PA4962	<i>ydjM</i>	-	1,39
				b1061	<i>dinI</i>	+	2,4				
				b1183	<i>umuD</i>	+	12,4				
				b1184	<i>umuC</i>	+	20,5				
				b4347	<i>yjiW</i>	+	2,0				
				b0685	<i>ybfE</i>	+	2,5				
				b1741	<i>ydjQ</i>	+	3,3				

^aEl primer gen dels possibles operons es mostra en negreta; els següents es mostren a continuació.

^bFactor d'inducció de la soca *lexA1*(Def), respecte la soca salvatge no tractada. (*) El factor d'inducció correspon a la soca *lexA2*(Def), respecte la soca salvatge.

^cFactor d'inducció als 10 minuts de tractament amb UV (Courcelle *et al.*, 2001).

^dFactor d'inducció utilitzant ciprofloxacina (Brazas *et al.*, 2005).

(NI) indica que no s'han apreciat canvis en l'expressió del gen a causa del tractament.

Els símbols (+) o (-) representen presència o absència de la caixa SOS en el promotor dels gens indicats. Les cel·les en blanc indiquen que no s'ha trobat homòleg.

En el cas de *P. aeruginosa* només poguérem veure si els gens es trobaven induïts i si tenien caixa SOS, però no es coneixien en detall els gens regulats per LexA, de manera que només poguérem estimar que aquells gens que es trobaven induïts i que posseïen caixa, formaven part del reguló. En canvi, en el cas d'*E. coli*, els gens que es mostren en la Taula 3.5 com a induïts, s'ha demostrat que estan regulats directament per LexA, ja que posseeixen caixa SOS i a més es coneix el seu comportament en un mutant LexA(Ind⁻) (Courcelle *et al.*, 2001). D'aquesta manera, es pogué veure com la resposta SOS no és igual entre els membres del mateix grup filogenètic. Existeixen pocs gens que es trobin formant part d'aquesta resposta en els tres microorganismes analitzats. Mitjançant estudis bioinformàtics, en els quals es buscaren caixes SOS en diferents membres d'aquest grup, es va establir que el nucli de gens que conformen aquest reguló en els proteobacteris Gamma, està format per: *lexA*, *recA* i *recN* (Erill *et al.*, 2003). Els resultats obtinguts concorden amb aquest fet, però es va veure que *P. putida* compartia alguns gens més amb el reguló d'*E. coli* com ara: *dinP*, *uvrB*, *uvrD*, *yebG* i *sulA*. En canvi, altres gens força importants en el procés de reparació, com són els gens *ruvA* i *ruvB*, que participen en la resolució de les *Holliday junctions* en el procés de recombinació, no es trobaven controlats per LexA a *P. putida*. Més encara, els gens que formen l'operó *umuDC*, encarregats de la síntesi de translesió (TLS), no s'han pogut trobar en el genoma de *P. putida* ni en el de *P. aeruginosa* (Simonson *et al.*, 1990). L'absència d'aquests gens és un fet característic de tot el gènere *Pseudomonas*, per tant, aquests microorganismes deuen posseir altres mecanismes per continuar el procés de replicació quan existeixen múltiples lesions en el DNA. De fet, en algunes *Pseudomonas*, s'han trobat uns gens (*ruvA* i *ruvB*) que posseeixen homologia amb els gens *umuDC* i que a més, s'han relacionat amb un increment de la mutagènesi per l'efecte de la llum UV (Kim *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2004). *P. putida* però, no posseeix aquests gens, i sembla que és el gen *imuB* el responsable del procés de síntesi de translesió en aquest bacteri (Koorits *et al.*, 2007).

Per la seva banda, *P. aeruginosa* compartia pocs gens SOS amb *P. putida*: *dinP*, *yebG*, *recN*, i els operons *lexA-sulA*, *recA-recX* i *imuA-imuB-dnaE2*. Aquest últim operó, que es troba regulat per LexA2 a *P. putida*, a *P. aeruginosa* s'hi identificà una caixa com la d'*E. coli*, mantenint-se així la seva

regulació dins de l'operó LexA, ja que *P. aeruginosa* només posseeix una còpia del gen *lexA*, i aquest reconeix la caixa d'*E. coli*. La diferència que es trobà entre *P. putida* i *P. aeruginosa* pel que fa als gens regulats per LexA, es pot deure al fet que els seus nínxols ecològics són molt diferents, ja que el primer és un bacteri que habita principalment al sòl, mentre que l'altre és un bacteri patogen. De totes maneres, es necessitaria un estudi més acurat sobre *P. aeruginosa*, per tenir una idea més precisa del seu sistema SOS.

A més, el sistema SOS de *P. putida* contenia una sèrie de gens que no es trobaven regulats per LexA en els altres microorganismes. Entre ells cal destacar els gens *topB* i *endA-1*, relacionats amb el metabolisme del DNA, però també existien múltiples proteïnes hipotètiques de funció desconeguda.

3.7. Funcions del gen PP3901

Com ja s'ha dit, el gen PP3901 és l'únic que posseïa la doble regulació tant per LexA1 com per LexA2, i a més, tenia un dels factors d'inducció més elevats de tot el *microarray*. Fou per això que s'estudià la seva funció ja que estava anotat com a proteïna hipotètica. Cal destacar que aquest gen es trobava just en la zona final dels gens fàgics que s'indueïen per dany en el DNA en la soca salvatge. Fou per això que s'hipotetitzà que podria tenir un paper important en la regulació del profag, i per aquesta raó es construï un mutant defectiu per aquest gen.

3.7.1. Construcció d'un mutant PP3901(Def)

Mitjançant els oligonucleòtids 1241PP3901 i -996PP3901 es va fer una PCR per obtenir un fragment de 2.254 pb, que contenia el gen PP3901, i es clonà al vector pGEM-T. Un cop seqüenciat es va interrompre el gen amb el casset de resistència a Km i tota la construcció es clonà al vector pUA658. El plasmidi resultant (pUA1104) fou transferit a la soca salvatge de *P. putida* per conjugació, i se seleccionaren els dobles recombinants, que havien incorporat el gen mutant perdent la còpia salvatge.

Un cop obtingut el mutant es va comparar el seu patró de creixement amb el de la soca salvatge i no s'apreciaren diferències importants (Figura 3.22).

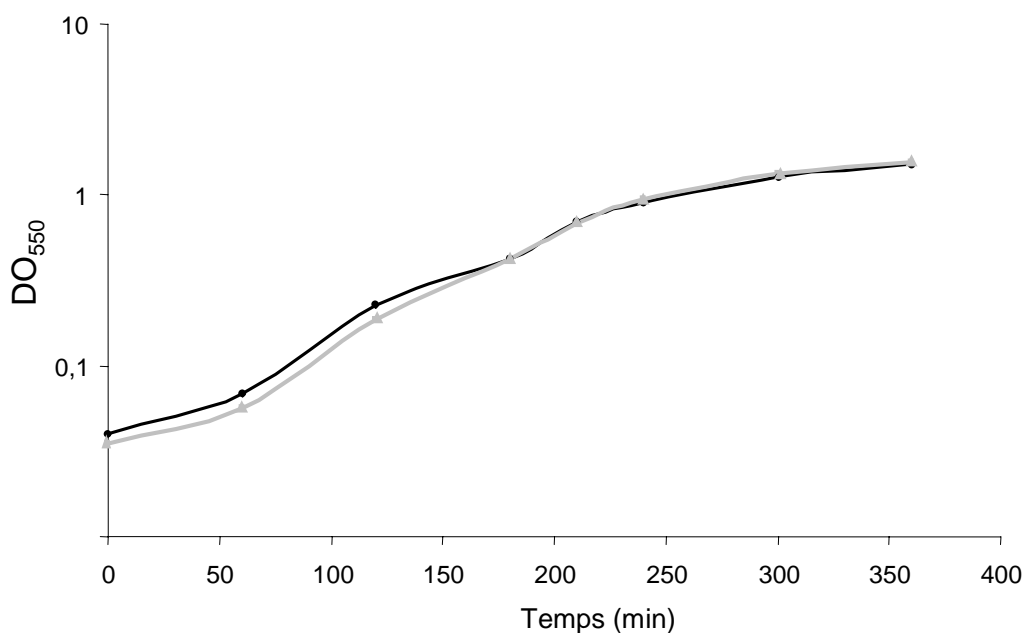


Figura 3.22. Corba de creixement d'un cultiu salvatge de *P. putida* (*) i d'un cultiu mutant PP3901(Def) (•).

Seguidament, es va tractar la soca mutant PP3901(Def) amb MMC seguint el mateix protocol que s'havia dut a terme per la soca salvatge de *P. putida* (Apartat 3.2) per tal d'obtenir l'RNA d'aquesta soca mutant. Aquest RNA fou analitzat per RT-PCR quantitativa a temps real per veure si els gens de la zona del profag que s'indueïa en la soca salvatge, també s'indueïen en aquesta soca. Per mesurar la transcripció dels gens fàgics es van utilitzar els oligonucleòtids PP3873upRT, PP3873dwRT, PP3894upRT i PP3894dwRT. Aquests oligonucleòtids hibridaven en la zona codificant dels gens PP3873 i PP3894, dos gens fàgics que s'indueïen força en el cultiu salvatge tractat amb MMC. Els resultats de la RT-PCR ens indicaren que no hi havia canvis en el patró d'expressió d'aquests gens en el mutant PP3901(Def) tant tractat com sense tractar amb MMC (Figura 3.23). En aquest experiment, i com a control positiu, es va mesurar l'expressió del gen *recA* que, com era d'esperar, es va induir en el cultiu tractat amb MMC (resultats no presentats). D'aquesta manera es pogué determinar que, tot i la presència de danys en el DNA, la soca mutant no induïa aquests gens del profag, demostrant-se la vinculació del PP3901 en la transcripció dels gens fàgics. Més encara, com que el gen PP3901 estava regulat pel LexA1 i el LexA2, i aquest gen estava implicat en la regulació de l'expressió dels gens fàgics, la inducció d'aquest profag era controlada indirectament per les proteïnes LexA1 i LexA2.

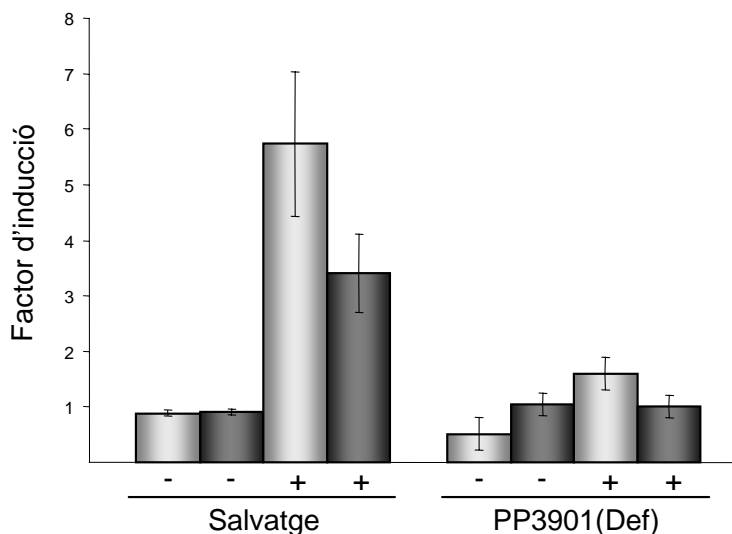


Figura 3.23 Factor d'inducció del gen PP3873 (gris) i PP3894 (negre) de la soca salvatge i de la mutant PP3901(Def) de *P. putida* mesurat per RT-PCR quantitativa a temps real. El factor d'inducció és el coeficient entre la concentració relativa d'RNA de cada gen en el cultiu tractat, respecte la del cultiu salvatge no tractat. Els símbols (+) o (-) representen presència o no de MMC respectivament.

Per tal de veure si l'expressió dels gens del profag produïa algun efecte en el creixement de *P. putida*, es va comparar el creixement de la soca mutant PP3901(Def) respecte el de la soca salvatge, tractades amb MMC. Ambdós cultius es van fer créixer alhora, en presència de MMC, i es va mesurar el seu creixement a través de la terbolesa del cultiu (DO_{550}) (Figura 3.24). Inesperadament, el creixement d'ambdós cultius fou similar, i el fet que en el cultiu mutant no s'induïssin els gens del profag, no va fer que aquesta soca creixés millor, ja que era d'esperar que el cultiu salvatge s'acabés lisant per l'efecte de la inducció del profag.

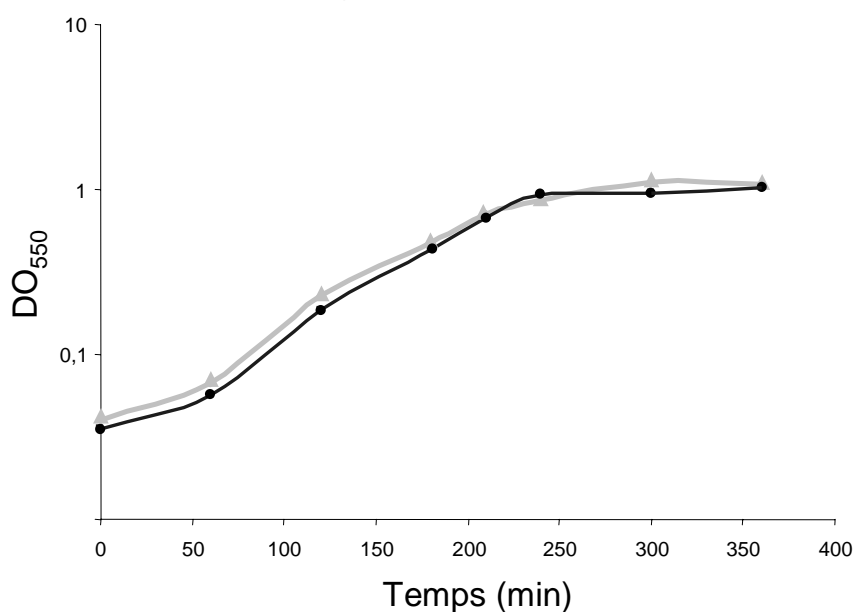


Figura 3.24. Corba de creixement d'un cultiu salvatge de *P. putida* (▲) i d'un cultiu mutant PP3901(Def) (●) tractats amb 20µg/ml de MMC.

Per últim, es va comparar el creixement de les soques salvatge i mutant en un experiment de *fitness*. En aquest assaig es van fer créixer les dues soques en un mateix cultiu, durant un període llarg de temps, per comprovar si una soca era capaç de desplaçar a l'altre. Això es donaria si una soca creixia millor que l'altre i per tant, tenia una millor *fitness* (Figura 3.25). De nou, la soca mutant no va demostrar tenir cap avantatge sobre la soca salvatge, sinó que més aviat al contrari, al final de l'experiment era la soca salvatge la que donava lloc a un lleuger desplaçament de la mutant.

Les dades de creixement i de *fitness* demostraren que la inducció del profag no tenia un efecte deleteri sobre *P. putida*, sinó que semblaria que el profag no és capaç de formar partícules víriques que produeixin la lisi de la cèl·lula. Aquest no és un cas únic, ja que s'ha vist que quan es tracta *P. fluorescens* amb MMC, també s'indueix un *cluster* de gens fàgics, però aquests no arriben a formar partícules víriques (Jin *et al.*, 2007). Aquest però, era un profag diferent del que es trobà a *P. putida*. Analitzant els gens del profag que s'indueixen a *P. putida*, es va veure com aquest també era un profag defectiu, ja que li mancaven gens essencials per dur a terme el cicle lític, com ara el gen que li permet escindir-se del cromosoma bacterià. Aquest gen és essencial per a poder formar partícules víriques en cèl·lules lisogèniques (Cali *et al.*, 2004).

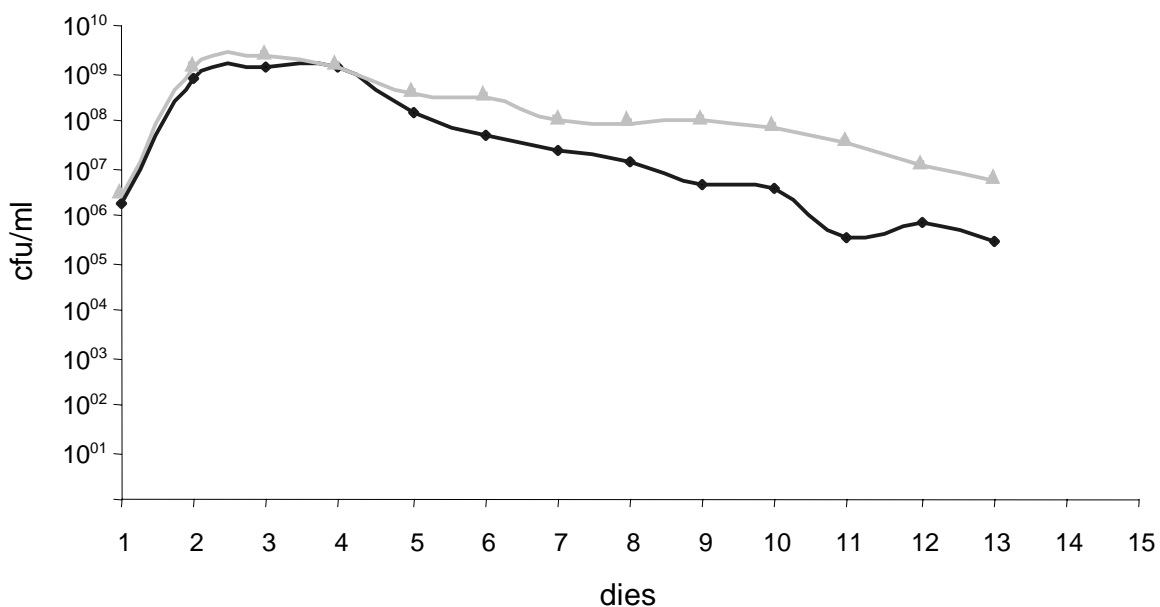


Figura 3.25. Assaig de *fitness* d'un cultiu salvatge de *P. putida* (▲) i d'un cultiu mutant PP3901(Def) (●) crescuts conjuntament.

3.8. Regulació dels gens fàgics

Els resultats obtinguts amb el mutant PP3901(Def) indicaren que aquest gen és necessari per la inducció dels gens fàgics. Malgrat això, en els mutants *lexA1*(Def) i *lexA2*(Def) sense tractar amb MMC, no hi havia un increment de la transcripció d'aquests gens respecte la soca salvatge. Això era així tot i que en aquests mutants hi havia un increment en l'expressió del gen PP3901, i fou per això, que es va voler veure si el tractament amb MMC de les soques mutants *lexA1*(Def) i *lexA2*(Def), feia induir l'expressió dels gens del profag. Seguint el protocol descrit en l'Apartat 3.2, es van tractar els cultius d'ambdues soques amb MMC i se'n va extreure l'RNA. Aquests RNAs es van utilitzar en una RT-PCR quantitativa a temps real per mesurar l'expressió dels dos gens fàgics PP3873 i PP3894. L'expressió d'ambdós gens es va veure induïda en les dues soques tractades amb MMC, demostrant-se de nou, que el tractament amb MMC era necessari per a la inducció d'aquests gens (Figura 3.26). El mateix experiment es dugué a terme amb la soca doble mutant *lexA1*(Def) *lexA2*(Def), amb resultats similars.

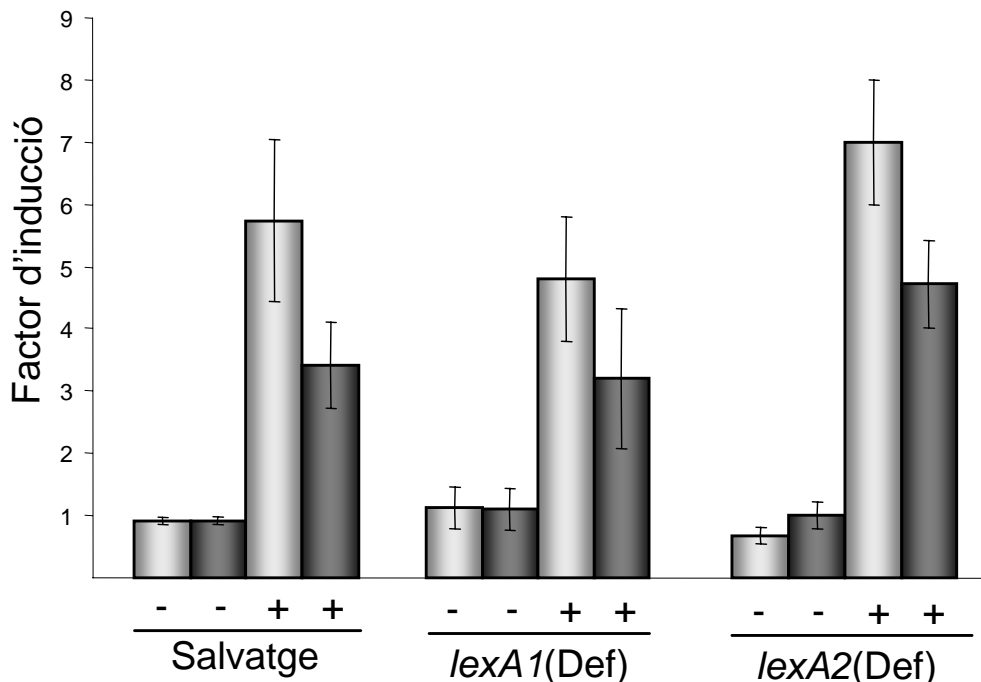


Figura 3.26. Factor d'inducció dels gens PP3873 (gris) i PP3894 (negre) de la soca salvatge i de les mutants *lexA1*(Def) i *lexA2*(Def) de *P. putida* mesurat per RT-PCR quantitativa a temps real. El factor d'inducció és el coeficient entre la concentració relativa d'RNA de cada gen en el cultiu tractat, respecte la del cultiu salvatge no tractat. Els símbols (+) o (-) representen addició o no de MMC respectivament.

Veient aquests resultats, semblaria que el mecanisme de regulació del profag de *P. putida*, seria similar al dels bacteriòfags regulats per Tum. La proteïna PP3901, a l'igual que la proteïna Tum, és una proteïna petita que es troba codificada en una zona pròxima als gens *cl* i *cro*. A més, la proteïna *cl* d'aquest bacteriòfag no presenta la regió de trencament Ala-Gly, tal i com passa en els bacteriòfags regulats per Tum. Malgrat això, la seqüència aminoacídica de la proteïna PP3901 no presenta homologia amb les proteïnes Tum descrites fins ara. D'aquesta manera, sembla que en aquest cas el mecanisme d'activació del cicle lític del profag és diferent als descrits fins ara, i es necessitaria com a mínim la proteïna PP3901 i algun altre factor que es desencadena quan hi ha un agent que lesiona el DNA en el medi.

4. Discussió

4. Discussió

La resposta SOS ha estat estudiada àmpliament en diferents espècies bacterianes com ara *E. coli* (Fernandez de Henestrosa *et al.*, 2000; Courcelle *et al.*, 2001; Khil *et al.*, 2002), *P. aeruginosa* (Brazas *et al.*, 2005), o els bacteris grampositius *B. subtilis* (Au *et al.*, 2005) i *S. aureus* (Cirz *et al.*, 2007). En tots ells s'ha descrit una única còpia del gen *lexA*, responsable de controlar l'expressió de tots els gens del reguló SOS. En canvi, a *P. putida* s'ha descrit la presència de dues còpies del gen *lexA*, anomenades *lexA1* i *lexA2* (Nelson *et al.*, 2002). Això ens ha portat a estudiar la coexistència d'aquests dos gens en un mateix organisme. El treball realitzat demostra que *P. putida* posseeix dos gens *lexA* funcionals i independents. Ambdós LexA s'autorregulen però cada un d'ells reconeix una seqüència de DNA diferent. Així, el LexA1 reconeix una seqüència de DNA, del seu promotor, que és homòloga a la seqüència consens de la caixa SOS d'*E. coli* (CTGTN₈ACAG); mentre que el LexA2 reconeix una seqüència similar a la caixa SOS descrita pel grup dels cianobacteris (AGTACN₄GTGCT). La proteïna LexA1 és per tant, similar a la proteïna LexA dels altres membres del grup dels proteobacteris Gamma, mentre que la proteïna LexA2 posseeix algunes diferències. Aquests gens es troben organitzats en el genoma de tal manera que el *lexA1* forma tàndem amb el gen *sulA*; i el *lexA2* forma unitat transcripcional amb els gens *imuA*, *imuB* i *dnaE2*. S'ha vist que els gens que formen aquest casset estan controlats únicament per la proteïna LexA2 i que la seva expressió incrementa si hi ha danys en el DNA. La presència de dues còpies del gen *lexA* que reconeixen seqüències d'unió diferents, no és habitual, però s'ha pogut descriure també en altres *Pseudomonas* (*Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens*) i també en *Xanthomonas campestris* i *Xanthomonas axonopodis* (Yang *et al.*, 2002; Abella *et al.*, 2004). En tots aquests microorganismes el gen *lexA2* està precedit pels gens que formen el casset, *imuA*, *imuB* i *dnaE2*, i en el seu promotor es manté la seqüència d'unió descrita pel LexA2 de *P. putida*.

D'aquesta manera, semblà raonable pensar que aquest casset hagués arribat a *P. putida*, i als altres bacteris que posseeixen dues còpies del gen *lexA*, per mitjà de transferència gènica horitzontal. Això ho corroboraria el fet que la proteïna LexA2 sigui més semblant a la proteïna LexA2 dels altres bacteris que tenen dos LexAs, que a la proteïna LexA del seu grup (Abella *et al.*, 2004), i que a més, reconegui una seqüència de DNA diferent. De fet, s'ha especulat sobre la possibilitat que un bacteri del grup dels cianobacteris fos el donador d'aquest casset degut a la similitud entre la seqüència reguladora del LexA2 de *P. putida* i la del LexA dels cianobacteris (Abella *et al.*, 2004). Malgrat tot, no s'ha pogut trobar el casset en cap dels genomes dels cianobacteris estudiats fins ara. Així el donador del casset podria ser un cianobacteri que encara no s'ha seqüenciat o algun organisme relacionat amb ells. Semblaria, doncs, que l'origen del casset es trobaria en un antecessor dels proteobacteris Gamma, i que s'hauria donat algun procés de reorganització gènica per obtenir el casset actual.

A més, un casset format pels gens *imuA*, *imuB* i *dnaE2* s'ha trobat en altres grups de proteobacteris, tot i que amb variacions en la seqüència reguladora del seu promotor. En la majoria dels casos per tant, el gen *lexA2*, no hi és present, fent que la regulació dels gens *imuA*, *imuB* i *dnaE2*, depengui del *lexA* que ja posseeix el bacteri (Abella *et al.*, 2004; Brazas *et al.*, 2005). Així, aquests gens es troben sempre sota el control del sistema SOS. L'estructuració del casset sense el gen *lexA* en aquests microorganismes també es podria explicar per transferència genètica horitzontal directament dels gens *imuA*, *imuB* i *dnaE2* que ja contenen la seqüència reguladora modificada, com és el cas de *P. aeruginosa*.

Recentment, però, s'ha analitzat més detalladament la presència d'aquest casset en diferents grups filogenètics (Erill *et al.*, 2006). S'ha trobat que un derivat d'aquest casset format pels gens *imuA'*, *imuB* i *dnaE2* (on *imuA'* és un homòleg del gen *recA*) és present en diferents grups bacterians anteriors als proteobacteris. Al llarg de l'evolució, aquest casset sembla haver patit una substitució del gen *imuA'* pel gen *imuA* present en els proteobacteris. D'aquesta manera, l'existència d'aquest casset, present en els proteobacteris Delta i Alfa i en alguns Gamma i Beta, seria a través d'herència vertical. Aquesta possibilitat la demostra el fet que el contingut en GC del casset no és diferent al del propi

microorganisme, fet que passaria si el casset tingués un origen horitzontal. La presència d'un casset format pels gens *lexA*, *imuA*, *imuB* i *dnaE2* és poc habitual i només s'ha trobat en alguns proteobacteris Gamma i Beta. En aquests casos sempre hi ha dues còpies del gen *lexA* en el genoma, de manera que es pot hipotetitzar que el *lexA* present en el casset prové d'una duplicació gènica ancestral, ja que conserva una caixa d'unió poc evolucionada. En el cas de *P. putida*, el gen *lexA2* no comparteix una gran homologia amb el *lexA* dels Cianobacteris (Abella *et al.*, 2004), fet que descartaria la hipòtesi de la transferència gènica horitzontal, ja que a més, s'hauria d'haver donat en moltes espècies bacterianes diferents de forma independent. Ara bé, La presència d'aquesta segona còpia del gen *lexA* permet explicar l'evolució en la seqüència reguladora, ja que permetria que una de les dues còpies del gen anés evolucionant mentre que l'altre mantindria la regulació dels gens SOS. De totes maneres l'existència de dues còpies del gen *lexA* no sembla ser avantatjós a llarg termini, ja que la majoria d'espècies bacterianes només en conserven una.

En qualsevol cas, la presència d'aquest casset en múltiples grups de proteobacteris, en els quals sempre es troba regulat per la proteïna LexA, demostra la seva importància dins la resposta SOS. A més, espècies que no tenen *lexA* tampoc posseeixen aquest casset (Erill *et al.*, 2006). El fet que aquests gens estiguin sempre controlats per LexA es deu al fet que es troben implicat en el procés de la mutagènesi SOS (TLS) (Galhardo *et al.*, 2005), i per tant és important regular-ne l'expressió ja que si no disminueix la *fitness* cel·lular (Kim *et al.*, 1997). Estudis recents han analitzat el paper dels gens *imuB* i *dnaE2* a *P. putida* (Koorits *et al.*, 2007). Així, s'ha vist que ambdós gens tenen funcions oposades: l'*imuB* fa incrementar la taxa de mutagènesi, mentre que la *dnaE2* la fa disminuir. La implicació d'aquest casset en el procés de la mutagènesi és especialment important en gèneres com *Pseudomonas*, en el qual no s'han trobat homòlegs al gens *umuDC*, principals responsables de la mutagènesi SOS a *E. coli*. Així, sembla que els gens d'aquest casset supleixen les funcions dels gens *umuDC*. A més, s'ha vist que les famílies que posseeixen l'operó *umDC* (com ara els enterobacteris), no conserven els gens *imuA*, *imuB* i *dnaE2* en el seu genoma (Erill *et al.*, 2006). La presència de

l'operó *umuDC* en aquestes famílies explicaria l'absència del casset, ja que ofereix una via alternativa per dur a terme el procés de la mutagènesi adaptativa, fent que la presència dels gens *imuA*, *imuB* i *dnaE2* fos redundant.

Els resultats obtinguts fins ara apuntaven a que la resposta SOS de *P. putida* estava controlada principalment pel LexA1, ja que és aquest el que es manté en tots els membres del grup dels proteobacteris Gamma. De totes maneres, per tal de veure el paper de cada un dels gens *lexA* de *P. putida* en la regulació dels gens SOS, es va analitzar l'expressió gènica d'un mutant *lexA1(Def)* i d'un *lexA2(Def)*. Així, es va trobar que existeixen quatre grups de gens dins la resposta SOS de *P. putida*: i) gens controlats per LexA1, ii) gens controlats per LexA2, iii) gens doblement regulats per LexA1 i LexA2, i iv) gens controlats indirectament per LexA1 i LexA2 que només es transcriuen quan hi ha danys al DNA. El reguló del LexA1 és el més gran i controla la majoria de gens relacionats amb la resposta SOS, mentre que el LexA2 només controla el casset anteriorment estudiat i el gen PP3901. Aquest gen forma part del reguló d'ambdues proteïnes LexA, però s'ha vist que la seva regulació depèn principalment de la proteïna LexA1. Aquest fet confirma la hipòtesi que el gen *lexA2* és un vestigi, probablement fruit d'una duplicació gènica ancestral, i que l'evolució ha portat que els gens SOS fossin regulats per la proteïna LexA1. Així, el reguló del LexA2 (que reconeix una seqüència SOS menys evolucionada) ha quedat pràcticament reduït al control de la seva pròpia expressió.

La resposta SOS de *P. putida*, difereix de la descrita en altres microorganismes del grup dels proteobacteris Gamma, com ara *E. coli*, sobretot en la quantitat i diversitat de gens que la componen. Així, tot i l'estreta relació filogenètica que existeix entre ambdós microorganismes, les diferències presents en els seus sistemes SOS demostren que aquest és un sistema molt variable. Més encara, aquestes diferències també es troben quan es compara *P. putida* amb membres del mateix gènere com ara *P. aeruginosa* o *P. fluorescens*, en els que s'ha pogut veure que també existeixen diferències importants dins dels seus respectius sistemes SOS (Brazas *et al.*, 2005; Jin *et al.*, 2007). Això demostra que aquest és un sistema molt adaptable, probablement a causa de les diferents condicions de vida de cada

microorganisme, així com al nivell i tipus d'agents lesius als quals estan sotmesos en els seus hàbitats.

Un fet comú en el comportament dels bacteris tractats amb agents lesius és l'activació de profags atenuats. *P. putida* no n'és una excepció, i quan és tractat amb MMC, s'incrementa l'expressió d'un *cluster* de gens relacionats amb funcions fàgiques. L'expressió d'aquests gens està regulada per la proteïna codificada en el locus PP_3901. Curiosament, aquest gen posseeix una doble regulació tant per LexA1, com per LexA2, cosa que fa pensar que una correcta regulació d'aquest gen és necessària pel bon funcionament de la cèl·lula. Malgrat tot, i a l'igual que passa a *P. fluorescens* (Jin *et al.*, 2007), l'expressió dels gens fàgics no porta a l'aparició de virions ni modifica el patró de creixement del bacteri. A més l'expressió dels gens fàgics no només està regulada per la proteïna codificada al locus PP_3901, sinó que es necessita algun altre factor per activar-ne l'expressió. Aquest factor només es manifesta quan hi ha danys en el DNA de la cèl·lula. Això fa pensar que aquest factor podria ser la proteïna RecA*, ja que s'ha descrit que és important per la regulació d'alguns profags (Dutreix *et al.*, 1985). De totes maneres, s'han trobat altres mecanismes d'inducció del cicle lític que són independents de RecA (Rozanov *et al.*, 1998) i també el sistema de regulació a través de la proteïna Tum. Existeixen per tant, múltiples mecanismes de regulació dels gens fàgics i sembla que en el cas de *P. putida* ens trobem davant d'un sistema nou no descrit fins ara.

Aquesta regulació tan acurada de l'expressió dels gens fàgics, suggereix que aquests tenen un paper important dins la resposta SOS de *P. putida*. Així, podria ser que en comptes de tenir un efecte nociu per la viabilitat del bacteri, com és el cas de la majoria de profags, tinguessin algun efecte beneficiós per la supervivència en una situació d'estrès causada per agents genotòxics. La interacció entre la resposta SOS i els profags ja s'ha vist en altres estudis. En aquest sentit, el treball realitzat per Rubinstein *et al.* (1998), demostrà que la presència d'un profag en el genoma de *Bacillus subtilis* incrementa l'expressió dels gens SOS, mentre que la presència d'un mutant d'aquest mateix bacteriòfag disminueix la resposta SOS per sota dels nivells de la soca sense el profag. Així doncs, els gens codificats en profags residents poden ser importants per la *fitness* cel·lular. Més encara, molts dels factors de virulència

que permeten a un bacteri ser patogen, estan codificats en zones fàgiques (Brussow *et al.*, 2004). *P. putida* no és un bacteri patogen, però no és estrany pensar que la presència d'aquest bacteriòfag defectiu en el seu genoma, pot ser beneficiós per a la seva *fitness*; tal i com ho demostra l'experiment dut a terme amb una soca PP3901(Def), en el qual la soca salvatge presentava un millor comportament que la que no podia transcriure els gens del profag (Figura 3.25).

5. Conclusions

5. Conclusions

1. La caixa SOS de la proteïna LexA1 de *P. putida* és homòloga a la d'*E. coli*, mentre que la proteïna LexA2 reconeix una caixa similar a la dels cianobacteris.
2. El gen *lexA2* controla l'expressió d'un casset format pels gens *imuA*, *imuB* i *dnaE2*, amb els quals comparteix la mateixa unitat transcripcional. Aquest casset es troba àmpliament distribuït entre els proteobacteris gramnegatius.
3. Els gens *lexA1* i *lexA2* són induïbles per danys al DNA.
4. La resposta SOS de *P. putida* està formada per quatre grups de gens: gens controlats per LexA1; gens controlats per LexA2; gens controlats conjuntament per LexA1 i LexA2; i gens regulats indirectament per LexA1 i LexA2 que només es transcriuen quan hi ha danys al DNA.
5. Els gens principals de la resposta SOS de *P. putida* estan controlats per la proteïna LexA1 (que agrupa un total de 23 gens sota el seu contro), mentre que el reguló LexA2 és molt petit, controlant tan sols l'expressió de 5 genes.
6. L'expressió de la proteïna codificada pel locus PP_3901 està sota el control de LexA1 i LexA2, encara que la proteïna LexA1 té un efecte més determinant sobre la regulació d'aquest gen.
7. La proteïna codificada pel locus PP_3901 regula l'expressió dels gens d'un profag, ja que en un mutant PP3901(Def) no hi ha expressió del gens fàgics.
8. Per tal d'induir l'expressió dels gens del profag és necessària la proteïna PP3901, però també un altre factor que només es desencadena quan la cèl·lula és tractada amb mitomicina C. Aquest é un mecanisme d'inducció diferent als descrits fins ara.
9. L'expressió massiva dels gens fàgics no origina cap efecte deleteri apreciable sobre el comportament de les cèl·lules de *P. putida*.

6. Bibliografia

6. Bibliografia

Abella M., Erill I., Jara M., Mazon G., Campoy S., i Barbe J. (2004) Widespread distribution of a *lexA*-regulated DNA damage-inducible multiple gene cassette in the proteobacteria phylum. *Mol Microbiol* **54**: 212-222.

Aertsen A., i Michiels C.W. (2005) *Mrr* instigates the SOS response after high pressure stress in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **58**: 1381-1391.

Amer G.A., i Utkhede R.S. (2000) Development of formulations of biological agents for management of root rot of lettuce and cucumber. *Can J Microbiol* **46**: 809-816.

Anderson D.G., i Kowalczykowski S.C. (1998) Reconstitution of an SOS response pathway: Derepression of transcription in response to DNA breaks. *Cell* **95**: 975-979.

Anderson K.L., Roberts C., Disz T., Vonstein V., Hwang K., Overbeek R., *et al.* (2006) Characterization of the *Staphylococcus aureus* heat shock, cold shock, stringent, and SOS responses and their effects on log-phase mRNA turnover. *J Bacteriol* **188**: 6739-6756.

Au N., Kuester-Schoeck E., Mandava V., Bothwell L.E., Canny S.P., Chachu K., *et al.* (2005) Genetic composition of the *Bacillus subtilis* SOS system. *J Bacteriol* **187**: 7655-7666.

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., Nohmi T., Donnelly C.E., i Walker G.C. (1990a) Genetic analyses of cellular functions required for UV mutagenesis in *Escherichia coli*. *Basic Life Sci* **52**: 269-275.

Battista J.R., Ohta T., Nohmi T., Sun W., i Walker G.C. (1990b) Dominant negative *umuD* mutations decreasing RecA-mediated cleavage suggest roles for intact UmuD in modulation of SOS mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 7190-7194.

Beaber J.W., Hochhut B., i Waldor M.K. (2004) SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature* **427**: 72-74.

Bi E., i Lutkenhaus J. (1993) Cell division inhibitors SulA and MinCD prevent formation of the FtsZ ring. *J Bacteriol* **175**: 1118-1125.

Birnboim, H. C., y J. Doly. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**:1513-23.

Bisognano C., Kelley W.L., Estoppey T., Francois P., Schrenzel J., Li D., *et al.* (2004) A *recA*-LexA-dependent pathway mediates ciprofloxacin-induced fibronectin binding in *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* **279**: 9064-9071.

Black C.G., Fyfe J.A., i Davies J.K. (1998) Absence of an SOS-like system in *Neisseria gonorrhoeae*. *Gene* **208**: 61-66.

Brazas M.D., i Hancock R.E. (2005) Ciprofloxacin induction of a susceptibility determinant in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:3222-3227.

Brent R., i Ptashne M. (1981) Mechanism of action of the *lexA* gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: 4204-4208.

Brotcorne-Lannoye A., i Maenhaut-Michel G. (1986) Role of RecA protein in untargeted UV mutagenesis of bacteriophage lambda: Evidence for the requirement for the *dinB* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 3904-3908.

Brussow H, Canchaya C, Hardt WD. (2004) Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol Mol Biol Rev.* **68**:560-602. Review.

Bunny K., Liu J., i Roth J. (2002) Phenotypes of *lexA* mutations in *Salmonella enterica*: Evidence for a lethal *lexA* null phenotype due to the fels-2 prophage. *J Bacteriol* **184**: 6235-6249.

Calero S., Garriga X., i Barbe J. (1991) One-step cloning system for isolation of bacterial *lexA*-like genes. *J Bacteriol* **173**: 7345-7350.

Cali S., Spoldi E., Piazzolla D., Dodd I.B., Forti F., Deho G., i Ghisotti D. (2004) Bacteriophage P4 vis protein is needed for prophage excision. *Virology* **322**: 82-92.

Campoy S., Salvador N., Cortes P., Erill I., i Barbe J. (2005) Expression of canonical SOS genes is not under LexA repression in *Bdellovibrio bacteriovorus*. *J Bacteriol* **187**: 5367-5375.

Campoy S., Fontes M., Padmanabhan S., Cortes P., Llagostera M., i Barbe J. (2003) LexA-independent DNA damage-mediated induction of gene expression in *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* **49**: 769-781.

Campoy S., Mazon G., Fernandez de Henestrosa A.R., Llagostera M., Monteiro P.B., i Barbe J. (2002) A new regulatory DNA motif of the gamma subclass proteobacteria: Identification of the LexA protein binding site of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Microbiology* **148**: 3583-3597.

Casadaban MJ, Cohen SN. (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 U S A* **76**:4530-3.

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

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

Cirz R.T., Jones M.B., Gingles N.A., Minogue T.D., Jarrahi B., Peterson S.N., i Romesberg F.E. (2007) Complete and SOS-mediated response of *Staphylococcus aureus* to the antibiotic ciprofloxacin. *J Bacteriol* **189**: 531-539.

Courcelle C.T., Chow K.H., Casey A., i Courcelle J. (2006) Nascent DNA processing by RecJ favors lesion repair over translesion synthesis at arrested replication forks in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 9154-9159.

Courcelle J., i Hanawalt P.C. (2003) RecA-dependent recovery of arrested DNA replication forks. *Annu Rev Genet* **37**: 611-646.

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

Cox M.M. (2003) The bacterial RecA protein as a motor protein. *Annu Rev Microbiol* **57**: 551-577.

Cox M.M. (2001) Recombinational DNA repair of damaged replication forks in *Escherichia coli*: Questions. *Annu Rev Genet* **35**: 53-82.

Cox M.M. (1999) Recombinational DNA repair in bacteria and the RecA protein. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **63**: 311-366.

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

Demple B. (1997a) Study of redox-regulated transcription factors in prokaryotes. *Methods* **11**: 267-278.

Demple B. (1997b) Exploitation of oxygen. *Methods* **11**: 265-266.

Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**:6127-45.

Drees J.C., Lusetti S.L., i Cox M.M. (2004) Inhibition of RecA protein by the *Escherichia coli* RecX protein: Modulation by the RecA C terminus and filament functional state. *J Biol Chem* **279**: 52991-52997.

Dronkert M.L., i Kanaar R. (2001) Repair of DNA interstrand cross-links. *Mutat Res* **486**: 217-247.

Duarte F.T., Carvalho F.M., Bezerra e Silva U., Scortecci K.C., Blaha C.A., Agnez-Lima L.F., and Batistuzzo de Medeiros S.R. (2004) DNA repair in *Chromobacterium violaceum*. *Genet Mol Res* **3**: 167-180.

Dudas A., i Chovanec M. (2004) DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Mutat Res* **566**: 131-167.

Durbach S.I., Andersen S.J., i Mizrahi V. (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.

Dutreix M., Bailone A., i Devoret R. (1985) Efficiency of induction of prophage lambda mutants as a function of *recA* alleles. *J Bacteriol* **161**: 1080-1085.

Egelman E.H. (1998) Bacterial helicases. *J Struct Biol* **124**: 123-128.

Eisen J.A. (1995) The RecA protein as a model molecule for molecular systematic studies of bacteria: Comparison of trees of RecAs and 16S rRNAs from the same species. *J Mol Evol* **41**: 1105-1123.

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

Erill I., Campoy S., Mazon G., i Barbe J. (2006) Dispersal and regulation of an adaptive mutagenesis cassette in the bacteria domain. *Nucleic Acids Res* **34**: 66-77.

Erill I., Escribano M., Campoy S., i Barbe J. (2003) In silico analysis reveals substantial variability in the gene contents of the gamma proteobacteria LexA-regulon. *Bioinformatics* **19**: 2225-2236.

Erill I., Jara M., Salvador N., Escribano M., Campoy S., i Barbe J. (2004) Differences in LexA regulon structure among proteobacteria through in vivo assisted comparative genomics. *Nucleic Acids Res* **32**: 6617-6626.

Fellay, R., J. Frey, and H. Krisch. (1987). Interposon mutagenesis of soil and water bacteria: a family of DNA fragments designated for in vitro insertional mutagenesis of gram-negative bacteria. *Gene* **52**:147–154.

Ferentz A.E., Walker G.C., i Wagner G. (2001) Converting a DNA damage checkpoint effector (UmuD2C) into a lesion bypass polymerase (UmuD'2C). *EMBO J* **20**: 4287-4298.

Fernandez de Henestrosa A.R., Badiola I., Saco M., Perez de Rozas A.M., Campoy S., i Barbe J. (1997) Importance of the galE gene on the virulence of *Pasteurella multocida*. *FEMS Microbiol Lett* **154**: 311-316.

Fernandez de Henestrosa A.R., Rivera E., Tapias A., i Barbe J. (1998) Identification of the *Rhodobacter sphaeroides* SOS box. *Mol Microbiol* **28**: 991-1003.

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

Fick R. B. (1993) *Pseudomonas Aeruginosa* the Opportunist: Pathogenesis and Disease. CRC Press

Fogh R.H., Otteleben G., Ruterjans H., Schnarr M., Boelens R., i Kaptein R. (1994) Solution structure of the LexA repressor DNA binding domain determined by 1H NMR spectroscopy. *EMBO J* **13**: 3936-3944.

Frank E.G., Hauser J., Levine A.S., i Woodgate R. (1993) Targeting of the UmuD, UmuD', and MucA' mutagenesis proteins to DNA by RecA protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 8169-8173.

Friedberg E.C., Walker G.C., Siede W., Wood R.D., Schultz R.A., i Ellenberger T. (eds). (2005) DNA repair and mutagenesis, 2nd edn. Washington, DC: American Society for Microbiology Press.

Friedman N., Vardi S., Ronen M., Alon U., i Stavans J. (2005) Precise temporal modulation in the response of the SOS DNA repair network in individual bacteria. *PLoS Biol* **3**: e238.

Fuchs R.P., i Fujii S. (2007) Translesion synthesis in *Escherichia coli* : Lessons from the NarI mutation hot spot. *DNA Repair (Amst)* .

Fyfe J.A., i Davies J.K. (1990) Nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of the *recA* gene of *Neisseria gonorrhoeae*. *Gene* **93**: 151-156.

Galhardo RS, Rocha RP, Marques MV i Menck CF. (2005) An SOS-regulated operon involved in damage-inducible mutagenesis in *Caulobacter crescentus*. *Nucleic Acids Res* **33**: 2603-14.

Garriga X., Calero S., i Barbe J. (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.

Garrity G.M.(ed). (2005) Bergey's manual of systematic bacteriology volume 2 : The proteobacteria. New York: Springer-Verlag.

Goerke C., Koller J., i Wolz C. (2006) Ciprofloxacin and trimethoprim cause phage induction and virulence modulation in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 171-177.

Gonzalez M., i Woodgate R. (2002) The "tale" of UmuD and its role in SOS mutagenesis. *Bioessays* **24**: 141-148.

Groban E.S., Johnson M.B., Banky P., Burnett P.G., Calderon G.L., Dwyer E.C., *et al.* (2005) Binding of the *Bacillus subtilis* LexA protein to the SOS operator. *Nucleic Acids Res* **33**: 6287-6295.

Giuliodori A.M., Gualerzi C.O., Soto S.M., Vila J., and Tavio M.M. (2007) Review on bacterial stress topics. *Ann N Y Acad Sci* . (Acceptat per la seva publicació)

Hanahan D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* **166**:557-80.

Harmon F.G., Rehrauer W.M., i Kowalczykowski S.C. (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., i Aggarwal A.K. (1990) DNA recognition by proteins with the helix-turn-helix motif. *Annu Rev Biochem* **59**: 933-969.

Heide L., Melzer M., Siebert M., Bechthold A., Schroder J., i Severin K. (1993) Clarification of the *Escherichia coli* genetic map in the 92-minute region containing the *ubiCA* operon and the *plsB*, *dgk*, *lexA*, and *dinF* genes. *J Bacteriol* **175**: 5728-5729.

Heller R.C., i Marians K.J. (2007) Non-replicative helicases at the replication fork. *DNA Repair (Amst)* .

Herrero, M., V. de Lorenzo, and 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.

Hersh M.N., Ponder R.G., Hastings P.J., i Rosenberg S.M. (2004) Adaptive mutation and amplification in *Escherichia coli* : Two pathways of genome adaptation under stress. *Res Microbiol* **155**: 352-359.

Horii T., Ogawa T., Nakatani T., Hase T., Matsubara H., i Ogawa H. (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.

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

Hurstel S., Granger-Schnarr M., Daune M., i Schnarr M. (1986) In vitro binding of LexA repressor to DNA: Evidence for the involvement of the amino-terminal domain. *EMBO J* **5**: 793-798.

Ivancic-Bace I., Peharec P., Moslavac S., Skrobot N., Salaj-Smic E., i Brcic-Kostic K. (2003) RecFOR function is required for DNA repair and recombination in a RecA loading-deficient *recB* mutant of *Escherichia coli* . *Genetics* **163**: 485-494.

Jara M., Nunez C., Campoy S., Fernandez de Henestrosa A.R., Lovley D.R., i Barbe J. (2003) *Geobacter sulfurreducens* has two autoregulated *lexA* genes whose products do not bind the *recA* promoter: Differing responses of *lexA* and *recA* to DNA damage. *J Bacteriol* **185**: 2493-2502.

Jarosz D.F., Beuning P.J., Cohen S.E., i Walker G.C. (2007) Y-family DNA polymerases in *Escherichia coli* . *Trends Microbiol* **15**: 70-77.

Jin H., Retallack D.M., Stelman S.J., Hershberger C.D., i Ramseier T. (2007) Characterization of the SOS response of *Pseudomonas fluorescens* strain DC206 using whole-genome transcript analysis. *FEMS Microbiol Lett* **269**: 256-264.

Joardar V., Lindeberg M., Jackson R.W., Selengut J., Dodson R., Brinkac L.M., *et al.* (2005) Whole-genome sequence analysis of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1448A reveals divergence among pathovars in genes involved in virulence and transposition. *J Bacteriol* **187**: 6488-6498.

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

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

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

Kim J.J., i Sundin G.W. (2000) Regulation of the *ruAB* mutagenic DNA repair operon of *Pseudomonas syringae* by UV-B (290 to 320 nanometers) radiation and analysis of *ruAB*-mediated mutability in vitro and in planta. *J Bacteriol* **182**: 6137-6144.

Kim SR, Maenhaut-Michel G, Yamada M, Yamamoto Y, Matsui K, Sofuni T, Nohmi T, Ohmori H. (1997) Multiple pathways for SOS-induced mutagenesis in

Escherichia coli: an overexpression of *dinB/dinP* results in strongly enhancing mutagenesis in the absence of any exogenous treatment to damage DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**:13792-7.

Knegtel R.M., Fogh R.H., Otteleben G., Ruterjans H., Dumoulin P., Schnarr M., *et al.* (1995) A model for the LexA repressor DNA complex. *Proteins* **21**: 226-236.

Koch W., i Woodgate R. (1998) The SOS response. DNA damage and repair: DNA repair in prokaryotes and lower eukaryotes, pp. 107-134. ed. J.A. Nockoloff i M.F. Hoekstr (ed). Totowa, NJ.: Humana Press.

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

Kolodner R., Hall S.D., i Luisi-DeLuca C. (1994) Homologous pairing proteins encoded by the *Escherichia coli* *recE* and *recT* genes. *Mol Microbiol* **11**: 23-30.

Koorits L., Tegova R., Tark M., Tarassova K., Tover A., i Kivisaar M. (2007) Study of involvement of ImuB and DnaE2 in stationary-phase mutagenesis in *Pseudomonas putida*. *DNA Repair (Amst)* **6**: 863-868.

Kristensen C.S., Eberl L., Sanchez-Romero J.M., Givskov M., Molin S., i De Lorenzo V. (1995) Site-specific deletions of chromosomally located DNA segments with the multimer resolution system of broad-host-range plasmid RP4. *J Bacteriol* **177**: 52-58.

Kuban W., Jonczyk P., Gawel D., Malanowska K., Schaaper R.M., i Fijalkowska I.J. (2004) Role of *Escherichia coli* DNA polymerase IV in in vivo replication fidelity. *J Bacteriol* **186**: 4802-4807.

Kusano K., Takahashi N.K., Yoshikura H., i Kobayashi I. (1994) Involvement of RecE exonuclease and RecT annealing protein in DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Gene* **138**: 17-25.

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

Labazi M., del Rey A., Fernandez de Henestrosa A.R., i Barbe J. (1999) A consensus sequence for the Rhodospirillaceae SOS operators. *FEMS Microbiol Lett* **171**: 37-42.

Labib K., i Hodgson B. (2007) Replication fork barriers: Pausing for a break or stalling for time? *EMBO Rep* **8**: 346-353.

Lamont I., Brumby A.M., i Egan J.B. (1989) UV induction of coliphage 186: Prophage induction as an SOS function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 5492-5496.

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

Layton J.C., i Foster P.L. (2005) Error-prone DNA polymerase IV is regulated by the heat shock chaperone GroE in *Escherichia coli* . *J Bacteriol* **187**: 449-457.

Layton J.C., i Foster P.L. (2003) Error-prone DNA polymerase IV is controlled by the stress-response sigma factor, RpoS, in *Escherichia coli* . *Mol Microbiol* **50**: 549-561.

Lehmann A.R., i Fuchs R.P. (2006) Gaps and forks in DNA replication: Rediscovering old models. *DNA Repair (Amst)* **5**: 1495-1498.

Lehmann A.R., Niimi A., Ogi T., Brown S., Sabbioneda S., Wing J.F., *et al.* (2007) Translesion synthesis: Y-family polymerases and the polymerase switch. *DNA Repair (Amst)* .

Lewis L.K., Harlow G.R., Gregg-Jolly L.A., i Mount D.W. (1994) Identification of high affinity binding sites for LexA which define new DNA damage-inducible genes in *Escherichia coli* . *J Mol Biol* **241**: 507-523.

Little J.W. (1993) LexA cleavage and other self-processing reactions. *J Bacteriol* **175**: 4943-4950.

Little J.W. (1991) Mechanism of specific LexA cleavage: Autodigestion and the role of RecA coprotease. *Biochimie* **73**: 411-421.

Little J.W. (1984) Autodigestion of lexA and phage lambda repressors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 1375-1379.

- Little J.W., Kim B., Roland K.L., Smith M.H., Lin L.L., i Slilaty S.N. (1994) Cleavage of LexA repressor. *Methods Enzymol* **244**: 266-284.
- Lomba MR, Vasconcelos AT, Pacheco AB, de Almeida DF. (1997) Identification of yebG as a DNA damage-inducible *Escherichia coli* gene. *FEMS Microbiol Lett.* **156**:119-22.
- Lombardo M.J., Aponyi I., i Rosenberg S.M. (2004) General stress response regulator RpoS in adaptive mutation and amplification in *Escherichia coli* . *Genetics* **166**: 669-680.
- de Lorenzo V, Herrero M, Jakubzik U, Timmis KN. (1990) Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J Bacteriol* **172**:6568-72.
- Love P.E., Lyle M.J., i Yasbin R.E. (1985) DNA-damage-inducible (din) loci are transcriptionally activated in competent *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 6201-6205.
- Luo Y., Pfuetzner R.A., Mosimann S., Paetzel M., Frey E.A., Cherney M., *et al.* (2001) Crystal structure of LexA: A conformational switch for regulation of self-cleavage. *Cell* **106**: 585-594.
- Lusetti S.L., Drees J.C., Stohl E.A., Seifert H.S., i Cox M.M. (2004a) The DinI and RecX proteins are competing modulators of RecA function. *J Biol Chem* **279**: 55073-55079.

Lusetti S.L., Voloshin O.N., Inman R.B., Camerini-Otero R.D., i Cox M.M. (2004b) The DinI protein stabilizes RecA protein filaments. *J Biol Chem* **279**: 30037-30046.

Maiques E., Ubeda C., Campoy S., Salvador N., Lasa I., Novick R.P., *et al.* (2006) Beta-lactam antibiotics induce the SOS response and horizontal transfer of virulence factors in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **188**: 2726-2729.

Marques S., i Ramos J.L. (1993) Transcriptional control of the *Pseudomonas putida* TOL plasmid catabolic pathways. *Mol Microbiol* **9**: 923-929.

Mazon G., Lucena J.M., Campoy S., Fernandez de Henestrosa A.R., Candau P., i Barbe J. (2004) LexA-binding sequences in gram-positive and cyanobacteria are closely related. *Mol Genet Genomics* **271**: 40-49.

McCool J.D., Long E., Petrosino J.F., Sandler H.A., Rosenberg S.M., i Sandler S.J. (2004) Measurement of SOS expression in individual *Escherichia coli* K-12 cells using fluorescence microscopy. *Mol Microbiol* **53**: 1343-1357.

McGlynn P., i Lloyd R.G. (2002) Recombinational repair and restart of damaged replication forks. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 859-870.

McInerney P., i O'Donnell M. (2004) Functional uncoupling of twin polymerases: Mechanism of polymerase dissociation from a lagging-strand block. *J Biol Chem* **279**: 21543-21551.

Michan C., Manchado M., Dorado G., i Pueyo C. (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. M. (1992). A short course in bacterial genetics. Handbook. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.

Miller C., Thomsen L.E., Gaggero C., Mosseri R., Ingmer H., i Cohen S.N. (2004) SOS response induction by beta-lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. *Science* **305**: 1629-1631.

Miller M.C., Resnick J.B., Smith B.T., i Lovett C.M.,Jr. (1996) The *Bacillus subtilis dinR* gene codes for the analogue of *Escherichia coli* LexA. purification and characterization of the DinR protein. *J Biol Chem* **271**: 33502-33508.

Mohana-Borges R., Pacheco A.B., Sousa F.J., Foguel D., Almeida D.F., i Silva J.L. (2000) LexA repressor forms stable dimers in solution. the role of specific dna in tightening protein-protein interactions. *J Biol Chem* **275**: 4708-4712.

Moolenaar G.F., Moorman C., i Goosen N. (2000) Role of the *Escherichia coli* nucleotide excision repair proteins in DNA replication. *J Bacteriol* **182**: 5706-5714.

Moolenaar G.F., van Rossum-Fikkert S., van Kesteren M., i Goosen N. (2002) Cho, a second endonuclease involved in *Escherichia coli* nucleotide excision repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 1467-1472.

Moolenaar G.F., Visse R., Ortiz-Buysse M., Goosen N., i van de Putte P. (1994) Helicase motifs V and VI of the *Escherichia coli* UvrB protein of the UvrABC endonuclease are essential for the formation of the preincision complex. *J Mol Biol* **240**: 294-307.

Movahedzadeh F., Colston M.J., i Davis E.O. (1997) Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* LexA: Recognition of a cheo (bacillus-type SOS) box. *Microbiology* **143 (Pt 3)**: 929-936.

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

Neher S.B., Flynn J.M., Sauer R.T., i Baker T.A. (2003) Latent ClpX-recognition signals ensure LexA destruction after DNA damage. *Genes Dev* **17**: 1084-1089.

Nelson K.E., Weinel C., Paulsen I.T., Dodson R.J., Hilbert H., Martins dos Santos V.A., *et al.* (2002) Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* **4**: 799-808.

Nohmi T., Battista J.R., Dodson L.A., i Walker G.C. (1988) RecA-mediated cleavage activates UmuD for mutagenesis: Mechanistic relationship between transcriptional derepression and posttranslational activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 1816-1820.

Oertel-Buchheit P., Porte D., Schnarr M., i Granger-Schnarr M. (1992) Isolation and characterization of LexA mutant repressors with enhanced DNA binding affinity. *J Mol Biol* **225**: 609-620.

Oertel-Buchheit P., Lamerichs R.M., Schnarr M., i Granger-Schnarr M. (1990) Genetic analysis of the LexA repressor: Isolation and characterization of LexA(def) mutant proteins. *Mol Gen Genet* **223**: 40-48.

Oertel-Buchheit P., Reinbolt J., John M., Granger-Schnarr M., i Schnarr M. (1998) A LexA mutant repressor with a relaxed inter-domain linker. *Protein Sci* **7**: 512-515.

Oppenheim A.B., Kobiler O., Stavans J., Court D.L., i Adhya S. (2005) Switches in bacteriophage lambda development. *Annu Rev Genet* **39**: 409-429.

Opperman T., Murli S., Smith B.T., i Walker G.C. (1999) A model for a umuDC-dependent prokaryotic DNA damage checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 9218-9223.

O'Reilly E.K., i Kreuzer K.N. (2004) Isolation of SOS constitutive mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**: 7149-7160.

Pages V., i Fuchs R.P. (2003) Uncoupling of leading- and lagging-strand DNA replication during lesion bypass in vivo. *Science* **300**: 1300-1303.

Pieper D.H., Martins dos Santos V.A., and Golyshin P.N. (2004) Genomic and mechanistic insights into the biodegradation of organic pollutants. *Curr Opin Biotechnol* **15**: 215-224.

Rand L., Hinds J., Springer B., Sander P., Buxton R.S., i Davis E.O. (2003) The majority of inducible DNA repair genes in *Mycobacterium tuberculosis* are induced independently of RecA. *Mol Microbiol* **50**: 1031-1042.

Rangarajan S., Woodgate R., i Goodman M.F. (2002) Replication restart in UV-irradiated *Escherichia coli* involving pols II, III, V, PriA, RecA and RecFOR proteins. *Mol Microbiol* **43**: 617-628.

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

Rehrauer W.M., Lavery P.E., Palmer E.L., Singh R.N., i Kowalczykowski S.C. (1996b) 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.

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

del Rey A., Diestra J., Fernandez de Henestrosa A.R., i Barbe J. (1999) Determination of the *Paracoccus denitrificans* SOS box. *Microbiology* **145 (Pt 3)**: 577-584.

Riera J., i Barbe J. (1995) Cloning, sequence and regulation of expression of the *lexA* gene of *Aeromonas hydrophila*. *Gene* **154**: 71-75.

Riera J., i Barbe J. (1993) Sequence of the *Providencia rettgeri lexA* gene and its control region. *Nucleic Acids Res* **21**: 2256.

Roca A.I., i Cox M.M. (1990) The RecA protein: Structure and function. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **25**: 415-456.

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

Ronen M., Rosenberg R., Shraiman B.I., i Alon U. (2002) Assigning numbers to the arrows: Parameterizing a gene regulation network by using accurate expression kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 10555-10560.

Rozanov D.V., D'Ari R., i Sineoky S.P. (1998) RecA-independent pathways of lambdoid prophage induction in *Escherichia coli* . *J Bacteriol* **180**: 6306-6315.

Rubinstein CP, Guerchicoff A, Sanchez-Rivas C. (1998) Normal induction of the SOS response in *Bacillus subtilis* is prevented by the mutant repressor from phage phi 105cts23. *FEMS Microbiol Lett.* **167**:315-20.

Rudolph C.J., Upton A.L., i Lloyd R.G. (2007) Replication fork stalling and cell cycle arrest in UV-irradiated *Escherichia coli* . *Genes Dev* **21**: 668-681.

Sambrook J. i Russell D. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual* (3a ed.). Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N. Y.

- Sanger F., Nicklen S., i Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467.
- Sassanfar M., i Roberts J.W. (1990) Nature of the SOS-inducing signal in *Escherichia coli*. The involvement of DNA replication. *J Mol Biol* **212**: 79-96.
- Sattin B.D., i Goh M.C. (2004) Direct observation of the assembly of RecA/DNA complexes by atomic force microscopy. *Biophys J* **87**: 3430-3436.
- Sauer R.T., Yocum R.R., Doolittle R.F., Lewis M., i Pabo C.O. (1982) Homology among DNA-binding proteins suggests use of a conserved super-secondary structure. *Nature* **298**: 447-451.
- Schnarr M., Oertel-Buchheit P., Kazmaier M., i Granger-Schnarr M. (1991) DNA binding properties of the LexA repressor. *Biochimie* **73**: 423-431.
- Shearwin K.E., Brumby A.M., i Egan J.B. (1998) The Tum protein of coliphage 186 is an antirepressor. *J Biol Chem* **273**: 5708-5715.
- Shigekawa, K., y W. J. Dower. (1988). Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: a general approach to the introduction of macromolecules into cells. *Biotechniques* **6**:742-51.
- Silberstein Z., Tzfati Y., i Cohen A. (1995) Primary products of break-induced recombination by *Escherichia coli* RecE pathway. *J Bacteriol* **177**: 1692-1698.

Simonson C.S., Kokjohn T.A., i Miller R.V. (1990) Inducible UV repair potential of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *J Gen Microbiol* **136**: 1241-1249.

Slilaty S.N., i Little J.W. (1987) Lysine-156 and serine-119 are required for LexA repressor cleavage: A possible mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 3987-3991.

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

Springer B., Kidan Y.G., Prammananan T., Ellrott K., Bottger E.C., i Sander P. (2001) Mechanisms of streptomycin resistance: Selection of mutations in the 16S rRNA gene conferring resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 2877-2884.

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

Stover C.K., Pham X.Q., Erwin A.L., Mizoguchi S.D., Warrenner P., Hickey M.J., *et al.* (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**: 959-964.

Stumpf J.D., i Foster P.L. (2005) Polyphosphate kinase regulates error-prone replication by DNA polymerase IV in *Escherichia coli* . *Mol Microbiol* **57**: 751-761.

Sutton M.D., Kim M., i Walker G.C. (2001) Genetic and biochemical characterization of a novel *umuD* mutation: Insights into a mechanism for UmuD self-cleavage. *J Bacteriol* **183**: 347-357.

Sutton M.D., Smith B.T., Godoy V.G., i Walker G.C. (2000) The SOS response: Recent insights into *umuDC*-dependent mutagenesis and DNA damage tolerance. *Annu Rev Genet* **34**: 479-497.

Tang M., Shen X., Frank E.G., O'Donnell M., Woodgate R., i Goodman M.F. (1999) UmuD'(2)C is an error-prone DNA polymerase, *Escherichia coli* pol V. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 8919-8924.

Tang M., Bruck I., Eritja R., Turner J., Frank E.G., Woodgate R., *et al.* (1998) Biochemical basis of SOS-induced mutagenesis in *Escherichia coli*: Reconstitution of in vitro lesion bypass dependent on the UmuD'2C mutagenic complex and RecA protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 9755-9760.

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

Tapias A., Campoy S., i Barbe J. (2000) Analysis of the expression of the *Rhodobacter sphaeroides* *lexA* gene. *Mol Gen Genet* **263**: 957-965.

Tapias A., Fernandez de Henestrosa A.R., i Barbe J. (1997) Characterization of the promoter of the *Rhizobium etli* *recA* gene. *J Bacteriol* **179**: 1573-1579.

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

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

Timmis K.N. (2002) *Pseudomonas putida*: A cosmopolitan opportunist par excellence. *Environ Microbiol* **4**: 779-781.

Tomasz M. (1995) Mitomycin C: Small, fast and deadly (but very selective). *Chem Biol* **2**: 575-579.

Ubeda C., Maiques E., Tormo M.A., Campoy S., Lasa I., Barbe J., *et al.* (2007) SaPI operon I is required for SaPI packaging and is controlled by LexA. *Mol Microbiol* **65**: 41-50.

Ubeda C., Maiques E., Knecht E., Lasa I., Novick R.P., i Penades J.R. (2005) Antibiotic-induced SOS response promotes horizontal dissemination of pathogenicity island-encoded virulence factors in staphylococci. *Mol Microbiol* **56**: 836-844.

Validov S., Kamilova F., Qi S., Stephan D., Wang J.J., Makarova N., i Lugtenberg B. (2007) Selection of bacteria able to control *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in stonewool substrate. *J Appl Microbiol* **102**: 461-471.

Van Houten B., i Snowden A. (1993) Mechanism of action of the *Escherichia coli* UvrABC nuclease: Clues to the damage recognition problem. *Bioessays* **15**: 51-59.

Wackett L.P. (2003) *Pseudomonas putida*--a versatile biocatalyst. *Nat Biotechnol* **21**: 136-138.

Walker G.C. (ed). (1996) The SOS response of *Escherichia coli*. F. C. Neihardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaecheter, i H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and molecular biology. The SOS response of *Escherichia coli*, p. 1400-1416. Washington, D.C.: ASM Press.

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

Ward P.G., Goff M., Donner M., Kaminsky W., i O'Connor K.E. (2006) A two step chemo-biotechnological conversion of polystyrene to a biodegradable thermoplastic. *Environ Sci Technol* **40**: 2433-2437.

Weinel C., Nelson K.E., i Tummeler B. (2002) Global features of the *Pseudomonas putida* KT2440 genome sequence. *Environ Microbiol* **4**: 809-818.

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

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

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

Wojciechowski M.F., Peterson K.R., i Love P.E. (1991) Regulation of the SOS response in *Bacillus subtilis*: Evidence for a LexA repressor homolog. *J Bacteriol* **173**: 6489-6498.

Xing X, Bell CE. (2004) Crystal structures of *Escherichia coli* RecA in a compressed helical filament. *J Mol Biol.* **344**:1161.

Yang M.K., Yang Y.C., and Hsu C.H. (2002) Characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri LexA: Recognition of the LexA binding site. *Mol Genet Genomics* **268**: 477-487.

Yellaboina S., Seshadri J., Kumar M.S., and Ranjan A. (2004) PredictRegulon: A web server for the prediction of the regulatory protein binding sites and operons in prokaryote genomes. *Nucleic Acids Res* **32**: W318-20.

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

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

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

Yuste L, Hervas AB, Canosa I, Tobes R, Jimenez JI, Nogales J, Perez-Perez MM, Santero E, Diaz E, Ramos JL, de Lorenzo V, Rojo F. (2005) Growth phase-dependent expression of the *Pseudomonas putida* KT2440 transcriptional machinery analysed with a genome-wide DNA microarray. *Environ Microbiol.* **8**:165-77.

Zhang S., i Sundin G.W. (2004) Mutagenic DNA repair potential in *Pseudomonas* spp., and characterization of the *ruIABPc* operon from the highly mutable strain *Pseudomonas cichorii* 302959. *Can J Microbiol* **50**: 29-39.

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

Zou Y., Walker R., Bassett H., Geacintov N.E., i Van Houten B. (1997) Formation of DNA repair intermediates and incision by the ATP-dependent UvrB-UvrC endonuclease. *J Biol Chem* **272**: 4820-4827.

7. Annex

Widespread distribution of a *lexA*-regulated DNA damage-inducible multiple gene cassette in the Proteobacteria phylum

Marc Abella,^{1†} Ivan Erill,^{2†} Mónica Jara,¹
Gerard Mazón,¹ Susana Campoy³ and Jordi Barbé^{1,3*}

¹Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain.

²Biomedical Applications Group, Centro Nacional de Microelectrónica, 08193 Bellaterra, Spain.

³Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA), 08193 Bellaterra, Spain.

Summary

The SOS response comprises a set of cellular functions aimed at preserving bacterial cell viability in front of DNA injuries. The SOS network, negatively regulated by the LexA protein, is found in many bacterial species that have not suffered major reductions in their gene contents, but presents distinctly divergent LexA-binding sites across the Bacteria domain. In this article, we report the identification and characterization of an imported multiple gene cassette in the Gamma Proteobacterium *Pseudomonas putida* that encodes a LexA protein, an inhibitor of cell division (SulA), an error-prone polymerase (DinP) and the alpha subunit of DNA polymerase III (DnaE). We also demonstrate that these genes constitute a DNA damage-inducible operon that is regulated by its own encoded LexA protein, and we establish that the latter is a direct derivative of the Gram-positive LexA protein. In addition, *in silico* analyses reveal that this multiple gene cassette is also present in many Proteobacteria families, and that both its gene content and LexA-binding sequence have evolved over time, ultimately giving rise to the *lexA* lineage of extant Gamma Proteobacteria.

Introduction

Bacterial cells contain several pathways involved in DNA repair. Although most of them target specific DNA lesions

(i.e. oxidative damage or presence of alkyl radicals in DNA), a global DNA damage response system is present in most bacteria. The LexA-mediated SOS response, first described and thoroughly studied in *Escherichia coli* (Walker, 1984), is addressed to guarantee cell survival when massive DNA damage is introduced and the normal DNA replication of the bacterial cell is disturbed. The *E. coli* SOS network comprises at least 40 genes that are under direct control of the *lexA* and *recA* genes, which are also members of this network (Fernández de Henestrosa *et al.*, 2000; Courcelle *et al.*, 2001; Khil and Camerini-Otero, 2002). Many of the *E. coli* SOS genes have been associated to a particular cellular process, such as transitory inhibition of cell division (*sulA*), error-prone replication (*umuDC* and *dinP*) or excision repair (*uvrAB*). In the absence of DNA injuries, the *E. coli* LexA protein binds specifically to a regulatory motif with consensus sequence CTG₆TN₆ACAG (the *E. coli* SOS box), thereby effectively blocking transcription of SOS genes (Walker, 1984). Conversely, in the advent of DNA damage the RecA protein acquires an active conformation (RecA*) after binding to single-stranded DNA fragments generated either by DNA damage-mediated replication inhibition or by enzymatic processing of broken DNA ends (Sassanfar and Roberts, 1990). Upon activation, RecA* promotes autocatalytic cleavage of the Ala⁸⁴-Gly⁸⁵ bond of *E. coli* LexA (Little, 1991). This cleavage, mediated by LexA residues Ser¹¹⁹ and Lys¹⁵⁶, is similar in mechanism to that observed for serine proteases (Little, 1991; Luo *et al.*, 2001) and effectively prevents LexA from binding SOS regulatory motifs, thus resulting in a global induction of the SOS response. After removal of DNA lesions, RecA* concentration declines and non-cleaved LexA protein returns to its usual levels, inhibiting again the expression of SOS genes.

The LexA protein is, with some notable exceptions, widely distributed across the Bacterial Domain. Presence of the *E. coli* SOS box in the promoter region of DNA damage-inducible genes has been described in several families of the Gamma Proteobacteria, such as *Pseudomonaceae*, *Aeromonadaceae*, *Vibrionaceae* and *Pasteurellaceae*, and even in some Beta Proteobacteria (e.g. *Ralstonia solanacearum*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella parapertussis* or *Burkholderia cepacia*). Moreover, *in silico* analyses have shown that LexA controls a

Accepted 10 June, 2004. *For correspondence. E-mail jordi.barbe@uab.es; Tel. (+34) 93 581 1837; Fax (+34) 93 581 2387. †M. Abella and I. Erill should be regarded as joint first authors in this work.

regulon of 10–40 genes in these species (Erill *et al.*, 2003). However, the *E. coli* LexA-binding sequence is not preserved in other bacterial groups where LexA-dependent DNA damage-inducible activity has been reported. For instance, Alpha Proteobacteria possess a markedly divergent LexA-binding motif, with a GTTCN₇GTTC direct repeat consensus sequence that is monophyletic for this class (Fernández de Henestrosa *et al.*, 1998; Tapias and Barbé, 1999). Similarly, all Gram-positive bacteria studied so far display a highly conserved LexA recognition motif with the CGAACRNRYGTTYC consensus sequence (Winterling *et al.*, 1998; Davis *et al.*, 2002). Nevertheless, this motif is not exclusive of Gram-positive bacteria, because it has been demonstrated to be also the LexA-binding motif in some Gram-negative phyla, such as the Green non-sulphur bacteria (Fernández de Henestrosa *et al.*, 2002). Likewise, the Cyanobacteria LexA-binding sequence (RGTACNNNDGTWCB) seems to be a direct derivative of the Gram-positive one (Mazón *et al.*, 2004).

Even though it is not the usual situation, duplicity of SOS regulatory genes has been described for a number of bacteria spanning different phyla. *Myxococcus xanthus*, for instance, presents two copies of the *recA* gene, but only one of these two *recA* genes (*recA1*) is DNA damage inducible (Norioka *et al.*, 1995). Even so, in the promoter region of the *M. xanthus recA2* gene, a mutant derivative sequence of the *M. xanthus* LexA-binding motif is still present (Campoy *et al.*, 2003). In a similar case, *Geobacter sulphurreducens* presents two copies of the *lexA* gene, encoding each a functional LexA protein able to recognize the same DNA binding sequence in both promoters: GGTTN₂CN₄GN₃ACC (Jara *et al.*, 2003). Although both these instances of gene duplicity could be attributed either to a gene duplication event or to lateral gene transfer (LGT), the close similarities between the duplicated proteins and their LexA-binding sites suggest that this duplicity is a consequence of the former.

In contrast, the Gamma Proteobacteria *Pseudomonas putida* presents a case of *lexA* duplicity that cannot be readily explained as a consequence of a gene duplication event. It has been demonstrated that *P. putida* has a *lexA* gene (*lexA1*) whose product binds an *E. coli*-like SOS box (Calero *et al.*, 1991) and that is placed upstream of a *sulA*-like (*sulA1*) gene (Weinel *et al.*, 2002). Recently, however, complete sequencing of the *P. putida* genome has revealed the presence of a second *lexA* gene (*lexA2*) in this organism (Weinel *et al.*, 2002), but *in silico* screening of the whole *P. putida* chromosome has shown that this *lexA2* gene does not present any *E. coli*-like SOS motifs in its promoter sequence (Erill *et al.*, 2003). In the present work, this *lexA2* gene of *P. putida* has been cloned, and its encoded product has been characterized to analyse both its origin and its relationship with the LexA protein of other bacterial species. The results here obtained demon-

strate that the *P. putida lexA2* gene is the first gene of an imported polycistronic transcriptional operon to which three other genes involved in DNA repair belong and whose expression is under direct control of its own product: the LexA2 protein. Furthermore, this operon and closely related derivatives are widespread in the Proteobacteria Phylum.

Results

Transcriptional organization of the P. putida chromosomal region containing the lexA2 gene

Immediately downstream the *lexA2* gene (PP3116), there are three ORFs (PP3117, PP3118 and PP3119) that have been annotated as *sulA*, *dinP* and *dnaE* genes (Fig. 1A) in the published complete genome of *P. putida* (Weinel *et al.*, 2002). As it is well known, these genes encode, respectively, a cell division inhibitor, the DNA polymerase IV and the alpha subunit of the DNA polymerase III. To determine whether the *lexA2* gene is co-transcribed with these ORFs, a reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis was performed using RNA extracted from *P. putida* cells. Results indicate that a *lexA2-sulA2-dinP-dnaE* transcript is definitely present in *P. putida* (Fig. 1B), showing that these four genes constitute a single polycistronic unit. Furthermore, it was assessed that expression of this transcriptional unit increases when cells are treated with DNA damaging agents such as mitomycin C (Fig. 2). However, RT-PCR experiments using the oligonucleotides shown in Fig. 1A demonstrate that, in a *lexA2*(Def) mutant, *lexA2* promoter transcription does not increase due to DNA damage (Fig. 2). Moreover, in *lexA2*(Def) cells the *lexA2* promoter presents a basal expression that is practically equal to that obtained in mitomycin C-treated wild-type cells (Fig. 2). Besides, and as expected because of the insertion of the Ω Km interposon inside the *lexA2* gene coding region, a *lexA2-sulA2-dinP-dnaE* transcript cannot be detected in the *lexA2*(Def) mutant (data not shown). Taken together, these results demonstrate that the *lexA2* gene product regulates the DNA damage-mediated expression of the whole *lexA2-sulA2-dinP-dnaE* operon, and that no additional internal promoters are present in this transcriptional unit.

Identification of the P. putida LexA2-binding sequence

Data presented in Fig. 2 indicate that the LexA2 protein negatively regulates the *P. putida lexA2-sulA2-dinP-dnaE* operon. To identify the LexA2 recognition sequence, electrophoresis mobility shift assays (EMSA) were carried out with this purified protein and using as a probe a DNA fragment extending from –140 to +72 of the *P. putida lexA2*

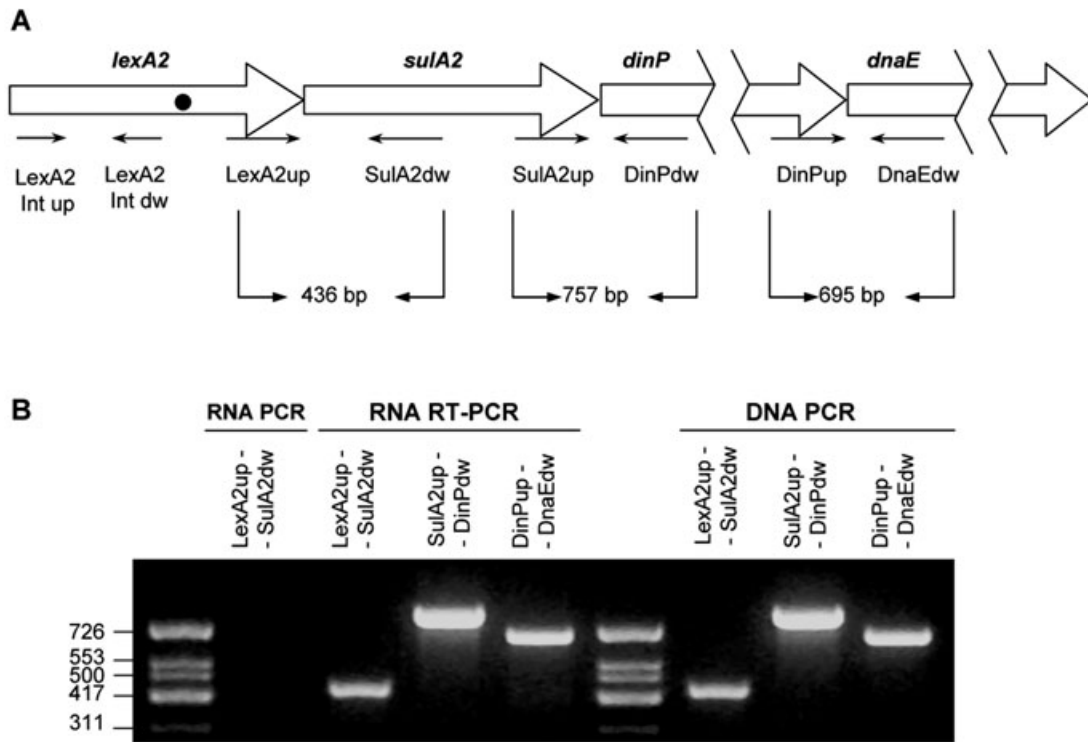


Fig. 1. A. Structural arrangement of *P. putida lexA2-sulA2-dinP-dnaE* genes. Arrows denote the primers used to determine transcripts. The black dot in the *lexA2* gene indicates the insertion point of the Ω -interposon (Int). Arrows upstream this point mark the position of primers used to measure the *lexA2* gene expression. B. RT-PCR analysis of *lexA2-sulA2-dinP-dnaE* transcripts present in total RNA from *P. putida* (RNA RT-PCR). As a control, PCR experiments were also carried out using either DNA (DNA-PCR) or RNA (RNA-PCR) as a template. The molecular mass marker (*Hinf*I-digested DNA of ϕ x174) size is shown at left in base pairs.

gene promoter (with respect to its putative translational starting point). The addition of LexA2 protein, but not that of LexA1, specifically decreased the mobility of the *lexA2* promoter, as an excess of unlabelled *lexA2* promoter abolished it. However, the same did not occur when an excess of non-specific DNA was added (Fig. 3A). These data, together with those concerning the gene expression profiles presented in Fig. 2, clearly demonstrate that *lexA1* and *lexA2* genes do not present cross-regulation.

To define precisely the *P. putida* LexA2 binding site, serial deletions of the upstream promoter region of the *lexA2* gene were generated and analysed in EMSAs with the purified LexA2 protein. Results indicate that the LexA2-binding motif is located between the -26 and -14 positions upstream *lexA2* translational start codon (Fig. 3B). A further analysis of this region revealed the presence of the AGTACAAATGTGCTCC sequence, which is very similar to the recently reported LexA-binding motif RGTACNNNDGTWCB of the Cyanobacteria Phylum (Mazón *et al.*, 2004). Several mutations were introduced in the AGTACAAATGTGCTCC sequence to confirm that this was the *P. putida* LexA2 box. As it can be seen in Fig. 3C, these mutations inhibited the binding of the

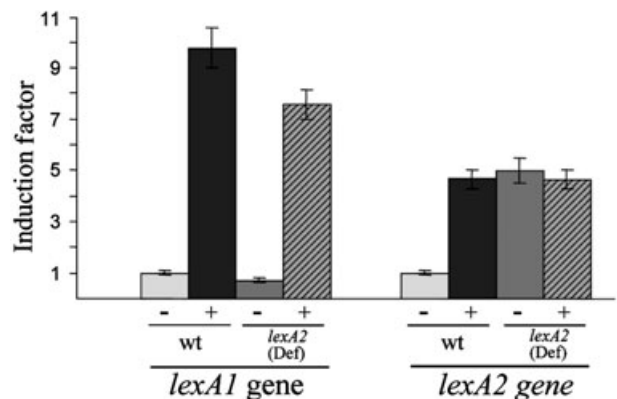


Fig. 2. Mitomycin C-mediated induction of *P. putida lexA1* and *lexA2* genes measured by quantitative RT-PCR in wild-type (wt) and *lexA2*(Def) cells. The induction factor is the ratio of the relative mRNA concentration for each gene to that of mitomycin C-untreated wild-type cells. The relative mRNA concentration for a given gene is its amount normalized to that of the *P. putida trpA* gene. Values were calculated 2 h after mitomycin C addition. In each case, the mean value from three independent experiments (each in triplicate) is shown. Symbols (+) and (-) represent addition or not of mitomycin C ($20 \mu\text{g ml}^{-1}$) respectively.

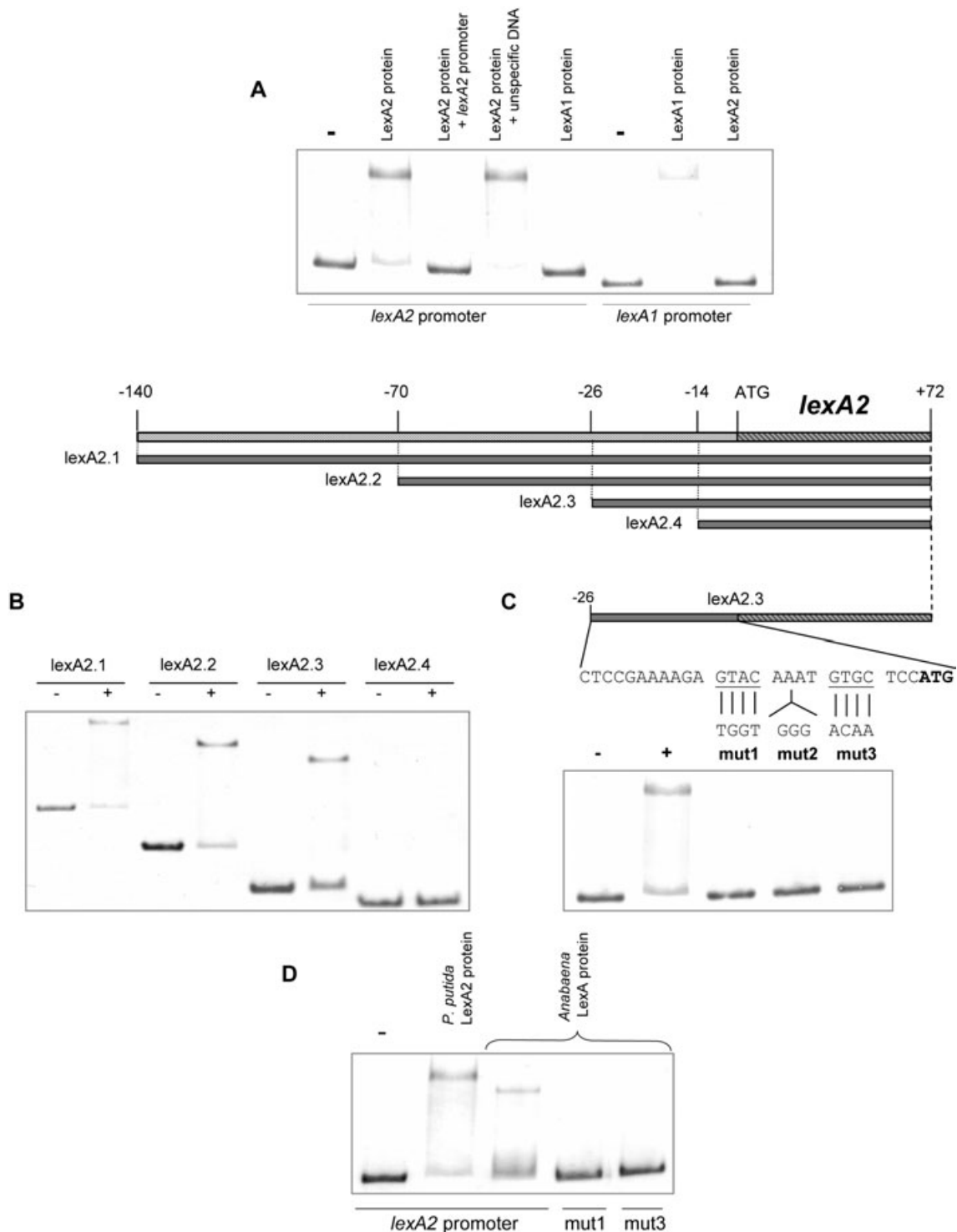


Fig. 3. A. EMSAs of the *P. putida* *lexA1* and *lexA2* promoters in presence of 80 ng of purified LexA1 or LexA2 proteins. When necessary, a 300-fold molar excess of either unlabelled *lexA2* promoter or pGEM-T plasmid DNA was used as a, respectively, specific or unspecific competitor fragment.

B. Electrophoretic mobilities of several *lexA*-promoter fragments in presence (+) or absence (-) of the LexA2 protein (80 ng).

C. Effect of the substitution of either GTAC or GTGC motifs, as well as of the insertion of three nucleotides (GGG) between them, in the electrophoretic mobility of the LexA2.3 fragment in presence of LexA2 protein.

D. Binding of the purified *Anabaena* sp. LexA protein to the wild-type or mutant derivatives of the *P. putida* LexA2.3 fragment. As a control, the binding of the *P. putida* LexA2 protein to the wild-type DNA fragment is shown.

LexA2 protein to the *lexA2* promoter. In accordance with these facts, the *Anabaena* LexA protein is able to bind to the *P. putida* wild-type *lexA2* promoter but not to its derivative mutants (Fig. 3D), implying that the Cyanobacterial and the *P. putida* LexA2 binding sites are closely related.

Distribution of the lexA-sulA-dinP-dnaE transcriptional unit in the Bacteria Domain

The results shown above suggested a close relationship between the *P. putida* *lexA2* and the cyanobacterial *lexA* gene products. Considering the evolutionary gap between both phyla, this resemblance prompted the possibility that the *lexA2-sulA2-dinP-dnaE* transcriptional unit had been acquired by *P. putida* through LGT. To explore this possibility, a TBLASTN search for each one of the four proteins encoded by the *lexA2-sulA2-dinP-dnaE* operon was carried out against all the available sequenced bacterial genomes. The *lexA2-sulA2-dinP-dnaE* operon was not found in any of the Gram-positive bacteria and cyanobacteria genomes analysed. However, either this transcriptional unit or others closely related to it were detected in several Gram-negative bacteria belonging to different Proteobacteria classes (Fig. 4). Two major differences could be identified among the detected cassette orthologues: (i) the nature of their regulatory sequences and (ii) the loss of some of the genes belonging to them. Thus, three different instances of the original cassette, besides isolated *lexA*, *sulA*, *dinP* and *dnaE* genes, were identified: the own *lexA-sulA-dinP-dnaE* structure, and *sulA-dinP-dnaE* and *lexA-sulA* cassettes.

The distinct dissemination of the identified cassette across several Proteobacteria classes is indicative of a complex evolutionary history. On the one hand, a *sulA-dinP-dnaE* cassette is present in all the Alpha Proteobacteria genomes whose complete sequence has been published to date. Particularly, in *Agrobacterium tumefaciens* and *Sinorhizobium meliloti*, where the *sulA-dinP-dnaE* cassette is present both in plasmids and in the chromosome, the detected cassettes also form a single transcriptional unit that has been shown to be damage inducible (Fig. 4). Moreover, a classical Alpha Proteobacteria LexA SOS box (GTTCN₇GTTC) is present in the promoter region of these cassettes, to which the *S. meliloti* LexA protein binds specifically (Fig. 4). On the other hand, and in contrast with the monophyletic nature of the *sulA-dinP-dnaE* cassette in the Alpha Proteobacteria, the

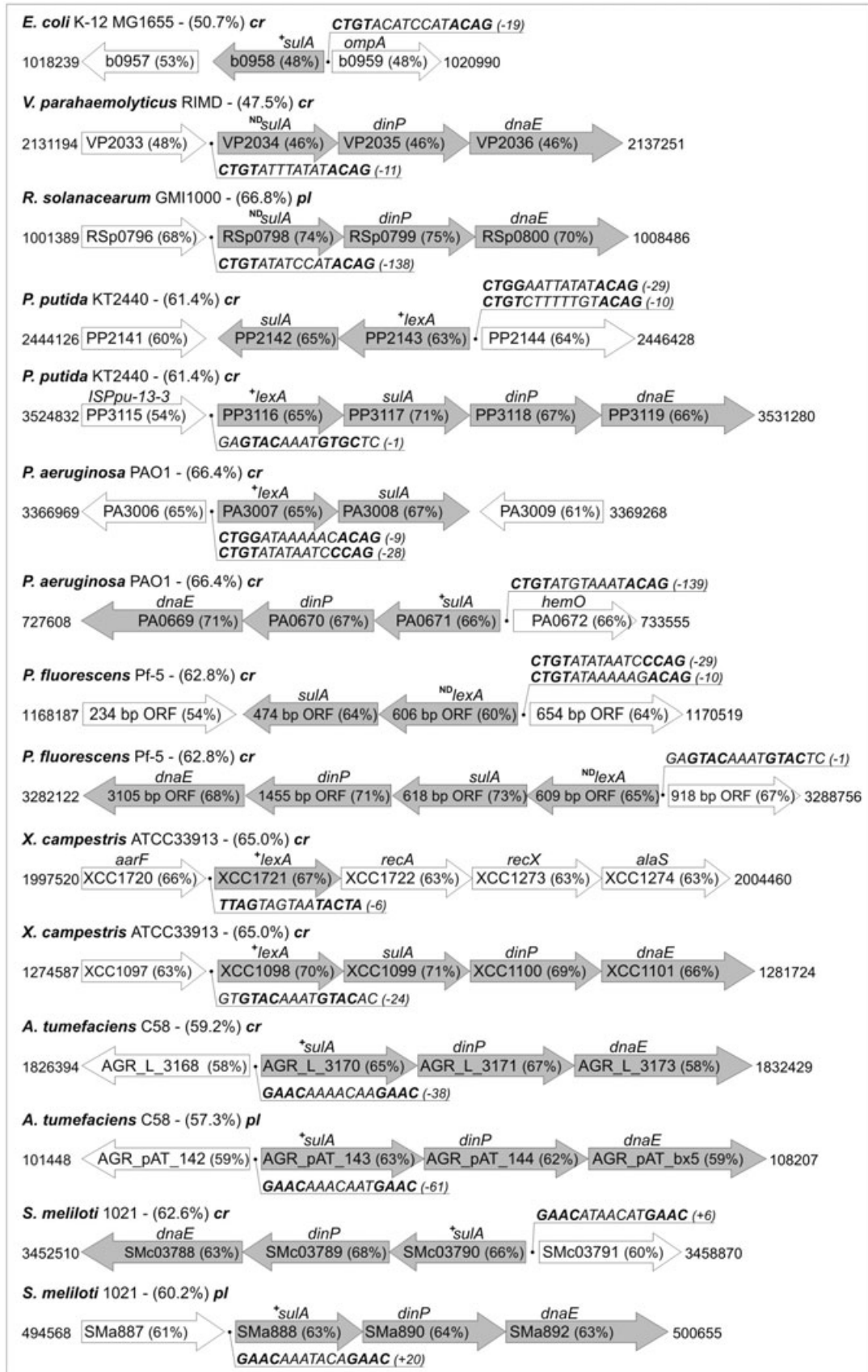
Gamma Proteobacteria class presents a noticeably larger heterogeneity. Aside from *P. putida*, the *lexA-sulA-dinP-dnaE* operon is present in other phytopathogenic pseudomonads (e.g. *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas syringae*) as well as in *Xanthomonas campestris* and *Xanthomonas axonopodis*. It must be noted that, in all these instances, the DNA binding sequence of the *P. putida* LexA2 protein (AGTACAAATGT GCTCC) is present in the promoter region of the cassette *lexA* gene. In fact, the purified product of the *lexA* gene of the *X. campestris* *lexA-sulA-dinP-dnaE* operon is able to bind both its own promoter and the *P. putida* *lexA2* one (data not shown). Furthermore, and as in the case of *P. putida*, all these *Pseudomonas* species contain also an additional *lexA-sulA* operon that presents the *E. coli*-like LexA-binding sequence (CTGTN₈ACAG) in its promoter. In contrast, the *lexA* gene of *X. campestris* and *X. axonopodis* presents its own regulatory motif (TTAGN₆TACTA) and is not placed upstream the *sulA* gene, but immediately before *recA* (Campoy *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2002).

Still, other Gamma Proteobacteria species display additional cassette organizations. The *Alteromonadaceae* *Shewanella oneidensis* and the animal-pathogenic *Pseudomonas aeruginosa*, for instance, present only one *lexA* gene with the same *lexA-sulA* arrangement of *P. putida* *lexA1* (Fig. 4). However, *P. aeruginosa* also possesses a DNA damage-inducible *sulA-dinP-dnaE* cassette with an *E. coli*-like LexA-binding sequence to which *P. putida* LexA1 is able to bind (Fig. 4). An equivalent *sulA-dinP-dnaE* gene cassette, with its corresponding *E. coli*-like LexA-binding motif, is also found in the Beta Proteobacteria *R. solanacearum*, *B. bronchiseptica* and *B. parapertussis*, and in some *Vibrionaceae*, such as *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* (Fig. 4). Nevertheless, *lexA* does not conform a tandem with a *sulA* gene in these five species. It must be noted that, as in *A. tumefaciens* and *S. meliloti*, the cassette of *R. solanacearum* is also located in a plasmid although, in this case, there is not an additional copy in the chromosome (Fig. 4).

Phylogenetic analysis of the lexA-sulA-dinP-dnaE cassette

To shed more light on the basis of this variability in gene content of the *lexA-sulA-dinP-dnaE* operon, separate phylogenetic analyses were performed for each of the

Fig. 4. Genetic arrangement of representative *lexA-sulA-dinP-dnaE* cassettes and their derivatives. Putative and reported LexA-binding sites are displayed with their distance to the translational start codon. The + sign preceding the operon heading gene indicates experimentally confirmed binding of the corresponding LexA protein and DNA damage induction of the operon either in this work (*A. tumefaciens*, *P. putida*, *P. aeruginosa*, *S. meliloti* and *X. campestris*) or previously (*E. coli*). In turn, ND designates non-determined induction/binding ability. Gene G+C percentages for comparison with the overall G+C content of each bacterium, as well as accession numbers, are shown. *cr* and *pl* are contractions of, respectively, chromosome and plasmid molecules. Shading denotes cassette-related genes. *P. fluorescens* positions are relative to the origin of TIGR_220664|contig:3337 fragment of its unfinished genome (NC_004129).



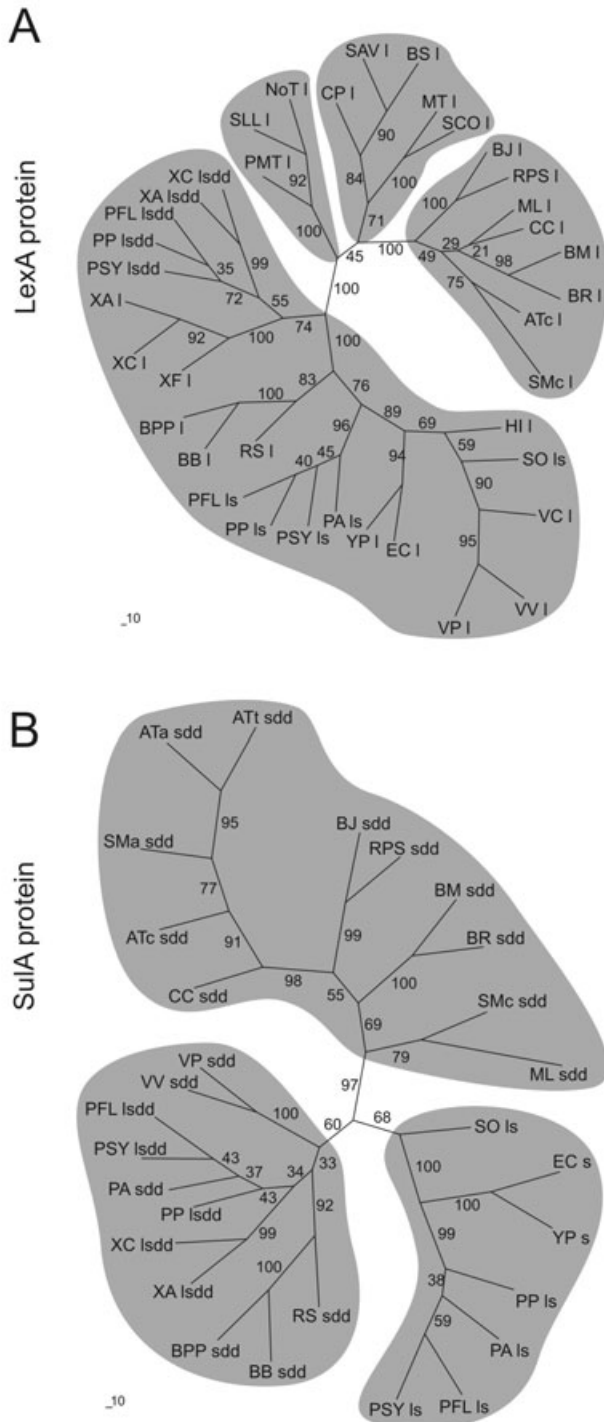


Fig. 5. LexA (A) and SulA (B) protein sequence phylogenetic trees. Single *l* and *s* characters following the bacterium name represent isolated *lexA* and *sulA* genes. Likewise, *ls*, *sdd* and *lsdd* suffixes stand for, respectively, *lexA-sulA*, *sulA-dinP-dnaE* and *lexA-sulA-dinP-dnaE* cassette arrangements.

AT, *A. tumefaciens*; BS, *Bacillus subtilis*; BB, *B. bronchiseptica*; BPP, *B. parapertussis*; BJ, *Bradyrhizobium japonicum*; BM, *Brucella melitensis*; BR, *Brucella suis*; CC, *Caulobacter crescentus*; CP, *Clostridium perfringens*; EC, *E. coli*; HI, *H. influenzae*; ML, *Mesorhizobium loti*; MT, *M. tuberculosis*; NoT, *Nostoc*; PMT, *Prochlorococcus marinus*; PA, *P. aeruginosa*; PFL, *P. fluorescens*; PP, *P. putida*; PSY, *P. syringae*; RS, *R. solanacearum*; RPS, *Rhodospseudomonas palustris*; SCO, *S. coelicolor*; SO, *S. oneidensis*; SM, *S. meliloti*; SAV, *Staphylococcus aureus*; SLL, *Synechocystis*; VC, *Vibrio cholerae*; VP, *V. parahaemolyticus*; VV, *V. vulnificus*; XA, *X. axonopodis*; XC, *X. campestris*; XF, *X. fastidiosa*; YP, *Y. pestis*.

Characters adjacent to the bacterium name indicate chromosome *c* or plasmids (*a* or *t*; pSymA, AT or Ti) in those species with cassettes present in both molecules. Numbers at branch nodes indicate bootstrapping values for 100 bootstrap replicates.

clustered all in a separate group. Furthermore, a detailed analysis of this cluster clearly indicates that isolated *lexA* genes, as well as those belonging to the *lexA-sulA-dinP-dnaE* cassette, diverged all from a common precursor that evolved separately from the *lexA* gene of a Gram-positive descendant.

Regarding SulA proteins (Fig. 5B), those that are not contained in *lexA-sulA-dinP-dnaE* or *sulA-dinP-dnaE* cassettes clustered all in a same group, regardless of their genetic organization either in *lexA-sulA* tandems or as independent *sulA* genes. Moreover, Gamma Proteobacteria SulA proteins encoded by either *lexA-sulA-dinP-dnaE* or *sulA-dinP-dnaE* operons formed a separate group that included also the Beta Proteobacteria SulA. Less related to both these groups, the Alpha Proteobacteria SulA proteins, which are encoded by a *sulA-dinP-dnaE* type cartridge, constituted a third cluster, suggesting that this cassette was acquired independently of the one incorporated by Gamma Proteobacteria. The analysis of both DinP and DnaE proteins (data not shown) yielded very similar results, thus validating the above-described scenarios. It is worth noting, however, that *Mycobacterium tuberculosis* and *Streptomyces coelicolor* both possess *dinP* (Brooks *et al.*, 2001; Bentley *et al.*, 2002) and DNA damage-inducible *dnaE* genes (Flett *et al.*, 1999; Boshoff *et al.*, 2003) whose products are much more closely related to those of the *lexA-sulA-dinP-dnaE* and *sulA-dinP-dnaE* cassettes than to their own housekeeping copies of *dinP* and *dnaE*. This suggests that both these Gram-positive species could have acquired these *dinP* and *dnaE* genes through LGT.

proteins encoded by the genes that belong to the original cassette. As seen in Fig. 5A, Gram-positive, Cyanobacteria and Alpha Proteobacteria LexA proteins group in three independent clusters, although there is a significant relationship between them. However, the rest of Proteobacteria LexA proteins analysed, regardless of their genetic organization in either *lexA-sulA-dinP-dnaE* operons or as single genes in the bacterial chromosome,

Even so, the analysis of the G+C content of *lexA-sulA-dinP-dnaE* and *sulA-dinP-dnaE* operons indicates that, in all the species here analysed, these multiple gene cassettes must have been incorporated early in the speciation process of each organism. This is deduced from the fact that there is a large variation in the mean G+C percentage

among detected cassettes (from 45 to 75%) while, for each case, the cassette G+C content is very close to that of the species containing it (Fig. 4).

Discussion

Evidence for lateral gene transfer of a lexA gene in the Proteobacteria

In the present work we have demonstrated that *P. putida* contains two functional and independent *lexA* genes. One of them (*lexA1*) constitutes a *lexA1-sulA1* tandem operon harbouring an *E. coli*-like LexA-binding sequence in its promoter. The second *lexA* (*lexA2*) belongs to a multiple gene cassette with the following gene order: *lexA2-sulA2-dinP-dnaE*. This cassette has been shown to be a DNA damage-inducible transcriptional unit and, in fact, the LexA2 protein controls the expression of its encoding operon by binding to the AGTACAAATGTGCTCC recognition sequence present in its promoter (Fig. 3C). Interestingly, this motif is also able to bind the Cyanobacteria LexA protein (Fig. 3D). Furthermore, we have also shown that the *lexA-sulA-dinP-dnaE* gene cassette and its derivatives are widespread among the Proteobacteria Phylum (Fig. 4). Taken together, these facts convey strong evidence that LGT events involving the *lexA* gene have taken place at least once in the evolutionary history of the Gamma Proteobacteria.

With the available data, the exact moment and processes that gave rise to the original *lexA-sulA-dinP-dnaE* gene cassette here reported are difficult to pinpoint. Nonetheless, the data here obtained provide substantial insights on the probable origins of this cassette. Given the phylogenetic distance between both phyla, the ability of cyanobacterial LexA protein to bind the *P. putida* cassette binding sequence suggests at first instance that *P. putida* acquired the cassette through LGT from the Cyanobacteria. However, none of the available cyanobacteria genomes presents a *lexA-sulA-dinP-dnaE* gene cassette. Therefore, the donor of this operon to *P. putida* may have been a cyanobacterium whose genome has not been sequenced yet or another bacterial species that, in agreement with the recently proposed branching order of the bacterial phylogenetic tree (Gupta and Griffiths, 2002), appeared closely after the Cyanobacteria. Thus, it seems probable that this multiple gene cassette was formed *de novo* in an unknown Gram-negative ancestor of the Gamma Proteobacteria class through genetic reorganization involving extant and/or recently imported genes. In this respect, it should be noted that this precursor presented a LexA protein with a binding sequence closely related to that of both Gram-positive and Cyanobacteria, thereby implying direct inheritance of the LexA protein from Gram-positive bacteria or an immediate descendant. Similarly, *dinP* and *dnaE* homologues are present in

Gram-positive bacteria, Cyanobacteria and Alpha Proteobacteria, making it very probably that these genes were also vertically transmitted to this unknown ancestor of Gamma Proteobacteria. A *sulA* gene, however, has not been reported to date in any of these three lineages. Thus, the cassette *sulA* gene must have been acquired by this Gamma Proteobacteria ancestor from an unknown source. Although LGT from a non-described bacterium is possible, the most plausible origin of the *sulA* gene lies in either bacteriophages or plasmids. Even if *sulA* genes have not been previously described in plasmids or phages, it is well known that these extrachromosomal elements frequently encode proteins that interfere with such basic cellular processes as division, gene transcription or DNA replication (Miki *et al.*, 1984; Conter *et al.*, 1996; Goyal *et al.*, 1996; Couturier *et al.*, 1998). Additional support for this hypothesis stems from experimental knowledge of proteins with a similar function in extant phages. The protein encoded by the *kil* gene of the *E. coli* defective prophage *rac*, for instance, inhibits the same target as the SulA protein: the FtsZ protein of *E. coli*, involved in septum formation (Bi and Lutkenhaus, 1993; Conter *et al.*, 1996).

Relationship between the lexA-sulA-dinP-dnaE cassette and the Proteobacteria lexA genes

LexA protein phylogenetic data (Fig. 5A) indicate that, after its constitution, the *lexA-sulA-dinP-dnaE* cassette evolved through vertical transmission to give rise to the *lexA* lineage of extant Gamma Proteobacteria. From this point onwards, a deletion of the cassette *dinP* and *dnaE* genes probably originated the *lexA-sulA* tandem that is still conserved in the *Pseudomonadacea* family and in *S. oneidensis*. In turn, later deletions or genetic reorganizations of the *sulA* gene would have given rise, respectively, to the ultimate loss of this gene (such as in the chromosome of *Haemophilus influenzae* or *R. solanacearum*) or to the dissociation of the *lexA-sulA* tandem seen today in *E. coli* and close relatives (*Yersinia pestis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri*).

In contrast to the vertical transmission scenario outlined above, the presence in the phytopathogenic pseudomonads and in *X. campestris* and *X. axonopodis* of a full *lexA-sulA-dinP-dnaE* cassette that is markedly divergent from the *E. coli*-like *lexA-sulA* tandem also present in the pseudomonads implies that either a duplication or a LGT event took place in an ancestor of these species. At first instance, the high adaptation of the cassettes G+C content seems to support a gene duplication hypothesis, but the divergent LexA-binding motifs of vertically transmitted and cassette *lexA* genes suggest otherwise (Fig. 4). In addition, the fact that Cyanobacteria LexA protein is still able to bind the

LexA-binding motif of both *P. putida* and *X. campestris* cassettes (Figs 3D and 4), the evidence that all *lexA-sulA-dinP-dnaE* cassettes present self-regulation and the scattered distribution of the cassettes among Gamma Proteobacteria (Fig. 4) all pile up in support of an LGT scheme. Furthermore, when considering an early acquisition scenario, the accepted time since speciation of bacteria with and without cassettes is ample enough for complete amelioration of the cassette G+C content (Koski *et al.*, 2001). Therefore, it seems evident that some time after the lineage presenting the *E. coli*-like LexA-binding sequence was unambiguously formed, one of its early members acquired by LGT a novel, non-evolved copy of the *lexA-sulA-dinP-dnaE* cassette (i.e. the *lexA2-sulA2-dinP-dnaE* cassette here reported for *P. putida*).

In turn, the presence of a *sulA-dinP-dnaE* cassette in the closely related *P. aeruginosa* suggests that the further evolution of this *lexA2-sulA2-dinP-dnaE* cassette was marked by a deletion of its *lexA* gene and the emergence of an *E. coli*-like LexA-binding motif in the promoter region of the *sulA2* gene. Thereafter, the presence of several copies of this same *sulA-dinP-dnaE* operon under *E. coli*-like LexA control in other Gamma Proteobacteria (*V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*) and some Beta Proteobacteria (*R. solanacearum*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica*) can be explained by reiterated and independent lateral transfer from *P. aeruginosa*. Likewise, the existence of a *sulA-dinP-dnaE* operon in the Alpha Proteobacteria could be explained by a similar lateral transfer process: reception of the *lexA-sulA-dinP-dnaE* cassette, subsequent loss of the governing *lexA* gene, generation of the necessary Alpha LexA binding box upstream of the *sulA-dinP-dnaE* operon and plasmid-mediated dissemination. In this respect, it must be noted that similar cases of reiterated lateral transfer have been proposed to explain, for instance, the evolution and organization of the tryptophan biosynthetic genes in the Bacteria Domain (Xie *et al.*, 2003). The fact that *sulA-dinP-dnaE* cassettes regulated either by the Alpha or by the *E. coli*-like LexA repressor (Fig. 4) can be found in plasmids both in the Alpha Proteobacteria and in the Beta Proteobacterium *R. solanacearum* gives further support to the hypothesis of LGT in both classes.

Finally, LexA phylogenetic evidence in the xanthomonads (Fig. 5A) suggests that their conserved *lexA-recA* tandem is not a product of the evolution of the original *lexA-sulA-dinP-dnaE* cassette but a duplication of the later acquired, non-evolved cassette that, in the case of *Xylella fastidiosa*, seems to have been lost as a consequence of a phage-mediated rearrangement still evident in its genome sequence (Simpson *et al.*, 2000). The fact that the surrounding makeup of the *Xanthomonas* and *Xylella recA* gene (Fig. 4) preserves the typical Gamma

Proteobacteria structure, *recX* and *alaS* genes downstream *recA* (De Mot *et al.*, 1994), further supports the hypothesis of a gene duplication event with insertion of the *lexA* gene upstream the *recA-recX* transcriptional unit.

Thus, the results here reported convey a consistent outline of the evolutionary process of the described *lexA-sulA-dinP-dnaE* cassette and of its influence on the evolution of the SOS system of Gamma Proteobacteria. It seems evident, though, that the availability of more sequence data across different bacterial phyla will make possible to pin down the exact branching point in evolution and, possibly, the precise species in which the *lexA-sulA-dinP-dnaE* operon here identified was formed, and will also shed light on the events that marked the evolutionary history of this operon, both in terms of its gene content and in terms of its regulatory sequence.

Experimental procedures

Bacterial strains and growth conditions

Strains of bacterial species used were *P. putida* KT2440, *P. aeruginosa* PAO1, *A. tumefaciens* C58, *S. meliloti* 1021 and *X. campestris* ATCC33913. All of them were grown in their respective suitable growth and temperature conditions as recommended (Miller, 1991). A *P. putida lexA2(Def)* mutant was constructed by marker exchange with a *lexA2* gene interrupted by the insertion of a Ω Km cassette in a *SmaI* restriction site generated by inverse PCR in its +301 nucleotide, following previously described methodology (Campoy *et al.*, 2003) and using a pGP704 suicide vector-derivative (pUA658) carrying gentamicin resistance (Fernández de Henestrosa *et al.*, 1997). Antibiotic concentrations used for each microorganism were as previously reported (Miller, 1991).

Nucleic acids techniques

RNA and DNA total extraction was carried out by standard methods (Sambrook and Russell, 2001). Genes and promoter fragments for electrophoretic mobility shift assays were isolated by PCR from total DNA extraction of each bacterial species, using suitable oligonucleotide primers designed in accordance to their published sequences. Directed mutagenesis of the *P. putida lexA2* promoter was carried out by PCR as described earlier (Campoy *et al.*, 2003) and the presence of DNA changes was confirmed by sequencing using the dideoxy method (Sanger *et al.*, 1977) on an ALF Sequencer (Pharmacia Biotech). RT-PCR analysis of gene expression was performed for all bacterial species as reported (Campoy *et al.*, 2003) and using specific internal oligonucleotide primers for each gene. For each bacterial species (*A. tumefaciens*, *P. putida*, *P. aeruginosa*, *S. meliloti* and *X. campestris*), the RNA concentration of the gene to be analysed was always normalized to that of its own *trpA* gene, because expression of the latter is not affected by DNA damage (Courcelle *et al.*, 2001).

Purification of LexA proteins

LexA protein from *Anabaena* PCC7120 had been purified previously (Mazón *et al.*, 2004). The *lexA1* and *lexA2* genes from *P. putida*, as well those of *X. campestris* and *S. meliloti*, were cloned by PCR using specific primers for each one. The 5' end of the upper primer in all cases contained an *NdeI* restriction site in which the ATG initial triplet of each *lexA* gene to be cloned was included. The lower primer always started 200 bp downstream of the translational stop codon of the *lexA* genes. PCR fragments containing the desired *lexA* gene were cloned into a pGEM-T vector and, afterwards, inserted into a pET15b expression vector. pET15b-derivatives containing the appropriate *lexA* gene were transformed into the *E. coli lexA* (Def) BL21(DE3) codon plus strain (Fernández de Henestrosa *et al.*, 2000) for overexpression of the corresponding LexA proteins, which were subsequently purified using the Talon™ Metal Affinity Resin Kit (Clontech) as reported (Mazón *et al.*, 2004). All LexA proteins obtained were above 95% purity as determined with Coomassie Blue staining of SDS-PAGE (15%) polyacrylamide gels (data not shown) following standard methodology (Laemmli, 1970).

Electrophoresis mobility shift assays

LexA-DNA binding was analysed for each bacterial species by EMSAs using purified LexA proteins. DNA probes were prepared by PCR amplification with one of the primers labelled at its 5' end with digoxigenin (DIG) and purifying each product in a 2–3% low-melting-point agarose gel. DNA-protein reactions (20 µl) typically containing 20 ng of the DIG-DNA-labelled probe and 80 nM of purified LexA protein were incubated in binding buffer: 10 mM *N*-2-Hydroxyethyl-piperazine-*N'*-2-ethanesulphonic acid (Hepes), NaOH (pH 8), 10 mM Tris-HCl (pH 8), 5% glycerol, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mg ml⁻¹ salmon DNA and 50 µg ml⁻¹ BSA. After 30 min at 30°C, the mixture was loaded onto a 6% non-denaturing Tris-glycine polyacrylamide gel [pre-run for 30 min at 10 V cm⁻¹ in 25 mM Tris-HCl (pH 8.5), 250 mM glycine, 1 mM EDTA]. DNA-protein complexes were separated at 150 V for 60 min, followed by transfer to a Biodine B nylon membrane (Pall Gelman Laboratory). DIG-labelled DNA-protein complexes were detected following the manufacturer protocol (Roche). For the binding-competition experiments, a 300-fold molar excess of either specific or non-specific unlabelled competitor DNA was also included in the mixture. All EMSAs were repeated a minimum of three times to ensure reproducibility of results.

In silico phylogenetic analysis

Protein sequences for each gene under study were aligned using the CLUSTALW program (Higgins *et al.*, 1994). Multiple alignments were then used to infer phylogenetic trees with the SEQBOOT, PROML and CONSENSE programs of the Phylip 3.6 software package (Felsenstein, 1989), applying the maximum-likelihood method on 100 bootstrap replicates. The resulting phylogeny trees were plotted using TreeView (Page, 1996).

Acknowledgements

This work was funded by Grants BMC2001-2065 from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCyT) de España and 2001SGR-206 from the Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació (DURSI) de la Generalitat de Catalunya, and by the Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). M. Abella and M. Jara were recipients of predoctoral fellowships from the Ministerio de Educación y Cultura (MEC) and the DURSI respectively. We are deeply indebted to Joan Ruiz and Dr Pilar Cortés for their excellent technical assistance.

References

- Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdano-Tarraga, A.M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., *et al.* (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**: 141–147.
- Bi, E., and Lutkenhaus, J. (1993) Cell division inhibitors SulA and MinCD prevent formation of the FtsZ ring. *J Bacteriol* **175**: 1118–1125.
- Boshoff, H.I.M., Reed, M.B., Barry, C.E., and Mizrahi, V. (2003) DnaE2 polymerase contributes to *in vivo* survival and the emergence of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell* **113**: 183–193.
- Brooks, P.C., Movahedzadeh, F., and Davis, E.O. (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., Garriga, X., and Barbe, J. (1991) One-step cloning system for isolation of bacterial *lexA*-like genes. *J Bacteriol* **173**: 7345–7350.
- Campoy, S., Mazón, G., Fernández de Henestrosa, A.R., Llagostera, M., Brant-Monteiro, P., and Barbé, J. (2002) A new regulatory DNA motif of the gamma subclass *Proteobacteria*: identification of the LexA protein binding site of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Microbiology* **148**: 3583–3597.
- Campoy, S., Fontes, M., Padmanabhan, S., Cortes, P., Llagostera, M., and Barbe, J. (2003) LexA-independent DNA damage-mediated induction of gene expression in *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* **49**: 769–781.
- Conter, A., Bouché, J.P., and Dassan, M. (1996) Identification of a new inhibitor of essential division gene *ftsZ* as the *kil* gene of defective prophage Rac. *J Bacteriol* **178**: 5100–5104.
- Courcelle, J., Khodursky, A., Peter, B., Brown, P.O., and Hanawalt, P.C. (2001) Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. *Genetics* **158**: 41–64.
- Couturier, M., Bahassi, E.M., and Van Melderen, L. (1998) Bacterial death by DNA gyrase poisoning. *Trends Microbiol* **6**: 269–275.
- Davis, E.O., Dullaghan, E.M., and Rand, L. (2002) Definition of the Mycobacterial SOS box and use to identify LexA-regulated genes in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* **184**: 3287–3295.
- De Mot, R., Schoofs, G., and Vanderleyden, J. (1994) A putative regulatory gene downstream of *recA* is conserved

- in gram-negative and gram-positive bacteria. *Nucleic Acids Res* **22**: 1313–1314.
- Erill, I., Escribano, M., Campoy, S., and Barbé, J. (2003) *In silico* analysis reveals substantial variability in the gene contents of the Gamma Proteobacteria LexA-regulon. *Bioinformatics* **19**: 2225–2236.
- Felsenstein, J. (1989) PHYLIP: phylogeny inference package (version 3.2). *Cladistics* **5**: 164–166.
- Fernández de Henestrosa, A.R., Badiola, I., Erill, I., Saco, M., Perez de Rozas, A., Campoy, S., and Barbé, J. (1997) Importance of the *galE* gene on the virulence of *Pasteurella multocida*. *FEMS Microbiol Lett* **154**: 311–316.
- Fernández de Henestrosa, A.R., Rivera, E., Tapias, A., and Barbé, J. (1998) Identification of the *Rhodobacter sphaeroides* SOS box. *Mol Microbiol* **28**: 991–1003.
- Fernández de Henestrosa, A.R., Ogi, T., Aoyagi, S., Chafin, D., Hayes, J.J., Ohmori, H., and Woodgate, R. (2000) Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **35**: 1560–1572.
- Fernández de Henestrosa, A.R., Cuñé, J., Erill, I., Magnuson, J.K., and Barbé, J. (2002) A green nonsulfur bacterium, *Dehalococcoides ethenogenes*, with the LexA binding sequence found in gram-positive organisms. *J Bacteriol* **184**: 6073–6080.
- Flett, F., Jungmann-Campello, D.M., Mersinias, V., Koh, S.L.M., Godden, R., and Smith, C.P. (1999) A 'gram-negative-type' DNA polymerase III is essential for replication of the linear chromosome of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* **31**: 949–958.
- Goyal, D., Wachi, M., Kijima, N., Kobayashi, M., Yukawa, H., and Nagai, K. (1996) A cryptic plasmid pBL1 from *Brevibacterium lactofermentum* causes growth inhibition and filamentation in *Escherichia coli*. *Plasmid* **36**: 62–66.
- Gupta, R.S., and Griffiths, E. (2002) Critical issues in bacterial phylogeny. *Theor Popul Biol* **61**: 423–434.
- Higgins, D., Thompson, J., Gibson, T., Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673–4680.
- Jara, M., Nuñez, C., Campoy, S., Fernández de Henestrosa, A.R., Lovley, D.R., and Barbé, J. (2003) *Geobacter sulfurreducens* has two autoregulated *lexA* genes whose products do not bind the *recA* promoter: differing responses of *lexA* and *recA* to DNA damage. *J Bacteriol* **185**: 2493–2502.
- Khil, P.P., and Camerini-Otero, R.D. (2002) Over 1000 genes are involved in the DNA damage response of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **44**: 89–105.
- Koski, L.B., Morton, R.A., and Golding, G.B. (2001) Codon bias and base composition are poor indicators of horizontally transferred genes. *Mol Biol Evol* **18**: 404–412.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
- Little, J.W. (1991) Mechanism of specific LexA cleavage: autodigestion and the role of RecA coprotease. *Biochimie* **73**: 411–421.
- Luo, Y., Pfuetzner, R.A., Mosimann, S., Paetzel, M., Frey, E.A., Cherney, M., et al. (2001) Crystal structure of LexA: a conformational switch for regulation of self-cleavage. *Cell* **106**: 585–594.
- Mazón, G., Lucena, J.M., Campoy, S., Fernández de Henestrosa, A.R., Candau, P., and Barbé, J. (2004) LexA-binding sequences in Gram-positive and cyanobacteria are closely related. *Mol Genet Genomics* **271**: 40–49.
- Miki, T., Yoshioka, K., and Horiuchi, T. (1984) Control of cell division by sex factor F in *Escherichia coli*. I. The 42.84–43.6 F segment couples cell division of the host bacteria with replication of plasmid DNA. *J Mol Biol* **174**: 605–625.
- Miller, J.H. (1991) Bacterial genetic systems. *Methods Enzymol*, Vol. 204. New York: Academic Press, pp. 123–165.
- Norioka, N., Hsu, M.Y., Inouye, S., and Inouye, M. (1995) Two *recA* genes in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **177**: 4179–4182.
- Page, R.D.M. (1996) Treeview: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *CABIOS* **12**: 357–358.
- Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, S. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463–5467.
- Sassanfar, M., and Roberts, J.W. (1990) Nature of SOS-inducing signal in *Escherichia coli*. The involvement of DNA replication. *J Mol Biol* **212**: 79–96.
- Simpson, A.J.G., Reinach, F.C., Arruda, P., Abreu, F.A., Acencio, M., Alvarenga, R., et al. (2000) Mapping analysis of the *Xylella fastidiosa* genome. *Nature* **406**: 151–159.
- Tapias, A., and Barbé, J. (1999) Regulation of divergent transcription from the *uvrA-ssb* promoters in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Gen Genet* **262**: 121–130.
- Walker, G.C. (1984) Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **48**: 60–93.
- Weinel, C., Nelson, K.E., and Tümmier, B. (2002) Global features of the *Pseudomonas putida* KT2440 genome sequence. *Environ Microbiol* **4**: 809–818.
- Winterling, K.W., Chafin, D., Hayes, J.J., Sun, J., Levine, A.S., Yasbin, R.E., and Woodgate, R. (1998) The *Bacillus subtilis* DinR binding site: redefinition of the consensus sequence. *J Bacteriol* **180**: 2201–2211.
- Xie, G., Bonner, C.A., Brettin, T., Gottardo, R., Keyhani, N.O., and Jensen, R.A. (2003) Lateral gene transfer and ancient paralogy of operons containing redundant copies of tryptophan-pathway genes in *Xylella* species and in heterocystous cyanobacteria. *Genome Biol* **4**: R14.
- Yang, Y.C., Hsu, C.H., Chou, C.P., and Yang, M.K. (2002) Genetic organization of the *lexA*, *recA* and *recX* genes in *Xanthomonas campestris*. *FEMS Microbiol Lett* **209**: 149–154.

2 A manuscript to the *Journal of Bacteriology*

4 **Cohabitation of two different *lexA* regulons in *Pseudomonas putida***

6 Marc Abella¹^ϕ, Susana Campoy²^ϕ, Ivan Erill³, Fernando Rojo⁴ and Jordi Barbé^{*1,2}

8 ¹ *Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona 08193 Bellaterra, Spain*

² *Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), 08193 Bellaterra, Spain*

10 ³ *Biomedical Applications Group, Centro Nacional de Microelectrónica, CNM-IMB (CSIC), 08193 Bellaterra, Spain*

12 ⁴ *Departamento de Biotecnología Microbiana, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Campus de la Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain*

14 **ABSTRACT**

16 In contrast with the vast majority of the Bacteria Domain members, several *Pseudomonas*
and *Xanthomonas* species present two *lexA* genes whose products have been shown to
18 recognize different LexA-binding motifs, making them an interesting target for the study of
the interplay between cohabiting LexA regulons in a single species. Here we report the
20 analysis of the genetic composition of the two LexA regulons of *Pseudomonas putida*
KT2440 using a genomic micro-array. The data obtained indicate that one of the two LexA
22 proteins (LexA1) seems to be in control of the conventional *Escherichia coli*-like SOS
response, while the other LexA (LexA2) regulates only its own transcriptional unit, which
24 includes the *imuA*, *imuB* and *dnaE2* genes, and a gene (PP_3901) from a resident *P. putida*
prophage. Furthermore, PP_3901 is also regulated by LexA1 and is required for DNA
26 damage-mediated induction of several *P. putida* resident prophage genes. *In silico* searches
suggest that this marked asymmetry in regulon contents is also the case for other
28 *Pseudomonas* species presenting two *lexA* genes, and the implications of this asymmetry in
the evolution of the SOS network are discussed.

32 **RUNNING TITLE**

P. putida lexA1 and lexA2 networks

34 ^ϕ M. Abella and S. Campoy should be regarded as joint first authors in this work.

36
38

* To whom correspondence should be addressed at: Departament de Genètica i Microbiologia, Ed. Cn, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 - Bellaterra, Spain. jordi.barbe@uab.es.

2 INTRODUCTION

4 Bacterial cells are able to display a range of responses against the wide spectrum of DNA
damaging agents they are frequently exposed to. Among these, one of the most studied is
6 the SOS response. First described in *Escherichia coli* (38) the SOS response comprises a
network of more than 40 genes involved in DNA repair, error-prone DNA replication and
8 cell division regulation (10, 16, 19). Typically, SOS genes are negatively regulated by the
LexA repressor protein, which in *E. coli* recognizes specifically a CTGTTN₈ACAG regulatory
10 motif present in the promoter region of its target genes. This motif, usually named SOS or
LexA box, has been shown to vary among different phyla, such as the Gram-positive
12 bacteria or the α -, β - γ - and δ -Proteobacteria (22) and has been shown to be monophyletic
in some of them (22). Induction of the SOS genes is triggered by activation of the RecA
14 protein after binding to single-stranded DNA fragments, generated either by replication fork
stall or enzymatic processing of broken DNA ends (33). Activated RecA is able to induce the
16 autocatalytic cleavage of LexA, thus preventing it from binding its target sites and
activating the expression of SOS genes (21). Once DNA damage has been properly
18 addressed, activated RecA concentration drops and newly synthesized LexA is able to bind
again to its target sites, thus switching off the coordinated response. It is worth noting that
20 not all LexA-regulated genes are induced at the same level or at the same time. Instead, the
timing, duration and level of the induction may vary significantly among different SOS
22 genes (10, 30).

24 Even though the SOS response has been thoroughly characterized in several
microorganisms, such as *E. coli* (10), *Pseudomonas aeruginosa* (9), or the Gram-positive
26 *Bacillus subtilis* (2) and *Staphylococcus aureus* (8), both presenting a SOS box
(GAACN₄GTTC) (8, 40) markedly different from that of *E. coli* (38), recent work has offered a
28 glimpse at the composition of the LexA regulon in several additional bacterial species (20).
In contrast with the above cited examples, the genetic composition of the LexA network has
30 been seen to vary widely among phyla and even among species from the same class (14,

22). In this respect, it is interesting to note that although the majority of bacterial genomes
2 sequenced so far have only one, or none, LexA homologues, duplication of LexA has been
reported previously. The δ -proteobacterium *Geobacter sulfurreducens*, for instance,
4 presents two *lexA* genes whose products recognize the same regulatory motif and which
seem to be the result of a recent duplication event (18). In contrast, the two LexA proteins
6 encoded by several *Pseudomonas* and *Xanthomonas* species have been shown to recognize
markedly different LexA binding motifs (1, 41). In *P. putida*, one of the two LexA proteins
8 (LexA1) recognizes an *E. coli*-like SOS box (CTGTN₃ACAG), while the other one (LexA2)
binds to a manifestly divergent motif (GTACN₄GTGC)(1). In *Xanthomonas* (41), however,
10 while LexA2 recognizes the same motif as in *P. putida*, the LexA1 protein has been shown
to bind a motif (TTAGN₆TACTA) previously reported also in *Xylella fastidiosa*, which
12 belongs to the same Class (6).

14 Besides the coincidence in LexA-binding motifs, the relationship between *Xanthomonas*
and *Pseudomonas* LexA proteins has been established through comprehensive phylogenetic
16 analyses (13). Interestingly, results from these studies indicate also that the *lexA2* gene is
always co-transcribed with three other DNA-damage inducible genes (PP_3117, PP_3118
18 and PP_3119, named here following the recently proposed nomenclature *imuA*, *imuB* and
dnaE2) (13, 17, 20)), which make up a cassette that has been shown to be widespread
20 across the Bacteria Domain and involved in DNA-damage mediated mutagenesis (1, 13, 17).
Along its evolutionary history, this multiple gene cassette has undergone a number of
22 reorganizations, with 3-gene, 2-gene and completely split cassettes reported in different
phyla, but showing always an apparent regulation by LexA (13). Phylogenetic
24 reconstruction of the cassette history suggests that the particular reorganization leading to
the *lexA2-imuA-imuB-dnaE2* gene cassette seen in the *Xanthomonas* and *Pseudomonas*
26 took place soon before the split of γ - and β -Proteobacteria, and was soon followed by a
duplication of the cassette and its accompanying *lexA* gene, at a point in which the *E. coli*
28 LexA-binding sequence, or a closely related motif, had probably already evolved (13).

1 The presence of two different LexA proteins that do not recognize the same binding site is
2 an uncommon feature in the Bacteria Domain that can yield clues on the evolution of
3 complex regulatory networks like the SOS response, addressing such issues as the
4 behavior of coexisting *lexA* genes or the evolution of novel LexA-binding sequences. For this
5 reason, the aim of the present work has been the analysis of the genetic composition of *P.*
6 *putida* *lexA1* and *lexA2* regulons in order to determine the possible relationships and
7 overlaps between both networks. Gene expression patterns in DNA-damaged wild-type cells
8 of *P. putida*, as well as in its *lexA1* and *lexA2* mutant derivatives, have been determined
9 and examined to reveal the extent of the interplay between both networks.

10 **MATERIALS AND METHODS**

12 **Bacterial strains and growth conditions.** All bacterial strains and plasmids used in this
13 work are listed in Table S1 as supplementary data. *P. putida* KT2440 (25) was grown in LB
14 medium (32) at 30°C. Antibiotic concentrations used for each microorganism were as
15 previously reported (1, 24). All plasmid constructions and cloning experiments were
16 performed in *E. coli* *DH5 α* (32). Plasmid DNA was transformed into competent *E. coli* cells
17 as described previously (32). All *P. putida* mutants were constructed by marker exchange
18 using the plasmid pUA658 (Gm^r) (Table S1) with the gene of interest interrupted by the
19 insertion of a Ω Km cassette in a *SmaI* restriction target generated by inverted PCR using
20 suitable oligonucleotides (Table S2 of supplementary data), as described previously (1).
21 The presence of a transcriptional terminator in the Ω Km cassette avoids the expression of
22 genes downstream of the truncated gene. In all cases, and after serial passages, all the
23 mutant derivatives were genetically stable. The growth ratio in LB media and the cell
24 survival after mitomycin C treatment were determined for each of the constructed mutant
25 derivatives and displayed no differences with respect to the isogenic wild type *P. putida*
26 KT2440 strain. Likewise, microscope observation of the mutant strains did not reveal any
27 phenotypic changes.

2 **RNA extraction and RT-PCR.** RNA purification was carried out using the TriPure Isolation
Reagent kit (Tri Reagent LS, Molecular Research Center) followed by DNase I treatment
4 (Roche) and purified by using RNeasy columns (Qiagen) as described previously (42). DNA
total extraction was carried out by standard methods (32). RT-PCR analysis of gene
6 expression was performed as reported previously (1) using specific internal oligonucleotide
primers for each gene. The RNA concentration of the gene to be analyzed was always
8 normalized to that of *P. putida trpA* gene, whose expression is not affected by DNA damage,
as described in *E. coli* (10), nor in the mutant strains (Tables S3 and S4 of supplementary
10 data).

12 **Electrophoretic mobility shift assays.** LexA1 and LexA2 proteins had been purified
previously (1). Promoter fragments for electrophoretic mobility shift assays (EMSA) were
14 isolated by PCR from total *P. putida* DNA, using suitable oligonucleotide primers designed
in accordance to their published sequences. The PCR fragments were cloned in a pGEM-T[®]
16 vector and sequenced. DNA probes were prepared by PCR amplification with one of the
primers labeled at its 5' end with digoxigenin (DIG) and purifying each product in a 2–3%
18 low-melting-point agarose gel. DNA-protein binding reactions were performed as previously
described (1) and were loaded onto a 6% non-denaturing Tris-glycine polyacrylamide gel
20 [pre-run for 30 min at 10 V cm⁻¹ in 25 mM Tris-HCl (pH 8.5), 250 mM glycine, 1 mM EDTA].
DNA-protein complexes were separated at 100 V for 90 min, followed by transfer to a
22 Biodine B nylon membrane (Pall Gelman Laboratory). DIG-labeled DNA-protein complexes
were detected following the manufacturer's protocol (Roche). When necessary, either *lexA1*
24 or *lexA2* promoter fragments, obtained by PCR performed with the suitable oligonucleotides,
were used as non-labeled DNA competitor (1).

26

Hybridization and processing of microarrays. A previously described genome-wide
28 oligonucleotide-based DNA micro-array for *Pseudomonas putida* KT2440 was used (42). 20
μg of total RNA were transformed to cDNA and afterwards Cy3 or Cy5 fluorescent dyes

(Amersham Biosciences) were coupled to the amino-modified first-strand cDNA. Labeling efficiency was assessed using a NanoDrop ND1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies). Pre-hybridization and hybridization micro-array processes were performed as described previously (42). Slides were scanned with a ScanArray 4000 fluorescence scanner. For each experiment, three independent RNA extractions were made and pooled together as a sample, and each one was analyzed with at least two microarrays. Statistical analysis was based on an empirical Bayes method implemented in the software package LIMMA for the R-computing environment (www.r-project.org) (37) . A given gene was considered to be induced when the ratio of either treated vs. non-treated or wild-type vs. mutant was higher than 2.0 and presented *P* values below 0.01. All the array data were included in Arrayexpress database (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>) with accession number E-MEXP-1187.

14

***In-silico* searches of LexA-binding sites.** In-silico searches of LexA-binding sites were performed with Fitom, a general search program for the detection of DNA-binding sites based on position-specific weight matrices (PSWM) of known sites that implements several reported methods for the scoring of putative binding sites. Searches were carried out using the information content-averaged Berg-von Hippel Heterology Index (RI·BvH) as the scoring function (3, 27, 28, 35). In order to ensure that the results obtained would present low false positive rates and thus constitute a reasonable, though necessarily abridged, approximation of the true regulon, a restrictive threshold (a score better than that of half the PSWM sites) was applied to putative binding sites when analyzing full genomes. A more relaxed threshold (scores better than 85% of the original PSWM sites) was applied to search for LexA-binding sites in the promoter regions of genes that had been shown to be LexA-regulated in *P. putida*. Collections of binding sites to construct both PSWM were obtained from the literature. For LexA1, 23 experimentally verified binding sites from *E. coli* (15, 23, 29, 31) were used to build up the PSWM, whilst 7 LexA2 binding sites from several *Pseudomonas* and *Xanthomonas* species were used to construct the LexA2 PSWM (1, 41).

Genomic sequences were all downloaded from the NCBI GenBank repository through its
2 FTP server (<ftp.ncbi.nlm.nih.gov>).

4 **RESULTS AND DISCUSSION**

6 **Analysis of gene expression in *P. putida* *lexA1* and *lexA2* mutant derivatives.** To
determine the genetic composition of the LexA1 and LexA2 regulons and their possible
8 overlap, *P. putida* KT2440 *lexA1* and *lexA2* mutant derivatives were obtained by marker
exchange inserting a construct that presents either *lexA1* or *lexA2* interrupted by the Ω Km
10 cassette insertion. Both *P. putida* mutant derivatives are completely viable and do not
present observable phenotypic differences with respect to the wild-type strain. Using a
12 previously described *P. putida* KT2440 oligonucleotide-based genomic array (42), the gene
expression pattern of both mutant strains was compared to that of the wild-type before and
14 after treatment of the latter with mitomycin C.

16 The results of the array experiments, summarized in Fig. 1, revealed a differential
expression profile between the two mutant derivatives and the non-treated wild-type strain,
18 indicating that different sets of genes were under control of the LexA1 and LexA2 proteins
as inferred from their increased expression in the respective mutant derivatives. Moreover,
20 for all genes presenting differential expression between the non-treated wild-type strain
and the mutant derivatives, LexA binding sequences of the corresponding LexA protein
22 could be located in their promoter regions, thus suggesting direct regulation by either the
LexA1 or LexA2 proteins. Microarrays were also used to analyze the effect of mitomycin C
24 on the transcriptome profile of the wild-type strain. As expected, all genes presenting
increased expression in the mutant derivatives were also induced in the wild-type strain
26 treated with mitomycin C (Fig. 1), thereby confirming their regulation by either LexA1 or
LexA2. Data obtained by microarray analysis were confirmed for all the differentially
28 expressed genes through quantitative RT-PCR experiments (not shown).

As it can be seen in Fig. 1, there are 18 transcriptional units under direct control of LexA1, while only two are regulated by LexA2. A more detailed analysis of the LexA1 regulon reveals that, as expected, most of the regulated genes are involved in recombination and DNA repair. Furthermore, the LexA1 regulon of *P. putida* presents a significant overlap with the reported LexA regulons of both *E. coli* and *P. aeruginosa* (Table 1), in which there is only one LexA protein that recognizes the same regulatory motif (CTGTN₃ACAG) as *P. putida* LexA1 (9, 16). In contrast, the *P. putida* LexA2 protein controls only its own transcriptional unit and a gene (PP_3901) that is also regulated by LexA1. To ascertain whether the observed disparity in regulon contents was the general trend in other *Pseudomonas* species presenting two LexA proteins, restrictive *in silico* searches with both regulatory motifs were conducted in several *Pseudomonas* genomes to gauge approximately the extent of their LexA1 and LexA2 networks.

The results summarized in Table 1 suggest that the imbalance in regulon contents between both LexA proteins is extensive to other *Pseudomonas* species and give further credence to previous phylogenetic analyses (13), which have suggested that the *lexA2* gene arose as a duplication of an early ancestor.

The only gene directly controlled by both LexA proteins belongs to a prophage. Apart from the 18 transcriptional units regulated by LexA1 and LexA2 seen in Fig. 1, there are also a number of genes that are induced in the mitomycin C treated wild-type strain but that were not deregulated in either *lexA* mutant derivative. These genes correspond all to the coding region of a bacteriophage that has been previously described as the *P. putida* KT2440 genomic island number 79 of atypical sequences composed by elements annotated with phage-like gene signatures (39) and their DNA damage-mediated induction profile was initially attributed to a LexA-independent pathway, as seen in many bacteriophages in which activated RecA promotes self-cleavage of their lytic cycle repressors, thus inducing the bacteriophage (34). However, the fact that the only gene upregulated in both *lexA1* and *lexA2* mutant derivatives (PP_3901) resided also in the same bacteriophage coding region

suggested that some kind of LexA co-regulation might lie beneath the observed induction of phage genes. PP_3901 presents regulatory motifs for both LexA1 and LexA2 in its promoter region, and the ability of both LexA proteins to specifically bind the PP_3901 promoter was determined through EMSA (Fig. 2). Moreover, a quantitative RT-PCR experiment was performed (Fig. 3), thus validating the results from the array data and confirming not only that PP_3901 is simultaneously and directly regulated by LexA1 and LexA2, but also that it is the LexA1 protein which plays the leading role in the transcriptional control of PP_3901 expression (Fig. 3). BLAST-P searches with the 86 amino acid protein coding sequence of PP_3901 resulted in significant matches with paralogous proteins in *P. putida* (PP_2452), other *Pseudomonas* species, like *P. syringae* (PSPPH_2123), and even in the *P. aeruginosa* F116 bacteriophage (F116928). In all these cases, however, only LexA binding sequences corresponding to the LexA1 motif, but not to that of LexA2, could be identified in the promoter region of the PP_3901 homologues.

To gain some further understanding on the possible role of PP_3901 in the induction of phage genes and of its co-regulation by the two LexA proteins of *P. putida*, a PP_3901 mutant derivative was constructed after ensuring, through RT-PCR analysis, that PP_3901 was not part of a transcriptional unit and that its inactivation would not result in polar effects on downstream genes (data not shown). As in the case of both LexA mutant derivatives, the PP_3901 mutant derivative did not present morphological or growth differences with respect to the wild-type strain (data not shown). Since PP_3901 lies in the coding region of a genome encoded bacteriophage, the expression of two genes from this region (PP_3873 and PP_3894) that had been shown to be DNA-damage inducible in the mitomycin C treated wild-type strain were analyzed by means of quantitative RT-PCR studies in the PP_3901 mutant derivative.

As it can be seen in Fig. 4, RT-PCR results indicate that neither prophage gene is induced by mitomycin C treatment in the PP_3901 derivative, thereby suggesting that PP_3901 is involved in the DNA damage-mediated induction of prophage genes. In this respect, the

explicit regulation of PP_3901 by both LexA proteins and its involvement in the DNA damage-mediated induction of the prophage genes is reminiscent of previously described mechanisms of SOS-mediated bacteriophage induction. For instance, the Tum protein of coliphage-186 (36) and other prophages (4) has been shown to be explicitly regulated by LexA, where it controls the induction of these prophages by interfering with its lytic cycle repressor. Nonetheless, the protein sequence of PP_3901 has no apparent sequence homology with Tum, suggesting that it may be a key component of a previously unreported pathway of LexA-mediated bacteriophage induction. Moreover, the induction of the prophage genes does not only require the presence of PP_3901, but also treatment of the *P. putida* culture with Mitomycin C, as seen in Figure 4 for *lexA1* and *lexA2* mutant derivatives. Even though both mutant derivatives present an increased amount of PP_3901 product in the non-treated cultures, prophage gene expression remains unchanged with respect to that of the isogenic wild type strain.

In summary, the results presented above yield a picture of pronounced asymmetry between the two cohabiting LexA regulons of *P. putida*, and show that this asymmetry is extensible to other *Pseudomonas* species harboring two *lexA* genes. Based on previous results on the phylogeny of the mutagenesis cassette associated with the *lexA2* gene (13), where the relationship between both *P. putida* LexA proteins has been firmly established, the small size of the *lexA2* regulon reinforces the hypothesis that the *lexA2* gene arose from a relatively ancient duplication of the full *lexA-imuA-imuB-dnaE2* cassette at the onset of the β/γ -Proteobacteria radiation. As seen in other instances (5, 26), genetic duplication would have freed one of the two copies from selective constraints, while the other copy maintained its former regulatory role. This would explain both the divergence observed in the LexA2 binding motif and the very small number of genes under LexA2 regulation. Ultimately, the most convincing explanation for the survival of the *lexA2* gene in the several *Pseudomonas* and *Xanthomonas* species might well be its direct regulation of the *imuA-imuB-dnaE2* mutagenic cassette, which has been shown to be LexA regulated in all the species in which it is present (13). In fact, in the close relative *P. aeruginosa*, which has lost its *lexA2* gene,

regulation of the *imuA-imuB-dnaE2* cassette has been taken up by the remaining LexA
2 protein (9), which has been shown to correspond to *P. putida* LexA1 and which binds to the
E. coli LexA binding sequence (9).

4
In this context, the fact that the *P. putida* LexA1 protein presents an *E. coli*-like binding
6 motif becomes noteworthy, as it confirms previous suggestions that an *E. coli* LexA binding
motif was already in place when the *lexA-imuA-imuB-dnaE2* cassette duplication took place
8 early in the history of β - and γ -Proteobacteria (13). Furthermore, the fact that the regulon
of *Xanthomonas* LexA1, which presents a binding sequence divergent from *E. coli* (41), has
10 been shown to regulate only a handful of genes (22) suggests that preservation of the *E. coli*
LexA-binding motif may have played a substantial role in the conservation of LexA regulon
12 contents in the γ -Proteobacteria. Taking into account the significant overlap between LexA
regulons in different phyla, in spite of manifestly divergent LexA-binding sites across the
14 Bacteria Domain (12, 22), the evidence that motif conservation could equate to a certain
degree with conservation of regulon contents has strong implications for the evolution of
16 the LexA regulon, as it suggests that changes to the LexA-binding sequence must have
been very gradual and continuous following an ancestral line. In this context, the puzzling
18 existence of markedly divergent LexA-binding motifs (6, 7, 11, 12, 41), which are often
associated with very small regulons, may be regarded simply as the end product of relaxed
20 selection on the LexA regulon in some species and phyla.

22 **ACKNOWLEDGEMENTS**

24 This work was funded by Grants BFM2004-02768/BMC and BFU2006-00767/BMC from
the Ministerio de Educación y Ciencia (MEC) de España, and 2005SGR533 from the
26 Generalitat de Catalunya, and by the Consejo Superior de Investigaciones Científicas
(CSIC). Dr. S. Campoy is recipient of a post-doctoral contract from INIA-IRTA. M. Abella is
28 recipient of a pre-doctoral fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia (MEC).

2 REFERENCES

- 4 1. **Abella, M., I. Erill, M. Jara, G. Mazon, S. Campoy, and J. Barbe.** 2004. Widespread distribution
6 of a *lexA*-regulated DNA damage-inducible multiple gene cassette in the Proteobacteria phylum. *Mol*
Microbiol **54**:212-22.
- 8 2. **Au, N., E. Kuester-Schoeck, V. Mandava, L. E. Bothwell, S. P. Canny, K. Chachu, S. A. Colavito,**
10 **S. N. Fuller, E. S. Groban, L. A. Hensley, T. C. O'Brien, A. Shah, J. T. Tierney, L. L. Tomm, T.**
M. O'Gara, A. I. Goranov, A. D. Grossman, and C. M. Lovett. 2005. Genetic composition of the
Bacillus subtilis SOS system. *J Bacteriol* **187**:7655-66.
- 12 3. **Berg, O. G., and P. H. von Hippel.** 1987. Selection of DNA binding sites by regulatory proteins.
Statistical-mechanical theory and application to operators and promoters. *J Mol Biol* **193**:723-50.
- 14 4. **Bunny, K., J. Liu, and J. Roth.** 2002. Phenotypes of *lexA* mutations in *Salmonella enterica*:
evidence for a lethal *lexA* null phenotype due to the Fels-2 prophage. *J Bacteriol* **184**:6235-49.
- 16 5. **Campoy, S., M. Fontes, S. Padmanabhan, P. Cortes, M. Llagostera, and J. Barbe.** 2003. *LexA*-
independent DNA damage-mediated induction of gene expression in *Myxococcus xanthus*. *Mol*
Microbiol **49**:769-81.
- 18 6. **Campoy, S., G. Mazon, A. R. Fernandez de Henestrosa, M. Llagostera, P. B. Monteiro, and J.**
Barbe. 2002. A new regulatory DNA motif of the gamma subclass Proteobacteria: identification of
20 the *LexA* protein binding site of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Microbiology* **148**:3583-97.
- 22 7. **Campoy, S., N. Salvador, P. Cortes, I. Erill, and J. Barbe.** 2005. Expression of canonical SOS
genes is not under *LexA* repression in *Bdellovibrio bacteriovorus*. *J Bacteriol* **187**:5367-75.
- 24 8. **Cirz, R. T., M. B. Jones, N. A. Gingles, T. D. Minogue, B. Jarrahi, S. N. Peterson, and F. E.**
Romesberg. 2007. Complete and SOS-mediated response of *Staphylococcus aureus* to the antibiotic
ciprofloxacin. *J Bacteriol* **189**:531-9.
- 26 9. **Cirz, R. T., B. M. O'Neill, J. A. Hammond, S. R. Head, and F. E. Romesberg.** 2006. Defining the
Pseudomonas aeruginosa SOS response and its role in the global response to the antibiotic
28 ciprofloxacin. *J Bacteriol* **188**:7101-10.
- 30 10. **Courcelle, J., A. Khodursky, B. Peter, P. O. Brown, and P. C. Hanawalt.** 2001. Comparative gene
expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. *Genetics*
158:41-64.
- 32 11. **Cune, J., P. Cullen, G. Mazon, S. Campoy, B. Adler, and J. Barbe.** 2005. The *Leptospira*
interrogans *lexA* gene is not autoregulated. *J Bacteriol* **187**:5841-5.
- 34 12. **Erill, I., S. Campoy, and J. Barbe.** 2007. Eons of distress: an evolutionary perspective on the
bacterial SOS response. *FEMS Microbiology Reviews* **in press**.
- 36 13. **Erill, I., S. Campoy, G. Mazon, and J. Barbe.** 2006. Dispersal and regulation of an adaptive
mutagenesis cassette in the bacteria domain. *Nucleic Acids Res* **34**:66-77.

14. **Erill, I., M. Escribano, S. Campoy, and J. Barbe.** 2003. In silico analysis reveals substantial
2 variability in the gene contents of the gamma proteobacteria LexA-regulon. *Bioinformatics* **19**:2225-
36.
- 4 15. **Fernandez de Henestrosa, A. R., J. Cune, G. Mazon, B. L. Dubbels, D. A. Bazylnski, and J.
6 Barbe.** 2003. Characterization of a new LexA binding motif in the marine magnetotactic bacterium
strain MC-1. *J Bacteriol* **185**:4471-82.
- 8 16. **Fernandez De Henestrosa, A. R., T. Ogi, S. Aoyagi, D. Chafin, J. J. Hayes, H. Ohmori, and R.
10 Woodgate.** 2000. Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*.
Mol Microbiol **35**:1560-72.
- 12 17. **Galhardo, R. S., R. P. Rocha, M. V. Marques, and C. F. Menck.** 2005. An SOS-regulated operon
involved in damage-inducible mutagenesis in *Caulobacter crescentus*. *Nucleic Acids Res* **33**:2603-14.
- 14 18. **Jara, M., C. Nunez, S. Campoy, A. R. Fernandez de Henestrosa, D. R. Lovley, and J. Barbe.**
2003. *Geobacter sulfurreducens* has two autoregulated *lexA* genes whose products do not bind the
14 *recA* promoter: differing responses of *lexA* and *recA* to DNA damage. *J Bacteriol* **185**:2493-502.
- 16 19. **Khil, P. P., and R. D. Camerini-Otero.** 2002. Over 1000 genes are involved in the DNA damage
response of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **44**:89-105.
- 18 20. **Koorits, L., R. Tegova, M. Tark, K. Tarassova, A. Tover, and M. Kivisaar.** 2007. Study of
involvement of ImuB and DnaE2 in stationary-phase mutagenesis in *Pseudomonas putida*. *DNA
Repair (Amst)* **6**:863-8.
- 20 21. **Little, J. W.** 1991. Mechanism of specific LexA cleavage: autodigestion and the role of RecA
coprotease. *Biochimie* **73**:411-21.
- 22 22. **Mazon, G., I. Erill, S. Campoy, P. Cortes, E. Forano, and J. Barbe.** 2004. Reconstruction of the
evolutionary history of the LexA-binding sequence. *Microbiology* **150**:3783-95.
- 24 23. **McNally, K. P., N. E. Freitag, and G. C. Walker.** 1990. LexA-independent expression of a mutant
mucAB operon. *J Bacteriol* **172**:6223-31.
- 26 24. **Miller, J.** 1991. *A short Course in Bacterial Genetics*. Cold Spring Harbor, New York.
- 28 25. **Nelson, K. E., C. Weinl, I. T. Paulsen, R. J. Dodson, H. Hilbert, V. A. Martins dos Santos, D. E.
Fouts, S. R. Gill, M. Pop, M. Holmes, L. Brinkac, M. Beanan, R. T. DeBoy, S. Daugherty, J.
30 Kolonay, R. Madupu, W. Nelson, O. White, J. Peterson, H. Khouri, I. Hance, P. Chris Lee, E.
Holtzapple, D. Scanlan, K. Tran, A. Moazzez, T. Utterback, M. Rizzo, K. Lee, D. Kosack, D.
32 Moestl, H. Wedler, J. Lauber, D. Stjepandic, J. Hoheisel, M. Straetz, S. Heim, C. Kiewitz, J. A.
Eisen, K. N. Timmis, A. Dusterhoft, B. Tummler, and C. M. Fraser.** 2002. Complete genome
sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440.
34 *Environ Microbiol* **4**:799-808.
26. **Norioka, N., M. Y. Hsu, S. Inouye, and M. Inouye.** 1995. Two *recA* genes in *Myxococcus xanthus*. *J
36 Bacteriol* **177**:4179-82.
27. **O'Neill, M. C.** 1989. Consensus methods for finding and ranking DNA binding sites. Application to
38 *Escherichia coli* promoters. *J Mol Biol* **207**:301-10.

28. **O'Neill, M. C.** 1998. A general procedure for locating and analyzing protein-binding sequence motifs in nucleic acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:10710-5.
29. **Reppas, N. B., J. T. Wade, G. M. Church, and K. Struhl.** 2006. The transition between transcriptional initiation and elongation in *E. coli* is highly variable and often rate limiting. *Mol Cell* **24**:747-57.
30. **Ronen, M., R. Rosenberg, B. I. Shraiman, and U. Alon.** 2002. Assigning numbers to the arrows: parameterizing a gene regulation network by using accurate expression kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:10555-60.
31. **Salles, B., and G. M. Weinstock.** 1989. Mutation of the promoter and LexA binding sites of *cea*, the gene encoding colicin E1. *Mol Gen Genet* **215**:483-9.
32. **Sambrook, J., and D. Russell.** 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N. Y.
33. **Sassanfar, M., and J. W. Roberts.** 1990. Nature of the SOS-inducing signal in *Escherichia coli*. The involvement of DNA replication. *J Mol Biol* **212**:79-96.
34. **Sauer, R. T., M. J. Ross, and M. Ptashne.** 1982. Cleavage of the lambda and P22 repressors by recA protein. *J Biol Chem* **257**:4458-62.
35. **Schneider, T. D., G. D. Stormo, L. Gold, and A. Ehrenfeucht.** 1986. Information content of binding sites on nucleotide sequences. *J Mol Biol* **188**:415-31.
36. **Shearwin, K. E., A. M. Brumby, and J. B. Egan.** 1998. The Tum protein of coliphage 186 is an antirepressor. *J Biol Chem* **273**:5708-15.
37. **Smyth, G. K.** 2004. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* **3**:Article3.
38. **Walker, G. C.** 1984. Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **48**:60-93.
39. **Weinel, C., K. E. Nelson, and B. Tummli.** 2002. Global features of the *Pseudomonas putida* KT2440 genome sequence. *Environ Microbiol* **4**:809-18.
40. **Winterling, K. W., D. Chafin, J. J. Hayes, J. Sun, A. S. Levine, R. E. Yasbin, and R. Woodgate.** 1998. The *Bacillus subtilis* DinR binding site: redefinition of the consensus sequence. *J Bacteriol* **180**:2201-11.
41. **Yang, M. K., Y. C. Yang, and C. H. Hsu.** 2002. Characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* LexA: recognition of the LexA binding site. *Mol Genet Genomics* **268**:477-87.
42. **Yuste, L., A. B. Hervas, I. Canosa, R. Tobes, J. I. Jimenez, J. Nogales, M. M. Perez-Perez, E. Santero, E. Diaz, J. L. Ramos, V. de Lorenzo, and F. Rojo.** 2006. Growth phase-dependent expression of the *Pseudomonas putida* KT2440 transcriptional machinery analysed with a genome-wide DNA microarray. *Environ Microbiol* **8**:165-77.

36

2 Table 1. Comparison of *P. putida* *lexA1* and *lexA2* regulons reported herein with both experimentally validated *lexA* networks of *E. coli* and *P. aeruginosa* and *in silico* searches in other *Pseudomonas* species encoding both LexA proteins.

	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 (NC_002947)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 (NC_002516)	<i>Escherichia coli</i> K12 (U00096)	<i>Pseudomonas entomophila</i> L48 (NC_008027)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5 (NC_004129)	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a (NC_007005)	
TUs belonging to LexA1 regulon ^Δ	18 ^a	11 ^b	27 ^c	15 ^d	21 ^d	25 ^d	
TUs belonging to LexA2 regulon	2 ^a	<i>lexA2</i> not present	<i>lexA2</i> not present	1 ^d	1 ^d	1 ^d	
Statement of the <i>P. putida</i> TUs also regulated by the <i>E. coli</i> -like LexA protein at least in one of the other species	↓ PP_1629 (<i>recA</i>)	+	+	+	+	+	
	↓ PP_1630 (<i>recX</i>)	+	+	+	+	+	
	PP_1125 (<i>dinG</i>)	+	+	+	+	+	
	↓ PP_2143 (<i>lexA1</i>)	+	+	+	+	+	
	↓ PP_2142 (<i>sulA</i>)	+	+	+	+	+	
	PP_4616 (<i>yebG</i>)	+	+	+	+	+	
	PP_4729 (<i>recN</i>)	+	+	+	+	+	
	PP_1203 (<i>dinP</i>)	+	+	+	-	-	
	PP_1974 (<i>uvrB</i>)	-	+	+	-	-	
	PP_5352 (<i>uvrD</i>)	-	+	+	-	+	
	PP_2109 (<i>hp</i>)*	+	+	+	+	-	NP
	↓ PP_2452 (<i>hp</i>)	NP*	NP	NP	+	+	+
	↓ PP_2451 (<i>endA</i>)	-	-	-	+	+	+
	PP_4019 (<i>topB</i>)	NP	-	-	NP	NP	+
	PP_5393 (<i>hp</i>)	NP	NP	NP	+	+	NP
	↓ PP_2924 (<i>hp</i>)	NP	-	-	+	+	+
	↓ PP_2923 (<i>hp</i>)	NP	NP	NP	+	+	+
↓ PP_1110 (<i>cysE</i>)	-	-	NP	NP	NP	+	
↓ PP_1111 (<i>hp</i>)	-	-	NP	NP	NP	+	
↓ PP_1112 (<i>hp</i>)	-	-	NP	NP	NP	+	
↓ PP_1113 (<i>cysK</i>)	NP	-	-	NP	NP	+	
Statement of the <i>P. putida</i> TUs also regulated by LexA2 in other species	↓ PP_3116 (<i>lexA2</i>)	NP	NP	+	+	+	
	PP_3117 (<i>imuA</i>)	- ^φ	NP	+	+	+	
	PP_3118 (<i>imuB</i>)	- ^φ	NP	+	+	+	
	↓ PP_3119 (<i>dnaE2</i>)	- ^φ	NP	NP	+	+	+
	PP_3901 (<i>hp</i>)	NP	NP	NP	P	P	P

^Δ TU means transcriptional units

4 ^a Experimental data obtained in this work

^b Experimental data described in (9)

6 ^c Experimental data described in (16)

^d Data obtained through *in silico* searches performed as described in Materials and Methods section

8 *NP means not present in the corresponding genome, + or - symbols indicate genes that are present in the corresponding genome and that are LexA regulated or not, respectively.

P presence of a PP_3901 paralogous gene that is controlled by the *E. coli*-like LexA protein (but not by the *P. putida* LexA2-like repressor).

10 **hp* means hypothetical protein

^φ Gene controlled by the *E. coli*-like LexA protein

12 Genes comprised in the arrow are constituting a single transcriptional unit

FIGURE LEGENDS

2

FIG. 1 Schematic diagram showing *P. putida* mitomycin C-induced transcriptional units (TUs) and their relationship with either LexA1 and LexA2 proteins regulation. All genes shown presented an induction factor higher than 2.0 fold in microarray data with respect to either mitomycin C treated or untreated wild-type expression cells. Data obtained by microarray analysis were confirmed for all the genes through quantitative RT-PCR experiments (see Materials and Methods). ● and ○ symbols indicate the presence of either LexA1 or LexA2 binding sites in the corresponding promoter region, respectively. When identified in the genome annotation, the gene symbol is included. ORFs without gene symbol are represented by their locus name. Genes belonging to the *P. putida* genomic island number 79 (from position 4363000 to 4428000 of *P. putida* genome sequence and annotated as a bacteriophage (39)) are shown as dark-grey arrows. Connected arrows indicate polycistronic transcriptional units.

FIG. 2 A) Structural arrangement of the *P. putida* PP_3901 gene promoter. LexA1 and LexA2 binding sites and their position, with respect to the ATG translational starting codon, are indicated. Black arrows show the position of the oligonucleotides used to obtain the PP_3901 promoter probe for EMSA experiments. **B)** Electrophoretic mobility shift assay of the *P. putida* PP_3901 promoter in the absence or in the presence of either LexA1 or LexA2 purified proteins. To determine the specificity of binding of both proteins, a 300-fold molar excess of either non-labelled *lexA1* or *lexA2* promoters were used as specific or non-specific competitor fragment depending on the purified LexA protein that was used in each case.

FIG. 3 Relative expression levels of the PP_3901 gene in the *P. putida* wild type strain and in its *lexA1* and *lexA2* mutant derivatives. The expression level was measured by quantitative RT-PCR and it is the ratio of the relative mRNA concentration for the PP_3901 gene in mitomycin C treated (+) and untreated (-) cells with respect to that in the untreated *P. putida* wild type strain. The relative mRNA concentration was normalized to the *trpA* gene expression. In each case, the mean value from three independent experiments (each in triplicate) is shown.

28

FIG. 4 Relative expression levels of PP_3873 and PP_3894 prophage genes in the *P. putida* wild type strain and its PP_3901, *lexA1* and *lexA2* mutant derivatives measured by quantitative RT-PCR. The relative

30

expression level is the ratio of the relative mRNA concentration for either PP_3873 (gray columnnes) or
2 PP_3894 (black columnnes) genes in mitomycin C treated (+) and untreated (-) cells with respect to that of the
each gene in the untreated isogenic *P. putida* wild type strain. The relative mRNA concentration for each gene
4 is normalized to the *trpA* gene expression. In each case, the mean value from three independent experiments
(each in triplicate) is shown.

6

8

Fig. 1

Mitomycin C induced transcriptional units (TUs)

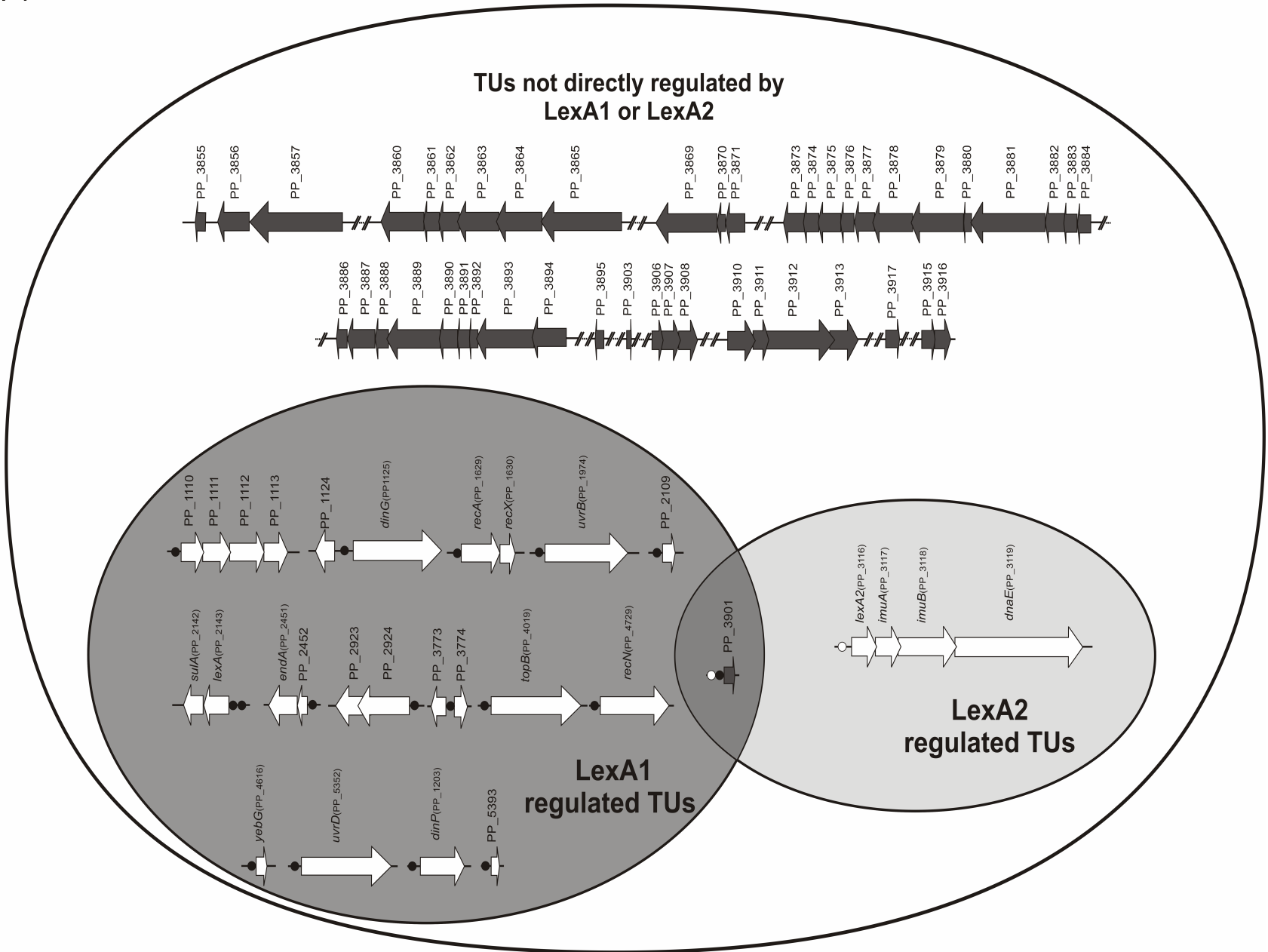
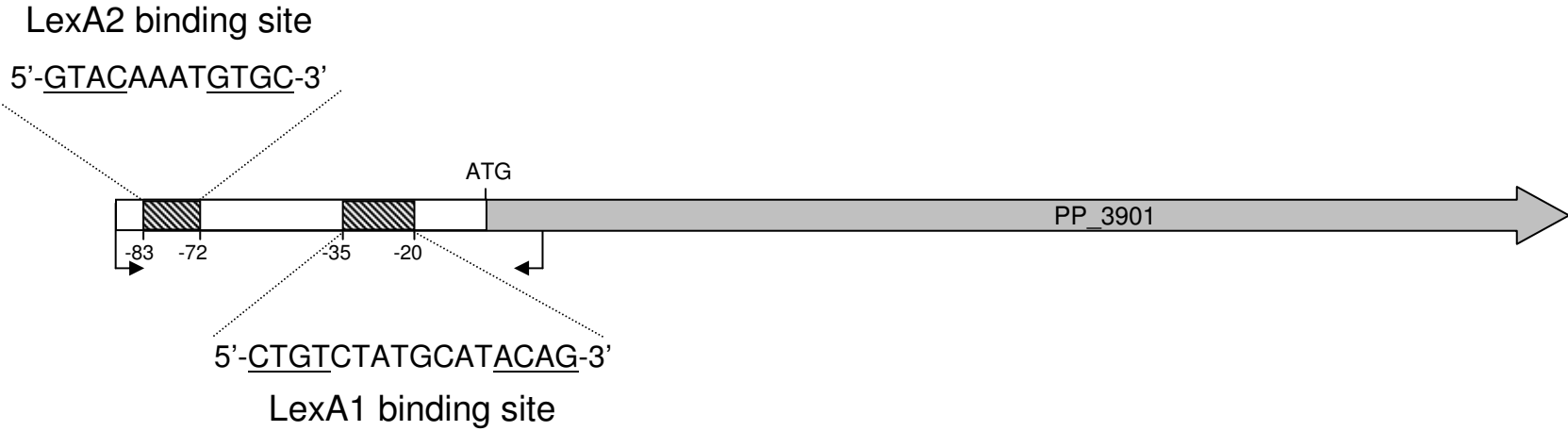


Fig. 2

A.



B.

Labelled PP_3901 promoter	+	+	+	+	+	+	+
Non-labelled <i>lexA1</i> promoter	-	-	-	+	+	-	-
Non-labelled <i>lexA2</i> promoter	-	-	-	-	-	+	+
<i>P. putida</i> LexA purified protein	-	LexA1	LexA2	LexA1	LexA2	LexA1	LexA2

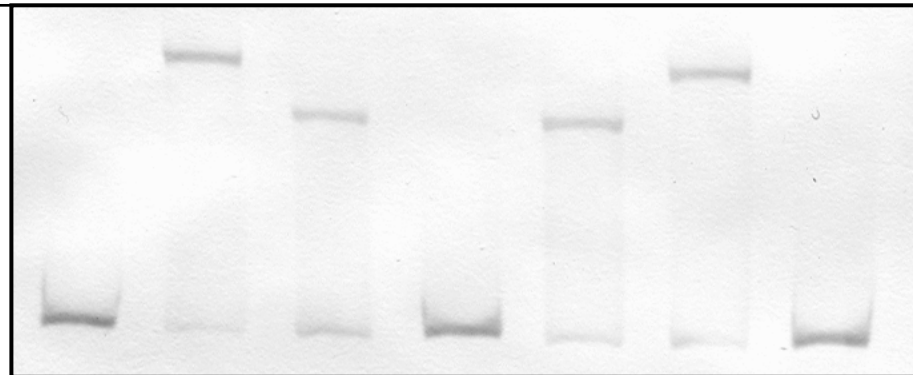


Fig. 3

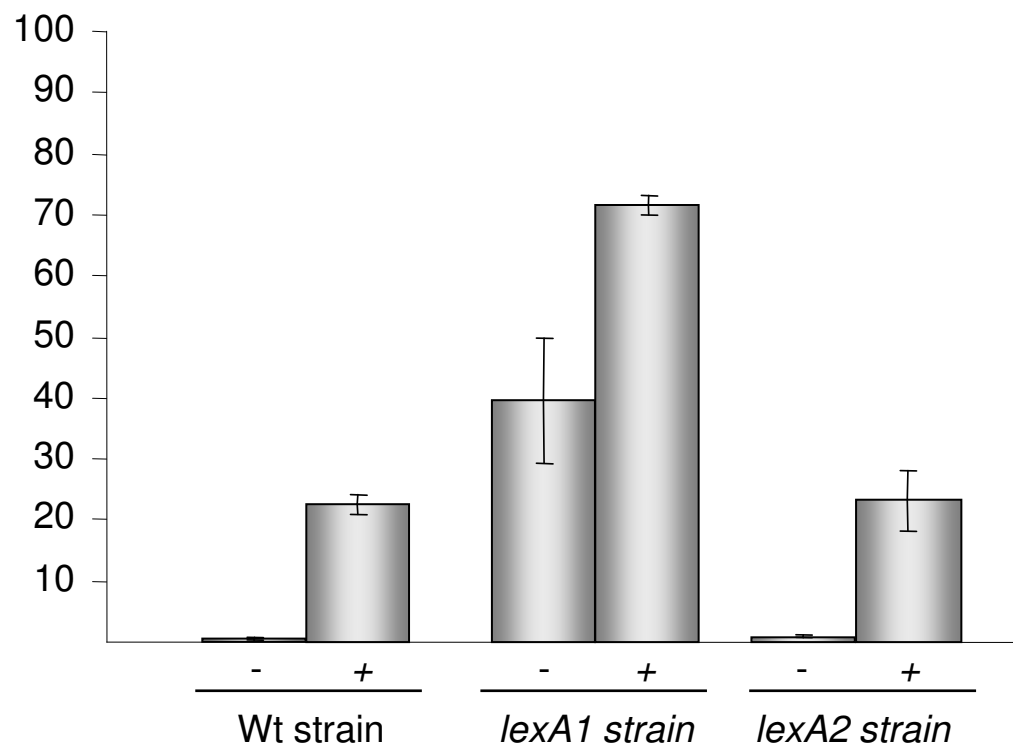


Fig. 4

