

24.90



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

**Interacción de los Genes Recombinacionales de  
Escherichia coli (rec A) y del Bacteriófago  $\lambda$   
(red) en la Recombinación y Reparación del ADN  
Dañado por Radiación UV**

**T E S I S**

Que para obtener el título de :

**B I O L O G O**

p r e s e n t a :

**UBALDO SAMUEL LEON SANTOS**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# I N D I C E

I	Introducción	
	A.- Estructura y función del ADN.....	1
	B.- Daños al ADN.....	5
	C.- Mecanismos de reparación.....	7
	D.- Regulación de los mecanismos de reparación.....	18
	E.- El gene recA de <u>Escherichia coli</u> .....	22
	F.- El gene red del bacteriófago $\lambda$ .....	28
II	Materiales	
	A.- Material biológico.....	33
	B.- Medios de cultivo.....	34
III	Métodos	
	A Obtención de reservas de virus.....	38
	B Cuantificación de los bacteriófagos y de las células bacterianas.....	40
	C Identificación de algunas características genéticas de bacteriófagos y bacterias.....	41
	D Irradiación de bacterias y de bacteriófagos.....	46
IV	Cruzas genéticas.....	47
V	Resultados.....	49
VI	Discusión.....	64
VII	Conclusiones.....	68
VIII	Bibliografía.....	69

## I Introducción

### A Estructura y función del ADN.

La información que determina las características de los seres vivos, es transmitida de generación en generación por las moléculas de ácido desoxirribonucleico (ADN). La molécula de ADN está constituida generalmente por dos largas cadenas de polinucleótidos entrelazadas en forma de una doble hélice, el diámetro de la misma es de 20 Å (Watson, 1974). Un nucleótido está constituido de una base nitrogenada, un residuo de desoxirribosa y un grupo fosfato. Las bandas son cadenas de moléculas de azúcar, unidas entre sí por los grupos fosfato, los cuales forman una estructura muy regular denominada esqueleto. A partir de este esqueleto se proyectan las bases nitrogenadas que pueden ser purinas : adenina (A) y guanina (G) o pirimidinas : citosina (C) y timina (T). El orden de los residuos de las purinas y pirimidinas en las cadenas es muy irregular y varía en las diferentes moléculas de ADN.

Las cuatro bases son relativamente insolubles en agua y tienden a acomodarse sobre sí mismas perpendicularmente a la dirección del eje helicoidal. Las bases de una banda se enlazan con las de la otra por medio de puentes de hidrógeno para formar la doble hélice de ADN. Tales bases son complementarias, esto significa que la adenina de una banda se aparea sólo con la timina de la otra y la guanina únicamente con la citosina. A diferencia de las relaciones A/T y G/C que son 1 a 1 para satisfacer las normas de apareamiento entre las bases, el contenido de A+T/G+C es muy variable en las diferentes moléculas de ADN. Una consecuencia estereoquímica de la formación de pares de bases, es la orientación de las cadenas de polinucleótidos en direcciones opuestas.

Como resultado de la complementariedad de las bases, cada banda es un molde de la otra. Dicha complementación es la base para la duplicación del ADN, su expresión en la síntesis de proteínas y su recombinación.

## 1 Duplicación del ADN.

En la duplicación del ADN se separan las bandas de este ácido y se unen los nucleótidos complementarios a cada una de las cadenas libres. Las principales enzimas implicadas en este proceso son las polimerasas, requeridas para la iniciación y crecimiento de la cadena. Estas enzimas necesitan de una banda de ADN, la cual actúa como molde, un iniciador que es una pieza de polinucleótido apareada al molde, así como de nucleósidos trifosfatados, los cuales serán unidos por medio de enlaces fosfodiéster en dirección 3'-5'. Finalmente, la acción de una ligasa dá la continuidad covalente a la nueva cadena (Watson, 1974).

## 2 Síntesis de proteínas.

La información hereditaria para la síntesis de cualquier proteína, está contenida en los genes, constituidos por la secuencia de bases a lo largo de una cadena de ADN. A la serie de tres bases nitrogenadas se le llama triplete o codón y cada uno de ellos codifica para cada uno de los aminoácidos que constituyen la cadena polipeptídica. Para formar una proteína, un gene estructural dirige la maquinaria celular ensamblando cientos de aminoácidos en una secuencia lineal determinada. En un primer paso llamado transcripción, interviene otro tipo de ácido nucléico, el ácido ribonucleico mensajero (ARNm). Dicho ARNm se forma a partir de un molde de ADN, por lo que su secuencia de nucleótidos es complementaria a la del ADN. Existen dos tipos más de ARN, el ARN ribosomal y el ARN de transferencia, los cuales son construidos de la misma manera. En el siguiente paso, la traducción del mensaje, la actuación de estas distintas clases de ARN logra la síntesis de las moléculas complejas llamadas proteínas (Watson, 1974).

No todo el ADN de un organismo determinado tiene esta función codificadora. Existen segmentos de bases situadas al lado de los genes estructurales que controlan su expresión, dentro de estas regiones tenemos a los promotores y a los operadores. A los primeros se une la enzima ARN polimerasa, la cual se des

plaza a lo largo de ellos, iniciándose así la transcripción desde un punto anterior al comienzo del gene estructural. Al final del gene estructural hay tripletes sin sentido que actúan como señal para terminar la transcripción. Los operadores son regiones a las cuales se pueden unir, directa o indirectamente, ciertas proteínas llamadas represores. Por ejemplo, a una secuencia operadora se puede unir una proteína represora producto de un gene regulador específico, por lo tanto, la presencia de este represor impide la transcripción del gene estructural en determinadas circunstancias (Watson, 1974).

### 3 Recombinación

Si consideramos únicamente la estructura del ADN, sin tomar en cuenta a la proteína *recA*, la cual es la más importante en la recombinación y cuya actuación se describirá posteriormente, nos percataremos que la recombinación es posible, al igual que la duplicación y la transcripción, gracias a dicha estructura.

En la recombinación dos moléculas de ADN con regiones homólogas se unen para después intercambiarse, originando así nuevas combinaciones de genes. Recientemente se ha avanzado mucho en la comprensión de este proceso, lo cual se ha logrado con el estudio, tanto de algunas propiedades físicoquímicas del ADN, como de cepas de microorganismos deficientes en proteínas que intervienen en la recombinación, así como también del aislamiento y caracterización de estas proteínas (Dressler y Potter, 1982).

Veamos primero las características estructurales del ADN relacionadas con la recombinación genética. Como se mencionó inicialmente, los enlaces por puente de hidrógeno son las fuerzas que mantienen la estructura de doble hélice en el ADN, pero debido a que estos son relativamente débiles se dan fenómenos como la desnaturalización, renaturalización, migración de bandas y superenrollamiento. De estos procesos el último es una faceta importante en la duplicación, transcripción, reparación y recombinación del ADN.

El superenrollamiento puede ser comprendido de la siguiente forma : en el ADN lineal las dos bandas antiparalelas forman una hélice dirigida hacia la derecha, con cerca de un giro de hélice por cada diez pares de bases, la configuración B. Si el ADN está en la forma de círculos cerrados y tiene el mismo giro de hélice como en la configuración B, se dice que este está relajado. Pero si las dos bandas están entretrejidas menos veces que en el círculo relajado, el ADN disminuye su alejamiento de la configuración B, favorecida energéticamente, enrollándose alrededor de su eje.

La energía mecánica producto de la torsión, almacenada en el ADN superenrollado, ejerce una persistente fuerza de torsión que tiende a desenrollar regiones locales de la doble hélice de ADN. De esta manera el superenrollamiento facilita los procesos que ocasionan desenrollamiento de la hélice, por ejemplo, las horquetas de duplicación durante la transcripción y las reacciones de transferencia de bandas implicadas en la recombinación del ADN (Fisher, 1981).

Otras estructuras del ADN implicadas en la recombinación y reparación de daños causados al mismo, son el ADN con una banda cortada y el ADN con huecos en una de las bandas (Rupp y Howard-Flanders, 1968).

#### 4 Consideraciones evolutivas de la recombinación.

La recombinación genética origina nuevas combinaciones de genes, lo que resulta en una mayor variabilidad para los organismos, dicha variabilidad es importante en la evolución ya que sobre esta opera la selección natural. Ahora bien, si comparamos a la recombinación con otra fuente de variación como lo es la mutación, es decir un cambio en la secuencia nucleotídica del ADN, nos daremos cuenta que aunque la mutación es finalmente el origen de dicha variación, esta es de pocas consecuencias evolutivas inmediatas, debido a que dichas mutaciones deben ser "enjuiciadas" por la selección natural y sólo hasta entonces podrán formar parte de la composición genética de las poblaciones. Además, las mutaciones espontáneas son muy raras co

mo para explicar la variabilidad observada, sobre todo en organismos diploides. En cambio la recombinación es más importante como fuente de variación, porque produce un número enorme de combinaciones, aún con una cantidad pequeña de genes (Mayr, 1977).

Otro papel no menos importante de la recombinación genética reside en su capacidad de reparar cierto tipo de daños producidos en el ADN.

#### B Daños al ADN.

El ADN en los seres vivos está expuesto, de manera natural o artificial, a agentes físicos, químicos y aún biológicos que le provocan alteraciones en su estructura, ya sea de una manera directa o indirecta. Este daño es responsable de la mayoría de la mutagénesis y de parte de la letalidad observada. En vista de que estas alteraciones son mutagénicas y carcinogénicas (Ames et al, 1973; Ames et al, 1975; McCann et al, 1975), se puede apreciar la importancia del estudio de los mecanismos de reparación de estos daños.

Se entiende por daño a cualquier modificación al ADN que altere sus propiedades codificadoras o su funcionamiento normal en la duplicación o la transcripción (Hanawalt et al, 1979). En la elucidación del papel de los procesos de reparación en la viabilidad celular y en la mutagénesis, es muy importante el estudio de lesiones específicas del ADN, ya que la estructura química de los daños, así como su distribución y abundancia en el genoma, determinan el modo de procesarlos. Menos informativo es el estudio de los agentes que dañan al ADN inespecíficamente, puesto que inducen un amplio espectro de lesiones (Cerutti, 1978).

Los daños más comunmente estudiados son :

#### 1 Bases ausentes, incorrectas o alteradas.

##### a) Ausencia de bases .

La pérdida de bases puede ocurrir espontáneamente, por radiaciones ultravioleta (UV) o ionizantes y por alquilación.

b Bases incorrectas.

Durante la duplicación del ADN puede ocurrir una incorporación errónea de bases. Por ejemplo, se puede presentar la introducción de uracilo en lugar de timina (Tye et al., 1978). El apareamiento erróneo en el ADN puede deberse también a la desaminación de la citosina, adenina y guanina lo cual produce uracilo, hipoxantina y xantina respectivamente (Hanawalt et al., 1979).

Las lesiones mencionadas son modificaciones sutiles de la estructura de las bases del ADN, las cuales causan incorporación de forma errónea de la base complementaria por las ADN polimerasas (Boiteaux et al., 1978). y causan mutaciones de manera directa (Radman et al., 1979).

c Bases alteradas

Las bases nitrogenadas están sujetas a una amplia variedad de adiciones que alteran la estructura del ADN, algunas de estas constituyen un daño, como los dimeros de pirimidina y ciertas alquilaciones, mientras que otras representan un procesamiento normal en el ADN y pueden tener funciones biológicas importantes. Entre estas alteraciones de bases con importancia biológica tenemos a las alquilaciones, principalmente metilaciones ( Hanawalt et al., 1979).

2 Enlaces cruzados entre las bandas.

Cuando el ADN se expone a compuestos químicos como mitomicina C, ácido nitroso y varios derivados del platino, las bandas complementarias se enlazan de manera cruzada covalentemente (Hanawalt et al., 1979; Bernstein, 1981). En el ADN del fago lambda este tipo de daños puede repararse por excisión (Radman, 1978).

En general los mutágenos mencionados en el inciso c y en el punto 2, producen alteraciones grandes en el ADN y pueden interferir con su duplicación, tales mutágenos actúan indirectamente, ya que dichas lesiones inducen un mecanismo de reparación mutagénico (Radman et al., 1979).

### 3 rompimientos de bandas.

El daño ocasionado por la radiación ionizante, incluye diferentes tipos de rompimientos que afectan a una o a las dos bandas del ADN (Hanawalt et al, 1979). Se conoce menos de estas lesiones que acerca de los dímeros de pirimidina producidos por radiación UV. Una razón es la tendencia de estos agentes, especialmente las radiaciones ionizantes, a producir muchos tipos de lesiones en el ADN, además del rompimiento de las bandas (Hutchinson, 1978).

### C Mecanismos de reparación.

El ADN no sólo interviene en procesos tales como la duplicación, transcripción y recombinación, también participa en los mecanismos capaces de reparar las lesiones que producen los diversos agentes físicos y/o químicos presentes en el medio ambiente. Dichos mecanismos se encargan de mantener la estructura del ADN lo más exacto posible para que éste efectúe sus funciones normalmente. Hasta el momento se han identificado cuatro mecanismos implicados en la reparación de los dímeros de pirimidina : fotorreactivación, excisión, recombinación y SOS.

#### 1 Fotorreactivación.

La fotorreactivación enzimática se caracteriza por sus constituyentes y por su acción. El papel principal es llevado a cabo por la enzima fotorreactivante PRE (Muhammed, 1966 ; Sutherland et al, 1973), cuya manera de actuar es única. La enzima PRE se une a regiones de ADN con dímeros de pirimidina (Setlow y Carrier, 1966), el complejo formado absorbe la luz fotorreactivante, rompe los dímeros y produce dos monómeros de pirimidina (Setlow y Boling, 1965). El resultado final es la reparación del ADN y la consiguiente restauración de su integridad biológica. Esta enzima posee tres niveles de especificidad : 1o. longitud y tipo de ácido nucléico, 2o. dímeros de pirimidina ciclobutil cis-syn y 3o. fotones fotorreactivantes de longitud de onda de 300 nm a 600 nm. En cuanto a la estructura de dicha enzima, es posible que haya heterogeneidad entre

los diferentes organismos que la poseen (Sutherland, 1978).

En la determinación de los daños producidos por radiación UV en sistemas de procariontes o eucariontes, es de gran utilidad práctica el hecho de que las enzimas fotorreactivantes sean específicas para reparar los dímeros de pirimidina, producidos por este tipo de radiación (Helene, 1978).

## 2 Excisión.

En la obscuridad operan mecanismos diferentes a la fotorreactivación, uno de ellos y tal vez el más importante es la reparación por excisión (Setlow y Carrier, 1964; Boyce y Howard-Flanders, 1964).

El primer paso en este tipo de reparación es el reconocimiento de la distorsión de la doble helice de ADN por la endonucleasa uvrAB. Las proteínas uvrA (Sancar et al., 1981c; Seeborg y Steinum, 1982) y uvrB (Sancar et al., 1981a), se unen al sitio dañado y posteriormente, tal vez con la ayuda de la proteína uvrC (Sancar et al., 1981b; Yoakum y Grossman, 1981), hacen una incisión en el enlace fosfodiester, en un sitio cercano al extremo 5' del dímero. En presencia de uvrC (Howard-Flanders y Theriot, 1966; Howard-Flanders, 1981), la ADN polimerasa I (Cooper y Hanawalt, 1972b; Shimizu et al., 1981) elimina un segmento de 20 a 30 nucleótidos mediante una acción exonucleasa, comenzando en el extremo 5' en el cual está contenido el dímero de timina. Después, la ADN polimerasa I con su actividad de polimerasa y mediante un mecanismo progresivo (Matson y Bambara, 1981) vá resintetizando, a partir del extremo 3', los nucleótidos que van siendo eliminados. Para efectuar la tarea anterior la polimerasa utiliza la banda opuesta como molde, con lo cual, en principio, hay un reemplazamiento exacto de los nucleótidos perdidos. Por último la ADN-ligasa une el extremo libre del fragmento recién sintetizado con el resto de la cadena.

Este mecanismo de reparación incrementa su eficiencia cuando se bloquea temporalmente la duplicación del ADN (Radman y Errera, 1970). Se han observado diferencias en el tamaño del

parche reparado por excisión (Cooper y Hanawalt, 1972a), la mayoría de las lesiones son reparadas por parches cortos, según el mecanismo ya descrito, mientras que otros daños son reparados por parches mucho más largos mediante un proceso que requiere del genotipo  $recA^+$  (Cooper y Hanawalt, 1972b).

Aunque la reparación por excisión parecía totalmente constitutiva (Seeberg, 1978), recientemente se ha demostrado que la ruta denominada de parche largo, es un proceso inducido por daño al ADN y regulado por los genes  $recA$  y  $lexA$  (Kenyon y Walker, 1980; Fogliano y Schendel, 1981; Cooper, 1982), de una manera que se explicará posteriormente. En la excisión de parche largo también interviene la ADN polimerasa I aunque tal vez de una forma modificada (Cooper, 1982). Los parches son aproximadamente de 1,500 nucleótidos de longitud en el 75 % de los casos y cerca del 1% de los parches reparados son de alrededor de 9,000 nucleótidos. No se conocen con exactitud los factores que determinan el lugar de inserción de un parche largo, pero los datos obtenidos denotan un papel especializado para esta ruta de excisión.

A partir del descubrimiento de la enzima ADN N-glicosilasa que corta los dímeros de pirimidina en su enlace glicosílico (Haseltine et al., 1980), el esquema de la reparación por excisión de nucleótidos se ha modificado de alguna manera (Lehman, 1980). Dicha enzima se aisló de *Micrococcus luteus* y se demostró que es específica para ADN con dímeros de pirimidina.

La ADN N-glicosilasa no corta el enlace fosfodiéster, en lugar de ello, primero rompe el enlace N-glicosílico entre el extremo 5' de la pirimidina del dímero y el azúcar correspondiente, después corta el enlace fosfodiéster entre el sitio apirimidínico (AP) resultante y el extremo 3' de la pirimidina del dímero (Haseltine et al., 1980).

Aún no está bien establecido si la función glicosilasa tiene también una actividad AP endonucleasa o si las dos actividades pueden separarse. Actualmente se están realizando estudios en células humanas y de *Escherichia coli*, para tratar de

dilucidar las diferencias entre excisión de bases y excisión de nucleótidos (Lehman, 1980).

### 3 Reparación por recombinación.

Los dímeros de pirimidina que no son eliminados ni por fotoreactivación ni por excisión, retardan la duplicación del ADN por varios segundos, antes que la síntesis normal pueda continuar en un punto posterior al dímero (Rupp y Howard-Flanders, 1968). Lo anterior dá por resultado un hueco en la banda hija o hueco postduplicativo (Howard-Flanders *et al*, 1968 ; Rupp *et al*, 1971). de alrededor de 1,000 nucleótidos de largo (Iyer y Rupp, 1971).

A pesar de estas lesiones secundarias causadas por UV, se observa supervivencia celular. Como el sistema de reparación por excisión requiere una cadena complementaria intacta, dicho mecanismo no puede explicar tal supervivencia puesto que una banda tiene un dímero y la otra un hueco, la reparación por tanto debe realizarse por un proceso diferente. Este nuevo mecanismo fué denominado reparación postduplicativa (Rupp y Howard-Flanders, 1968) o reparación por recombinación y su reconocimiento se inició con el aislamiento de cepas de *E. coli* deficientes en la recombinación (Clark y Margulies, 1965), atribuyéndose esto a una mutación en el gene bautizado como *recA*. Se encontró además que estas células mutantes eran mucho más sensibles a los efectos letales de la luz UV que sus cepas parentales, infiriéndose que la mutación afectaba la capacidad de las células irradiadas para reparar el fotodaño al ADN. Este hecho apoyaba una sugerencia anterior (Howard-Flanders y Boyce, 1964) acerca de que ciertas enzimas podrían estar implicadas, tanto en la recombinación genética como en la reparación de los daños después de irradiación.

Para confirmar lo anterior se realizaron una serie de experimentos, en uno de ellos se comparó la sensibilidad a radiación UV de cepas *uvrA*<sup>-</sup> (deficientes en excisión) o *recA*<sup>-</sup> con la sensibilidad mostrada por los dobles mutantes (*uvrA*<sup>-</sup> *recA*<sup>-</sup>), encontrándose que estos últimos eran muchas veces más sensibles

a la luz UV, que las cepas portadoras de una sola de estas mutaciones (Howard-Flanders y Boyce, 1966). El criterio usado generalmente para inferir las múltiples rutas de reparación del ADN, es el de que si un doble mutante, cuyas mutaciones no están relacionadas, presenta un aumento en la sensibilidad a radiación UV mayor que el mostrado por cada mutante por separado, entonces se consideran estas mutaciones como deficientes en dos rutas de reparación diferentes (Bernstein, 1981); por lo tanto, era claro que en  $uvrA^- recA^-$  estaban implicados dos sistemas distintos de reparación.

El siguiente paso fué el de tratar de determinar el modo de acción del sistema de reparación postduplicativo. Mediante experimentos en gradientes de sedimentación en CsCl e incorporación de radioisótopos en cepas  $uvr^- recA^+$ , se encontró que las bandas hijas de ADN sintetizadas después de irradiación UV son de bajo peso molecular, lo cual llevó a pensar que este ADN poseía regiones de una banda o huecos postduplicativos (Howard-Flanders *et al*, 1968; Howard-Flanders *et al*, 1975; Lin y Howard-Flanders, 1976). Tomando en cuenta que el número de dichos huecos o interrupciones en la banda hija, es similar al de dímeros de pirimidina en una longitud equivalente del ADN parental (Rupp y Howard-Flanders, 1968), se pensó que estos huecos se encuentran enfrente de cada dímero de pirimidina.

Por otro lado, si las células irradiadas se incuban, la tasa de sedimentación del ADN aumenta, sugiriendo que los espacios en las bandas hijas son llenados por intercambios con las moléculas hermanas de ADN de doble banda. Es evidente que la información que falta en el hueco postduplicativo de uno de los ADN dobles, está intacta en el ADN doble hermano.

Posteriormente se demostró (Rupp *et al*, 1971) la existencia de intercambios entre los ADN hermanos de doble banda, ocupando uno de éstos por aproximadamente el mismo número de huecos.

La reparación postduplicativa complementa a la reparación

por excisión (Rupp y Howard-Flanders, 1968; Radman et al., 1970) por que si el aparato duplicativo pasa un dímero no escindido, entonces la información perdida en la banda hija, que constituye un hueco, es luego reemplazada mediante la recombinación genética. A su vez la reparación por excisión ya puede eliminar el dímero que queda en la banda parental (Howard-Flanders, 1981)

Recientemente ya se puede hablar de un modelo coherente de recombinación genética (Dressler y Potter, 1982). En los últimos tres años se han podido fusionar datos provenientes de experimentos de genética clásica en hongos del análisis de las estructuras intermediarias del ADN en la recombinación, recuperadas de cepas tipo silvestre y del estudio de enzimas producidas por genes implicados en la recombinación genética en *E. coli*, especialmente la proteína recA.

El modelo de Holliday (1964) para la recombinación genética generalizada, ha servido de idea unificadora en este campo, sobre todo por la estructura intermediaria propuesta. Según dicha estructura los dos cromosomas recombinantes son mantenidos juntos covalentemente en una región de homología, mediante una conexión de entrecruzamiento, formada por el intercambio recíproco de dos de las cuatro bandas de las moléculas de ADN participantes. A pesar de que el modelo ha tenido que sufrir ciertos cambios adecuados, continúa manteniéndose como el intermediario teórico preferido.

La evidencia física que comprobó el modelo de Holliday no provino de estudios en eucariontes, sobre los cuales tuvo sus bases genéticas, sino de sistemas en procariontes; básicamente en experimentos bajo la influencia del sistema de recombinación de *E. coli* y usando virus tales como S13,  $\phi$ X174 y además de plásmidos como colE1. Teniendo en cuenta la estructura intermediaria de Holliday en la recombinación, así como el hecho de que el ADN de estos organismos es circular, se esperaba que la molécula recombinante tuviera figura de 8 y efectivamente, estas son las que se han observado al microscopio electrónico en diferentes virus (Potter y Dressler, 1976; Benbow et al., 1975). Se

usaron enzimas de restricción, con el objeto de descartar las alternativas de que estas estructuras con forma de 8 resultaran de círculos monoméricos entrelazados o de un círculo de doble longitud que se traslape sobre si mismo por la mitad (Potter y Dressler, 1976). Tales enzimas cortan los anillos monoméricos una vez y en un sitio único, generando moléculas lineales del tamaño de un genoma completo, de la cual se obtienen estructuras con la forma de la letra X (ji), esto indica que los círculos estaban conectados covalentemente en una región de homología.

Por otro lado las moléculas en forma de ji sólo se recuperan en células hospederas tipo silvestre o recBC, pero no en recA<sup>-</sup> que son deficientes en recombinación, lo que confirma que dichas estructuras están implicadas en la recombinación genética (Kolodner, 1980; Potter y Dressler, 1976).

Al contrario de la evidencia física que apoya la existencia del intermediario en el modelo de Holliday, no existe ninguna prueba que indique cuales son los eventos precisos que ocurren en el corte e intercambio de bandas. Hay varios modelos alternativos al propuesto por Holliday (Meselson y Radding, 1975; Champoux, 1977) para explicar el mecanismo de iniciación, estos tratan de adaptar los nuevos datos genéticos obtenidos en trabajos con hongos.

Pasando a otro nivel, los estudios enzimológicos han contribuido a una comprensión más específica de las enzimas implicadas, y su secuencia, en el proceso de intercambio de información genética. El método que ha dado mayores resultados es el de purificar el producto de los genes implicados o relacionados con la recombinación y estudiar sus propiedades. El objetivo es encontrar una reacción parcial que puede ser efectuada por una proteína aislada, después se intenta relacionar esta actividad con el proceso completo de la recombinación (Dressler y Potter, 1982). De esta manera se ha encontrado que las proteínas recA, recB, SSB (unión a una banda simple) y la ADN topoisomerasa I son muy importantes en la recombinación genética generalizada.

Posteriormente se describirá de manera amplia el papel de la proteína recA.

#### 4 Reparación SOS

El gene *recA* de *Escherichia coli*, además de intervenir en la reparación por recombinación, está implicado en otras rutas de reparación, también postduplicativas (Witkin, 1976; Ganesan y Seawell, 1975; Sedgwick, 1975; Sedgwick y Bridges, 1974; Youngs y Smith, 1976). Se desprende de lo anterior que el fenotipo de los mutantes *recA* es altamente pleiotrópico y carece por lo tanto de varias funciones presentes en el tipo silvestre (Witkin, 1976), de las cuales una muy notable es su no mutabilidad por radiación UV.

Los mutantes *recA<sup>-</sup>lexA<sup>-</sup>* reparan eficientemente su ADN por medio de la excisión y la fotorreactivación pero por su puesto, no pueden realizar las rutas de reparación que necesitan los productos de estos genes, las cuales son propensas a error y responsables de la mutabilidad por radiación UV (Bridges, 1969).

Con base en lo anterior se postuló la existencia de dos rutas diferentes de reparación postduplicativa, una recombinogénica, libre de errores e independiente de *lexA* y otra propensa a error y dependiente de *lexA* (Bridges *et al*, 1967).

Una primera hipótesis para explicar este hecho, proponía que la reparación por recombinación es exacta y que el mecanismo dependiente de *lexA* se debía a la actividad de una ADN polimerasa propensa a error, capaz de insertar nucleótidos en los huecos postduplicativos sin instrucciones del molde y con una alta probabilidad de error. Otra hipótesis proponía que la mutagénesis por radiación UV podía deberse a errores en una ruta de reparación de recombinación, dependiente de *lexA*, sin embargo, cada vez se dan más pruebas que excluyen esta posibilidad (Bridges y Mottershead, 1971).

Por otro lado se ha demostrado que esta actividad reparadora del ADN propensa a error, es inducida en *E. coli* como respuesta a la radiación UV u otros tratamientos mutagénicos. Pa-

ra llegar a esta conclusión se utilizó mucho la hipótesis de la reparación SOS, la cual es un fundamento teórico unificador de varias investigaciones biológicas y bioquímicas.

Una de las primeras observaciones que contribuyeron a la hipótesis SOS fué la demostración por Lwoff y colaboradores (Lwoff et al, 1950), de que la radiación UV provoca la inducción de las bacterias lisogénicas, células que alojan en su ADN el cromosoma de un fago. Otros agentes inhibidores de la duplicación del ADN, como la radiación UV, también provocan inducción del profago  $\lambda$  (Witkin, 1976).

Otra observación importante fué el hallazgo de Weigle (1953) de que la exposición de una población de células de *E. coli* a una dosis baja de radiación UV, antes de infectarla; produce un aumento en la supervivencia del fago  $\lambda$ , dañado a su vez con radiación UV. Además esta exposición previa se requiere para promover un alto nivel en la mutagénesis del fago. A este fenómeno se le ha denominado reactivación por radiación UV o reactivación W (Witkin, 1976).

En estudios posteriores (Radman y Devoret, 1971; Defais et al, 1971; Caillet-Fauquet y Defais, 1972) se encontró que era necesaria la presencia de los genes *recA* y *lexA*, así como la síntesis de proteínas para que se lleven a cabo procesos tales como la reactivación por radiación UV, mutagénesis por radiación UV e inducción del bacteriófago  $\lambda$ . Esto llevó a proponer que existen rutas comunes en estos tres fenómenos y además de que una o más funciones bacterianas son inducidas por la radiación UV.

Finalmente fue desarrollada por Radman (1974) la hipótesis de la SOS, según la cual las células de *E. coli* poseen un sistema de reparación del ADN propenso a error, el cual requiere de varias funciones genéticas, principalmente de los genes *rec* y *lex*, así como de la síntesis de proteínas (Radman, 1974; Radman, 1975). Bajo condiciones fisiológicas normales este sistema reparador se encuentra reprimido, pero puede ser inducido por radiación UV u otros agentes que también dañen al ADN o in

terrumpan su síntesis. Tales tratamientos al ADN generan una señal inductora, la señal SOS, la cual se ha sugerido (Sedgwick, 1976; Witkin, 1976) que es un hueco en la banda hija. Dicho espacio se traslapa parcialmente con otro hueco postduplicativo en la molécula hermana del ADN, la coincidencia entre las lesiones puede quedar hasta con una separación de mil bases (Hutchinson y Stein, 1981). Dichas estructuras no podrían ser reparadas, en principio, por ningún tipo de reparación por recombinación, tampoco serían arregladas por las ADN polimerasas conocidas, debido a que los dímeros de pirimidina, que se encuentran frente al hueco, no le servirían de molde. Sin embargo la señal inductora permanece sin identificarse (Kenyon et al, 1982).

Una vez dada la señal se inicia un proceso complejo de inducción que culmina en la desrepresión de un grupo de funciones metabólicamente diversas pero coordinadamente reguladas denominadas funciones SOS, las cuales promueven una mayor supervivencia de la célula dañada de sus fagos que la observada en condiciones normales. Entre las funciones SOS, además de la reparación del ADN propensa a error, están la inducción del profago  $\lambda$ , el retardo en la división celular representado por el crecimiento filamentosos y la inhibición de la actividad degradadora del ADN de la exonucleasa V (Witkin, 1976). Varios de estos procesos son utilizados extensamente como sistemas para la detección de mutágenos y carcinógenos potenciales.

El mecanismo de la mutagénesis por radiación UV en *E. coli*, dentro de la reparación SOS, es básicamente desconocido. Inicialmente se pensó (Devoret et al, 1975) que la reactivación W mutagénica del bacteriófago lambda, dependía de una actividad reparadora propensa a error, la cual era inducida o activada en la célula huésped por la radiación UV y por otros tratamientos inductores de SOS. El requerimiento de la síntesis de proteínas después del tratamiento inductor (Defais et al, 1976), sugiere una inducción más que una activación, del mecanismo reparador propenso a error.

A partir de experimentos con el fago  $\Phi$ X174 (cuyo ADN es de una sola banda) se propuso un posible mecanismo en la mutagénesis por UV. Cuando el fago  $\Phi$ X174 irradiado infecta células de *E. coli* sin el tratamiento inductor, el ADN del fago no se duplica, lo cual se observa por la cantidad de síntesis. Una interpretación puede ser que en el primer dímero encontrado se detuvo la duplicación (Benbow et al, 1974) y en este caso ninguna de las ADN polimerasas constitutivas podría copiar el ADN después de un dímero de pirimidina. Sin embargo, si el huésped es expuesto a radiación UV antes de la infección, es decir, bajo condiciones inductoras óptimas de SOS, la duplicación de ADN prosigue más allá de la presencia del primer dímero.

La razón de que los dímeros bloqueen la síntesis efectuada por la ADN polimerasa I en células hospederas no irradiadas, parece que es debida a la actividad 3' - 5' exonucleasa "correctora de errores" de esta enzima. Esta actividad evita que se polimericen nucleótidos incorrectos frente a los dímeros de pirimidina en el ADN dañado del fago. En el segundo caso, cuando la célula hospedera está irradiada, los resultados sugieren la existencia de un inhibidor inducible de la actividad correctora de errores en una o más de estas ADN polimerasas. Dicho inhibidor toleraría la inserción de nucleótidos equivocados, permitiendo así que continuara la duplicación, pero con una alta frecuencia de mutación.

Recientemente se ha encontrado en células inducidas, una variante de la ADN polimerasa I con mayor peso molecular, la cual posee baja fidelidad de duplicación (Howard-Flanders, 1981). Este hallazgo podría explicar parte de la frecuencia de mutaciones inducidas. Por otro lado, es necesaria la presencia del gene inducible *umuC* de *E. coli*, para observar un incremento en la mutación después de inducir daño al ADN por radiación UV (Bagg et al, 1981; Walker y Dobson, 1979), sin embargo la función precisa de este gene todavía se desconoce.

Actualmente, gracias al cúmulo de datos obtenidos en este campo, se han llegado a comprender algunos aspectos de la reparación SOS, particularmente su mecanismo de control.

#### D Regulación de los mecanismos de reparación.

Inicialmente sólo había fenomenología y especulación acerca de las respuestas inducibles por daños al ADN (Bridges y Lehman, 1982; Witkin, 1976), ahora se comprenden algunos aspectos con gran detalle, en especial el control coordinado de dichas respuestas por los genes *recA* y *LexA*. Para aclarar este problema fué muy importante el estudio de la inducción del profago  $\lambda$  por radiación UV.

Se sabe que ciertas cepas de *E. coli*, llamadas lisógenas, albergan en su genoma el ADN del bacteriófago  $\lambda$ , denominado en este caso profago. Si una población de tales bacterias se expone a luz UV o en general a agentes que dañan al ADN, los genes del virus anteriormente inactivos son encendidos repentinamente, lo que provoca que la maquinaria de la célula traduzca los genes del fago y se formen múltiples copias del mismo. Después de un lapso de aproximadamente 45 minutos, la célula hinchada de fagos, estalla. Por otro lado, si la bacteria no es irradiada esta crece normalmente de generación en generación y sólo espontáneamente dá origen a partículas de fagos (Lwoff et al, 1950; Ptashne et al, 1982; Maniatis y Ptashne, 1976).

El profago  $\lambda$  permanece inactivo por la acción de una proteína reguladora llamada represor, la cual proviene de la expresión de ciertos genes virales. Además de la luz UV, también la mitomicina C o la inhibición de la síntesis de ADN por otros medios, inactivan la molécula represora. En las bacterias lisógenas se ha encontrado (Roberts y Roberts, 1975) que la inducción del profago lambda se produce a causa del rompimiento proteolítico del represor. El represor es inactivado por un corte que lo divide en dos fragmentos, estos son detectables mediante la incubación in vitro, con la proteína *recA* purificada, en una reacción que requiere ATP (Roberts et al, 1978). En mutantes *recA*<sup>-</sup> no se observó inducción del profago ni degradación de su represor.

La identificación y caracterización del producto del gene *recA* (Gudas y Mount, 1977; Sancar et al, 1981a), han permi-

tido un avance mayor en el estudio de los fenómenos relacionados con esta proteína.

Los estudios en *lexA* continuaron independientemente. Estos mutantes, al igual que *recA*, son sensibles a radiación UV pero no son deficientes en la recombinación genética (Howard-Flanders y Theriot, 1966). En 1972 se halló que en cepas mero diploides es decir parcialmente diploides,  $lex^+/lex^-$  el carácter  $lex^-$  es dominante (Mount et al, 1972), ya que se conserva el fenotipo de las células haploides  $lex^-$  en cuanto a sensibilidad a la radiación. Puesto que la dominancia en un gene mutante a menudo denota que dicho gene está implicado en la regulación genética, era posible que *lexA* codificara para una proteína represora, la cual regularía algunas enzimas de la reparación del ADN (Howard-Flanders, 1981).

Posteriormente Mount (1977) aisló el mutante STS de *E. coli*, el cual expresa constitutivamente la inducción del profago y la ruta de la reparación del ADN propensa a error. Este mutante denominado DM 1187 (*lexA spr tif sfi*) probó que los dos fenómenos mencionados se llevan a cabo por un mecanismo similar, con lo cual se evidenció que la respuesta SOS no sólo dependía de *recA* sino también de *lexA*, sugiriéndose nuevamente que *lexA* era una proteína represora.

Con la identificación de la proteína *lexA* (Little y Harper, 1979), se determinó que su peso molecular es de 24 kilodaltons y que es autorregulable. Posteriormente se demostró su posible función represora.

Los modelos recientes de la desrepresión de *recA* después del daño al ADN, sugerían que un paso inicial en este proceso era el rompimiento proteolítico de la proteína *lexA*, conduciendo esto a una mayor síntesis de *recA*. En un trabajo con varias evidencias (Little et al, 1980) se demostró que la proteína de *lexA* es funcional y también físicamente destruida por la actividad proteasa de *recA*. Se insinuó además que la proteína *lexA* es un mejor sustrato para la proteína *recA* que el represor de  $\lambda$ .

Se ha supuesto (Little et al, 1980; Sedgwick y Yarranton, 1982) que los fagos  $\lambda$  han evolucionado de tal forma que pueden tomar ventaja de la respuesta SOS, abandonando una célula hospedera cuya viabilidad es incierta. Este fenómeno además ha dado indicios de como ocurre una regulación más fina de la respuesta SOS, ya que la proteína recA rompe a la de lexA, al menos 10 veces más eficientemente de lo que lo hace el represor de  $\lambda$ . Esto puede favorecer además la sobrevivencia de  $\lambda$ , asegurando que la inducción lisogénica no ocurrirá, hasta que los niveles de daño al ADN excedan la capacidad de los sistemas de reparación inducibles.

Prosiguiendo en la misma línea de investigación se demostró (Little et al, 1981; Brent y Ptashne, 1981) que la proteína lexA es un represor de los genes recA y de lexA mismo. La proteína lexA purificada se enlazó específicamente a las regiones reguladoras de ambos genes, inhibiendo su transcripción. Los sitios de unión para la proteína lexA fueron de alrededor de 20 pares de bases (pb) en el operador del gene recA y de 40 pb en lexA. Este último segmento se compone de dos series de 20 pb, semejantes cada una de ellas a la secuencia de bases presentadas por el operador del gene recA. Dichos conjuntos de 20 pb, denominadas "cajas SOS", poseen secuencias de nucleótidos repetidas inversamente o palindrómicas. La proteína lexA se enlaza a la "caja SOS" de recA alrededor de diez veces más fuertemente de lo que lo hace en las "cajas" que preceden al gene lexA (Brent y Ptashne, 1981). Esta observación también nos indica una regulación fina de la respuesta SOS. Los diversos operones SOS con variaciones en la secuencia de cajas SOS, se pueden desreprimir conforme se vayan inactivando diferentes cantidades de la proteína lexA (Sedgwick y Yarranton, 1982).

La determinación de algunos de los genes en *E. coli* cuya expresión es inducible por daño al ADN, se logró (Kenyon y Walker, 1980) usando un fago transductor especializado. Ciertos genes encontrados por Kenyon denominados din (damage indu

cible) mapearon en posiciones interesantes, tales como *dinE* que mapeó en la posición de los mutantes *uvrA*, enzima implicada en la reparación por excisión y considerada como de expresión constitutiva. Otro gene, el *dinF* mapeó cerca de *leu* por lo que probablemente es el gene codificador de la polimerasa II. Los otros genes encontrados fueron denominados *dinB* y *dinD*. Con tratamiento inductor de la respuesta SOS también se estimula la expresión de otros genes tales como *umuC*, el cual es necesario para la mutagénesis química y por UV (Bagg *et al.*, 1981), así como de los genes *uvrB* (Fogliano y Schendel, 1981), *himA* (Miller *et al.*, 1981) y *sfiA* (Huisman y D'ari, 1981).

Con los datos anteriormente mencionados se han desarrollado modelos para la regulación de la respuesta SOS (Howard-Flanders, 1981; Kenyon *et al.*, 1982), la cual de manera general es como sigue : en una célula no inducida, los genes que intervienen en el mecanismo de la SOS están casi totalmente reprimidos por el represor *lexA*, no obstante se pueden sintetizar pequeñas cantidades de proteínas como *recA*, *uvr*, y aún el mismo represor *lexA*. Cuando se daña el ADN de una célula -estado inducido- los dímeros de pirimidina no reparados antes de la duplicación, originan huecos postduplicativos. Actualmente parece muy probable (Bridges y Lehman, 1982) que son dichos espacios postduplicativos la señal que activa a la proteína *recA*, la cual ya se sabe que es la proteasa específica que rompe, tanto al represor de  $\lambda$  como a la proteína *lexA*. Una vez degradado *lexA*, se dispara la respuesta SOS por la desrepresión de *recA* y los demás genes involucrados en este sistema de regulación. Después del desencadenamiento de la respuesta SOS, se estimula una reparación más eficiente del ADN, debido a la mayor cantidad de enzimas que intervienen en la reparación por excisión y a la actuación de la reparación postduplicativa (SOS y recombinación). También se observa un aumento en la frecuencia de mutación, hecho en el que es absolutamente necesario el gene *umuC*.

El mecanismo para la mutagénesis por UV en *E. coli* es básicamente desconocido hasta el momento (Bridges y Lehman, 1982), pero hay observaciones que indican que en células inducidas se puede aislar una variante de la ADN polimerasa I, de alto peso molecular y con baja fidelidad en la replicación, lo cual sería una posible guía en la aclaración de este complicado proceso.

Aún faltan por determinar algunos detalles acerca del ajuste fino dentro de este sistema regulador, por ejemplo, algunos tratamientos inductores de SOS (Kenyon et al., 1982). Una posible explicación a esto son las diferentes afinidades de atracción de los sitios operadores, implicados en SOS, por la proteína *lexA*. La posición relativa del promotor SOS y las secuencias del operador varían, por lo que las constantes relativas de unión de los promotores en los diferentes genes se deben determinar, para poder hacer un análisis cinético completo de la expresión de los genes regulados por *recA* y *lexA*.

#### E El gene *recA* de *Escherichia coli*.

Como se mencionó anteriormente, el primer papel fisiológico asignado a la proteína *recA* (*PrecA*), fué el de proteasa y sus efectos pleiotrópicos se explicaron tomando en cuenta la función reguladora de esta proteína. Utilizando mutantes *recA* sensibles a la temperatura se demostró que la *PrecA*, además de su papel regulador como proteasa, también participa directamente en la recombinación genética (Kobayashi e Ikeda, 1978).

No obstante, hasta el momento no se comprende porque una proteína debe catalizar reacciones aparentemente tan diferentes, como son la proteólisis y el arreglo de bandas del ADN. Tampoco se entiende el significado fisiológico o evolutivo que esto implica.

En la comprensión de estos procesos uno de los problemas a resolver fué el del inicio de la recombinación genética, para lo cual se dió un paso importante al poder clonar el gene

recA (Sancar et al, 1979), así como la purificación de su producto proteico (Shibata et al, 1979b). Esto permitió un estudio más directo acerca del funcionamiento de esta proteína.

En los primeros estudios sobre el inicio de la recombinación (Holloman et al, 1975), se concluyó que en presencia de PrecA (Holloman y Radding, 1976) el ADN de una banda se adhiere a ADN superenrollado formando la estructura llamada asa en D (D-loop).

En trabajos posteriores (Shibata et al, 1979b) se descubrió que la PrecA purificada cataliza el apareamiento homólogo entre fragmentos de ADN de una banda y ADN doble superenrollado, mediante una reacción que requiere de ATP. Finalmente se reportó (McEntee et al, 1979) que la PrecA produce asas en D con igual eficiencia si el ADN es lineal o superenrollado.

Con estos experimentos quedó demostrado que efectivamente la PrecA interviene en la formación de las asas en D. En dichas estructuras existe un área de triple banda en donde la cadena lineal sencilla ha invadido parcialmente al ADN doble recipiente, enlazándose por medio de puentes de hidrógeno a su banda complementaria y dejando en un estado desapareado, a la banda no complementaria del ADN doble.

La recombinación consiste generalmente en la interacción de dos moléculas de ADN dobles, sin embargo el modelo de formación de la asa en D es útil para la exploración bioquímica de la asimilación de la banda en un sistema simplificado (Dressler y Potter, 1982). Este mecanismo, aunque parece simple, es una reacción compleja que consiste en : la unión de la PrecA al ADN, desenrollamiento de la molécula de ADN recipiente por PrecA y la búsqueda de homología entre las moléculas de ADN participantes.

#### 1 Unión de la proteína recA al ADN.

En el apareamiento homólogo promovido por la PrecA entre ADN de una banda y el ADN doble para formar la asa en D, la cantidad de PrecA requerida fué directamente proporcional

al monto de ADN de una banda (Shibata et al, 1979b; Shibata, et al 1981a; McEntee et al, 1980). La reacción es estequiométrica, se necesita alrededor de un monómero de PrecA por cada cinco pares de bases de ADN de una banda (Shibata et al, - 1979b; Cassuto et al, 1980).

La unión de la PrecA con el ADN doble es dependiente del pH y requiere de ATP y un catión divalente. Por otro lado, el enlace de esta proteína con ADN de una banda se lleva a cabo en ausencia de ATP y es al menos 100 veces más rápida que la unión con el ADN doble (McEntee et al, 1980).

Fisiológicamente la mayor afinidad de PrecA por ADN de una banda puede reflejar la necesidad de evitar que el vasto exceso de ADN doble intacto, aleje a la PrecA de los sitios donde esta es necesaria.

En el estudio sobre la interacción recA-ADN, utilizando ATP- $\gamma$ -S un análogo de ATP no hidrolizable, se ha determinado que la unión de la PrecA al sustrato se efectúa sin gasto de energía, pero después la proteína debe hidrolizar ATP para recuperar su conformación inicial (McEntee et al, 1979; Shibata et al, 1979a).

2 Desenrollamiento de la molécula de ADN recipiente mediante la proteína recA.

En vista de que el ADN doble recipiente debe desnaturarse parcialmente para aceptar la banda sencilla que lo invade, es importante saber si la proteína recA puede efectuar esta reacción de desnaturalización parcial. Lo anterior se ha estudiado experimentalmente (Shibata et al, 1979b; Shibata et al, 1981a; Shibata et al, 1981b; Stasiak et al, 1981) y se observó que aunque la PrecA se une al ADN doble intacto, no hay indicios de que este ADN sea desenrollado. Sin embargo, cuando se adiciona ADN sencillo ya sea homólogo o no a la reacción, se observa el desenrollamiento. Una interpretación de este resultado y de los ya mencionados respecto a la unión de la PrecA con ADN de una banda, es la de que la PrecA tiene dos funciones : unirse al ADN de una banda y pos

teriormente desnaturalizar parcialmente la molécula de ADN doble (Dressler y Potter, 1982).

### 3 Búsqueda de homología.

Para que ocurra la asimilación de la banda sencilla, esta debe encontrar su complemento en el ADN doble. Se podría considerar que el primer complejo estable que se forma entre PrecA, ADN de una banda y ADN doble, sería una estructura unida por puentes de hidrógeno tal como la asa en D. No obstante, en experimentos efectuados en presencia de ATP- $\gamma$ -S en lugar de ATP, se observa que los complejos formados se disocian en presencia de detergente desnaturalizador de proteínas, lo que demuestra que los ADN de una y doble banda no están apareados por sus bases entre sí (Shibata et al., 1979b). El complejo que contiene el ADN de una banda y ADN doble parcialmente desenrollado, sólo se mantiene por la unión de estos con la PrecA y representa una estructura intermedia anterior al apareamiento homólogo. Cuando el ATP está presente en la reacción, la proteína recA forma asas en D estables y la asociación recA-ADN es debilitada fuertemente cuando el ATP es hidrolizado.

Todos los experimentos anteriores sugieren que la interacción inicial entre la banda sencilla y el ADN doble ocurre al azar en una región no homóloga, formando un complejo de tres bandas no específico. La búsqueda de homología se lleva a cabo tan pronto como la PrecA forma y disocia tales complejos repetidamente e hidroliza ATP o tal vez conforme la PrecA translada las dos moléculas de ADN, una con respecto a la otra, hasta que ocurre el apareamiento homólogo (Shibata et al., 1979a; Dressler y Potter, 1982).

La reacción de asimilación de una banda en la forma de asa en D es sólo el primer y más simple tipo de recombinación que puede ser catalizado por la recA. Como se verá más adelante, con el uso de sustratos más complejos se obtuvo un mejor conocimiento de las reacciones de fusión de genomas

que la proteína *recA* puede llevar a cabo. Uno de dichos sustratos experimentales son un círculo de una banda y un ADN doble lineal, los cuales son un círculo de una banda y un ADN doble lineal, los cuales en presencia de *recA* formaron inicialmente una estructura de asa en D, que con la posterior migración de la banda produjeron un círculo de ADN doble y una banda de ADN lineal (Cox y Lehman, 1981a). La *PrecA* también promueve el apareamiento homólogo y el intercambio de bandas entre ADN doble circular intacto, sin huecos y ADN circular de una banda hidrolizado con un fragmento corto (West et al, 1981b; West et al, 1981c).

Utilizando los sustratos anteriores se ha demostrado que la transferencia de bandas catalizada por la *PrecA* posee direccionalidad (West et al, 1981c; Cox y Lehman, 1981b; Kahn et al, 1981). La reacción sólo ocurre cuando un extremo 3' en el ADN doble es complementario y está disponible para intercambiarse con el ADN circular sencillo, por lo tanto la migración de la banda promovida por la *PrecA* se dá unicamemente en la dirección 3'-5', en relación a la banda negativa del ADN doble lineal.

Hasta el momento se han descrito apareamientos, promovidos por *PrecA*, entre moléculas de ADN perfectamente complementarias. Sin embargo, en la naturaleza, el papel genético de la recombinación implica la interacción de dos genomas ligamente diferentes. Se ha demostrado que unos cuantos apareamientos erróneos entre pares de bases no son suficientes para inhibir la formación de ADN heteroduplex, mediante la acción de la *PrecA*. Sin embargo, concentraciones altas por ejemplo del 10 %, de apareamientos erróneos en una distancia corta, sí inhiben la reacción (DasGupta y Radding, 1982). Una vez efectuado el paso inicial de transferencia de la banda, la asimilación de la cadena continúa siendo dirigida activamente por *PrecA* y requiere de la hidrólisis continua del ATP (Cox y Lehman, 1981a).

Por último, en el estudio de las reacciones que pueden

ser catalizadas por la *PrecA*, se han utilizado ADN dobles como sustratos. Esto es también con el objeto de satisfacer el hecho de que la recombinación ocurre generalmente entre dos moléculas de ADN doble. Se ha encontrado (West et al, 1980) que los huecos de 60 a 700 nucleótidos de longitud en el ADN doble, funcionan como punto focal para la reacción de fusión de los ADN dobles en presencia de *recA*, con la búsqueda posterior de homología mediante la hidrólisis de ATP. Además, la *PrecA* es capaz de efectuar un intercambio recíproco entre bandas de ADN pertenecientes a ADN dobles (West et al, 1981b). Es decir, conforme una de las bandas de ADN doble donador invade a un ADN doble recipiente, la banda desplaza en la molécula receptora al primer ADN doble, o donador, de la misma manera propuesta en el modelo de Holliday (Dressler y Potter, 1982).

No obstante que la proteína *recA* sola puede catalizar una variedad de reacciones en el intercambio de bandas de ADN, aún queda por dilucidar el papel que puedan tener otras proteínas celulares en el proceso completo de la recombinación genética. En *E. coli* parecen estar involucradas tres proteínas en la recombinación genética, aparte de la *recA*, estas son: la proteína que se adhiere a una banda de ADN (McEntee et al, 1979; McEntee et al, 1980; Shibata et al, 1979a). La ADN topoisomerasa y la enzima *recBC* (Dressler y Potter, 1982).

Tomando en cuenta los datos mencionados es posible sugerir una manera por medio de la cual la *PrecA* actúa en la recombinación y en la reparación postduplicativa. La ADN polimerasa que se mueve en dirección 3'-5' a lo largo de la banda molde, es bloqueada en un dímero de pirimidina, reiniciando su síntesis en un punto posterior de la cadena. Por lo tanto la banda hija termina con un extremo 3' - OH en la posición del dímero. El ADN sencillo resultante o hueco postduplicativo activa la función proteasa de la *PrecA*, disparando la respuesta SOS, incrementándose así la síntesis de *PrecA*, la cual está ahora en disposición para aparearse con el ADN. El apareamiento en-

tre la PrecA y el ADN ocurre, en primer lugar, en el hueco del ADN doble y después entre este complejo y el ADN doble intacto.

Una vez establecidos los contactos homólogos, una enzima de corte en trans puede dividir el ADN doble hermano en un sitio opuesto al hueco. El corte capacita a la PrecA para transferir el extremo 3' - OH de la banda cortada hacia el hueco, proveyendo de una banda complementaria intacta a la banda que contiene el dímero. Por lo tanto, la reacción de intercambio de la banda se inicia con una estructura de tres cadenas conforme la PrecA dirige la migración de la banda y la formación del heteroduplex más allá del dímero. El extremo 3' - OH de la cadena con hueco también es transferido, produciendo un intercambio de bandas cruzado. A partir de este punto las cuatro bandas se aparean e intercambian para producir moléculas dobles. Ambas moléculas de ADN dobles pueden ser ahora reparadas por la ADN polimerasa I y por la ligasa, la consumación de la reparación permite la liberación de la PrecA y la terminación de la respuesta SOS. La estructura final conserva el dímero de pirimidina, pero ahora tiene una banda complementaria exacta y este puede ser eliminado por las enzimas de la reparación por excisión.

F El gene red del bacteriófago lambda.

Los bacteriófagos forman un grupo diverso de virus que se multiplican dentro de las células bacterianas. El bacteriófago lambda es una variedad de estos virus que también puede destruir o lisar a su célula hospedera. Como se mencionó anteriormente el fago posee además la facultad de propagarse de una manera que permite la multiplicación conjunta del huésped y de él mismo, por lo que se le llama fago moderado. Esta y otras características (Hershey y Dove, 1971) hacen de lambda un organismo experimental muy útil.

En cuanto a estudios sobre recombinación genética, se hizo evidente que la recombinación en fagos puede analizarse de acuerdo a los principios generales de pruebas de cruza desarrolladas para organismos superiores. La recombinación en fa-

gos, por lo tanto, puede ser un modelo útil para la recombinación en general. Debido a la facilidad de su manipulación, actualmente los sistemas de fagos parecen ser el mejor material para el estudio de la recombinación a nivel molecular (Signer, 1971).

Inicialmente se encontró que la recombinación en el bacteriófago está acompañada por intercambio de ADN, lo cual se efectúa por rompimiento y reunión de los cromosomas participantes. Posteriormente se descubrió que son varios los sistemas de recombinación que operan en lambda: el sistema *int*, el cual está relacionado con la interacción del profago. Se ha demostrado (Echols y Gingery, 1968) que esta recombinación es integrativa, específica en un sitio y promovida por un gene de  $\lambda$  (Campbell, 1971; Campbell, 1976; Kellenberger-Gujer y Weisberg, 1971). El sistema *red*, el cual también está bajo el control del fago y el sistema *rec* dirigido por los genes bacterianos (Signer y Weil, 1968). Los sistemas *red* y *rec*, a diferencia de *int*, no son específicos en un sitio y son responsables de la recombinación generalizada es decir intercambios en cualquier punto a lo largo de los cromosomas homólogos, efectuada en el ADN del fago  $\lambda$ .

La recombinación generalizada efectúa intercambios en cualquier punto a lo largo de cromosomas homólogos, pero estos pueden ocurrir más frecuentemente en algunas regiones de un cromosoma que en otras. La mayor frecuencia de intercambios ha sido atribuida en ciertos casos, a sitios especiales, en y alrededor de los cuales la recombinación se dá a niveles elevados (Sthal, 1979).

En el bacteriófago  $\lambda$  los sitios X (*xi*) son un ejemplo de regiones que incrementan la recombinación a su alrededor y su estudio ha dado información interesante sobre el mecanismo de la recombinación genética a nivel molecular (Rosamond, 1980). Estos lugares estimulan la recombinación catalizada por la ruta *recBC* de *E. coli* y requieren de la presencia de *recA* (Sthal, 1979). Se ha reportado que 23 pares de bases son comu

nes a dos sitios  $J_i$ , los loci  $X^+B$  y  $X^+C$  del fago  $\lambda$  (Schultz et al., 1981), lo cual confirmaría a los sitios  $J_i$  como un lugar de reconocimiento para una proteína de la ruta  $recBC$ . Por el momento falta aún bastante por aprender acerca de los sitios  $J_i$  en la recombinación genética.

El mecanismo por el cual el sistema  $red$  del bacteriófago  $\lambda$  promueve la recombinación es aún desconocido, aunque recientemente se están teniendo algunos avances. Un paso esencial en la recombinación genética es la unión de dos ADN. En *E. coli* la recombinación homóloga es dependiente del producto del gene  $recA$ , el cual también promueve la recombinación generalizada del bacteriófago  $\lambda$ , aunque de una manera menos eficiente (Kellenberger-Gujer y Weisberg, 1971). En ausencia de  $recA$  funcional, la recombinación generalizada  $\lambda$  puede ocurrir vía un sistema de recombinación propio.

Las observaciones de que el fago  $\lambda$  se recombina normalmente en un huésped bacteriano deficiente en la recombinación (Van de Putte et al., 1966), condujeron a la idea de que el fago puede dirigir la síntesis de, al menos, un componente que interviene en dicho mecanismo. El concepto anterior se confirmó con el aislamiento y caracterización de mutantes de  $\lambda$  deficientes en el proceso de la recombinación (Signer y Weil, 1968; Echols y Gingery, 1968), a los que se denominó  $red^-$  (de recombinación deficiente).

A partir del aislamiento y caracterización de los mutantes  $red^-$ , se estableció que el fago  $\lambda$  produce al menos un componente del sistema responsable de la recombinación genética del mismo, sin embargo el mecanismo de recombinación bacteriano es capaz de reemplazar esta función del fago. Los mutantes  $red^-$  mostraron una mayor sensibilidad a la radiación UV que los  $red^+$ , cuando crecieron en un huésped  $uvr^- rec^-$ . Al inactivarse por mutaciones tanto el sistema  $rec$  de la bacteria, como los procesos  $rec$  e  $int$  del fago, la recombinación se redujo más de 100 veces respecto al tipo silvestre. Por lo tanto estos sistemas son los únicos que promueven la recombi

nación vegetativa en el bacteriófago. A pesar de que el sistema red no es esencial para el crecimiento del fago, los mutantes red<sup>-</sup> originan poblaciones más pequeñas que las de los virus silvestres. La recombinación en red<sup>-</sup> disminuye hasta 10 veces, comparado con la obtenida en un fago red<sup>+</sup>, lo que indicaría que la mayoría de la recombinación en lambda es mediada por el gene red.

Todos los mutantes red mapean dentro de un pequeño intervalo entre los loci int y cIII. Esta región contiene a los genes de la exonucleasa de  $\lambda$  y la proteína  $\beta$  (Signer y Weil, 1968). De experimentos de mapeo, bioquímicos y de complementación, se corroboró que el sistema red consta del gene estructural para la exonucleasa de  $\lambda$  y para la proteína  $\beta$  (Shulman et al., 1970; Radding, 1970).

La estructura y función de la exonucleasa de  $\lambda$  no se ha aclarado suficientemente, a pesar de que se ha estudiado en detalle por varios investigadores (Little, 1967; Carter y Radding, 1971; Radding y Carter, 1971).

Se propone que la exonucleasa de lambda principia su actividad en un sitio específico, el cual puede ser un hueco post-duplicativo o cualquier otro espacio que se encuentre en el ADN. Posteriormente va degradando los nucleótidos de una sola de las bandas de la molécula de ADN doble y en ese sitio asimila una banda de ADN redundante o donador, el cual se va incorporando por detrás de la enzima en cuestión. Después de la asimilación completa de la banda redundante, se necesita de un mecanismo que evite la acción posterior de la exonucleasa de  $\lambda$  en el hueco que queda después de efectuarse, tanto la degradación como la asimilación de la banda redundante.

En cuanto a la proteína  $\beta$ , esta se aisló y se caracterizó en 1971 (Carter y Radding, 1971), determinándose posteriormente que dicha proteína es codificada por el gene red  $\beta$  del bacteriófago (Kmiec y Holloman, 1981) y promueve el apareamiento de bandas complementarias y sencillas de ADN, provenientes de cromosomas homólogos. Esta propiedad es muy importante ya que

dicho apareamiento es un proceso capital en la recombinación genética.

Sin embargo, sigue sin explicarse porque el fago  $\lambda$  proporciona a la proteína  $\beta$  para el proceso de recombinación, si la reacción de apareamiento in vitro puede efectuarse por las proteínas del huésped, en particular la proteína recA. Es necesario realizar un análisis del mecanismo por el cual la proteína promueve el apareamiento del ADN, así como conocer su función cuando forma un complejo con la exonucleasa del fago, con el objeto de comprender mejor como se realiza la recombinación generalizada del mismo.

Con base en lo anterior podemos establecer que la recombinación es un proceso mediante el cual hay una reordenación de los genes, o parte de ellos y que agrupa en un mismo individuo la información genética de dos o más organismos. Su amplia distribución en la naturaleza demuestra el gran valor adaptativo que representa para los seres vivos. Sin embargo dicha recombinación posee otra función muy importante también, que es la reparación de los daños que continuamente sufre el ADN. Además de la recombinación, existen otros sistemas de reparación del material genético.

El propósito de esta tesis es estudiar la interacción entre los genes de *E. coli* (recA) y del fago  $\lambda$  (red) que intervienen en el proceso de recombinación del fago, cuando su ADN ha sido dañado por radiación UV o no tiene ningún daño.

## II Materiales

## A Material biológico.

Se utilizaron diferentes cepas silvestres y mutantes de *E. coli* y del fago  $\lambda$ .

- 1) Cepas bacterianas
- Características sobresalientes en la reparación del ADN.
- a) AB 1157 Tipo silvestre. Presencia de todos los sistemas de reparación.
- b) AB 2463 (recA 13) Deficiente en la reparación postreplicativa, parte de ella se realiza por recombinación. Carece también de reparación inducible SOS. Radiosensible.
- 2) El conteo de placas se hace en las siguientes cepas indicadoras de *E. coli*.
- a) C600 Tipo silvestre.
- b) QR48 (recA<sup>-</sup>, su<sup>+</sup>) Mutante permisivo que tiene capacidad para suprimir las mutaciones ambar del fago  $\lambda$
- c) S601 (recA<sup>-</sup>, su<sup>-</sup>) Mutante no permisivo, deficiente en la capacidad de supresión de las mutaciones ambar del fago  $\lambda$ .
- d) N2668 (lights, su<sup>+</sup>) Incapacidad de los fagos red<sup>-</sup> para crecer en esta cepa.
- 3 Bacteriófagos.
- a)  $\lambda$ susN<sub>7</sub>susN<sub>53</sub>c<sup>+</sup>red<sup>+</sup> Cepa con dos mutaciones ambar en el gene N. Forma placas turbias (c<sup>+</sup>).

b)  $\lambda$  susP<sub>80</sub>c<sup>+</sup>red<sup>+</sup>

Cepa con una mutación ambar en el gene P. Forma placas turbias (c<sup>+</sup>).

c)  $\lambda$  susN<sub>7</sub>susN<sub>53</sub>c<sup>+</sup>red<sup>-</sup>

Mutante construido en nuestro laboratorio mediante cru<sup>z</sup>as a partir del fago número uno. Características semejantes al fago uno y deficientes en recombinación. Radiosensible.

d)  $\lambda$  susN<sub>7</sub>susN<sub>53</sub>c<sup>+</sup>red<sup>-</sup>

Se obtuvo en nuestro laboratorio por medio de cru<sup>z</sup>as a partir del fago número 2. Características parecidas al fago 2 pero deficiente en re<sup>combinación</sup>. Radiosensible.

En la tabla No. 1 se dan más características acerca de las cepas bacterianas.

#### B Medios de cultivo.

A continuación se describe la manera de elaborar cada uno de los medios de cultivo empleados, así como su composición.

#### 1) Medios sólidos

a) TA<sub>12</sub>

Bacto - triptona	10.0 g.
NaCl	2.5 g.
Agar bacteriológico	12.0 g.
Agua bidestilada	1,000 ml.
Esterilizar a 120 C durante 20 minutos *	

b) TA<sub>6</sub>

Bacto - triptona (Difco)	10.0 g.
NaCl	2.5 g.
Bacto-agar (Difco)	6.0 g.

TABLA 1 Características de las cepas bacterianas de E. coli K-12 usadas en los experimentos de recombinación y reparación del bacteriófago  $\lambda$ .

Clave de la cepa		AB 1157	AB 2463
origen		Tipo silvestre	Mutación NG de AB 1157
Recombinación		+	-
	treonina	-	-
	leucina	-	-
	prolina	-	-
Caracteres	histidina	-	-
Auxotróficos	metionina	+	+
	tiamina	-	-
	arginina	-	-
	isoleucina	+	+
	timina	+	+
	lactosa	-	-
Utilización de la fuente de energía	galactosa	-	-
	arabinosa	-	-
	xilosa	-	-
	manitol	-	-
	T1	S	S
	T4	S	S
Crecimiento del fago	T6	R	R
	$\lambda$	S	S
Resistencia a drogas	estreptomocina	R	R
	mitomicina C	R	S
Sexo		F <sup>-</sup>	F <sup>-</sup>
Supresor		Pm <sup>+</sup>	Pm <sup>+</sup>

Pm<sup>+</sup> denota huésped permisivo para fagos con mutaciones ambar. Las letras R y S significan resistente y sensible, respectivamente (Howard-Flanders y Theriot, 1966).

- Agua bidestilada 1,000 ml.  
 Esterilizar a 120°C durante 20 minutos\*  
 El TA<sub>6</sub> se utiliza suplementado con MgSO<sub>4</sub> 10<sup>-2</sup>M, Maltosa 0.03% y TLB 10<sup>-2</sup>M.
- c) 869 (Luria)
- |                          |           |
|--------------------------|-----------|
| Bacto - triptona (Difco) | 10.0 g.   |
| Extracto de levadura     | 5.0 g.    |
| NaCl                     | 10.0 g.   |
| Agar bacteriológico      | 12.0 g.   |
| Agua bidestilada         | 1,000 ml. |
- Esterilizar a 120°C durante 20 minutos\*
- d) Gelosa profunda
- |                  |         |
|------------------|---------|
| Caldo nutritivo  | 4.0 g.  |
| Agar             | 3.8 g.  |
| Agua bidestilada | 500 ml. |
- Esterilizar a 120°C durante 20 minutos\*
- 2) Medios líquidos y soluciones
- a) TB<sub>1</sub>
- |                              |           |
|------------------------------|-----------|
| Bacto - triptona (Difco)     | 10.0 g.   |
| NaCl                         | 5.0 g.    |
| Vit B <sub>1</sub> (1 mg/ml) | 1.0 ml.   |
| Agua bidestilada             | 1,000 ml. |
- Esterilizar a 120°C durante 20 minutos\*
- b) 869 (Luria)
- |                          |           |
|--------------------------|-----------|
| Bacto - triptona (Difco) | 10.0 g.   |
| Extracto de levadura     | 5.0 g.    |
| NaCl                     | 10.0 g.   |
| Agua bidestilada         | 1,000 ml. |
- Esterilizar a 120°C durante 20 minutos\*
- c) TBD
- |                      |         |
|----------------------|---------|
| TB <sub>1</sub>      | 100 ml. |
| MgSO <sub>4</sub> 1M | 1.0 ml. |
| Maltosa 30 %         | 1.0 ml. |
| TLB                  | 1.0 ml. |

d) SM

NaCl	5.85 g.
Gelatina	0.5 g.
Agua bidestilada	480 ml.
Esterilizar a 120 °C durante 20 minutos*	
TRIS 1M pH 7.4	5.0 ml.
MgSO <sub>4</sub> 1M	2.5 ml.

e) TLB

L - treonina	1.0 g.
L - leucina	1.0 g.
Tiamina (vitamina B <sub>1</sub> )	0.1 g.
Agua bidestilada	100 ml.
Esterilizar a 120 °C durante 20 minutos*	

f) Maltosa 30 %

Maltosa	30.0 g.
Agua bidestilada	100 ml.
Esterilizar a 120 °C durante 20 minutos*	

g) MgSO<sub>4</sub> 1M

MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	246.48 g.
Agua bidestilada	1,000 ml.
Esterilizar a 120 °C durante 20 minutos*	

Bacto triptona (Difco) = Peptona de caseína purificada (Bioxon).

Bacto peptona (Difco) = Peptona de gelatina (Bioxon).

\* Ajustar a pH 7.0 con NaOH al 2 %, agregarlo inmediatamente después de esterilizar.

### III Métodos

La metodología utilizada se encamina principalmente tanto a la obtención de reservas de bacteriófagos y de células bacterianas de *Escherichia coli*, como a su cuantificación, identificación de características genéticas, irradiación y medición de las frecuencias de recombinación en el fago  $\lambda$ .

## A Obtención de reservas de virus

### 1 Inducción del profago $\lambda$ en bacterias lisógenas de Escherichia coli K-12.

#### a Inducción del profago por tratamiento con mitomicina C.

Se incuba una colonia de la cepa lisógena en medio  $TB_1$  a  $37^\circ C$ , con agitación y aereación durante 24 horas. Posteriormente se siembra un segundo cultivo haciendo una dilución 1 : 50, a partir del cultivo de 24 hs. Se incuba a  $37^\circ C$  con aereación y agitación hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4 a 590 nm (D.O. = 0.4 =  $1/2 \times 10^8$  células/ml). En este momento se agrega mitomicina C a una concentración final de 4 mg/ml, como agente inductor del profago, nuevamente se incuba a  $37^\circ C$  hasta observar la lisis celular. Para obtener destrucción celular total, se agregan 4 gotas de cloroformo, incubando 10 minutos más. Se centrifuga a 10,000 rpm por 10 minutos con el fin de eliminar los restos celulares, se recupera el sobrenadante en tubos de vidrio estériles y se conservan a  $4^\circ C$ .

#### b Inducción del profago de una cepa lisógena termoinducible.

Un cultivo del día anterior de la cepa a tratar, se diluye 50 veces en medio  $TB_1$ , se incuba a  $32^\circ C$  con agitación hasta llegar a una D.O.<sub>590</sub> = 0.8, después de lo cual se dá el tratamiento inductor al fago termosensible, el cual consiste en incubar a  $40^\circ C$  durante 10 minutos. Se continúa incubando a la temperatura inicial de  $30^\circ C$  con agitación hasta observar la lisis celular, se agregan 4 gotas de cloroformo y después de 10 minutos se suspende la incubación. Se centrifuga el cultivo a 10,000 rpm por 10 minutos, se recupera el sobrenadante, se titula y se conserva a  $4^\circ C$ .

#### c Inducción del profago de bacterias lisógenas por medio de la irradiación con luz UV.

Se diluye 1/50 en  $TB_1$  un cultivo de 24 hs. y se incuba a  $37^\circ C$  hasta que alcance una D.O.<sub>590nm</sub> = 0.4. Se centrifuga a 10,000 rpm durante 10 minutos para recuperar las células. El botón se resuspende agregando  $MgSO_4$   $10^{-2}M$ . Las células ya re

suspendidas se vacían en una caja de Petri procurando que el volumen de estas no exceda los 2 mm de espesor. La dosis de irradiación es de 70 Joules/m<sup>2</sup> para cepas silvestres y de aproximadamente 7 J/m<sup>2</sup> para las cepas radiosensibles deficientes en reparación. Nuevamente se centrifuga por 10 minutos a 10,000 rpm resuspendiendo ahora el botón en TB<sub>1</sub>. Se incuban las células en la obscuridad a 37°C con agitación hasta que se observe lisis celular, después de lo cual se agregan 5 gotas de cloroformo para destruir completamente las células. Se agita el cultivo durante 10 minutos más, centrifugándolo a 10,000 rpm durante 10 minutos, se recupera el sobrenadante y se titula.

## 2 Infección de células bacterianas con fagos lambda.

### a En medio líquido.

Esta técnica es muy efectiva para obtener un gran rendimiento de fagos. Se toman 0.6 ml. de un cultivo de 24 hs de C<sub>600</sub> incubado en medio Luria, en este volumen de bacteria se destruyen de 3 a 5 placas de lisis del fago deseado previamente purificado. Posteriormente se permite la adsorción de los fagos 15 minutos a 37°C sin agitación. Los centros infecciosos así formados constituidos por fagos adheridos a las bacterias, se vacían en un matraz con 10 ml. de medio Luria agregando además cloruro de calcio a una concentración final de 10<sup>-2</sup>M. Se incuba a 37°C con agitación hasta observar lisis celular, en ese momento se agregan 5 gotas de cloroformo y se agita durante 10 minutos. La mezcla se centrifuga a 10,000 rpm por 10 minutos, después de lo cual se titula el sobrenadante recuperado.

### b En medio sólido (capa confluyente).

Se destruyen de 3 a 5 placas del fago en cuestión, previamente purificado, en 0.6 ml de un cultivo de 24 hs de bacteria C<sub>600</sub>, se permite la adsorción de los fagos durante 15 minutos a 37°C, sin agitación. Una vez formados los centros infecciosos se divide el volumen inicial en 6 partes iguales es decir 0.1 ml por tubo de ensaye, agregando a cada una de

ellas 2 ml de medio Luria líquido y 2.5 ml de TA<sub>6</sub> fundido. El contenido de cada uno de los tubos se vacía en una caja de Petri muy húmeda que contiene medio Luria sólido, y se incuba a 37 °C hasta observar una confluencia casi total entre las placas de lisis. Lo anterior ocurre aproximadamente a las 5 hs después de iniciada la incubación. Se agregan ahora 3 gotas de cloroformo a cada caja y se colecta en un tubo de centrífuga la parte blanda superior de cada caja, que es donde se encuentran los fagos y los restos celulares. Después de agitar vigorosamente la mezcla anterior se centrifuga por 10 minutos a 10,000 rpm, se recupera y titula el sobrenadante.

B Cuantificación de los bacteriófagos y de las células bacterianas.

#### 1 Titulación de fagos.

Todos los fagos se titulan rutinariamente en la bacteria *E. coli* C<sub>600</sub>, con el objeto de conocer su número aproximado por mililitro para lo cuál se sigue la siguiente técnica : se hacen diluciones en la solución amortiguadora SM de las reservas de fagos por titular, las cuales pueden ser de 10 en 10. de 100 en 100 o combinaciones de ambas, hasta llegar a una dilución apropiada como 10<sup>-6</sup> o 10<sup>-7</sup>, ya que con los métodos usados de inducción del profago o de infección se obtienen de 10<sup>9</sup> a 10<sup>10</sup> partículas virales por mililitro. Se recomienda agregar 0.5 ml de soluto en 4.5 ml de solvente, con lo que se obtiene una dilución 10 veces menor y 0.05 ml de soluto en 5 ml de solvente para diluir 100 veces. Una vez efectuadas las diluciones adecuadas se coloca 0.1 ml de la dilución elegida en 0.15 ml de bacteria C<sub>600</sub>, permitiéndose la adsorción de los fagos incubando a 37 °C por 15 minutos sin agitación. Posteriormente se agregan 2.5 ml de TA<sub>6</sub>, se agita ligeramente la mezcla y se vacía ésta en una caja de Petri con medio TA<sub>12</sub> esparciendo rápidamente. La incubación se lleva a cabo a 37 °C toda la noche. Después de esto se cuentan cuidadosamente las placas de lisis y se hacen los cálculos necesarios, tomando

en cuenta el número de placas obtenido y la dilución utilizada.

### 3 Titulación de bacterias.

Se llevan a cabo una serie de diluciones del cultivo de células que se desea titular, de igual manera que para el caso de los fagos, pero utilizando  $\text{MgSO}_4$   $10^{-2}\text{M}$  como amortiguador solvente. De la dilución adecuada se toma 0.1 ml y se esparce por medio de movimientos circulares con un triángulo de vidrio estéril, sobre una caja de Petri con medio Luria sólido. Se incuba a  $37^\circ\text{C}$  toda la noche,, posteriormente se cuentan las colonias aisladas y con los datos obtenidos se efectúan los cálculos apropiados.

C Identificación de algunas características genéticas de bacteriófagos y bacterias.

#### 1 Técnicas para bacteriófagos.

##### a Purificación de fagos.

Se introduce un palillo de dientes en la reserva de fagos que se desea purificar y con la punta ya humedecida se estria sobre la superficie de una caja de Petri con  $\text{TA}_{12}$ . Por otro lado, en un tubo de ensaye se colocan 0.15 ml de bacteria  $\text{C}_{600}$  y 2.5 ml de  $\text{TA}_6$ , vaciando inmediatamente el contenido del tubo sobre las estrias hechas con el palillo. Se incubaba por 24 hs a  $37^\circ\text{C}$ . Al día siguiente se tendrán las placas de lisis aisladas, formadas cada una de ellas por la actividad de un sólo fago. Con esta técnica se puede asegurar la viabilidad y posibilidad de clonar los virus, por otro lado, la distribución espaciada de las placas facilita su manejo.

b Detección de la presencia de mutación ambar en los genes N o P del bacteriófago  $\lambda$ .

Para esta técnica se usa la cepa  $\text{S}_{601}$  ( $\text{su}^-$ ), incapaz de suprimir las mutaciones ambar del fago, la cepa  $\text{C}_{600}$  se usa como control positivo. Los tapices de bacterias se hacen de la siguiente manera : de un cultivo de bacterias de 24 hs se colocan 0.15 ml en un tubo de ensaye a los que se agrega 2.5 ml de  $\text{TA}_6$ , se agita la mezcla y se vacía rápidamente el conte

nido del tubo en una caja de Petri con medio TA<sub>12</sub>.

Se hace un tapiz con E. coli S<sub>601</sub> (su<sup>-</sup>) y otro con E. coli C<sub>600</sub> (su<sup>+</sup>). El tapiz con S<sub>601</sub> se divide con líneas bajo la caja de Petri en tantos casos como sea necesario. De cada una de las cepas de fagos por probar se colocan pequeñas gotas de 0.01 ml aproximadamente, sobre el tapiz de bacterias indicadoras y se dejan secar cuidando que ninguna de ellas llegue a unirse. Se recomienda partir de reservas con 10<sup>5</sup> a 10<sup>8</sup> fagos por mililitro. Una vez secas las gotas se pone una más de la reserva conocida ya sea N o P, exactamente sobre las gotas anteriores. Por otro lado se colocan gotas de todos los fagos utilizados, tanto problemas como testigos, sobre el tapiz de C<sub>600</sub>. La incubación se lleva a cabo por 24 hs a 37°C.

Posteriormente se comprueba si hubo o no formación de placas de lisis. Debido a que únicamente aquellos fagos que tengan la mutación ambar en diferentes loci podrán complementarse entre sí y crecer, la presencia o ausencia de dicho crecimiento nos indicará el tipo de mutación ambar de las reservas problema.

c Medición de la frecuencia de reversión espontánea de los genes N y P.

En esta prueba se mide la frecuencia con que las mutaciones ambar de los fagos regresan al estado original, para lo cual es necesario efectuar los siguientes pasos. El grupo de fagos por probar se preadsorbe a 37°C por 15 minutos en 0.15 ml de medio TBD con células S<sub>601</sub>. Ya formados los centros infecciosos se agregan 2.5 ml de medio TA<sub>6</sub> fundido, se agita ligeramente la mezcla y se esparce rápidamente en una caja de Petri con medio TA<sub>12</sub>. La incubación se lleva a cabo a 37°C por 24 hs. En la cepa indicadora usada sólo crecerán los revertantes al tipo silvestre. Se recomienda sembrar 0.1 ml de fago de las diluciones 10<sup>-1</sup> y 10<sup>-2</sup>.

## 2 Técnicas para bacterias

### a Purificación de bacterias.

Se siembra un cultivo de células bacterianas en medio Luria líquido y se incuba por 24 hs a 37°C con agitación. Pasado ese lapso se introduce una asa de siembra estéril en el cultivo para transportar las bacterias a una pequeña porción de una caja de Petri con medio Luria sólido. Se esteriliza nuevamente el asa de siembra y cruzando la porción inicial se forman varias estrias sobre una mitad de la caja de Petri, lo anterior se repite para la mitad restante. Después de incubar a 37°C por 24 hs se tendrán colonias aisladas de las bacterias deseadas, además se podrán identificar fácilmente las colonias contaminantes que posiblemente estaban en el cultivo original.

b Método cualitativo para probar fácilmente la sensibilidad de las bacterias a la radiación UV.

Se hacen cultivos de 24 hs de las cepas por probar, se introduce el asa de siembra estéril en uno de estos y se coloca una línea de bacterias sobre la superficie de una caja de Petri con Luria sólido.

Se distribuyen sobre la misma caja de Petri, bandas paralelas de cada una de las cepas restantes. La caja se divide en secciones perpendiculares a las líneas de bacterias que corresponderán a diferentes dosis de radiación UV, las cuales se logran de la siguiente manera : se quita la tapa de la caja de Petri y se cubre ahora con un cartón, ya colocada la caja bajo la fuente de radiación UV, se descubre la primera sección de la misma, irradiándola a cierta dosis preseleccionada. Posteriormente se descubre la segunda sección, se irradia y se continúa de la misma manera con las otras divisiones. Lo anterior nos permite establecer un gradiente de dosis de radiación ultravioleta. La última parte, que no se irradia, representa nuestro control. La incubación se hace a 37°C durante 24 hs en la obscuridad. Posteriormente se comparan los diferentes grados de crecimiento obtenidos en cada cepa. La va-

riabilidad en la respuesta es un indicio de la sensibilidad a la radiación UV.

c Construcción y purificación de bacterias lisógenas. Se siembra en TBD una colonia de la bacteria que se desea hacer lisogénica, se incuba a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 hs con agitación y aereación. Después de este lapso se mezclan en un tubo de ensaye 0.15 ml del cultivo de 24 hs y aproximadamente 500 fagos lisogénizadores, permitiendo su adsorción por 15 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Se agregan 2.5 ml de  $\text{TA}_6$  fundido y se vacía la mezcla en una caja de Petri con  $\text{TA}_{12}$ . Se incuban las cajas por 24 hs a  $37^{\circ}\text{C}$ . Se observa la turbidez de las placas de lisis, en donde la parte central de las mismas está formada por bacterias lisógenas, es decir, son bacterias que crecieron posteriormente a la infección y que llevan ahora el profago. Dicha parte central se pica con un palillo de dientes estéril, las bacterias que se encuentran en la punta del palillo, se colocan en una gota de  $\text{MgSO}_4$   $10^{-2}\text{M}$ , lo mismo se hace para varias placas de lisis con el objeto de purificar a los candidatos. Con una asa de siembra estéril se toma un poco de volumen de las gotas y se estría la superficie de una caja de Petri con medio Luria sólido, de manera semejante a la técnica usada en la purificación de bacterias. Se incuban las cajas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 hs.

Ahora se tiene que probar cuáles de las colonias aisladas que crecieron en las cajas con medio Luria son lisógenas. Con el objeto de tener un cultivo de cada una de ellas, con una asa de siembra estéril se toman varias de las mismas y se siembran cada una en tubos diferentes con medio  $\text{TB}_1$ , estos cultivos se incuban a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 hs con agitación. Al siguiente día, se ponen dos líneas de fagos con una pipeta de 0.01 ml en una caja con medio  $\text{TA}_{12}$ , una de ellas es de fagos del mismo tipo de los que se encuentran como profagos en las lisógenas formadas y la otra está constituida por fagos con inmunidad diferente a la primera línea. Se recomienda usar reservas de fagos con una concentración de  $10^5$  a  $10^7$  fagos/ml.

Una vez colocadas las líneas de fagos se dejan secar y se cruzan perpendicularmente cada una de ellas con los candidatos de células lisógenas, utilizando para ello el asa de siembra. Es necesario esterilizar el asa cada vez que se termine de cruzar la línea de fagos, sobre todo antes de introducir dicha asa en un cultivo de células. Las líneas de virus se cruzan además con bacterias no lisógenas y lisógenas con profagos de la misma o diferente inmunidad que la de los fagos usados para la prueba, estos últimos serán los controles. Finalmente se incuban a 37°C durante 24 hs.

Los resultados se analizan de la siguiente forma : a) las bacterias que no son lisógenas son lisadas por los fagos, esto se observará como dos líneas de bacterias interrumpidas; b) las lisógenas son destruidas por el fago de diferente inmunidad a la del profago pero no por el de la misma inmunidad, por lo tanto, sólo se observará una línea de células interrumpida y c) las bacterias que no son lisadas por ninguno de los dos tipos de fagos, son resistentes a la infección por el fago  $\lambda$ .

Finalmente se hacen cultivos de las lisógenas probables en TB<sub>1</sub> y se induce el profago por cualquiera de los métodos de inducción ya nombrados como radiación UV, mitomicina C o temperatura, en el caso de que el profago sea termosensible. Los cultivos de bacterias que tengan fagos después del tratamiento inductor son las lisógenas, se purifican y se almacenan en la forma indicada en el siguiente inciso.

d Almacenamiento de reservas de fagos y bacterias.

Las reservas de bacterias se almacenan de la siguiente manera : una vez comprobadas las características genéticas de la cepa en cuestión, se toma con el asa de siembra estéril una colonia aislada que no se vea contaminada a simple vista y se introduce el asa en tubos pequeños con gelosa profunda. Se incuba a 37°C durante 24 hs. Si el cultivo creció bien se sellan los tubos con parafilm y se guardan en la obscuridad a temperatura ambiente.

Las reservas de fagos se conservan en el medio donde fueron obtenidos y se les agregan de 2 a 3 gotas de cloroformo. Si después de cierto tiempo se observa contaminación en la reserva, este se puede centrifugar a 10,000 rpm por 10 minutos, se recupera el sobrenadante y se añade cloroformo antes de almacenarlos a 4 °C.

#### D Irradiación de bacterias y de bacteriófagos.

##### 1 Irradiación de células con luz UV.

Se diluye 50 veces un cultivo de 24 hs en TBD dejando que el mismo alcance una D.O.<sub>590</sub> = 0.4 aproximadamente de  $1.2 \times 10^8$  bacterias/ml.

Las bacterias se colectan por centrifugación a 10,000 rpm durante 10 minutos y el botón formado se resuspende en  $\text{MgSO}_4$   $10^{-2}$ M. Se coloca la suspensión de bacterias en una caja de Petri, procurando que el volumen no sea mayor a una capa de 2 mm de espesor. Se irradia a la dosis deseada con una lámpara germicida que emita una radiación de 2,537 nm, agitando lentamente a 0 °C. De aquí en adelante todos los pasos deben realizarse en la obscuridad o con luz roja, para evitar la fotorreactivación.

##### 2 Irradiación de bacteriófagos.

Las reservas de fagos deseados se diluye en SM a la concentración requerida, dicha dilución se vacía en cajas de Petri pequeñas procurando que el espesor de la capa formada no exceda los 2 mm de espesor. Las condiciones de irradiación con luz UV son 0 °C y agitación lenta, la lámpara de irradiación es igual a la utilizada en el caso de las bacterias.

#### IV Cruzas genéticas.

Las cepas de fagos que se utilizaron en los experimentos de recombinación tienen una mutación ambar en el gene N ( $N^-$ ) o en el gene P ( $P^-$ ), de tal manera que los recombinantes obtenibles pueden ser silvestres para los dos loci ( $N^+P^+$ ) o mutantes para ambos ( $N^-P^-$ ).

##### A Experimentos de recombinación.

1 Se diluye 50 veces un cultivo de noche de las células hospederas (AB 1157 o AB 2463) y se incuba en TBD hasta alcanzar una concentración celular de  $1 \times 10^8$  células por ml (D.O.  $590=0.4$ ).

2 Se centrifuga a 10,000 rpm por 10 minutos, el botón se resuspende en  $MgSO_4$   $10^{-2}$  M y se conserva la suspensión en hielo picado.

3 Las cepas de fagos mutantes por recombinar se mezclan a concentraciones iguales para obtener una multiplicidad de infección de 10. La concentración final deber ser de  $1 \times 10^9$  fagos; si el título de las reservas de fagos es muy alto, estas se pueden diluir en SM. Tanto la suspensión de bacterias como la mezcla de fagos se titulan para conocer la multiplicidad de infección real con la cual se trabajó.

4 Se toman alícuotas tanto de la suspensión de bacterias como de la mezcla de fagos y se irradian con UV a las diferentes dosis establecidas. La formación de centros infecciosos se hace según los cuatro casos siguientes :

- a Control. Bacteria no irradiada (0), fago no irradiado (0). Caso OB/ $\lambda$ .
- b Bacteria irradiada (UV), fago no irradiado (0). Caso UVB/ $\lambda$ .
- c Bacteria no irradiada (0), fago irradiado (UV). Caso OB/UV $\lambda$ .
- d Bacteria irradiada (UV), fago irradiado (UV). Caso UVB/UV $\lambda$ .

5 Para la formación de los centros infecciosos se permite la adsorción por 15 minutos a 37°C en las cepas AB 1157 o

AB 2463.

6 Se adicionan 5 ml de  $\text{MgSO}_4$   $10^{-2}$  M a cada tubo y se centrifugan a 10,000 rpm durante 10 minutos, con el fin de eliminar los fagos no adsorbidos.

7 El botón se resuspende en TBD y se incuba a  $37^\circ\text{C}$  con agitación durante 90 minutos.

8 Se agregan tres gotas de cloroformo en cada tubo al finalizar el tiempo de incubación, se permiten 10 minutos más de agitación y se centrifuga a 10,000 rpm por 10 minutos. Se recupera el sobrenadante, en este se encuentran tanto los fagos progenitores como los recombinantes originados durante los 90 minutos de incubación.

B Método para determinar la frecuencia de recombinación de los fagos irradiados o no.

1 El sobrenadante recuperado se titula, usando para esto tapices de E. coli QR 48 y  $S_{601}$ , en cajas de Petri con medio  $\text{TA}_{12}$ .

2 Se incuba a  $37^\circ\text{C}$  durante 24 horas, se cuentan las placas de lisis que crecieron en cada uno de los tapices.

Debido a que en QR 48 ( $\text{recA}^- \text{su}^+$ ) crece la población total de fagos y en  $S_{601}$  ( $\text{recA}^- \text{su}^-$ ) únicamente lo hacen los fagos recombinantes, la frecuencia de recombinación se calcula dividiendo el título de fagos obtenido en  $S_{601}$  entre el título obtenido en QR 48. Se debe tomar en cuenta que con este sistema sólo se detectan los recombinantes  $\text{NN}^+\text{P}^+$ , pero no los recombinantes  $\text{NN}^-\text{P}^-$ .

## V Resultados.

Mediante las cruzas genéticas entre los fagos utilizados, se pudieron observar varios fenómenos que se presentan durante la recombinación del fago  $\lambda$ , cuando este ha sido irradiado o no con luz UV.

Tanto en la cepa silvestre (AB 1157) como en la  $recA^-$  (AB 2463), la frecuencia de recombinación del fago  $\lambda$  aumenta conforme se incrementa la dosis de radiación al ADN de  $\lambda$  (gráficas 1, 3 y 5). Sin embargo este proceso tiene un límite, ya que a pesar de que se produzca un mayor número de daños en el ADN del fago, la cantidad de intercambios genéticos permanece más o menos constante (gráficas 1, 3 y 5).

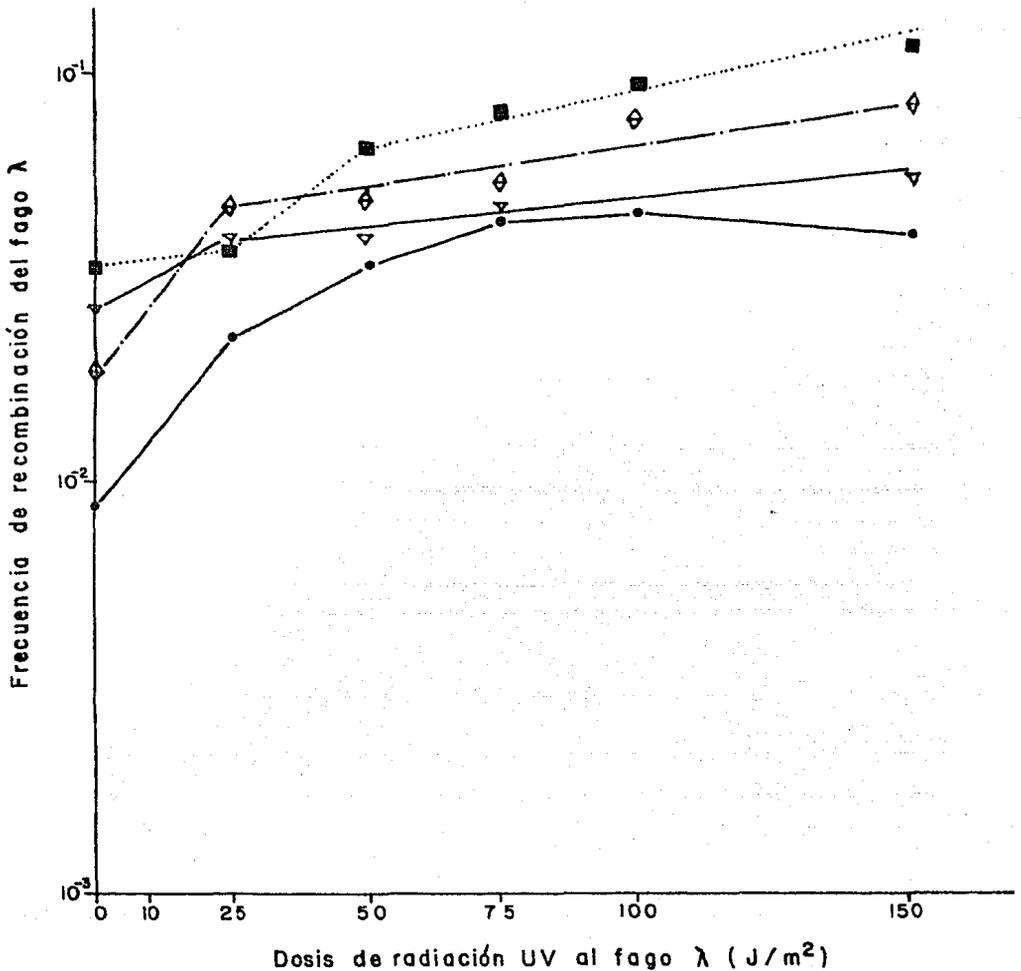
No obstante que la recombinación del fago no aumenta después de que este ha recibido ciertas dosis de radiación, este proceso de recombinación es mayor cuando se irradia a las células hospederas, fenómeno que se presenta tanto en las bacterias tipo silvestre como en las  $recA^-$  (gráficas 1, 3, 5 y 7). El incremento de la recombinación del fago  $\lambda$  no es directamente proporcional a la cantidad de radiación a la bacteria, sino que existe una dosis de radiación UV con la cual el alza de la recombinación es óptima (gráficas 1, 3, 5 y 7).

Muy interesante es el hecho de que la frecuencia de recombinación del fago  $\lambda$  aumenta simplemente por irradiar al hospedero, sin irradiación del fago, y por lo tanto sin que se induzcan daños aparentes en el mismo. Esto es válido tanto para la cepa silvestre como para la  $recA$ . Sin embargo mientras que para la primera cepa este fenómeno es dependiente de la dosis; en la segunda únicamente importa el hecho de que se irradie o no a la bacteria, siempre y cuando esté presente el gene  $red$  (gráficas 2, 4 y 6; caso UVB/O $\lambda$ ).

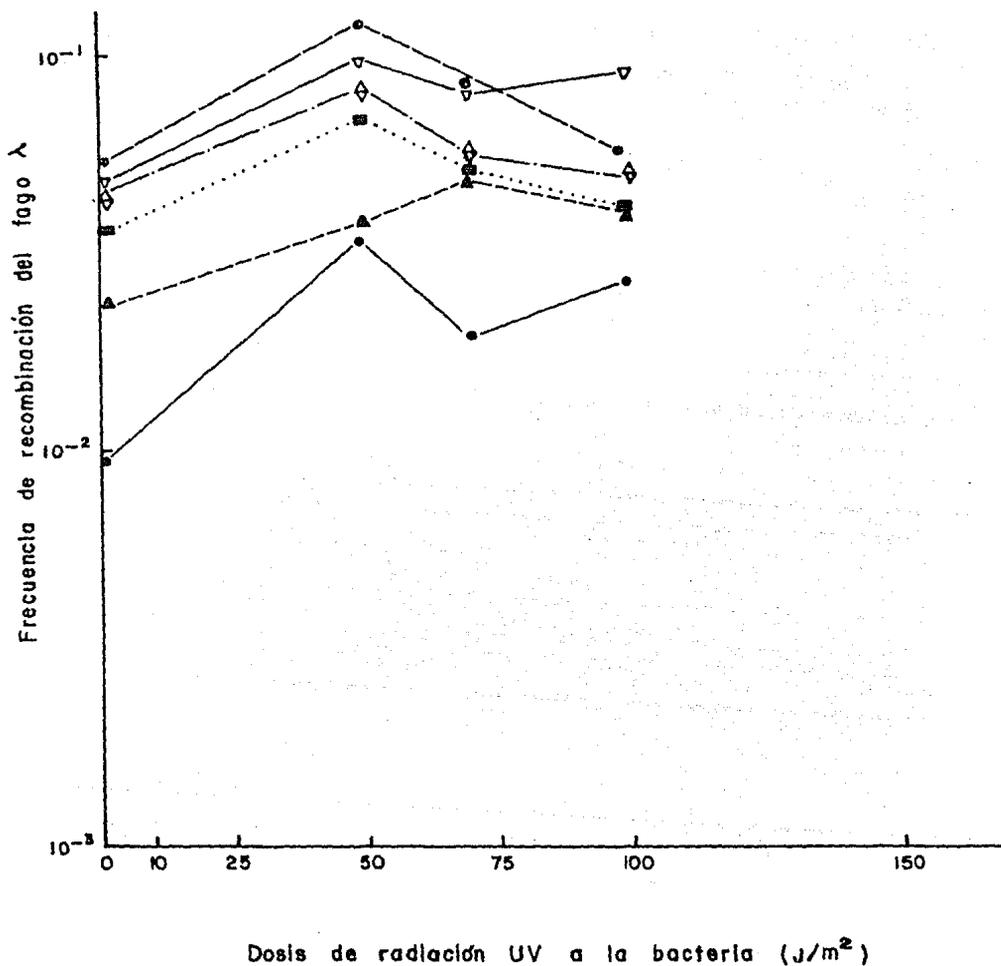
La recombinación espontánea del fago (OB/O $\lambda$ ) también está influenciada por la presencia o ausencia de los genes  $rec$  y  $red$ . Si el fago es  $red^+$ , no importa si la bacteria carece o no del gene  $recA$ , de todas formas la frecuencia de recombinación espontánea es la misma, es decir,  $9.2 \times 10^{-3}$  para la

TABLA 1 Efecto de la radiación UV en la recombinación de los fagos  $\lambda$ susN<sub>7</sub>sus<sub>53</sub>c<sup>+</sup>red<sup>+</sup> y  $\lambda$ susP<sub>80</sub>c<sup>+</sup>red<sup>+</sup>, utilizando como célula hospedera a la cepa AB 1157 (tipo silvestre).

Dosis de UV (J/m <sup>2</sup> )		Frecuencia de recombinación (10 <sup>-3</sup> )	Desviación estándar ( $\sigma_{n-1}$ )
E. coli	$\lambda$		
0	0	9.2	2.0
50	0	34.9	5.1
70	0	19.2	5.3
100	0	27.2	9.3
0	25	23.4	9.1
0	50	35.0	14.0
0	75	45.0	17.7
0	100	47.5	13.2
0	150	42.0	12.6
50	25	38.2	11.9
50	50	69.2	23.4
50	75	82.2	25.0
50	100	98.7	41.8
50	150	124.0	22.0
70	25	49.7	4.7
70	50	50.6	5.2
70	75	55.5	7.4
70	100	80.5	12.7
70	150	84.6	9.2
100	25	40.3	5.1
100	50	42.1	6.5
100	75	49.9	14.6
100	100	93.7	19.1
100	150	57.6	11.4



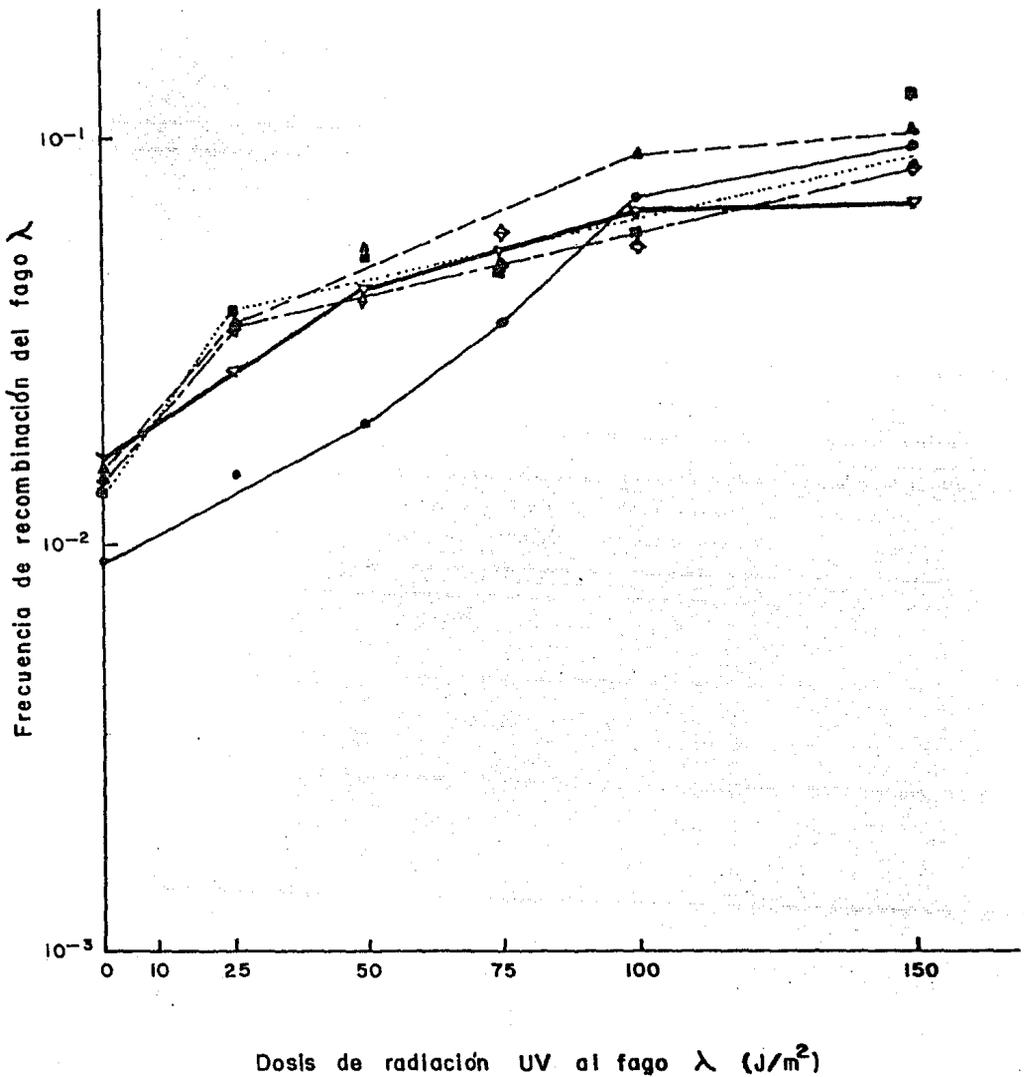
Gráfica 1. Efecto de la radiación UV en la recombinación de las cepas  $\lambda$ susN<sub>7</sub>susN<sub>53</sub>c<sup>+</sup>red<sup>+</sup> y  $\lambda$ susP<sub>80</sub>c<sup>+</sup>red<sup>+</sup>, utilizando como célula hospedera a la cepa irradiada AB 1157 (tipo silvestre). En algunos casos la bacteria no ha sido irradiada (●—) o se irradió a 50 J/m<sup>2</sup> (■·····■), 70 J/m<sup>2</sup> (◇- - - - -◇) o 100 J/m<sup>2</sup> (▽—▽). Cada punto de ésta y de las siguientes gráficas representa el promedio de por lo menos cuatro experimentos. Mediante el método de la desviación estándar ( $\sigma_{n-1}$ ) se eliminaron aquellos valores que estaban alejados de la media ( $\bar{x}$ ).



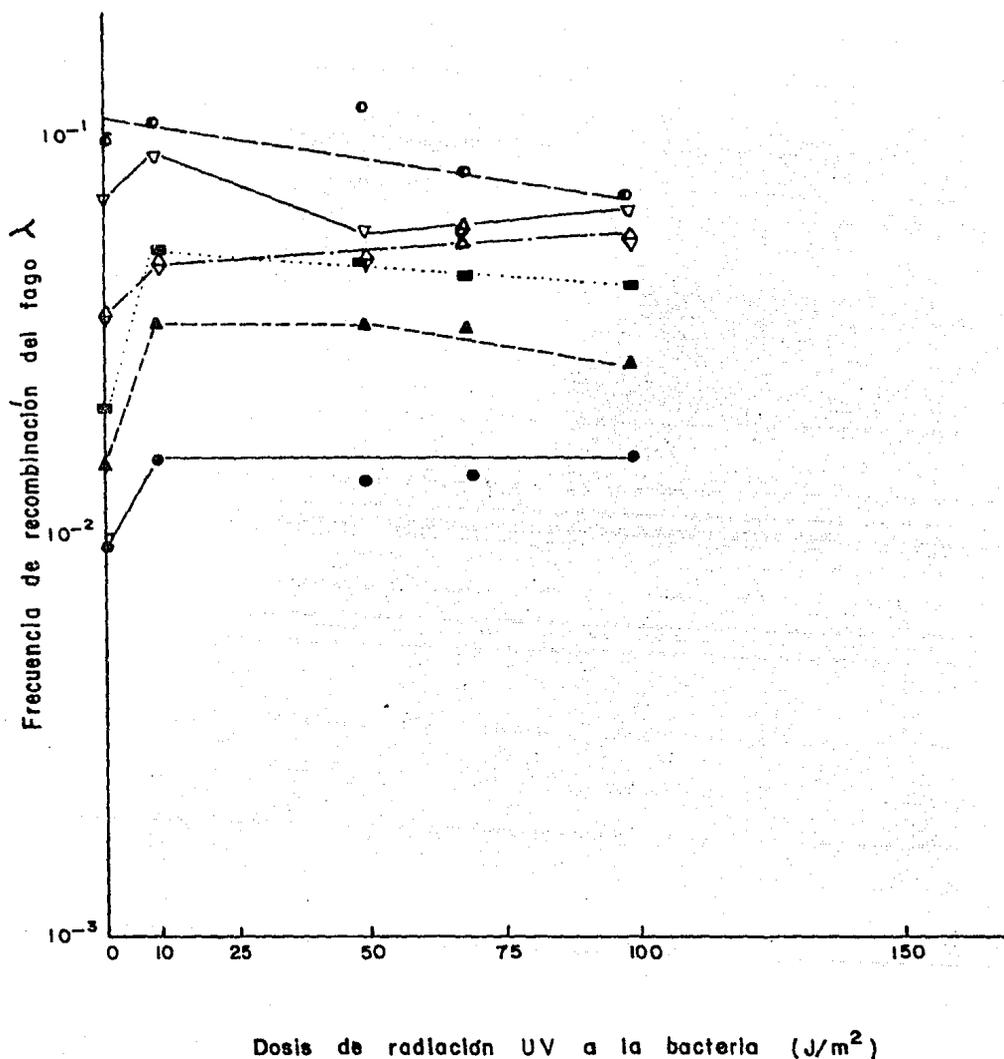
Gráfica 2. Efecto de la radiación UV en la recombinación de las cepas  $\lambda_{susN_7susN_{53}c^+red^+}$  y  $\lambda_{susP_{80}c^+red^+}$ , utilizando como huésped a la cepa AB 1157 (tipo silvestre). El fago no se irradió (●—●) o se irradió a  $25 J/m^2$  (▲—▲),  $50 J/m^2$  (■····■),  $75 J/m^2$  (◊····◊),  $100 J/m^2$  (▽—▽) o  $150 J/m^2$  (⊙—⊙).

TABLA 2 Efecto de la radiación UV en la recombinación de los fagos  $\lambda$ susN<sub>7</sub>susN<sub>53</sub>c<sup>+</sup>red<sup>+</sup> y  $\lambda$ susP<sub>80</sub>c<sup>+</sup>red<sup>+</sup>, utilizando como célula hospedera a la cepa AB 2463 (recA<sup>-</sup>).

Dosis de UV (J/m <sup>2</sup> )		Frecuencia de recombinación (10 <sup>-3</sup> )	Desviación estándar ( $\sigma_{n-1}$ )
E coli	$\lambda$		
0	0	9.1	1.7
10	0	15.7	3.7
50	0	13.3	3.0
70	0	14.0	1.3
100	0	15.9	5.0
0	25	14.8	2.0
0	50	19.8	4.3
0	75	34.2	2.8
0	100	70.4	6.1
0	150	95.7	24.7
10	25	33.5	8.3
10	50	51.6	8.5
10	75	47.5	16.7
10	100	91.8	32.8
10	150	104.9	58.2
50	25	37.8	2.4
50	50	51.0	16.5
50	75	46.6	4.6
50	100	56.5	6.5
50	150	120.8	42.8
70	25	33.6	4.6
70	50	42.0	3.1
70	75	58.6	4.4
70	100	55.2	5.7
70	150	83.3	1.2
100	25	26.4	2.4
100	50	42.6	3.2
100	75	51.6	6.0
100	100	65.5	1.2
100	150	69.0	7.9



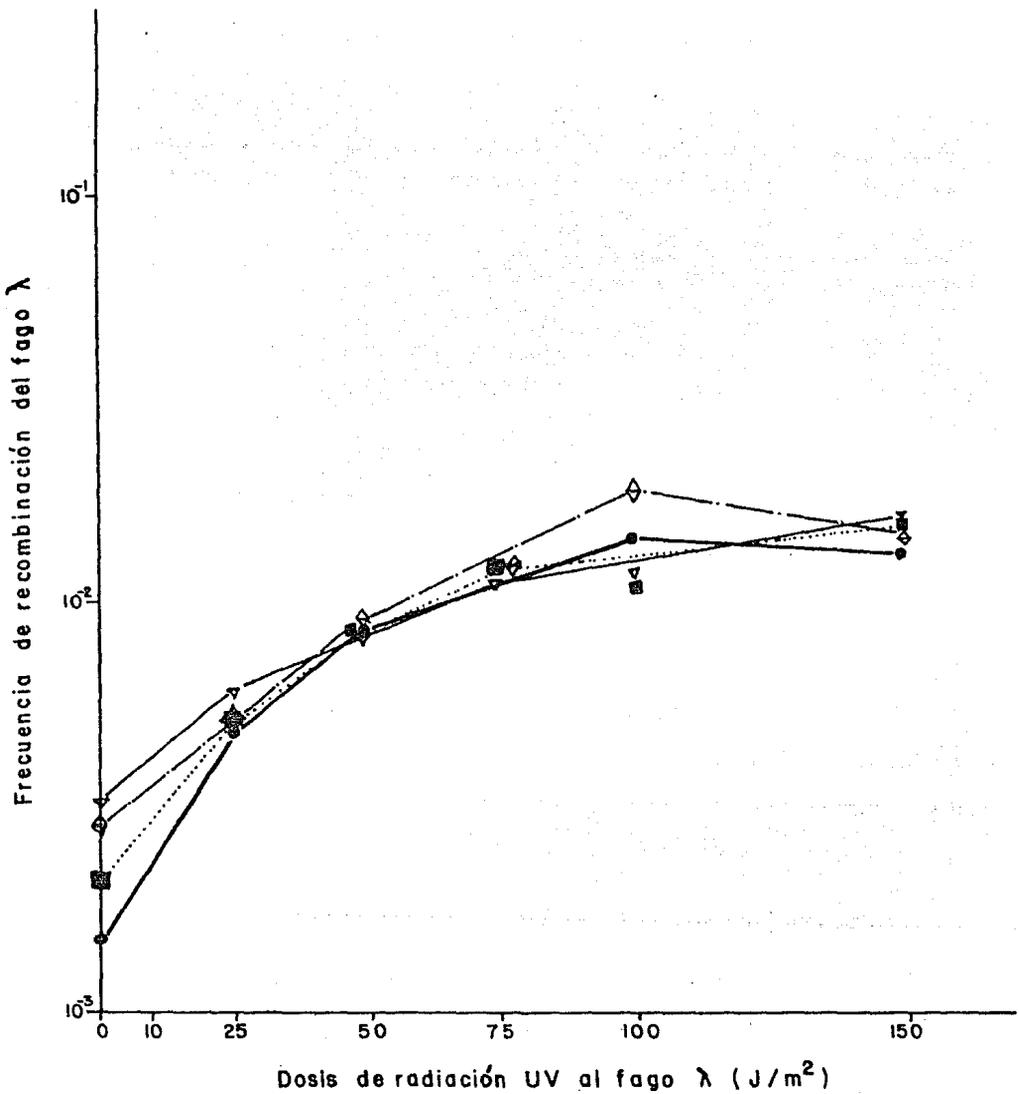
Gráfica 3. Efecto de la radiación UV en la recombinación de las cepas  $\lambda$ susN<sub>7</sub>susN<sub>53</sub>c<sup>+</sup>red<sup>+</sup> y  $\lambda$ susP<sub>80</sub>c<sup>+</sup>red<sup>+</sup>, utilizando como huésped a la cepa AB 2463 (recA<sup>-</sup>). Las dosis de radiación a la bacteria fueron: 0 J/m<sup>2</sup> (●—●), 10 J/m<sup>2</sup> (▲-----▲), 50 J/m<sup>2</sup> (■·····■), 70 J/m<sup>2</sup> (◇-----◇) o 100 J/m<sup>2</sup> (▽—▽).



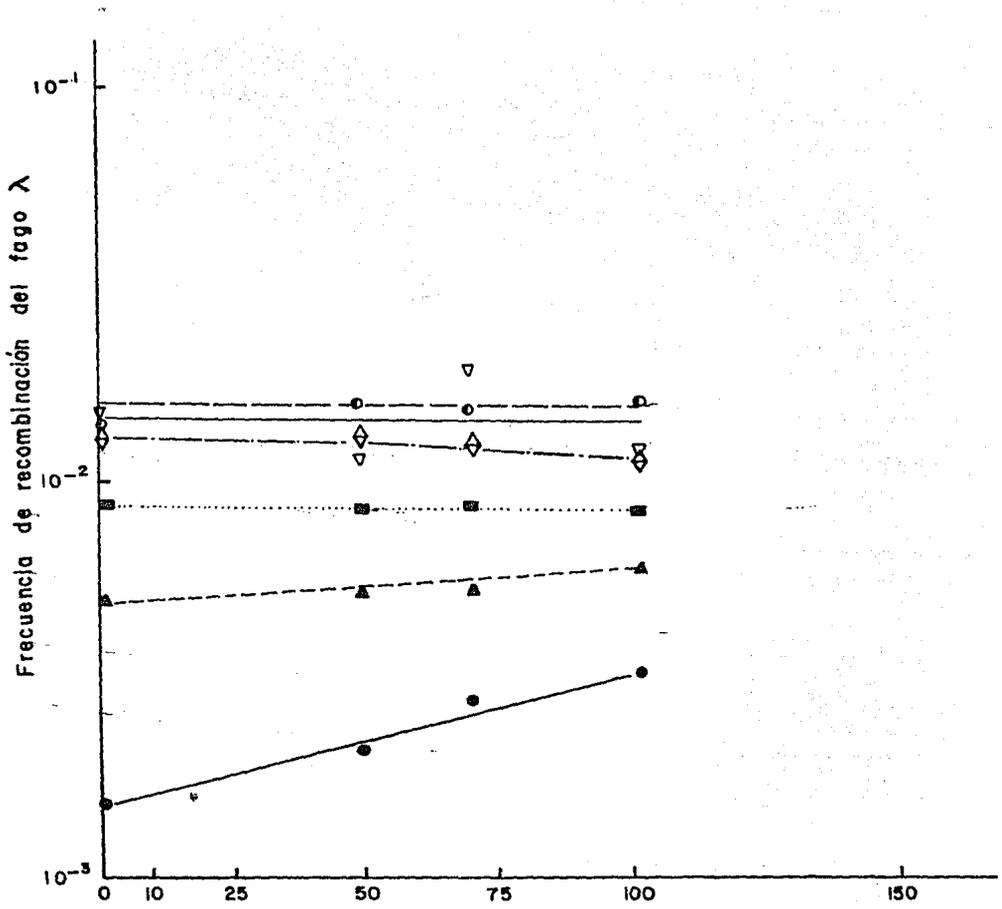
Gráfica 4. Efecto de la radiación UV en la recombinación de las cepas  $\lambda$ susN<sub>7</sub>susN<sub>53</sub>c<sup>+</sup>red<sup>+</sup> y  $\lambda$ susP<sub>80</sub>c<sup>+</sup>red<sup>+</sup>, utilizando como huésped a la cepa AB 2463 (recA<sup>-</sup>). Las dosis de radiación al fago fueron 0  $J/m^2$  (●—●), 25  $J/m^2$  (▲-▲), 50  $J/m^2$  (■····■), 75  $J/m^2$  (◇-◇), 100  $J/m^2$  (▽—▽) o 150  $J/m^2$  (⊙-⊙).

TABLA 3 Efecto de la radiación UV en la recombinación de los fagos  $\lambda$ susN<sub>7</sub>susN<sub>53</sub>c<sup>+</sup>red<sup>-</sup> y  $\lambda$ susP<sub>80</sub>c<sup>+</sup>red<sup>-</sup>, utilizando como célula hospedera a la cepa AB 1157 (tipo silvestre).

Dosis de UV (J/m <sup>2</sup> )		Frecuencia de recombinación (10 <sup>-3</sup> )	Desviación estándar ( $\sigma_{n-1}$ )
E coli.	$\lambda$		
0	0	1.5	0.5
50	0	2.1	0.5
70	0	2.8	0.8
100	0	3.3	0.3
0	25	4.9	1.2
0	50	8.7	0.4
0	75	5.6	0.8
0	100	14.8	7.9
0	150	13.3	2.5
50	25	5.2	0.7
50	50	8.6	3.2
50	75	12.4	3.4
50	100	11.2	5.4
50	150	15.6	5.1
70	25	5.2	0.7
70	50	9.3	2.5
70	75	12.4	2.7
70	100	19.7	4.2
70	150	14.7	3.5
100	25	6.2	1.2
100	50	8.5	1.6
100	75	11.3	0.7
100	100	11.8	2.0
100	150	16.3	4.6



Gráfica 5. Efecto de la radiación UV en la recombinación de las cepas  $\lambda$ susN<sub>7</sub>susN<sub>53</sub>c<sup>+</sup>red<sup>-</sup> y  $\lambda$ susP<sub>80</sub>c<sup>+</sup>red<sup>-</sup>, utilizando como huésped a la cepa AB 1157 (tipo silvestre). Las dosis de radiación a la bacteria fueron : 0  $J/m^2$  (●—●), 50  $J/m^2$  (■·····■), 70  $J/m^2$  (▽·····▽) o 100  $J/m^2$  (△—△).

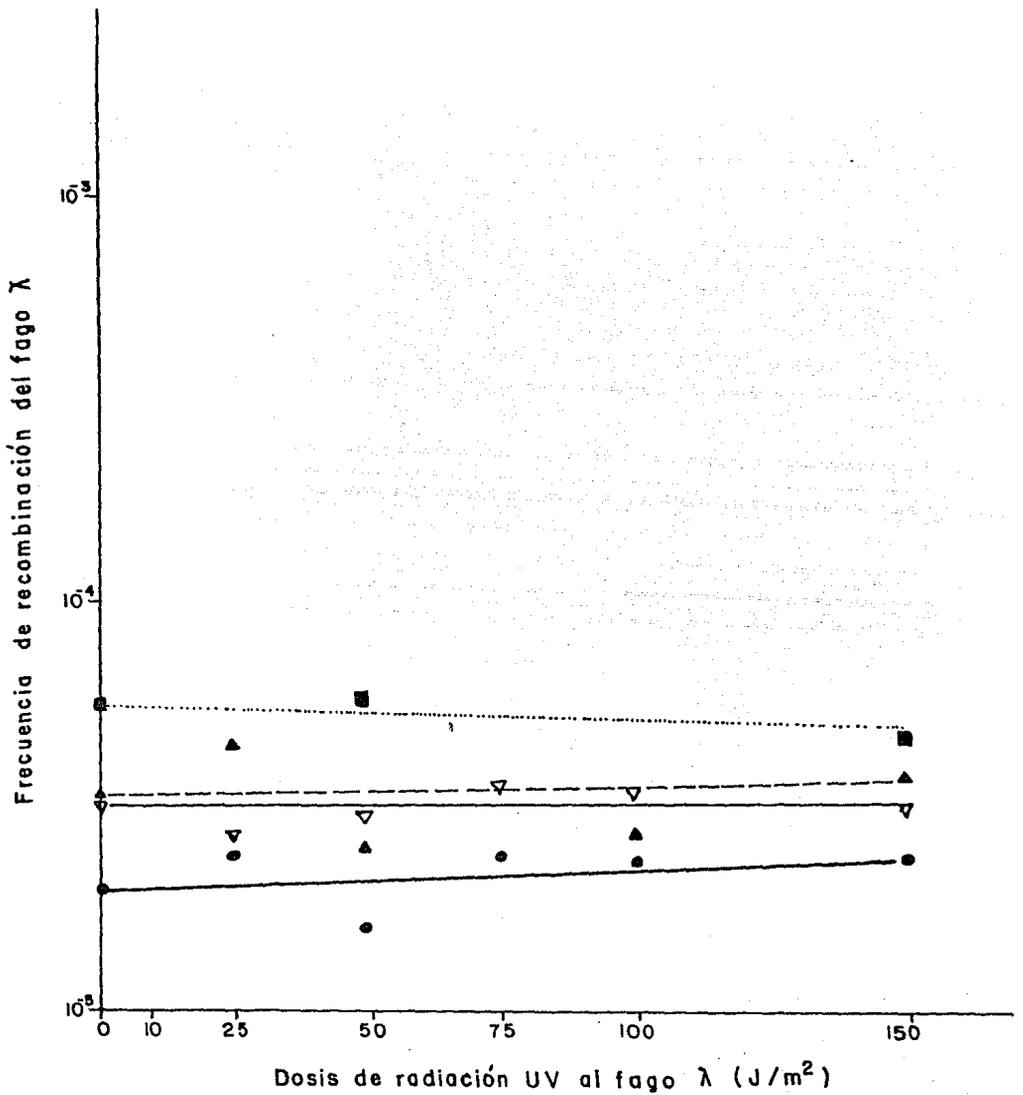


Dosis de radiación UV a la bacteria (J/m<sup>2</sup>)

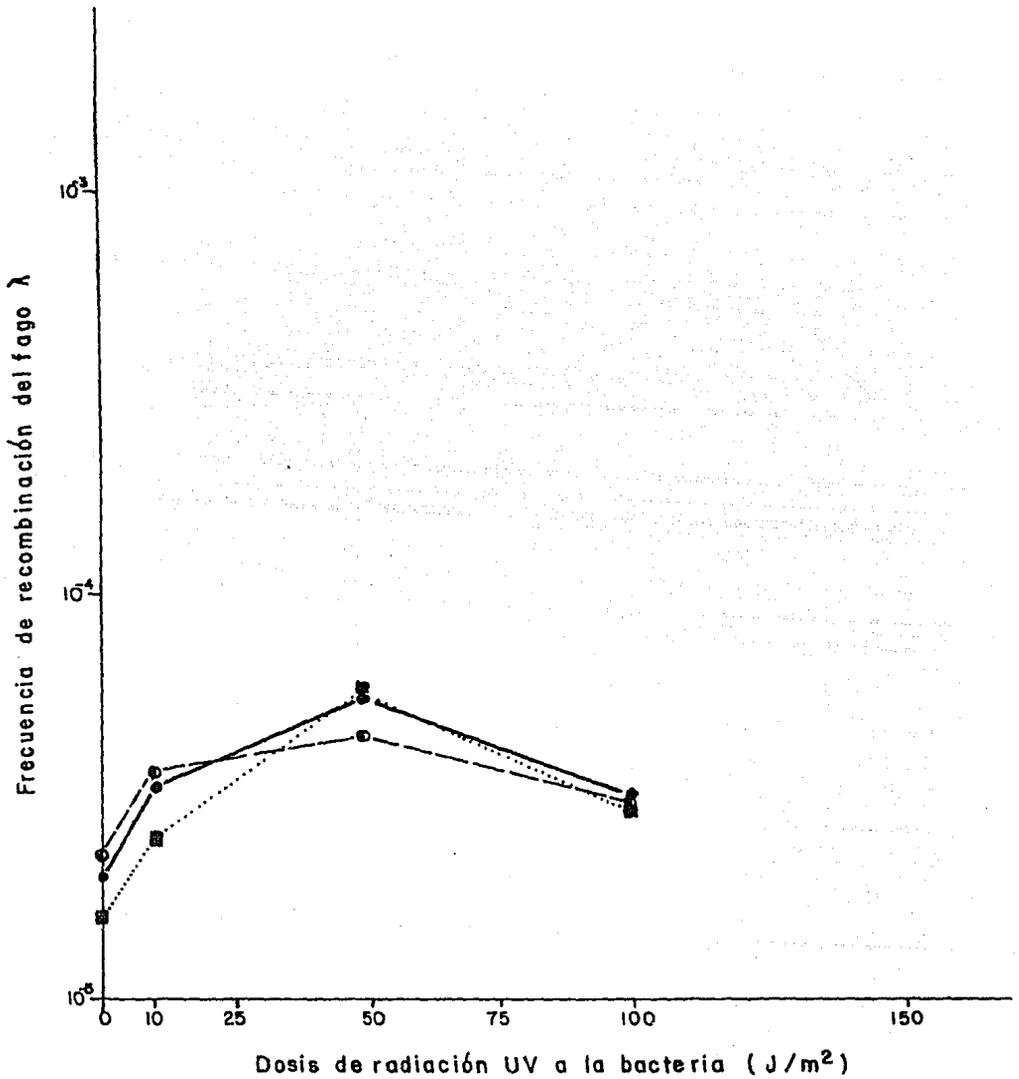
Gráfica 6. Efecto de la radiación UV en la recombinación de las cepas  $\lambda$ susN<sub>7</sub>susN<sub>53</sub>c<sup>+</sup>red<sup>-</sup> y  $\lambda$ susP<sub>80</sub>c<sup>+</sup>red<sup>-</sup>, utilizando como huésped a la cepa AB 1157 (tipo silvestre). Las dosis de radiación al fago fueron : 0 J/m<sup>2</sup> (●—●), 25 J/m<sup>2</sup> (▲—▲), 50 J/m<sup>2</sup> (■.....■), 75 J/m<sup>2</sup> (◇-----◇), 100 J/m<sup>2</sup> (———), 100 J/m<sup>2</sup> (▽—▽) o 150 J/m<sup>2</sup> (●—●).

TABLA 4 Efecto de la radiación UV en la recombinación de los fagos  $\lambda$ susN<sub>7</sub>susN<sub>53</sub>c<sup>+</sup>red<sup>-</sup> y  $\lambda$ susP<sub>80</sub>c<sup>+</sup>red<sup>-</sup> utilizando como célula hospedera a la cepa AB 2463 (recA<sup>-</sup>).

Dosis de UV (J/m <sup>2</sup> )	UV	Frecuencia de recombinación (10 <sup>-3</sup> )	Desviación estándar ( $\sigma_{n-1}$ )
E. coli	$\lambda$		
0	0	0.02	0.01
10	0	0.034	0.007
50	0	0.057	0.024
100	0	0.032	0.165
0	25	0.024	0.005
0	50	0.016	0.005
0	75	0.024	0.007
0	100	0.023	0.013
0	150	0.023	0.015
10	25	0.045	0.198
10	50	0.025	0.012
10	100	0.027	0.0183
10	150	0.037	0.0187
50	50	0.059	0.022
50	150	0.046	0.018
100	25	0.027	0.0028
100	50	0.030	0.0014
100	75	0.036	0.049
100	100	0.035	0.0028
100	150	0.031	0.008



Gráfica 7. Efecto de la radiación UV en la recombinación de las cepas  $\lambda$ susN<sub>7</sub>susN<sub>53</sub>c<sup>+</sup>red<sup>-</sup> y  $\lambda$ susP<sub>80</sub>c<sup>+</sup>red<sup>-</sup>, utilizando como huésped a la célula hospedera AB 2463 (recA<sup>-</sup>). Las dosis de radiación a la bacteria fueron : 0  $J/m^2$  (●—●), 10  $J/m^2$  (▲—▲), 50  $J/m^2$  (◻.....◻) o 100  $J/m^2$  (▽—▽).



Gráfica 8. Efecto de la radiación UV en la recombinación de las cepas  $\lambda$ susN<sub>7</sub>susN<sub>53</sub>c<sup>+</sup>red<sup>-</sup> y  $\lambda$ susP<sub>80</sub>c<sup>+</sup>red<sup>-</sup>, utilizando como huésped a la bacteria AB 2463 (recA<sup>-</sup>). Las dosis de radiación al fago fueron : 0 J/m<sup>2</sup> (●—●), 50 J/m<sup>2</sup> (■.....■) o 150 J/m<sup>2</sup> (⊙—⊙).

cepa AB 1157 y  $9.1 \times 10^{-3}$  para la línea AB 2463 (tablas 1 y 2). La situación es muy diferente cuando no está presente el sistema red del fago (gráficas 5 y 6, tabla 3), ya que en su ausencia la frecuencia de recombinación espontánea se reduce a  $1.5 \times 10^{-3}$  pero cuando faltan los dos sistemas, red y rec (gráficas 7 y 8, tabla 4), la recombinación disminuye a  $2.0 \times 10^{-5}$ .

Comparando los casos OB/UV $\lambda$  y UVB/UV $\lambda$  en la cepa recA<sup>-</sup>, es decir, aquellos en donde sólo se irradia al fago  $\lambda$  o a la bacteria y al fago respectivamente, encontramos que hay diferencias en la frecuencia de recombinación, las cuales son dependientes de la dosis de radiación. A dosis bajas de radiación, menores de  $75 \text{ J/m}^2$ , la recombinación es inferior en el caso OB/UV $\lambda$  que en el UVB/UV $\lambda$ ; pero a dosis altas las frecuencias de recombinación, en ambos casos, son parecidas (gráfica 3).

Algo semejante a lo anterior sucede cuando comparamos la frecuencia de recombinación para el caso OB/UV $\lambda$ , entre las cepas silvestre y recA<sup>-</sup>. Mientras que a dosis bajas, la frecuencia es menor en las células recA<sup>-</sup>, a altas dosis dicha frecuencia es mayor que en el tipo silvestre (gráficas 1 y 3).

En la AB 1157 y cuando los fagos carecen del sistema red (red<sup>-</sup>), las frecuencias de recombinación, tanto la espontánea como la inducida, son siempre menores que cuando está presente dicho gene (red<sup>+</sup>). A pesar de ello, la pendiente de la curva es mayor en red<sup>-</sup> que en red<sup>+</sup> (comparar gráficas 1 y 5). En este caso (red<sup>-</sup>) también se observa que la frecuencia de recombinación del fago  $\lambda$  a dosis altas, mayores de  $75 \text{ J/m}^2$ , es tan elevada que logra alcanzar a las frecuencias que se presentan cuando está activo el gene red (red<sup>+</sup> a dosis bajas, gráficas 1 y 5).

El ejemplo más drástico en cuanto a la reducción de la recombinación es el que se presenta cuando faltan, tanto el sistema rec (recA<sup>-</sup>) como el red (red<sup>-</sup>), aquí la frecuencia de recombinación no aumenta al dañar más al ADN de  $\lambda$  (gráfica 7),

empero, sí se observan ligeros aumentos cuando se irradia unicamente a la bacteria (casos UVB/0λ, gráfica 8) o a esta y al fago (caso UVB/UVλ, gráfica 7).

## VI Discusión

La radiación UV daña el ADN, del fago  $\lambda$ . pero algunos de estos daños pueden ser reparados mediante sistemas enzimáticos que se encuentran en las células de *E. coli* a las que parasitan (Witkin, 1976).

Como en las cepas tipo silvestre (AB 1157), se encuentran todos los sistemas de reparación conocidos, dichas bacterias son capaces de reparar con gran eficiencia el ADN irradiado del fago  $\lambda$ . El incremento de la frecuencia de recombinación al irradiar únicamente al fago (ver gráficas 2, 4, 6 y 8, casos OB/UV $\lambda$ ), se debe posiblemente a que, por la actuación de los sistemas constitutivos de reparación, se producen mayor cantidad de intercambios en el ADN del fago, con el objeto de reparar las alteraciones, o huecos postreplicativos, producidos por las dosis crecientes de radiación ultravioleta (Howard-Flanders *et al.*, 1968).

El hecho de que la frecuencia de recombinación no aumente después de ciertas dosis de radiación ultravioleta, sugiere que los fenómenos de reparación recombinogénicos no pueden corregir más allá de un número de daños determinado, es decir, una vez que se rebasa cierto límite, los daños producidos podrán ser enmendados por otros sistemas de reparación, más no por recombinación (gráficas 1, 3 y 5).

Aparentemente en la cepa AB 1157, el sistema de reparación por recombinación no es saturable, por el hecho de que actúan otros sistemas de reparación. En este caso los procesos no recombinogénicos le quitan sustrato a los recombinogénicos y por lo tanto las frecuencias de recombinación observadas son el producto de la competencia de todos los mecanismos reparadores del ADN. Esto se puede inferir si se toman en cuenta los resultados obtenidos en la cepa AB 1886 (uvrA<sup>-</sup>).

Como las bacterias uvrA<sup>-</sup> son deficientes en el mecanismo de excisión de los daños, el cual es un tipo de reparación no recombinogénica, la mayoría de su reparación se lleva a cabo por procesos de recombinación, por lo que en esta cepa la fre-

cuencia de este fenómeno es mayor que en el tipo silvestre (datos no presentados).

Es interesante la inducción de la recombinación del fago  $\lambda$ , observada cuando se irradia únicamente al hospedero como se observa al comparar casos OB/O $\lambda$  contra UVB/O $\lambda$ , ya que sin daño aparente en el ADN del fago, se produce un número mayor de eventos de recombinación. Dicha inducción al irradiar a la bacteria se presenta cuando también se ha irradiado el ADN del fago como se ve al comparar el caso OB/UV $\lambda$  contra UVB/UV $\lambda$ . Aunque actualmente se están realizando varios experimentos en nuestro laboratorio para tratar de dilucidar la hipótesis correcta, pensamos que el aumento de la recombinación se debe a un incremento en la producción de PrecA.

Tomando en cuenta el modelo de regulación propuesto por Howard-Flanders (1981) (ver inciso D de la introducción), cuando hay daños en el ADN se induce una síntesis mayor de PrecA, además de otras proteínas, productos de los genes *uvrC*, *uvrA*, *SfiA*, etc. (Kenyon et al, 1982). Al haber mayor cantidad de PrecA disponible, es posible encontrar mayor recombinación entre las moléculas de ADN. Esto resulta lógico si consideramos los resultados obtenidos en la cepa silvestre, sin embargo en la cepa *recA<sup>-</sup>* también observamos un ligero aumento en la recombinación del fago, al irradiar únicamente a la bacteria. Tomando en cuenta que el mutante *recA<sup>-</sup>* no es un mutante por supresión, es probable que a pesar de que esta cepa tiene una alteración en el gene que codifica para la PrecA, dicho mutante conserva cierta actividad residual de la PrecA y por lo tanto puede estar sintetizando una proteína similar a la PrecA silvestre, pero con algún defecto estructural que provoca una menor actividad que la PrecA normal.

Otra explicación para este incremento de la recombinación en la cepa *recA<sup>-</sup>* es la de que el gene *recF<sup>-</sup>* se induce como respuesta a la radiación ultravioleta, independientemente del sistema SOS y del gene *recA*. Esta autonomía del gene *recF* está sustentada en el hecho de que el doble mutante *recA<sup>-</sup> recF<sup>-</sup>* es

más sensible que los mutantes sencillos por separado, por lo que si es probable que el gene recF esté involucrado en una vía metabólica distinta de la del gene recA.

Aunque actualmente no podemos descartar ninguna de las dos alternativas propuestas, la primera de ellas nos parece la más adecuada, ya que tiene mayor apoyo experimental en nuestro laboratorio y se adapta mejor al modelo de regulación rec-lex.

El gene red del fago no está involucrado de manera notable en esta inducción de la recombinación, ya que el fenómeno se observa aunque falte dicho gene. Si acaso la ausencia del gene red disminuye la recombinación generalizada del fago  $\lambda$ , pero no interfiere con la respuesta celular inducida por la radiación.

La recombinación espontánea del fago depende principalmente del sistema red, pero cuando falta dicho sistema, el gene recA puede sustituirlo, aunque con menor eficiencia. Posiblemente esto se debe a que el ADN del fago, por su configuración tamaño o estructura, es menos accesible a las enzimas bacterianas. De hecho es de esperarse mayor eficiencia del gene del bacteriófago, que del gene bacteriano, en la recombinación de  $\lambda$ .

Se observa además que en el caso de la recombinación espontánea hay una interacción de los sistemas rec y red ya que, si falta red, la recombinación disminuye 6 veces pero si faltan los dos sistemas la recombinación se reduce 455 veces.

Cuando falta solamente el sistema rec la frecuencia de recombinación es muy semejante a cuando están presentes los dos sistemas, de los que se deduce, como ya se expresó anteriormente, que la recombinación espontánea del fago depende en mayor grado del gene red que del gene rec.

Es de esperarse que a pesar de que el gene int es otro gene del fago que interviene en la recombinación, la presencia de este gene no afecta nuestros resultados, ya que únicamente participa en la recombinación integrativa (Campbell, 1971).

la recombinación del fago es el resultado de la competencia entre los sistemas *red* y *rec*, los cuales están íntimamente relacionados, es decir, desde el punto de vista general ambos están involucrados en la recombinación inducida, aunque particularmente su especificidad es diferente. Cuando falta uno de los dos el otro puede suplirlo, pero en este caso el sistema presente manifiesta más actividad, por falta de rivalidad, que cuando está acompañado. Lo anterior se hace aparente porque se nota un incremento mayor en la recombinación del fago, cuando está presente un solo sistema de recombinación, independiente de que sea el del fago o el de la bacteria.

Cuando faltan los dos sistemas se observa la hipotética actividad residual de *PrecA*, no obstante las frecuencias de recombinación espontánea e inducida son sumamente bajas, y que además, esta última no aumenta con la dosis.

## VII Conclusiones

- 1.- Como resultado de la actuación de la reparación recombinogénica, la frecuencia de recombinación del fago  $\lambda$  aumenta mientras más se daña su ADN con un agente inactivante como la radiación UV.
- 2.- La recombinación del fago  $\lambda$  es consecuencia de la interacción entre los sistemas red del bacteriófago y rec de la bacteria.
- 3.- Cuando están presentes estos dos sistemas, red lleva a cabo la mayor parte de la recombinación, tanto espontánea como inducida por radiación UV.
- 4.- Aunque el sistema rec es menos eficiente que el red, ambos mecanismos pueden substituirse entre sí.
- 5.- Se propone que el incremento en la recombinación, observado al irradiar únicamente a la bacteria tipo silvestre (caso UVB/ $0\lambda$ ), se debe a una síntesis mayor de proteína recA involucrada en la reparación del ADN.
- 6.- Se postula una cierta actividad residual para la proteína recA en las cepas recA<sup>-</sup>. Dicha actividad explicaría la recombinación inducida al irradiar a la bacteria, cuando el ADN del fago ha sido irradiado o no.

## VIII.- Bibliografía.

- Ames, B.N., W.E. Durston, E. Yamasaki y F.D. Lee. 1973. Carcinogens are mutagens : a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 70, 8 : 2281-2285.
- Ames, B.N., J. McCann y E. Yamasaki. 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian microsome mutagenicity test. Mutat. Res. 31 : 347-364.
- Bagg, A., C.J. Kenyon y G.C. Walker. 1981. Inducibility of a gene product required for UV and chemical mutagenesis in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78, 9 : 5749-5753.
- Benbow, R.M., A.J. Zuccarelli y R.L. Sinsheimer. 1974. A role for single-strand breaks in bacteriophage  $\phi$ X174 genetic recombination. J. Mol. Biol. 88 : 629-651.
- Benbow, R.M., A.J. Zuccarelli y R.L. Sinsheimer. 1975. Recombinant DNA molecules of bacteriophage  $\phi$ X174. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72, 1 : 235-239.
- Bernstein, C. 1981. Deoxyribonucleic acid repair in bacteriophage. Microbiol. Rev. 45, 1 : 72-98.
- Boiteux, S., G. Villani, S. Spadari, F. Zambrano y M. Radman. 1978. Making and correcting errors in DNA synthesis : in vitro studies of mutagenesis. En : DNA repair mechanisms. (P.C. Hanawalt, E.C. Friedberg and C.F. Fox, Eds.). Academic Press. New York. Vol IX. 73-84.
- Boyce, R.P. y P. Howard-Flanders. 1964. Release of ultraviolet light-induced thymine dimers from DNA in *Escherichia coli* K-12. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 51 : 293-300.
- Brent, R. y M. Ptashne. 1981. Mechanism of action of the *lexA* gene product. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78, 7 : 4204-4208.
- Bridges, B.A. 1969. Mechanisms of radiation mutagenesis in cellular and subcellular systems. Ann. Rev. Nucl. Sci. 19 : 139-178.
- Bridges, B.A., R.E. Dennis y R.J. Munson. 1967. Differential induction and repair of ultraviolet damage leading to true reversions and external suppressor mutations of an ochre codon in *Escherichia coli* B/r WP2. Genetics. 57 : 897-908.
- Bridges, B.A. y A. Lehman. 1982. Inducible responses to DNA damage. Nature. 298 : 118-119.
- Bridges, B.A. y R. Mottershead. 1971. RecA - dependent mutagenesis occurring before DNA replication in UV and  $\gamma$ -irradi-

- ated *Escherichia coli*. *Mutat. Res.* 13 : 1-8.
- Caillet-Fauquet, P. y M. Defais. 1972. UV reactivation of phage  $\lambda$  in a *polA* mutant of *E. coli*. *Mutat. Res.* 15 : 353-355.
- Campbell, A. 1971. Genetic structure. En : *The bacteriophage - lambda*. (A.D. Hershey, Ed.). Cold Spring Harbor Laboratory. New York. 13-45.
- Campbell, A.M. 1976. How viruses insert their DNA into the DNA of the host cell. *Sci. Am.* 235, 6 : 102-113.
- Carter, D.M. y C.M. Radding. 1971. The role of exonuclease and  $\beta$  protein of phage  $\lambda$  in genetic recombination. II. Substrate specificity and the mode of action of the  $\lambda$  exonuclease. *J. Biol. Chem.* 246, 8 : 2502-2512.
- Cassuto, E., S.C. West, J. Mursalim, S. Conlon y P. Howard-Flinders. 1980. Initiation of genetic recombination : homologous pairing between duplex DNA molecules promoted by *recA* protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77, 7 : 3962-3966.
- Cerutti, P.A. 1978. Repairable damage in DNA. En : *DNA repair mechanisms*. (P.C. Hanawalt and C.F. Fox, Eds.). Academic Press. New York. Vol IX. 1-14.
- Champoux, J.J. 1977. Renaturation of complementary single-stranded DNA circles : complete rewinding facilitated by the DNA untwisting enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74, 12 : 5328-5332.
- Clark, A.J. y A.D. Margulies. 1965. Isolation and characterization of recombination deficient mutants of *Escherichia coli* K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 53 : 451-459.
- Cooper, P.K. 1982. Characterization of long patch excision repair of DNA in ultraviolet-irradiated *Escherichia coli* : an inducible function under Rec-Lex control. *Molec. Gen. Genet.* 185 : 189-197.
- Cooper, P.K. y P.C. Hanawalt. 1972a. Heterogeneity of patch size in repair replicated DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 67 : 1-10.
- Cooper, P.K. y P.C. Hanawalt. 1972b. Role of DNA polymerase I and the *rec* system in excision repair in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 69 : 1156-1160.
- Cox, M.M. e I.R. Lehman. 1981a. *recA* protein of *Escherichia coli* promotes branch migration, a kinetically distinct phase of DNA strand exchange. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78, 6 : 3433-3437.

- Cox, M.M. e I.R. Lehman. 1981b. Directionality and polarity in recA protein-promoted branch migration. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78, 10 : 6018-6022.
- DasGupta, C. y C.M. Radding. 1982. Polar branch migration promoted by recA protein : effect of mismatched base pairs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79 : 762-766.
- Defais, M., P. Caillet-Fauquet, M.S. Fox y M. Radman. 1976. Induction kinetics of mutagenic DNA repair activity in *E. coli* following ultraviolet irradiation. Molec. Gen. Genet. 148 : 125-130.
- Defais, M., P. Fauquet, M. Radman y M. Errera. 1971. Ultraviolet reactivation and ultraviolet mutagenesis of  $\lambda$  in different genetic systems. Virology. 43 : 495-503.
- Devoret, R., M. Blanco, J. George y M. Radman. 1975. Recovery of phage  $\lambda$  from ultraviolet damage. En : Molecular mechanisms for repair of DNA. (P.C. Hanawalt and R.B. Setlow, Eds.). Plenum Press. New York. Part A. 155-171.
- Dressler, D. y H. Potter. 1982. Molecular mechanisms in genetic recombination. Ann. Rev. Biochem. 51 : 727-761.
- Echols, H. y R. Gingery. 1968. Mutants of bacteriophage  $\lambda$  defective in vegetative genetic recombination. J. Mol. Biol. 34 : 239-249.
- Fisher, M. 1981. DNA supercoiling by DNA gyrase. Nature. 294 : 607-608.
- Fogliano, M. y P.F. Schendel. 1981. Evidence for the inducibility of the uvrB operon. Nature. 289 : 196-198.
- Ganesan, A.K. y P.C. Seawell. 1975. The effect of lexA and recF mutations on post-replication repair and DNA synthesis in *E. coli* K-12. Molec. Gen. Genet. 141 : 189-205.
- Gudas, L.J. y D.W. Mount. 1977. Identification of the recA (tif) gene product of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74, 12 : 5280-5284.
- Hanawalt, P.C., P.K. Cooper, A.K. Ganesan y C.A. Smith. 1979. DNA repair in bacteria and mammalian cells. Ann. Rev. Biochem. 48 : 783-836.
- Haseltine, W.A., L.K. Gordon, C.P. Lindan, R.H. Grafstrom, N.L. Shaper y L. Grossman. 1980. Cleavage of pyrimidine dimers in specific DNA sequences by a pyrimidine dimer DNA-glycosylase.

- se of *M. luteus*. *Nature*. 285 : 634-641.
- Helene, C. 1978. Mechanism and diversity of photoreactivation. En : DNA repair mechanisms. (P.C.Hanawalt, E.C.Friedberg and C.F.Fox, Eds.). Academic Press. New York. Vol IX. 123-128.
- Hershey, A.D. y W.Dove. 1971. Introduction to lambda. En : The bacteriophage lambda. (A.D. Hershey, Ed.). Cold Spring Harbor Laboratory. New York. 3-11.
- Holliday, R. 1964. A mechanism for gene conversion in fungi. *Genet. Res.* 5 : 282-304.
- Holloman, W.K. y C.M.Radding. 1976. Recombination promoted by superhelical DNA and the *recA* gene of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73, 11 : 3910-3914.
- Holloman, W.K., R.Wiegand, C.Hoessli y C.M.Radding. 1975. Uptake of homologous single-stranded fragments by superhelical DNA : a possible mechanism for initiation of genetic recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72, 6 : 2394-2398.
- Howard-Flanders, P. 1981. Inducible repair of DNA. *Sci. Am.* 245, 5 : 56-64.
- Howard-Flanders, P. y R.P. Boyce. 1964. A biochemical pathway in the repair of DNA after UV irradiation that may have steps in common with those of genetic recombination by breakage reunion. *Genetics.* 50 : 256-257.
- Howard-Flanders, P. y R.P. Boyce. 1966. DNA repair and genetic recombination studies on mutants of *Escherichia coli* defective in these processes. *Radiat. Res.* 6 : (suppl) 156-184.
- Howard-Flanders, P., P.F.Lin y E.Bardwell. 1975. Genetic exchanges induced by structural damage in nonreplicating phage  $\lambda$  DNA. En : Molecular mechanisms for repair of DNA. (P.C.Hanawalt and R.B.Setlow, Eds.). Part A. Plenum Press. 275-281.
- Howard-Flanders, P., W.D.Rupp, B.M.Wilkins y R.S.Cole. 1968. DNA replication and recombination after UV irradiation. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 33 : 195-205.
- Howard-Flanders, P. y L.Theriot. 1966. Mutants of *Escherichia coli* K-12 defective in genetic recombination. *Genetics.* 53 : 1137-1150.
- Huisman, O. y R.D'Ari. 1981. An inducible DNA replication-cell division coupling mechanism in *E. coli*. *Nature.* 290, 5009 : 797-799.

- Hutchinson, F. 1978. DNA strand break repair in eukaryotes. En : DNA repair mechanisms. (P.C.Hanawalt, E.C.Friedberg and C. F.Fox, Eds.). Academic Press. New York. 457-463.
- Hutchinson, F. y J.Stein. 1981. Mutagenesis of lambda phage : Weigle mutagenesis is induced by coincident lesions in the double helical DNA of the host cell genome. Molec. Gen. Ge net. 181 : 458-463.
- Iyer, V.N. y W.D.Rupp. 1971. Usefulness of benzoylated naphthoyla ted DEAE-cellulose to distinguish and fractionate double stranded DNA bearing different extents of single-stranded regions. Biochim. Biophys. Acta. 228 : 117-126.
- Kahn, R., R.P.Cunningham, C.DasGupta y C.M.Radding. 1981 Polarity of heteroduplex formation promoted by Escherichia coli recA protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78, 8 : 4786-4790.
- Kellenberger-Gujer, G. y R.A.Weisberg. 1971. Recombination in bacteriophage lambda. I. Exchange of DNA promoted by phage and bacterial recombination mechanisms. En : The bacteriophage lambda. (A.D.Hershey, Ed.). Cold Spring Harbor Laboratory. New York 407-415.
- Kenyon, C.J., R.Brent, M.Ptashne y G.C.Walker. 1982. Regulation of damage-inducible genes in Escherichia coli. J. Mol. Biol. 160 : 445-457.
- Kenyon, C.J. y G.C.Walker. 1980. DNA-damaging agents stimulate gene expression at specific loci in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77, 5 : 2819-2823.
- Kmiec, E. y W.K.Holloman. 1981.  $\beta$  protein of bacteriophage  $\lambda$  promotes renaturation of DNA. J. Biol. Chem. 256, 24 : 12636-12639.
- Kobayashi, I. y H.Ikeda. 1978. On the role of the recA gene product in genetic recombination : an analysis by in vitro packaging of recombinant DNA molecules formed in the absence of protein synthesis. Molec. Gen. Genet. 166, 1 : 25-29.
- Kolodner, R. 1980. Genetic recombination of bacterial plasmid DNA : electron microscopic analysis of in vitro intramolecular recombination. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77, 8 : 4847-4851.
- Lehmann, A.R. 1980. Early steps in excision repair. Nature. 285: 614-615.
- Lin, P.F. y P.Howard-Flanders. 1976. Genetic exchanges caused by ultraviolet photoproducts in phage  $\lambda$  DNA molecules : the role of DNA replication. Molec. Gen. Genet. 146 : 107-115.

- Little, J.B., J. Nove. y R.R. Weichselbaum. 1980. Abnormal sensitivity of diploid skin fibroblasts from a family with Gardner's syndrome to the lethal effects of X-irradiation, ultraviolet light and mitomycin C. *Mutat. Res.* 70 : 241-250.
- Little, J.W. 1967. An exonuclease induced by bacteriophage  $\lambda$ . II. Nature of the enzymatic reaction. *J. Biol. Chem.* 242, 4 : 679-686.
- Little, J.W. y J.E. Harper. 1979. Identification of the *lexA* gene product of *Escherichia coli* K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 12 : 6147-6151.
- Little, J.W., D.W. Mount y C.R. Yanisch-Perron. 1981. Purified *lexA* protein is a repressor of the *recA* and *lexA* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78, 7 : 4199-4203.
- Livneh, Z. e I.R. Lehman. 1982. Recombinational bypass of pyrimidine dimers promoted by the *recA* protein of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79 : 3171-3175.
- Lwoff, A., L. Simonovitch y N. Kjeldgaard. 1950. Induction de la production de bactériophages chez une bactérie lysogène. *Ann. Inst. Pasteur. Paris.* 79 : 815-859.
- Mayr, E. 1977. Populations, species and evolution. An abridgment of animal species and evolution. The Belknap Press of Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts and London, England. 453 pp.
- McCann, J., N.E. Spingarn, J. Kobori y B.N. Ames. 1975. Detection of carcinogens as mutagens : bacterial tester strains with R factor plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72, 3 : 979-983.
- McEntee, K., G.M. Weinstock e I.R. Lehman. 1979. Initiation of general recombination catalized in vitro by the *recA* protein of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 6 : 2615-2619.
- McEntee, K., G.M. Weinstock e I.R. Lehman. 1980. *recA* protein catalized strand assimilation : stimulation by *Escherichia coli* single-stranded DNA-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77, 2 : 857-861.
- Maniatis, M. y M. Ptashne. 1976. A DNA operator-repressor system. *Sci. Am.* 234, 1 : 64-76.
- Matson, S.W. y R.A. Bambara. 1981. Short deoxyribonucleic acid repeat patch length in *Escherichia coli* is determined by the processive mechanism of deoxyribonucleic acid polymerase I. *J. Bacteriol.* 146, 1 : 275-284.

- Meselson, M.S. y C.M. Radding. 1975. A general model for genetic recombination. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73, 11 : 3979-3983.
- Miller, H.I., M. Kirk y H. Echols. 1981. SOS induction and autoregulation of the *himA* gene for site-specific recombination in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78, 11 : 6754-6758.
- Mount, D.W. 1977. A mutant of *Escherichia coli* showing constitutive expression of the lysogenic induction and error-prone DNA repair pathways. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74, 1 : 300-304.
- Mount, D.W., K. Brooks-Low y S.J. Edmiston. 1972. Dominant mutations (*lex*) in *Escherichia coli* K-12 which affect radiation sensitivity and frequency of ultraviolet light induced mutations. J. Bacteriol. 112, 2 : 886-893.
- Muhammed, A. 1966. Studies on some properties of the enzyme that repair DNA of *E. coli*. J. Biol. Chem. 241 : 516.
- Potter, H. y D. Dresler. 1976. On the mechanism of genetic recombination intermediates. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73, 9: 3000-3004.
- Ptashne, M., A.D. Johnson y C.O. Pabo. 1982. A genetic switch in a bacterial virus. Sci. Am. 247, 5 : 106-120.
- Radding, C.M. 1970. The role of exonuclease and  $\beta$  effects of bacteriophage  $\lambda$  in genetic recombination. I. Effects of red mutants on protein structure. J. Mol. Biol. 52 : 491-499.
- Radding, C.M. 1978. Genetic recombination, strand transfer and mismatch repair. Ann. Rev. Biochem. 47 : 847-880.
- Radding, C.M. y D.M. Carter. 1971. The role of exonuclease and  $\beta$  protein of phage  $\lambda$  in genetic recombination. III. Binding to deoxyribonucleic acid. J. Biol. Chem. 246, 8 : 2513-2518.
- Radman, M. 1974. Phenomenology of an inducible mutagenic DNA repair pathway in *Escherichia coli* : SOS repair hypothesis. En : Molecular and environmental aspects of mutagenesis. (L. Prakash. et al., Eds.). 6th Rochester conference on environmental toxicity. Thomas Publ. Springfield, III. 128-142.
- Radman, M. 1975. SOS repair hypothesis : phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis. En : Molecular mechanisms for repair of DNA. (P.C. Hanawalt and R.B. Setlow, Eds.). Part A. Plenum Press. New York. 355-367.

- Radman, M., L. Cordone, D. Krsmanovic-Simic y M. Errera. 1970. complementary action of recombination and excision in the repair of ultraviolet irradiation damage to DNA. *J. Mol. Biol.* 49 : 203-212.
- Radman, M. y R. Devoret 1971. UV-reactivation of bacteriophage  $\lambda$  in excision repair-deficient hosts : independence of red functions and attachment regions. *Virology* 43 : 504-506.
- Radman, M. y M. Errera. 1970. Enhanced efficiency of excision repair of non replicated UV-damage *E. coli* DNA. *Mutat. Res.* 9 : 553-560.
- Radman, M., G. Villani, S. Boiteux, A. R. Kinsella, B. W. Glicman y S. Spadari. 1979. Replication fidelity : mechanisms of mutation avoidance and mutation fixation. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* XLIII : 937-946.
- Roberts, J. W. y C. W. Roberts. 1975. Proteolytic cleavage of bacteriophage lambda repressor in induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72, 1 : 147-151.
- Roberts, J. W., C. W. Roberts y N. L. Craig. 1978. *Escherichia coli* recA gene product inactivates phage  $\lambda$  repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75, 10 : 4714-4718.
- Rosamond, J. 1980. Special sites in genetic recombination. *Nature.* 286 : 202-204.
- Rupp, W. D. y P. Howard-Flanders. 1968. Discontinuities in the DNA synthesized in an excision-defective strain of *Escherichia coli* following ultraviolet irradiation. *J. Mol. Biol.* 31 : 291-304.
- Rupp, W. D., C. E. Wilde III, D. L. Reno y P. Howard-Flanders. 1971. Exchanges between DNA strands in ultraviolet-irradiated *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 61 : 25-44.
- Sancar, A., N. D. Clarke, J. Griswold, W. J. Kennedy y W. D. Rupp. 1981a. Identification of the uvrB gene product. *J. Mol. Biol.* 148 : 63-76.
- Sancar, A., A. M. Hack y W. D. Rupp. 1979. Simple method for identification of plasmid-coded proteins. *J. Bacteriol.* 137, 1 : 692-693.
- Sancar, A., B. M. Kacinski, D. L. Mott y W. D. Rupp. 1981b. Identification of the uvrC gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78, 9 : 5450-5454.
- Sancar, A., C. Stachelek, W. Konigsberg y W. D. Rupp. 1980. Sequences of the recA gene and protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77, 5 : 2611-2615.

- Sancar, A., R.P. Wharton, S. Seltzer, B.M. Kacinski, N.D. Clarke y W. D. Rupp. 1981c. Identification of the *uvrA* gene product. *J. Mol. Biol.* 148 : 45-62.
- Schultz, D.W., J. Swindle y G.R. Smith. 1981. Clustering of mutation inactivating a *chi* recombination hotspot. *J. Mol. Biol.* 146 : 275-286.
- Sedgwick, S.G. 1975. Genetic and kinetic evidence for different types of postreplication repair in *Escherichia coli*. *B. J. Bacteriol.* 123, 1 : 154-161.
- Sedgwick, S.G. 1976. Misrepair of overlapping daughter strand gaps as a possible mechanism for UV induced mutagenesis in *uvr* strains of *Escherichia coli* : a general model for induced mutagenesis by misrepair SOS repair of closely spaced DNA lesions. *Mutat. Res.* 41 : 185-200.
- Sedgwick, S.G. y B.A. Bridges 1974. Requirement for either DNA polymerase I or DNA polymerase III in post-replication repair in excision-proficient *Escherichia coli*. *Nature.* 249: 348-349.
- Sedgwick, S.G. y G.T. Yarranton. 1982. How cells in distress use SOS. *Nature.* 296 : 606-607.
- Seeberg, E. 1978. A DNA-binding activity associated with the *uvrA* protein from *Escherichia coli*. En : DNA repair mechanisms. (P.C. Hanawalt, E.C. Friedberg and C.F. Fox, Eds.). Academic Press. New York. Vol IX. 225-228.
- Seeberg, E. y A.L. Steinum. 1982. Purification and properties of the *uvrA* protein from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79 : 988-992.
- Setlow, J.K. y M.E. Boling. 1965. The resistance of *Micrococcus radiodurans* to ultraviolet radiation. II. Action spectra for killing, delay in DNA synthesis, and thymine dimerization. *Biochim. Biophys. Acta.* 108 : 259-265.
- Setlow, R.B. y W.L. Carrier. 1964. The disappearance of thymine dimers from DNA : an error-correcting mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 51 : 226-231.
- Setlow, R.B. y W.L. Carrier. 1966. Pyrimidine dimers in ultraviolet-irradiated DNA's. *J. Mol. Biol.* 17 : 237-254.
- Shibata, T., R.P. Cunningham, C. DasGupta y C.M. Radding. 1979a. Homologous pairing in genetic recombination : complex of *recA* protein and DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 10 : 5100-5104.
- Shibata, T., R.P. Cunningham y C.M. Radding. 1981a. Homologous pairing in genetic recombination. Purification and charac -

- terization of *Escherichia coli* recA protein. *J. Biol. Chem.* 256, 14 : 7557-7564.
- Shibata, T., C. DasGupta, R.P. Cunningham y C.M. Radding. 1979b. Purified *Escherichia coli* recA protein catalyzes homologous pairing of superhelical DNA and single stranded fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 4 : 1638-1642.
- Shibata, T., C. DasGupta, R.P. Cunningham, J.G.K. Williams, L. Osber y C.M. Radding. 1981b. Homologous pairing in genetic recombination. The pairing reaction catalyzed by *Escherichia coli* recA protein. *J. Biol. Chem.* 256, 14 : 7565-7572.
- Shimizu, K., K. Yamashita y M. Sekiguchi. 1981. Restoration of defective cellular functions by supply of DNA polymerase I to permeable cells of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101, 1 : 15-21.
- Shulman, M.J., L.M. Hallick, H. Echols y E.R. Signer. 1970. Properties of recombination deficient mutants of bacteriophage lambda. *J. Mol. Biol.* 52 : 501-520.
- Signer, E. 1971. General recombination. En : *The bacteriophage lambda*. (A.D. Hershey, Ed.). Cold Spring Harbor Laboratory. New York. 139-174.
- Signer, E.R. y J. Weil. 1968. Recombination in bacteriophage lambda. I. Mutants deficient in general recombination. *J. Mol. Biol.* 34 : 261-271.
- Stahl, F.W. 1979. Genetic recombination. Thinking about it in phage and fungi. W.H. Freeman and Co. San Francisco. 333 pp.
- Stasiak, A., E. DiCapua y T. Koller. 1981. Elongation of duplex DNA by recA protein. *J. Mol. Biol.* 151 : 557-564.
- Sutherland, B.M. 1978. Enzymatic photoreactivation of DNA. En : DNA repair mechanisms. (P.C. Hanawalt, E.C. Friedberg and C. F. Fox, Eds.). Academic Press. New York. Vol IX. 113-121.
- Sutherland, B.M., M.J. Chamberlin y J.C. Sutherland. 1973. Deoxyribonucleic acid photoreactivating enzyme from *Escherichia coli*. Purification and properties. *J. Mol. Biol.* 248, 12 : 4200-4205.
- Tye, B.K., J. Chien, I.R. Lehman, B.K. Duncan y H.R. Warner. 1978. Uracil incorporation : a source of pulse-labeled DNA fragments in the replication of the *Escherichia coli* chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75, 1 : 233-237.
- Van de Putte, P., H. Zwenk y A. Rorsch. 1966. Properties of four mutants of *Escherichia coli* defective in genetic recombina

- tion. *Mutat. Res.* 3, 5 : 381-392.
- Walker, G.D. y P.P. Dobson. 1979. Mutagenesis and repair deficiencies of *Escherichia coli* umuC mutants are suppressed by the plasmid pKM 101. *Molec. Gen. Genet.* 172, 1 : 17-24.
- Watson, J.D. 1974. *Biología molecular del gen*. Fondo educativo interamericano. 619 pp.
- Weigle, J.J. 1953. Induction of mutation in a bacterial virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 39 : 628-636.
- West, S.C., E. Cassuto y P. Howard-Flanders. 1981a. Homologous pairing can occur before DNA strand separation in general genetic recombination. *Nature.* 290 : 29-33.
- West, S.C., E. Cassuto y P. Howard-Flanders. 1981b. recA protein promotes homologous-pairing and strand-exchange reactions between duplex DNA molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78, 4 : 2100-2104.
- West, S.C., E. Cassuto y P. Howard-Flanders. 1981c. Heteroduplex formation by recA protein : polarity of strand exchanges. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78, 10 : 6149-6153.
- West, S.C., E. Cassuto, J. Mursalim y P. Howard-Flanders. 1980. Recognition of duplex DNA containing single-stranded regions by recA protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77, 5 : 2569-2573.
- Witkin, E.M. 1976. Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *Escherichia coli*. *Bacteriol. Rev.* 40, 4 : 869-907.
- Yoakum, G.H. y L. Grossman. 1981. Identification of *E. coli* uvrC protein. *Nature.* 292 : 171-173.
- Youngs, D.A. y K.C. Smith. 1976. The yield and repair of X-ray-induced single-strand breaks in the DNA of *Escherichia coli* K-12 cells. *Radiat. Res.* 68 : 148-154.