

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CAMPUS IZTACALA

"PAPEL DE LA DNA POLIMERASA BETA DE RATA  
EN EL PROCESO DE REPARACIÓN EN DAÑOS  
CAUSADOS POR LUZ ULTRAVIOLETA"

TESIS PROFESIONAL  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
BIÓLOGO  
PRESENTA  
LAURA TERESA GUZMÁN VILLANUEVA



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.

## **DEDICATORIA**

**Este trabajo esta dedicado con todo mi cariño a la memoria de mi hermano.**

**PAUL:**

**Te he extrañado todos los días, tú vas conmigo en cada lugar y en cada momento  
de mi vida.**

**Te amare siempre**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi mamá y mi hermana Mony, quienes siempre han estado conmigo, por todo su cariño, amor y comprensión, gracias por todo. Este logro también es suyo.

A mi sobrino Fabián que es el regalo más valioso que nos enviaron.

A mi papá por darme la vida, a toda mi familia por estar conmigo.

A Alfonso Galicia por todo su cariño y amor. Por estar en estos momentos junto a mí, apoyándome incondicionalmente, por todas tus palabras de aliento, por tu comprensión, y también por tus regaños. Gracias por compartir y apoyarme en la realización de esta meta.

A Margarita Morales y Madeline Rosales por brindarme su cariño y amistad a lo largo de tantos años, por sus palabras de aliento y su sinceridad.

A mis queridas amigas Olga V., Lety J., Paty G., Ruth P., y Pamela R., quienes me enseñaron el verdadero sentido de la amistad. Por todos los momentos felices y tristes compartidos. Por toda la risa, las peleas, los viajes y sobre todo por su apoyo.

A mi mejor amigo Alejandro Ochoa, por su confianza y cariño, porque se que siempre puedo contar contigo.

A mis amigos de la EMI, Román Olmos, Andrés y Rodrigo por su amistad sincera y cariño.

A Alberto Escalante por todos los momentos y los recuerdos agradables que me dejó.

A mis primos Rosy, Octavio, Aída. Nico, Paco, Elia y Fabiola quienes han compartido conmigo los momentos más felices de mi vida y me han apoyado en los más difíciles.

Al Dr. Rogelio Maldonado, Dr. Diego Arenas, Dr. Sergio Vaca, M. en C. Irma Dueñas y al M. en C. Rafael Quintanar, por su apoyo en las revisiones y sugerencias para realizar y mejorar este trabajo.

A mis amigos de la carrera Gerardo Zamora (Maesse), por brindarme tu amistad sincera, a Flor, Damaris, Antonio Estrella (Secre) y a todas las personas que compartieron conmigo esa etapa tan padre.

A mis amigos Francisco Medina, Claudia Martínez y al pequeño David por compartir conmigo su amistad a través de la carrera.

A Vero Vega por su confianza y por todos los momentos compartidos.

A Aarón Rosas Gallegos por tus palabras y el tiempo que dedicaste a nuestra amistad, se que ahora estas bien.

A la familia Galicia por su apoyo, amabilidad y atención, así como su apoyo para la realización de este trabajo.

A Tosky y a chiquita, amigas fieles y compañeras.

A la UNAM y a todos mis profesores que hicieron que disfrutara cada momento de esta maravillosa carrera, muchas gracias.

## ÍNDICE

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	i
ÍNDICE.....	1
ÍNDICE DE FIGURAS.....	2
ÍNDICE DE TABLAS.....	3
ABREVIATURAS.....	4
RESUMEN.....	7
I. INTRODUCCIÓN.....	8
Mecanismos de reparación del daño al DNA.....	10
Reparación por escisión de nucleótidos (NER).....	12
Reparación por escisión de bases (BER).....	13
Características de las DNA polimerasas eucarióticas.....	14
DNA Polimerasa $\alpha$ .....	15
DNA Polimerasa $\delta$ .....	15
DNA polimerasa $\epsilon$ .....	16
DNA Polimerasa $\gamma$ .....	16
DNA Polimerasa $\zeta$ .....	16
DNA Polimerasa $\beta$ .....	17
Arquitectura de Pol $\beta$ .....	17
Cinética de Pol $\beta$ .....	19
Actividad liasa de pol $\beta$ .....	19
Papel fisiológico de las DNA polimerasas de eucariontes en el proceso de replicación del DNA.....	20
Papel fisiológico de las DNA polimerasas de eucariontes en el proceso de reparación de daños al DNA.....	20
II. ANTECEDENTES.....	22
III. JUSTIFICACIÓN.....	25
IV. HIPOTESIS DE TRABAJO.....	26
V. OBJETIVOS.....	27
OBJETIVO GENERAL.....	27
OBJETIVOS PARTICULARES.....	27
VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....	28
Medios de cultivo.....	28
Antibióticos para los medios de cultivo.....	29
Determinación de las curvas de crecimiento de las cepas de Escherichia coli.....	33
Preparación de la suspensión celular para los eventos de irradiación.....	33
Análisis estadísticos.....	34
VII. RESULTADOS.....	36
Curvas de crecimiento en unidades Klett (UK).....	36
Curvas de crecimiento en unidades formadoras de colonias (UFC/mL).....	36
Curvas de sensibilidad a la luz UV.....	41
VIII. DISCUSIÓN.....	48
XI. CONCLUSIONES.....	57
X. LITERATURA CITADA.....	58

## RESUMEN

Debido a la dificultad para obtener células eucariotas deficientes en DNA Polimerasa  $\beta$  (Pol  $\beta$ ) su papel fisiológico aún no se conoce completamente. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad reparadora de Pol  $\beta$  de rata por medio de las cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*) recombinantes WP1, WP6 y JM109 con los plásmidos p $\beta$ 5, p $\beta$ 6, pUC118 y pSC101; para demostrar que esta enzima puede sustituir o reforzar la actividad de Polimerasa I (Pol I) de *E. coli*. Para determinar el efecto de la presencia de Pol  $\beta$  sobre la actividad de reparación en dichas cepas, se realizaron curvas de crecimiento y de resistencia al efecto letal de la luz ultravioleta (UV), bajo condiciones normales y en presencia del inductor IPTG. De estos ensayos se encontró que las cepas que contenían al gen de Pol  $\beta$  (p $\beta$ 5 y p $\beta$ 6) presentaban una resistencia mayor a la luz UV en comparación a las cepas que no lo poseían (pUC118 y pSC101). También se apreció que las cepas portadoras de la actividad completa de Pol I y el gen de Pol  $\beta$  (WP1/p $\beta$ 5, WP1/p $\beta$ 6) aumentaron su índice de supervivencia significativamente con respecto a sus contrapartes, las cuales solo poseen la actividad de Pol I (WP1/pUC118 y WP1/pSC101). Las cepas WP6, carentes de la actividad Pol I, presentaron el porcentaje mas bajo de supervivencia a pesar de la presencia del gen Pol  $\beta$ . La presencia del inductor IPTG no aumento el número de UFC/mL significativamente, y en algunos casos disminuyo el índice de supervivencia de algunas cepas.

Los resultados sugieren que niveles basales de Pol  $\beta$  aumentan la capacidad de reparación y pueden sustituir la actividad reparadora de Pol I, sin embargo el aumento de los niveles de Pol  $\beta$ , están relacionados con aumento en la sensibilidad a la luz UV.

## I. INTRODUCCIÓN

La tolerancia a cierto grado de daño no reparado del DNA es crucial para la supervivencia de la célula, más específicamente, para la funcionalidad sostenida de la maquinaria de replicación en presencia de condiciones genotóxicas y adversas (Wang, 2001).

El DNA celular es sujeto a un ataque continuo por las reacciones propias de la célula y por agentes ambientales. Las consecuencias tóxicas y mutagénicas son reducidas al mínimo por caminos distintos de la reparación, y 130 genes humanos sabidos para esta función. El genoma humano codifica la información para proteger su propia identidad, las enzimas de la reparación del DNA supervisan continuamente cromosomas para corregir los residuos dañados de nucleótidos generados por la exposición a los agentes carcinógenos y a los compuestos citotóxicos. El daño es en parte una consecuencia de agentes ambientales tales como la luz (UV) del sol, el humo del cigarro, así como una proporción muy grande de alteraciones es causada inevitablemente por mutágenos débiles endógenos incluyendo el agua, las especies reactivas del oxígeno y los metabolitos que pueden actuar como agentes alquilantes. La inestabilidad del genoma causado por la gran variedad de factores DNA-perjudiciales sería un gran problema para las células y los organismos sino existiera la reparación del DNA (Wood *et al.*, 2001).

Actualmente sabemos, que cada día se pierden unas 5000 bases púricas (adenina y guanina) del DNA de cada célula humana debido a la destrucción térmica de enlaces N-glucosídicos entre estas bases y la desoxirribosa (despurinación). Análogamente, se estima que la desaminación de citosina a uracilo en el DNA se produce a una velocidad de 100 cambios por genoma y día. Las bases del DNA también están sujetas a cambios debido, por un lado, a la acción de metabolitos reactivos que pueden alterar la capacidad de apareamiento de las bases, y por otro a la acción de luz UV del sol, que favorece la formación de dímeros de ciclobutano-pirimidina y 6-4 fotoproductos (Fig.1).

Cuando estos sistemas permiten que algún daño permanezca suelen aparecer enfermedades como cánceres (Doll y Peto 1981), además se ha observado que la frecuencia de enfermedades genéticas aumenta en individuos portadores de alteraciones en los genes que codifican para proteínas de reparación del daño al DNA (Wang *et al.*, 1992; Aaltonen *et al.*, 1993). Tal como, los individuos que presentan la anomalía

genética *Xeroderma pigmentosum*, quienes son defectuosos en una gran cantidad de procesos de reparación (De Laat *et al.*, 1999; Alberts, 1994).

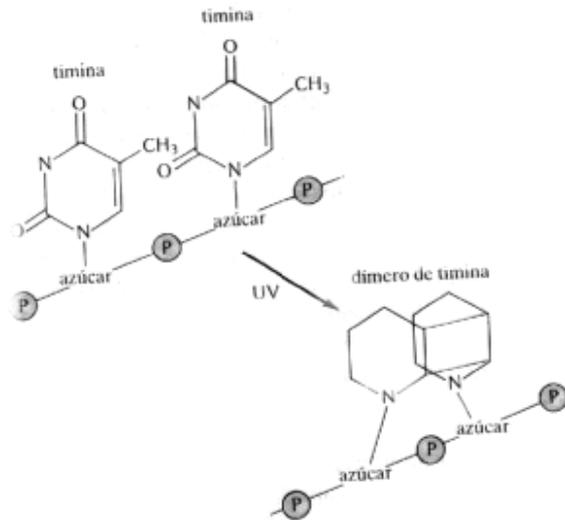


Figura 1. Formación de un dímero de pirimidina por efecto de luz UV

En general cuatro sistemas complejos se han desarrollado para responder al daño del DNA: 1) reparación del daño del DNA; 2) control del punto de comprobación del ciclo celular; 3) apoptosis y 4) tolerancia de daños. La reparación del DNA forma el sistema más eficaz de la defensa contra el daño y abarca por lo menos cinco mecanismos: a) reparación de supresión de bases (BER); b) reparación de supresión de nucleótidos (NER); c) reparación de uniones mal apareadas (mismatch); d) reparación después de la replica (post-replicación) y e) revocación directa del daño. Las lesiones endógenas o espontáneas del DNA son reparadas principalmente por la reparación por escisión de bases (BER), mientras que la reparación por escisión de nucleótidos (NER) es un mecanismo importante para quitar una amplia gama del daño, especialmente las lesiones abultadas del DNA que causan distorsiones estructurales significativas, como son los dímeros de pirimidina. La reparación de uniones mal hechas o mal acopladas corrige bases mal unidas, canceladuras e inserciones pequeñas que resultan de los errores de las polimerasas de replicación del DNA. La reparación en la replicación requiere roturas en la doble cadena y es especialmente importante en la radiación ionizante. La revocación directa del daño es un mecanismo altamente especializado. En el humano actúa la proteína MGMT directamente sobre el grupo metilo (Wang *et al.*, 2001).

En la respuesta al daño del DNA, la progresión del ciclo de la célula en fase S es retrasada por el control del punto de comprobación del ciclo de la célula G1, mientras que la fase M es parada por el punto de comprobación G2. La prolongación de G1 y G2

retrasan a M ó se prolongan para permitir una reparación más eficaz y evitar la síntesis de DNA y mitosis en presencia de un daño excesivo (Wang *et al.*, 2001).

Tanto la reparación del DNA como el control del punto de comprobación del ciclo de la célula promueven la supervivencia genómica y la estabilidad de la célula después del daño. En contraste la apoptosis es un mecanismo que elimina las células con DNA demasiado dañado, protegiendo así la integridad genómica de organismos multicelulares. (Wang, *et al.*, 2001).

### ***Mecanismos de reparación del daño al DNA***

Existen varios sistemas que utiliza la célula para reparar el daño al DNA:

1.- Fotoreactivación. Es específico para los dímeros de pirimidina formados por luz UV. Rompe el dímero y restaura la secuencia de tipo silvestre. (Tessier *et al.*, 2000). Muchos organismos contienen fotoliasas que pueden monomerizar lesiones inducidas por UV tales como los dímeros del tipo ciclobutano de pirimidina y algunos otros fotoproductos. El genoma humano tiene dos CRY genes similares en secuencia a fotoliasas. Estos codifican fotorreceptores para luz azul, involucrados en el ritmo circadiano pero no en la fotoreactivación del DNA dañado; aun no se han detectado genes homólogos a las fotoliasas en el genoma humano (Wood *et al.*, 2001).

2.- La reparación por escisión de nucleótidos (NER) también trabaja con dímeros. Aquí una polimerasa corta en los nucleótidos cercanos al dímero y otras sintetizan y llenan el hueco (Tessier *et al.*, 2000).

3.- Reparación después de la replicación (post-replicación) repara el daño por intercambio de filamentos del otro cromosoma de la hija, implica la recombinación homóloga (Tessier *et al.*, 2000).

4.- La replicación de supresión de bases (BER) permite la identificación y eliminación de bases aberrantes debido a la desaminación de bases normales y también a las modificadas químicamente. (Tessier *et al.*, 2000).

5.- La reparación de uniones mal hechas (mismatch) es un sistema multienzimático que reconoce bases acopladas inadecuadamente en el DNA y sustituye una de las dos bases. El problema principal de este sistema es cómo reconocer cuál de las bases mal unidas es

la correcta y por lo tanto cual suprime; en *E. coli* se usa un sistema específico de metilación. Durante la replica, solamente un filamento (el viejo), se desnaturaliza para poder discriminar los filamentos nuevos y viejos. Entonces el ataque endonucleolítico ocurre en el nuevo filamento no metilado permitiendo el retiro de la base incorrecta así como todo el sitio mutado y el sitio metilado. Los “sitios incompletos” en el filamento nuevo se modifican posteriormente. El error no necesita estar en la vecindad inmediata del sitio de metilación, este sistema permite simplemente la discriminación entre los filamentos viejos y nuevos del DNA (Tessier *et al.*, 2000).

6.- La reparación adaptativa-inducible describe varias actividades de las proteínas que reconocen bases modificadas muy específicas, desnaturalizadas típicamente y transmiten así mismos el grupo modificado del DNA, al hacerlo destruyen su propia función enzimática. Son inducibles pues tienden a ser reguladores negativos de su propia síntesis, así que la exposición a los agentes de modificación induce más síntesis y por lo tanto adaptación (Tessier *et al.*, 2000).

7.- La reparación SOS o error-propenso es inducible por huecos de una sola cadena en presencia de los productos de la degradación del DNA. Este sistema es capaz de replicarse en presencia de dímeros de timina o de sitios apúricos. Por lo tanto causa un espectro muy alto de mutaciones incluyendo duplicaciones y canceladuras. Este sistema es a menudo la causa de mutaciones que siguen a la mutagénesis química o UV. Obviamente este proceso de reparación es un recurso desesperado para la célula, permitiendo la réplica de una región más allá de donde “se ha perdido” la secuencia de tipo silvestre. (Tessier *et al.*, 2000).

### ***Reparación por escisión de nucleótidos (NER)***

NER principalmente remueve errores causados por agentes ambientales. En *E. coli* los tres polipéptidos UvrA, UvrB y UvrC pueden localizar la lesión e incidirla para remover el segmento de nucleótidos que contienen el daño. Eucariotes, incluyendo levaduras y células humanas pueden tener UvrABC homólogos directamente. (Wood *et al.*, 2001).

En NER, un sistema de enzimas hidroliza dos enlaces fosfodiéster, a uno y otro lado de la lesión, para generar un oligonucleótido que contiene la lesión, el cual es eliminado del dúplex y el sitio vacío es llenado por una DNA polimerasa y sellado por una DNA

ligasa para completar la reacción de reparación (Sancar, 1994). El patrón de escisión y el tamaño del fragmento eliminado son diferentes en procariotes y eucariotes. Ambos tipos de organismos hidrolizan el quinto enlace fosfodiéster hacia al lado 3' de la lesión, en cambio en el lado 5', los procariotes hidrolizan el octavo enlace fosfodiéster y los eucariotes hidrolizan el vigésimo cuarto. En general, el patrón de escisión es bastante preciso y como consecuencia el daño es eliminado dentro de oligómeros de 12 a 13 nucleótidos en procariotes y de 27 a 29 nucleótidos en eucariotes. Esta actividad de nucleasa, que es única para la reparación del daño al DNA, se ha denominado nucleasa de escisión (escinucleasa) para diferenciarla de las endonucleasas y exonucleasas que participan en otras funciones de la célula (Sancar, 1994). Por otro lado, se ha sugerido que NER es un mecanismo de reparación acoplado a la transcripción, pues repara preferentemente los genes que se están expresando. Además, NER requiere de factores que normalmente son necesarios para el inicio de la transcripción (Hanawalt, 1994). En los humanos tanto como en *E. coli* la escinucleasa es un sistema capaz de eliminar los productos de la unión de una base con otro compuesto o con otra base. Entre las lesiones que pueden ser corregidas por este sistema de reparación se incluyen los dímeros de pirimidina del tipo ciclobutano los cuales son causa de cánceres de la piel por acción de la luz UV. Otras lesiones que son reparadas por escisión de nucleótidos son la benzo(a)pireno-guanina la cual es producida por el humo del cigarro, la psoralen timina y la cisplatin guanina los cuales se producen por acción de algunos fármacos. No obstante, este no es el único sustrato de la enzima, pues también repara lesiones que no distorsionan la estructura de la hélice del DNA, como la O<sup>6</sup>-metilguanina y otras bases metiladas, elimina incluso a los nucleótidos del DNA que se encuentran apareados incorrectamente (Sancar, 1994).

### ***Reparación por escisión de bases (BER)***

En BER actúan las proteínas de escisión y se reemplazan las bases dañadas del DNA, principalmente aquellas que surgen por oxidación endógena y por estropeos hidrolíticos del DNA. Las DNA glicosilasas inician estos procesos por liberación de la base modificada, esto es seguido por el corte en la cadena de la azúcar-fosfato, la escisión del residuo abasico, la síntesis del DNA local y su ligación. (Wood *et al.*, 2001).

Pol  $\beta$  juega un papel esencial en BER de segmentos largos por conducir el desplazamiento, síntesis de la cadena y además controla el tamaño de escisión de la asa (Dianov *et al.*, 1999).

La mejor forma de reparar y proteger células que tienen una sola base dañada de DNA es a través de este camino. Este mecanismo se inicia por la remoción enzimática de bases alteradas o por hidrólisis química espontánea de los enlaces glicosídicos conectados a las bases dañadas del azúcar-fosfato del esqueleto del DNA. La reparación da como resultados sitios abasicos o sitios apúricos/apirimidínicos. Estudios en extractos celulares han evidenciado dos subrutas en BER que se diferencian por el tamaño del segmento que reparan y las enzimas involucradas (Prassat *et al.*, 2000).

Estas rutas son designadas como “BER de segmentos cortos” (single-nucleotide-BER) repara y llena segmentos de 2-10 nucleótidos. BER de un solo nucleótido es usado cuando se presenta en la secuencia DNA-Uracilo, entonces la enzima uracil-DNA-glicosilasa (UDG) remueve la base enseguida AP endonucleasa (APE) incide el sitio AP. Entonces Pol  $\beta$  llena el segmento de un solo nucleótido y remueve el 5'-azúcar-fosfato (dRP), seguido de DNA ligasa I sellando la mella en el DNA, esta ligasa no actúa hasta que el grupo 5'-dRP es removido. Esta coordinación de la actividad enzimática se requiere para que se complete el proceso de BER (Prasad *et al.*, 2000).

Pol  $\beta$  repara y sintetiza en este proceso, remueve el grupo 5'-azúcar-fosfato por una reacción de catálisis de  $\beta$  eliminación. BER de segmentos largos involucra la síntesis y desplazamiento de la cadena y remoción del segmento generado por endonucleasas específicas. Tres DNA polimerasas humanas (Pol  $\beta$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ ) han sido propuestas para jugar un papel en estos procesos, aunque la identidad de la polimerasa involucrada y los mecanismos de selección no son del todo claros. DNA Pol  $\beta$  incorpora el primer nucleótido durante la reparación de sitios AP y en BER de segmentos grandes (Andrej *et al.*, 2001).

## ***Características de las DNA polimerasas eucarióticas***

Las DNA polimerasas actúan como enzimas “autocorrectoras” que van eliminando sus propios errores de polimerización a medida que avanza por el DNA (Alberts, 1994).

En las células eucarióticas se ha reportado la existencia de seis DNA polimerasas dependientes de DNA, todas están codificadas por distintos genes y se les ha denominado como DNA polimerasas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\zeta$ . A pesar de que todas las pueden participar en la reparación del DNA sólo a  $\beta$  y  $\epsilon$  se les ha asignado ese papel principal (Wang, 1991). Las DNA polimerasas de eucariotes presentan las siguientes características comunes: incorporan dNTP en dirección 5' a 3', requieren de un molde de DNA y de un iniciador con un extremo 3'OH libre, carecen de actividad endonucleolítica y exonucleolítica 5' a 3' y requieren de un catión divalente (Wang, 1991).

Ensayos en eucariotes deficientes en DNA polimerasas demuestran que tienen un rango de error menor de  $10^{-3}$  a  $10^{-6}$  nucleótidos. Diversas polimerasas han sido identificadas con una baja fidelidad en presencia de DNA ileso ( $10^{-2}$ - $10^{-3}$ ), conocer su mecanismo estructural y funcional ayuda a entender los procesos de síntesis del DNA. (Amit *et al.*, 2001).

### ***DNA Polimerasa $\alpha$***

La DNA Polimerasa  $\alpha$  (Pol  $\alpha$ ) es una enzima de peso molecular relativamente elevado de aproximadamente 165 kDa y fue la primera polimerasa identificada en eucariotes. Esta presente en el núcleo, es la única polimerasa eucariótica que presenta un dominio con actividad de iniciasa, carece de actividad editora, exonucleasa 3'-5', aunque se ha reportado que en *Drosophila*, Pol  $\alpha$  si tiene actividad editora. La síntesis de DNA por cada unión es de continuidad intermedia y con alta fidelidad en el copiado de la secuencia de nucleótidos. La interacción de la enzima con el sustrato es con el iniciador y finalmente con el dNTP. Para una mejor interacción de la enzima se requiere de un iniciador de al menos ocho nucleótidos de longitud. Su papel en la replicación del DNA se comprobó por medio de anticuerpos específicos contra Pol  $\alpha$ . Con ellos se demostró que se encuentra en células en replicación activa, tales como los cultivos de células

transformadas y en los linfomas malignos (Wang, 1991), también se ha reportado que sus niveles aumentan cuando las células entran en la fase S del ciclo celular (Schneider *et al.*, 1985). No se ha detectado Pol  $\alpha$  en células no proliferativas. Se le ha encontrado fosforilada a través de todo el ciclo celular pero en la fase de mitosis está altamente fosforilada, en esta última forma presenta baja afinidad por DNA de una sola cadena, lo cual sugiere que la fosforilación es un mecanismo para evitar la interacción de la enzima con el DNA al terminar la replicación. Por los datos anteriores se ha sugerido que esta enzima es la principal polimerasa involucrada en la replicación del DNA (Wang, 1991).

### ***DNA Polimerasa $\delta$***

Es una proteína de aproximadamente de 124 kDa que se encuentra también en el núcleo, presenta una alta fidelidad, introduce menos de 1 base errónea por cada  $10^6$  nucleótidos incorporados, lo cual es aproximadamente 10 veces y 500 veces mayor que la fidelidad de Pol  $\alpha$  y Pol  $\beta$ , respectivamente (Kunkel *et al.*, 1987). Esta alta fidelidad se debe a que tiene actividad editora, exonucleasa 3' a 5' (Byrnes *et al.*, 1976), la cual está en el mismo polipéptido que presenta la actividad de polimerasa. La continuidad durante la síntesis es baja pero, a diferencia de las otras polimerasas eucarióticas, la continuidad es afectada por el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA), el cual incrementa la continuidad en la síntesis de DNA. Se ha encontrado que Pol  $\delta$  es muy similar a Pol  $\alpha$  pero no se ha detectado que Pol  $\delta$  tenga actividad de iniciasa (Wang, 1991).

### ***DNA polimerasa $\epsilon$***

Tiene un peso molecular de 255 kDa, se localiza en el núcleo, tiene alta fidelidad pues posee actividad exonucleolítica 3' a 5', además presenta una alta continuidad de síntesis la cual no es afectada por la presencia de PCNA. Se ha visto que Pol  $\epsilon$  es esencial para las células en crecimiento durante la fase S (Wang, 1991).

### ***DNA Polimerasa $\gamma$***

Es una proteína de aproximadamente 140 kDa, está presente en la mitocondria aunque es codificada por el núcleo, tiene una alta continuidad y fidelidad de síntesis, su fidelidad la debe a su actividad de exonucleasa 3' a 5', la cual reside en el mismo polipéptido (Wang, 1991). Es inhibida por cardiolipina, lo cual es interesante, ya que la cardiolipina se localiza en la membrana interna de la mitocondria (Yoshida *et al.*, 1989).

### ***DNA Polimerasa $\zeta$***

Esta polimerasa fue identificada al precipitar conjuntamente con Pol  $\alpha$ . Presenta actividad exonucleolítica 3' a 5' discontinua, incide preferentemente a las bases mal incorporadas, por cada incisión incorpora de 1 a 3 nucleótidos. La síntesis de DNA realizada por esta enzima es de manera discontinua y no es afectada por el PCNA. En *Saccharomyces cerevisiae*, Pol  $\zeta$  está formada por dos subunidades, las proteínas Rev3 y Rev7 que corresponden a pesos moleculares de 173 kDa y 29 kDa respectivamente (Bialek y Grosse, 1993).

### ***DNA Polimerasa $\beta$***

Pol  $\beta$  de mamífero es una enzima de una sola cadena polipeptídica de 39 kDa, interviene en BER (Idriss *et al.*, 2002) y otros procesos metabólicos del DNA, involucrada en el llenado de segmentos en la síntesis del DNA (Clairmont y Sweasy 1996, Sobol *et al.*, 1996; Wang, 1991). Carece de actividades accesorias tales como, 3' o 5' exonucleasa, endonucleasa, recambio de dNMP o pirofosforolisis (Bear y Wilson, 1995). Presenta una baja continuidad de síntesis, la cual depende del catión que este presente en la reacción, ya que utilizando  $Mn^{2+}$  llega a ser cinco veces más alta que cuando se usa  $Mg^{2+}$  (Fisher *et al.*, 1977; Wang y Korn, 1980).

Presenta baja afinidad por el DNA de cadena sencilla y por DNA de doble cadena intacta, pero gran afinidad por DNA con mellas, es decir, espacios de cadena sencilla flanqueados por extremos de doble cadena con residuos 3'OH o 3'PO. La enzima puede

sintetizar al mismo tiempo que desplaza a una de las cadenas de DNA, o puede incorporar sólo un nucleótido en el extremo 3'OH abásico producido por las AP endonucleasas. Pol  $\beta$  es un gen que se expresa constitutivamente en las células de mamíferos, sin embargo su expresión es tejido específica ya que los niveles de la enzima varían de un tejido a otro (Nowak *et al.*, 1989).

### ***Arquitectura de Pol $\beta$***

Pol  $\beta$  (Fig. 2), esta constituida por dos dominios (335 residuos): el dominio de N-terminal de 8 kDa y el dominio C-terminal de 31 kDa. El último es como una mano con el pulgar, los dedos y el subdominio de la palma que es una característica común compartida por todas las polimerasas (Kungland, 2001).

La palma cataliza la transferencia del grupo fosforil, el subdominio del pulgar controla interacciones con el trifosfato entrante del nucleósido y la base correspondiente de la plantilla. Los dedos pueden desempeñar un papel dominante en la colocación del DNA que ayudan al desplazamiento de la enzima (Kungland, 2001).

Esta enzima es una de las polimerasas eucarióticas más pequeñas, juega un papel importante en varios procesos biológicos. La delección del gen Pol  $\beta$  produce letalidad embrionaria en ratones debido a la apoptosis de neuronas post-mitóticas. Esto indica que Pol  $\beta$  es necesaria para el neurodesarrollo además es bien documentado que participa en BER. Esta enzima remueve bases dañadas durante el mecanismo de BER; aunque también interviene en NER. Durante la meiosis Pol  $\beta$  se localiza en el complejo sinaptonemal en la primera profase. (Amit *et al.*, 2001).

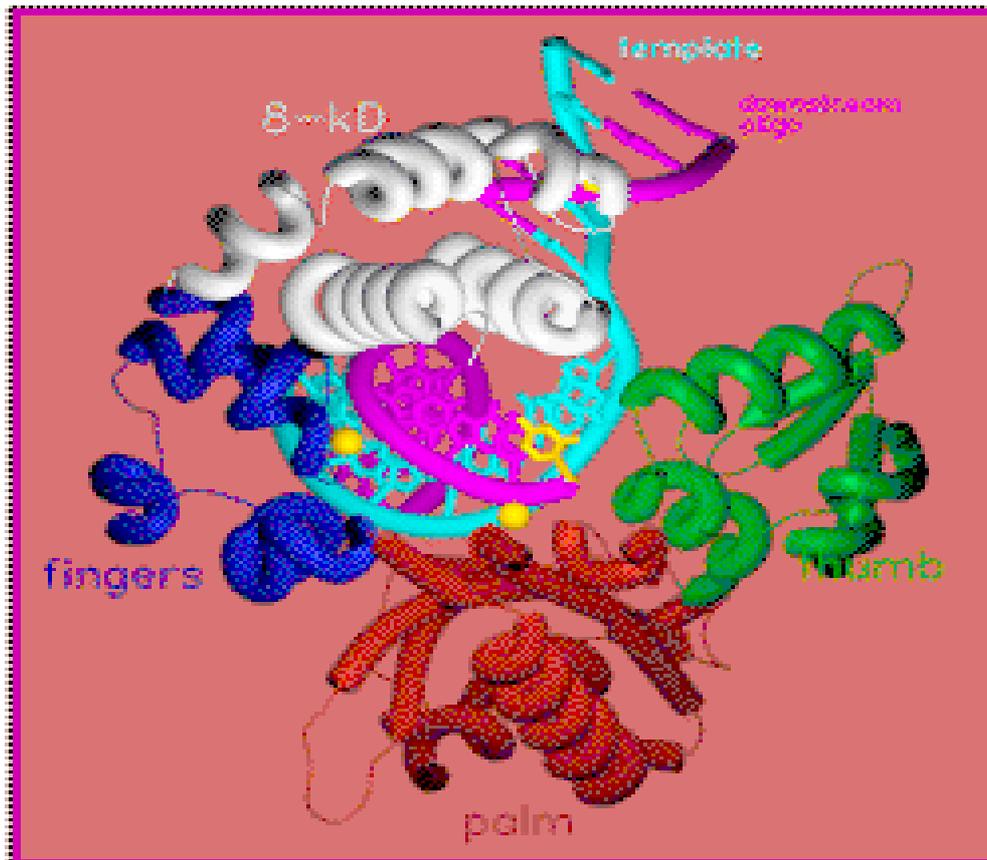


Figura 2. Representación de la DNA Polimerasa  $\beta$ . Se muestra un modelo de la DNA Polimerasa  $\beta$  unida a su sustrato, así como los dominios que la integran. El sustrato es un DNA que presenta el extremo 3'OH y uno  $\text{PO}_4$ . Obsérvese como el DNA descansa en el dominio de la palma, y el dominio de 8 kDa se une al extremo 5'  $\text{PO}_4$  (Sawaya *et al.*, 1997).

### ***Cinética de Pol $\beta$***

Pol  $\beta$  provee un modelo natural para relacionar la estructura y la fidelidad de síntesis del DNA. Su escasez de proteínas accesorias, así como la falta de actividad exonucleasa, proveen un sistema ideal para examinar con exactitud la síntesis del DNA. Estas propiedades han facilitado la caracterización cinética del tipo silvestre (WT $\beta$ ) permitiendo describir su actividad de polimerasa (Amit *et al.*, 2001). La cinética que presenta es de orden bi-bi, la cual es rigurosamente ordenada y secuencial (Nowak *et al.*, 1989). Primero Pol  $\beta$  se une al sustrato DNA, enseguida se une al desoxirribosa trifosfato (dNTP). Después de la formación del complejo ternario Pol  $\beta$ , DNA y dNTP, ocurre un cambio conformacional para comenzar la síntesis de una secuencia inicial del DNA. Al finalizar la formación del enlace fosfodiéster, el pirofosfato es liberado y Pol  $\beta$  es disociado del sustrato DNA. Los cambios estructurales contribuyen al decremento de la fidelidad de la enzima. (Amit *et al.*, 2001). Por lo cual la actividad editora es baja, esto sugiere que tiene poca fidelidad en el copiado de las secuencias de DNA, sin embargo, puede aumentar debido a que la forma de la molécula se ajusta en función a la base presente en la cadena molde (Amit *et al.*, 2001; Sawaya *et al.*, 1997).

### ***Actividad liasa de pol $\beta$***

La actividad liasa de esta proteína de reparación protege del daño al DNA inducido por citotoxicidad. Pequeñas lesiones tales como la oxidación y bases alquilantes son reparadas por BER, este mecanismo incluye la remoción de la base dañada por una lesión específica de la DNA glicosilasa, la escisión de la cadena por endonucleasas apúricas o apirimidínicas, la resíntesis del DNA y su ligación. BER puede ser subdividido en DNA Polimerasa  $\beta$ -dependiente o  $\beta$ -independiente de segmentos largos (Sobol *et al.*, 2000), donde el dominio grande de la polimerasa tiene actividad nucleotidil-transferasa. Este dominio tiene una organización modular con subdominios que se unen al dúplex del DNA, metales catalíticos y al nucleósido trifosfato correcto (Bear y Wilson, 2000). Dos importantes pasos enzimáticos en BER de mamíferos son la actividad liasa y la remoción de dRP. Estudios con fibroblastos de ratón carentes de Pol  $\beta$  muestran que se aumenta la sensibilidad a agentes alquilantes así como el daño

cromosomal, apoptosis y la muerte celular por necrosis, esto indica que la actividad liasa en la remoción de dRP es un paso primordial en BER *in vivo* (Sobol *et al.*, 2000).

### ***Papel fisiológico de las DNA polimerasas de eucariontes en el proceso de replicación del DNA***

A diferencia de la replicación del DNA en procariotes, en eucariotes se requiere más de una DNA polimerasa para la replicación del DNA. Se ha propuesto que la DNA polimerasa  $\delta$  participa en la síntesis de la cadena líder y la DNA polimerasa  $\alpha$  participa en el inicio y en la síntesis de la cadena rezagada (Downey *et al.*, 1990). Sin embargo, también se ha propuesto que la DNA polimerasa  $\alpha$  participa solo como una DNA polimerasa de inicio debido a que es la única que presenta actividad de iniciasa, en cuyo caso se sugiere que las DNA Polimerasas  $\epsilon$  y  $\delta$  participan en la síntesis de las cadenas líder y rezagada respectivamente. Lo anterior se basa en que Pol  $\epsilon$  además de mostrar alta continuidad de síntesis es esencial durante la fase S del ciclo celular y, en que Pol  $\delta$  incrementa su continuidad en presencia de PCNA. Por otra parte, se considera que la DNA polimerasa  $\gamma$  replica al DNA mitocondrial (Weissbach, 1979; Zimmermman *et al.*, 1980). La DNA polimerasa  $\zeta$  participa en la replicación del DNA que contiene lesiones, pasando sobre ellas. Pol  $\zeta$  es más eficiente en la replicación de DNA que contiene dímeros de timina, que Pol  $\alpha$ , y es menos propensa a insertar nucleótidos incorrectos (Lawrence y Hinkle, 1996).

### ***Papel fisiológico de las DNA polimerasas de eucariontes en el proceso de reparación de daños al DNA.***

Estudios realizados con los inhibidores afidilcolina, didesoxitimidina trifosfato (dTTP) y butil fenil-dGTP indican que algunas DNA polimerasas participan en la reparación del daño al DNA nuclear. Es probable que Pol  $\epsilon$  este involucrada, puesto que se requiere en la reparación de lesiones inducidas por UV en células HeLa (Nishida *et al.*, 1988). Otra de las DNA polimerasas que se sugiere participa en la reparación es la DNA polimerasa  $\delta$  (Dresler y Frattini, 1986). Así también se ha observado que Pol  $\delta$  y Pol  $\epsilon$

participan en la reparación de lesiones en el mecanismo de escisión de tipo BER con alargamiento (Wood y Shivji, 1997).

La DNA Pol  $\beta$  se ha considerado como la principal en el proceso de reparación del daño al DNA, varios estudios *in vitro* y algunos *in vivo* sugieren que participa principalmente en BER (Clairmont y Sweasy, 1996; Sobol, *et al* ,1996).

Con respecto a la reparación del DNA mitocondrial, recientemente se ha identificado una DNA polimerasa en la mitocondria de *Crithidia fasciculata*, la cual presenta características similares a Pol  $\beta$ , es propensa a cometer errores durante la síntesis de DNA y contiene 33% de similitud a nivel de aminoácidos con Pol  $\beta$ , por lo que se ha sugerido que su función es la de reparar los huecos en la replicación de los cinetoplastos, los cuales son mini-círculos de DNA mitocondrial que presenta este parásito (Torri y Englund, 1995).

## II. ANTECEDENTES

El primer descubrimiento acerca del proceso de reparación lo describió Kelner (1949), el encontró que la luz blanca protege a los microorganismos de los defectos letales de la radiación UV, (Klug *op cit.*, 1992). Rupert (1958), demostró que tal fenómeno, llamado fotorreactivación es catalizado por una enzima llamada DNA fotoliasa. Esta enzima revierte la principal de las lesiones causadas por efecto de la luz UV que son los dímeros de pirimidina, y su modo de acción es mediante la conversión de energía luminosa a energía química. Kornberg *et al.*, (1957) hizo la primera publicación sobre la enzimología de la replicación del DNA. Estos investigadores aislaron una enzima de *E. coli* que podía dirigir la síntesis de DNA en un sistema exento de células (*in vitro*), actualmente esta enzima recibe el nombre de DNA Polimerasa I ya que fue la primera en aislarse, (Klug *op cit.*, 1992). Boyce *et al.*, (1964), descubrieron un mecanismo que implicaba la remoción enzimática de bases alteradas seguidas de su reemplazo por bases correctas, (Salamanca *op cit.*, 1993). DeLucia y Cairns (1969) publicaron el descubrimiento de una cepa de *E. coli* que era deficiente para la actividad de la DNA Polimerasa I. En la ausencia de la enzima funcional, esta cepa mutante de *E. coli* podía duplicar su DNA y se reproducía con éxito. Otras características de la mutación condujeron a concluir que, en ausencia de DNA Polimerasa I estas células eran muy deficientes en su habilidad de “reparar” el DNA. La cepa mutante era muy sensible a luz UV y a la radiación; las bacterias no mutantes pueden reparar una gran cantidad del daño inducido con UV.

El conocimiento acerca de las polimerasas de origen eucariótico ha sido enriquecido en gran medida en los últimos años. Se han realizado una serie de experimentos destinados a la caracterización de tales polimerasas y analizar las analogías entre estas y las de origen procariótico. Pol  $\beta$ , de origen eucariótico, fue inicialmente identificada como una polimerasa de bajo peso molecular encontrada en los núcleos de células HeLa, en hepatocitos y en timo de ternera, de numerosos organismos. Desde los metazoarios inferiores hasta los mamíferos, pero no así en células embrionarias de insectos. Además la presencia constitutiva de Pol  $\beta$  sugiere que tiene una función permanente en el metabolismo celular del DNA y también que es una enzima esencial para sobrevivir (Chang, 1976; Chang, 1982).

Posteriormente Fisher *et al.*, (1977), Wang y Korn (1980) comprobaron que la DNA polimerasa presenta una baja continuidad de síntesis, la cual depende del catión que este presente en la reacción. Wang (1980) sugiere que Pol  $\beta$  esta involucrada en algún tipo de reparación del DNA, principalmente durante la síntesis del DNA y en la incorporación de bases que faltan debido al proceso de reparación por escisión. Spadari *et al.*, (1982) estudiando inhibidores específicos contra Pol  $\alpha$ , demuestra que Pol  $\beta$  participa en la reparación del DNA y no en la síntesis. Nowak *et al.*, (1989) comprueban que la DNA polimerasa  $\beta$  es un gen que se expresa constitutivamente en las células de mamíferos, sin embargo su expresión es tejido específica ya que los niveles de la enzima varían de un tejido a otro y considera la posibilidad de que participe en la regulación específica de la transcripción de genes en los tejidos y en los eventos de recombinación que tienen lugar durante la maduración de espermatozoides.

Sancar (1985), describe el uso de *E. coli* como un instrumento para estudiar genes de reparación del DNA en eucariotes. El clono en un vector de expresión un fragmento de la enzima fotoliasa de *Saccharomyces cerevisiae* y lo expreso en *E. coli* deficiente de esta enzima. Esta fue la primera vez que se utilizo la complementación de una enzima para estudiar genes de reparación en *E. coli*. Desde entonces varios genes más fueron clonados y expresados en mutantes de *E. coli* con fenotipos sensitivos para estudiar las diferencias y similitudes entre los sistemas de reparación de procariotes y eucariotes.

Downey *et al.* (1990); Wiebauer (1990) y Dianov (1992). estudiando el proceso de las polimerasas sugieren que estas podrían participar en funciones adicionales del metabolismo del DNA tales como la reparación o en la recombinación del DNA. Swesy y Loeb (1992 y 1993) probaron que Pol  $\beta$  puede sustituir a la DNA Pol I en el proceso de replicación del DNA, y en el proceso de reparación en daños al DNA inducidos por agentes alquilantes. Escamilla *et al.*, (1998 y 2002) estudio el efecto que tenia la presencia de pol  $\beta$  en cepas recombinantes de *E. coli* al ser expuestas al efecto letal de la luz UV sugiriendo que pol  $\beta$  puede participar *in vivo* en procesos de reparación del DNA

Clairmont y Sweasy (1996) y Sobol *et al.*, (1996) realizaron varios estudios *in vitro* y algunos *in vivo* sugiriendo que Pol  $\beta$ , al igual que Pol  $\delta$  participan principalmente en BER, y que además, según Wood y Shivji (1997) participa en la eliminación de muchas bases modificadas y sitios abásicos. Dianov *et al.*, (1999) sugieren que Pol  $\beta$  juega un

papel esencial en BER de segmentos largos por conducir el desplazamiento, síntesis de la cadena y además controla el tamaño de escisión. Prasad *et al.*, (2000) encuentra que Pol  $\beta$  llena segmentos y remueve al grupo dRP durante el mismo proceso. Andrej *et al.*, (2001) e Idriss (2002), en sus trabajos concuerdan que Pol  $\beta$  incorpora el primer nucleótido durante la reparación de sitios AP y BER de segmentos largos.



### III. JUSTIFICACIÓN

Varios genes de eucariotes han sido clonados en líneas mutantes de *E. coli* para examinar las similitudes y diferencias de los sistemas de reparación entre bacterias y eucariotes.

La gran mayoría de los trabajos realizados para dilucidar las funciones y estructuras de las DNA polimerasas en eucariotes, han estado basadas en técnicas de inhibición *in vitro*, pero para estudiar la DNA polimerasa  $\beta$  se carece de inhibidores específicos, de manera que no se conoce con certeza el papel fisiológico de dicha enzima.

La clonación de Pol  $\beta$  en *E. coli* ha facilitado su estudio, desde entonces llamó la atención la similitud que tiene con la Pol I de *E. coli*, ya que Pol I participa en la reparación del DNA de esta bacteria, de manera que se han desarrollado estudios para investigar si Pol  $\beta$  puede sustituir o reforzar la actividad de Pol I. Existe el antecedente de Swesy y Loeb, 1992, de que Pol  $\beta$  de mamíferos puede sustituir a la DNA Pol I en el proceso de replicación del DNA. Por otra parte, Escamilla (1998) y Escamilla *et al.*, (2002) demostraron, utilizando algunas cepas isogénicas, que Pol  $\beta$  puede participar en los mecanismos de reparación de daño al DNA en *E. coli*.

.El presente trabajo estudio el efecto que tenía la presencia de Pol  $\beta$  utilizando cepas isogénicas de *E. coli*, una de las cuales transporta el gen normal de Pol I y otra contiene una forma inactiva de éste gen (Pol A<sup>-</sup>), realizando de curvas de crecimiento, curvas de sensibilidad a luz UV, en condiciones normales y bajo inducción de IPTG; con lo cual se pretende determinar si Pol  $\beta$  puede sustituir o reforzar la actividad de reparación de Pol I.

#### **IV. HIPOTESIS DE TRABAJO**

Sabiendo que la DNA Pol I de *E. coli* y la DNA Pol  $\beta$  de rata son enzimas que participan en los mecanismos de reparación al daño del DNA y que además DNA Pol  $\beta$  puede sustituir a Pol I en el proceso de replicación, entonces en el presente trabajo se estudio el efecto que tenia la presencia de Pol  $\beta$  en cepas rcombinantes al ser expuestas al efecto letal de la luz UV.

Si DNA Pol I y DNA Pol  $\beta$  participan en mecanismos de reparación entonces la actividad de ambas, reforzara la acción de reparación en daños al DNA inducidos por luz UV.

En cepas carentes de actividad Pol I, DNA Pol  $\beta$  podrá sustituir la actividad de Pol I aumentando el índice de supervivencia en lesiones ocasionadas por luz UV.

## **V. OBJETIVOS**

### ***OBJETIVO GENERAL***

- Evaluar el papel de la DNA Polimerasa  $\beta$  de rata en el proceso de reparación de daños al DNA ocasionados por luz UV.

### ***OBJETIVOS PARTICULARES***

- Evaluar la actividad reparadora en células de *E. coli* JM109, WP1 y WP6 transformadas con los plásmidos pSC101, pUC118, p $\beta$ 5 y p $\beta$ 6.
- Realizar curvas de crecimiento de las cepas de *E. coli* transformadas en medio de cultivo normal y en medio complementado con el inductor IPTG.
- Determinar el punto medio de la fase logarítmica de la curva de crecimiento en todas las cepas.
- Medir la sensibilidad a la luz UV en todas las construcciones en medio de cultivo normal y en presencia del inductor IPTG.
- Establecer si la DNA polimerasa  $\beta$  de rata es capaz de sustituir o reforzar la actividad de reparación de la DNA Polimerasa I, en el daño letal causado por la luz UV.
- Evaluar la actividad reparadora de Pol  $\beta$  en células de *E. coli* carentes de Pol I.

## VI. MATERIAL Y MÉTODOS

Primero se describen las cepas bacterianas que fueron empleadas en este trabajo (Tabla 1). El plásmido pUC118 fue donado por el Dr. Joachim Messing (Waksman Institute). El plásmido que contiene el gen de la DNA polimerasa  $\beta$  de rata (pUC118/p $\beta$ 5) fue obtenido del cepario del laboratorio del Dr. K. L. Beattie. El plásmido pSC101 fue donado por el laboratorio de Ingeniería genética de la ENCB; el plásmido que contiene el gen Pol  $\beta$ , presente en la recombinante WP6/p $\beta$ 6 fue construido en el laboratorio de Tecnología del DNA del IPN (Escamilla, 1995) y denominado p $\beta$ 6, los mapas genéticos de éstos vectores se muestran en las figuras 3-6.

Todas las construcciones de las células transformantes, obtenidas de las combinaciones de las cepas de *E. coli* JM109, WP1 y WP6 con los plásmidos pSC101, pUC118, p $\beta$ 5 y p $\beta$ 6 fueron realizadas en trabajos anteriores por Hernández, 1994; Escamilla, 1995 y Escamilla, 1998.

### *Medios de cultivo.*

El crecimiento de la bacteria se realiza en el medio YT, el cual contiene 8 g de bactotripton, 5 g de extracto de levadura y 5 g de NaCl disueltos en 1 L de agua destilada. Se esteriliza durante 15 min. a 15 libras por  $\text{pg}^2$  de presión. El medio sólido para placas se prepara adicionando agar al 1.75% y se esteriliza bajo las mismas condiciones, luego se deja enfriar hasta 50°C y se vacían 20 mL en cada placa. Para las placas con ampicilina se adiciona el antibiótico al medio a una concentración final de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y las que llevan tetraciclina a una concentración final de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

### *Antibióticos para los medios de cultivo.*

Ampicilina 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Se pesaron 250 mg de ampicilina y se disolvieron en 5 mL de agua. La solución se esterilizó por filtración usando una membrana con poro de 0.22  $\mu\text{m}$ , se repartió en alícuotas de 1 mL y se almacenaron a -20°C.

Tetraciclina 5 µg/mL. La solución se preparó con alcohol al 96%, se esterilizó por filtración utilizando una membrana con poro de 0.22 µm, se repartió en alícuotas de 1 mL y se almacenaron a -20°C.

**Tabla 1. Cepas de *E. coli* empleadas.**

<b>CEPA</b>	<b>GENOTIPO O FENOTIPO</b>	<b>FUENTE O REFERENCIA</b>
<b>JM109</b>	RecA1, <i>supE44</i> , <i>endA1</i> , <i>hsd</i> R17, <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> , Δ( <i>lac-pro AB</i> ), F' <i>[traD36, proAB+, lacI<sup>q</sup>, lacZ, ΔM15]</i>	Donada por el Dr. K. L. Beattie
<b>JM109/pUC118</b>	RecA1, <i>supE44</i> , <i>endA1</i> , <i>hsd</i> R17, <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> , Δ( <i>lac-pro AB</i> ), F' <i>[traD36, proAB+, lacI<sup>q</sup>, lacZ, ΔM15]</i> , <i>Amp<sup>r</sup></i> con el fagémid o pUC118	Escamilla, 1998
<b>JM109/pSC101</b>	RecA1, <i>supE44</i> , <i>endA1</i> , <i>hsd</i> R17, <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> , Δ( <i>lac-pro AB</i> ), F' <i>[traD36, proAB+, lacI<sup>q</sup>, lacZ, ΔM15]</i> <i>Amp<sup>r</sup></i> , con el fagémido pSC101	Escamilla, 1998
<b>JM109/pβ5</b>	RecA1, <i>supE44</i> , <i>endA1</i> , <i>hsd</i> R17, <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> , Δ( <i>lac-pro AB</i> ), F' <i>[traD36, proAB+, lacI<sup>q</sup>, lacZ, ΔM15]</i> , <i>Amp<sup>r</sup></i> , pUC118/pβ5, cepa donadora del gen de pol β de rata	Donada por el Dr. K. L. Beattie
<b>JM109/pβ6</b>	RecA1, <i>supE44</i> , <i>endA1</i> , <i>hsd</i> R17, <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> , Δ( <i>lac-pro AB</i> ), F' <i>[traD36, proAB+, lacI<sup>q</sup>, lacZ, ΔM15]</i> con el gen de pol β de rata	Escamilla, 1998

**Tabla 1. Cepas de *E. coli* empleadas (continuación).**

<b>WP1</b>	<i>lon1</i> , SulA1, malB+, trpE65 con actividad normal de DNA polimerasa I.	Donada por el Dr. K. L. Beattie
<b>WP1/pUC118</b>	<i>lon1</i> , SulA1, malB+, trpE65, <i>Amp<sup>r</sup></i> con el fagémido pUC118	Escamilla, 1998
<b>WP1/pSC101</b>	<i>lon1</i> , SulA1, malB+, trpE65 con el fagémido pSC101	Escamilla, 1998
<b>WP1/pβ5</b>	<i>lon1</i> , SulA1, malB+, trpE65, <i>Amp<sup>r</sup></i> , pUC118/pβ5, F', pUC118/pβ5	Hernández, 1994
<b>WP1/pβ6</b>	<i>lon1</i> , SulA1, malB+, trpE65, <i>Amp<sup>r</sup></i> lleva el gen pol β	Escamilla, 1998
<b>WP6</b>	<i>lon1</i> , SulA1, malB+, trpE65, pol A1, con deficiencia en actividad de DNA polimerasa I.	Caracterizada por la Dra. Witkin y donada por el Dr. K. L. Beattie
<b>WP6/pUC118</b>	<i>lon1</i> , SulA1, malB+, trpE65, con deficiencia en actividad DNA pol I con el fagémido pUC118	Escamilla, 1998
<b>WP6/pSC101</b>	<i>lon1</i> , SulA1, malB+, trpE65, <i>Amp<sup>r</sup></i> con deficiencia en actividad DNA pol I, con el fagémido pSC101	Escamilla, 1998
<b>WP6/pβ6</b>	<i>lon1</i> , SulA1, malB+, trpE65, <i>Amp<sup>r</sup></i> con deficiencia en actividad DNA pol I, no tiene el factor F' y contiene pol β	Escamilla, 1995
<b>WP6/pβ5</b>	<i>lon1</i> , SulA1, malB+, trpE65, con deficiencia en actividad DNA pol I con el fagémido pUC118, <i>amp<sup>r</sup></i> lleva el gen pol β	Escamilla, 1998

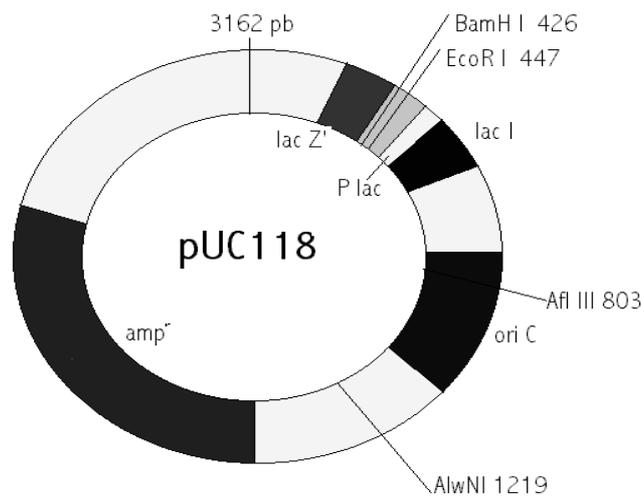


Figura 3. Vector pUC118; *lacZ'* (fragmento amino terminal del producto del gen de *lacZ*) esta bajo el control de  $P_{lac}$  y presenta  $\alpha$  complementación con la cepa JM109.

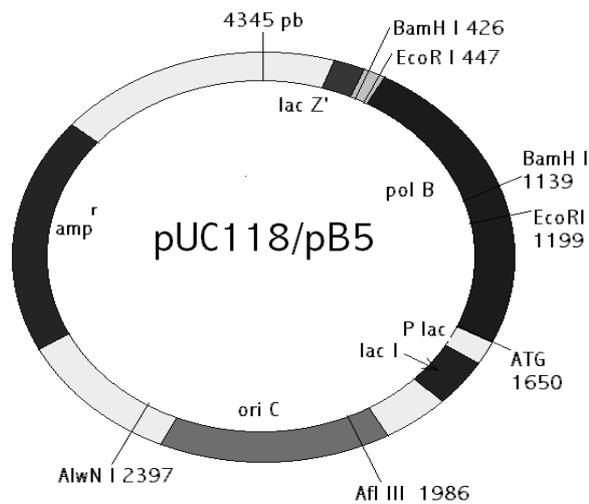


Figura 4. Mapa genético del vector pUC118/p $\beta 5$ , contiene el gen de pol  $\beta$  y, debido a la incorporación de éste gen, *lacZ'* ya no se expresa, se indica el codón de inicio de pol  $\beta$  y el inserto que lo contiene abarcando una región de aproximadamente 1213 pb.

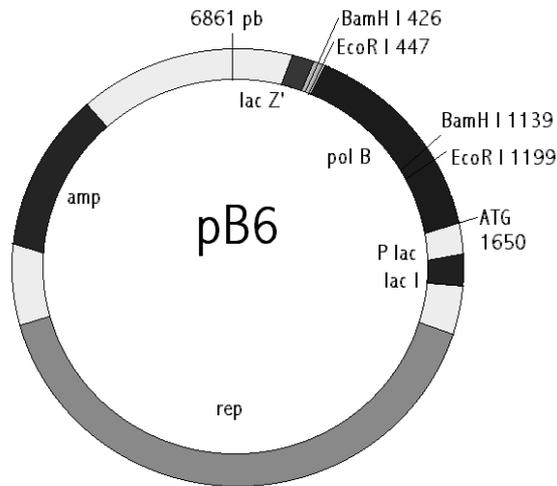


Figura 5. Mapa genético del vector pβ6, derivado de pUC118/pβ5, contiene el origen de replicación del plásmido pSC101 (rep) en lugar de ori C del pUC118, se indica el codón de inicio de pol β y el inserto que lo contiene abarcando una región de aproximadamente 1213 pb.

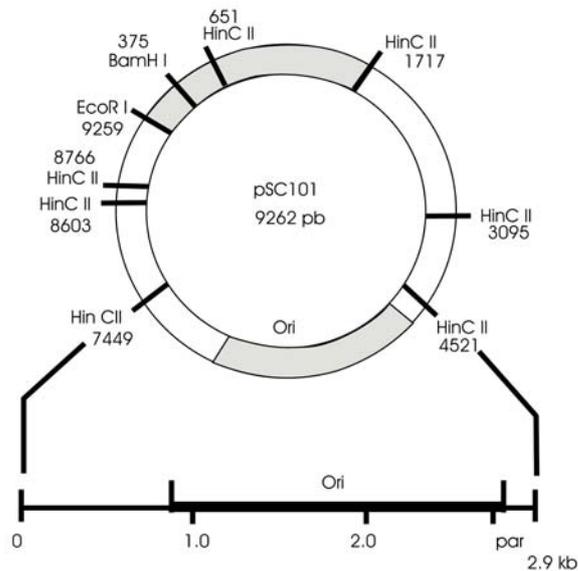


Figura 6. Mapa genético del plásmido plásmido pSC101. Se muestran, entre otros, los cortes de restricción de las enzimas EcoR I y BamH I, también podemos observar los cortes de la enzima HinC II la cual se empleó para extraer un fragmento de aproximadamente 2.9 Kb el cual contiene al ori y la región *par*.

### ***Determinación de las curvas de crecimiento de las cepas de Escherichia coli.***

Se prepararon tubos de 3 mL de medio YT con ampicilina o tetraciclina, según fue el caso. Los tubos se inocularon con una colonia de la cepa correspondiente. Se incubaron toda la noche a 37°C con agitación constante, posteriormente se tomaron 250 µL para inocular matraces de rama de 250 mL, preparados con 50 mL de medio YT con el antibiótico correspondiente. Se incubaron con agitación a 37°C, se tomaron lecturas de la absorción de luz en un fotocolorímetro Klett-Summerson cada 30 minutos. También se tomaron alícuotas de 100 µL cada media hora, se diluyeron adecuadamente con solución fisiológica para sembrar por espatulado en placas con medio sólido YT con el antibiótico correspondiente. Las placas se incuban 24 h a 37°C, posteriormente se contaron las colonias para determinar las UFC/mL. Con los datos obtenidos se trazaron gráficas de cuenta viable y de densidad óptica de cada cepa.

A partir de estas curvas se obtuvo el punto medio de la fase logarítmica, para utilizarla como referencia en la determinación de las curvas de crecimiento en presencia de IPTG. Para estas curvas se procedió en forma similar a la mencionada, con la diferencia de que el inductor (IPTG 5mM) se adicionó cuando el cultivo alcanzó la mitad de la fase logarítmica. Con estos datos se construyen las curvas de las cepas de *E. coli* en presencia de IPTG.

### ***Preparación de la suspensión celular para los eventos de irradiación.***

Se inoculó un tubo de 3 mL de medio YT con o sin antibiótico, con una colonia de la cepa a irradiar, se incubó con agitación a 37 °C durante toda la noche. A la mañana siguiente se tomaron alícuotas de 125 µL del cultivo y se inocularon dos matraces de rama de 125 mL con 25 mL del mismo medio, los matraces se incubaron con agitación a 37 °C, el cultivo se incubó hasta alcanzar la mitad de la fase logarítmica, momento en el cual se adicionó el inductor IPTG 5 mM a uno de los matraces. Los matraces se incubaron 4 h más. Se cosecharon las células por centrifugación a 3000 g en tubos de centrífuga de 30 mL estériles. Las células se resuspendieron en 5 mL de solución fisiológica estéril. A partir de esta suspensión y, tomando en cuenta los datos de las curvas de crecimiento, se prepararon suspensiones de 5 mL con  $1 \times 10^9$  UFC/mL de

cada una de las cepas en presencia y en ausencia de IPTG. Estas suspensiones celulares se utilizaron para los ensayos de sensibilidad a luz UV.

### ***Curvas de sensibilidad a la irradiación UV***

En la figura 7, se muestra el arreglo de los componentes del sistema de iluminación con luz UV. Por medio de un radiómetro digital UVX y utilizando el sensor UVX-31, se determino la intensidad de la lámpara germicida de luz UV, la cual se presume que es de  $100\mu\text{W}/\text{cm}^2$ . La lámpara se precalienta durante 30 minutos. Se colocaron en una caja Petri estéril, 5 mL de las suspensiones celulares previamente preparadas con aproximadamente  $1 \times 10^9$  UFC/mL, la caja Petri se colocó sobre la agitadora y se procedió a irradiar, durante la irradiación la suspensión celular esta en agitación a una velocidad de 200 r.p.m.. Se toman alícuotas de 10  $\mu\text{L}$  cada 15 segundos, durante 90 segundos. Estas alícuotas se guardan en la oscuridad. Se realizan las diluciones pertinentes, utilizando solución fisiológica estéril y se sembraron las diluciones, por espatulado, en placas con medio sólido YT con ampicilina o tetraciclina de acuerdo a la cepa. La siembra de las diluciones se realizó en un cuarto oscuro iluminado con luz roja. Las placas se incuban a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  en un cuarto oscuro durante 24 h. Posteriormente se realizan las cuentas de las UFC/ mL y se trazaron las curvas de sensibilidad a la luz UV.

### ***Análisis estadísticos***

Para saber si existían diferencias significativas entre los tratamientos, se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparación de medias de Duncan. Se consideró que existen diferencias significativas entre los tratamientos cuando P tuvo valores menores a 0.05 (Zar, 1984). Esto se realizó por medio del paquete STATISTICA (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Todos los experimentos se realizaron por triplicado; para graficar las curvas de crecimiento y supervivencia se utilizo el promedio de los datos de cada cepa.

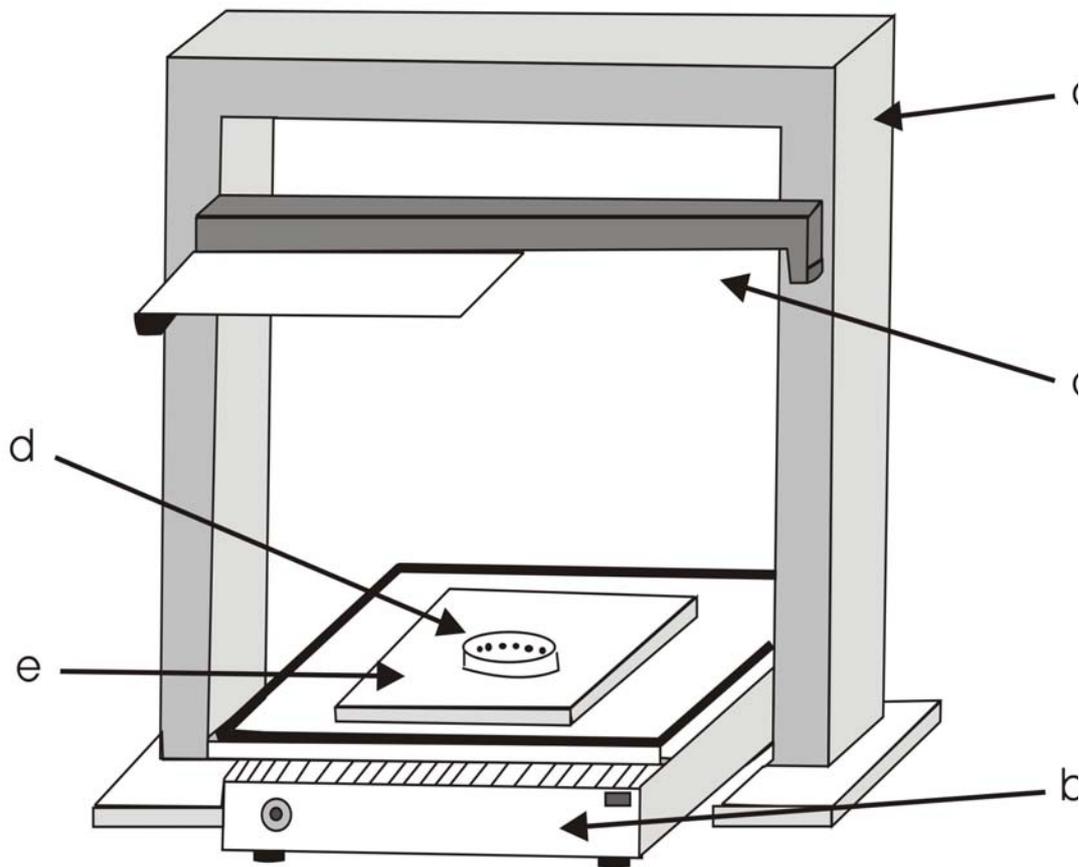


Figura 7. Sistema de irradiación con luz UV. Se muestra un esquema de los componentes que se empleó, cuando las células se sometieron a irradiación UV, a) corresponde al soporte de la lámpara, b) corresponde a la agitadora, c) corresponde a la lámpara de la luz germicida que tiene una potencia de  $100 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ , d) corresponde a la caja petri donde se coloca la suspensión celular a irradiar y e) un soporte de acrílico para la caja petri.

## VII. RESULTADOS

Para evaluar la actividad reparadora de las células transformantes obtenidas de las cepas *E. coli* JM109, WP1 y WP6 con los plásmidos pSC101, pUC118, p $\beta$ 5 y p $\beta$ 6, se realizaron curvas de crecimiento en unidades Klett (UK), curvas de crecimiento en UFC/mL y curvas de sensibilidad a la luz UV, en condiciones normales y bajo el inductor IPTG.

### *Curvas de crecimiento en unidades Klett (UK).*

La figura 8 muestra las curvas de crecimiento en ausencia de IPTG, medidas en UK. La cepa JM109/p $\beta$ 5 fue la que presentó el mayor crecimiento y WP1/pSC101 el menor. En general las construcciones con el plásmido pSC101 presentaron menor crecimiento. Las curvas en presencia del inductor IPTG fueron similares.

### *Curvas de crecimiento en unidades formadoras de colonias (UFC/mL).*

En la figura 9 y 10 se muestran las curvas de crecimiento (UFC/mL) de cada cepa en presencia y ausencia de IPTG; se aprecia que el tiempo de incubación necesario para alcanzar la mitad de la fase logarítmica es diferente para cada una, además después de seis o siete horas de crecimiento hay una clara disminución en la viabilidad. En ausencia de IPTG la cepa WP6/p $\beta$ 6 presentó el mayor crecimiento (Fig. 9 d).

En la figura 11, se observan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en presencia de IPTG, en las cepas JM109/pUC118, WP1/pUC118, WP6/pUC118, WP6/p $\beta$ 5, WP1/p $\beta$ 5 y JM109/p $\beta$ 6, las cuales presentaron mayor crecimiento. En general las construcciones con los plásmidos pUC118 y p $\beta$ 5 muestran un crecimiento mayor a las que portan los plásmidos pSC101 y p $\beta$ 6 (Fig. 12).

La presencia o ausencia de IPTG, mostró diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en la cepa WP6/p $\beta$ 6, quien presentó un crecimiento mayor en ausencia del inductor.

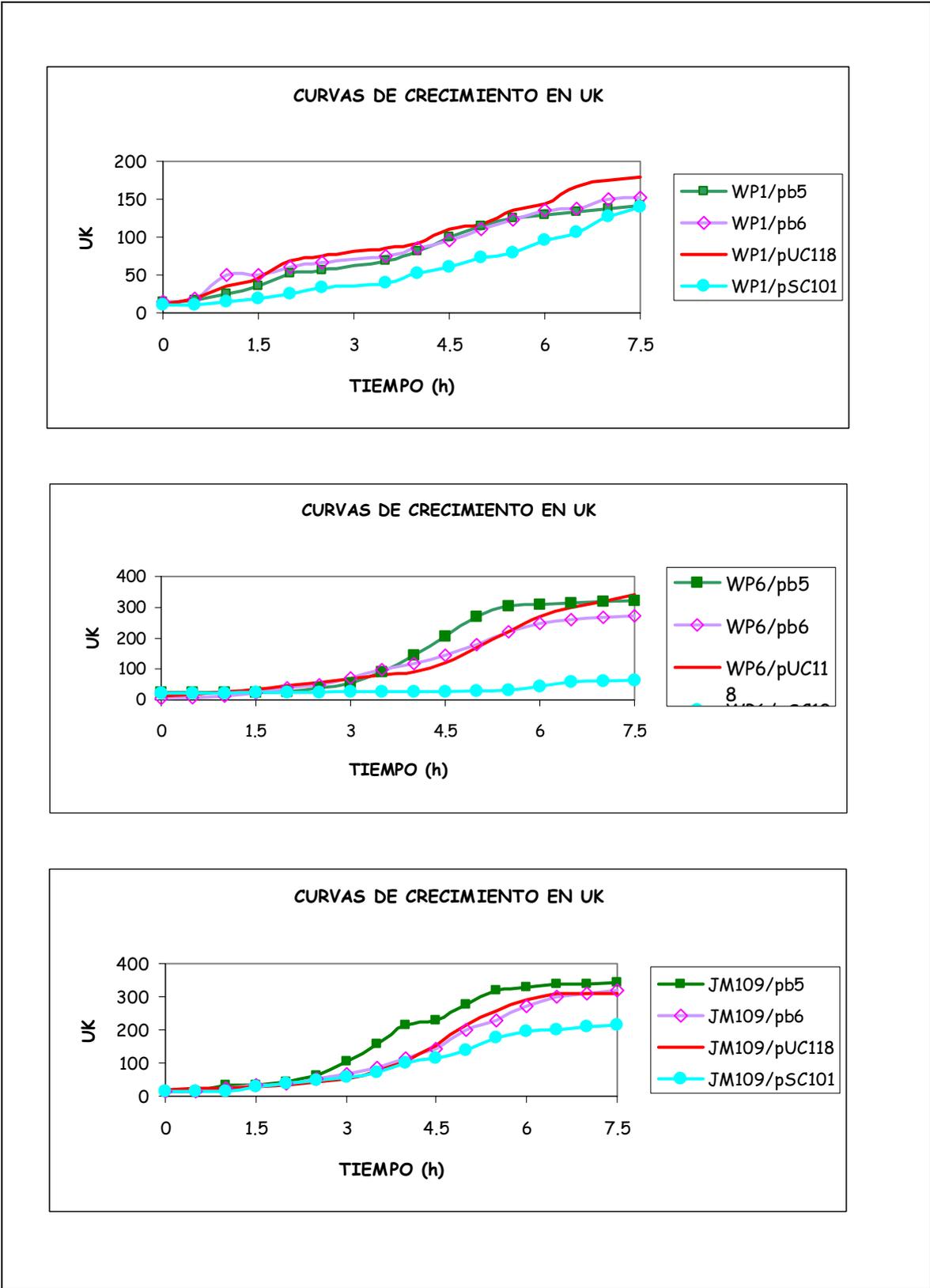


Figura 8. Curvas de crecimiento en unidades Klett de las cepas de *E. coli* recombinantes en ausencia del inductor IPTG.

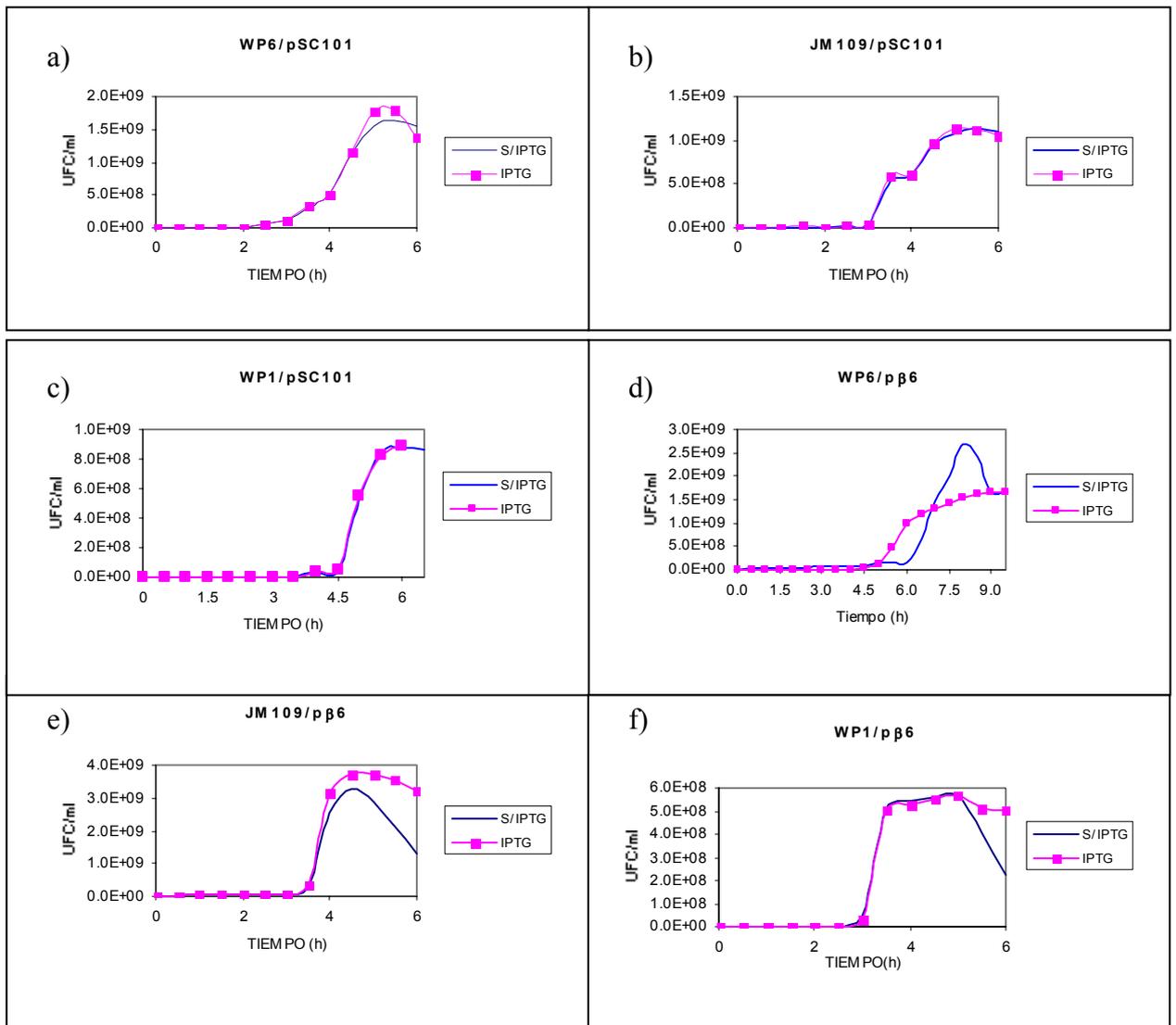


Figura 9. Curvas de crecimiento en UFC/mL de las cepas de *E. coli* recombinantes con los plásmidos pSC101 y pβ6. Se muestran las curvas de crecimiento incubadas en ausencia de IPTG (—) y en presencia de IPTG (—□—).

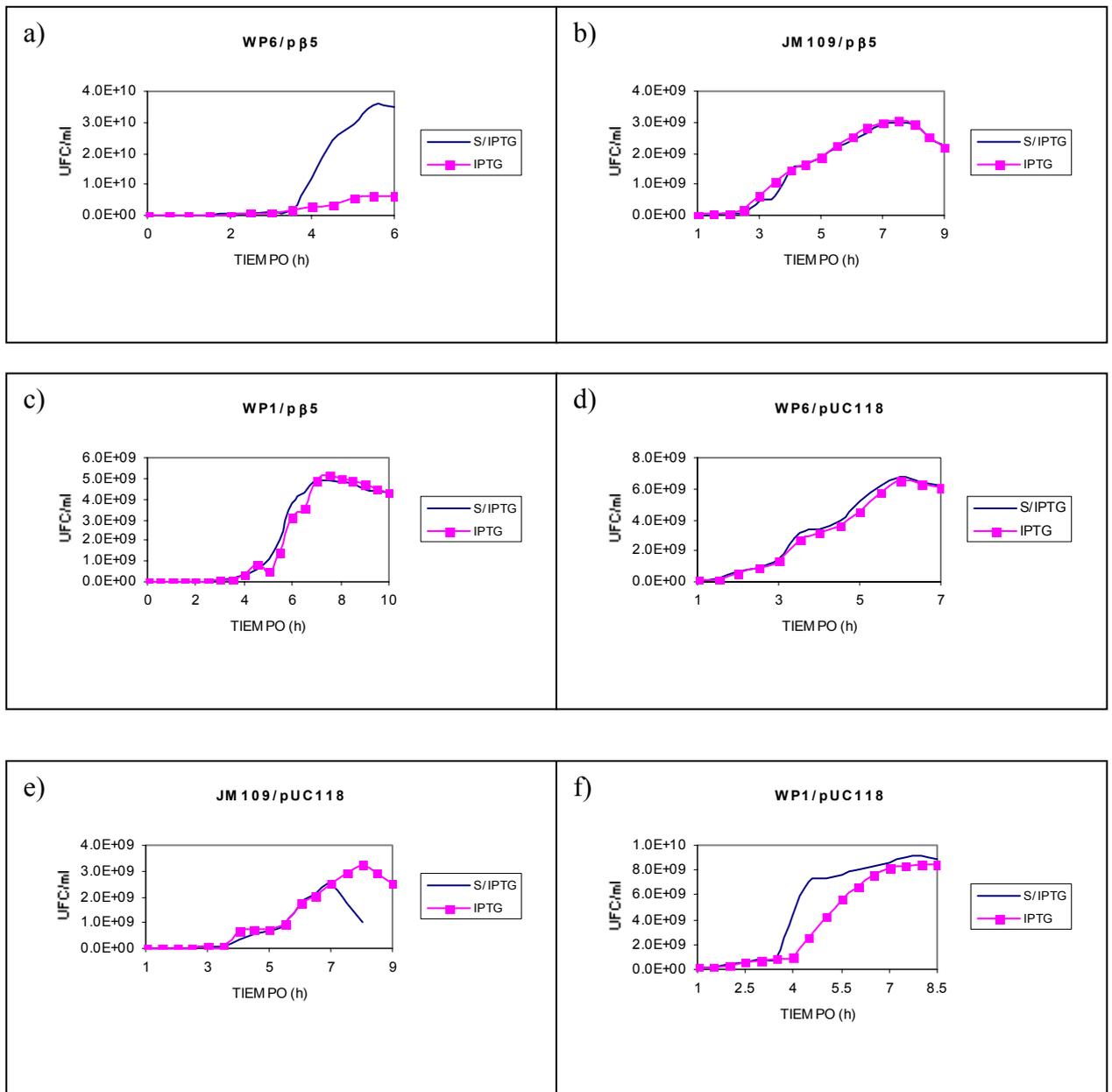


Figura 10. Curvas de crecimiento en UFC/mL de las cepas de *E. coli* recombinantes con los plásmidos pβ5 y pUC118. Se muestran las curvas de crecimiento de todas las construcciones, las cuales fueron incubadas en ausencia de IPTG (—) y en presencia de IPTG (—□—).

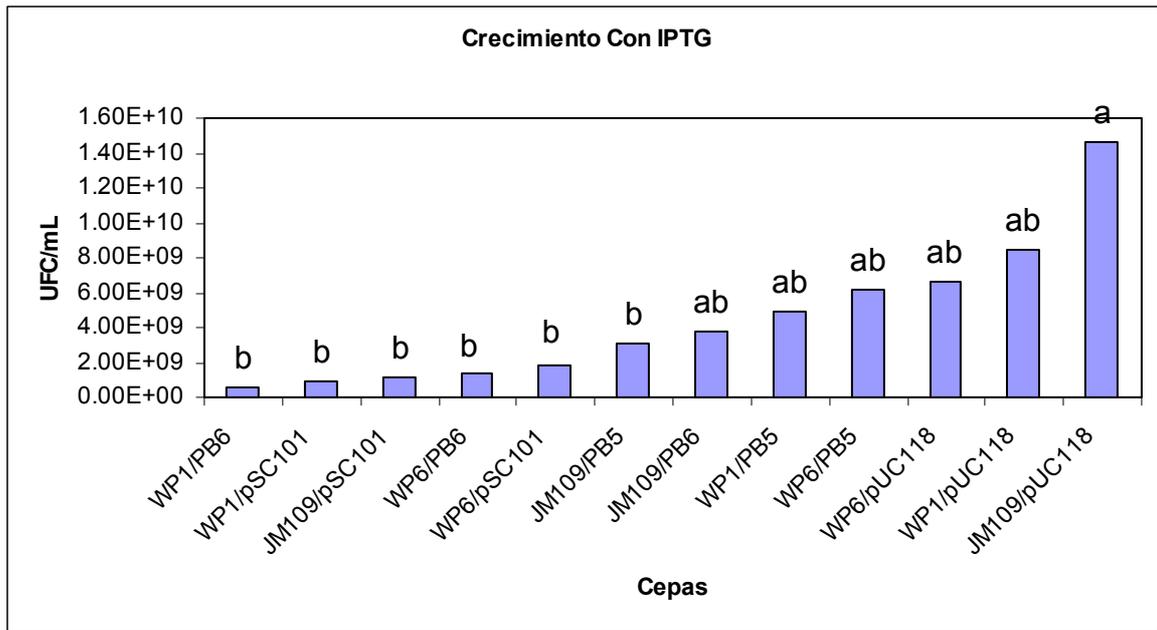


Figura 11. Gráfica de crecimiento de las cepas en presencia del inductor IPTG. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

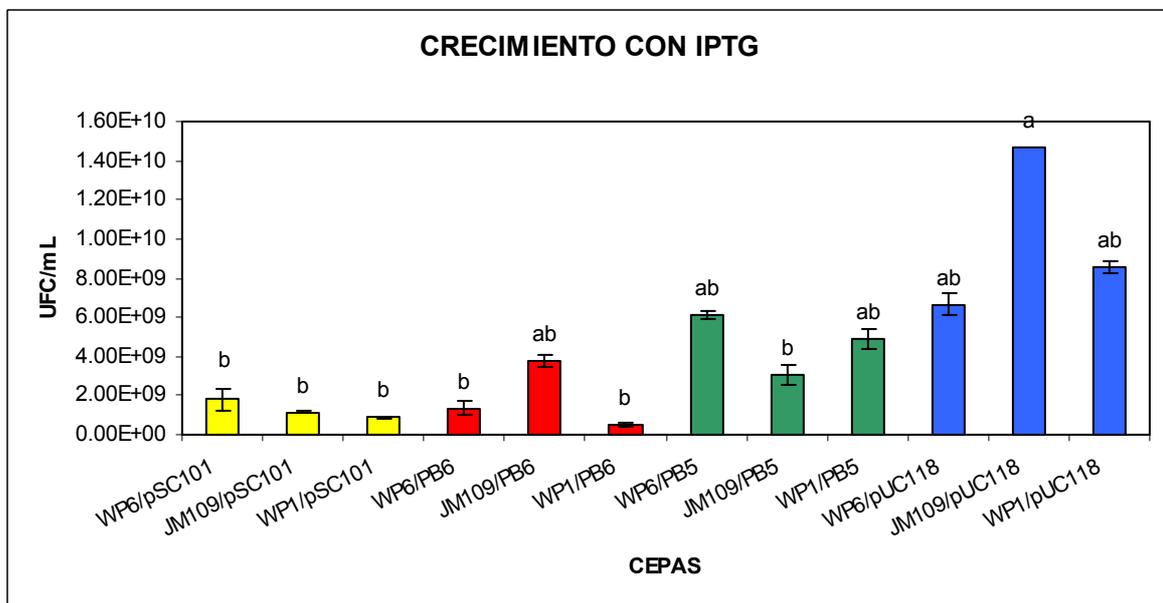


Figura 12. Gráfica de Crecimiento de las cepas, agrupadas por plásmidos en presencia del inductor IPTG. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

### Curvas de sensibilidad a la luz UV

Se realizaron curvas de supervivencia para medir la sensibilidad a la luz UV en condiciones normales y en presencia de IPTG (Fig. 13-16). En ausencia del inductor se observó (Fig. 17), que las construcciones con la cepa WP1 fueron las más resistentes y con WP6 las más sensibles. En cuanto a los plásmidos se aprecia que p $\beta$ 5 presentó mayor supervivencia y pUC118 la menor.

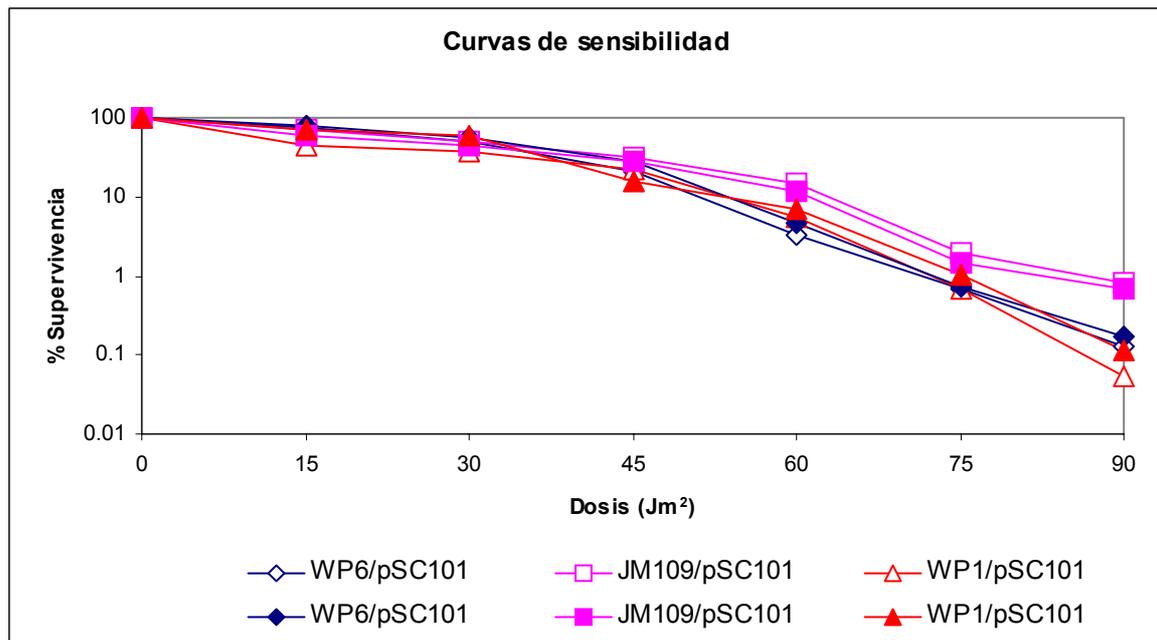


Figura 13. Curvas de sensibilidad a la irradiación UV de las cepas de estudio E. coli (WP6, JM109 y WP1) con el plásmido pSC101. Para los ensayos de cada una de las cepas se emplearon dos cultivos que fueron incubados en presencia de IPTG (símbolos llenos) y en ausencia de IPTG (símbolos vacíos).

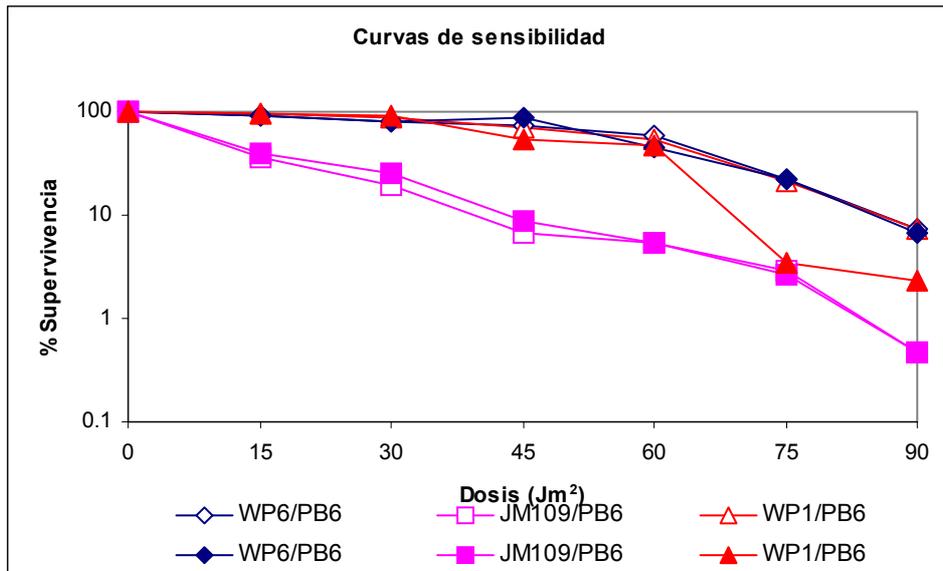


Figura 14. Curvas de sensibilidad a la irradiación UV de las cepas de estudio *E. coli* (WP6, JM109 y WP1) con el plásmido pβ6. Para los ensayos de cada una de las cepas se emplearon dos cultivos que fueron incubados en presencia de IPTG (símbolos llenos) y en ausencia de IPTG (símbolos vacíos).

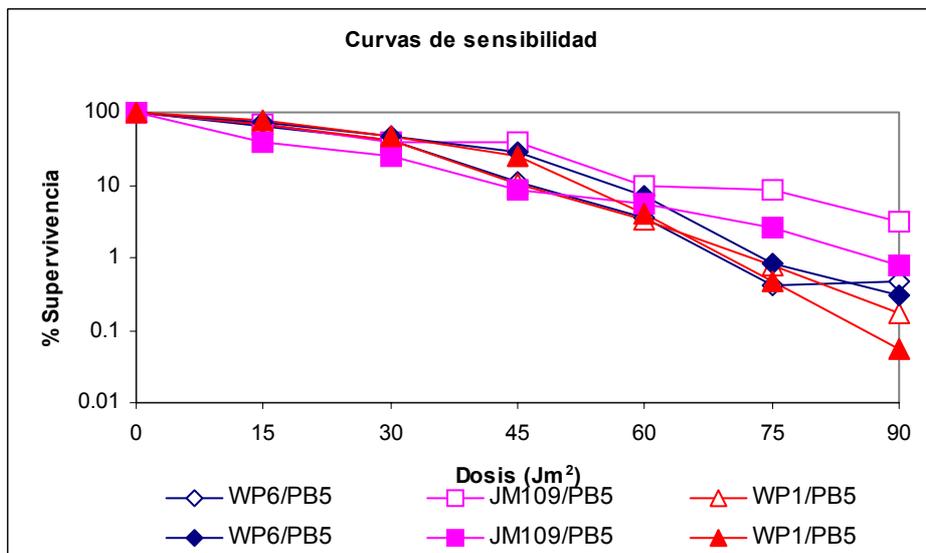


Figura 15. Curvas de sensibilidad a la irradiación UV de las cepas de estudio *E. coli* (WP6, JM109 y WP1) con el plásmido pβ5. Para los ensayos de cada una de las cepas se emplearon dos cultivos que fueron incubados en presencia de IPTG (símbolos llenos) y en ausencia de IPTG (símbolos vacíos).

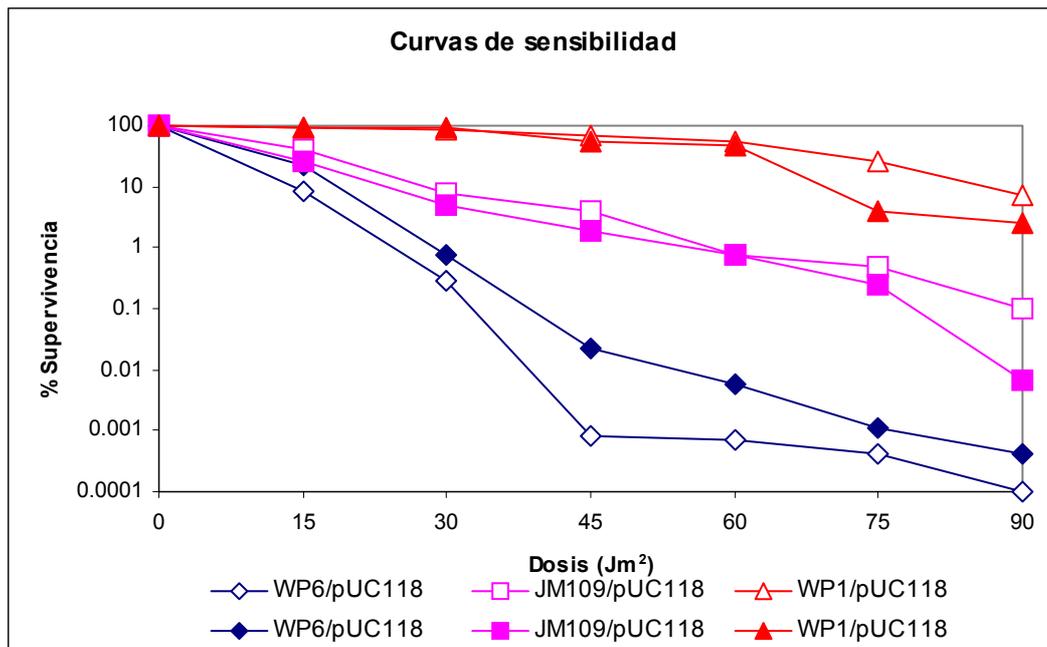


Figura 16. Curvas de sensibilidad a la irradiación UV de las cepas de estudio E. coli (WP6, JM109 y WP1) con el plásmido pUC118. Para los ensayos de cada una de las cepas se emplearon dos cultivos que fueron incubados en presencia de IPTG (símbolos llenos) y en ausencia de IPTG (símbolos vacíos).

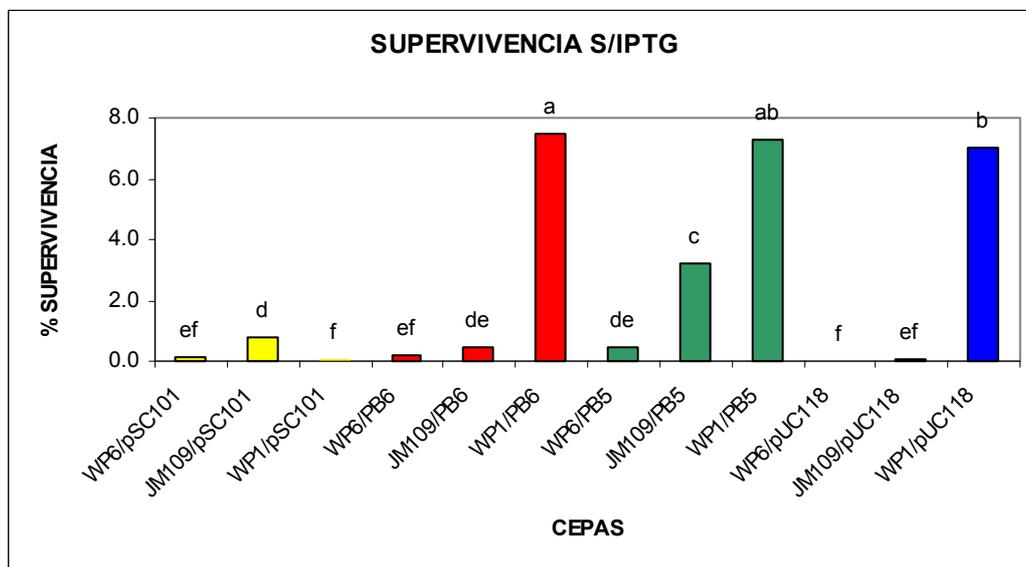


Figura. 17. Gráfica del efecto de sensibilidad a la luz UV en ausencia del inductor IPTG. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

La supervivencia en presencia del inductor (Fig.18) mostró diferencias ( $P < 0.05$ ). Los resultados son similares a la ausencia de IPTG, siendo la cepa WP1 y el plásmido pB5

los de mayor supervivencia y WP6 con pUC118 los más sensibles. Las cepas con el mayor índice de supervivencia fueron WP1/pUC118, WP1/pβ5, WP1/pβ6 y JM109/pβ5 Sin embargo la supervivencia de algunas cepas fue menor en presencia de IPTG.

Para comparar la sensibilidad en presencia o ausencia del inductor se realizó una ANOVA de dos vías, mostrando diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en WP1/pβ6, WP1/pβ5, WP1/pUC118 y JM109/pβ5 quienes son más sensibles en presencia de IPTG (Fig. 19). En las demás cepas se observa una sensibilidad similar al efecto letal de la luz UV y que el inductor no aumento la supervivencia de ninguna de ellas.

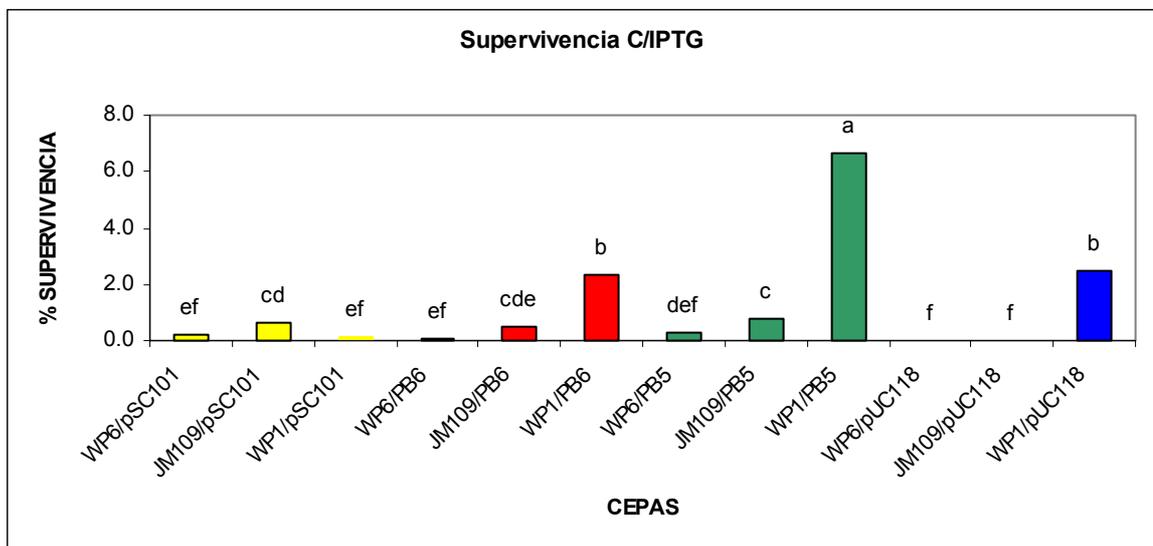


Figura 18. Gráfica del efecto de sensibilidad a la luz UV en presencia del inductor IPTG. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

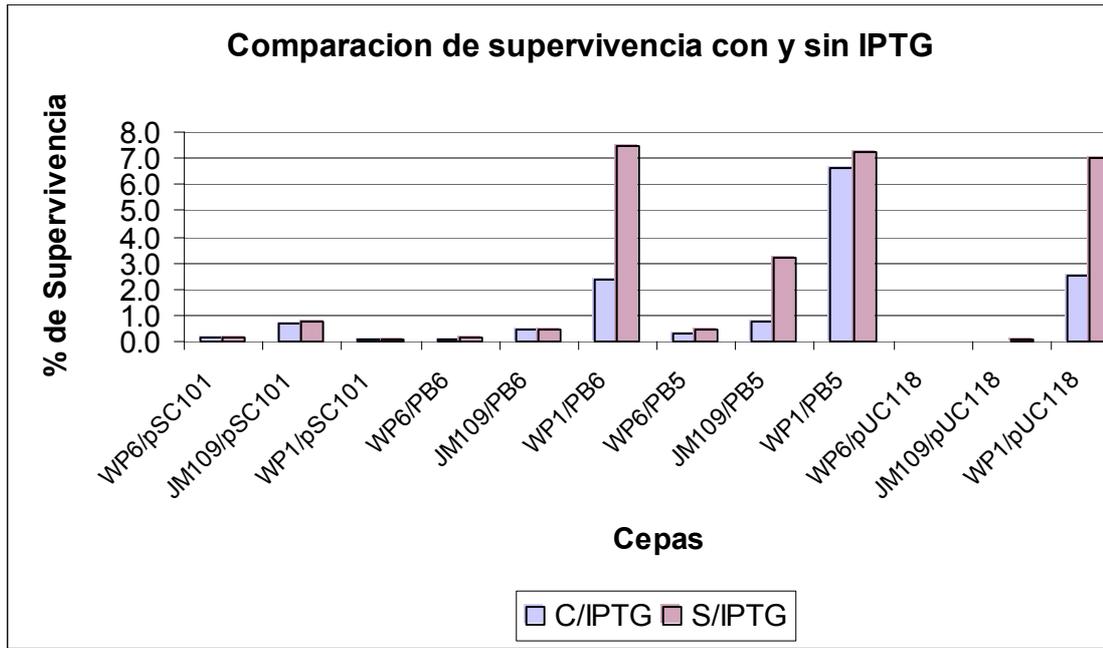


Figura 19. Gráfica del efecto de sensibilidad a la luz UV en ausencia y presencia del inductor IPTG. Podemos apreciar que la presencia del inductor IPTG no aumento el índice de supervivencia de ninguna de las cepas.

Para Investigar si la DNA Pol  $\beta$  es capaz de reforzar o sustituir la actividad de reparación, de la DNA Pol I al efecto letal de la luz UV se comparo a las cepas WP1 (actividad Pol I completa) y WP6 (actividad de Pol I ausente) con los plásmidos p $\beta$ 5 y p $\beta$ 6 (portadores del gen DNA Pol  $\beta$ ) y sus contrapartes, pUC118 y pSC101 (ausencia del gen DNA Pol  $\beta$ ) (Tabla 2); encontrándose diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) tanto en ausencia (Fig. 20) como en presencia (Fig. 21) de IPTG. En todas las construcciones donde se encontraron diferencias se observo que la presencia de Pol  $\beta$  aumentaba el índice de supervivencia.

En la figura 20, se aprecia que las construcciones con la cepa WP1 fueron las mas resistentes a la luz UV, así como, WP1/ p $\beta$ 5 y WP1/p $\beta$ 6 presentaron un mayor porcentaje de supervivencia con respecto a sus contrapartes WP1/pUC118 y WP1/pSC101. Las construcciones portadoras del gen DNA Pol  $\beta$  tuvieron un índice de supervivencia significativamente mayor en comparación a las cepas que solo poseen la actividad de Pol I.

Las construcciones con WP6, presentaron la sensibilidad más alta con respecto a las otras cepas. Se observaron diferencias ( $P < 0.05$ ), en ausencia del inductor en WP6/p $\beta$ 5 y en presencia del inductor con WP6/p $\beta$ 6 comparándolas con sus contrapartes WP6/pUC118 y WP6/pSC101 respectivamente (figuras 20 y 21).

**Tabla 2. Comparación del índice de supervivencia de las cepas portadoras del gen Pol  $\beta$  con sus contrapartes (ausencia del gen Pol  $\beta$ ) en ausencia y presencia del inductor IPTG. Diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) \*\*\***

Cepas portadoras de gen pol $\beta$ y sus contrapartes (ausencia del gen pol $\beta$ )	DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS	DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS
	SIN IPTG	CON IPTG
	***	***
JM109/p $\beta$ 5 & JM109/pUC118	***	***
JM109/p $\beta$ 6 & JM109/pSC101	---	***
WP1/p $\beta$ 5 & WP1/pUC118	***	***
WP1/p $\beta$ 6 & WP1/ pSC101	***	***
WP6/ p $\beta$ 5 & WP6/ pUC118	***	---
WP6/ p $\beta$ 6 & WP6/ pSC101	---	***

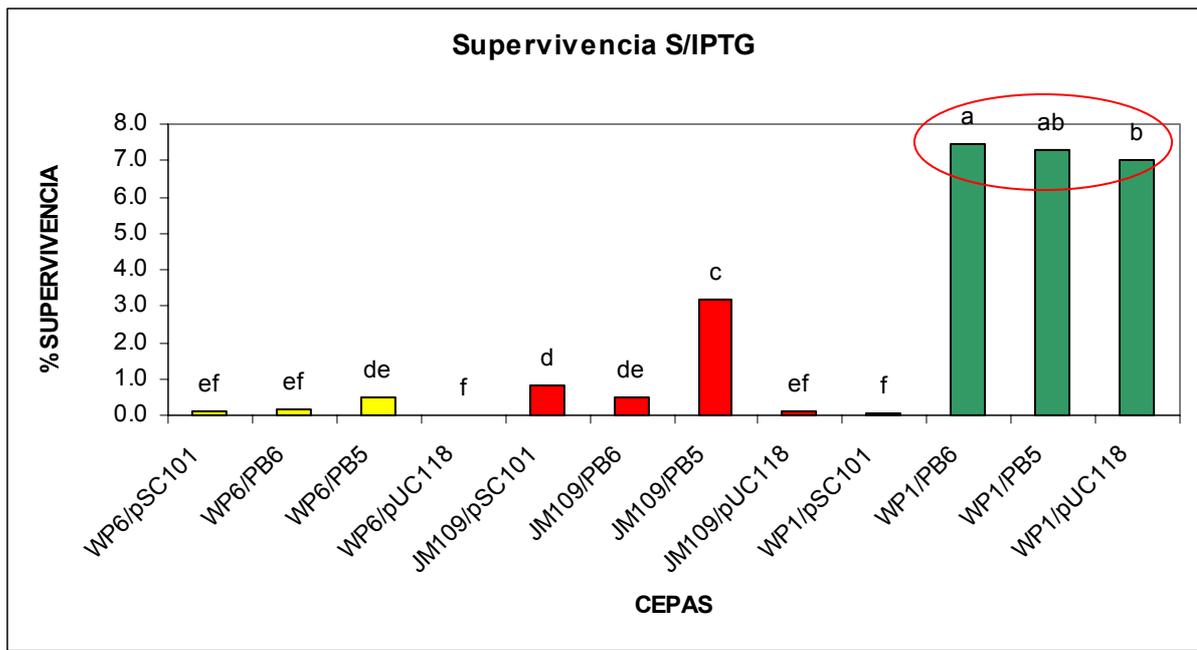


Figura 20. Gráfica que muestra el índice de supervivencia agrupado por cepas, se destaca que WP1 es significativamente mayor en comparación a las demás cepas, en ausencia del inductor IPTG. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

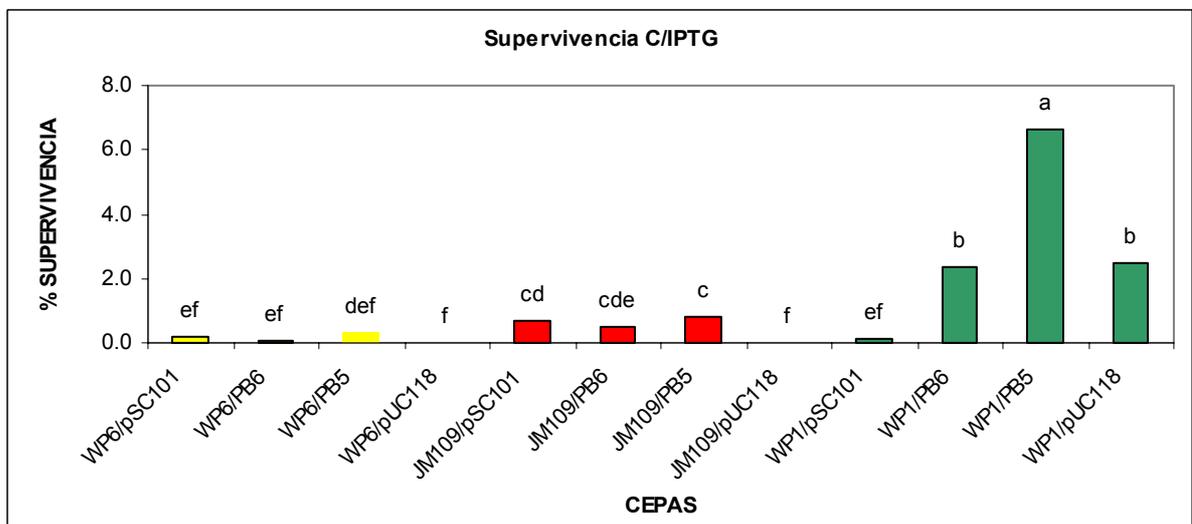


Figura 21. Gráfica de supervivencia de las cepas en presencia del inductor IPTG. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

## VIII. DISCUSIÓN

Los sistemas de reparación NER y BER han evolucionado, poseen mecanismos versátiles y sofisticados para remover DNA dañado (de Laat *et al.*, 1999). La enzima Pol  $\beta$  juega un papel importante en el proceso de BER de segmentos cortos y largos, principalmente en daños ocasionados por luz UV (de Laat *et al.*, 1999; Lindahl y Wood, 1999; Wu *et al.*, 2001). En ausencia de esta enzima las células son inducidas a apoptosis y rompimiento cromosomal (Osheroff *et al.*, 1999; Ochs *et al.*, 1999; Dianov *et al.*, 1999, Andrej *et al.*, 2001).

En el laboratorio de Tecnología del DNA del IPN, se contaba con las construcciones de las cepas *E. coli* JM109, WP1 y WP6 transformadas con los plásmidos pSC101, pUC118, p $\beta$ 5 y p $\beta$ 6 (Hernández, 1994; Escamilla, 1995; Escamilla 1998) para realizar esta investigación.

En este trabajo, para asociar la presencia del gen Pol  $\beta$  con el efecto biológico es importante destacar el uso de huéspedes isogénicos que tenían la mutación Pol A-I (A<sup>-</sup>) como única diferencia, por esta razón se seleccionaron a WP1 y WP6 que respectivamente contienen o carecen de la actividad Pol I (Tabla 1)

En cuanto a los plásmidos, su característica esencial, es su habilidad para replicarse como un elemento genético autónomo, se usan para explorar los mecanismos involucrados en la replicación del DNA, estos conocimientos aportan parámetros para entender el mantenimiento celular y sus elementos genéticos bajo condiciones ambientales (del Solar, *et al.*, 1998).

El plásmido p $\beta$ 5 contiene el gen Pol  $\beta$ ; sin embargo los plásmidos con oriC son incapaces de crecer en *E. coli* Pol A<sup>-</sup> (Filutowicz y Roll, 1990) por lo que el oriC presente en p $\beta$ 5 fue sustituido por el oriC de pSC101. El nuevo plásmido fue llamado p $\beta$ 6 (Escamilla, 1998). El plásmido p $\beta$ 5 tiene un oriC como origen de replicación y p $\beta$ 6 tiene *rep* como origen de replicación (Escamilla *et al.*, 2002)

En un estudio como este, en el que se trabaja con algunas cepas nuevas y se desconoce su velocidad de crecimiento, fue necesario hacer curvas de crecimiento para determinar el período de la fase logarítmica y para conocer su comportamiento en presencia ó ausencia del inductor IPTG. Lo anterior es recomendable ya que en trabajos previos, sugieren que el IPTG, usado como inductor, se debe agregar a la mitad de la fase

logarítmica (Maniatis *et al.*, 1989) y por que en los análisis de sensibilidad a la luz UV se deben utilizar alícuotas con la misma cantidad de células viables y en fase activa de replicación (Escamilla, 1998).

Al analizar las curvas de crecimiento en ausencia de IPTG se encontraron diferencias significativas en la cepa WP6/p $\beta$ 6 quien presento el mayor crecimiento y una fase lag mas larga, esto concuerda con Escamilla *et al.*, (2002), donde se comunica que esta cepa tiene una fase lag muy prolongada, sugieren que su velocidad de crecimiento probablemente se deba a la presencia del plásmido p $\beta$ 6, el cual tiene un origen de replicación diferente. En tanto que las demás cepas tuvieron un crecimiento similar entre si.

En cuanto al crecimiento en presencia del inductor, las cepas JM109/pUC118, WP1/pUC118, WP5/pUC118, WP6/p $\beta$ 5, WP1/p $\beta$ 5 y JM109/p $\beta$ 6 mostraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), presentando el mayor crecimiento. También se aprecia (Fig. 11) que las cepas portadoras de un oriC del plásmido pUC118 tienden a crecer más que las portadoras de un oriC de pSC101. Esto se puede deber a que el vector de expresión pUC, posee un OriC que funciona en presencia de Pol I por lo que llega a producir entre 500 a 700 copias por célula; mientras que pSC101 es de bajo número de copias (Escamilla, 1995; Ochoa, 1986).

Con respecto al crecimiento de las cepas con pSC101, este es un plásmido de bajo número de copias ya que tiene una replicación rigurosa, requiere de la proteína producida por el gen *dnaA* y de la actividad de la DNA Polimerasa III (del Solar, *et al.*, 1998; Ochoa, 1986).

Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo, no aportan elementos suficientes para explicar este hecho.

La construcción WP6/p $\beta$ 5 presentó uno de los mayores crecimientos en comparación a las demás cepas. Este resultado es contrario a lo esperado, puesto que WP6/p $\beta$ 5 es una construcción inestable ya que el plásmido p $\beta$ 5 posee al gen completo de Pol  $\beta$  clonado en pUC118, el cual posee un origen de replicación ColE1. Este es un prototipo de un pequeño plásmido multicopia que requiere de DNA Pol I para iniciar su replicación (del Solar, *et al.*, 1998) y las cepas mutantes pol A<sup>-</sup> (WP6) presentan inestabilidad hacia los plásmidos que dependen de OriC (Kornberg y Baker, 1992).

Esto concuerda con Hernández (1994) quien realizó transformaciones de las cepas *E. coli* WP6 Pol A<sup>-</sup> con el fagémido pUC118/pβ5, estas resultaron inestables no obteniéndose cepas recombinantes después de la probable transformación; se propuso que era debido a la incompatibilidad que el plásmido presentaba con la cepa de *E. coli*, pues se ha observado que los plásmidos que provienen de un mismo grupo de incompatibilidad, de acuerdo al tipo de replicación, presentan inestabilidad entre sí, es decir que si una bacteria tiene un plásmido y se trata de introducir otro plásmido diferente pero dentro del mismo grupo de incompatibilidad, la cepa lo abortará.

La presencia o ausencia de IPTG no afectó significativamente la velocidad de crecimiento ni el número de UFC/mL a excepción de WP6/pβ6, que en ausencia de IPTG presentó el mayor crecimiento. Estos datos son similares a los obtenidos por Escamilla *et al.* (2002) donde menciona que la presencia de IPTG no afecta la velocidad de crecimiento del cultivo para ninguna de las cepas. En este experimento el IPTG actúa negativamente disminuyendo el crecimiento de la cepa. Podemos sugerir que el crecimiento desmedido de WP6/pβ6 en comparación a las demás cepas, se debe a que es una cepa altamente mutante, por problemas en su construcción (Hernández, 1994). Además al obtener su perfil proteico para evidenciar la presencia de Pol β no se encontró la proteína correspondiente, y esto se le asume a cambios en la transcripción o traducción del gen, ó bien, a la degradación rápida de la proteína en el extrato crudo (Escamilla *et al.*, 2002)

Las curvas de crecimiento se realizaron con el propósito de identificar, en cada cepa, el momento adecuado del cultivo para cuantificar la sensibilidad de las cepas a la luz UV.

Las curvas de sensibilidad a la luz UV (Fig. 13-16) sirvieron para poner en evidencia el efecto que tiene la presencia de Pol β en las cepas de *E. coli* puesto que su supervivencia está directamente relacionada con la capacidad de eliminar los dímeros de timina de su DNA inducidos por luz UV (Mathews y Van Holde, 2000).

En 1980, Nowak y colaboradores, demostraron la capacidad de Pol β para reparar los dímeros de pirimidina, utilizando el plásmido ColE1, el cual fue irradiado a una dosis de 60 J/m<sup>2</sup> creando 3.2 dímeros de pirimidina por molécula de DNA.

Para los humanos un mutágeno ambiental poderoso es la luz UV (Lindahl y Wood, 1999), la enzima Pol β participa en la reparación de fotoproductos, tales como dímeros de pirimidina tipo ciclobutano timina-timina (CPD) y el fotoproducto 6-4 (pirimidina-

pirimidona), con una frecuencia de error del 32% y 26% respectivamente (Servant, *et al.*, 2002). Estas lesiones causan distorsiones en la molécula del DNA, las cuales bloquean a las DNA polimerasas durante la replicación del DNA, para eliminarlas existen varios mecanismos de reparación, tales como NER, BER y la lectura de pruebas, vías donde Pol  $\beta$  tiene un papel importante (Lindahl y Wood, 1999).

Las curvas de supervivencia en presencia o ausencia del inductor (Fig. 17 y 18) mostraron, en ambos casos, que las construcciones con WP1 y el plásmido p $\beta$ 5 fueron las más resistentes, así como con WP6 y el plásmido pUC118 las más sensibles, esto simplemente se atribuye a que ambas son cepas isogénicas cuya única diferencia radica en que WP6 es Pol A-I y WP1 es portadora de Pol I (Wilkin, 1975), por lo que WP1 puede reparar mejor su ADN ya que posee la actividad completa de Pol I, enzima de reparación que llena los huecos en la secuencia del DNA en *E. coli* (Sancar, 1994), mientras que WP6 carece de dicha actividad por lo que se relaciona directamente con su baja supervivencia (Escamilla *et al.*, 2002).

Gamas *et al.*, (2000) reportan que las cadenas pol A<sup>-</sup>, deficientes en la actividad de polimerasa son hipersensibles a radiación UV. Estas cadenas son deficientes en reparar saltos cortos en la secuencia del DNA. Además de que su replicación esta asociada con la reparación de las lesiones inducidas por UV, lo cual apoya nuestros resultados.

Se esperaba que WP6/pUC118 y WP6/pSC101 mostraran la sensibilidad más alta., puesto que ambas carecen de la actividad Pol  $\beta$  y Pol I

Las construcciones con WP6.con los plásmidos pUC118 y pSC101 mostraron la sensibilidad más alta esto se le atribuye a que la cepa no posee la enzima principal del proceso de reparación, aunque se ha documentado que la DNA Polimerasa III de *E. coli* puede intervenir en este proceso, esto concuerda con trabajos anteriormente citados de Hernández (1994), donde se realizaron transformaciones de la cepa *E. coli* WP6 A<sup>-</sup> con el fagémido pUC118/p $\beta$ 5, estas resultaron inestables no obteniéndose cepas recombinantes después de la probable transformación , se sugirió que el fagémido no fue estable en pol A<sup>-</sup> , debido a que pUC118 tiene como origen de replicación el origen del plásmido ColE1 cuya replicación depende de Pol I , por lo tanto las mutantes Pol A<sup>-</sup> presentan inestabilidad hacia plásmidos que dependen de *oriC* (Kornberg y Baker,1992).

En cuanto a los plásmidos, p $\beta$ 5 poseen al gen completo de Pol  $\beta$  de rata, cuya función principal es reparar lesiones en el DNA ocasionadas por daño oxidativo, agentes alquilantes, luz UV; entre otros; sintetizando y llenando saltos en la secuencia del DNA (Kosa, *et al.*, 1999; Canitrott, *et al.*, 2000; Servant, 2002) por lo que se esperaba que las construcciones con este plásmido resistieran mejor el efecto letal de la irradiación UV.

El plásmido pUC118 se esperaba fuese uno de los mas sensibles pues no posee al gen Pol  $\beta$ , además tiene como origen de replicación el origen del plásmido ColE1, que requiere la polimerasa y el dominio 5' nucleasa de Pol I para la iniciación del plásmido *in vivo*. Este dominio esta involucrado en la recombinación, y es dependiente de la replicación (Gamas, *et al.*, 2000)

En este trabajo la supervivencia en ausencia del inductor (Fig. 20) mostró diferencias ( $P < 0.05$ ); las construcciones con WP1 presentaron el mas importante efecto de protección a la luz UV, en comparación a las demás cepas; así como, WP1/p $\beta$ 5 y WP1/p $\beta$ 6 presentaron un mayor porcentaje de supervivencia con respecto a sus contrapartes WP1/pUC118 y WP1/pSC101, que solo poseen a Pol I. Los resultados muestran que las construcciones portadoras del gen Pol  $\beta$  y el gen Pol I resistieron mejor el efecto letal de la luz UV. (Fig.22).

Se encontró que la supervivencia fue similar tanto en ausencia como en presencia del inductor. Las cepas WP1/ p $\beta$ 5 y WP1/p $\beta$ 6 al tener la acción conjunta de las enzimas Pol  $\beta$  y Pol I, repararon mejor el daño inducido por luz UV, pues su porcentaje de supervivencia fue significativamente mayor que el de sus contrapartes, WP1/pUC118 y WP1/pSC101 que solo poseen a Pol I, por lo que sugerimos que pol  $\beta$  puede ayudar a la reparación en lesiones inducidas por UV.

Estos resultados concuerdan con Escamilla *et al.*, (2002) quien encontró que las construcciones con ambas enzimas, como lo es WP1/p $\beta$ 5, es mas resistente al compararla con la cepa silvestre WPI, pero esto solo ocurre a niveles basales de Pol  $\beta$ .

Investigaciones realizadas por Lindahl y Wood (1999), sobre el ciclo celular y sus puntos de comprobación, mecanismos encargados de reparar el DNA dañado antes de la replicación y la división celular, sugieren que varias polimerasas están involucradas en estos mecanismos, tal como la Polimerasa III de *E. coli* y en eucariotes Pol  $\zeta$ , permitiendo un índice de supervivencia mayor en lesiones inducidas por UV. En su experimento irradian con luz UV cultivos de fibroblastos XP-A, a una dosis de 0.3 J/m<sup>2</sup>,

creando aproximadamente 10,000 dímeros de pirimidina ciclobutano en el genoma, sobreviven el 50% de las células, sin embargo, al dividirse las colonias lo hacen con una gran cantidad de daños.

En otros estudios realizados por Servant *et al.*, (2002), sugiere que Pol  $\beta$  también puede participar en los mecanismos de control de pruebas pero con un grado de error alto, esto aumenta la supervivencia celular pero de igual forma incrementa la mutagénesis inducida por luz UV.

En este trabajo al comparar la sensibilidad en presencia o ausencia del inductor se observó que el IPTG no aumentó la supervivencia de ninguna de las cepas.

Se esperaba que las cepas aumentaran su índice de supervivencia al adicionarles el inductor IPTG, puesto, que la expresión de Pol  $\beta$  se lleva a cabo gracias a que pUC118 (Fig. 3) fue diseñado para que utilizara la secuencia de regulación del operón lac de *E. coli* y el codón de iniciación ATG tanto para  $\beta$ -galactosidasa como para Pol  $\beta$  de rata (Date, 1988). El operón Lac es un promotor muy fuerte y la producción de estas enzimas se lleva a cabo por la presencia de un inductor como la lactosa o un inductor no metabolizable como el IPTG, el cual es análogo de la lactosa. En consecuencia al adicionar el inductor aumentarían los niveles de Pol  $\beta$  y con ello el índice de reparación, pero nuestros resultados mostraron el efecto contrario.

Se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en WP1/p $\beta$ 6, WP1/p $\beta$ 5, WP1/pUC118, WP6/p $\beta$ 6 y JM109/p $\beta$ 5 quienes son más sensibles en presencia de IPTG (Fig. 19).

Estas células transformantes poseen al gen la DNA Pol I y al gen de la DNA Pol  $\beta$  por lo que presentaron una supervivencia mayor; al adicionar el inductor IPTG se estimula la producción de Pol  $\beta$ , aumentando sus niveles basales por lo cual se esperaba que aumentara aun más su índice de supervivencia, sin embargo la supervivencia fue menor.

En los trabajos realizados por Escamilla (1998), mencionan que la cepa WP1/p $\beta$ 5 presenta una supervivencia mayor cuando pol  $\beta$  esta en niveles basales y al estimular la expresión de Pol  $\beta$ , es más sensible al efecto de la luz UV. Atribuye esto a la inhibición de la actividad de Pol  $\beta$ , ya que los altos niveles de Pol  $\beta$  pueden culminar en fragmentos de degradación que eventualmente pueden competir con Pol  $\beta$  y con Pol I

Esto se ha demostrado en otros estudios donde un fragmento de 14 kDa proveniente de la degradación de Pol  $\beta$ , compite por el sustrato, actuando negativamente inhibiendo la actividad de polimerasa *in vitro*. Este dominio de 14 kDa es específico para Pol  $\beta$  porque no inhibe otras DNA polimerasas de mamíferos como Pol  $\alpha$  o Pol I de *E. coli* (Husain, *et. al.*, 1995). De igual manera, Bhathacharya y Banerjee (1997) demostraron que fragmentos de 14 y 16 kDa provenientes de la degradación de Pol  $\beta$  compiten con esta enzima dejando sin llenar saltos en la secuencia del DNA, perdiendo la actividad de polimerización.

Clairmont y Sweasy (1996), reportan que una proteína mutante de Pol  $\beta$  que presenta una deleción, actúa negativamente sobre al actividad de reparación por escisión, uno de los mecanismos en los cuales participa Pol  $\beta$ .

Nuestros datos sugieren que el aumento de los niveles de Pol  $\beta$  esta relacionado con aumento en la sensibilidad de las cepas recombinantes (Fig. 19).

Esto concuerda con los trabajos de Canitrott *et al.*, (2000) donde mencionan que Pol  $\beta$  se expresa en niveles bajos a todo lo largo del ciclo celular y demuestran que su aumento puede perturbar los pasos adecuados del proceso de NER, compitiendo con Pol  $\delta$  y/o Pol  $\epsilon$  en la síntesis del DNA aumentando la posibilidad de una mala incorporación de nucleótidos, además en excesos Pol  $\beta$  favorece la inestabilidad genética provocando aumento en la mutagénesis. Sugiere que el aumento en los niveles de Pol  $\beta$  puede jugar un papel importante en la predisposición a cáncer y/o en la progresión de tumores. Además se le encuentra sobre expresada en algunos tejidos cancerigenos como son el cáncer de seno, próstata, colon y ovario al compararlos con tejidos normales.

Servant *et al.*, (2002) investigando el papel potencial de Pol  $\beta$  en la inestabilidad genética inducida por UV, analizaron el efecto de excesos de Pol  $\beta$  a nivel celular y molecular. Ellos demostraron que las células de mamíferos que sobre expresan esta enzima son resistentes pero hiper-mutantes después de la irradiación UV. Pol  $\beta$  mediante un chequeo de prueba (bypass), repasa las lesiones, en este caso, los dímeros de pirimidina, pero con una baja eficiencia. Estos datos apoyan que Pol  $\beta$  a concentraciones superiores a las basales pueden aumentar la inestabilidad genética producida por UV.

Para investigar si Pol  $\beta$  es capaz de reforzar o sustituir la actividad de reparación, de la Pol I al efecto letal de la luz UV se comparo (Tabla 2) a las cepas WP1 (actividad Pol I completa) y WP6 (actividad de Pol I ausente).

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que las construcciones con actividad de Pol I (WP1) y actividad Pol  $\beta$  ( $p\beta 5$  y  $p\beta 6$ ) son mas resistentes al efecto letal de la luz UV por lo que podemos sugerir que Pol  $\beta$  de rata, a niveles basales puede reforzar la actividad de reparación en daños ocasionados por luz UV. Sin embargo algunos autores señalan que al aumentar sus niveles de expresión, la enzima puede competir con Pol I bloqueando la actividad de polimerización (Escamilla *et al.*, 2002) y que en excesos las células pueden ser más resistentes pero hiper-mutantes aumentando la incidencia de varios tipos de cánceres (Canitrot, 2002).

También los datos obtenidos concuerdan con Sweasy y Loeb (1992), que mostraron la habilidad de Pol  $\beta$  de rata para complementar la actividad de pol I de *E. coli*, en procesos de replicación y reparación, su trabajo abrió nuevas perspectivas para identificar secuencias mutantes, de Pol  $\beta$  de rata que dañan la función de la polimerasa.

Las construcciones carentes de actividad Pol I (WP6), al estar complementadas con Pol  $\beta$  ( $p\beta 5$  y  $p\beta 6$ ) en ausencia del inductor IPTG mostró diferencias significativas en WP6/ $p\beta 5$  vs WP6/ $pUC118$ .(Tabla 2) Aparentemente Pol  $\beta$  ayuda a incrementar el índice de supervivencia, sin embargo estas construcciones no son estables, puesto que tienen como origen de replicación a  $pUC118$  que requiere la actividad de Pol I para replicarse, esto de acuerdo a los trabajos realizados por Hernández (1994) y Escamilla (1998). A pesar de que estas construcciones carecen de la principal enzima de reparación, *E. coli* tiene otros mecanismos de reparación, por lo cual suponemos pudo sobrevivir la cepa.

Con respecto a WP6/ $p\beta 6$ , en presencia del inductor, en otros estudios realizados por Escamilla *et al.*,( 2002) menciona que al realizar la obtención de los extractos proteicos crudos de la cepa WP6/ $p\beta 6$ , para comprobar la expresión de una proteína de 40 kDa como producto del gen Pol  $\beta$  (Date y col., 1988) su perfil de proteínas fue completamente diferente que el de las demás cepas, en su lugar se formo una banda de aproximadamente 37 kDa, no obstante no se pudo asegurar ni descartar que corresponde a una forma alterada de Pol  $\beta$ , por lo que esta cepa no es un patrón adecuado de comparación.

De acuerdo a nuestros resultados Pol  $\beta$  ayuda a incrementar el índice de supervivencia, sin embargo, debido a la inestabilidad de las cepas Pol A<sup>-</sup>, no se puede concluir tajantemente que Pol  $\beta$  sustituye la actividad reparadora de la DNA Polimerasa I de *E. coli* en daños ocasionados por luz UV. Los datos de este trabajo concuerdan con los obtenidos por Escamilla *et al.*, (2002), donde sugiere que Pol  $\beta$  puede sustituir la actividad de pol I, aunque propone que deben realizarse más experimentos para confirmar o descartar esta hipótesis.

Sweasy y Loeb (1993) proponen que Pol  $\beta$  puede reemplazar la actividad de Pol I, en experimentos de daños al DNA, por agentes alquilantes en *E. coli*.

*E. coli* ha sido empleada en estudios de genes eucarióticos que reparan el DNA. Varios genes de eucariotes han sido clonados en líneas mutantes de *E. coli* para entender y examinar las similitudes y diferencias de los sistemas de reparación entre bacterias y eucariotes. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la DNA Pol  $\beta$  puede reforzar y reemplazar la actividad de *E. coli* en el procesos de reparación en daños causados por luz UV, sin embargo, se necesitan mas experimentos para poder confirmar o descartar esta posibilidad.

## XI. CONCLUSIONES

- La DNA Polimerasa  $\beta$  de rata puede participar en los procesos de reparación del daño al DNA por luz UV en *E. coli*.
- La presencia o ausencia del inductor IPTG no aumenta la velocidad de crecimiento ni el número de UFC/mL significativamente de las células transformantes *E. coli* JM109, WP1 y WP6 con los plásmidos pSC101, pUC118, p $\beta$ 5 y p $\beta$ 6.
- Las cepas recombinantes WP1/p $\beta$ 5 y WP1/p $\beta$ 6 presentan el índice mas alto de supervivencia al efecto letal de la luz UV.
- La presencia o ausencia del inductor IPTG no aumenta el índice de supervivencia en lesiones inducidas por UV de las células transformantes *E. coli* JM109, WP1 y WP6 con los plásmidos pSC101, pUC118, p $\beta$ 5 y p $\beta$ 6.
- Los niveles basales de la DNA Polimerasa  $\beta$  de rata aumentan la capacidad de reparación en *E. coli*.
- El aumento de los niveles de la DNA Polimerasa  $\beta$  se relaciona con aumento en la sensibilidad de las células transformantes *E. coli*
- La DNA Polimerasa  $\beta$  de rata ayuda a incrementar el índice de supervivencia, pero aun no queda establecido si puede sustituir la capacidad de reparación de la DNA Polimerasa I de *E. coli*.
- En este trabajo no se puede establecer si la DNA Polimerasa  $\beta$  de rata puede sustituir la capacidad de reparación de la DNA Polimerasa I de *E. coli*.

## X. LITERATURA CITADA

- Aaltonen, L. A., P. Peltomaki, F. S. Leach, P. Sistonen, L. Pylkkänen, J. P. Mecklin, H. Jarvinen, S. M. Powell, J. Jen and S. R. Hamilton. 1993. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*. **260**: 812-816.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and D., Watson. 1994. *Biología Molecular de la Célula*. Ediciones Omega. Segunda edición. España. Pág. 232-244.
- Amit, M., A. Conn, L. Shu-Xia, J. Copadi, J., Joachim and J. Sweasy. 2001. A DNA Polymerase beta Mutator Mutant with Reduced Nucleotide Discrimination and Increased Protein Stability. *Biochemistry*. **40**: 11372-11381.
- Andrej, J., I. Dianova, V. Podust, V. Bohr and G. Dianov. 2001. Human DNA Polymerase beta initiates DNA synthesis during long patch repair of reduced AP sites in DNA. *The EMBO Journal* **20**: 1477-1482.
- Beard, W.A. and S. H. Wilson. 1995. Purification and Domain Mapping of Mammalian DNA Polymerase  $\beta$ . *Meth. Enzimol.* **262**: 98-107.
- Beard, W. and S. Wilson. 2000. Structural design of a eucaryotic DNA repair Polymerase: DNA polymerase beta. *Mutat. Res.* **30**: 231-44.
- Bialek, G. and F. Grosse. 1993. An error-correcting proofreading exonuclease-polymerase that copurifies with DNA-polymerase-alpha-primase. *J. Biol. Chem.* **268**: 6024 - 6033.
- Byrnes, J. J., K. M. Downey, V. L., Black and A. G. So. 1976. A new mammalian DNA Polymerase with 3'-5' exonuclease activity: DNA Polymerase delta. *Biochemistry*. **15**: 2817-2823.
- Canitrot, Y., Hoffmann, J., Calsou, P., Hayakawa, H., Salles, B. and C., Cazaux. 2000. Nucleotide excision repair DNA synthesis by excess DNA polymerase beta: a potential source of genetic instability in cancer cells. *FASEB J.* **12**: 1765-1774.
- Chang, L.M. 1975. The distribute nature of enzymatic synthesis. *J. Mol. Biol.* **93**. 219.
- Chang L.M.S. 1976. Phylogeny of DNA Pol B. *Science* **191**. 1118-1185.
- Chang, L. and Bollom. 1982. Immunological reagents for comparasions for DNA Polymerase  $\alpha$  and DNA Polymerase  $\beta$ . *J. Biol. Chem.* **258**. 494-498.
- Clairmont, C. A. and J. B. Sweasy. 1996. Dominant negative rat DNA polymerase beta mutants interfere with base excision repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **178**: 656-66.

- Das, S. K and R. K. Fujimura. 1979. Possessiveness of DNA polymerases: a comparative study using a simple procedure. *J. Biol. Chem.* **254**:1227.
- Date, T., Yamaguchi, M., Hirose, F., Nishimoto, K., Tanihara, K. and A. Matsukage. 1988. Expression of active rat DNA polymerase beta in *Escherichia coli*. *Biochemistry.* **27**: 2983-2990.
- De Lucía P. and J. Cairns. 1969. Isolation of *E. coli* strain with a mutation affecting DNA polymerase. *Nature* **224**: 1164-1166.
- Del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarria, M., Espinoza and O., Diaz. 1998. Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2**:434-64.
- De Laat, W.L., Jaspers, N.G., and J.H. Hoeijmakers. 1999. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev.* **13**, 768-785.
- Dianov, G., Prince, A. and T. Lindhal. 1992. Generation of single-nucleotide repair patches following excision residues from DNA. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 1605-1612.
- Dianov, G., R. Prasad, S. Wilson and A. Bohr. 1999. Role of the DNA Polymerase beta in the excision step of long patch mammalian base excision repair. *J. Biol Chem.* **274**: 13741-13743.
- Doll, R. and R. Peto. 1981. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J. Natl. Cancer Inst.* **66**: 1191-1308.
- Downey, K. M., Ch. Tan and A. G. So. 1990. DNA polymerase delta: a second eucaryotic DNA replicase. *BioEssays.* **12**: 231-236.
- Dresler, S. L. and M. G. Frattini. 1986. DNA replication and UV-induced DNA repair synthesis in human fibroblasts are much less sensitive than DNA polymerase  $\alpha$  to inhibition by butylphenyl-deoxyguanosine triphosphate. *Nucleic. Acids Res.* **14**: 7093 - 7102.
- Escamilla, H. R. 1995. Construcción de un plásmido con la DNA polimerasa beta de rata compatible con *Escherichia coli* pol A-. Tesis profesional. ENCB-IPN. México.
- Escamilla, H. R. 1998. Reparación en cepas transgénicas de *Escherichia coli* con DNA polimerasa beta de rata. Tesis de Maestría. ENCB-IPN. México.
- Escamilla, H., Espinoza, L., Quintana, H., Uribe, L., Loyola A., Hernández, S. and R Maldonado. 2002. Rat DNA Polymerase substitutes the repairing activity of DNA Polymerase I in lethal effect of UV light. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **2**: 58-64.
- Filutowitz, M., and J., Roll. 1990. The requirement of IHF protein for extrachromosomal replication of de *E. coli* oriC in a mutant deficient DNA Polymerase I activity. *New Biol.* **9**: 818-827.

- Fisher, P. A. and D. Korn. 1977. DNA polymerase-alpha. Purification and structural characterization of the near homogeneous enzyme from human KB cells. *J. Biol. Chem.* **252**: 6528-6535.
- Gamas, P., Burguer, A., Churchward, G., Carol, L., Galas, D. and M., Chandler. 2000. Replication of pSC101: effects of mutations in the *E. coli* DNA binding protein IFH. *Mol. Gen. Genet.* **1**: 85-9
- Hanawalt, P. C. 1994. Transcription-coupled repair and human disease. *Science.* **266**:1957-1958.
- Hernández, E. J. 1994. Papel de la DNA Polimerasa beta en el mecanismo de reparación del DNA en *E. coli* Pol A. Tesis Profesional. ENCB-IPN. México.
- Husain, I., B. S. Morton, W. A. Berad, R. K. Shingal, R. Prasad, S. H. Wilson and J. M. Besterman .1995. Specific inhibition of DNA Polymerase beta by its 14 kDa domain; role of single-and double-stranded DNA binding and 5'-phosphate recognition. *Nucleic Acids Res.* **23**: 1597-1603
- Idriss, H., O. Al-Assar and S. Wilson. 2002. DNA Polymerase beta. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **4**: 321-4.
- Karp, G. 1996. "Cell and Molecular Biology-Concepts and Experiments". John Wiley and Sons, Inc. pp. 588-589.
- Klug, S. y R. Cummings. 1992. Conceptos de Genética. Editorial Prentice may. Quinta edición. España. Pág. 323-326.
- Kornberg, A. and T. Baker. 1992. DNA Replication. W. H. Freeman and Co. New York.
- Kosa, J. L. and J.B. Sweasy, 1999. The E249K Mutator mutant DNA Polymerase beta extends mispaired termini. *J. Biol.Chem.* **274**: 35886-35872.
- Kumar, A., S. G. Widen, K. R. Williams, P. Kedar, R. L. Karpel and S. H. Wilson. 1990. Studies of the domain structure of mammalian DNA polymerase  $\beta$ . *J. Biol. Chem.* **265**: 2124 -2131.
- Kunghland, A. 2001. Large-scale Molecular Dynamics Simulation of DNA polymerase beta complexed whit Primer/ Template DNA.
- Kunghland, A. and T. Lindhal. 1997. Second pathway for completion of human DNA base excision repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). *EMBO J.* **16**: 3341-3348.
- Kunkel, T A., R. D. Sabatino and R. A. Bambara. 1987. Exonucleolytic proofreading by calf thymus DNA polymerase  $\delta$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**: 4865 -4869

- Lawrence, C. W. and D. C. Hinkle. 1996. DNA polymerase zeta and the control of DNA damage induced mutagenesis in eukaryotes. *Cancer Surv.* **28**: 21-31.
- Maniatis, T., E., Fritsch and Sambrook, J. 1989. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> Ed. Vol. **1**, **2** y **3**. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Matsukage, A., H. Kitani, M. Yamaguchi, M. Kusakabe, T. Morita and Yoshida. 1986. Differentiation of lens and neural cells in chicken embryos is accompanied by simultaneous decay of DNA replication machinery. *Dev. Biol.* **117**: 226-232.
- Mathews K. and E. Van Holde. 2000. *Bioquímica*. Edit. McGraw Hill Interamericana Segunda ed. España. 1283 pp.
- Nicholl, Y. D., Nealon, K. and M. K. Kenny. 1997. Reconstitution of human base repair with purified proteins. *Biochemistry.* **36**: 7557-7566.
- Nishida, C., P. Reinhard and S. Linn. 1988. DNA repair synthesis in human fibroblasts requires DNA polymerase delta. *J. Biol. Chem.* **263**: 501-510.
- Nowak, R.J., Sieldecki, K. Leszek, B. Zmudzka and S. H. Wilson. 1989. Levels and size complexity of DNA polymerase Beta in rat regenerating liver and others organs. *Biochim. Et Biophys Acta.* **1008**: 203-207.
- Nowak, R., Zarebska, J. and B. Zmudzka. 1980. The DNA polymerase beta reaction with ultraviolet-irradiated DNA incised by correndonuclease. *Biochim. Biophys. Acta.* **2**: 246-56.
- Ochoa, S., Leloir, Oro, J., y A. Sols. 1986. *Bioquímica y Biología Molecular*. Salvat. España. pp.
- Ochs, K., Sobol, R., Wilson, S. and Kaina. 1999. Cells deficient in DNA Polymerase beta are hypersensitive to alkylating agent-induced apoptosis and chromosomal breakage. *Cancer Research.* **59**: 1544-1551.
- Osheroff, W., Beard, W., Wilson, S., and Kunkel, T. 1999. Base substitution specificity of DNA Polymerase beta depend on interactions in the DNA minor groove. *J. Biol. Chem.* **30**: 20749-20752.
- Prasad, R., G. Dianov, V. Bohr and S. Wilson. 2000. FEN1 stimulation of DNA polymerase beta mediates an excision step in mammalian long patch base excision repair. *J. Biol. Chem.* **6**: 4460-6.
- Rupert, C. S., Goodgal S. H and R. M. Herriott. 1958. Photoreactivation in vitro of ultraviolet inactivated *Haemophilus influenzae*. *J. Gen. Physiol.* **41**: 451-471.
- Salamanca, A. 1993. *Citogenética Humana*. Editorial. Omega. Segunda Edición. pág. 219-225.

- Sancar, G.B. (1985). Expression of a *Saccharomyces cerevisiae* photolyase gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **161**: 769-771.
- Sancar, A. 1994. Mechanisms of DNA excision repair. *Science*. **266**: 1954-1956.
- Sawaya, M. R., H. Pelletier, A. Kumar, S. H. Wilson and J. Kraut. 1994. Crystal structure of rat DNA polymerase beta: evidence for a common polymerase mechanism. *Science*. **264**: 1930 - 1935.
- Sawaya, M. R., R. Prasad, S. H. Wilson, J. Kraut and H. Pelletier. 1997. Crystal structures of human DNA polymerase  $\beta$  complexed with gapped and nicked DNA: Evidence for an induced fit mechanism. *Biochemistry*. **36**: 11205 - 11215.
- Schneider, E., B. Muller and R. Schindler. 1985. Control of DNA polymerase  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  activities in heat-and cold-sensitivite cell cycle mutants. *Biochim. Biophys. Acta*. **825**: 375-383.
- Servant, L., Cazaux, C., Bieth, A. Iwai, S., Hanaoka F. and JS. Hoffmann. 2002. A role for DNA Pol  $\beta$  in mutagenic UV lesion bypass. *J. Biol. Chem.* **51**: 50046-53.
- Sobol, R., J. Horton, R. Kuhn, H. Gu, R. Singhal, R. Prasad, K. Rajewsky and S. Wilson. 1996. Requirement of mammalian DNA polymerase beta in base excision repair. *Nature*. **379**: 183-186.
- Sobol, R., R. Prasad, A. Evensky, A. Baker, X. Yang, J. Horton and S. Wilson. 2000. The lyase activity of de DNA repair protein beta-polymerase protects from DNA-damage-induced cytotoxicity. *Nature*. **6788**: 807-10.
- Spadari S., Sala F. and Pedrali-Noy. 1982. Aphidicolin a specific inhibitor of nuclear DNA replication in eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* **7**: 29-32
- Swesy, J.B. and L. A. Loeb. 1992. Mammalian Polymerase beta can substitute for DNA Polymerase I during DNA replication in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **267**: 1407-1410.
- Swesy, J. B. and L. A. Loeb. 1993. Detection and characterization of mammalian DNA Polymerase beta mutants by functional complementation in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **10**: 4626-4630.
- Tanabe, K., E., W. Bhon, and S. H. Wilson. 1979. Steady state kinetic of mouse DNA polymerase B. *Biochemistry*, **18**: 3401.
- Tessier, A., E. Frank, E. McDonald, S. Iwais, S. Hanaoka and R. Woodgate. 2000. Misinsertion and bypass of thimyne-thimyne dimmers by human DNA Polymerase. *EMBO Journal*. **19**: 5259-5266.
- Torri, A. and P. Englund. 1995. A DNA polymerase beta in the mitochondrian of the trypanosomatid *Crithidia fasciculata*. *J. Biol. Chem.* **270**: 3495-3497.

- Wang, L., U. Patel, L. Ghosh and S. Banerjee. 1992. DNA polymerase beta mutations in human colorectal cancer. *Cancer Res.* **52**: 4824-4827.
- Wang, T. S. 1991. Eukaryotic DNA polymerase. *Annu. Rev. Biochem.* **60**: 513-552.
- Wang, T. S. and D. Korn. 1980. Reactivity of KB cell deoxyribonucleic acid polymerases alpha and beta with nicked and gapped deoxyribonucleic acid. *Biochemistry.* **19**: 1782-1790.
- Wang, Z. 2001. DNA Damage-Induced Mutagenesis: A Novel Target For Cancer Prevention. *Mol. Interv.* **1**: 269-281.
- Weissbach, A. 1979. The functional roles of mammalian DNA polymerase. *Arch. Biochem. Biophys.* **198**: 386-396.
- Wiebauer, K. and J. Jiriciny. 1990. Mismatch- specific thymine DNA glucosylase and DNA polymerase beta mediate the correction of G\* T mispairs in nuclear extracts from human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 5842-5845.
- Witkin, E. M. 1975. Elevated mutability of Pol A derivatives of *Escherichia coli* B/r sublethal dose ultraviolet light: evidence for and inducible error-prone repair system ("SOS repair") and its anomalous expression in these strains. *Genetics.* **79**: 199-213.
- Wood, R. D. and M. K. Shivji. 1997. Which DNA Polymerase are used for DNA repair in eukaryotes? *Carcinogenesis.* **4**: 605-610.
- Wood, R. D., M. Mitchell, J. Sgouros, T. Lindahl and T. Lindahl. 2001. Genes Human DNA Repair of DNA. *Science.* **5507**: 12849.
- Wu, X., Guo, D., Yuhan, F. and Wang, Z. 2001. Accessibility of DNA polymerase to repair synthesis during nucleotide excision repair in yeast cell-free extracts. *Nucleic Acids Research.* **29**: 143123-3130.
- Yamaguchi, M., K., Tanabe, Y. N. Taguchi, M. Nishizawa, T. Takahashi and A. Matsukage. 1980. Chick embryo DNA polymerase B. *J. Biol. Chem.* **20**. 9942-9948.
- Yoshida, S., K. Tamiya-Koizumi and K. Jokima. 1989. Interaction of DNA polymerases with phospholipids. *Boichim. Bhiophys. Acta.* **1007**: 61-66.
- Zar, J. H. 1984. Biostatistical analysis. Segunda Edición. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, N.J. 679 p.
- Zimmerman, W., S. Chen, A. Bolden and A. Weissbach. 1980. Mitochondrial DNA replication does not involve DNA polymerase alpha. *J. Biol. Chem.* **225**: 11847-11852.



## ABREVIATURAS

Amp	Ampicilina
amp <sup>r</sup>	gen de resistencia a ampicilina
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
APE	Endonucleasa APE
BER	Reparación por escisión de bases
dGTP	2' desoxiguanosintrifosfato
dNMP	2' desoxinucleosidomonofosfato
dNTP	2' desoxirribonucleosidotrifosfato
dRP	5' desoxirribosafosfato
dTTP	2' desoxitimidintrifosfato
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
IPTG	Isopropiltio-β-D-galactósido
KDa	Kilodaltones
Mm	Milimolar
NER	Reparación por escisión de nucleótidos
PCD	Dímero ciclobutano pirimidina
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular

$P_{lac}$	Promotor de la lactosa
PM	Peso molecular
Pol $\alpha$	DNA Polimerasa $\alpha$
Pol $\beta$	DNA Polimerasa $\beta$
Pol $\delta$	DNA Polimerasa $\delta$
Pol $\epsilon$	DNA Polimerasa $\epsilon$
Pol $\gamma$	DNA Polimerasa $\gamma$
Pol $\zeta$	DNA Polimerasa $\zeta$
Pol I	DNA Polimerasa I
RNA	Ácido ribonucleico
UDG	Uracil DNA-glicosilasa
UFC	Unidades formadoras de colonia
U. K.	Unidades Klett
UV	Ultravioleta
WTP	Polimerasa $\beta$ Silvestre
YT	Medio extracto de levadura y triptona
YT-amp	Medio YT adicionado de ampicilina