

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**PAPEL DE DIFERENTES NUCLEASAS EN LA ACTIVACIÓN DE LAS  
FUNCIONES SOS EN *Escherichia coli* POR LESIONES PRODUCIDAS POR  
RADIACIÓN GAMMA**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

JORGE HUMBERTO SERMENT GUERRERO

DIRECTOR DE TESIS: DR. JAVIER ESPINOSA AGUIRRE



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.

**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 4 de Agosto de 2008, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de DOCTOR EN CIENCIAS del alumno JORGE HUMBERTO SERMENT GUERRERO con número de cuenta 82147048 con la tesis titulada: "PAPEL DE DIFERENTES NUCLEASAS EN LA ACTIVACIÓN DE LAS FUNCIONES SOS EN *Escherichia coli* POR LESIONES PRODUCIDAS POR RADIACIÓN GAMMA", realizada bajo la dirección del DR. JESÚS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE:

Presidente:	DR. RAFAEL VILLALOBOS PIETRINI
Vocal:	DR. RAFAEL CAMACHO CARRANZA
Vocal:	DR. DAVID RENÉ ROMERO CAMARENA
Vocal:	DR. ADALBERTO EMILIO PIMENTEL PEÑALOZA
Secretario:	DR. JESÚS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE
Suplente:	DRA. ROSARIO RODRÍGUEZ ARNAIZ
Suplente	DR. MANUEL URIBE ALCOCER

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
"POR MI RAZA HABLARÉ EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F. a, 5 de Septiembre de 2008.

Dr. Juan Núñez Farfán  
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al programa de Posgrado en Ciencias Biológicas por la oportunidad que me concedió para obtener el grado de doctor

Mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología por la beca que me otorgó para realizar mis estudios de doctorado.

Quiero agradecer a los doctores Rafael Villalobos Pietrini, David Romero Camarena, Rafael Camacho Carranza, Emilio Pimentel Peñalosa, Rosario Rodríguez Arnaiz y Manuel Uribe Alcocer por la revisión y los comentarios realizados para mejorar en lo posible el presente trabajo.

Mi agradecimiento al Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre por su dirección y asesoría en la realización de este trabajo.

Agradezco muy especialmente a la M. en C. Matilde Breña Valle su apoyo y valiosa dirección a lo largo de mi vida profesional.

Agradezco a la Sra. Alicia Hernández por su ayuda técnica.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares mi agradecimiento por todas las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

Mi más profundo agradecimiento a la Universidad Nacional Autónoma de México, porque a lo largo de mi vida siempre ha estado presente: cuando niño fue sustento, cuando adolescente fue una meta, posteriormente se convirtió en un reto que hoy se conquista. Agradezco profundamente la formación académica que me ha dado, espero poder corresponder algún día.

## **DEDICATORIAS**

A mi esposa, Silvia, mi compañera inseparable en cada paso que doy.

A mis hijos, Guillermo y Cristina, mi incentivo para tratar de ser mejor día con día.

A mi madre, Gloria (Chumi), que siempre ha sido un impulso constante para mí.

A mis hermanos, Vinicio, Gloria, León, Rosa Aurora (Malú) y Patricia, apoyo incondicional a lo largo de mi vida.

Dedico muy especialmente este trabajo a mi padre, Vinicio Serment Cabrero (*qepd*), el primer, el original Doctor Serment.

## RESUMEN

La radiación ionizante produce rupturas sencillas y dobles en el DNA, así como daños diversos sobre las bases. Para contrarrestar estos daños existen diversas opciones entre las que se encuentra la respuesta SOS de *Escherichia coli*, que consiste en la activación de un grupo de genes cuando ocurren lesiones en el material genético para conferir a la bacteria mayores oportunidades de sobreponerse. Para la activación de este sistema es necesario que se generen regiones de DNA de cadena sencilla, de manera que la mayoría de las lesiones deben ser procesadas para poder inducir dicha respuesta. Se conocen algunos genes como *recO*, *recB* y *recJ*, que intervienen en dichos eventos, ya que cuando se exponen a radiación mutantes defectuosos en éstos, la actividad de SOS es menor que en una cepa silvestre. Experimentos preliminares mostraron que lo mismo ocurre en mutantes defectuosos en *xonA*. Dado que los productos de *recJ* y *xonA* son exonucleasas de cadena sencilla se consideró que podría ser un fenómeno general para ese tipo de nucleasas. Dado que la ausencia de RecBCD (Exo V) también disminuye la actividad de SOS se evaluó la participación de *recD* en estos eventos. Los resultados obtenidos indican que las cuatro exonucleasas de cadena sencilla de *E. coli* conocidas participan en el procesamiento de lesiones producidas por radiación gamma para activar SOS. Se observó que también es necesaria la participación de RecD y de algunas glucosidasas como Nth y Fpg. Con base en estos resultados se presenta un modelo que propone una explicación de cómo sucede el procesamiento de los daños para inducir la respuesta SOS.

## ABSTRACT

Ionising radiation causes different types of genetic damage, ranging from base modifications to single- and double-stranded DNA breaks, which may be deleterious or even lethal to the cell. There are different repair or tolerance mechanisms to counteract the damage. Among them is the *Escherichia coli* SOS system: a set of genes that becomes activated upon DNA damage to confer better opportunities for cell survival. However, since this response is triggered by single-stranded DNA regions, most lesions have to be processed or modified prior to SOS activation. Several genes such as *recO*, *recB* and *recJ* that seem to be required to induce the response have already been reported. The results of this work indicate that the four known *E. coli* single-strand exonucleases take part in processing gamma radiation damage, though RecJ and ExoI proved to be more important than ExoVII or ExoX. In addition, Exo V as well as glycosylases such as Nth and, to a lesser extent, Fpg are also required. A model intended to explain the role of all these genes in damage processing is presented.

## INDICE

INTRODUCCION	1
Radiación	1
Efecto biológico de la radiación ionizante	2
Reparación de lesiones en el DNA	5
Reparación por escisión	5
Reparación por recombinación	8
Reparación de disparidades en las bases	10
Respuesta SOS	11
JUSTIFICACION	14
OBJETIVOS	16
METODOLOGIA	16
Construcción de cepas	16
Exposición a radiación gamma	18
Supervivencia	18
Cromoensayo	19
RESULTADOS	21
DISCUSION	30
Supervivencia	30
Actividad de SOS	31
CONCLUSIONES	34
PERSPECTIVAS	35
REFERENCIAS	37
ANEXO I. Nucleasas	
ANEXO II. La respuesta SOS en <i>Escherichia coli</i>	
ANEXO III. <i>In vivo</i> role of <i>Escherichia coli</i> single-strand exonucleases in SOS induction by gamma radiation.	

## INTRODUCCIÓN

### Radiación

Los átomos que cuentan con un número excesivo de neutrones son inestables y pueden liberar partículas subatómicas para disminuir el exceso de energía. A este proceso se le conoce como radioactividad. La radiación se puede definir como paquetes de energía en movimiento que cuando chocan con las moléculas de otro material les transfieren dicha energía. Al hacerlo, dependiendo de la energía que posea o que deposite, puede provocar que los electrones orbitales vibren, que se exciten al pasar a niveles de energía superiores o bien que salgan de su órbita dando lugar a iones. A la radiación que tiene la capacidad de transferir la energía suficiente para que ocurra esto último se le conoce como radiación ionizante. Puede considerarse como ionizante toda aquella radiación cuya energía sea superior a 10 electrón-voltios (eV) (Casarett, 1968; Arena, 1971).

Por sus características físicas la radiación se clasifica en corpuscular y electromagnética:

La radiación corpuscular posee energía y masa pero tiene menor penetrabilidad y produce gran cantidad de ionizaciones a lo largo del limitado espacio que recorre. Un ejemplo de esta radiación son las partículas alfa ( $\alpha$ ) que son núcleos de helio formados por dos protones y dos neutrones, lo que les da una doble carga positiva. Gracias a esta carga presentan una marcada atracción electrostática hacia los electrones exteriores de los átomos a los que se acercan, provocando que éstos se exciten y cambien de orbital o bien que sean expulsados produciendo iones. Gran parte de los electrones expulsados (denominados rayos delta) tiene la suficiente energía como para a su vez producir ionizaciones secundarias que se observan como ramificaciones a lo largo de la trayectoria de la partícula alfa, con lo que aumenta el alcance de la radiación. Los rayos delta contribuyen aproximadamente con 25% del total de ionizaciones producidas por las partículas alfa. Conforme viaja, la partícula  $\alpha$  va perdiendo velocidad, lo que aumenta su poder de ionización ya que va cediendo cada vez mayor cantidad de energía hasta que finalmente captura dos electrones formando así un átomo de helio (Casarett, 1968). Las radiaciones beta ( $\beta$ ) son en realidad electrones provenientes del núcleo y según sea su carga positiva o negativa se denominan positrones o negatrones, respectivamente. Dado que las partículas  $\beta$  tienen sólo 1/7400 de la masa de las

partículas  $\alpha$  y viajan a una velocidad igual a la de la luz, es difícil que interactúen con los electrones orbitales, por lo que su penetración en la materia es mayor. Para que se dé una ionización, deben transferirse por lo menos 32.5 eV por cada impacto de la partícula  $\beta$  con electrones orbitales. Una vez perdida toda la energía, el negatrón se incorpora como electrón orbital en un átomo positivo, mientras que el positrón interactúa con un electrón orbital, eliminándose mutuamente (Casarett, 1968; Arena, 1971). Por carecer de carga, los neutrones no ionizan directamente sino que al pasar por el material ceden energía cinética al núcleo de los átomos, ocasionando la liberación de una partícula cargada (un protón), capaz de producir ionizaciones. A medida que avanzan, los neutrones van perdiendo velocidad hasta que su energía cinética iguala a la de las moléculas del material que atraviesan. En este punto se conocen como neutrones térmicos y pueden ser atrapados por prácticamente cualquier núcleo atómico al que se acerquen, con la consecuente emisión de radiación.

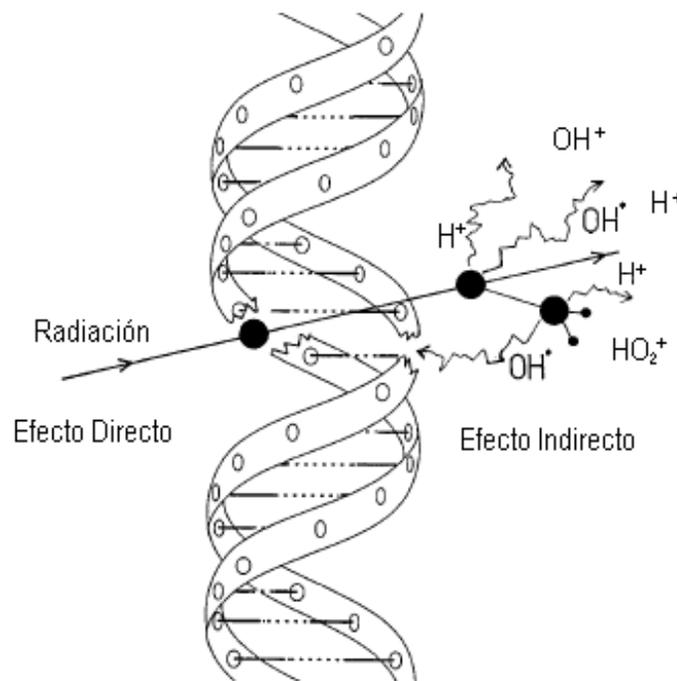
La radiación electromagnética tiene gran poder de penetración, posee energía en forma de fotones que abarcan longitudes de onda de 10 Angstroms o menores y produce ionizaciones de manera muy dispersa. Según la magnitud de la energía, afecta a los materiales de acuerdo con tres distintos mecanismos que se conocen como efecto **a)** fotoeléctrico, **b)** Compton y **c)** formación de pares. En el primer caso toda la energía del rayo se transfiere a un electrón de valencia, sacándolo de su órbita. En el segundo, parte de la energía se pierde por expulsión de un electrón de valencia y el resto continúa, también como radiación electromagnética pero desviándose de su trayectoria original y con menor energía. La tercera posibilidad se presenta con fotones de más alta energía que al pasar cerca del núcleo de un átomo son totalmente absorbidos por aquel, expulsando un positrón y un electrón (Casarett, 1968).

El cobalto-60 ( $\text{Co}_{60}$ ) es un isótopo radiactivo con una vida media de 5.27 años, que decae por desintegración beta al isótopo estable níquel-60 ( $\text{Ni}_{60}$ ). En el proceso de desintegración se emite un electrón con una energía de 315 keV y luego dos rayos gammas con energías de 1.17 y 1.33 MeV, respectivamente.

### **Efecto biológico de la radiación ionizante**

Al incidir sobre las células la radiación ionizante afecta tanto a los componentes estructurales como al material genético, pero mientras que el daño en los primeros es temporal (ya que existe la posibilidad de sintetizar nuevas moléculas para reemplazarlas), en el material genético los efectos pueden ser permanentes y traer graves consecuencias a nivel celular, tisular, en los organismos o incluso en la población, por lo que en general cuando se refiere a los efectos de la radiación se considera al DNA como la molécula blanco.

La radiación afecta al material genético de manera totalmente aleatoria en función de dos alternativas conocidas como efectos directo e indirecto. El primero se refiere a la interacción de los fotones y/o partículas ionizantes con el DNA, mientras que el segundo se debe a reacciones con los productos de la radiólisis del agua en donde ocurre la mayoría de las ionizaciones, ya que es el componente más abundante de la materia viva (figura 1).

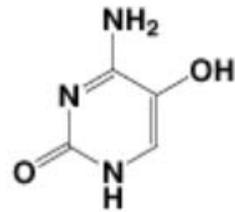


**Figura 1. Efecto directo e indirecto de la radiación ionizante sobre el DNA**

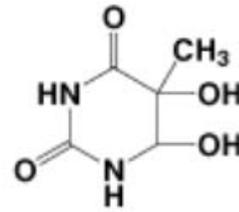
Los principales productos son iones hidroxilo (OH<sup>·</sup>), superóxido (HO<sub>2</sub><sup>·</sup>), hidronio (H<sup>+</sup>) y por subsecuentes reacciones, peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y radicales libres como el

radical hidroxilo ( $\text{OH}^\bullet$ ) (Casarett, 1968; Gentner y Paterson, 1984; Retel, 1993; Pouget y Mather, 2001). Todas estas especies son muy reactivas y pueden atacar a cualquiera de los componentes del DNA.

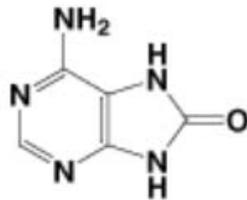
El radical hidroxilo ataca enlaces dobles, especialmente el 5-6 de las pirimidinas para dar lugar a bases oxidadas como 5,6-dihidroxi-5,6-dihidrotimina (timidín glicol) que es el aducto más frecuente (Téoule, 1987). En las purinas ocasiona la apertura del anillo de imidazol con formación de 4,6-diamino-5-formamidopirimidina o 2,6-diamino-4-hidroxy-5-formamidopirimidina en la mayoría de los casos (Friedberg, 1985; Téoule, 1987). Los radicales  $\text{OH}^\bullet$  reaccionan además con los carbonos de la desoxirribosa, sustrayendo un átomo de hidrogeno con formación de agua o rompiendo el enlace N-glucosídico, lo que genera sitiosapurínicos o apirimidínicos (sitios AP). Todos estos cambios a su vez pueden finalmente dar lugar a rupturas del DNA. Las rupturas de banda sencilla (RBS) son interrupciones en la continuidad de una de las hebras de la molécula de DNA, casi siempre por la escisión del enlace éster fosfato-carbono 3'. Las de doble banda (RDB) se producen por la coincidencia de dos rupturas sencillas en hebras opuestas (Pouget y Mather, 2001).



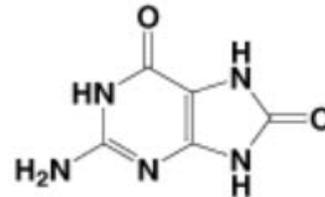
5-hidroxi-citosina



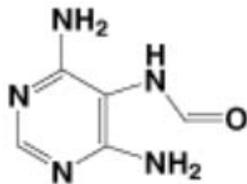
Timidín glicol



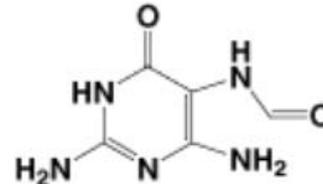
8-oxo-adenina



8-oxo-guanina



4,6-diamino-formamidopirimidina



2,6-diamino-5-hidroxi-formamido pirimidina

Figura 2. Ejemplos de bases modificadas producidas por radiación ionizante

### Reparación de lesiones en el DNA

Dado que el funcionamiento de los organismos en buena medida depende de la integridad del material genético, gradualmente han desarrollado diferentes estrategias para enfrentar o contrarrestar los daños de acuerdo con dos alternativas, la protección contra tales ataques o bien la reparación de las lesiones que aquellos causen en el genoma. Dentro de los primeros están diversos sistemas enzimáticos que neutralizan el efecto de los agentes tóxicos, inhibiendo su actividad o destruyéndolos antes de que puedan ejercer su acción sobre el genoma. Un ejemplo de estos serían los sistemas que atrapan o eliminan agentes o radicales oxidantes, evitando así que reaccionen con el DNA (Friedberg *et al.*, 1995).

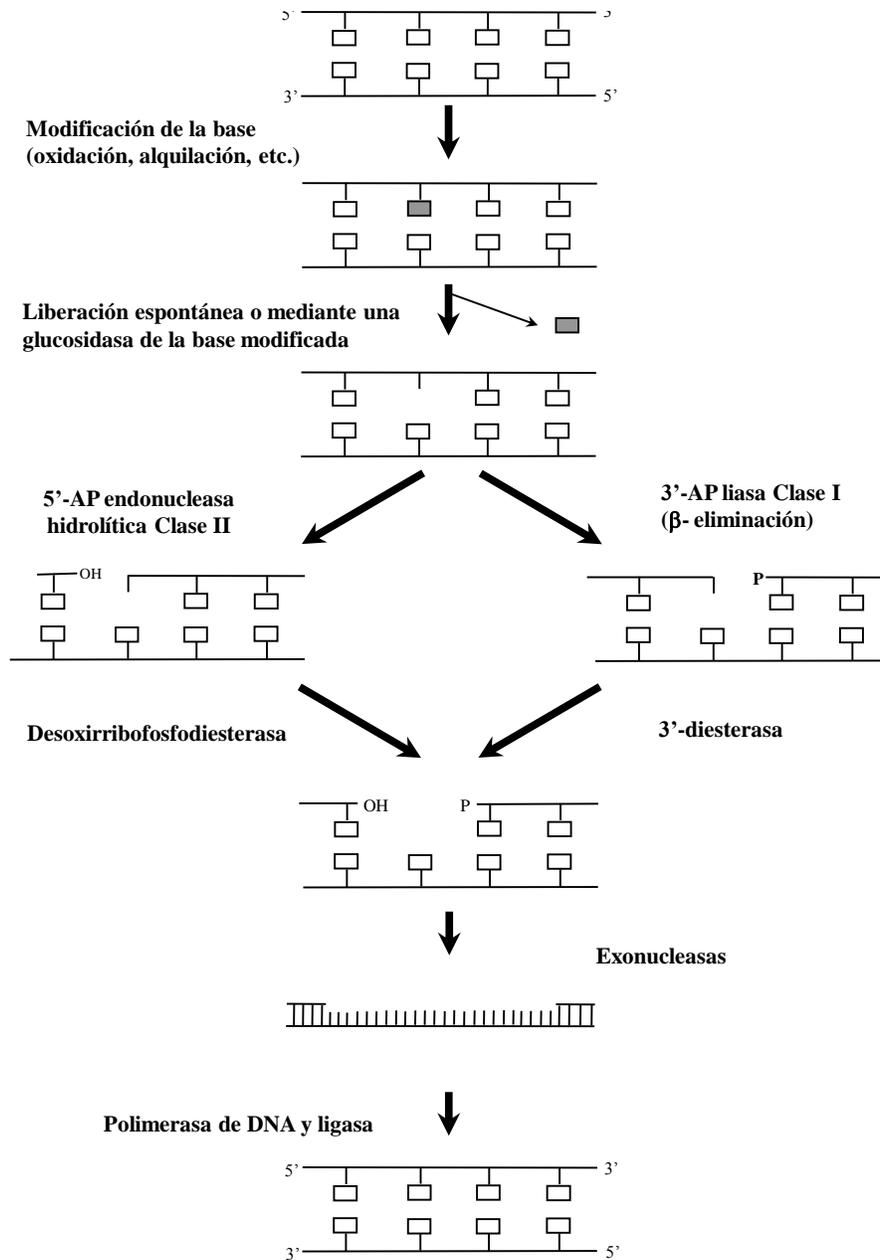
Los segundos son los sistemas de reparación que actúan directamente sobre el material genético ya dañado y poseen diferentes grados de especificidad. Algunos eliminan

directamente a la lesión restituyendo de inmediato a la estructura original del DNA y en general reconocen un solo tipo de daño. Un ejemplo clásico de mecanismo de reparación específico es la fotorreactivación, proceso en el que la enzima fotoliasa reconoce los dímeros de pirimidina que surgen por exposición a luz ultravioleta y simplemente rompe los enlaces que se formaron entre las dos pirimidinas adyacentes con lo que se restaura en un solo paso la estructura original del DNA. Otro ejemplo de este grupo es el de eliminación de grupos alquilo anormales mediante las enzimas alquil-transferasas, que sacan a estos grupos del DNA restaurando al mismo tiempo a la estructura original (revisado en Sancar *et al.*, 2004)

### **Reparación por escisión**

Hay otros procesos menos específicos que pueden reconocer distintos tipos de daños y genéricamente se conocen como mecanismos de escisión. Este tipo de reparación implica el corte y la eliminación de regiones de DNA que contengan daños, ya sea a nivel de una base (reparación por escisión de bases ó REB) o bien de tramos que incluyen un número determinado de nucleótidos (reparación por escisión de nucleótidos o REN) (Sancar *et al.*, 2004).

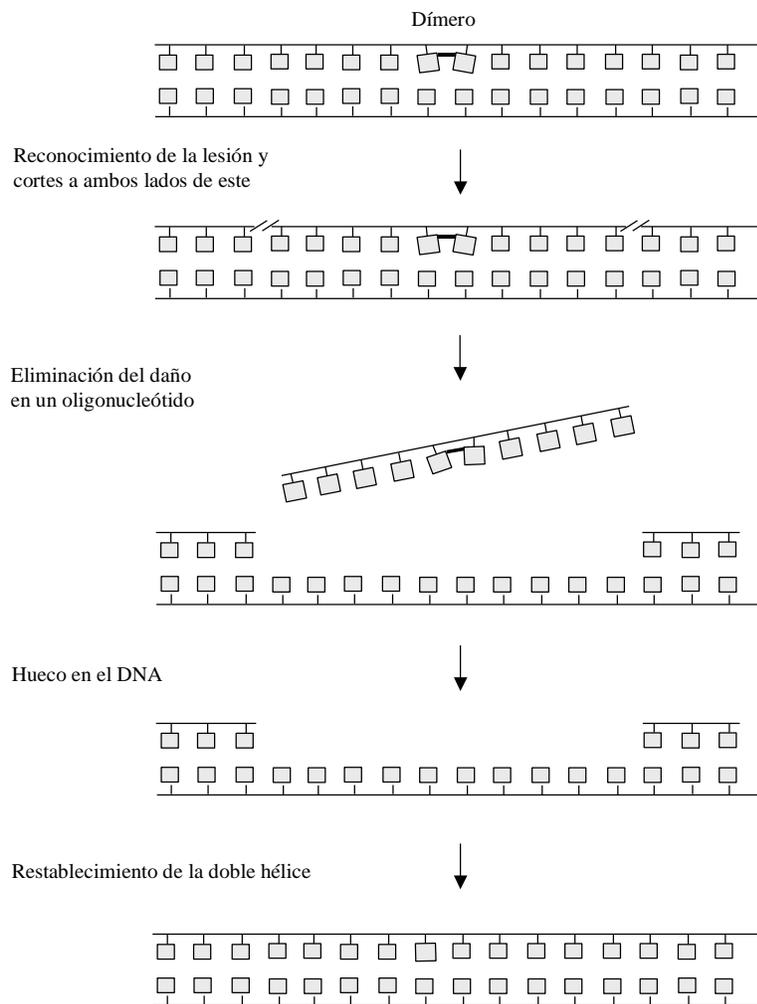
El primero se inicia con la hidrólisis del enlace N-glucosídico de la base dañada, con lo que queda un huecoapurínico o apirimidínico (sitio AP), al que reconocen enzimas, por lo mismo llamadas endonucleasas AP, que al romper el enlace éster fosfato, ya sea por hidrólisis o por eliminación  $\beta$ , dejan una ruptura en la hebra de DNA que posteriormente reparará una polimerasa (figura 3). Una característica importante de este tipo de reparación es su relativa especificidad, ya que las diferentes enzimas que participan en este mecanismo reconocen solamente cierto tipo de bases dañadas (Glassner *et al.*, 1998).



**Figura 3. Esquema de las dos alternativas para la reparación por escisión de bases (Glassner *et al.*, 1998)**

El proceso REN implica la liberación de los tramos de DNA de una sola banda que contienen el daño. Es la principal respuesta celular a modificaciones al DNA causadas por agentes muy diversos y por lo mismo puede reconocer una amplia gama de lesiones. Los pasos del proceso son: **1)** reconocimiento de la lesión, **2)** corte a ambos lados de ésta y **3)** separación del tramo que contiene a la lesión (Bhatia *et al.*, 1996). En *E. coli* todos estos pasos están a cargo de la escinucleasa ABC, también conocida como UvrABC, que consta de

tres subunidades. La subunidad A forma un dímero con gran afinidad por el DNA dañado que se adhiere a lugares donde hay alguna alteración. A esto se une la subunidad B que al formar un complejo UvrB-DNA provoca el desprendimiento de UvrA. Al complejo UvrB-DNA se une UvrC que se encarga de romper los enlaces fosfodiéster a ambos lados de la región alterada y por acción de la helicasa UvrD, se libera entonces el oligonucleótido correspondiente (figura 4). Los huecos resultantes de cualquiera de las dos alternativas antes descritas (REB ó REN) son posteriormente resintetizados por la polimerasa I de DNA (Lin y Sancar, 1992).



**Figura 4. Modelo de reparación por escisión de nucleótidos (Friedberg, 1985)**

## Reparación por recombinación

Otra opción importante de recuperación al daño es la de recombinación, que implica intercambio de material de moléculas de DNA distintas. El fenómeno de recombinación se presenta en todos los seres vivos y su único requisito es que haya al menos dos copias de DNA.

En esencia el proceso se refiere al paso de secciones de una molécula de DNA a otra diferente, ya sea en forma recíproca, es decir que haya intercambio entre ambas o no recíproca, en donde solamente una de ellas recibe material nuevo. Esta transferencia puede llevarse a cabo en regiones con secuencias similares (recombinación homóloga) o bien por la unión de extremos de DNA (recombinación no homóloga) evento que se da principalmente en eucariotes y de manera muy reducida en la mayoría de las bacterias, si bien en otras como *Deinococcus radiodurans* ó *Basillus subtilis* parece ser un mecanismo importante (Kuzminov, 1999). El proceso es muy importante ya que la recombinación es la única posibilidad de componer el daño en el caso de rupturas en la doble banda (RDB), puesto que al perderse la continuidad de la hebra de DNA no hay un molde a partir del cual resintetizarla, lo cual conduce a la muerte de la celular. Puede también intervenir para tolerar lesiones durante el proceso de duplicación de DNA: cuando la polimerasa que cataliza la síntesis del DNA nuevo encuentra una lesión ilegible (dímero, aducto, etc.), interrumpe el proceso y prosigue varios nucleótidos más adelante, dejando un hueco enfrente del sitio donde se halla el daño. Para resolver este problema la célula lleva a cabo un evento de recombinación no recíproca, en el que una molécula homóloga de DNA cede el fragmento homólogo para así rellenar el hueco que quedó en el DNA recién sintetizado (Kuzminov, 1999).

En *Escherichia coli* existen dos vías principales de recombinación homóloga, la vía RecBCD y la vía RecFOR, aunque en algunas bacterias existe también la vía RecE que depende de la presencia del profago *rac*. La más importante es la que lleva a cabo RecBCD ya que es la principal responsable de la reparación de rupturas de doble cadena. Esta enzima reconoce los extremos rotos del DNA y degrada el extremo 3' hasta encontrar una secuencia específica denominada sitio *chi* (llamado así por sus siglas en inglés crossover hotspot instigator, comúnmente se representa con la letra griega  $\chi$ ), en donde la subunidad

RecD cambia de polaridad y degrada en el lado 5' de modo que se genera un extremo 3'. Al mismo tiempo la enzima promueve la polimerización de RecA sobre esta cadena. Esta proteína por su parte, se encarga de intercambiar dicha banda con su secuencia homóloga en una molécula intacta y posteriormente la polimerasa I del DNA se encarga de sintetizar la parte faltante (Kuzminov, 1999).

La vía RecFOR por su parte se encarga de la recombinación en tramos de DNA de cadena sencilla (huecos). Cabe mencionar que estos huecos pueden formarse por la actividad de nucleasas como RecJ ó Exo I a partir de cortes de cadena sencilla o bien por la interrupción de la síntesis de DNA. Al formarse este tipo de estructuras la enzima SSB (por sus siglas en inglés single-strand binding protein) se pega a ellos para protegerlo y darle estabilidad. Posteriormente el complejo FOR (formado por las subunidades RecF, RecO y RecR) se encarga de retirar a SSB y promueve la entrada de RecA, que realiza el intercambio con la secuencia homóloga de otra molécula de DNA (Umezú y Kolodner, 1993; Umezú y Kolodner, 1994) (figura 5).

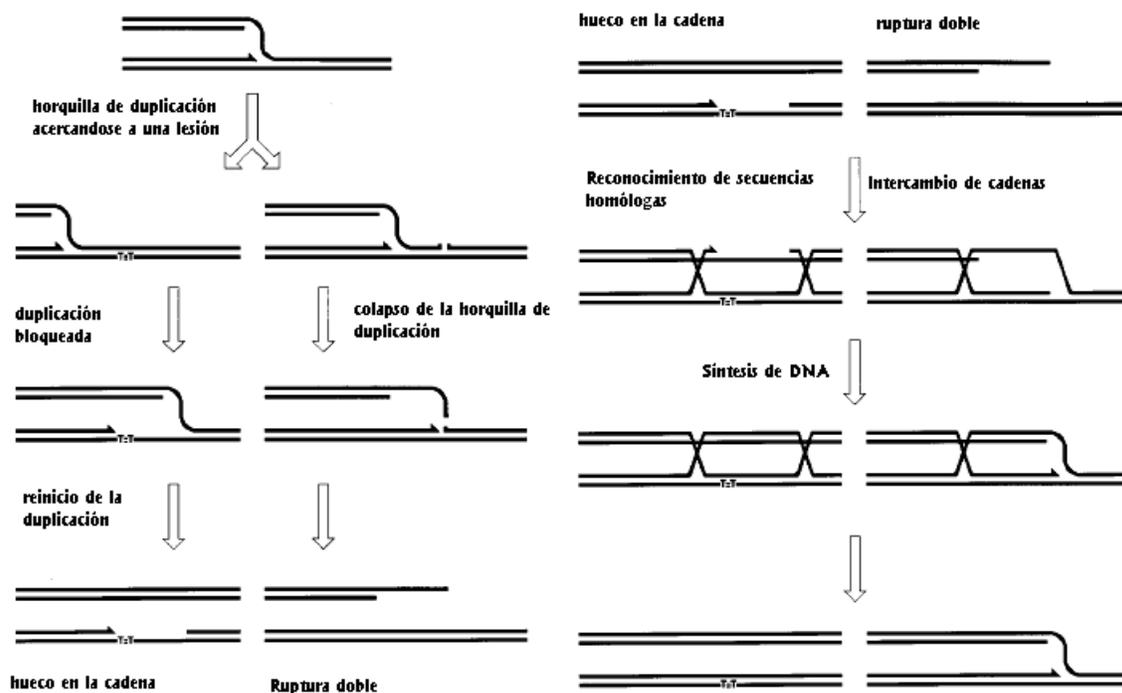


Figura 5. Vías de recombinación homóloga en *Escherichia coli* (Kuzminov, 1999)

### **Reparación de disparidades en las bases**

Además de los mecanismos mencionados, la bacteria cuenta con otros cuyo objetivo es eliminar apareamientos incorrectos que quedaron al finalizar los procesos de duplicación o de reparación del DNA, y asegurar así que la información genética se conserve fielmente. Uno de esos mecanismos es la actividad correctora de las polimerasas y reside en la función de nucleasa 3'-5', que actúa simultáneamente al proceso de polimerización. Aún así es posible que a dicha actividad de edición se lleguen a escapar bases o regiones mal apareadas, por lo que se cuenta con una alternativa más, la llamada en inglés “methyl-directed mismatch repair” que puede traducirse como reparación de disparidades determinada por metilaciones. El proceso consiste en retirar el tramo de la banda donde se encuentra(n) la(s) disparidad(es) para después ser resintetizado en la forma correcta. Se requieren dos condiciones: **1)** el reconocimiento de los apareamientos erróneos o de las estructuras en forma de asa que resulten de pérdidas o inserciones de bases y **2)** la selección y eliminación del tramo incorrecto, utilizando como guía la presencia de metilaciones periódicas a lo largo de la hebra que sirve de molde durante la síntesis (Modrich, 1991)

Las encargadas de llevar a cabo este proceso en *E. coli* son las proteínas MutS, MutL y MutH. (Modrich, 1991; Yang, 2000). Cada vez que finaliza un evento de duplicación, la proteína Dam introduce un grupo metilo en el nitrógeno 6 de cada adenina que se localice en la secuencia GATC, marcando al material genético como propio para así diferenciarlo del de otra(s) especie(s) que llegase a penetrar a la célula. A la siguiente duplicación, el DNA ya metilado sirve de molde para la síntesis de cadenas nuevas que permanecen temporalmente sin metilar. A éstas se pega MutS que reconoce a las bases erróneas y las regiones de DNA con pérdidas o inserciones extra (Parker y Marinus, 1992). A continuación se agrega MutL y por último MutH, una endonucleasa que sólo se activa cuando se une a MutS. Por su parte, MutL ayuda a establecer la unión entre ambas proteínas. Ya formado el complejo de todas estas proteínas con el DNA, se realizan cortes en las dos secuencias GATC que queden a ambos lados del error y por acción conjunta de

una helicasa y alguna exonucleasa (Harris *et al.*, 1998; Burdett *et al.*, 2001), se retira el tramo erróneo de DNA. Más adelante, la polimerasa I lo resintetiza, la ligasa restaura los enlaces fosfodiéster y finalmente Dam metila el DNA ya reparado (figura 6). Se ha comprobado que además de su papel de “retocado” al finalizar la duplicación, este sistema también corrige regiones con secuencias diferentes (*heteroduplexes*), resultado de apareamientos entre secuencias no idénticas durante la recombinación genética (Zarht y Maloy, 1997).

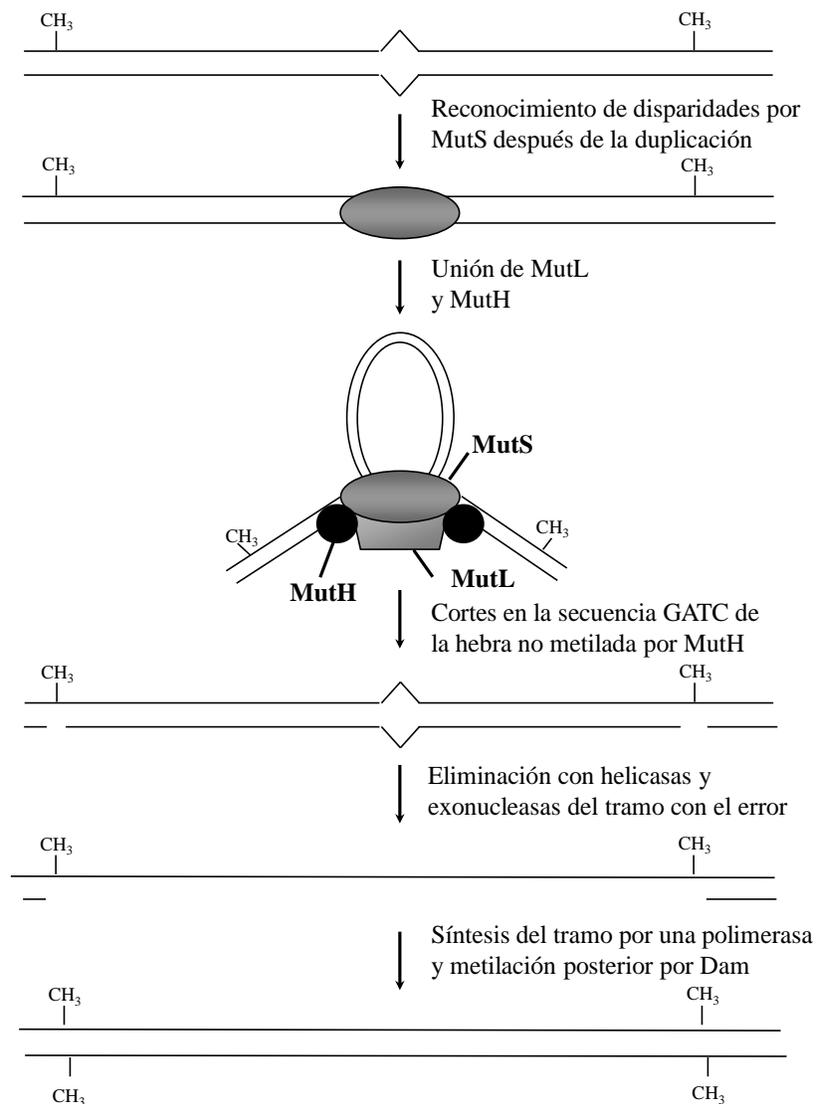


Figura 6. Reparación metil-dirigida de bases mal apareadas (Modrich, 1991)

**Respuesta SOS**

Además de los mecanismos de reparación ya mencionados existen sistemas complejos en los que participa gran cantidad de genes cuya finalidad es aumentar las posibilidades de las células a sobreponerse a un medio adverso. Dentro de esta última modalidad, en *E. coli* y algunas otras especies de bacterias se encuentra la llamada respuesta SOS (Walker, 1996). Este sistema está formado por alrededor de 60 genes de defensa cuya expresión se activa al ocurrir lesiones en el material genético (Fernández de Henestrosa *et al.*, 2000; Courcelle *et al.*, 2001).

El descubrimiento de esta respuesta surgió de los experimentos realizados por Weigle (1953), en los que observaba que al infectar *E. coli* previamente expuesta a la luz ultravioleta con el bacteriófago lambda aumentaba la cantidad total de fagos. Tiempo después el grupo dirigido por Radman observó que aunado a la reactivación Weigle, (como se llamó a dicho fenómeno) se producían otras manifestaciones como la filamentación celular y el aumento en la frecuencia de mutación (Defais *et al.*, 1971; Radman, 1976). Esto los llevó a proponer la existencia de un tipo de reparación inducible relacionado con la mutagenicidad, que se activaba en situaciones de estrés e inducía la síntesis de diversas proteínas normalmente reprimidas. Llamaron a este fenómeno respuesta SOS (por la señal internacional de auxilio “Save Our Souls”), ya que consideraron que se trataba de la última opción de las células para sobrevivir. Gudas y Pardee (1975), basándose en el hecho de que la reactivación de lambda se da por la proteólisis del represor CI y de que en algunos mutantes en los genes *recA* y *lexA* no ocurre así ni tampoco hay activación de SOS (Roberts *et al.*, 1975), proponen un esquema de regulación de dicha respuesta. Little y colaboradores (1980, 1982) trabajaron con los productos de esos genes *in vitro* y demostraron que RecA se activa y facilita la auto-degradación de LexA, con lo que elaboraron el modelo de regulación que sigue vigente.

## **Regulación**

El producto de *recA* actúa como regulador positivo y el de *lexA* como represor del sistema. LexA es un homodímero formado por dos subunidades, cada una de 22.7 kD, unidas a través de sus extremos carboxílicos (Brent y Ptashne, 1981; Schnarr *et al.*, 1985; Thliveris *et al.*, 1991). Gracias a la atracción de los extremos amino, el dímero reconoce y se pega a una secuencia consenso que se conoce como “caja SOS”, presente en todos los operadores

de los genes pertenecientes a esta vía e impide el reconocimiento por la polimerasa de RNA, con lo que bloquea la transcripción. Cuando ocurre alguna lesión o se interrumpe la síntesis de DNA se genera una señal que promueve el paso de la proteína RecA al llamado estado activo y donde funciona como coproteasa al promover la autodegradación de LexA por la ruptura del enlace peptídico Ala 84-Gly 85 que se encuentra a la mitad de la proteína. En este estado LexA es incapaz de unirse a la caja SOS con lo que se incrementa la expresión de los genes de la vía (figura 8). Un aspecto importante en cuanto a la respuesta SOS es que su actividad se puede regular de acuerdo con el grado de daño causado sobre el material genético. Así, el momento de la transcripción, la duración y el nivel de expresión de cada gen SOS varía dependiendo de la cantidad de daño que se genere y de la afinidad de cada operador de SOS por el represor LexA.

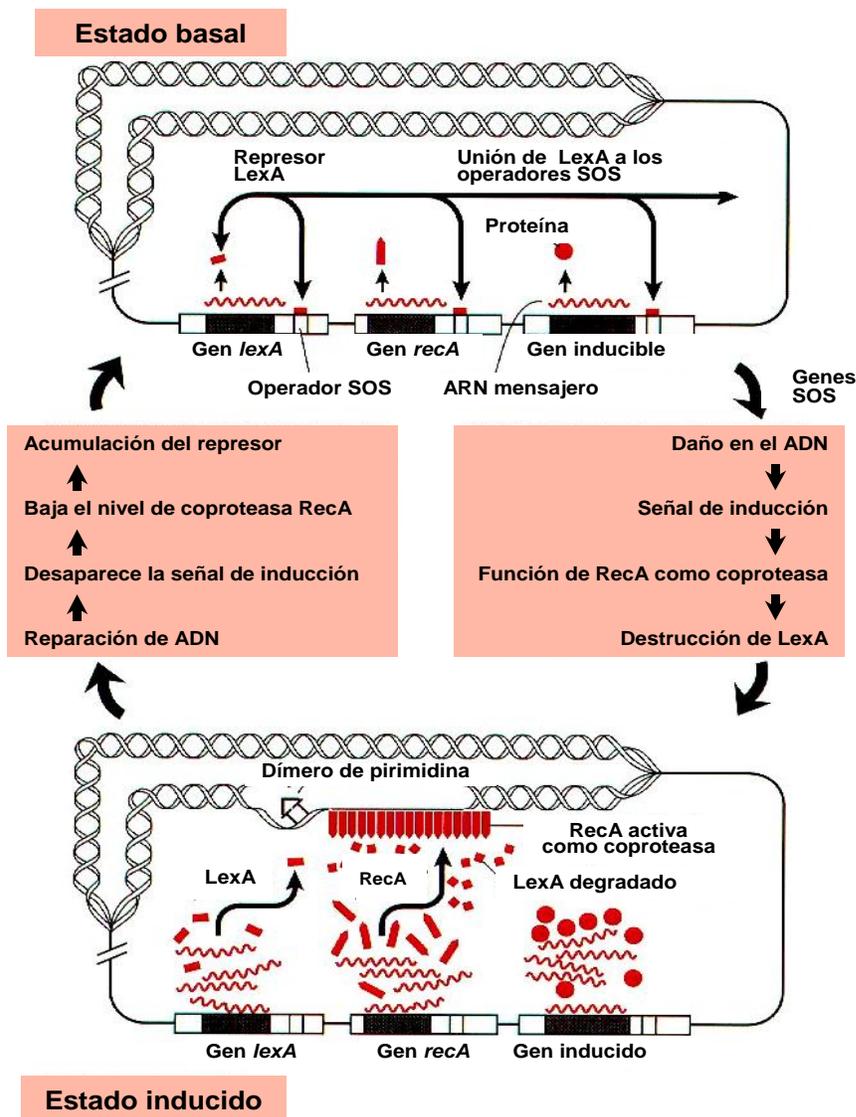


Figura 8. Regulación de la respuesta SOS

El aumento en la concentración de RecA no basta para que se inicien las funciones SOS, es necesario que la proteína se active para promover la degradación de LexA y así desencadenar la respuesta (Quillardet *et al.*, 1982). Los experimentos *in vitro* con las proteínas reguladoras purificadas han demostrado que para estimular la actividad de coproteasa de RecA son necesarios el DNA de una hebra y el ATP (Little *et al.*, 1981; Little, 1984). Adicionalmente, en experimentos *in vivo* en los que se infectaron bacterias con mutantes del fago f1, incapaces de llevar a cabo la síntesis complementaria de DNA y

que permanecen como DNA de una hebra dentro de la célula, la respuesta SOS se induce, lo que demuestra que el DNA de una sola hebra activa el regulón (Higashitani *et al.*, 1995). Esto sin embargo, explica sólo parcialmente el proceso que lleva a la inducción de SOS, ya que si bien hay una gran cantidad de agentes que alteran la estructura química del DNA, son pocos los que generan directamente las regiones de una hebra requeridas para que se active el sistema y, en general, es necesario que ocurra una serie de eventos previos. Durante el proceso de síntesis semiconservadora de DNA, la horquilla de duplicación puede encontrar lesiones o deformaciones en la estructura helicoidal del DNA que detienen o bloquean a la polimerasa, dando lugar a huecos o regiones de una hebra a los que se une RecA para iniciar el proceso que conduce a la activación de SOS (Sassanfar y Roberts, 1990). Los anillos de ciclobutano, también conocidos como dímeros de pirimidina, que resultan de la exposición a la luz ultravioleta son un ejemplo clásico de este tipo de deformaciones en la hélice de DNA. Otro caso es el de las rupturas dobles, en donde es necesaria la intervención de diversas enzimas, como helicasas y nucleasas, para que finalmente se forme el sustrato que pueda reconocer RecA y se inicie la respuesta SOS (Breña y Serment, 1998; Tavera *et al.*, 2003). Dentro de la célula existen diferentes enzimas que compiten por estas estructuras, ya sea para degradarlas (exonucleasas de una hebra) o bien para estabilizarlas, como es la proteína SSB. En este último caso es necesario que RecA se una a DNA de cadena sencilla en lugar de SSB para que se puedan reparar dichas estructuras (Umezú y Kolodner, 1994).

## JUSTIFICACIÓN

Como ya se explicó son las regiones de DNA de cadena sencilla las que activan a RecA para iniciar la respuesta SOS, sin embargo aun existen muchas incógnitas en el proceso. RecA es una proteína que normalmente se encuentra en concentraciones relativamente altas dentro de la bacteria y es necesaria para que se lleven a cabo eventos de recombinación genética. Para ello es necesario que se una también a DNA de una banda. Si en ambos casos RecA tiene que formar este complejo DNA-proteína ¿qué es lo que determina su función? ¿Cómo decide qué ruta seguir, recombinación ó SOS? ¿Son acaso eventos que compiten entre sí o que se complementan? ¿Son quizás dos alternativas para responder a situaciones de estrés? Hay que tomar en cuenta además que la respuesta SOS implica la transcripción de muchos genes, lo que le significa a la bacteria un gasto energético enorme. ¿Por qué entonces, si existen muy diversos mecanismos para enfrentar y reparar lesiones en el DNA, se ha conservado la respuesta SOS? ¿Cuál es su significado evolutivo? Existen aun muchísimas interrogantes con respecto a la activación, la función y el significado biológico de este sistema.

Uno de los aspectos importantes que es necesario explorar es el de los pasos que se siguen desde que se origina una lesión en el DNA hasta que finalmente se activa la respuesta SOS así como los genes participan en ello. Cuando se descubrió esta respuesta se pensó que cualquier tipo de lesión genética podía activarla (tan es así que a los genes de esta vía se les nombró *din* por las palabras en inglés damage inducible), sin embargo se ha observado que en la mayoría de los casos es necesario un procesamiento de las lesiones que lleve finalmente a la estructura que reconoce RecA como sustrato para activar SOS. Se han identificado ya varios genes que en mayor o menor grado parecen intervenir en este procesamiento, ya que cuando faltan o están defectuosos la actividad SOS disminuye o bien está casi totalmente inhibida. Entre estos están *recB*, *recJ* y *recO* (Hedge *et al.*, 1995; Whitby y Lloyd, 1995; Breña y Serment, 1998) y en experimentos preliminares se observó que en un mutante defectuoso en *xonA* también disminuía notablemente la actividad de dicho regulón.

El producto de *recO* actúa como parte de un complejo junto con los de *recF* y *recR* para desplazar a la proteína SSB y promover la entrada de RecA sobre DNA de una hebra. En su defecto la activación de SOS disminuye dramáticamente en bacterias expuestas a diversos agentes o a radiación gamma (Breña y Serment, 1998)). Cabe destacar que *recB*, *recJ* y *xonA* codifican para exonucleasas; el producto de *recB* es la subunidad principal del complejo RecBCD, una exonucleasa (Exo V) que reconoce extremos de DNA de doble cadena y degrada una de ellas para generar regiones de cadena sencilla que pueda reconocer RecA para la recombinación homóloga. Por otro lado, los productos de *recJ* y *xonA* son exonucleasas de una sola hebra que, a partir de rupturas dobles o bien de pequeños huecos generados por diferentes procesos enzimáticos, degradan una de las bandas de DNA y dejan regiones de una hebra que como ya se dijo es el tipo de estructura a partir de la cual se inicia SOS. Hasta el momento se han reportado en *E. coli* cuatro exonucleasas de este último tipo (RecJ, ExoI, ExoVII y ExoX) (Viswanathan y Lovett, 1999) que participan en la eliminación de bases mal apareadas, en la reparación por escisión de bases, en procesos de recombinación y posiblemente también en la formación de regiones de DNA de una banda reconocibles por RecA.

En el presente trabajo se estudia la participación de las cuatro exonucleasas de cadena sencilla con que cuenta *E. coli* así como el papel de la subunidad exonucleolítica de RecBCD (*recD*) en el procesamiento de lesiones previo a la activación de las funciones SOS. Además, dado que una buena porción de las lesiones producidas por la radiación gamma es sobre las bases, que muy probablemente se reparan por el proceso de escisión de bases descrito anteriormente, se decidió investigar también la participación de algunas glucosidasas en dichos eventos.

## **OBJETIVOS**

Los objetivos de este trabajo son:

- Estudiar el papel de diferentes exonucleasas en el procesamiento del daño al DNA.

- Determinar el papel de *recD* en el procesamiento de lesiones previo a la inducción de la respuesta SOS.
- Determinar la participación de algunas glucosidasas en procesos que lleven a la activación de SOS.

## METODOLOGÍA

### Construcción de cepas

Se construyeron mutantes de *E. coli* utilizando la técnica de transducción general mediante el fago P1 (Miller, 1992). Este fago tiene la capacidad de encapsular DNA bacteriano perteneciente a su hospedero y al infectar otra cepa, transmitir esta información. De esta manera se seleccionaron mutantes defectuosos en *recD*, *xonA*, *fpg*, *nth*, así como combinaciones de algunos de éstos con *recB* *recJ* y *recO*. Por otro lado, se construyeron mutantes con deleciones en los genes *xseA* y *exoX* usando la metodología descrita por Datsenko y Wanner (2002). Brevemente, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y usando un plásmido como molde se construyeron “cassettes de eliminación” que en medio tienen el gen que confiere resistencia a kanamicina y en ambos extremos tiene regiones de 40 bases con secuencias homólogas a las que flanquean el gen en el cromosoma bacteriano (figura 9). Los iniciadores tienen en un extremo las secuencias 5'-TGTAGGCTGG AGCTGCTTCG (“upstream”) y 5'-CATATGAATA TCCTCCTTAG, (“downstream”) que reconocen las regiones que flanquean al gen de resistencia al antibiótico en el plásmido, y en el otro extremo (extremo 5') una secuencia de 40 bases que reconocen las regiones que flanquean al gen que se quiere eliminar: para *xseA* , 5'-GACTGAATAA CCTGCTGATT TAGAATTTGA TCTCGCTCAC (“upstream”) y 5'-ATGGCTTGAT ATCGAAAAA CGCGTTGAAT TCGTGCTGGC (“downstream”); para *exoX* 5'-TCATTCCATT ACGCTAGGC TTTTTCGGCC TGGAGCATGCC (upstream) y 5'-CGCTGGCGCA GGGAACATTA CCCGCTACGC CTGCGGACTA (downstream). Estos iniciadores fueron diseñados por Feschenko y colaboradores (2003).

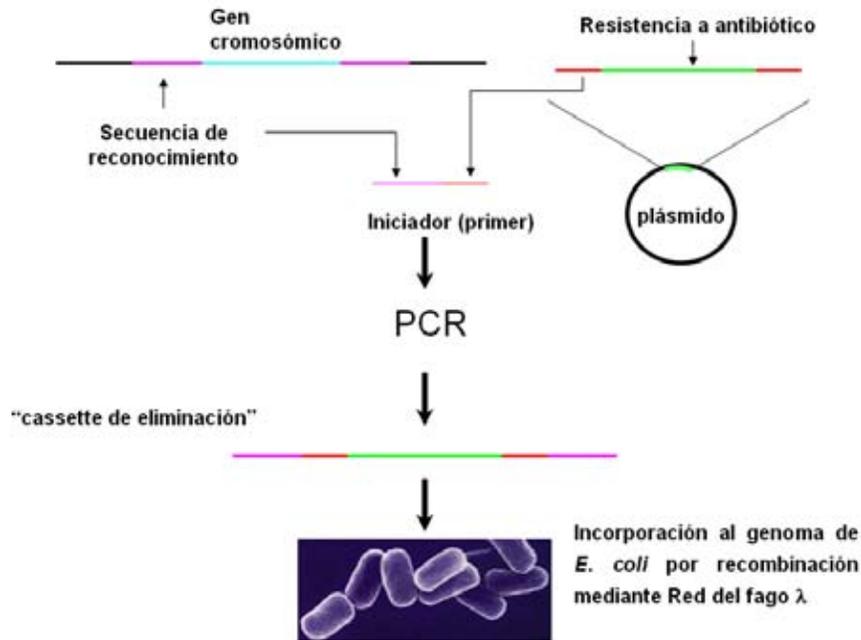


Figura 9. Construcción de cassetes de eliminación de acuerdo con la metodología descrita por Datsenko y Wanner (2002)

Con estos “cassetes” se transforman células competentes por el método descrito por Chung *et al.* (1989) a una cepa receptora que tiene un plásmido que expresa los genes del sistema de recombinación *red/gam* de lambda, de modo que al entrar el DNA lineal de doble hebra reconozca su región homóloga y se integre por recombinación al cromosoma, sustituyendo al gen blanco (en este caso *exoX* ó *xseA*) por el de la resistencia al antibiótico. Una vez obtenidas estas cepas se lisan por medio del fago P1 para que por transducción pase el defecto a PQ30 que tiene los marcadores necesarios para realizar el cromoensayo. Para la construcción de un doble mutante *xseA exoX* fue necesario eliminar la resistencia a la kanamicina de la cepa IN520 (*exoX::kan*) como lo indica la técnica propuesta por Datsenko y Wanner descrita más arriba, que da la opción de eliminar la resistencia al antibiótico después de la sustitución. Los “cassetes de eliminación” poseen secuencias de reconocimiento para la enzima de restricción FLP que flanquean al gen que confiere resistencia al antibiótico (en este caso *kan*). Usando bacterias competentes por el método de polietilenglicol, se introdujo en IN520 el plásmido pCP20 (que produce dicha enzima y confiere resistencia a cloranfenicol y a ampicilina) y se sembró en medio con estos antibióticos a 30 °C. Se seleccionó una colonia, se sembró en caldo de cultivo a 30 °C y

posteriormente se incubó a 45 °C por 30 minutos para permitir la expresión de FLP y además eliminar el plásmido. Se sembró en medio con ampicilina y se comprobó la sensibilidad a kanamicina. Una vez seleccionada la cepa IN520 sensible a kanamicina se infectó con un lisado de la cepa IN510 (*xseA::kan*) se sembró en medio con kanamicina y se recuperaron los transductantes.

### **Exposición a la radiación gamma**

A partir de los cultivos en medio sólido, se sembró una colonia en caldo de Luria-Bertani (LB) (NaCl 10 g, extracto de levadura 5 g, peptona biotriptasa 10 g/L H<sub>2</sub>O) con el antibiótico adecuado y se incubó a 37 °C con agitación constante durante 16-20 horas. El cultivo se diluyó 1:50 en LB y se incubó en idénticas condiciones hasta alcanzar una concentración de  $2 \times 10^8$  cel/ml que en nuestras condiciones equivale a densidad óptica a 600<sub>nm</sub> de 0.5. El cultivo se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante, se resuspendió el botón celular en amortiguador de fosfatos 20 mM pH 7.0 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.02 M, 880 ml, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.02 M 120 ml) y se distribuyó en tubos de cristal con tapón de rosca y se expusieron a diferentes dosis de radiación gamma de Co<sup>60</sup>. Se utilizó un irradiador tipo “Gammacell” con una razón de dosis de aproximadamente 4 Gy/minuto.

### **Supervivencia**

En microbiología se toma como supervivencia al porcentaje de bacterias que logran recuperarse y dar lugar a una colonia visible al sembrarla en medio sólido. Una vez irradiadas las bacterias se hicieron las diluciones pertinentes en amortiguador de fosfatos, se sembró por triplicado en cajas de petri con medio de Luria y se incubaron a 37 °C durante 16-20 horas. Posteriormente se contaron las colonias en cada caja y se calculó el porcentaje de supervivencia tomando como 100 % al testigo no irradiado.

### **Cromoensayo**

Para medir la actividad de las funciones SOS se utilizó la técnica del cromosensayo, descrita por Quillardet y Hofnung en 1985. En todas las cepas utilizadas en este trabajo el gen *lacZ* (que codifica para la enzima β-galactosidasa y que normalmente forma parte del operón de

la lactosa) está fusionado a *suIA*, que pertenece al grupo de genes de la respuesta SOS, de manera que su expresión depende de la activación de dicha respuesta. Para determinar la cantidad de  $\beta$ -galactosidasa se agrega un sustrato que al ser degradado por la enzima libera un color amarillo al medio, que puede medirse por espectrofotometría. En estas cepas la síntesis de fosfatasa alcalina es constitutiva, lo que sirve como indicador de síntesis de proteínas en general e indirectamente como parámetro de supervivencia.

Una vez irradiados los cultivos se tomó una alícuota, se diluyó 1:10 en LB y se incubó por una hora para permitir la expresión de la respuesta SOS. A continuación a cada tubo se agregaron tres gotas de cloroformo para romper la pared celular, se tomaron 0.3 ml y se pusieron en tubos con 2.7 ml de los amortiguadores específicos ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.1 M, 880 ml,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.1 M 120 ml pH 7 para  $\beta$ -galactosidasa ó Tris 1 M pH 8.8 para fosfatasa alcalina). Cada amortiguador tiene un detergente (SDS al 1 %) que rompe la membrana celular y libera a las enzimas al medio. Posteriormente se añadieron 0.5 ml de cada uno de los sustratos específicos para cada enzima (*o*-nitrofenil-galactopiranososa para  $\beta$ -galactosidasa y *p*-nitrofenil-fosfato para fosfatasa alcalina). Se incubaron a 37 °C hasta que se desarrolló un color amarillo y se midió por espectrofotometría a 420 nm. La determinación de SOS se basa en la intensidad de dicha coloración que es, a su vez, función del grado de actividad de ambas enzimas y cuya relación (factor R) se obtuvo de acuerdo con la formula siguiente:

En donde:

$$\mathbf{FR} = \frac{A_{420} \beta\text{-gal} \times t_{f\text{-alc}}}{A_{420} f\text{-alc} \times t_{\beta\text{-gal}}}$$

FR= Factor R  
 $A_{420}$  = Absorbencia a 420 nm  
 $\beta$ -gal =  $\beta$ -galactosidasa  
*f*-alc = fosfatasa alcalina  
 t = tiempo de reacción de cada enzima

El factor o grado de inducción de SOS (FI), se calculó al comparar los  $\text{FR}_t$  de las muestras tratadas con el  $\text{FR}_0$  del testigo

$$\mathbf{FI} = \frac{\mathbf{FR}_t}{\mathbf{FR}_0}$$

En donde:

$FR_t$  = Actividad SOS en irradiados

$FR_0$  = Actividad SOS en testigo sin irradiar

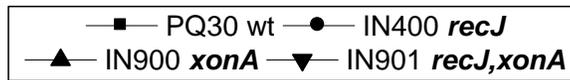
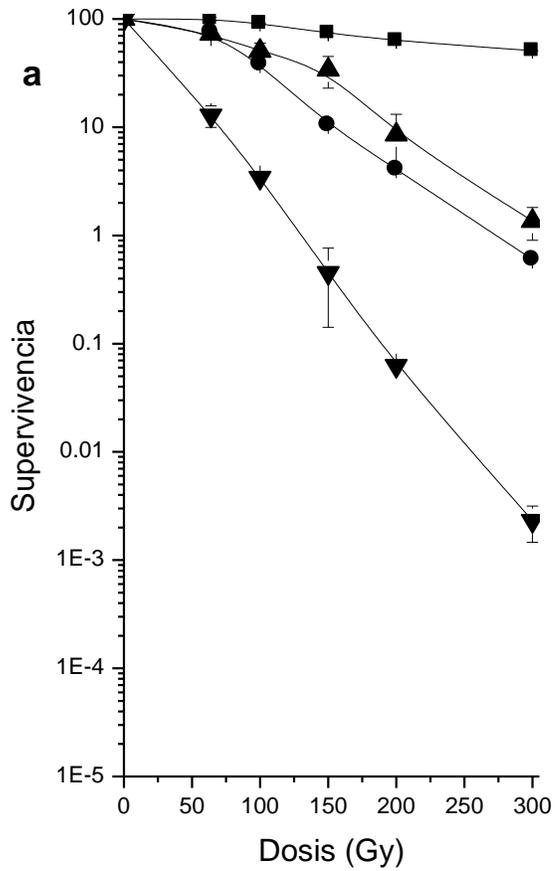
## RESULTADOS

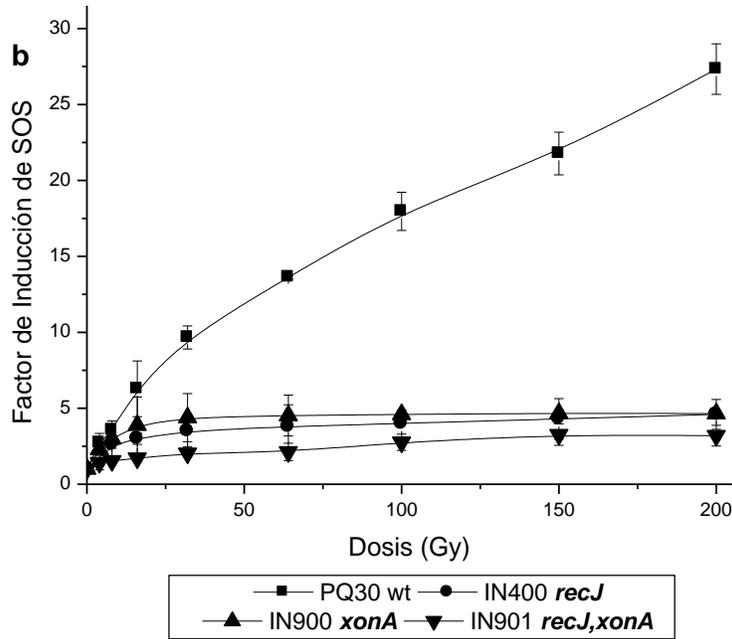
En la tabla I se muestran las diferentes cepas utilizadas en este estudio

Tabla I. Cepas de <i>Escherichia coli</i> utilizadas en el presente estudio			
Cepa	Gen defectuoso	Origen	Actividad enzimática faltante
PQ30	wt	Quillardet y Hofnung, 1985	ninguna
IN400	<i>recJ</i>	Breña y Serment, 1998	<b>RecJ</b>
IN900	<i>xonA</i>	Este trabajo	<b>ExoI</b>
IN602	<i>recB</i>	Breña y Serment, 1998	<b>ExoV</b> y helicasa <b>RecBC</b>
IN650	<i>recD</i>	Este trabajo	<b>ExoV</b>
IN510	<i>xseA</i>	Este trabajo	<b>ExoVII</b>
IN520	<i>exoX</i>	Este trabajo	<b>ExoX</b>
IN530	<i>xseA exoX</i>	Este trabajo	<b>ExoVII y ExoX</b>
IN901	<i>recJ xonA</i>	Este trabajo	<b>RecJ y ExoI</b>
IN605	<i>recB recO</i>	Este trabajo	<b>RecBCD y RecF</b>
IN610	<i>recD recO</i>	Este trabajo	<b>ExoV y RecF</b>
IN700	<i>fpg</i>	Este trabajo	<b>Glucosidasa Fpg</b>
IN750	<i>nth</i>	Este trabajo	<b>Glucosidasa Nth</b>

Todas estas cepas tienen fusionado el gen de la enzima  $\beta$ -galactosidasa (*lacZ*) a *sulA* del sistema SOS de modo que la expresión de esa enzima está controlada por dicho sistema. La actividad de ésta se evalúa agregando al medio un sustrato específico que al ser degradado libera un color cuya intensidad se mide por colorimetría. Tienen además la transcripción constitutiva de la enzima fosfatasa alcalina, cuya actividad se mide también por colorimetría y que permite monitorear la síntesis de proteínas e indirectamente da una idea de la toxicidad del tratamiento.

Se evaluó la participación de los diferentes genes de acuerdo con dos parámetros: la supervivencia, que es función de la cantidad de rupturas dobles en el genoma y el nivel de actividad SOS inducida por diferentes tipos de lesiones en el DNA mediante el cromosensayo.

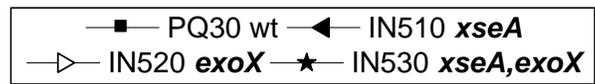
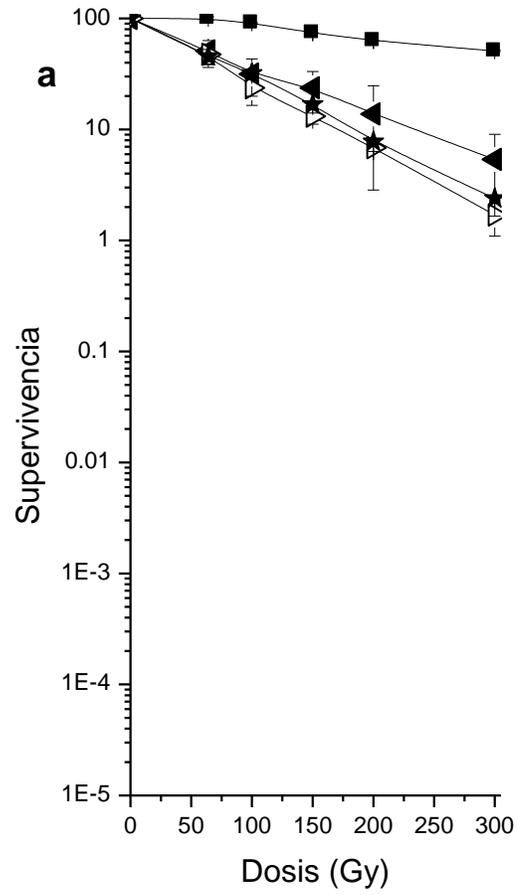


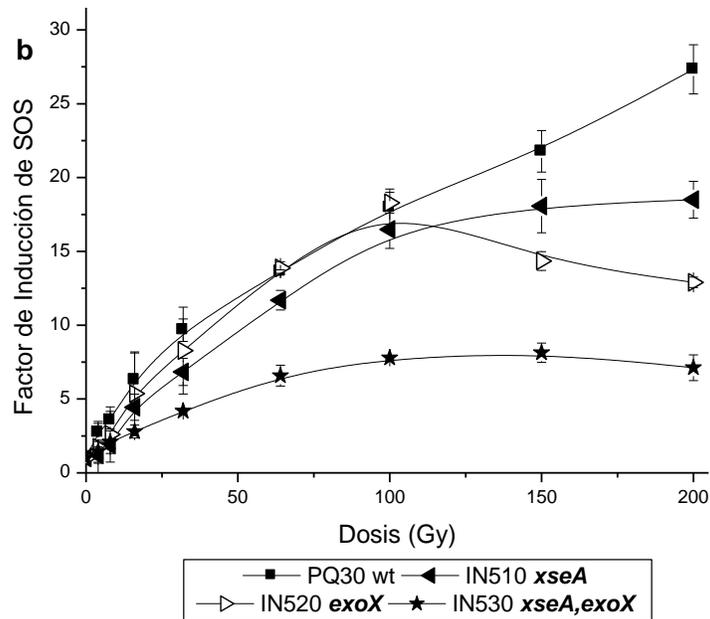


**Figura 10. a) Supervivencia y b) actividad de SOS en cepas de *E. coli* con defectos en *recJ* y *xonA* expuestas a radiación gamma**

En la figura 10a se observa el efecto de la radiación gamma en las cepas defectuosas en *recJ* ó *xonA*. A 300 Gy, los mutantes sencillos presentan una disminución en supervivencia de aproximadamente dos órdenes de magnitud con respecto a la cepa silvestre, mientras que en el mutante doble *recJ,xonA* la sensibilidad al efecto letal de la radiación es mucho mayor (cinco órdenes de magnitud a la dosis más alta) lo que sugiere que los productos de ambos genes son complementarios y que su actividad es importante en la reparación de las RDB, que originan la muerte celular.

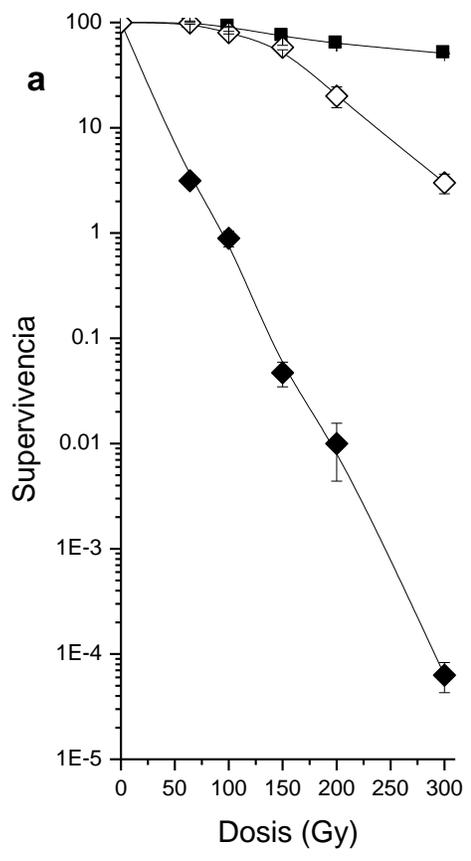
El nivel de actividad de SOS a dosis crecientes de radiación es considerablemente más bajo en los mutantes sencillos *xonA* ó *recJ* que en la cepa silvestre (cerca de cinco veces menor a la dosis más alta) y para el doble mutante es todavía más bajo lo que sugiere que ambas enzimas, RecJ y Exo I son necesarias para que, a partir las lesiones producidas por radiación ionizante, se genere DNA de una cadena. Ello también permite proponer la hipótesis de que se complementan parcialmente (figura 10b).





**Figura 11. a) Supervivencia y b) actividad de SOS en cepas de *E. coli* con defectos en *xseA* y *exoX* expuestas a radiación gamma**

Las deficiencias en *xseA* ó *exoX* ocasionan una disminución en la supervivencia de un orden de magnitud a la dosis más alta e incluso en el doble mutante *exoX,xseA* la supervivencia es similar a la de los sencillos (figura 11a) lo que indica que el producto de estos genes no contribuye substancialmente en la reparación de RDB. La actividad de SOS en estos mutantes es menor que en la cepa silvestre, si bien en la cepa deficiente en *exoX* esto sólo se observa a partir de los 100 Gy, posiblemente porque la cantidad de lesiones rebasa la capacidad de procesamiento de RecJ y ExoI, mientras que en el doble mutante *exoX, xseA* dicha disminución se observa desde las primeras dosis (figura 11b).



■ PQ30 wt    ◆ IN602 *recB*    ◇ IN650 *recD*

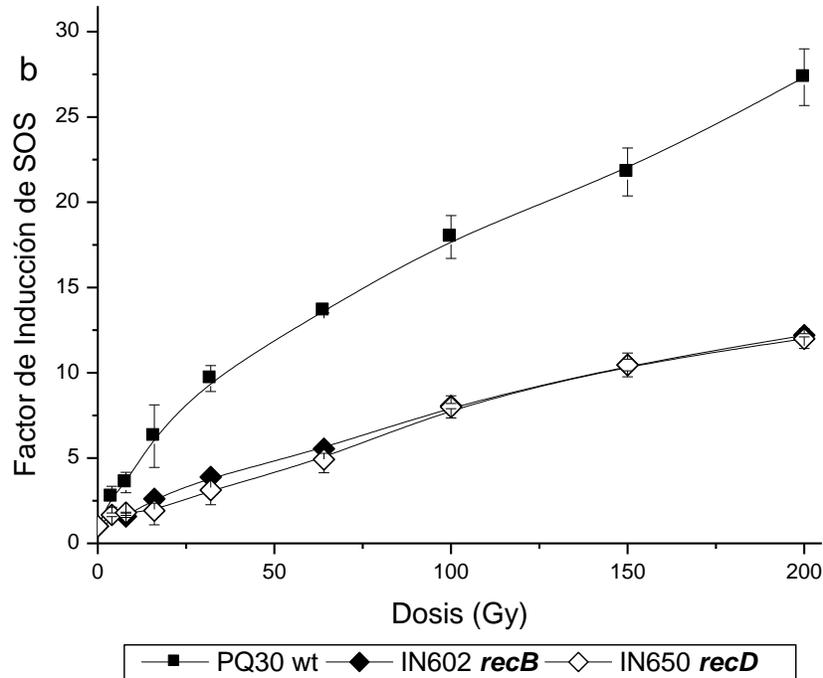
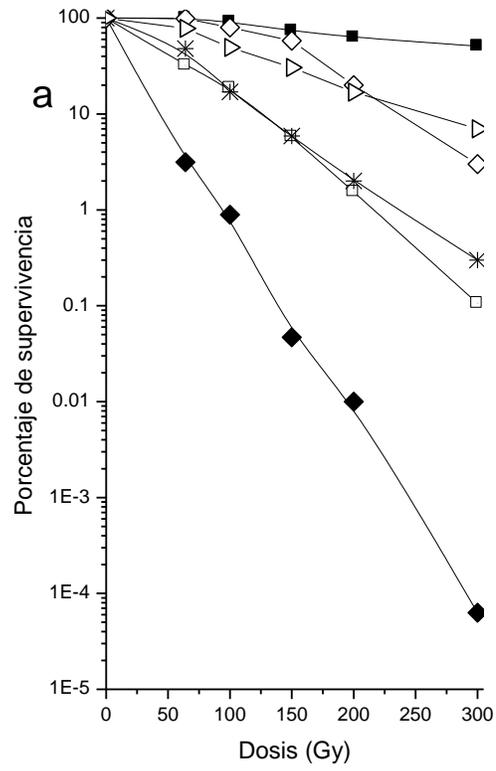


Figura 12. a) Supervivencia y b) actividad de SOS en cepas de *E. coli* con defectos en *recB* y *recD* expuestas a radiación gamma

La figura 12 muestra la supervivencia (a) y la actividad SOS (b) de las cepas con defectos en *recB* ó *recD* a dosis crecientes de radiación gamma. Como era de esperarse IN602 (*recB*) es mucho más sensible que la cepa silvestre, mientras que IN650 (*recD*) presenta una disminución de solamente un orden de magnitud a la dosis más alta. Los niveles de SOS son de aproximadamente la mitad en relación con los de la cepa silvestre PQ30 y muy similares en ambos mutantes lo que indica que la fracción de exonucleasa (ExoV) es, aunque en forma parcial, responsable de generar el sustrato necesario para la inducción de SOS.



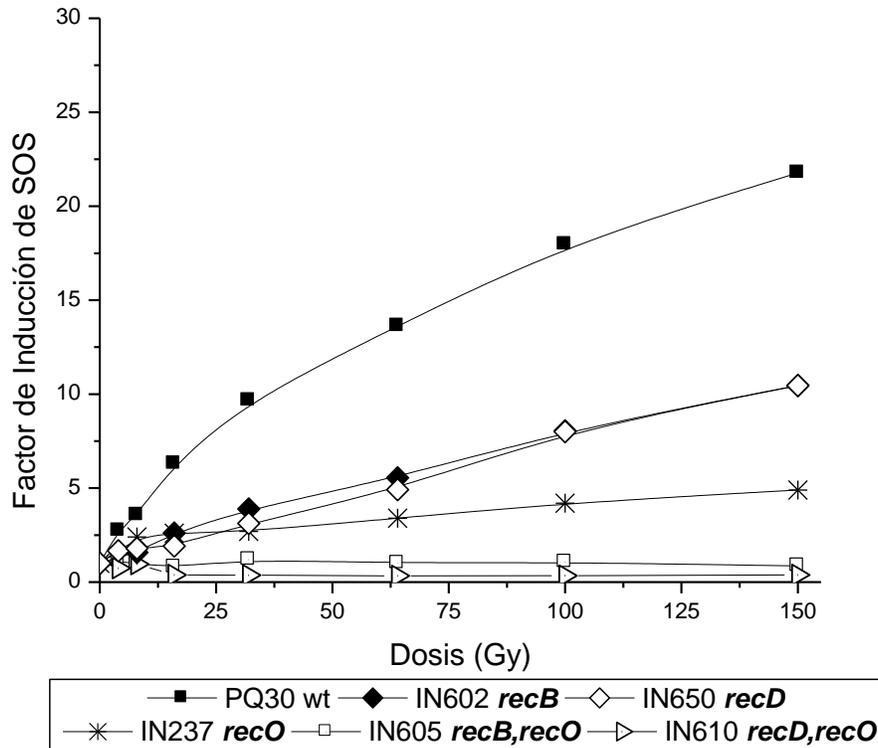
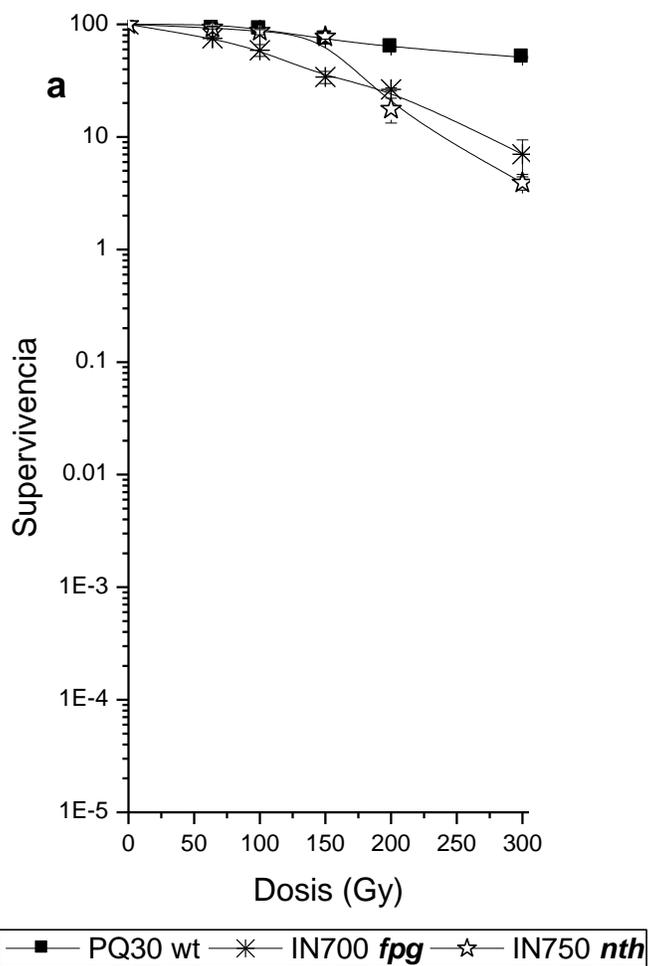
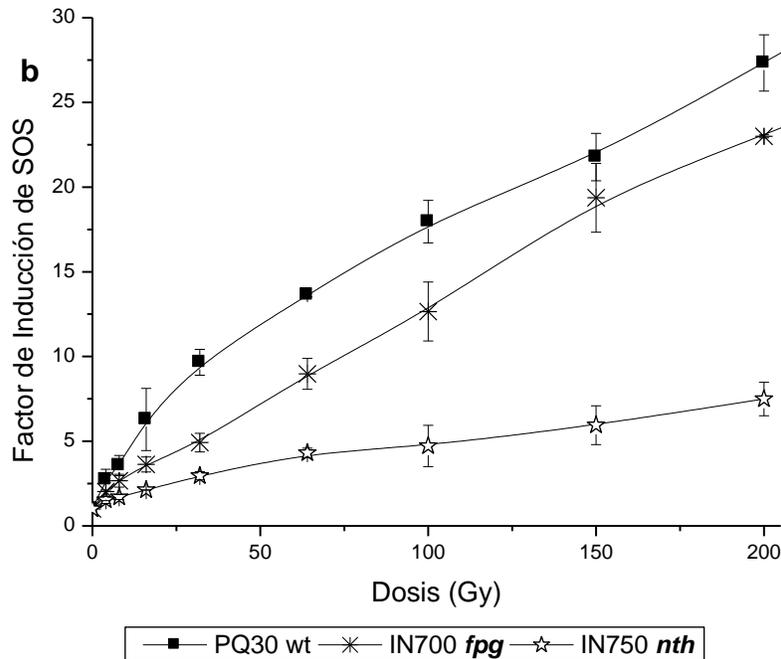


Figura 13. a) Supervivencia y b) actividad de SOS inducida por radiación gamma en mutantes de *E. coli* con defectos en las vías RecBCD y RecF

Dado que tanto los mutantes deficientes en *recB* como en *recO* tienen una actividad menor a la que presenta la cepa silvestre se construyó un mutante doble *recB,recO* para evaluar dicha actividad. La figura 13 muestra los resultados obtenidos en esta cepa defectuosa en ambas vías de recombinación. En el caso de SOS no se observó ningún aumento en la expresión basal de  $\beta$ -galactosidasa lo que apoya la idea de que para que se active la respuesta SOS es necesaria la participación de estas enzimas de recombinación para que RecA se una a DNA de cadena sencilla. La supervivencia en este mutante doble es mayor aun que la que presenta la cepa *recB* lo que es una sorpresa ya que en esta cepa se bloquearon las principales vías de recombinación y por tanto se esperaba una mayor letalidad. Cabe la posibilidad de que al no estar presentes estas enzimas se facilite la recombinación ilegítima, sin embargo esto está por comprobarse.





**Figura 14. a) Supervivencia y b) actividad de SOS inducida por radiación gamma en mutantes de *E. coli* con defectos en diferentes glucosidasas**

Es probable que además de los genes examinados haya otros más cuyos productos estén involucrados en el procesamiento de lesiones. En resultados obtenidos con una cepa defectuosa en *fpg* que codifica para una glucosidasa, se observó que al exponerla a la radiación ionizante había una disminución en la actividad de SOS en comparación con la cepa silvestre, lo cual sugiere que también podrían intervenir en procesos que generen el sustrato que pueda finalmente activar la respuesta SOS. La figura 14 muestra la actividad de SOS en los mutantes defectuosos en *fpg* y *nth*. Se observa una marcada disminución en dicha actividad, principalmente en *nth*, lo que sugiere que el mecanismo de reparación por escisión de bases en la que participan estos genes es, al menos parcialmente, responsable de la inducción de la respuesta por lesiones producidas por radiación gamma. Para confirmar esto se hicieron experimentos con hidropéroxido de *ter*-butilo, que provoca oxidaciones sobre las bases. Los resultados muestran que la actividad de SOS es menor en los mutantes con defectos en *fpg* y *nth*, así como en los defectuosos en *recJ* y *xonA* (figura 15).

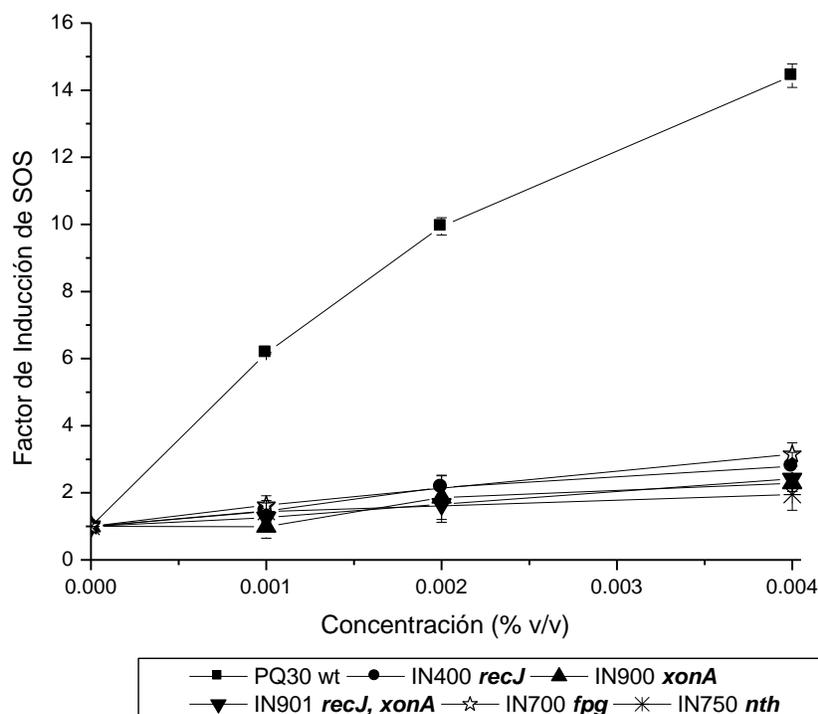


Figura 15. Activación de SOS por hidropéroxido de *ter*-butilo en cepas con defectos en algunas glucosidasas o nucleasas

## DISCUSIÓN

### Supervivencia

En *Escherichia coli* la reparación de rupturas dobles se lleva a cabo principalmente por el mecanismo de recombinación homóloga, de tal modo que los tramos de información que faltan al haber rupturas dobles, son restituidos a partir de regiones de DNA equivalentes. En términos generales el proceso ocurre así: RecBCD se une a uno de los extremos de la ruptura doble y comienza a degradar la cadena de DNA (liberando nucleótidos si es en el extremo 3' ó bien oligonucleótidos si es en el 5') hasta encontrar una secuencia específica conocida como sitio  $\chi$ . A partir de aquí se inactiva RecD y RecBC sigue funcionando como helicasa que en el extremo 3' promueve la entrada de RecA formando un filamento nucleoprotéico que se puede intercambiar con la secuencia homóloga de un tramo de DNA de cadena doble (Anderson y Kowalczykowski, 1997). Así, la cepa *recB* tiene sensibilidad muy alta a la radiación gamma, lo que coincide con reportes previos (Sargentini y Smith,

1986; Brčić-Kostić *et al.*, 1991) Cuando no está RecD, responsable de la actividad exonucleolítica, RecBC lleva a cabo la función de helicasa, de modo que la recombinación se realiza en forma eficiente y por tanto las RDBs se eliminan (Churchill *et al.*, 1999), de ahí que la letalidad causada por la radiación sea relativamente baja, casi igual que la cepa silvestre. Una limitante para el complejo enzimático RecBCD es que sólo reconoce rupturas dobles parejas así que para poder reparar las que no tienen este tipo de estructura, es necesario que tales extremos colgantes se emparejen y tal es la actividad que al parecer llevan a cabo exonucleasas como ExoI (*xonA*) y RecJ (*recJ*) (Thoms y Wackernagel, 1998). Los resultados con el mutante doble *recJ, xonA* apoyan lo anterior ya que al faltar ambas enzimas aumenta notablemente el efecto letal lo que indica que muchas RDBs permanecen sin reparar. Las otras dos exonucleasas examinadas Exo VII (*xseA*) y ExoX (*exoX*), si bien también participan, su importancia es menor ya que cuando faltan ya sea por separado o las dos juntas, el efecto letal de la radiación es mucho menor. Esto puede deberse a que la presencia de RecJ y Exo I es suficiente para realizar dicho procesamiento. Cabe mencionar que tanto Exo VII como ExoX tienen actividad limitada en la célula. Chase y Richardson (1974) usando extractos de cepas de *E. coli* defectuosas en Exo I y Exo VII y DNA desnaturizado demostraron que Exo VII es responsable de sólo del 2 al 4 % de la actividad exonucleolítica 3'; por su parte Exo X fue descubierta no por su actividad sino por similitudes con secuencias conservadas en las nucleasas de la familia DnaQ (Viswanathan y Lovett, 1999).

### **Actividad de SOS**

Como se mencionó antes para que se induzca la respuesta SOS es necesario que la proteína RecA se adhiera y forme un filamento sobre DNA de una hebra, sin embargo dado que compite con SSB (que se une al DNA de cadena sencilla para darle estabilidad por este sustrato) es poco probable que logre hacerlo por sí misma. Para ello es necesaria la participación de RecFOR (Umezú y Kolodner, 1994; Kuzminov, 1999; Shan *et al.*, 1997). Este complejo se encarga de desplazar a SSB y promover al mismo tiempo la unión de RecA en regiones de cadena sencilla (Hobbs *et al.*, 2007; Kowalczykowski, 2000). Se ha reportado que las exonucleasas RecJ y ExoI participan también en esta vía (Viswanathan *et al.*, 1999), generando el DNA de cadena sencilla para iniciar el proceso. Los datos

demuestran que las cepas con menor actividad SOS son las deficientes en estas exonucleasas, lo que sugiere que para activar dichas funciones, la unión de RecA sobre DNA de una hebra ocurre principalmente a través de la acción de RecFOR. El que los niveles de actividad de SOS en las cepas *recJ*, *xonA* y *recO* (Breña y Serment, 1998) sean prácticamente iguales sugiere que estas enzimas participan en diferentes etapas de un mismo proceso que comienza a partir de bases dañadas o rupturas de cadena sencilla y genera al final el sustrato requerido para que se inicie la respuesta.

En cambio, cuando RecA se une a DNA de una hebra por medio de la enzima RecBCD a partir de las rupturas de doble banda, se dirige principalmente a la vía de reparación por recombinación homóloga y sólo una fracción menor podría iniciar la respuesta SOS. Los datos obtenidos con los mutantes dobles *recB*, *recO* y *recD,recO*, en los que no se observa ninguna activación del sistema SOS, demuestran que tanto la vía RecBCD como RecFOR son necesarias para que se active la respuesta, lo que concuerda con lo reportado anteriormente en experimentos realizados con luz ultravioleta (Keller *et al.*, 2001; Ivančić-Baće *et al.*, 2007).

Como se mencionó anteriormente la radiación ionizante produce rupturas dobles, rupturas de cadena sencilla y daños diversos a las bases. De las primeras generalmente se encarga RecBCD dado que solamente reconoce como sustrato RDB de modo que la disminución en la actividad de SOS en la cepa *recB* indicaría la proporción de RDB que activan dicha respuesta. La respuesta similar de los mutantes *recB* y *recD* indica que la actividad de exonucleasa de la enzima es la responsable de generar el sustrato necesario para la activación de SOS. Se ha reportado que los mutantes *recD* son hiperrecombinogénicos (Churchill *et al.*, 1999) lo que sugiere que la actividad de RecBC al actuar sólo como helicasa da lugar únicamente a recombinación independientemente de los sitios  $\chi$  y no a SOS, por lo que dicha respuesta disminuye con respecto a la cepa silvestre aun cuando la supervivencia sea mucho mayor que en el mutante *recB*.

Las exonucleasas de cadena sencilla participan en muy diversos procesos dentro de la célula, como la reparación por escisión de bases (Cooper *et al.*, 1993), la reparación de

bases mal apareadas (Burdett *et al.*, 2001), la recombinación homóloga (Thoms y Wackernagel, 1998; Viswanathan y Lovett, 1998) ó la transducción mediante el fago P1 (Dermis, 2006). Las enzimas RecJ y Exo I son las principales encargadas de la degradación de DNA de cadena sencilla en *E. coli* y de acuerdo con los datos obtenidos con los mutantes defectuosos en dichas enzimas, son esenciales para que se active la respuesta SOS, mientras que la participación de Exo VII y ExoX sólo se observa en el doble mutante, lo que sugiere que sus respectivos productos participan en el procesamiento de lesiones requerido para la inducción de SOS (si bien no son indispensables) y que se complementan ya que sólo cuando faltan ambas exonucleasas la capacidad de procesamiento disminuye. Es interesante el hecho de que RecJ y Exo I, las dos exonucleasas más importantes para la activación de SOS y que presentan los mismos niveles de actividad de dicha respuesta, tienen varios puntos de coincidencia: poseen una misma estructura tridimensional que les permite tener una alta capacidad de procesamiento (Breyer y Matthews, 2000; Yamagata *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2006), actúan en los mismos mecanismos (Viswanathan y Lovett, 1998) y además tienen interacción directa con la helicasa RecQ y SSB, cuya actividad es también necesaria para que se active SOS (Han *et al.*, 2006; Sandigursky *et al.*, 1996; Shereda *et al.*, 2007).

Con base en los resultados obtenidos se propone un modelo en el que se sugiere cómo se procesan los distintos tipos de lesiones en el DNA producidos por la radiación gamma para activar la respuesta SOS, así como el papel de las enzimas involucradas en estos procesos (figura 16).

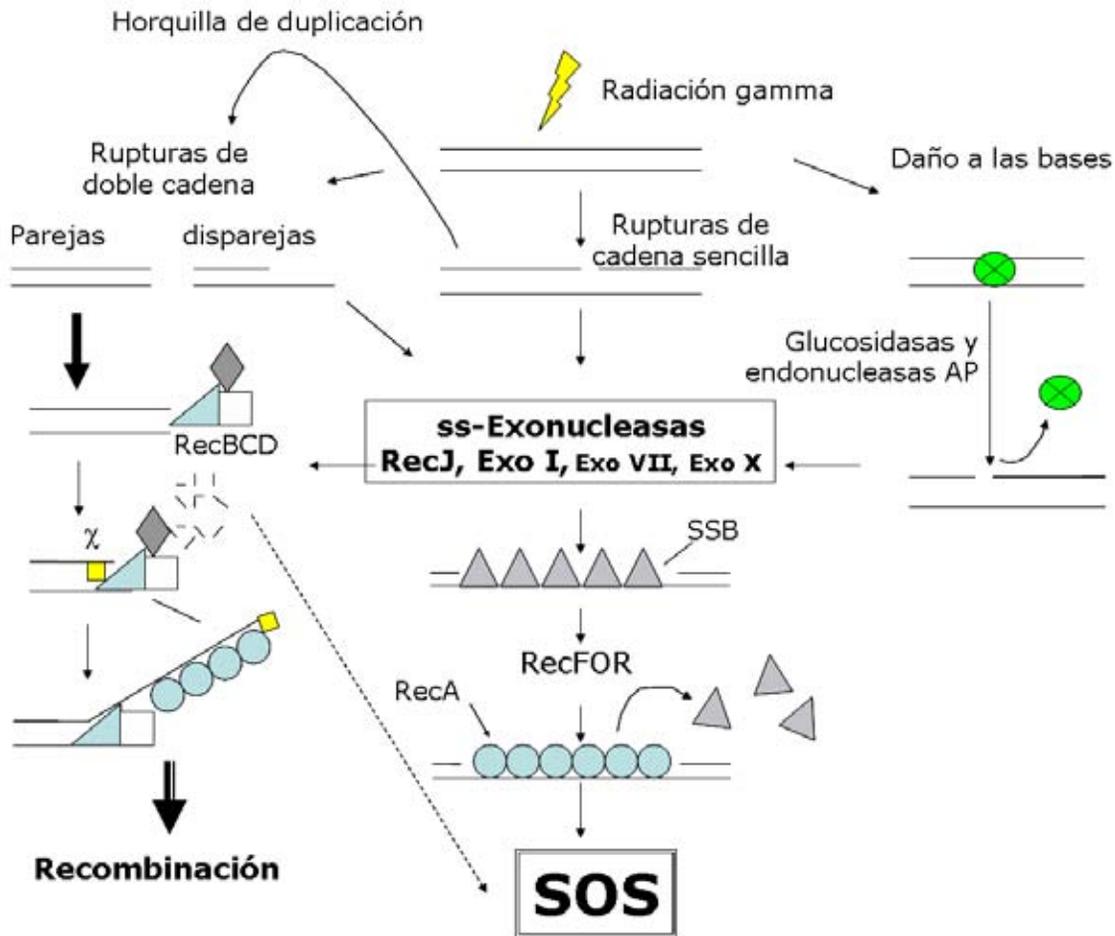


Figura 16. Alternativas de procesamiento de lesiones en el DNA producidas por radiación gamma previas a la inducción de SOS. En el lado izquierdo: las rupturas dobles parejas son reconocidas por RecBCD para dar lugar principalmente a reparación por recombinación, y sólo una pequeña parte daría lugar a SOS como lo indica la línea punteada. Al centro: los cortes de cadena sencilla son procesados por exonucleasas (principalmente Exo I y RecJ) y con la intervención de SSB y RecFOR generan el sustrato que activa SOS. Del lado derecho: las bases dañadas son reconocidas y procesadas por diferentes glucosidasas y endonucleasas AP dando lugar a cortes de cadena sencilla que seguirían la misma ruta descrita en la parte central del modelo

Para permitir que SOS se exprese al máximo los cultivos se llevan a la fase exponencial de crecimiento, lo que significa que hay varias horquillas de duplicación en proceso que al encontrar un corte de cadena sencilla lo transformará en ruptura doble. Estas RDB junto con las producidas directamente por la radiación son reconocidas por RecBCD para repararlas por recombinación homóloga y sólo una pequeña parte activaría SOS. En cuanto a los cortes de cadena que no llegan a la horquilla de duplicación pueden ser reconocidos y ampliados por exonucleasas de cadena sencilla, probablemente con la ayuda de helicasas como RecQ (Hishida *et al.*, 2004; Shereda *et al.*, 2007), para dar lugar a regiones de DNA de una sola hebra sobre las que se une primero la proteína SSB y posteriormente RecA (con

la ayuda de RecFOR) para iniciar la respuesta, como lo sugieren los resultados con los mutantes defectuosos en RecJ, Exo I y RecO, que presentan una inducción similar de SOS.

Aproximadamente el 74 % de los daños producidos por la radiación gamma ocurre sobre las bases (Gulston *et al.*, 2002). De éstos, una buena parte, como son el timidín glicol, la dihidrotimina o la formamido pirimidina, son reconocidas por las glucosidasas Nth ó Fpg (Frelon *et al.*, 2000; Shikazono *et al.*, 2006) y por la acción de endonucleasas AP se producen cortes sencillos que pueden dar lugar a rupturas dobles como se explicó anteriormente o bien con la participación de exonucleasas pueden activar la respuesta SOS (Dianov *et al.*, 1994). Anteriormente se demostró que la interrupción de la duplicación de DNA activaba la respuesta SOS (Salles y Defais, 1984; Sassanfar y Roberts, 1990). Sin embargo, contrario a lo que ocurre con las producidas por la luz ultravioleta, sólo una pequeña parte de las lesiones que produce la radiación gamma pueden bloquear las horquillas de duplicación. La diferencia que existe en los niveles de SOS entre una cepa silvestre y una defectuosa en *uvrA* expuestas a radiación gamma (Breña y Serment, 1998) es relativamente pequeña, lo que sugiere que las lesiones ilegibles para la polimerasa contribuyen muy poco en la activación de dicha respuesta (Roldán-Arjona, y Sedgwick, 1996). Los datos presentados en este trabajo así como el modelo propuesto fueron publicados recientemente (Serment-Guerrero *et al.*, 2008).

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que todas las exonucleasas de cadena sencilla estudiadas, así como algunas glucosidasas, participan en el procesamiento de lesiones producidas por la radiación gamma para generar regiones de DNA de cadena sencilla que activan la respuesta SOS. Se demostró también que la actividad de nucleasa de RecD es responsable del pequeño porcentaje de SOS que se induce a partir de rupturas dobles. Además los resultados sugieren que la respuesta SOS se activa cuando RecA se une a DNA de cadena sencilla, principalmente por medio de RecFOR y en menor medida de RecBCD.

## PERSPECTIVAS

Los datos obtenidos demuestran que las exonucleasas de cadena sencilla participan en los procesos que llevan a la activación de la respuesta SOS a partir de lesiones producidas por radiación ionizante. En el modelo se propone que esto es principalmente a partir de rupturas de cadena sencilla o bien de cortes producidos por la acción de endonucleasas AP como parte del mecanismo de reparación por escisión de bases. En ese aspecto y para confirmar dicha propuesta se realizarán experimentos con una cepa con defectos en la enzima Endo III (codificada por el gen *xth*) que lleva a cabo alrededor del 90 % de los cortes en sitios abásicos.

Por otra parte las dos exonucleasas más importantes en el procesamiento de lesiones (RecJ y Exo I) previo a la activación de la respuesta SOS degradan DNA de cadena sencilla, así que en el caso de rupturas o cortes de cadena sencilla es necesario que actúe también una helicasa. Se ha demostrado que RecJ y Exo I interactúan con la helicasa RecQ por lo que es necesario probar la participación de dicha proteína en los procesos previos a la activación de SOS.

Como se dijo antes para activar la respuesta es necesario que RecA se una a DNA de cadena sencilla. Esta unión se lleva a cabo ya sea por la vía RecBCD o por RecFOR. Los

resultados indican que SOS se activa principalmente por la vía FOR mientras que cuando RecA se une a DNA de cadena sencilla con la ayuda de RecBCD se va a recombinación principalmente. Una de las diferencias entre ambos mecanismos es la presencia de la proteína Ssb ya que RecBCD carga a RecA sobre este tipo de estructuras directamente sin la intervención de Ssb, mientras que en la vía RecFOR, RecA sustituye a dicha proteína. Es posible que la proteína Ssb sea la responsable de decidir si el filamento de RecA-DNA vaya a recombinación o a la activación de SOS.

El modelo trata de explicar el procesamiento de las lesiones producidas por radiación ionizante, sin embargo es necesario además investigar si las exonucleasas estudiadas juegan el mismo papel en lesiones producidas por otro tipo de agente genotóxico. En experimentos preliminares se observó que la cepa defectuosa en RecJ se comporta de un modo distinto cuando se les expone a luz ultravioleta (que produce principalmente los enlaces intrabanda conocidos como dímeros de pirimidina, que bloquean a la polimerasa III durante la duplicación del DNA), por lo que es necesario estudiar lo que ocurre en todos los mutantes utilizados en este trabajo.

El que en las bacterias se tengan cuatro distintas exonucleasas de cadena sencilla sugiere que este tipo de enzimas tiene gran importancia para la reparación, la duplicación y la recombinación del DNA. Sin embargo como ya se observó existen diferentes categorías ya que al parecer RecJ y Exo I son las principales encargadas de dichos procesos, mientras que Exo VII y Exo X parecen ser sólo un respaldo. A nivel evolutivo resultaría entonces interesante investigar si realmente estas últimas son capaces (y hasta qué punto) de sustituir a RecJ y Exo I en las funciones antes mencionadas.

## REFERENCIAS

- Anderson DG y Kowalczykowski SC (1997). The recombination hot spot  $x$  is a regulatory element that switches the polarity of DNA degradation by the RecBCD enzyme. *Genes & Dev.*, **11**:571–581.
- Arena V (1971). *Ionizing Radiation and Life*. Mosby, St. Louis., 453 p.
- Bhatia P, Wang Z y Friedberg E (1996). DNA repair and transcription. *Current Opinion in Genetics & Development*, **6**:146-150.
- Brčić-Kostić K, Salaj-Šmic E, Maršić N, Kajić S, Stojiljković I y Trgovčaronević Ž (1991). Interaction of RecBCD enzyme with DNA damaged by gamma radiation. *Mol. Gen. Genet.*, **228**:136-142.
- Brent R. y Ptashne M. (1981). Mechanism of action of the *lexA* gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:4204-4208.
- Breña M y Serment J (1998). SOS induction by gamma radiation in *E. coli* strains defective in repair and or recombination mechanisms. *Mutagenesis*, **13**:637-641.
- Breyer W y Matthews B (2000). Structure of *Escherichia coli* exonuclease I suggests how processivity is achieved. *Nature Struct. Biol.*, **7**:1125–1128.
- Burdett V, Baitinger C, Viswanathan M, Lovett ST y Modrich P (2001). *In vivo* requirement for RecJ, ExoVII, ExoI, and ExoX in methyl-directed mismatch repair. *Proc. Natl. Acad. of Sci. USA*, **98**:6765–6770.
- Casarett A (1968). *Radiation Biology* Prentice-Hall, Englewood, New Jersey, 367 p.
- Chase JW y Richardson CC (1974). Exonuclease VII of *Escherichia coli*; Purification and properties. *J. Biol. Chem.*, **249**:4545-4552.
- Chung CT, Niemela SL y Miller RH (1989). One-Step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**:2172-2175.
- Churchill J, Anderson D y Kowalczykowski S (1999). The RecBC enzyme loads RecA protein onto ssDNA asymmetrically and independently of  $x$ , resulting in constitutive recombination activation *Genes & Dev.*, **13**:901–911.
- Cooper DL, Lahue RS y Modrich P (1993). Methyl-directed mismatch repair is bidirectional. *J. Biol. Chem.*, **268**:11823-1182.

- Courcelle J, Khodursky A, Peter B, Brown P y Hanawalt P (2001). Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. *Genetics*, **158**:41-64.
- Datsenko KA y Wanner BL (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 6640–6645.
- Defais M, Fauquet P, Radman M y Errera M (1971). Ultraviolet reactivation and ultraviolet mutagenesis of  $\lambda$  in different genetic systems. *Virology*, **43**:495-503.
- Dermic D (2006). Functions of multiple exonucleases are essential for cell viability, DNA repair and homologous recombination in *recD* mutants of *Escherichia coli*. *Genetics*, **172**:2057-2069,
- Dianov G, Sedwick B, Daly G, Olsson M, Lovett ST y Lindhal T (1994). Release of 5'-terminal deoxyribose-phosphate residues from incised abasic sites in DNA by the *Escherichia coli* RecJ protein. *Nucleic Acids Res.*, **22**:993-998.
- Fernández de Henestrosa AR, Ogi T, Aoyagi S, Chafin D, Hayes JJ, Ohmori H y Woodgate R (2000). Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **35**:1560-1572.
- Feschenko VV, Rajman LA y Lovett ST (2003). Stabilization of perfect and imperfect tandem repeats by single-strand DNA exonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**:31134–1139.
- Frelon S, Douki T, Ravanat J, Pouget J, Tornabene C y Cadet J (2000). High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Measurement of Radiation-Induced Base Damage to Isolated and Cellular DNA. *Chem. Res. Toxicol.*, **13**:1002-1010.
- Friedberg E, Graham C y Siede W (1995). DNA repair and Mutagenesis. ASM press, Washington, USA.
- Gentner N y Paterson M (1984). Damage and repair from ionizing radiation. En: Reparable lesions in microorganisms. Edit. Hurst, A. y A. Nasim, *Academic Press*, 58-84 p.
- Glassner B Posnick L y Samson L (1998). The influence of DNA glycosilases on spontaneous mutation. *Mutat. Res.*, **400**:33-44.

- Gudas LJ y Pardee AB (1975). Model for regulation of *Escherichia coli* DNA repair functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**:2330-2334.
- Gulston M, Fulford J, Jenner T, de-Lara C y O'Neill P (2002). Clustered damage induced by gamma radiation in human fibroblasts (HF19), hamster (V79-4) cells and plasmid DNA revealed as Fpg and Nth sensitive sites. *Nucleic Acids Res.*, **30**:3464-3472.
- Han ES, Cooper DL, Persky NS, Sutera VA, Whitaker RD, Montello ML y Lovett ST (2006). RecJ exonuclease: substrates, products and interaction with SSB. *Nucleic Acids Res.*, **34**:1084–1091.
- Harris R, Ross K, Lombardo M y Rosenberg S (1998). Mismatch repair in *Escherichia coli* cells lacking single-strand exonucleases ExoI, ExoVII and RecJ. *J. Bacteriol.*, **180**:989-993.
- Hedge S, Sandler J, Clark A and Madiraju M (1995). *recO* and *recR* mutations delay induction of the SOS response in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.*, **246**:254-258.
- Higashitani N, Higashitani A y Horiuchi K (1995). SOS induction in *Escherichia coli* by single-stranded DNA of mutant filamentous phage: monitoring by cleavage of LexA repressor. *J. Bacteriol.*, **177**:3610-3612.
- Hishida T, Han YW, Shibata T, Kubota Y, Ishino Y, Iwasaki H y Shinagawa H (2004). Role of the *Escherichia coli* RecQ DNA helicase in SOS signaling and genome stabilization at stalled replication forks. *Genes & Dev.*, **18**:1886-1897.
- Hobbs MD, Sakai A y Cox M (2007). SSB protein limits RecOR binding onto single-stranded DNA. *J. Biol. Chem.*, **282**:11058-11067.
- Ivančić-Baće I, Vlašić I, Salaj-Šmic E y Brčić-Kostić K (2007). Genetic evidence for the requirement of RecA loading activity in SOS induction after UV irradiation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **188**:5024-5032.
- Keller KL, Overbeck-Carrick TL y Beck DJ (2001). Survival and induction of SOS in *Escherichia coli* treated with cisplatin, UV-irradiation, or mitomycin C are dependent on the function of the RecBC and RecFOR pathways of homologous recombination. *Mutat. Res.*, **486**:21–29.

- Kowalczykowski SC (2000). Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication. *Trends Biochem. Sci.*, **25**:156-165.
- Kuzminov A (1999). Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage  $\lambda$ . *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63**:751–813.
- Lin J y Sancar A (1992). Active site of (A)BC excinuclease. II. Binding, bending, and catalysis mutants of UvrB reveal a direct role in 3' and an indirect role in 5' incision. *J. Biol. Chem.*, **267**:17688–17692
- Little JW (1984). Autodigestion of *lexA* and phage  $\lambda$  repressors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**:1375-1379.
- Little JW, Edmiston SH, Pacelli LZ y Mount DW (1980). Cleavage of *Escherichia coli* LexA protein by RecA protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**:3225-3229.
- Little JW, Mount DW y Yanisch-Perron CR (1981). Purified LexA protein is a repressor of the *recA* and *lexA* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**:4199-4203.
- Little JW y Mount DW (1982). The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. *Cell*, **29**:11-22.
- Miller J (1991). *A short course in bacterial genetics: A laboratory manual and handbook for Escherichia coli and related bacteria*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY. 456 p.
- Modrich P (1991). Mechanisms and biological effects of mismatch repair. *Annu. Rev. Genet.*, **25**:229-253.
- Parker B y Marinus M (1992). Repair of DNA heteroduplexes containing small heterologous sequences in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**:17301734.
- Pouget JP y Mather SJ (2001). General aspects of the cellular response to low and high LET radiation. *Eur. J. Nucl. Med.*, **28**:541-561.
- Quillardet P y Hofnung M (1985). The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. *Mutat. Res.*, **147**:65-78.
- Quillardet P, Moreau PL, Ginsburg H, Mount DW y Devoret R (1982). Cell survival, UV reactivation and induction of prophage lambda in *Escherichia coli* K12 overproducing RecA protein. *Mol. Gen. Genet.*, **188**:37-43.

- Radman M (1975). Phenomenology of an inducible mutagenic DNA repair pathway in *Escherichia coli*: SOS repair hypothesis; in Molecular and Environmental Aspects of Mutagenesis (eds. Sherman, S., Miller, M., Laurence, C. & Tabor, W.H.) 128-142 (Charles C. Thomas Publisher, Springfield, USA, 1976).
- Retel J, Hoebee B, Braun J, Lutgerink J, Akker E, Wanamarta A, Joenje H y Lafleur V (1993). Mutational specificity of oxidative DNA damage. *Mutat. Res.*, **299**:165-182.
- Roberts JW, Roberts CW y Craig NL (1975). *Escherichia coli recA* gene product inactivates phage lambda repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**:4714-4718.
- Roldán-Arjona T y Sedgwick B (1996). DNA base damage induced by ionizing radiation recognized by *Escherichia coli* UvrABC nuclease but not Nth or Fpg proteins. *Mol. Carcinog.*, **16**:188-196.
- Salles B y Defais M (1984). Signal of induction of *recA* protein in *E. coli*. *Mutat. Res.*, **131**:53-59.
- Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Ünsal-Kaçmaz K y Linn S (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.*, **73**:39-85.
- Sandigursky M, Mendez F, Bases RE, Matsumoto T y Franklin WA (1996). Protein-protein interactions between the *Escherichia coli* single-stranded DNA-binding protein and exonuclease I. *Radiat. Res.*, **145**:619–623.
- Sargentini NJ y Smith KC (1986). Quantitation of the involvement of the *recA*, *recB*, *recC*, *recF*, *recJ*, *recN*, *lexA*, *radA*, *radB*, *uvrD*, and *umuC* genes in the repair of X-Ray-induced DNA double-strand breaks in *Escherichia coli*. *Radiat. Res.*, **107**:58-72.
- Sassanfar M y Roberts J (1990). Nature of the SOS-inducing signal in *Escherichia coli* ; the involvement of DNA replication. *J. Mol. Biol.*, **212**:79-96.
- Schnarr M, Pouyet J, Granger-Schnarr M y Daune M (1985) Large scale purification, oligomerization, equilibria, and specific interaction of the LexA repressor of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **24**:2812-2818.

- Serment-Guerrero J, Breña-Valle M y Espinosa-Aguirre JJ (2008). *In vivo* role of *Escherichia coli* single-strand exonucleases in SOS induction by gamma radiation. *Mutagenesis*, **23**:317-323.
- Shan Q, Bork JM, Webb BL, Inman RB y Cox MM (1997). RecA protein filaments: End-dependent dissociation from ssDNA and stabilization by RecO and RecR proteins. *J. Mol. Biol.* **265**:519-540.
- Shereda R, Bernstein DA y Keck J (2007). A central role for SSB in *Escherichia coli* RecQ DNA helicase function. *J. Biol. Chem.*, **282**:19247-19258.
- Shikazono N, Pearson C, O'Neill P y Thacker J (2006). The roles of specific glycosylases in determining the mutagenic consequences of clustered DNA base damage. *Nucleic Acids Res.*, **34**:3722–3730
- Tavera L, Breña M, Pérez M, Serment J y Balcázar M (2003). Response to alpha and gamma radiations of *Escherichia coli* strains defective in repair or protective mechanisms. *Radiat. Meas.*, **36**:591-595
- Téoule R (1987). Radiation-induced DNA damage and its repair. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.*, **51**:573-89.
- Thliveris AT, Little JW y Mount DW (1991). Repression of the *Escherichia coli* *recA* gene requires at least two LexA protein monomers. *Biochimie* **73**:449-455.
- Thoms B y Wackernagel W (1998). Interaction of RecBCD enzyme with DNA at double-strand breaks produced in UV-irradiated *Escherichia coli*: Requirement for DNA end processing. *J. Bacteriol.*, **180**:5639-5645.
- Umezumi K y Kolodner R (1993). Biochemical interaction of the *Escherichia coli* RecF, RecO, and RecR proteins with RecA protein and single-stranded DNA binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**: 3875–3879.
- Umezumi K y Kolodner R (1994). Protein interactions in genetic recombination in *Escherichia coli*: Interactions involving RecO and RecR overcome the inhibition of RecA by single-stranded DNA binding protein. *J. Biol. Chem.*, **269**:30005-30013.
- Viswanathan M, Lanjuin A. y Lovett ST (1999). Identification of RNase T as a high-copy suppressor of the UV sensitivity associated with single-strand DNA exonuclease deficiency in *Escherichia coli*. *Genetics*, **151**:929–934.

- Viswanathan M, y Lovett ST (1998). Single-strand DNA specific exonucleases in *Escherichia coli*: roles in repair and mutation avoidance. *Genetics*, **149**:7–16.
- Viswanathan M y Lovett ST (1999). Exonuclease X of *E. coli*, a novel 3'-5' DNase and DnaQ superfamily member involved in DNA repair. *J. Biol. Chem.*, **274**:30094-30100.
- Walker GC (1996). The SOS response of *Escherichia coli*. In Neidhardt, F.C., *et al.*, (eds), *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and molecular biology*. ASM Press, Washington, DC, pp. 1400-1416.
- Weigle JJ (1953). Induction of mutation in a bacterial virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **39**:628-636.
- Whitby C y Lloyd R (1995). Altered SOS induction associated with mutation in *recF*, *recO* and *recR*. *Mol. Gen. Genet.*, **246**:174-179.
- Yamagata A, Kakuta Y, Masui R y Fukuyama K (2002). The crystal structure of exonuclease RecJ bound to Mn<sup>2+</sup> ion suggests how its characteristic motifs are involved in exonuclease activity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **99**:5908–5912.
- Yang W (2000). Structure and function of mismatch repair proteins. *Mutat. Res.*, **460**:245-256.
- Zahrt T y Maloy S (1997). Barriers to recombination between closely related bacteria: MutS and RecBCD inhibit recombination between *Salmonella typhimurium* and *Salmonella typhi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*; **94**:9786-91.

## ANEXO I

### Nucleasas

Las nucleasas son enzimas que hidrolizan enlaces fosfodiéster en ácidos nucleicos y que juegan un papel muy importante en muchos y muy diversos procesos celulares como la duplicación, la recombinación, la restricción y la reparación.

Nucleasas	Inespecíficas con respecto al azúcar	
	Específicas con respecto al azúcar	DNAsas
		RNAsas

De acuerdo con el tipo de azúcar que reconocen las nucleasas se dividen en dos grandes grupos, azúcar inespecíficas y azúcar específicas. El primer grupo degrada ácidos nucleicos sin importar el tipo de azúcar que contengan, mientras que las del segundo grupo sí distinguen entre la ribosa y la desoxirribosa, esto es RNAsas y DNAsas (Brnakova y Godany, 2002). Del primer grupo, en *Escherichia coli* sólo se ha reportado una que se localiza en la zona periplásmica, la endonucleasa I (Jekel y Wackernagel, 1995).

Las nucleasas de RNA como su nombre lo indica reconocen y cortan RNA. Intervienen en diferentes procesos dentro de la célula como la iniciación de la duplicación (RNasa H) ó la regulación en la expresión de mRNA (RNasa E). Sin embargo, considero que es poco conveniente abundar en este tema ya que se aleja del contexto general de este trabajo por lo que me limito a mencionarlas con fines de clasificación

### **Endonucleasas de DNA**

Las endonucleasas son enzimas que reconocen un sustrato específico y cortan el DNA en un solo sitio. Dentro de esta categoría se encuentran las glucosidasas (como Fpg, EndoIII, EndoIV, etc.), enzimas que reconocen bases dañadas o erróneas, como es el caso del producto del gen *ung* que corta los uracilos que pudieran haberse incluido en el DNA y rompen el enlace N-glucosídico para crear un sitio AP. Las endonucleasas AP (como es el producto de *xthA*), reconocen este tipo de sitios abásicos lo que permite romper los enlaces fosfoestéricos y generar un corte (nick) en una de las cadenas del DNA. Dentro de las endonucleasas se encuentra también MutH que junto con MutS y MutL forma un complejo que durante la reparación metil-dirigida de bases mal apareadas corta los sitios de la cadena recién sintetizada que contengan disparidades debidas a errores ocurridos durante la duplicación (Friedberg, 2003).

Entre las endonucleasas se encuentran también las que participan en los procesos de restricción-modificación, sistemas que evitan el ingreso de DNA ajeno a la célula. Por sus características se clasifican en cuatro tipos distintos.

- Tipo I. estas enzimas son complejos proteicos codificados por los genes *hsd* que poseen dos subunidades R, esenciales para la restricción, dos subunidades M que

catalizan la metilación y una subunidad S que se encarga del reconocimiento específico de la secuencia (Dryden *et al.*, 2001).

- Tipo II. Reconocen y cortan secuencias específicas de DNA. Casi siempre requieren  $Mg^{2+}$  como cofactor. Dentro de este tipo se encuentran las enzimas de restricción utilizadas en técnicas de biología molecular. Generalmente reconocen secuencias palindrómicas y cortan en ambas cadenas de manera asimétrica (Pingoud y Jeltsch, 2001; Roberts y Macelis, 2003).
- Tipo III. Se componen de dos genes, *mod* y *res*, que codifican para dos subunidades que funcionan en el reconocimiento o restricción. Mientras que la metilación (sólo una de las cadenas de DNA se metila) se puede realizar sin la presencia de Res, la restricción necesita de las dos subunidades y requiere de la hidrólisis de ATP. La enzima interactúa con dos copias de la secuencia de reconocimiento (que es no palindrómica) orientadas de manera inversa y corta a una distancia específica de una de ellas (Roberts *et al.*, 2003).
- Tipo IV. Constan de una o dos proteínas y su característica principal es que cortan solamente secuencias metiladas. En este grupo se encuentran los sistemas McrA, McrBC y Mrr de *E. coli* (Roberts *et al.*, 2003).

### **Exonucleasas de DNA**

Las exonucleasas de DNA son enzimas que degradan progresivamente ya sea una de las cadenas o ambas cadenas de la molécula. Entre las que reconocen DNA de doble cadena se encuentra RecBCD (*exoV*) que es la principal responsable de la recombinación homóloga y de la reparación de rupturas dobles y además degrada cualquier DNA lineal que entre a la célula, en lo que podría definirse como un mecanismo de defensa (Kuzminov, 1999). Se encuentra también ExoIII que cumple una doble función ya que no solo reconoce DNA de doble cadena sino que además actúa como endonucleasa (EndoVI) de sitios abásicos. Está también ExoVIII, el producto de los genes *recE* y *recT* (pertenecientes al fago *rac*) que participa en la vía de recombinación alterna RecE (Lin y Deutscher, 1993).

Exonucleasas de <i>Escherichia coli</i> (tomado de Lin y Deutscher, 1993)		
Exonucleasa	Gen	Sustrato
ExoI	<i>xonA (sbcB)</i>	Cadena sencilla
ExoII (polimerasa I)	<i>polA</i>	Actividad correctora 3'-5'
ExoIII, (Endo VI)	<i>xthA</i>	Doble cadena
ExoIV, tipos A y B	¿?	Oligonucleótidos
ExoV	<i>recB, recC, recD</i>	Doble cadena
ExoVI	<i>polA</i>	Actividad 5'-3'
ExoVII	<i>xseA, xseB</i>	Cadena sencilla
ExoVIII	<i>recE</i>	Doble cadena
ExoIX	<i>Xni</i>	Doble cadena
ExoX	<i>exoX</i>	Cadena sencilla
RecJ	<i>recJ</i>	Cadena sencilla
Polimerasa II	<i>polB (dinA)</i>	
Polimerasa III	<i>dnaQ (mutD)</i>	

En *E. coli* se han identificado a la fecha cuatro diferentes exonucleasas de cadena sencilla que intervienen en diversos procesos dentro de la célula: ExoI, ExoVII, ExoX y RecJ. Todas ellas participan en la reparación metil-dirigida de bases mal apareadas y al menos RecJ y ExoI participan también en la reparación por escisión de bases. Se ha propuesto además la intervención de estas dos últimas en el proceso de reparación de rupturas dobles mediante la enzima RecBCD, modificando extremos disparejos para crear el sustrato que reconoce dicha enzima. Se ha demostrado además que RecJ, con ayuda de una helicasa

como RecQ es capaz de generar DNA de una hebra con extremos 3' para iniciar la reparación de rupturas dobles (Viswanathan y Lovett, 1998, 1999; Thoms y Wackernagel, 1998).

## Referencias anexo I

- Brnakova Z y Godany A (2002). Microbial sugar non-specific nucleases. *Biologia, Bratislava*, **57**:677-687.
- Dryden DT, Murray NE y Rao DN (2001). Nucleoside triphosphate-dependent restriction enzymes. *Nucleic Acids Research*, *29*:3728-3741
- Friedberg EC (2003). DNA damage and repair. *Nature*, **421**:436-440
- Jekel M y Wackernagel W (1995). The periplasmic endonuclease I of *Escherichia coli* has amino-acid séquense homology to the extracellular DNases of *Vibrio cholerae* and *Aeromonas hydrophila*. *Gene*, *154*:534-540.
- Kuzminov A (1999). Recombinational repair of damage in *Escherichia coli* and bacteriophage  $\phi$ . *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63**:751-813.
- Lin S y Deutscher MP (1993). The nucleases of *Escherichia coli*. In: Nucleases. Eds. LinS, RS Lloyd y RJ Roberts, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA. p 499.
- Pingoud A y Jeltsch A (2001) Structure and function of type II restriction endonucleases. *Nucleic Acids Research*, *29*:3705–3727.
- Roberts RJ, Belfort M, Bestor T, Bhagwat AS, Bickle TA, Bitinaite J, Blumenthal RM, Degtyarev SK, Dryden DTF, Dybvig K, Firman K, Gromova ES, Gumpport RI, Halford SE, Hattman S, Heitman J, Hornby DP, Janulaitis A, Jeltsch A, Josephsen J, Kiss A, Klaenhammer TR, Kobayashi I, Kong H, Krüger DH, Lacks S, Marinus MG, Miyahara M, Morgan RD, Murray NE, Nagaraja V, Piekarowicz A, Pingoud A, Raleigh E, Rao DN, Reich N, Repin VE, Selker EU, Shaw P, Stein DC, Stoddard BL, Szybalski W, Trautner TA, Van Etten JL, Vitor JMB, Wilson GG y Xu S

- (2003). A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic Acids Research*, **31**:1805-1812.
- Roberts RJ y Macelis D (2003). REBASE-restriction enzymes and methylases. *Nucleic Acids Research*, **31**:418-420
  - Thoms B y Wackernagel W (1998). Interaction of RecBCD enzyme with DNA at double-strand breaks produced in UV-irradiated *Escherichia coli*: Requirement for DNA end processing. *J. Bacteriol.*, **180**:5639-5645.
  - Viswanathan M y Lovett ST (1998). Single-strand DNA-specific exonucleases in *Escherichia coli*: roles in repair and mutation avoidance. *Genetics*, **149**:7-16.
  - Viswanathan M y Lovett ST (1999). Exonuclease X of *E. coli*, a novel 3'-5' DNase and DnaQ superfamily member involved in DNA repair. *J. Biol. Chem.*, **274**:30094-30100.

## ANEXO II

- Serment-Guerrero J, Breña-Valle M y Espinosa Aguirre JJ (2005). La respuesta SOS en *Escherichia coli*. TIPS Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, **8**:99-105.

<http://www.medigraphic.com/pdfs/revespciequibio/cqb-2005/cqb052e.pdf>

## ANEXO III

- Serment\_Guerrero J, Breña-Valle M y Espinosa-Aguirre JJ (2008). *In vivo* role of *Escherichia coli* single-strand exonucleases in SOS induction by gamma radiation. *Mutagenesis*, **23**:317-323.

<http://mutage.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/gen017v1>

## LA RESPUESTA SOS EN *Escherichia coli*

JORGE SERMENT-GUERRERO<sup>1</sup>, MATILDE BREÑA-VALLE<sup>1</sup> Y JAVIER ESPINOSA-AGUIRRE<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Lab. de Genética Microbiana, Depto. de Biología, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Carretera México-Toluca s/n, La Marquesa, Ocoyoacac, C.P. 52750. Apdo. Postal 18-1027, C.P. 11801, México, D.F. <sup>2</sup>Depto. de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Apdo. Postal 70228, C.P. 04510, México, D.F. E-mail: [josg@nuclear.inin.mx](mailto:josg@nuclear.inin.mx)

### RESUMEN

Todos los organismos están expuestos a sufrir el ataque de diversos agentes que pueden alterar la estructura química básica de su material genético, como la luz ultravioleta, metabolitos como las aflatoxinas que producen los hongos, o incluso especies reactivas de oxígeno que se generan como producto de la respiración. Para contrarrestar tal efecto a lo largo de la evolución se han desarrollado y seleccionado diferentes estrategias o mecanismos que le permiten sobreponerse a dichas eventualidades. Dentro de éstas se encuentra la respuesta SOS, durante la cual se incrementa la expresión de un grupo de genes cuya función es la de reparar el daño en el DNA y conferir a la célula más oportunidades de sobreponerse y sobrevivir en condiciones de estrés<sup>1</sup>.

**Palabras Clave:** *lexA*, *recA*, reparación de DNA, respuesta SOS.

### ABSTRACT

Living organisms are continuously exposed to genetic damage caused by a wide diversity of agents, either external, such as radiations and different types of biomolecules, or internal, such as free radicals and reactive oxygen species generated during oxidative metabolism. DNA damage may in turn lead to mutations and cellular or organismic death. Therefore, to cope with such effects and in order to minimize risks, different strategies have evolved in time. Among those strategies, there is the bacterial SOS response, a group of genes related to repair and damage tolerance mechanisms and whose expression rises upon DNA damage. As a result, chances of cell recovery and bacterial survival to stress have considerably increased.

**Key words:** *lexA*, *recA*, DNA repair, SOS response.

### HISTORIA

**E**l descubrimiento de esta respuesta surgió de los experimentos realizados por Weigle, en los que observaba que al infectar *Escherichia coli* previamente expuesta a la luz ultravioleta con el bacteriófago lambda aumentaba la cantidad total de fagos<sup>2</sup>. Tiempo después el grupo de Radman observó que aunado a la reactivación Weigle, como se llamó a dicho fenómeno, se producían otras manifestaciones como la filamentación celular y el aumento en la frecuencia de mutación<sup>3,4</sup>. Esto los llevó a proponer la existencia de un tipo de reparación inducible relacionado con la mutagenicidad, que se activaba en situaciones de estrés e inducía la síntesis de diversas proteínas normalmente reprimidas. Llamaron a este fenómeno respuesta SOS (por la señal internacional de auxilio "Save Our Souls"), ya que pensaron que se trataba de la última posibilidad de las células para sobrevivir. Posteriormente Gudas y Pardee<sup>5</sup>,

basándose en el hecho de que la reactivación de lambda se da por la proteólisis del represor CI y de que en algunos mutantes en los genes *recA* y *lexA* no ocurre así ni tampoco hay activación de SOS<sup>6</sup>, proponen un esquema de regulación de dicha respuesta. Little y colaboradores<sup>7,8</sup> trabajaron *in vitro* con los productos aislados de esos genes y demostraron que RecA se activa y facilita la auto-degradación de LexA, con lo que elaboran el modelo de regulación que sigue vigente hasta nuestros días.

### REGULACIÓN

El producto de *recA* actúa como regulador positivo y el de *lexA* como represor del sistema. LexA es un dímero formado por dos subunidades cada una de 22.7 kD, unidas a través de sus extremos carboxílicos<sup>9-11</sup>. Gracias a la atracción de los extremos amino, el dímero reconoce y se pega a una secuencia consenso conocida como "caja SOS", presente en todos los operadores de los genes pertenecientes a esta vía, e impide el reconocimiento por la polimerasa de RNA con lo que bloquea la transcripción

(Figura 1). Al analizar y comparar las regiones de los operadores se determinó la secuencia consenso TACTGTATATATATACAGTA para la caja SOS (Tabla I). No todas las bases en la secuencia de las cajas SOS tienen la misma importancia para la unión de LexA. En prácticamente todos los operadores SOS conocidos se presentan las secuencias 5'-CTG y CAG-3' (escritas en negritas), mientras que en la parte central parece haber mayor cantidad de repeticiones TA, si bien esto es muy variable<sup>12</sup>.

Cuando ocurre alguna lesión o se interrumpe la síntesis de DNA se genera una señal que promueve el paso de la proteína RecA al llamado estado activo y donde funciona como coproteasa al promover la autodegradación de LexA por la ruptura del enlace peptídico Ala 84-Gly 85 que se encuentra a la mitad de la proteína. En este estado LexA es incapaz de unirse a la caja SOS con lo que se incrementa la expresión de los genes de la vía (Figura 2).

Un aspecto importante en cuanto a la respuesta SOS es que su actividad se puede regular de acuerdo al grado de daño infligido sobre el material genético. Así, el momento de la transcripción, la duración y el nivel de expresión de cada gen SOS varía dependiendo de la cantidad de daño que se genere y de la afinidad de cada operador de SOS por el represor LexA. Lewis y colaboradores<sup>12</sup> con base en un modelo matemático para determinar el grado de divergencia en la secuencia de las distintas cajas SOS con respecto a la secuencia consenso, proponen un índice de heterología (IH) que expresa la afinidad de LexA por cada caja SOS. Así, un valor bajo supone mayor parecido con la secuencia consenso y por tanto gran afinidad de LexA, como el caso de *umuC* que tiene un IH de 2.77. Por el

Gen	Caja SOS
<i>umuDC</i>	TACTGTATATAAAAAACAGTA
<i>sbmC</i>	TACTGTATATAAAAAACAGTA
<i>pcsA</i>	A <b>ACT</b> GTATATAAAATACAGTT
<i>recA</i>	TACTGTAT <b>GCT</b> CATACAGTA
<i>sulA</i>	TACTGTACATCCATACAGTA
<i>recN</i>	TACTGTATATAAAACCAGTT
<i>uvrB</i>	A <b>ACT</b> GTTTTTTTATCCAGTA
<i>dinI</i>	ACCTGTATAAATAACCAGTA
<i>lexA</i>	TGCTGTATATACTCACAGCA
<i>uvrA</i>	TACTGTATATTCATTCAGGT
<i>yebG</i>	TACTGTATAAAATCACAGTT
<i>ftsK</i>	TCCTGTTAATCCATACAGCA
<i>uvrD</i>	ATCTGTATATATACCCAGCT
<i>dinG</i>	TATTGGCTGTTTATACAGTA
<i>ruvAB</i>	GCCTGGATATCTATCCAGCA
<i>polB</i>	GACTGTATAAAACCACAGCC
<i>dinB</i>	CACTGTATACTTTACCAGTG
consenso	TACTGTATATATATACAGTA

Tabla I. Secuencias de la caja SOS de los genes de *E. coli*. Las bases más conservadas en todas estas secuencias se señalan con negritas. Tomado de Fernández de Henestrosa<sup>14</sup>.

contrario, un valor alto como el de *polB* cuyo IH es 12.09, indica poca afinidad con LexA. Los genes cuyos promotores tengan valores IH altos se inducen por completo, incluso con poco daño genético, mientras que aquellos con un valor de IH bajo se expresarán sólo cuando ocurra una gran cantidad de daño genético<sup>13</sup>.

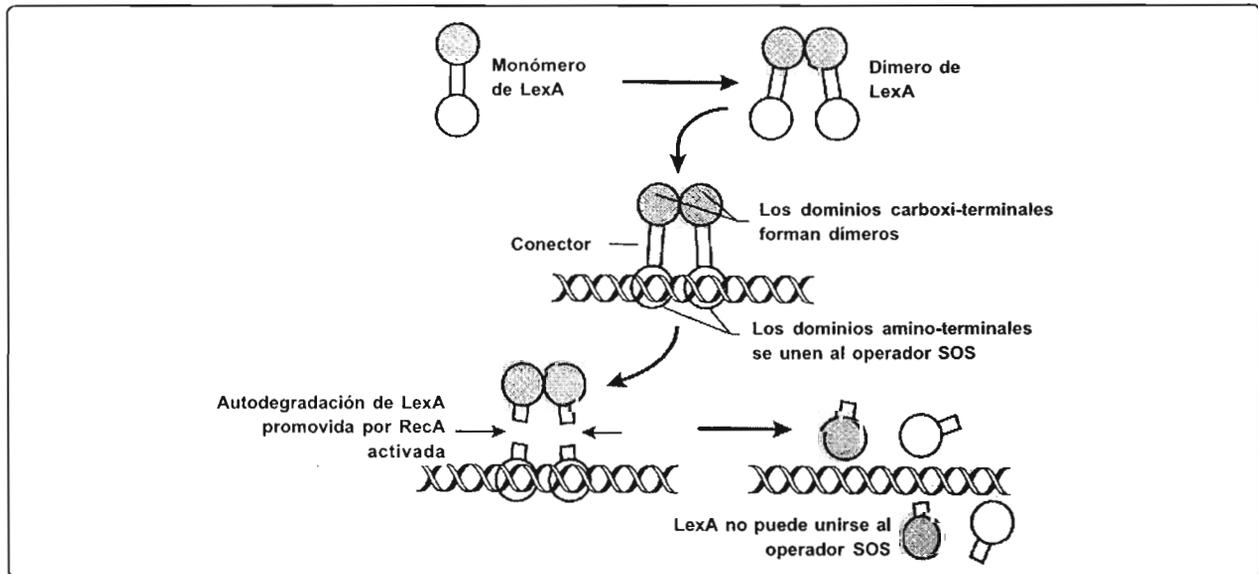


Figura 1. Unión de LexA con la caja SOS en los promotores SOS.

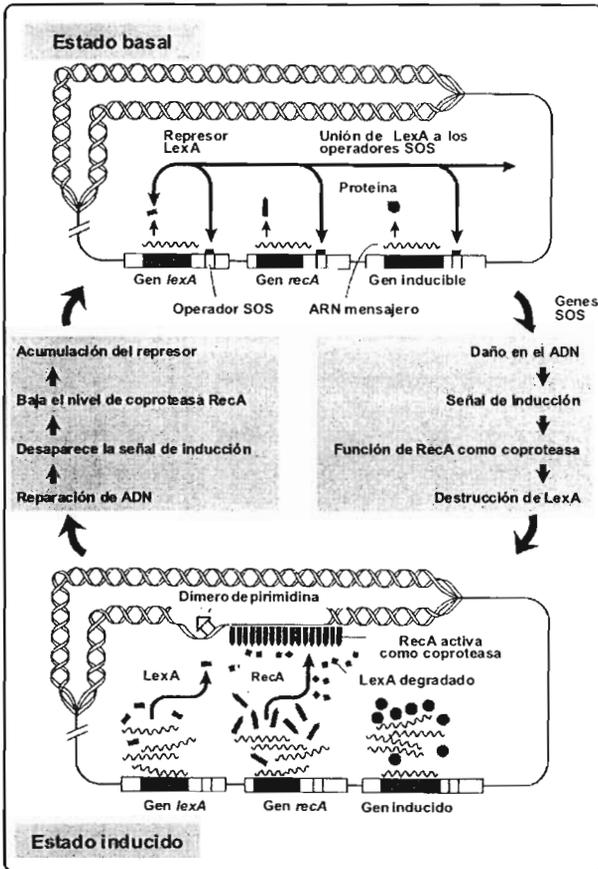


Figura 2. Regulación de la respuesta SOS.

Una vez reparado el daño genético, se pierde la señal de inducción, cesa la degradación del represor LexA, aumentan sus niveles intracelulares y se vuelve a unir a los operadores de SOS, con lo que se inactiva nuevamente el sistema.

**SEÑAL DE INDUCCIÓN DE SOS**

El aumento en la concentración de RecA no basta para que se inicien las funciones SOS, es necesario que la proteína se active para promover la degradación de LexA y así desencadenar la respuesta<sup>14</sup>. Los experimentos *in vitro* con las proteínas reguladoras purificadas han demostrado que para estimular la actividad de coproteasa de RecA son necesarios DNA de una hebra y ATP<sup>15,16</sup>. Adicionalmente, en experimentos *in vivo* infectando bacterias con mutantes del fago f1, incapaces de llevar a cabo la síntesis complementaria de DNA y que permanecen como DNA de una hebra dentro de la célula, la respuesta SOS se induce, lo que demuestra de manera inequívoca que el DNA de una sola hebra activa el regulón<sup>17</sup>. Esto sin embargo, explica sólo parcialmente el proceso que lleva a la inducción de SOS, ya que si bien hay una gran cantidad de agentes que alteran la estructura química del DNA, son pocos los que generan directamente las regiones de una hebra requeridas

para que se active el sistema y, en general, es necesario que ocurra una serie de eventos previos. Durante el proceso de síntesis semiconservativa de DNA, la horquilla de duplicación puede encontrar lesiones o deformaciones en la estructura helicoidal del DNA que detienen o bloquean a la polimerasa, dando lugar a huecos o regiones de una hebra a los que se une RecA para iniciar el proceso que conduce a la activación de SOS<sup>18</sup>. Los anillos de ciclobutano, también conocidos como dímeros de pirimidina, que resultan de la exposición a la luz ultravioleta son un ejemplo clásico de este tipo de deformaciones en la hélice de DNA. Otro caso es el de las rupturas dobles, en donde es necesaria la intervención de diversas enzimas como helicasas o nucleasas, para que finalmente se forme el sustrato que pueda reconocer RecA y se inicie la respuesta SOS<sup>19,20</sup> (Figura 3).

Dentro de la célula existen diferentes enzimas que compiten por estas estructuras, ya sea para degradarlas (exonucleasas de una hebra) o bien para estabilizarlas, como es la proteína llamada *single-strand binding protein* (SSB). En este último caso es necesario que RecA sustituya a SSB para que se puedan reparar dichas estructuras. Se ha demostrado que un complejo formado por las proteínas RecF, RecO y RecR se encarga de retirar a SSB del DNA de cadena sencilla y de facilitar la unión con RecA<sup>21,22</sup>. Asimismo, se ha visto que en los mutantes defectuosos en exonucleasas como RecJ tratados con radiación gamma, SOS disminuye considerablemente, lo que sugiere que es necesaria la participación de este gen en el procesamiento de rupturas de doble cadena para que se puedan activar dichas funciones<sup>19</sup>.

**GENES SOS**

Inicialmente Kenion y Walker<sup>23</sup> utilizando fusiones al azar del fago *Mu* con el gen *lacZ* inserto, lograron identificar 17 a 20 genes pertenecientes a la vía, a los que de manera genérica llamaron genes *din* (por sus siglas en inglés de *damage inducible*). Gracias a esto fue posible determinar una secuencia consenso para la caja SOS<sup>12</sup>. Posteriormente y contando ya con la secuencia completa del genoma de *Escherichia coli*, con el apoyo de programas de computación se realizó una búsqueda para identificar a los genes que pudieran estar controlados por el sistema LexA/RecA. El resultado de esta búsqueda arrojó inicialmente a 62 candidatos<sup>24</sup> y por medio de hibridaciones de estos genes con RNA de bacterias deficientes en *lexA* y en las que SOS está activo permanentemente se comprobó que de ellos, 31 pertenecían efectivamente al sistema. Más adelante en experimentos con microarreglos de todos los llamados marcos de lectura abierta (ORFs) y RNA de bacterias tratadas con luz ultravioleta, se evaluaron los cambios en los niveles de expresión de cada gen, comparándolos con los de un mutante *lexA* (Ind) en el que SOS está completamente reprimido<sup>25</sup>, estableciéndose finalmente un total de 43 genes controlados por el dúo LexA/RecA.

Dentro de la vía hay genes involucrados tanto en la reparación

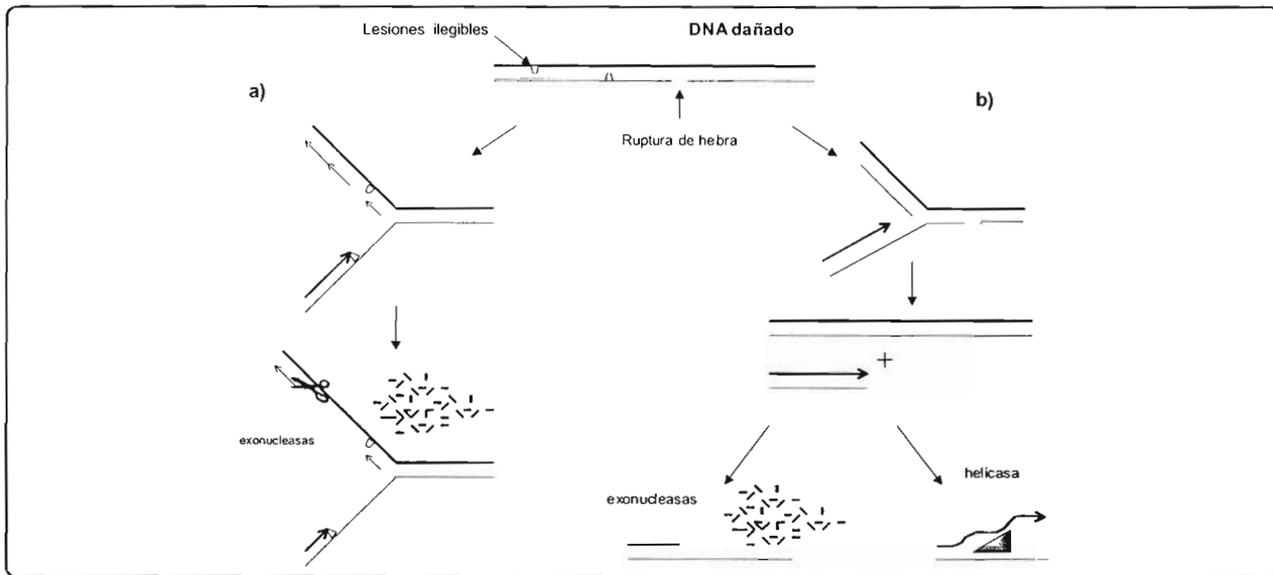


Figura 3. Generación de DNA de una hebra durante el proceso de duplicación a partir de lesiones. a) Al encontrar lesiones ilegibles la polimerasa se detiene formándose huecos en la molécula; en el caso de la hebra retardada los huecos pueden no ser lo suficientemente grandes para la entrada de RecA en cuyo caso las exonucleasas se encargan de agrandar el hueco. b) Si la horquilla de duplicación encuentra un corte en una de las hebras se forma una ruptura de doble cadena que puede dar lugar a DNA de una hebra por acción de exonucleasas o helicasa.

como en la tolerancia a daño genético. Están por ejemplo, los genes *uvrA*, *uvrB* y *uvrD*, que forman parte del sistema que se encarga de la reparación por escisión de nucleótidos y que son de los primeros en inducirse, así como los genes *sulA* y *ftsK* que inhiben la formación del septo dando por resultado la filamentación<sup>14,25</sup>. Se encuentran también genes de distintas polimerasas de DNA como Pol II, Pol IV y Pol V, codificadas respectivamente por *polB*, *umuC* y *dinB*, todas ellas responsables de la síntesis trans-lesión, llamada así porque ésta continúa aún ante la presencia de daño en el DNA. Mientras que la tasa de error de Pol II es baja, tanto la de Pol IV como la de Pol V son altas, lo que a su vez explica la razón de que la reparación de DNA, que ambas llevan a cabo durante la respuesta SOS, dé por resultado un aumento en la cantidad de mutaciones<sup>26,27</sup>. Cabe mencionar que si bien se identificaron ya los genes controlados por LexA/RecA todavía no se conoce la función que muchos de ellos pudieran tener para ayudar a contrarrestar situaciones de estrés.

### TERMINACIÓN DE SOS

En un principio se pensaba de manera simplista que la señal de inducción se perdía una vez que a través de los diferentes mecanismos de reparación se había eliminado el daño. Sin embargo, estudios recientes sugieren que los productos de los genes *dinI* y *recX* interactúan con RecA para regular su actividad. Inicialmente se propuso que DinI inactivaba a RecA compitiendo por el sitio de unión al DNA gracias a su carga negativa permitiendo así que SOS pudiera regresar al estado basal<sup>28,29</sup>. Sin embargo, los trabajos realizados con el recién descubierto *recX* cambiaron radicalmente esta idea, ya que se comprobó que es el

producto de este gen el que interacciona con RecA en cantidades subestequiométricas e inhibe cualquiera de sus tres actividades (recombinasa, coproteasa y activadora de UmuCD) que se describen más adelante<sup>30</sup>. Se planteó entonces un modelo en el que DinI estabilizaba la unión de RecA con el DNA, probablemente reforzando la interacción de los monómeros de esta proteína como se explica más adelante, mientras que el producto de *recX* la estaría regulando negativamente<sup>31</sup>. Dado que ambos genes forman parte de la misma respuesta SOS se propone que su función principal sea la de regular la actividad de coproteasa de RecA.

### RECA

Además de estar a cargo del control y regulación de SOS, la proteína RecA participa en diversos procesos enfocados todos a mantener la integridad del DNA<sup>32</sup>. De hecho, es tan versátil e interactúa con tantas otras proteínas que merece una mención aparte. Tiene un peso de aproximadamente 38 kilodaltones y está formada por 352 aminoácidos<sup>33</sup>. El aspecto fundamental de todas sus actividades es la unión con DNA de la que resulta un filamento nucleoproteico<sup>34</sup>. El primer paso que es también el más lento, consiste en la unión de un monómero de RecA con DNA, generalmente de una sola hebra, aunque eventualmente llega a darse con el de doble hebra<sup>35</sup>. Si bien esta unión es inespecífica, parece haber cierta preferencia por la secuencia de ocho nucleótidos denominada  $\chi$  (5'-GCTGGTGG-3') que facilita la recombinación homóloga<sup>36</sup>. A partir de la unión del primer monómero, rápidamente, de manera cooperativa, se van agregando más monómeros en dirección 5'-3', formando así un

filamento helicoidal que en presencia de ATP está extendido, es decir presenta 6 monómeros de RecA y 18 nucleótidos por vuelta de hélice que es su forma activa<sup>37,38</sup>. Cuando no hay ATP el filamento está plegado y es inactivo (Figura 4).

RecA tiene una función primordial en la recombinación homóloga, puesto que ya formado el filamento nucleoprotéico, se encarga de acarrear y aparear a esta hebra de DNA con una secuencia homóloga en la misma o en otra molécula de doble hebra para así realizar el intercambio (Figura 4). Esto es especialmente importante en eventos de reparación de rupturas de doble hebra originadas, ya sea por la acción directa de agentes como la radiación ionizante o bien por el colapso de la horquilla de replicación al encontrar un corte de una hebra en el DNA<sup>39</sup>. Para llevar a cabo este papel de recombinasa interactúa con la enzima RecBCD que a partir del sitio recombinogénico  $\chi$  genera DNA de cadena sencilla y facilita la unión de los monómeros de RecA<sup>40</sup>. Además interacciona con el complejo RecFOR para sustituir a la enzima SSB sobre regiones de una hebra<sup>21,41</sup>.

Por otra parte, además de su papel como coproteasa en la degradación de LexA, RecA es también la responsable de la degradación de UmuC necesaria para que pase a su estado activo UmuC' y se una con UmuD para llevar a cabo su función como polimerasa V en la síntesis trans-lesión<sup>1</sup>.

**CONSIDERACIONES FINALES**

Cuando Radman propuso la existencia del sistema SOS pensó que era el último recurso que le quedaba a la bacteria para sobrevivir al daño en el material genético, ya que el resultado final de tal actividad era una mayor supervivencia. De ahí dedujo que SOS era un sistema de respaldo que ayudaba a enfrentar las lesiones cuando los demás mecanismos eran ya insuficientes. En resumen, SOS era una de las diversas alternativas que tenía *E. coli* para enfrentar situaciones adversas.

Sin embargo, aparte de lo anterior, y como consecuencia adicional, había un aumento generalizado en la frecuencia de mutaciones inducidas principalmente por Pol IV y Pol V. Además, no siempre se observaba relación directa entre la inducción de las funciones SOS y la supervivencia a diversos agentes incluyendo a la

radiación, lo que sugería que a pesar de que el sistema involucraba mecanismos de reparación y tolerancia, en muchos casos no representaba un papel primordial en la supervivencia<sup>19,42</sup>.

La activación de la respuesta representa un gran consumo de energía para la bacteria y en vista de que cuenta además con diversas alternativas de reparación, la idea de que su papel fuera sólo de respaldo no parecía ser suficiente para justificar o explicar este gasto energético. Además hay que tomar en cuenta que más que activarse ante cualquier situación de estrés, el encendido del sistema requiere que ocurra un conjunto de eventos subsiguientes al daño inicial al DNA, algunos de los cuales ya se han mencionado, para dar lugar a lo que es al parecer la señal o estructura de inicio, es decir el DNA de cadena sencilla.

Todo lo anterior hace pensar que las funciones SOS no son solamente las de un sistema de reparación, sino que su importancia va más allá. Se ha propuesto la idea de que la importancia real de las funciones SOS radica en el aumento en la frecuencia de mutaciones como una alternativa para ampliar la variabilidad genética y de este modo incrementar las probabilidades de la población para sobreponerse a las condiciones adversas del entorno<sup>43,44</sup>. Efectivamente, dentro de SOS existen dos DNA polimerasas, Pol IV y Pol V, que al sintetizar DNA a nivel de una región dañada que Pol III no reconoce, pueden introducir nucleótidos erróneos y con esto aumentar la frecuencia de mutaciones. Esto en conjunto da lugar a una mayor capacidad para enfrentar situaciones adversas aumentando así las probabilidades de supervivencia y propagación de la especie<sup>26,27</sup>.

Cabe señalar que los niveles de transcripción de los distintos genes SOS se regulan de acuerdo a la cantidad y calidad de lesiones genéticas lo que permite un desfase en cuanto a la expresión de los mismos. Así, mientras que los responsables de reparación directa de DNA, como es el caso de la vía UvrABC, se activan pocos minutos después de ocurrido el daño genético, las polimerasas que se encargan de la síntesis trans-lesión cuya acción se ha tomado como una estrategia para llegar a una mutación fortuita que aumente las probabilidades de supervivencia, tardan alrededor de 40 minutos en expresarse al máximo. Finalmente, entre los últimos genes SOS que se expresan

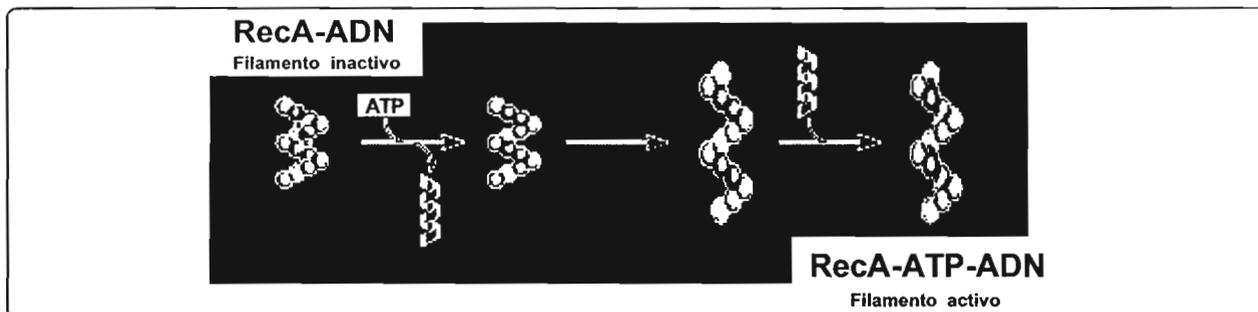


Figura 4. Estados del filamento nucleoproteico de RecA con DNA de una banda.

están *caa* y *cea* que se localizan en plásmidos y codifican respectivamente para las colicinas E1 y A, cuya expresión causa lisis y muerte celular tanto en las células productoras como en células sensibles a su acción<sup>45,46</sup>. En conjunto todo lo anterior apoya la idea de que la respuesta SOS podría funcionar no sólo como un monitor permanente de daño genético a nivel celular<sup>14</sup>, sino que trasciende lo inmediato dando oportunidad a la supervivencia a largo plazo de la población ante situaciones ambientales desfavorables.

## REFERENCIAS

- Sutton, M.D., Smith, B.T., Godoy, V.G. & Walker, C.G. The SOS response: Recent insights into *umuDC*-dependent mutagenesis and DNA damage tolerance. *Annu. Rev. Genet.* **34**:479-497 (2000).
- Weigle, J.J. Induction of mutation in a bacterial virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **39**:628-636 (1953).
- Defais, M., Fauquet, P., Radman, M. & Errera, M. Ultraviolet reactivation and ultraviolet mutagenesis of? in different genetic systems. *Virology* **43**:495-503 (1971).
- Radman, M. Phenomenology of an inducible mutagenic DNA repair pathway in *Escherichia coli*: SOS repair hypothesis; in Molecular and Environmental Aspects of Mutagenesis (eds. Sherman, S., Miller, M., Laurence, C. & Tabor, W.H.) 128-142 (Charles C. Thomas Publisher, Springfield, USA, 1976).
- Gudas, L.J. & Pardee, A.B. Model for regulation of *Escherichia coli* DNA repair functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**:2330-2334 (1975).
- Roberts, J.W., Roberts, C.W. & Craig, N.L. *Escherichia coli* *recA* gene product inactivates phage lambda repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**:4714-4718 (1975).
- Little, J.W., Edmiston, S.H., Pacelli, L.Z. & Mount, D.W. Cleavage of *Escherichia coli* LexA protein by RecA protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**:3225-3229 (1980).
- Little, J.W. & Mount, D.W. The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. *Cell* **29**:11-22 (1982).
- Brent, R. & Ptashne, M. Mechanism of action of the *lexA* gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:4204-4208 (1981).
- Schnarr, M., Pouyet, J., Granger-Schnarr, M. & Daune, M. Large-scale purification, oligomerization, equilibria, and specific interaction of the LexA repressor of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **24**:2812-2818 (1985).
- Thliveris, A.T., Little, J.W. & Mount, D.W. Repression of the *Escherichia coli* *recA* gene requires at least two LexA protein monomers. *Biochimie* **73**:449-455 (1991).
- Lewis, L.K., Harlow, G.R., Gregg-Jolly, L.A. & Mount, D.W. Identification of high affinity binding sites for LexA which define new DNA damage-inducible genes in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **241**:507-523 (1994).
- Schnarr, M., Oertel-Buchheit, P., Kazmaier, M. & Granger-Schnarr, M. DNA binding properties of the LexA repressor. *Biochimie* **73**:423-431 (1991).
- Quillardet, P., Moreau, P.L., Ginsburg, H., Mount, D.W. & Devoret, R. Cell survival, UV reactivation and induction of prophage lambda in *Escherichia coli* K12 overproducing *recA* protein. *Mol. Gen. Genet.* **188**:37-43 (1982).
- Little, J.W., Mount, D.W. & Yanisch-Perron, C.R. Purified LexA protein is a repressor of the *recA* and *lexA* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:4199-4203 (1981).
- Little, J.W. Autodigestion of LexA and phage? repressors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:1375-1379 (1984).
- Higashitani, N., Higashitani, A. & Horiuchi, K. SOS induction in *Escherichia coli* by single-stranded DNA of mutant filamentous phage: monitoring by cleavage of LexA repressor. *J. Bacteriol.* **177**:3610-3612 (1995).
- Sassanfar, M. & Roberts, J.W. Nature of the SOS-inducing signal in *Escherichia coli*: the involvement of DNA replication. *J. Mol. Biol.* **212**:79-96 (1990).
- Breña-Valle, M. & Serment-Guerrero, J. SOS induction by gamma radiation in *Escherichia coli* strains defective in repair and/or recombination mechanisms. *Mutagenesis* **13**:637-641 (1998).
- Tavera, L., Breña, M., Pérez, M., Serment, J. & Balcázar, M. Response to alpha and gamma radiations of *Escherichia coli* strains defective in repair or protective mechanisms. *Radiat. Meas.* **36**:591-595 (2003).
- Umezú, K. & Kolodner, R. Biochemical interaction of the *Escherichia coli* RecF, RecO and RecR proteins with RecA protein and single-stranded DNA binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:3875-3879 (1993).
- Whitby, M.C. & Lloyd, R.G. Altered SOS induction associated with mutations in *recF*, *recO* and *recR*. *Mol. Gen. Genet.* **246**:174-179 (1995).
- Kenyon, C.J. & Walker, G.C. DNA-damaging agents stimulate gene expression at specific loci in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**:2819-2823 (1980).
- Fernández de Henestrosa, A.R., et al. Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **35**:1560-1572 (2000).
- Courcelle, J., Khodursky, A., Peter, B., Brown, P.O. & Hanawalt, P. Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS deficient *Escherichia coli*. *Genetics* **158**:41-64 (2001).
- Yeiser, B., Pepper, E.D., Goodman, M.F. & Finkel, S.E. SOS-induced DNA polymerases enhance long-term survival and evolutionary fitness. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:8737-8741 (2002).
- Napolitano, R., Janel-Bintz, R., Wagner, J. & Fuchs, R.P. All three SOS-inducible DNA polymerases (Pol II, Pol IV and Pol V) are involved in induced mutagenesis. *EMBO J.* **19**:6259-6265 (2000).
- Ramírez, B.E., Voloshin, O.N., Camerini-Otero, R.D. & Bax, A. Solution structure of DinI provides insight into its mode of RecA inactivation. *Protein Sci.* **9**:2161-2169 (2000).
- Voloshin, O.N., Ramírez, B.E., Bax, A. & Camerini-Otero, R.D. A model for the abrogation of the SOS response by an SOS protein: a negatively charged helix in DinI mimics DNA in its interaction with RecA. *Genes Dev.* **15**:415-427 (2001).
- Stohl, E.A., et al. *Escherichia coli* RecX inhibits RecA recombinase and coprotease activities *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **278**:2278-2285 (2003).
- Lusetti, S.L., Dress, J.C., Stohl, E.A., Seifert, H.S. & Cox, M.M. The DinI and RecX proteins are competing modulators of RecA function. *J. Biol. Chem.* **279**:55073-55079 (2004).
- McGrew, D.A. & Knight, K.L. Molecular design and functional organization of the RecA protein. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **38**:385-432 (2003).
- Roca, A.I. & Cox, M.M. RecA protein: Structure, function, and role in recombinational DNA repair. *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* **56**:129-223 (1997).

34. Lusetti, S.L. & Cox, M.M. The bacterial RecA protein and the recombinational DNA repair of stalled replication forks. *Annu. Rev. Biochem.* **71**:71-100 (2002).
35. Pugh, B.F. & Cox, M.M. General mechanisms for RecA protein binding in duplex DNA. *J. Mol. Biol.* **203**:479-493 (1988).
36. Tracy, R.B., Chedin, F. & Kowalczykowski, S.C. The recombination hot spot chi is embedded within islands of preferred DNA pairing sequences in the *E. coli* genome. *Cell.* **90**:205-206 (1997).
37. Egelman, E.H. & Stasiak, A. Structure of helical RecA-DNA complexes. Complexes formed in the presence of ATP- $\gamma$ -S or ATP. *J. Mol. Biol.* **191**:677-697 (1986).
38. Yu, X. & Egelman, E.H. Structural data suggest that the active and inactive forms of the RecA filament are not simply interconvertible. *J. Mol. Biol.* **227**:334-346 (1992).
39. Kuzminov, A. Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage  $\lambda$ . *Acad. Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**:751-813 (1999).
40. Arnold, D.A. & Kowalczykowski, S.C. Facilitated loading of RecA protein is essential to recombination by RecBCD enzyme. *J. Biol. Chem.* **275**:12261-12265 (2000).
41. Bork, J.M., Cox, M.M. & Inman, R.B. The RecOR proteins modulate RecA protein function at 5' ends of single-stranded DNA. *EMBO J.* **20**:7313-7322 (2001).
42. Alcántara, D., Breña, M. & Serment, J. Divergent adaptation of *Escherichia coli* to cyclic ultraviolet light exposures. *Mutagenesis* **19**:349-354 (2004).
43. Radman, M. Enzymes of evolutionary change. *Nature* **401**:866-869 (1999).
44. Friedberg, E. & Gerlach, V. Novel DNA polymerases offer clues to the molecular basis of mutagenesis. *Cell* **98**:413-416 (1999).
45. Walker, G.C. The SOS response of *Escherichia coli*. In *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and molecular biology (ed. Neidhardt, F.C., et al.) 1400-1416 (ASM Press, Washington, DC, 1996).
46. Janion, C. Some aspects of the SOS response system- A critical survey. *Acta Biochim. Polon.* **48**:599-610 (2001).

## In vivo role of *Escherichia coli* single-strand exonucleases in SOS induction by gamma radiation

Jorge Serment-Guerrero\*, Matilde Breña-Valle and J. Javier Espinosa-Aguirre<sup>1</sup>

Departamento de Biología, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Apartado Postal 18-1027, México DF 110801, México and <sup>1</sup>Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70228, México DF 04510, México

**Ionizing radiation causes different types of genetic damage, ranging from base modifications to single- and double-stranded DNA breaks, which may be deleterious or even lethal to the cell. There are different repair or tolerance mechanisms to counteract the damage. Among them is the *Escherichia coli* SOS system: a set of genes that becomes activated upon DNA damage to confer better opportunities for cell survival. However, since this response is triggered by single-stranded DNA regions, most lesions have to be processed or modified prior to SOS activation. Several genes such as *recO*, *recB* and *recJ* that seem to be required to induce the response have already been reported. The results of this work indicate that the four known *E. coli* single-strand exonucleases take part in processing gamma radiation damage, though RecJ and ExoI proved to be more important than ExoVII or ExoX. In addition, ExoV as well as glycosylases such as Nth and, to a lesser extent, Fpg are also required. A model intended to explain the role of all these genes in damage processing is presented.**

### Introduction

Ionizing radiation causes a plethora of lesions upon striking DNA that can be grouped as double-strand breaks (DSB), single-strand breaks (ssb) and base damages (1). Among the many mechanisms that cope with DNA damage in *Escherichia coli*, there is the SOS response: a set of ~60 genes involved in repair or tolerance whose ultimate purpose is to increase the cell's chances of surviving (2,3). This response is regulated by the products of *recA* and *lexA*. Under normal circumstances, the latter attaches to a consensus sequence present in all SOS operators, repressing gene expression, but when DNA damage occurs, an induction signal is generated, activating RecA as a co-protease to promote LexA self-cleavage and hence triggering the response. Once lesions have been eliminated, the induction signal is lost, LexA binds again to all SOS operators and the system is turned off (4). It was thought in the beginning that any type of DNA damage would promptly activate the system; however, it has been established that the induction signal is single-stranded DNA (5,6). Consequently, most types of DNA lesions, such as DSBs, different kinds of base damage or even nicks, are not suitable substrates for RecA and have to be modified or processed to induce SOS (4,7,8). In

a previous report, we demonstrated that in gamma-irradiated bacteria, lack of functional *recB*, *recJ* and *recO* decreased SOS activation (7), indicating that these genes take part in damage processing prior to SOS activation. This is in agreement with the findings of other authors (9–11). According to preliminary experiments, *xonA* (*sbcB*) might also be involved. Interestingly, both *recJ* and *xonA* code for single-strand RecJ and ExoI exonucleases, respectively. Therefore, we decided to investigate whether previous SOS damage processing is a general feature of all *E. coli* single-strand-exonucleases. In this work, we present data supporting the proposed role of the single-strand-enzymes ExoI, ExoVII and ExoX in processing gamma radiation-induced damage to generate the single-stranded DNA that triggers the SOS response. Since *recB*-defective mutants exhibit lower radiation-induced SOS activity (7,8), we decided to test the influence of multifunctional heterotrimer enzyme RecBCD—especially its RecD subunit—exonucleolytic activity, which degrades linear double-stranded DNA (12).

### Methods

Bacterial strains used for this work are listed in Table I. Strains were either part of this laboratory collection or constructed by P1 general transduction (13). Strains defective in *xseA* and *exoX* were constructed by precise deletion using the methodology described by Datsenko and Wanner (14). Strain BW25113 and plasmids pKD4, pKD46 and pCP20 were obtained through the Yale University *E. coli* Genetic Stock Center. PCR products containing the *kan* gene and 40 bp of homology to sequences flanking the target gene were produced by using primers reported elsewhere (15) and pKD4 as the template. Upstream disruption primers terminated in the common sequence 5'-TGTAGGCTGGAGCTGCTTCG and downstream primers terminated in the sequence 5'-CATATGAATATCCTCCTTAG, which served to amplify the *kan* gene flanked by directly repeated FLP recognition target (FLP recombinase) sites. In addition, primers contained the following open reading frame-specific 40-base sequences at their 5' ends: 5'-GACTGAATAACCTGCTGATTTAGAATTTGATCTCGCTCAC (*xseA* upstream), 5'-ATGGCTTGATATCGAAAAAACGCGTTGAATTCGTGCTGGC (*xseA* downstream), 5'-TCATTCCATTACGCTAGGCTTTTTTCGGCCTGGAGCATGCC (*exoX* upstream) and 5'-CGCTGGCGCAGGGAACATTACCCGCTACGCTGCGGACTA (*exoX* downstream). BW25113 strain-containing plasmid pKD46, which expresses  $\lambda$ -Red recombinase, was transformed with the PCR products using the methodology described by Chung *et al.* (16). It was plated on Luria–Bertani (LB) agar (13) supplemented with 20  $\mu$ g/ml of kanamycin, and resistant colonies were selected and tested for sensitivity to mitomycin C (1  $\mu$ M) and up to 9/Jm of ultraviolet (UV) light (wavelength 254). The disrupted allele was introduced into PQ30 by P1 transduction to kanamycin resistance.

\*To whom correspondence should be addressed. Tel: +52 55 5329 7230; Fax: +52 55 5329 7387; Email: josg@nuclear.inin.mx

Table I. *Escherichia coli* strains used in the present work

	Genotype	Source/reference
Strain		
PQ30	F <sup>-</sup> , <i>thr</i> , <i>leu</i> , <i>his</i> , <i>pyrD</i> , <i>thi</i> , <i>trp</i> ::MuC <sup>+</sup> , <i>srl</i> ::Tn10, <i>rpoB</i> , <i>sfiA</i> ::MuD(Ap <i>lacZ</i> ), <i>cts</i> , <i>lac</i> ΔU169, <i>galE</i> , <i>galY</i> , <i>phoC</i> . wt	(17)
BW25113	F <sup>-</sup> ( <i>lacI</i> <sup>H</sup> <i>rrnBT14</i> Δ <i>lacZ</i> WJ16 Δ <i>hsdR514</i> Δ <i>araB</i> Δ <i>DAH33</i> Δ <i>rhaBA</i> Δ <i>LD78</i> )	(14)
IN237	Same as PQ30 but <i>recO1504</i> ::Tn5	(7)
IN400	Same as PQ30 but <i>recJ284</i> ::Tn10	(7)
IN900	Same as PQ30 but Δ <i>xonA300</i> :: <i>cam</i>	P1 STL2694*PQ30
IN602	Same as PQ30 but <i>recB21</i> <i>zga</i> ::Tn10	(7)
IN650	Same as PQ30 but <i>recD1013</i>	P1 RDK1858*PQ30
IN510	Same as PQ30 but Δ <i>xseA</i> :: <i>kan</i>	Insertion/deletion
IN520	Same as PQ30 but Δ <i>exoX</i> :: <i>kan</i>	Insertion/deletion
IN530	Same as PQ30 but Δ <i>xseA</i> , Δ <i>exoX</i> :: <i>kan</i>	Insertion/deletion
IN901	Same as PQ30 but <i>recJ</i> Δ <i>xonA300</i> :: <i>cam</i>	P1 IN400*IN900 (this work)
IN605	Same as PQ30 but <i>recB21</i> , <i>recO1504</i> ::Tn5	P1 IN602*IN237
IN610	Same as PQ30 but <i>recD1013</i> , <i>recO1504</i> ::Tn5	P1 RDK1858*IN237
IN700	Same as PQ30 but <i>fpg-1</i> :: <i>kan</i>	P1 BH410*PQ30
IN750	Same as PQ30 but <i>nth-1</i> :: <i>kan</i>	P1 BW434*PQ30
Plasmids		
pKD4	<i>oriR6Kγ</i> , <i>kan</i> , <i>bla</i> (ApR), <i>rgnB</i> (Ter)	(14)
pKD46	<i>araBp-gam-bet-exo</i> , <i>bla</i> (ApR) <i>repA101</i> (ts), <i>oriR101</i>	(14)
pCP20	<i>Ts-rep</i> , [FPL], [c1857] (lambda)(ts), <i>bla</i> (ApR), <i>cat</i>	(14)

To construct the *xseA*, *exoX* double mutant, excision of the *kan* gene was later accomplished by transformation of temperature-sensitive plasmid pCP20, which expresses FLP recombinase, into the appropriate strain at 30°C. Growth at 42°C resulted in the loss of pCP20, yielding kanamycin-sensitive deletion derivatives. The new strains were screened for their sensitivity to both mitomycin C and UV light against parental strains.

#### Irradiations

Liquid cultures were grown overnight, diluted 50-fold in fresh LB broth and incubated in a water bath shaker at 37°C until reaching mid-logarithmic growth ( $2 \times 10^8$  cells/ml). They were subsequently centrifuged and re-suspended in the same volume of  $10^{-2}$  M phosphate buffer at pH 7.0. Radiation treatments were performed at room temperature without any stirring or oxygen saturation, using a Gammacell Co<sub>60</sub> source, at a dose rate of 5 Gy/min. Cultures were diluted afterwards and immediately plated for viable counts or further incubated for SOS measurements.

#### SOS activity

SOS activity was evaluated by means of the chromotest (7,17). In brief, aliquots of the irradiated cell suspensions were diluted 10-fold in LB, incubated at 37°C for the appropriate time to allow the expression of the SOS response at its maximum according to kinetic experiments (data not shown) and mixed afterwards with the proper buffer and β-galactosidase substrate (*o*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside). Another series of tubes was prepared similarly for the alkaline phosphatase assays with *p*-nitrophenyl phosphate as substrate. Both series were then incubated until a yellow colour appeared (or up to 90 min). The reactions were then stopped as indicated by Quillardet and Hofnung (17), absorbency was read spectrophotometrically at 420 nm, and the SOS induction factor was calculated.

#### Results

Strains used in this work are listed in Table I. All of them have *lacZ* inserted in *sulA* (formerly known as *sfiA*), so

β-galactosidase expression is regulated by the SOS response. In addition, alkaline phosphatase is constitutively expressed to certify that transcription is unaffected. All results are the mean of at least three independent experiments. When available, most of the survival results are comparable with previous reports (18–20).

Figure 1a shows the gamma radiation survival curves of *recJ* and *xonA* strains, as well as of the *recJ*, *xonA* double mutant. At the highest dose, survival in either single mutant decreases ~100-fold compared to the wild-type (wt) strain PQ30, whereas in the *recJ*, *xonA* double mutant, survival decreases considerably more, suggesting that both ExoI and RecJ enzymes play comparatively equivalent roles and seem to complement each other, at least partially. As for the SOS response, it can be noticed that *recJ*- and *xonA*-defective bacteria have markedly lower levels than the wt strain, whereas in the case of the *recJ*, *xonA* mutant, even at the highest doses, it scarcely doubles the basal level (Figure 1b). These results show again that RecJ as well as ExoI exonucleases are required for SOS expression as a consequence of ionizing radiation-induced DNA damage and both seem to be partially redundant.

Exonucleases coded by either *xseA* or *exoX* genes proved to be less important for survival to gamma radiation, since viability in either mutant tested shows a modest decrease when compared to PQ30, as corroborated by survival plots, which are approximately the same in either single mutant as in the *xseA*, *exoX* double mutant (Figure 2a). At doses up to 100 Gy, all strains reach SOS expression levels very much the same as those in the wt. However, beyond that level a decrease is observed, suggesting that at higher doses both ExoVII and ExoX nucleases seem to be required for DNA damage processing prior to SOS activation, as supported by the response of the double mutant, whose activity is almost half of that for the wt strain at all the doses (Figure 2b).

As expected, the *recB*-defective strain is highly sensitive to gamma radiation, while at the highest dose, *recD* strain survival is slightly lower than that in the wt strain (Figure 3a). However, despite the differences in sensitivity between them,

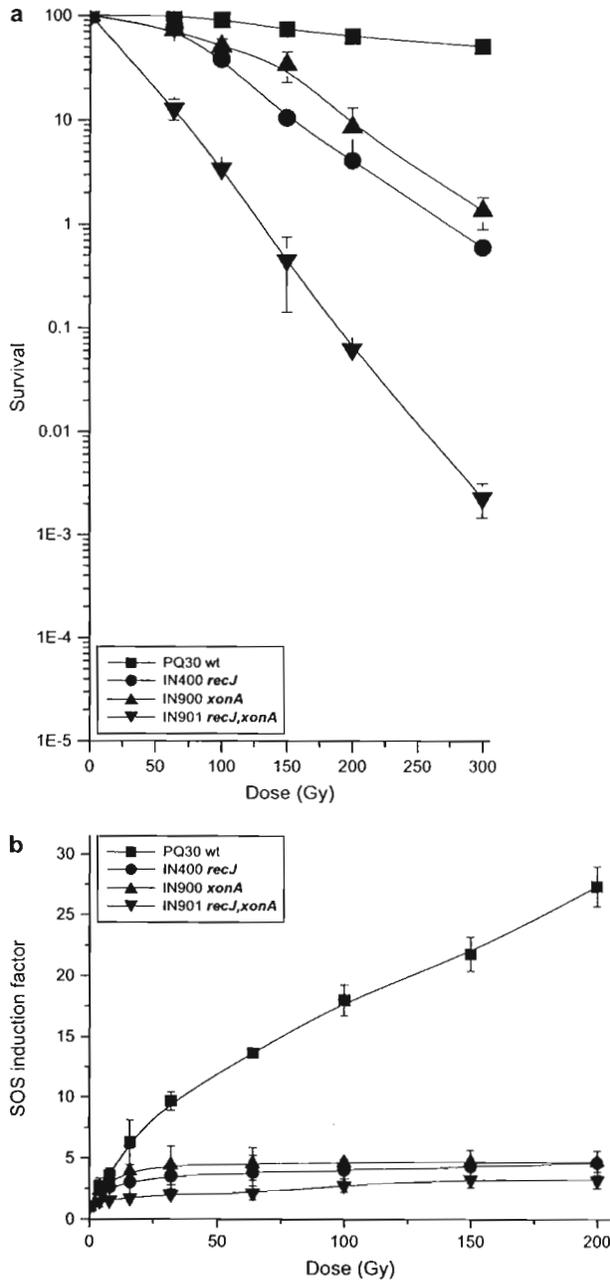


Fig. 1. Survival (a) and SOS activity (b) in *Escherichia coli* strains defective in *recJ*, *xonA* or both exposed to gamma radiation.

SOS levels are almost identical in both and are approximately half the expression levels reached by PQ30. These results in turn indicate that a lack of ExoV nuclease activity may be the main cause of this SOS decrease (Figure 3b).

Single-strand exonucleases take part in several mechanisms related to DNA recombination or damage repair within the cell (21,22). For example, in base excision repair, ss-exonucleases are supposed to enlarge nicks left by the joint action of glycosylases and apurinic/aprimidinic endonucleases as part of the process (23). Since ionizing radiation causes base

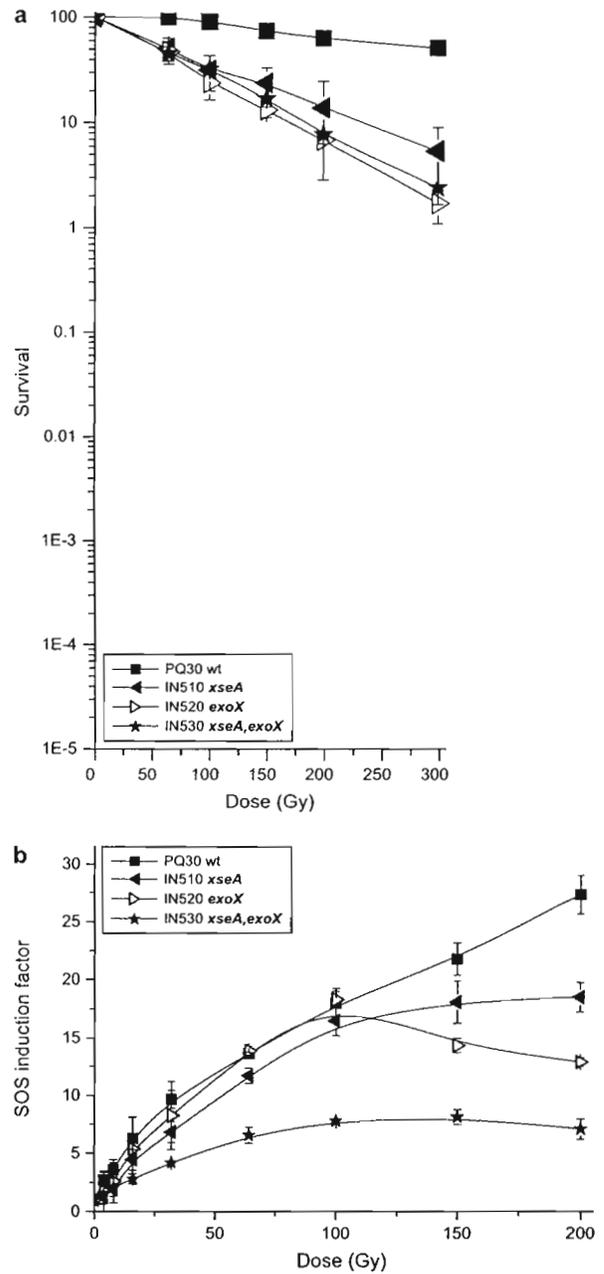


Fig. 2. Survival (a) and SOS activity (b) in *Escherichia coli* strains defective in *xseA*, *exoX*, or both exposed to gamma radiation.

modifications as well, we decided to test the role of some glycosylases in processing damage that could in turn lead to SOS induction, using previously constructed strains defective in either *fpg* or *nth* glycosylase genes. Results in Figure 4b show that the absence of either gene, especially the *nth*, lowers the activity of the response, suggesting that both genes may play a role in damage processing prior to SOS induction. The survival data show a slight reduction in viability of these mutants, demonstrating for the first time that *nth* increase the sensitivity to ionizing radiation (Figure 4a).

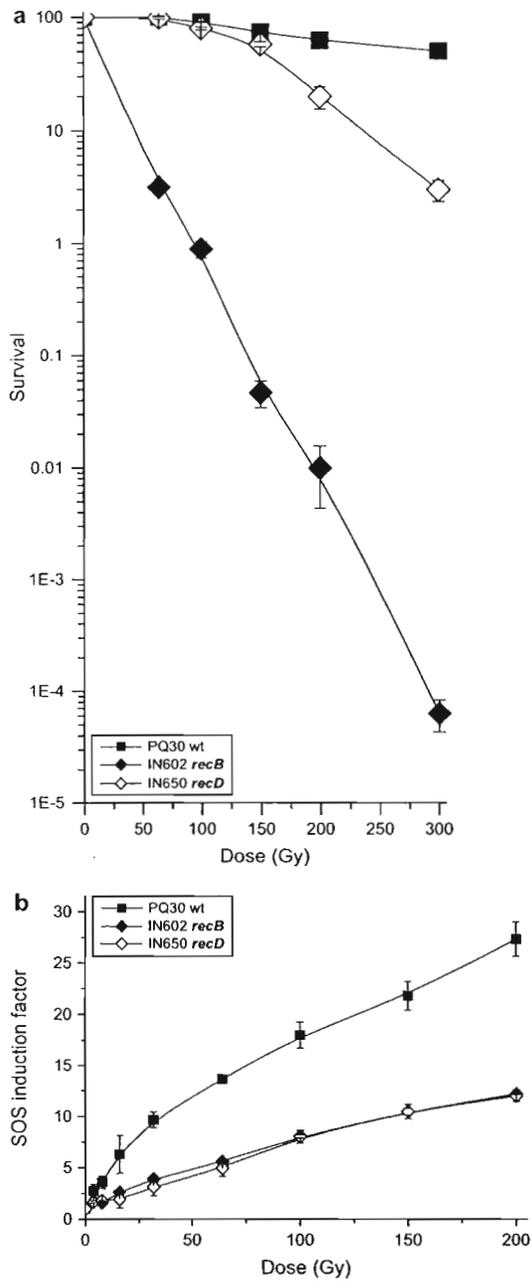


Fig. 3. Survival (a) and SOS activity (b) in *Escherichia coli* strains defective in *recB* or *recD* exposed to gamma radiation.

## Discussion

### Survival

In *E. coli*, DNA DSBs, caused either by radiation itself or as a result of the encounter of replication forks with *ssb*, are repaired mainly by homologous recombination through the RecBCD pathway, whereby information can be fully restored. The natural substrate for the RecBCD enzyme is linear duplex DNA with blunt ends or with short (up to 25 nucleotides) single-stranded DNA tails where the enzyme binds and simultaneously unwinds and cuts both strands, though the 3'-

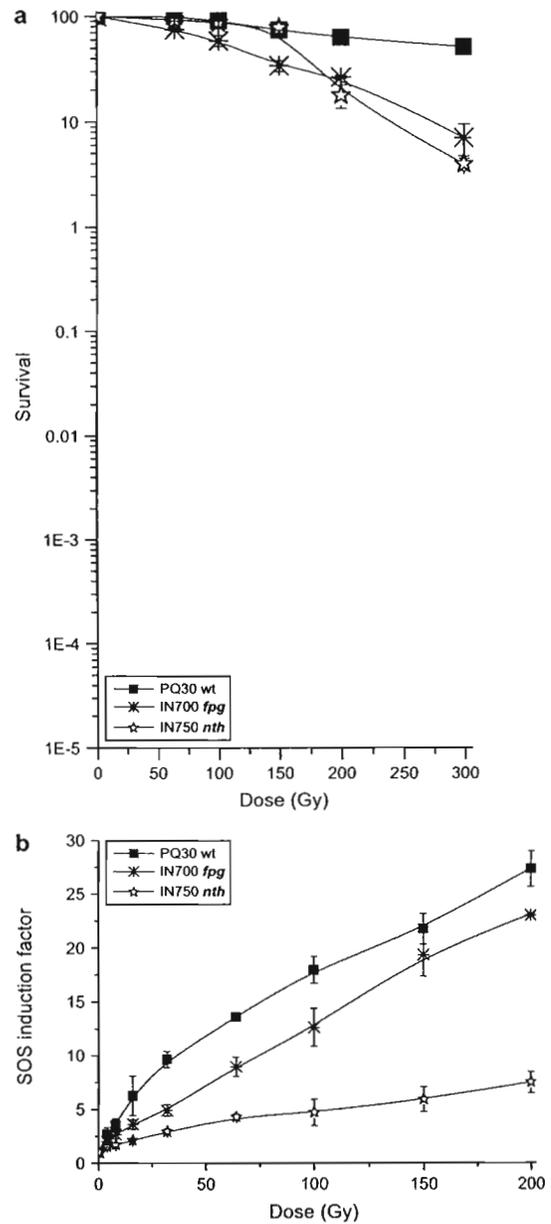


Fig. 4. Survival (a) and SOS activity (b) in *Escherichia coli* strains defective in *fpg* or *nth* exposed to gamma radiation.

ended strand is degraded to a greater extent than the 5'. When encountering a specific octanucleotide DNA sequence known as Chi ( $\chi$ ), the enzyme undergoes activity modification, and thereafter the nuclease shows an attenuated 5' exonuclease activity while retaining its helicase activity, loading at the same time RecA onto the 3' end, thus generating a nucleoprotein filament able to search and bind to a homologous sequence in an intact double-stranded DNA (24). Accordingly, the *recB* mutant shows high sensitivity to gamma radiation, in agreement with previous reports (18,25). RecBCD acts as a helicase and a nuclease (the latter due to the RecD subunit), but when RecD is missing, RecBC keeps acting as a helicase,

so recombination can be efficiently performed (26). This would explain why our *recD* mutant is almost as resistant as the wt. As stated above, RecBCD only recognizes DSBs with blunt or nearly blunt ends, so in the case of breaks with protruding ends longer than 25 nucleotides, ss-exonucleases such as RecJ and ExoI trim the overhanging tails, making the substrate adequate for RecBCD. Survival to gamma radiation of *recJ* and *xonA* strains show similar sensitivity, suggesting that both RecJ and ExoI play an analogous function in processing DSB, most probably converting sticky ends into blunt or near-blunt ends that could be recognized by RecBCD to initiate recombinational repair (27). The strong sensitivity of the *recJ*, *xonA* double mutant supports this idea since without these enzymes a good deal of DSB remains unrepaired and finally leads to cell death. As for ExoVII and ExoX, the results indicate that they have a lesser participation in such a process, most likely because both RecJ and ExoI are functional. It must be stressed that ExoVII and ExoX have a limited activity in the cell. Indeed, Chase and Richardson (28), using crude extracts of *E. coli* ExoI- and ExoVII-defective mutants on labelled, denatured DNA, reported that ExoVII was responsible for only 2–4% of the total 3'-exonuclease degradation, whereas the enzyme ExoX was discovered not because of its activity, but by its similarities to conserved sequences in the DnaQ nuclease family (29).

#### SOS response

As stated above, to induce the SOS response, it is essential that RecA binds to single-stranded DNA to form a nucleoprotein filament. However, RecA has to compete for single-stranded DNA regions with single-strand binding protein (SSB). When SSB is pre-bound to an ssDNA site, it creates a significant kinetic barrier that prevents RecA nucleation onto this region. To overcome this barrier, the participation of RecFOR seems to be required (9,12,30). RecFOR displaces SSB and promotes RecA binding onto this kind of region (9,31,32). It has been reported that RecJ and ExoI participate in this pathway (33), generating the single-stranded region required to start the process, so when these enzymes are not functional, SOS expression is very low compared to a wt strain. Moreover, radiation-induced SOS levels of *recO* (7), *xonA* and *recJ* mutants are practically the same, indicating that their products take part in different steps of a process, starting from *ssb* or damaged bases and leading to the single-strand DNA that in turn induces the response.

Alternatively and according to our data, when RecA is loaded onto single-strand DNA by RecBCD from DSB, most of it would go to homologous recombination, and just a small portion could actually induce SOS. To further support this proposal, we constructed *recB*, *recO* and *recD*, *recO* double mutants and none of them showed any SOS activity whatsoever after exposure to gamma radiation (Figure 5), clearly demonstrating that these pathways are essential for SOS induction, in agreement with previous reports of experiments using UV light (34,35).

Since radiation-induced DSBs are recognized by the RecBCD enzyme, the SOS activity decrease in the *recB* strain would indicate the DSB fraction actually leading to the induction of the response. Alternatively, the fact that *recB* and *recD* strains show equivalent SOS levels indicates that the nuclease activity of RecBCD is responsible for generating the SOS induction signal. Furthermore, since RecD exonuclease activity takes place before encountering a  $\chi$  site, and since the *recD* mutant is proficient in homologous recombination (26) as supported by survival results, it is likely that the RecA

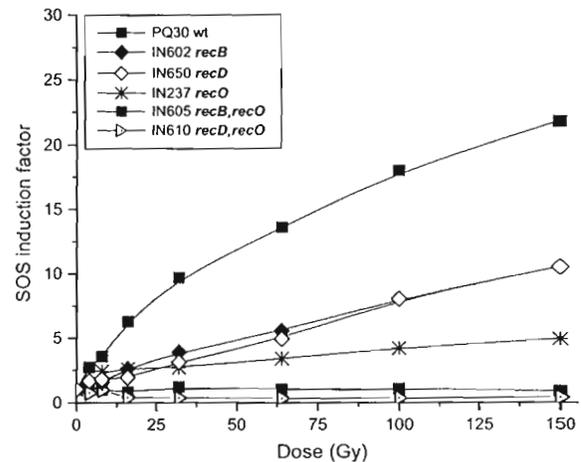


Fig. 5. SOS activity in *Escherichia coli* strains defective in RecBCD or RecF pathways exposed to gamma radiation. The results for IN237 *recO* were published before (7) and are included here for comparative purposes.

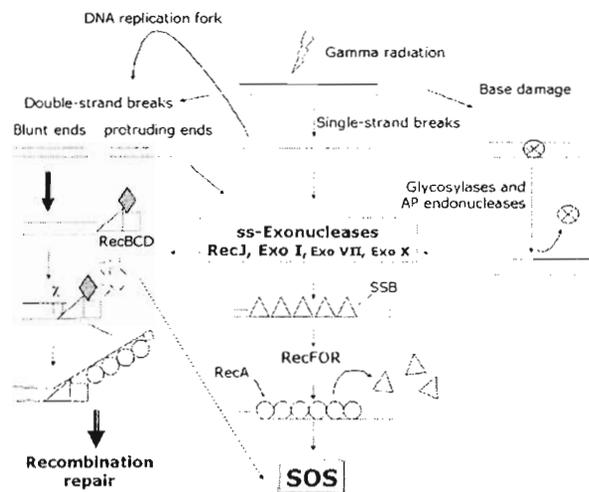
nucleoprotein filament loaded by RecBC may be leading to the homologous recombination repair pathway, rather than triggering the SOS response.

Single-strand exonucleases participate in several repair or recombination pathways within the cell, such as BER (23), methyl-directed mismatch repair (21), homologous recombination (27,36) and P1 transduction (22). RecJ and ExoI play an important role in degrading single-stranded DNA, and as observed in the present work, both are essential for DNA damage processing prior to SOS induction, whereas ExoVII as well as ExoX seem to be secondary, and as indicated by the results in the *xseA*, *exoX* double mutant are not indispensable for SOS to occur. It is important to point out that RecJ and ExoI share several common features: they both have a very similar tri-dimensional structure, including a narrow cleft just about the active site that promotes tight single-strand DNA binding while excluding duplex DNA to achieve a potent processive nuclease function (37–39); they both have been reported to act in the same mechanisms (36) and they both have direct protein–protein interaction with RecQ helicase and SSB, two proteins that are also important for SOS induction (39–41).

In an attempt to explain the results obtained in this work, a model suggesting how different kinds of gamma radiation-induced lesions may be processed and the role played by different repair enzymes in leading to the induction of the SOS response is proposed (Figure 6).

To allow full SOS expression, bacterial cultures were grown to exponential phase, and consequently there were several replication forks in progress, which when encountering *ssb* were able to be converted to DSBs. Those with blunt ends, together with the rest caused by radiation itself, may be directly recognized by RecBCD to be repaired by homologous recombination, while only a small portion could actually induce SOS. As supported by the strong radiation sensitivity of the *recJ,xonA* double mutant, DSBs with sticky ends would be trimmed by single-strand-exonucleases, mainly RecJ and ExoI, to become a proper substrate for RecBCD-directed recombination repair.

*ssb* could be recognized and enlarged by single-strand-exonucleases, probably assisted by helicases such as RecQ (41,42), to become single-strand DNA suitable to be coated by



**Fig. 6.** Damage processing proposed alternatives. To the left, blunt-ended DSBs are partially degraded by RecBCD and bound to RecA for recombination repair. A small portion of single-strand DNA may lead to SOS as indicated by the dashed line. At the centre, DNA ssb are differentially degraded by single-strand-exonucleases—especially by RecJ and ExoI, and via SSB mediation recognized by RecFOR and bound to RecA for SOS induction. Some of these ssb could be converted into DSBs if replication forks reach them. To the right, base damages recognized and processed by different glycosylases and AP endonucleases, generating single-strand DNA breaks which would follow the same single-strand-exonuclease-mediated stages depicted at the centre.

SSB and later by RecA with the participation of RecFOR, as suggested by the fact that *recJ*-, *recO*- and *xonA*-defective mutants have equally low induced SOS levels.

Nearly 74% of gamma radiation-induced DNA damage occurs at base level (43). A great deal of these lesions (such as dihydroxy-dihydrothymidine, hydroxy-deoxyuridine, hydroxymethyl-deoxyuridine, formyl-deoxyuridine, dihydro-deoxyadenosine, dihydro-deoxyguanosine, diamino-formamidopyrimidine and diamino-hydroxy-formamidopyrimidine) are recognized by Nth or Fpg glycosylases (44,45) and AP endonucleases, causing nicks that upon encountering replication forks may cause DSBs or, by single-strand-exonucleolytic extension, lead to SOS induction (46). It was demonstrated earlier that DNA replication arrest leads to SOS activation (47,48). However, and as opposed to UV light, only a small portion of gamma radiation base damage can actually block replication forks. Indeed, the difference in SOS levels between proficient and *uvrA*-defective strains is relatively small (7), suggesting that DNA polymerase illegible lesions of the type recognized by the UvrABC endonuclease complex (49) hardly contribute to overall SOS activation.

One would expect then that radiation-induced SOS levels would be lowered in glycosylase-defective mutants, as is the case with the results obtained using *nth*- or *fpg*-defective strains—especially the former. Moreover, preliminary experiments exposing these defective mutants to *tert*-butyl-hydroperoxide show, as expected, lowered SOS levels (data not shown), supporting the idea that part of the response is due to oxidized bases caused by gamma radiation.

## Conclusions

The results obtained in this work indicate that *in vivo*, all single-strand-exonucleases analysed, as well as some glycosylases, seem to participate in processing gamma radiation-

induced damage to generate single-stranded DNA regions that lead to induction of the SOS response. It was also demonstrated that the nuclease activity of RecD is responsible for the small percentage of SOS induced by DNA DSBs. Taken together, the results suggest that SOS induction occurs mainly when RecA is loaded onto single-stranded DNA by RecFOR and, to a lesser degree, by RecBCD.

It was stated initially that SOS was one of multiple alternatives for survival. However, when comparing SOS-proficient strains with those with poor SOS levels, differences in survival are relatively modest. This in turn indicates that, if not essential for survival, this response may be a backup system, and its actual importance lies rather in the increase in genetic variability through the error-prone polymerases, and consequently in enhancing chances for advantageous mutations to occur, as suggested previously (50,51).

## Funding

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (194870) to J.S.-G.

## Acknowledgements

The authors wish to thank Susan Lovett for bacterial strain STL2694, Dr Richard Kolodner for strain RDK1848, Dr Richard Cunningham for strain BW434, Dr Barry Wanner for the set of strains used in the gene disruption methodology and Dr Philippe Quillardet for PQ30 strain; Jessica Ponce-Malagón, Magdalena Aguilar-Moreno and Alicia González-Medina for technical assistance. Our special thanks to Dr Rafael Camacho-Carranza and Dr Manuel Uribe-Alcocer for their helpful comments throughout this work.

*Conflict of interest statement:* None declared.

## References

- Téoule, R. (1987) Radiation-induced DNA damage and its repair. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.*, **51**, 573–589.
- Fernández de Henestrosa, A. R., Ogi, T., Aoyagi, S., Chafin, D., Hayes, J. J., Ohmori, H. and Woodgate, R. (2000) Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **35**, 1560–1572.
- Courcelle, J., Khodursky, A., Peter, B., Brown, P. and Hanawalt, P. (2001) Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. *Genetics*, **158**, 41–64.
- Walker, G. C. (1996) The SOS response of *Escherichia coli*. In Neidhardt, F. C. *et al.* (eds). *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. ASM Press, Washington, DC, pp. 1400–1416.
- Little, J. W. (1984) Autodigestion of *lexA* and phage  $\lambda$  repressors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **81**, 1375–1379.
- Higashitani, N., Higashitani, A. and Horiuchi, K. (1995) SOS induction in *Escherichia coli* by single-stranded DNA of mutant filamentous phage: monitoring by cleavage of LexA repressor. *J. Bacteriol.*, **177**, 3610–3612.
- Breña, M. and Serment, J. (1998) SOS induction by gamma radiation in *E. coli* strains defective in repair and/or recombination mechanisms. *Mutagenesis*, **13**, 637–641.
- Tavera, L., Breña, M., Pérez, M., Serment, J. and Balcázar, M. (2003) Response to alpha and gamma radiations of *Escherichia coli* strains defective in repair or protective mechanisms. *Radiat. Meas.*, **36**, 591–595.
- Umezū, K. and Kolodner, R. (1994) Protein interactions in genetic recombination in *Escherichia coli*: interactions involving RecO and RecR overcome the inhibition of RecA by single-stranded DNA binding protein. *J. Biol. Chem.*, **269**, 30005–30013.
- Hedge, S., Sandler, J., Clark, A. and Madiraju, M. (1995) *recO* and *recR* mutations delay induction of the SOS response in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.*, **246**, 254–258.
- Whitby, C. and Lloyd, R. (1995) Altered SOS induction associated with mutation in *recF*, *recO* and *recR*. *Mol. Gen. Genet.*, **246**, 174–179.
- Kuzminov, A. (1999) Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage  $\lambda$ . *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63**, 751–813.

13. Miller, J. (1991) *A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, 456.
14. Datsenko, K. A. and Wanner, B. L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **97**, 6640–6645.
15. Feschenko, V. V., Rajman, L. A. and Lovett, S. T. (2003) Stabilization of perfect and imperfect tandem repeats by single-strand DNA exonucleases. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **100**, 31134–31139.
16. Chung, C. T., Niemela, S. L. and Miller, R. H. (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **86**, 2172–2175.
17. Quillardet, P. and Hofnung, M. (1985) The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. *Mutat. Res.*, **147**, 65–78.
18. Sargentini, N. J. and Smith, K. C. (1986) Quantitation of the involvement of the *recA*, *recB*, *recC*, *recF*, *recJ*, *recN*, *lexA*, *radA*, *radB*, *uvrD*, and *umuC* genes in the repair of X-ray-induced DNA double-strand breaks in *Escherichia coli*. *Radiat. Res.*, **107**, 58–72.
19. Cunningham, P. and Weiss, B. (1985) Endonuclease III (nth) mutants of *Escherichia coli*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **82**, 474–478.
20. Boiteux, S. and Huisman, O. (1989) Isolation of a formamidopyrimidine-DNA glycosylase (fpg) mutant of *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.*, **215**, 300–305.
21. Burdett, V., Baitinger, C., Viswanathan, M., Lovett, S. T. and Modrich, P. (2001) In vivo requirement for RecJ, ExoVII, Exol, and ExoX in methyl-directed mismatch repair. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **98**, 6765–6770.
22. Đermić, D. (2006) Functions of multiple exonucleases are essential for cell viability, DNA repair and homologous recombination in *recD* mutants of *Escherichia coli*. *Genetics*, **172**, 2057–2069.
23. Cooper, D. L., Lahue, R. S. and Modrich, P. (1993) Methyl-directed mismatch repair is bidirectional. *J. Biol. Chem.*, **268**, 11823–11829.
24. Anderson, D. G. and Kowalczykowski, S. C. (1997) The recombination hot spot  $\alpha$  is a regulatory element that switches the polarity of DNA degradation by the RecBCD enzyme. *Genes Dev.*, **11**, 571–581.
25. Brčić-Kostić, K., Salaj-Šmic, E., Maršić, N., Kajić, S., Stojiljković, I. and Trgovčaronević, Ž. (1991) Interaction of RecBCD enzyme with DNA damaged by gamma radiation. *Mol. Gen. Genet.*, **228**, 136–142.
26. Churchill, J., Anderson, D. and Kowalczykowski, S. C. (1999) The RecBC enzyme loads RecA protein onto ssDNA asymmetrically and independently of  $\alpha$ , resulting in constitutive recombination activation. *Genes Dev.*, **13**, 901–911.
27. Thoms, B. and Wackemagel, W. (1998) Interaction of RecBCD enzyme with DNA at double-strand breaks produced in UV-irradiated *Escherichia coli*: requirement for DNA end processing. *J. Bacteriol.*, **180**, 5639–5645.
28. Chase, J. W. and Richardson, C. C. (1974) Exonuclease VII of *Escherichia coli*; purification and properties. *J. Biol. Chem.*, **249**, 4545–4552.
29. Viswanathan, M. and Lovett, S. T. (1999) Exonuclease X of *E. coli*, a novel 3'-5' DNase and DnaQ superfamily member involved in DNA repair. *J. Biol. Chem.*, **274**, 30094–30100.
30. Shan, Q., Bork, J. M., Webb, B. L., Inman, R. B. and Cox, M. M. (1997) RecA protein filaments: end-dependent dissociation from ssDNA and stabilization by RecO and RecR proteins. *J. Mol. Biol.*, **265**, 519–540.
31. Hobbs, M. D., Sakai, A. and Cox, M. (2007) SSB protein limits RecOR binding onto single-stranded DNA. *J. Biol. Chem.*, **282**, 11058–11067.
32. Kowalczykowski, S. C. (2000) Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication. *Trends Biochem. Sci.*, **25**, 156–165.
33. Viswanathan, M., Lanjuin, A. and Lovett, S. T. (1999) Identification of RNase T as a high-copy suppressor of the UV sensitivity associated with single-strand DNA exonuclease deficiency in *Escherichia coli*. *Genetics*, **151**, 929–934.
34. Keller, K. L., Overbeck-Carrick, T. L. and Beck, D. J. (2001) Survival and induction of SOS in *Escherichia coli* treated with cisplatin, UV-irradiation, or mitomycin C are dependent on the function of the RecBC and RecFOR pathways of homologous recombination. *Mutat. Res.*, **486**, 21–29.
35. Ivančić-Baće, I., Vlašić, I., Salaj-Šmic, E. and Brčić-Kostić, K. (2007) Genetic evidence for the requirement of RecA loading activity in SOS induction after UV irradiation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **188**, 5024–5032.
36. Viswanathan, M. and Lovett, S. T. (1998) Single-strand DNA specific exonucleases in *Escherichia coli*: roles in repair and mutation avoidance. *Genetics*, **149**, 7–16.
37. Breyer, W. and Matthews, B. (2000) Structure of *Escherichia coli* exonuclease I suggests how processivity is achieved. *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 1125–1128.
38. Yamagata, A., Kakuta, Y., Masui, R. and Fukuyama, K. (2002) The crystal structure of exonuclease RecJ bound to Mn<sup>2+</sup> ion suggests how its characteristic motifs are involved in exonuclease activity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **99**, 5908–5912.
39. Han, E. S., Cooper, D. L., Persky, N. S., Sutera, V. A., Whitaker, R. D., Montello, M. L. and Lovett, S. T. (2006) RecJ exonuclease: substrates, products and interaction with SSB. *Nucleic Acids Res.*, **34**, 1084–1091.
40. Sandigursky, M., Mendez, F., Bases, R. E., Matsumoto, T. and Franklin, W. A. (1996) Protein-protein interactions between the *Escherichia coli* single-stranded DNA-binding protein and exonuclease I. *Radiat. Res.*, **145**, 619–623.
41. Shereda, R., Bernstein, D. A. and Keck, J. (2007) A central role for SSB in *Escherichia coli* RecQ DNA helicase function. *J. Biol. Chem.*, **282**, 19247–19258.
42. Hishida, T., Han, Y. W., Shibata, T., Kubota, Y., Ishino, Y., Iwasaki, H. and Shitagawa, H. (2004) Role of the *Escherichia coli* RecQ DNA helicase in SOS signaling and genome stabilization at stalled replication forks. *Genes Dev.*, **18**, 1886–1897.
43. Gulston, M., Fulford, J., Jenner, T., de-Lara, C. and O'Neill, P. (2002) Clustered damage induced by gamma radiation in human fibroblasts (HF19), hamster (V79-4) cells and plasmid DNA revealed as Fpg and Nth sensitive sites. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 3464–3472.
44. Frelon, S., Douki, T., Ravanat, J., Pouget, J., Tornabene, C. and Cadet, J. (2000) High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry measurement of radiation-induced base damage to isolated and cellular DNA. *Chem. Res. Toxicol.*, **13**, 1002–1010.
45. Shikazono, N., Pearson, C., O'Neill, P. and Thacker, J. (2006) The roles of specific glycosylases in determining the mutagenic consequences of clustered DNA base damage. *Nucleic Acids Res.*, **34**, 3722–3730.
46. Dianov, G., Sedwick, B., Daly, G., Olsson, M., Lovett, S. T. and Lindhal, T. (1994) Release of 5'-terminal deoxyribose-phosphate residues from incised abasic sites in DNA by the *Escherichia coli* RecJ protein. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 993–998.
47. Salles, B. and Defais, M. (1984) Signal of induction of recA protein in *E. coli*. *Mutat. Res.*, **131**, 53–59.
48. Sassanfar, M. and Roberts, J. (1990) Nature of the SOS-inducing signal in *Escherichia coli*; the involvement of DNA replication. *J. Mol. Biol.*, **212**, 79–96.
49. Roldán-Arjona, T. and Sedgwick, B. (1996) DNA base damage induced by ionizing radiation recognized by *Escherichia coli* UvrABC nuclease but not Nth or Fpg proteins. *Mol. Carcinog.*, **16**, 188–196.
50. Radman, M. (1999) Enzymes of evolutionary change. *Nature*, **401**, 866–867869.
51. Friedberg, E. and Gerlach, V. (1999) Novel DNA polymerases offer clues to the molecular basis of mutagenesis. *Cell*, **98**, 413–416.

Received on December 14, 2007; revised on February 15, 2008;  
accepted on March 14, 2008